



Leptin-Ria-CT

KIPMR44

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
210603	230727
Old DIAsource logo	New DiaSource logo



Human-Leptin-RIA-CT

Radioimmunoassay with Coated Tubes for the Quantitative Detection of
human Leptin in serum and plasma
KIPMR44
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

en

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ Measures total Leptin concentration in **serum, EDTA/Heparin plasma**
- ◆ Calibrated against the **WHO** International Standard: **NIBSC Code 97/594**
- ◆ High affinity antibodies, no influence of Leptin Bindingprotein
- ◆ Ready-to-use calibrators with **0-64 ng/ml**
- ◆ Small serum volumina sufficient, measurement in capillar blood possible
- ◆ Easy handling

INTRODUCTION

Leptin, the product of the ob gene (1,2), is a discovered single-chain proteohormone, discovered in 1994, with a molecular weight of 16 kD, which is thought to play a key role in the regulation of body weight. Its amino acid sequence exhibits no major homologies with other proteins (1). Leptin is almost exclusively produced by differentiated adipocytes (3-5). It acts on the central nervous system, in particular the hypothalamus, thereby suppressing food intake and stimulating energy expenditure (2,6-9). Leptin receptors - alternatively spliced forms exist that differ in length - belong to the cytokine class I receptor family (10-12). They are found ubiquitously in the body (10, 11, 13, 14) indicating a general role of leptin, which is currently not fully understood. A circulating form of the leptin receptor exists which acts as one of several leptin binding proteins (15). Besides its metabolic effects, leptin was shown to have a strong influence on a number of endocrine axes. In male mice, it blunted the starvation-induced marked decline of LH, testosterone, thyroxine and the increase of ACTH and corticosterone. In female mice, leptin prevented the starvation-induced delay in ovulation (16). Ob/ob mice, which are leptin deficient due to an ob gene mutation, are infertile. This defect could be corrected by administration of leptin, but not through weight loss due to fasting (17), suggesting that leptin is pivotal for reproductive functions.

All these actions may, at least in part, be explained by the suppressive effect of leptin on neuropeptide Y (NPY) expression and secretion by neurons in the arcuate nucleus (6,18,19). NPY is a strong stimulator of appetite (20,21) and is known to be involved in the regulation of various pituitary hormones, e.g. suppression of GH through stimulation of somatostatin (22,23), suppression of gonadotropins (23) or stimulation of the pituitary-adrenal axis (21).

The most important variable that determines circulating leptin levels is body fat mass (24-26). Obviously, under conditions of regular eating cycles, leptin reflects the proportion of adipose tissue (27) showing an exponential relationship (37). This constitutive synthesis of leptin is modulated by a number of non-hormonal and hormonal variables. Stimulators in both rodents and humans are overfeeding (28,29), insulin (3,5,30-33) and glucocorticoids (5,34-36). Suppression has been shown for fasting (27), cAMP and beta-3-adrenoceptor agonists (35). From these findings it becomes clear that leptin is an integral component of various metabolic and endocrine feedback loops (38).

For clinical purposes, it is important to note that serum leptin levels show a moderate circadian variation with a peak during the night at about 2 a.m. (37). The leptin values at this time are about 30 to 100 % higher than the levels measured in the morning or early afternoon. This variation together with the influence of food intake needs to be taken into account, when blood samples are collected.

Under fairly standardized conditions, i.e. normal eating cycles and blood sampling in the morning or early afternoon, a single leptin measurement is informative.

For the appropriate interpretation of measured leptin levels, reference ranges are required. Because body fat mass is the major confounding variable, these ranges should be referred to measures of the percentage body fat such as body mass index (BMI) or percent body fat determined by, e.g., bioelectric impedance assessment (BIA). Leptin levels are higher in females than in males (38,39) and an age dependence was shown in children and adolescents (40). Therefore, reference ranges referring to measures of body fat should be stratified according to gender and pubertal development.

Leptin levels are high in most obese patients suggesting the presence of leptin insensitivity (20,26,37,38,41,42). In a small percentage of patients, however, leptin levels have been found inappropriately low with respect to their fat mass. It remains for future studies to prove that these patients represent a new pathophysiologic entity: leptin deficiency. Since leptin has also been shown to be of great importance for reproductive functions, possible new pathophysiologic mechanisms may be discovered relating infertility to insufficient leptin production.

The discovery of leptin has released an avalanche of research activities seeking to understand the regulation and actions of this new hormone. Most importantly, it has provided a key to better understand the physiology of body weight regulation and to unveil possible pathophysiologic mechanisms in both obesity and eating disorders. Further, it may provide new insights into certain causes of infertility.

INTENDED USE

This radio immunoassay kit is suited for measuring human leptin in serum or plasma (EDTA-/Heparin- Plasma).

Under conditions of normal eating cycles, measurement in a single blood sample collected in the morning or early afternoon is sufficient.

The comparison with BMI-related reference ranges may be useful to detect conditions of relative **leptin deficiency** as a possible cause of obesity or provide an indication for **leptin resistance** respectively.

Due to its high correlation with body fat mass leptin measurements under standardized conditions may be used as a simple and inexpensive test for determination of **body fat**.

PRINCIPLE

For the Radioimmunoassay for the determination of human Leptin a polyclonal rabbit-antibody of high specificity is used. Leptin is measured quantitatively and binding protein does not influence the test results. Tubes were coated with streptavidin and separation is facilitated by biotinylated anti-rabbit-antibody.

Calibrators are prepared of recombinant human leptin in concentrations between **1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 ng/ml**.

Calibration of the Assay

The Assays is calibrated against the International Standard for human leptin. The standard preparation of the WHO with code 97/594 (y) is available from the NIBSC (z). One ampoule of the preparation, reconstituted in 1 ml Assay Buffer, will be quantified with the nominal content of 5000 ng human leptin.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The analytical **sensitivity** of the assay yields **0.1 ng/ml** (2x SD of zero calibrators)

Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value [ng/ml]	Standard Deviation [ng/ml]	VC%
Sample 1	6	19.67	0.87	4.4
Sample 2	6	6.95	0.33	4.8

Inter-Assay-Variation

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC% (%)
Sample 1	8.975	0.48	5.3
Sample 2	6.3	0.32	5.1
Sample 3	20.9	1.05	5.0

Linearity

The Leptin RIA KIPMR44 can be used for diluted samples. The linearity of serum dilutions is excellent (Fig.9).

Recovery

Serum spiking experiments with recombinant human leptin yielded a recovery of 97% ($\pm$ 2%).

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, AND STORAGE

Serum as well as EDTA/Heparin **plasma samples** are suitable (significant deviation of hLeptin levels in corresponding Serum or -Plasma samples were not found). An external sample preparation prior to assay is not required.

Warning statement

Biotin concentrations of >125 ng/mL in the hLeptin kit showed significant interference with the assay system and result in false high values. Therefore samples from patients under high dose biotin therapy (>10 mg/day) cannot be used for Leptin measurement by this test.

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen at -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although Leptin levels were found to be unaffected by few cycles (5x) in our experiments.

The high sensitivity of the assay allows measurement of hLeptin in small sample volumes. Because of the wide effective range of this RIA kit a preparative sample dilution is generally not necessary. For most of the determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) **the use of undiluted samples 25 μl per tube, should be appropriate**. In case Leptin levels of more than 64 ng/ml are expected, eg. obese patients (BMI>35), the sample should and can be diluted, e.g. 1:10.

The hLeptin concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.

REAGENTS PROVIDED

ASS	BUF	Assay buffer (1 bottle, 125 ml; ready for use)
Ab	BIOT	Capture-antibody: anti-rabbit IgG, biotin-conjugated. Reconstitute in 7 ml Assay buffer. (1 bottle, 7 ml; lyophilized)
Ab		Specific antibody: rabbit-anti-human leptin antibody. Reconstitute in 7 ml Assay buffer. (1 bottle, 7 ml; lyophilized)
Ag	125I	Tracer: ^{125}I -leptin; < 2.85 μCi or < 105kBq respectively. Reconstitute in 13 ml Assay buffer. (1 bottle, 13 ml; lyophilized, red coloured)
CAL	N	Calibrators 1-7. (7 vials, 750 μl each; ready for use). Contain recombinant Leptin. Use 25 μl / tube. See exact values on the vial label

CONTROL	1
---------	---

Control 1

(1 vial, 0.75 ml; human serum; lyophilized). Reconstitute with 750 µl Assay buffer.

See exact values on the vial label



Tubes (125 streptavidin-coated tubes, ready for use)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (50, 100 and 500 µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips

Vortex-mixer

Device to aspirate the fluid from the tubes (recommended because of the potential danger of radioactivity and infection by human samples)

Shaking Device : 350 rpm

Gamma Counter

REAGENT PREPARATION

In conducting the assay, follow strictly the test protocol. Room temperature incubation means: Incubation at 20 - 25°C.

Reagents with different lot numbers should not be mixed. All reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

Control 1, Capture Antibody, Specific Antibody and Tracer have to be reconstituted in **Assay Buffer**. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 30 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

The shelf life of the reagents after opening is in accordance with Tracer's shelf life.

Reconstituted Components (**Control 1, Capture Antibody, Specific Antibody and Tracer**) should be stored at -20°C (or below). Repeated freeze-thaw cycles have to be avoided.

Before use, all kit components should be brought to room temperature. **Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Possession and use of the kit is subject to the regulations of the national nuclear regulatory authorities.

Reagents with different lot numbers should not be mixed.

- Reagents contain sodium azide as preservative, however, highly diluted (0.02%).
- Safety Data Sheet available on request.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought **to room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect** the assay. However, Values for the patient samples will not be affected.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control 1 provided in this kit was tested by recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibody. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Radioactivity - Before ordering or using radioactive materials, it is necessary to take the appropriate actions to ensure compliance with national regulations governing their use. Local rules in each establishment, which define actions and behaviour in the radioactivity working areas, should also be adhered to. The advice given here does not replace any local rules, instructions or training in the establishment, or advice from the radiation protection advisers. It is important to follow the code of good laboratory practice in addition to the specific precautions relating to the radionuclide I-125 used.

Iodine-125 has a radioactive half-life T_{1/2} of 60 days and emits 35.5 keV gamma radiation, 27 – 32 keV x-rays and no beta radiation. Shielding is effective done by lead, first half value layer is 0.02 mm lead, reduction to 10 % is made by 0.2 mm.

To reduce the radiation dose time spent handling radioactivity should be minimized (plan ahead), and distance from source of radiation should be maximized (doubling the distance from the source quarters the radiation dose).

Formation of aerosols, e.g. by improper opening and mixing of vials or pipetting of solutions which may cause minute droplets of radioactivity become airborne, is a hazard and should be avoided.

Solutions containing iodine should not be made acidic, because this might lead to the formation of volatile elemental iodine.

As some iodo-compounds can penetrate rubber gloves, it is advisable to wear two pairs, or polyethylene gloves over rubber.

For cleaning of contaminated areas or equipment, the Iodine-125 should be rendered chemically stable by using alkaline sodium thiosulphate solution together with paper or cellulose tissue.

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

The handling of radioactive and potentially infectious material must comply with the following guidelines:

The material should be stored and used in a special designated area.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Avoid direct contact with these materials by wearing laboratory coats and disposable gloves.

Spilled material must be wiped off immediately. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

Unused radioactive material and radioactive waste should be disposed according to the recommendations of the national regulatory authorities.

Warning statement

Biotin concentrations of >125 ng/mL in hLeptin showed significant interference with the assay system and result in false high values. Therefore samples from patients under high dose biotin therapy (>10 mg/day) cannot be used for Leptin measurement by this test.

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Calibrators, Control 1 and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Calibrators, Control 1 and the samples should be pipette as fast as possible.

Flow Chart of Assay Protocol

#	Tube	Assay Buffer, Calibrators, Control 1, Samples μl	Capture-antibody μl	Specific antibody μl	Tracer μl
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B ₀	Assay Buffer :25	50	50	100
5-18	Calibrators	Cal 1-7: 25	50	50	100
19,20	Control 1	Control 1: 25	50	50	100
21,22	Sample 1	25	50	50	100
23,24	Sample 2	25	50	50	100
etc...					

- 1) Labelling of the assay tubes should be done in the following order:
1, 2 total counts (**TC**),
3, 4 zero calibrator (**B₀**),
5 - 18 duplicates of calibrators (**1-7**),
19, 20 duplicates of control (**1**),
21, 22 etc. duplicates of samples.
- 2) Add **25 μl** of **Assay Buffer** to tubes 3 and 4.
Add **25 μl** of **Calibrators** to tubes 5 - 18:
5, 6 calibrator **1**
7, 8 calibrator **2**, etc...
- 3) Add **25 μl** of **control 1** to tubes 19 and 20.
- 4) Add **25 μl** of the first **sample** to tubes 21 and 22, etc.
- 5) Add **50 μl capture-antibody** beginning with tube 3.
- 6) Add **50 μl specific antibody** beginning with tube 3.
- 7) Add **100 μl tracer** to all tubes.
- 8) Remove tubes 1 and 2 (total counts) or seal with a stopper.
- 9) Shake the tubes on a shaking device (350 rpm) **overnight** (at least 15 h) **at room temperature**. (steps 9 to 12 may not be performed with tubes 1 & 2)
- 10) Aspirate the liquid (except tubes 1 and 2 !) completely.

Take care that the coating of the tubes remains intact. Depending on laboratory equipment and common laboratory practice, aspiration of the liquid can be replaced by careful decantation.
- 11) Add **500 μl** of **assay buffer** to the tubes (except tubes 1 and 2 !).
- 12) Aspirate the liquid (see step 10).
- 13) Count the radioactivity of **all** tubes in a Gamma Counter for 1 to 3 min.

CALCULATION OF RESULTS

Establishing the Calibration Curve

Calibrator	B ₀	1	2	3	4	5	6	7
ng/ml	0	1	2	4	8	16	32	64

1. Calculate the average counts of each pair of tubes. This equals to the binding value B.
2. The mean of the zero standard (tubes 3 and 4) equals B₀.
3. Calculate the percent bound (% B/B₀) by dividing the B values by B₀:
 $\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$.
4. Plot % B/B₀ versus the calibrator concentrations on a semi-logarithmic or logit-log paper respectively. For convenience, it is recommended to use computer assisted data reduction programs.
5. Calculate the 'percentage bound of the zero calibrator':
Average of tubes 3, 4 (B₀) divided by average of tubes 1, 2 (total counts) multiplied by 100%.
It should be $\%B_0/TC > 20\%$.

Evaluation of sample concentrations:

Read the concentration value (abscissa) corresponding to the %B/B₀ of the sample as in the example given below:

average counts of zero calibrator (B₀): 8648 cpm
average counts of sample tube: 4283 cpm

$$\begin{aligned}\%B/B_0 &= \text{sample counts} / B_0 \times 100\% \\ &= 4283 / 8648 \times 100\% \\ &= 0.495 \times 100\% = 49.5\%\end{aligned}$$

For a 49.5% value on the y-axis (ordinate) a value of 7.28 ng/ml on the x-axis (abscissa) may be obtained.

In case of dilution of the samples, multiplication of this value determined graphically or by the aid of a computer program with the dilution factor gives the leptin concentration of the sample.

Concentration of the control:

The control 1 should fit with the labelled concentration range. The measured Leptin concentration are only valid, if the measured value of the control is in the labelled concentration range. Otherwise process analysis is required and depending on the results the measured values are accepted or not.

EXPECTED NORMAL VALUES

Serum leptin levels are mainly determined by body fat mass with low levels in lean individuals and high levels in obese subjects. In addition, there is a clear gender difference with higher levels in females at a given percentage body fat. Further, leptin levels are influenced by pubertal development. Any attempt, therefore, to give ranges of expected leptin levels must account for these relationships.

Various methods for the estimation of body fat are available such as calculation of body mass index (weight (kg) divided by the square of height (m)) (BMI), bioelectric impedance assessment (BIA) or total body dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Although the accuracy of BMI with respect to reflecting true fat mass is inferior to other more sophisticated methods such as BIA or DXA, BMI provides a number of advantages:

- 1) It is independent of the regression models applied.
- 2) It is easy to determine, only weight and height measurements are required.
- 3) It is retrospectively mostly available.
- 4) It is the most precise measure during short-term changes of fat mass, e.g. during fasting.

Therefore, the following expectation ranges of serum leptin levels were referred to BMI as the major confounding independent variable and were stratified according to gender and pubertal development (45; see figures 1-8 and tables 4 - 11). After the age of 20 years, no significant age dependence was observed. These gender and age adjusted expectation ranges may be used to compare a measured leptin level at a given BMI with normal subjects to detect pathologic deviations.

The best-fit regression lines for the various subgroups are exponential curves of the form $\text{leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI})}$.

The 5th and 95th percentiles are given by the following equations:

$$\text{leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)} \text{ and } \text{leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)} \text{ respectively.}$$

In a semi-logarithmic plot (y-axis = log leptin), these curves give straight lines. The values for a, b and c are given in table 3 according to gender and pubertal stage and also for adults. Using these values, the expectation ranges of leptin levels can be easily extended to lower or higher BMI ranges if required.

Example:

The 50th percentile for boys at Tanner stages 3 and 4 is given by the following curve:

$$\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI})}$$

The 5th percentile is given by: $\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} - 1,1919)}$

and the 95th percentile is given by: $\text{leptin} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} + 1,1919)}$

In a semi-logarithmic plot, these lines are parallel with an equal distance to the 50th percentile.

Calculation of standard deviation scores (SDS; Z-scores)

A convenient method to detect any deviation of a measured leptin level from the corresponding reference range is to calculate its standard deviation score by relating the leptin level at the patient's BMI to the average leptin value of the corresponding sex and age group and expressing its deviation by the x-fold standard deviation. This method may be considered as normalization to the normal reference cohort. Thus, the leptin values can be adjusted for BMI, gender and pubertal stage/age (i.e., the influence of gender, age and BMI are removed) and may be pooled for further analysis.

Accounting for the logarithmic distribution of leptin levels, the leptin SDS can be calculated by the following equation:

$$\text{leptin SDS} = (\ln(\text{leptin}) - \ln(a) - b \cdot \text{BMI}) / d$$

In this equation, $\ln$ represents the natural logarithm (referring to the basis e). The constants a , b and d are given in table 3 according to gender and pubertal stage/age.

Example:

A boy at Tanner stage 3, BMI = 25 kg/m², measured leptin concentration = 5 ng/ml.

$$\begin{aligned}\text{leptin SDS} &= (\ln(5) - \ln(0.0181) - 0.2067 \cdot 25) / 0.6850 = \\ &= (1.6094 - (-4.0118) - 5.1675) / 0.6850 = 0.66\end{aligned}$$

Estimation of optimal dilution of samples

Because serum leptin levels vary widely over several orders of magnitude, depending mainly on the body fat mass, adequate dilution might be a prerequisite for precise measurement. Therefore, samples should be diluted such, that the leptin concentration is near this value in order to take maximum advantage of the precision of the kit. The reference ranges provide a useful tool for a good estimation of the expected leptin value according to BMI, gender and age.

Example:

Adult woman, BMI = 45 kg/m² (130 kgs, 1.70 m height). From the reference range for adult women, the average leptin level at a BMI of 45 kg/m² is approximately 224 ng/ml. The optimal dilution would be 1:30.

APPENDIX

Table 3: Constants a, b, c and d for calculation of leptin reference ranges and leptin SDS based on BMI. Groups of normal healthy individuals were stratified according to gender and pubertal stage/age. TS= Tanner stage, n= number of subjects, a,b,c and d = constants as defined in the text.

Groups	n	a	b	c	d
Males					
TS 1&2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3&4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Adults	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Females					
TS 1&2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3&4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Adults	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Table 4: Girls Tanner stages 1 and 2

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.22	0.30	0.66	1.45	1.99
12	0.28	0.39	0.85	1.86	2.56
13	0.36	0.50	1.09	2.38	3.29
14	0.46	0.64	1.40	3.06	4.22
15	0.60	0.82	1.79	3.93	5.42
16	0.76	1.05	2.30	5.04	6.96
17	0.98	1.35	2.95	6.47	8.93
18	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
19	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
20	2.07	2.85	6.25	13.7	18.9
21	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
22	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
23	4.37	6.03	13.2	29.0	40.0
24	5.62	7.75	17.0	37.2	51.4
25	7.21	9.95	21.8	47.8	65.9
26	9.26	12.8	28.0	61.4	84.7
27	11.9	16.4	35.9	78.8	109.0
28	15.3	21.1	46.1	101.0	140.0
29	19.6	27.0	59.2	130.0	
30	15.2	34.7	76.1		
31	32.3	44.6	97.7		
32	41.5	57.2	125.0		
33	53.2	73.4			
34	68.4	94.3			
35	87.8	121.0			
36	113				
37	145				

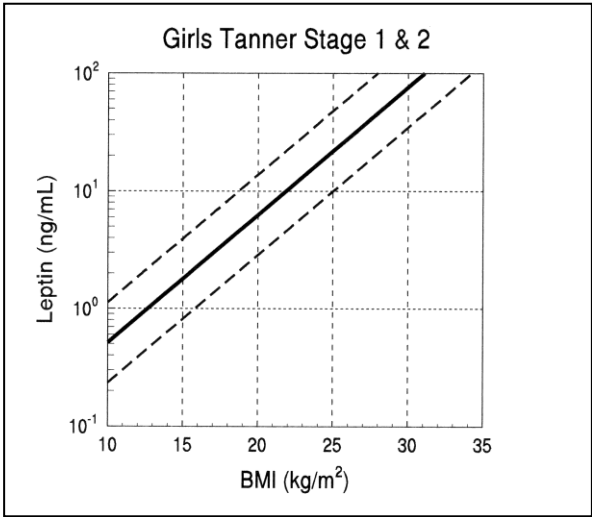


Figure 1: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: GirlsTanner stage 1 & 2 (see text for details)

Table 5: Boys Tanner stages 1 and 2

BMI (kg/m ²)	Percentile / Perzentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				

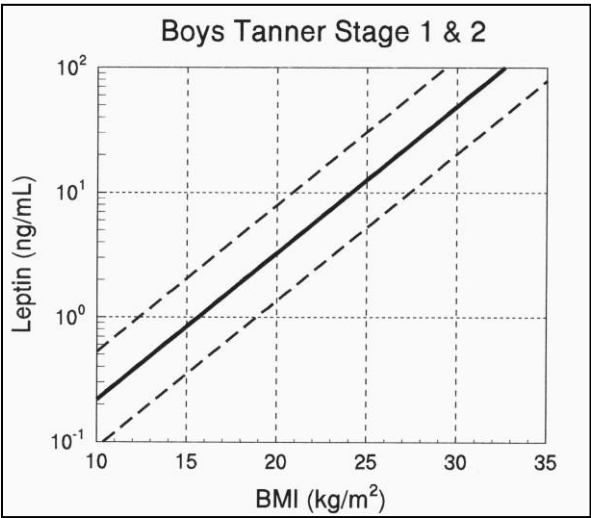


Figure 2: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 1 & 2 (see text for details)

Table 6: Girls Tanner stages 3 and 4.

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.32	0.41	0.73	1.29	1.63
12	0.41	0.52	0.92	1.63	2.06
13	0.52	0.66	1.16	2.07	2.61
14	0.65	0.83	1.47	2.61	3.31
15	0.83	1.05	1.87	3.31	4.19
16	1.05	1.33	2.36	4.19	5.30
17	1.33	1.68	2.99	5.30	6.71
18	1.68	2.13	3.78	6.71	8.49
19	2.13	2.69	4.79	8.5	10.8
20	2.69	3.41	6.06	10.7	13.6
21	3.41	4.31	7.67	13.61	17.2
22	4.32	5.46	9.71	17.2	21.8
23	5.46	6.91	12.3	21.8	27.6
24	6.91	8.75	15.6	27.6	34.9
25	8.75	11.1	19.7	34.9	44.2
26	11.1	14.0	24.9	44.2	56.0
27	14.0	17.7	31.6	56.0	70.9
28	17.8	22.5	39.9	70.9	89.7
29	22.5	28.4	50.5	89.7	114.0
30	28.4	36.0	63.9	114.0	144.0
31	36.0	45.6	80.9	144.0	
32	45.6	57.7	80.2	144.0	
33	57.7	73.0	102.0		
34	73.0	92.4	130.0		
35	92.4	117.0			
36	117.0	148.0			
37	148.0				

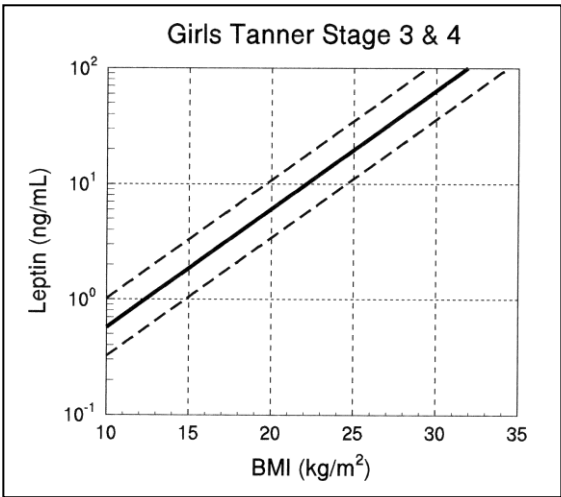


Figure 3: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

Table 7 : Boys Tanner stage 3 & 4

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.18	0.58	0.94
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		

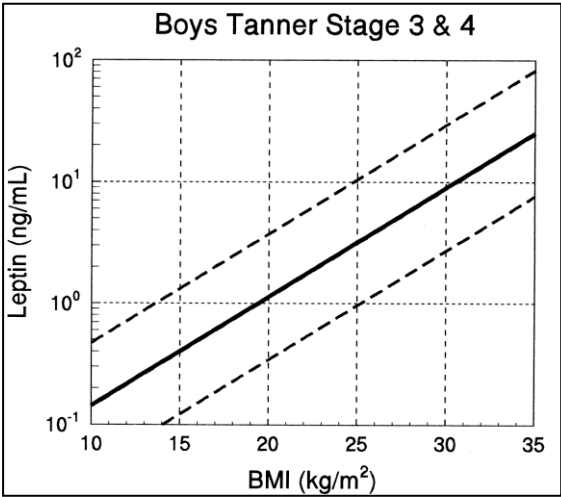


Figure 4: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 3 & 4 (see text for details).

Table 8 : Girls Tanner stage 5.

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
12	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
13	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
14	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
15	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
16	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
17	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
18	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
19	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
20	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
21	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
22	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
23	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
24	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
25	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
26	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
27	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
28	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
29	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
30	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
31	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
32	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
33	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
34	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
35	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
36	21.5	28.7	58.1	118.0	
37	25.0	33.4	67.6	137.0	
38	29.1	38.8	78.6		
39	33.8	45.1	91.4		
40	39.4	52.5	106.0		

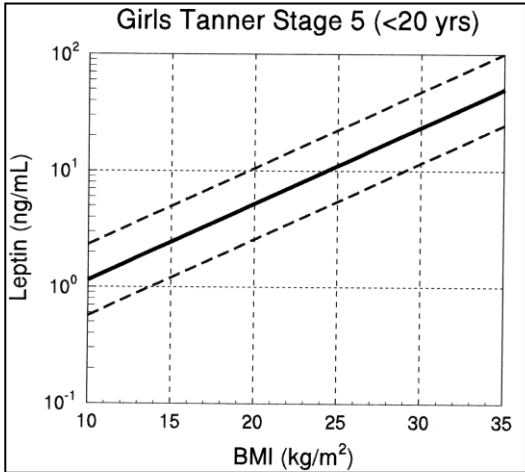


Figure 5: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Girls Tanner stage 5 (see text for details)

Table 9 : Boys Tanner stage 5

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

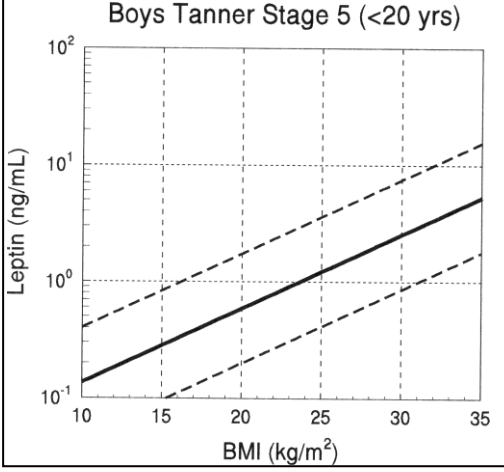


Figure 6: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Boys Tanner stage 5 (see text for details).

Table 10: Adult women

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.46	0.65	1.53	3.59	5.10
12	0.53	0.75	1.77	4.16	5.90
13	0.61	0.87	2.05	4.82	6.83
14	0.71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	7.82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0.95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10.0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1.99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7.67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8.88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28.0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46.0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7.87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9.97	14.1	33.3	78.2	111.0
33	11.5	16.4	38.5	90.5	129.0
34	13.4	19.0	44.6	105.0	149.0
35	15.5	22.0	51.6	121.0	
36	17.9	25.4	59.8	141.0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24.0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108.0		

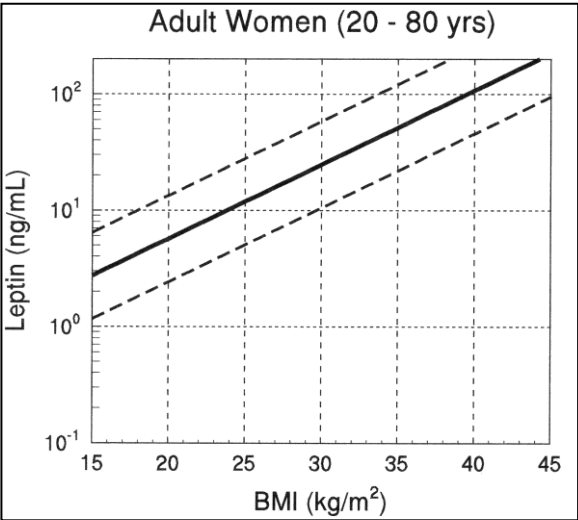


Figure 7: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult women (see text for details)

Table 11 Adult men

BMI (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		

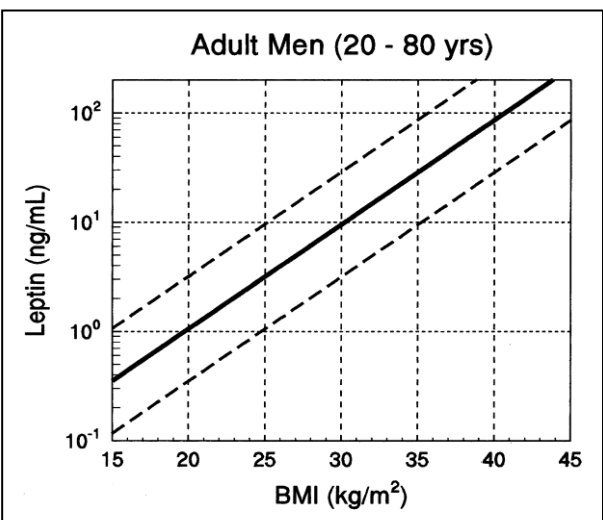


Figure 8: Reference ranges of human serum levels referring to BMI: Adult men (see text for details).

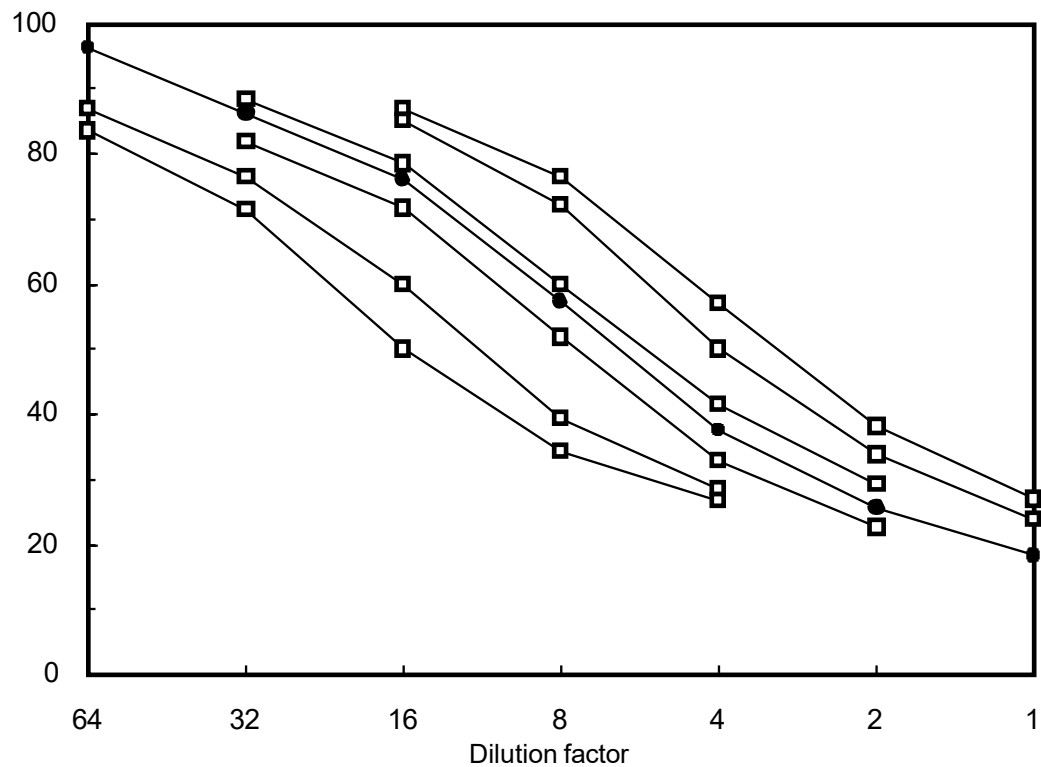


Figure 9: Serial dilution of leptin calibrator (filled circle) and different sera with varying concentrations of leptin. The leptin level of the undiluted calibrator was 16 ng/ml. Means of duplicate measurements are shown

REFERENCES

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Zatzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.
30. Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.

39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3424-3427.
40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics.* 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. *Horm Metab Res.* 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 348:159-161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol.* 27: 69-76.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin,s.318-326. In:Leptin -the voice of adipose tissue, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 88(11) 5169-5174
47. Guebre-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, *Nephrol Dial Transplant* 20: 129-134

SUMMARY – DIAsource Hu LEPTIN RIA KIPMR44

Reagent Preparation:	Reconstitution:
Capture Antibody	in 7 ml Assay Buffer
Specific Antibody	in 7 ml Assay Buffer
Tracer	in 13 ml Assay Buffer
Control 1	in 750 µl Assay Buffer
Plasma/Serum Samples can be used undiluted.	

Proposed Assay Procedure for Double Determination

Addition of Reagent [µl]					
Nr. of Tubes	Contents of Tubes	Assay Buffer Calibrators Control 1 Samples	Capture Antibody	Specific Antibody	Tracer
1,2	TC	–	–	–	100
3,4	B ₀	Ass Buf: 25	50	50	100
5-18	Calibrators	CAL 1-7: 25	50	50	100
19,20	Control 1	25	50	50	100
21,22	Sample 1	25	50	50	100
23,24 (etc)	Sample 2 (etc)	25	50	50	100

<u>Tubes Nr.:1,2 remove until counting the activity</u>
Incubate, over night, at least. 15 hours at RT, 350 rpm
Aspirate the liquid completely. Take care that the coating of the tubes remains intact.
Add 500 µl of Assay Buffer to the tubes.
Aspirate the liquid completely (see above).
Count the radioactivity of all tubes.

Revision Date : 2023-07-27

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



Human-Leptin-RIA-CT

Radioimmunoassay with Coated Tubes for the Quantitative Detection of
human Leptin in serum and plasma

KIPMR44

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

es

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium -
Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES TÉCNICAS

- ♦ Mide la concentración total de leptina en suero, plasma con EDTA o heparina
- ♦ Calibrado con referencia al patrón internacional de la OMS: código del NIBSC 97/594
- ♦ Anticuerpos de alta afinidad, sin influencia de la proteína de unión a la leptina
- ♦ Calibradores listos para usar con 0-64 ng/ml
- ♦ Un pequeño volumen de suero es suficiente, es posible la medición en sangre capilar
- ♦ Manipulación sencilla

INTRODUCCIÓN

La leptina, el producto del gen ob (1,2), se descubrió proteohormona monocatenaria, descubierta en 1994, con un peso molecular de 16 kD, que se cree juega un papel clave en la regulación del peso corporal. Su secuencia de aminoácidos no presenta ninguna homología importante con otras proteínas (1). La leptina es producida casi exclusivamente por adipocitos diferenciados (3-5). Actúa en el sistema nervioso central, en el hipotálamo en particular, suprimiendo así la ingesta de alimentos y estimulando el gasto de energía (2, 6-9). Los receptores de la leptina - existen formas alternativas de empalme que difieren en longitud - pertenecen a la familia de receptores de clase I de las citocinas (10-12). Se encuentran omnipresentes en el organismo (10, 11, 13, 14) lo que indica el papel general de la leptina, el cual no se entiende por completo actualmente. Existe una forma circulante del receptor de la leptina que actúa como una de varias proteínas de unión a la leptina. Además de sus efectos metabólicos, la leptina ha mostrado tener una fuerte influencia en una serie de ejes endocrinos. En ratones macho, mitigó el marcado descenso inducido por inanición de LH, testosterona, tiroxina y el aumento de ACTH y corticosterona. En ratones hembra, la leptina previno el retraso inducido por inanición en la ovulación (16). Los ratones ob/ob, deficientes en leptina debido a una mutación del gen ob, son infértiles. Este defecto podría corregirse mediante la administración de leptina, pero no por la pérdida de peso debida al ayuno (17), lo que sugiere que la leptina es fundamental para las funciones reproductoras.

Todas estas acciones pueden, al menos en parte, explicarse por el efecto supresor de la leptina sobre la expresión y secreción del neuropéptido Y (NPY) por las neuronas en el núcleo arcuato (6, 18, 19). El NPY es un gran estimulador del apetito (20, 21) y se sabe que está implicado en la regulación de varias hormonas pituitarias, p. ej. la supresión de GH a través de la estimulación de somatostatina (20, 23), la supresión de las gonadotropinas (23) o la estimulación del eje pituitario-adrenal (21).

La variable más importante que determina los niveles circulantes de leptina es la masa de grasa corporal (24-26). Obviamente, bajo condiciones de ciclos de alimentación regulares, la leptina refleja la proporción de tejido adiposo (27) mostrando una relación exponencial (37). Esta síntesis constitutiva de la leptina está modulada por una serie de variables hormonales y no hormonales. Los estimuladores, tanto en roedores como en seres humanos, son la sobrealimentación (28, 29), la insulina (3, 5, 30-33) y los glucocorticoides (5, 34-36). Se ha mostrado supresión para el ayuno (27), el AMPc y los agonistas de los adrenoreceptores beta 3 (35). De estos hallazgos queda claro que la leptina es un componente integral de varios circuitos de retroalimentación metabólica y endocrina (38).

A efectos clínicos, es importante observar que los niveles de leptina sérica muestran una variación circadiana moderada con un pico durante la noche a alrededor de las 2 a.m. (37). Los valores de leptina a esa hora son alrededor de un 30 a un 100 % más altos que los niveles medidos por la mañana o a primeras horas de la tarde. Esta variación, junto con la influencia de la ingesta de alimentos, debe tenerse en cuenta al obtener muestras sanguíneas.

Bajo condiciones relativamente normalizadas, es decir, ciclos de alimentación normales y obtención de muestras por la mañana o a primeras horas de la tarde, una sola medida de la leptina es informativa.

Para que la interpretación de los niveles de leptina medida sea adecuada hacen falta intervalos de referencia. Como la masa de grasa corporal es la principal variable de confusión, estos intervalos deberían hacer referencia a medidas del porcentaje de grasa corporal como el índice de masa corporal (IMC) o el porcentaje de grasa corporal determinado mediante, por ejemplo, un análisis por impedancia bioeléctrica (AIB). Los niveles de leptina son más elevados en las mujeres que en los hombres (38, 39) y han mostrado depender de la edad en niños y adolescentes (40). Por tanto, los intervalos de referencia referidos a medidas de grasa corporal deberían estratificarse según el sexo y el desarrollo puberal.

Los niveles de leptina son altos en la mayoría de pacientes obesos, lo que sugiere la existencia de insensibilidad a la leptina (20, 26, 37, 38, 41, 42). Sin embargo, en un pequeño porcentaje de pacientes los niveles de leptina han resultado ser inadecuadamente bajos con respecto a su masa de grasa. Queda para futuros estudios demostrar que estos pacientes representan una nueva entidad fisiopatológica: la deficiencia de leptina. Como la leptina también ha mostrado ser de gran importancia para las funciones reproductoras, podrían descubrirse nuevos mecanismos fisiopatológicos posibles que relacionen la infertilidad con la producción insuficiente de leptina.

El descubrimiento de la leptina ha desencadenado una avalancha de actividades en investigación que tratan de comprender la regulación y las acciones de esta nueva hormona. Y lo que es más importante, ha proporcionado la clave para entender mejor la fisiología de la regulación del peso corporal y para desvelar posibles mecanismos fisiopatológicos tanto de la obesidad como de los trastornos alimentarios. Asimismo, podría proporcionar nuevas perspectivas para ciertas causas de infertilidad.

INDICACIONES

Este radioinmunoensayo es adecuado para medir la leptina humana en suero o plasma (EDTA-/Heparin-plasma).

Bajo condiciones de alimentación normales, basta con obtener la medición en una sola muestra sanguínea extraída por la mañana o a primeras horas de la tarde.

La comparación con intervalos de referencia asociados al IMC puede ser útil para detectar situaciones de una relativa **deficiencia de leptina** como una posible causa de la obesidad o proporcionar una indicación de **resistencia a la leptina** respectivamente.

Debido a su alta correlación con la masa de grasa corporal, las mediciones de la leptina bajo condiciones normalizadas puede utilizarse como una prueba sencilla y económica para la determinación de la **grasa corporal**.

PRINCIPIO

Para la determinación de la leptina humana con el radioinmunoensayo se utiliza un anticuerpo policlonal de conejo de alta especificidad. La leptina se mide cuantitativamente, no influyendo la proteína de unión en los resultados de la prueba. Los tubos estaban recubiertos con estreptavidina y la separación se facilita mediante anticuerpo biotinilado anti-conejo.

Los Calibradores se preparan de leptina humana recombinante en concentraciones entre **1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 ng/ml**.

Calibración del ensayo

El ensayo se calibra con referencia al patrón internacional para leptina humana. La preparación de referencia de la OMS con el código 97/594 (y) está disponible en el NIBSC (z). Se cuantificará una ampolla de la preparación, reconstituida en 1 ml de tampón de ensayo, con el contenido nominal de 5000 ng de leptina humana.

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Sensibilidad

La **sensibilidad** analítica del ensayo arroja **0,1 ng/ml** (2x la DE de los calibradores cero)

Variación intraensayo

	Número de determinaciones	Valor medio [ng/ml]	Desviación estándar [ng/ml]	% VC
Muestra 1	6	19.67	0.87	4.4
Muestra 2	6	6.95	0.33	4.8

Variación interensayo

	Valor medio (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)	% VC (%)
Muestra 1	8.975	0.48	5.3
Muestra 2	6.3	0.32	5.1
Muestra 3	20.9	1.05	5.0

Linealidad

Leptin RIA KIPMR44 se puede utilizar para muestras diluidas. La linealidad de las diluciones séricas es excelente (fig. 9).

Recuperación

Los experimentos con suero a los que se añadió leptina humana recombinante arrojaron una recuperación del 97 % (± 2 %).

RECOGIDA, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El suero, así como las **muestras de plasma** con EDTA/heparina son adecuados (no se encontró una desviación significativa de los niveles de leptina humana en las muestras correspondientes de suero o plasma). No se precisa una preparación externa de la muestra antes de realizar el ensayo.

Declaración de advertencia

Las concentraciones de biotina > 125 ng / ml en hLeptin mostraron una interferencia significativa con el sistema de ensayo y dieron como resultado valores altos falsos. Por lo tanto, las muestras de pacientes que reciben dosis altas de biotina (> 10 mg / día) no pueden usarse para la medición de leptina con esta prueba.

Las muestras deben manipularse como se recomienda generalmente: lo más rápido posible y enfriarse lo antes posible. En el caso de que vaya a transcurrir un período de tiempo más largo entre la extracción de la muestra y la determinación, conserve las muestras sin diluir congeladas a -20 °C o menos en tubos de plástico herméticamente cerrados. Evítense en principio ciclos reiterados de congelación-descongelación del suero/plasma (si es necesario divida en partes alícuotas), aunque en nuestros experimentos los niveles de leptina no se vieron afectados por unos pocos ciclos (5x).

La alta sensibilidad de este ensayo permite la medición de la leptina humana en pequeños volúmenes de muestra. Gracias al amplio intervalo de eficacia de este kit de RIA, generalmente no es necesaria una dilución preparatoria de la muestra. **Para la mayoría de las determinaciones (muestras de suero o plasma, y valores esperados no extremos), el uso de muestras sin diluir de 25 µl por tubo debería**

ser apropiado. En el caso de esperarse niveles de leptina superiores a 64 ng/ml, p. ej. pacientes obesos (IMC > 35), la muestra puede y debería diluirse, p. ej. 1:10.

Las concentraciones de leptina humana pueden ser totalmente diferentes en líquidos corporales de origen humano distintos al suero o sobrenadante de cultivos celulares.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

ASS	BUF	Tampón de ensayo (1 frasco, 125 ml; listo para usar)
Ab	BIOT	Anticuerpo de captura: IgG anti-conejo conjugado con biotina. Reconstituya en 7 ml de tampón de ensayo. (1 frasco, 7 ml; liofilizado)
Ab		Anticuerpo específico: anticuerpo de conejo anti-leptina humana. Reconstituya en 7 ml de tampón de ensayo. (1 frasco, 7 ml; liofilizado)
Ag	125I	Trazador: ¹²⁵ I-leptina; < 2,85 µCi o < 105 kBq, respectivamente. Reconstituya en 13 ml de tampón de ensayo. (1 frasco, 13 ml; liofilizado, de color rojo)
CAL	N	Calibradores 1-7. (7 viales, 750 µl cada uno; listos para usar). Contienen leptina recombinante. Utilice 25 µl / tubo. Véanse los valores exactos en la etiqueta del vial.
CONTROL	1	Control 1 (1 vial, 0,75 ml; suero humano; liofilizado). Reconstituya con 750 µl de tampón de ensayo. Véanse los valores exactos en la etiqueta del vial.
		 Tubos (125 tubos recubiertos con estreptavidina, listos para usar)

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

Pipetas de precisión (50, 100 y 500 µl). Micropipetas y pipetas multicanal con puntas de plástico desechables

Agitador tipo vórtex

Dispositivo para aspirar el líquido de los tubos (recomendado debido al peligro potencial de radiactividad e infección por muestras humanas)

Dispositivo de agitación: 350 rpm

Contador gamma

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Siga estrictamente el protocolo de la prueba al realizar el ensayo. La incubación a temperatura ambiente quiere decir: incubación a 20 - 25 °C.

No deben mezclarse reactivos de distintos números de lote. Todos los reactivos son estables sin abrir hasta la fecha de caducidad si se conservan en la oscuridad a 2° - 8 °C (véase la etiqueta).

El control 1, el anticuerpo de captura, el anticuerpo específico y el trazador tienen que reconstituirse en **tampón de ensayo**. Se recomienda conservar los reactivos reconstituídos a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego mezclarlos completamente pero con suavidad (no debe formarse espuma) con un agitador tipo vórtex.

El período de validez de los reactivos después de la apertura está de acuerdo con la vida útil de Tracer. Los reactivos reconstituídos (**control 1, anticuerpo de captura, anticuerpo específico y trazador**) deben conservarse a -20 °C (o menos). Deben evitarse ciclos repetidos de congelación-descongelación.

Todos los componentes del kit deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. **Los precipitados, posibles en los tampones, deben disolverse antes de usar estos mezclándolos y calentándolos.**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Solo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.

La posesión y utilización del kit están sujetas a la normativa de las autoridades reguladoras nacionales en materia nuclear.

No deben mezclarse reactivos de distintos números de lote.

- Los reactivos contienen azida sódica como conservante, sin embargo, altamente diluida (0.02%).
- Hoja de datos de seguridad disponible bajo pedido.

Los reactivos contienen azida sódica como conservante, aunque muy diluido (0,02 %). La azida sódica es muy tóxica; deben tenerse en cuenta las frases R: 28, 32, 50/53 y las frases S: 28, 45, 60, 61.

Lea las instrucciones atentamente y por completo antes de comenzar el ensayo. Utilice la versión válida del prospecto facilitado con el kit. Asegúrese de entenderlo todo.

Todos los componentes del kit deben estar a **temperatura ambiente a 20 - 25 °C** antes de usar. Los precipitados de los tampones deben disolverse antes de usar estos mezclándolos y calentándolos. **La temperatura AFECTARÁ** al ensayo. Sin embargo, no afectará a los valores de las muestras de pacientes.

No use material obvio dañado o contaminado con microbios o derramado.

Precaución: Este kit contiene material de origen humano y/o animal. El suero de origen humano del control 1 proporcionado en este kit fue probado por los métodos recomendados y resultó no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), ni para anticuerpos del virus de la hepatitis C (VHC) y del virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH). Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de la ausencia de microorganismos infecciosos; por tanto, todos los componentes y muestras de pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Radiactividad - Antes de pedir o utilizar materiales radiactivos, es necesario tomar las medidas oportunas para garantizar el cumplimiento de la normativa nacional que regula su uso. Asimismo, deberán observarse las disposiciones locales de cada establecimiento que definen las medidas y procedimientos en las zonas de trabajo radiactivas. Las recomendaciones que se proporcionan en el presente documento no sustituyen ninguna disposición local, las instrucciones o la formación en el establecimiento, ni las recomendaciones de asesores para la protección frente a la radiación. Es importante seguir el código de buenas prácticas de laboratorio además de las precauciones específicas relacionadas con el radionúclido I-125 utilizado.

El yodo-125 tiene una semivida radioactiva T1/2 de 60 días y emite 35,5 keV de radiación gamma, rayos X de 27 – 32 keV y ninguna radiación beta. La protección eficaz se realiza con plomo, la primera capa de valor medio del plomo es de 0,02 mm, la reducción al 10 % se hace con 0,2 mm.

Para reducir la dosis de radiación debe minimizarse el tiempo que se pasa manipulando radiactividad (planifique por adelantado) y debe maximizarse la distancia de la fuente de radiación (duplicar la distancia disminuye en un cuarto la dosis de radiación).

La formación de aerosoles, p. ej. al abrir y mezclar incorrectamente los viales o al pipetear soluciones que podrían hacer que diminutas gotitas de radiactividad fueran transportadas por el aire, es un peligro que debe evitarse.

Las soluciones que contienen yodo no deben hacerse ácidas ya que esto podría dar lugar a la formación de yodo elemental volátil. Como algunos compuestos yodados pueden penetrar a través de los guantes de goma, se aconseja llevar dos pares o llevar guantes de polietileno sobre los de goma.

Para la limpieza de zonas o equipos contaminados, el yodo-125 debe estabilizarse químicamente empleando servilletas de papel o celulosa con solución alcalina de tiosulfato sódico.

Procedimientos generales de primeros auxilios:

Contacto con la piel: lávese bien la zona afectada con agua. Tire la ropa y calzado contaminados.

Contacto con los ojos: en caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua durante 15 minutos como mínimo.

Para que el lavado sea efectivo abra los párpados.

Ingestión: si se ingiere, enjuáguese la boca con abundante agua. Consulte a un médico inmediatamente.

No coma, beba ni fume en estas zonas.

No pipetee nunca con la boca los materiales.

El material derramado debe limpiarse de inmediato y desinfectarse. Limpie las zonas y equipos contaminados con un detergente apropiado.

Para la manipulación de material radiactivo y potencialmente infeccioso deben observarse las recomendaciones siguientes:

El material debe conservarse y utilizarse en una zona especial que se haya designado para tal fin.

No coma, beba ni fume en estas zonas.

No pipetee nunca con la boca los materiales.

Evite el contacto directo con estos materiales llevando batas de laboratorio y guantes desechables.

El material derramado debe limpiarse inmediatamente. Limpie las zonas y equipos contaminados con un detergente apropiado.

El material radiactivo no utilizado y los residuos radiactivos deben eliminarse de conformidad con las recomendaciones de las autoridades reguladoras nacionales.

Declaración de advertencia

Las concentraciones de biotina > 125 ng / ml en hLeptin mostraron una interferencia significativa con el sistema de ensayo y dieron como resultado valores altos falsos. Por lo tanto, las muestras de pacientes que reciben dosis altas de biotina (> 10 mg / día) no pueden usarse para la medición de leptina con esta prueba.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

NOTAS: Todas las determinaciones (calibradores, control 1 y muestras) deben analizarse por duplicado. Se recomiendan un pipeteo preciso y la adherencia al protocolo para obtener unos resultados óptimos.

Al realizar el ensayo, los calibradores, el control 1 y las muestras deben pipetearse lo más rápido posible.

Cuadro del protocolo del ensayo

N.º	Tubo	Tampón de ensayo, calibradores, control 1, muestras µl	Anticuerpo de captura µl	Anticuerpo específico µl	Trazador µl
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B0	Tampón de ensayo: 25	50	50	100
5-18	Calibradores	Cal 1-7: 25	50	50	100
19,20	Control 1	Control 1: 25	50	50	100
21,22	Muestra 1	25	50	50	100

23,24	Muestra 2	25	50	50	100
etc.					

- 1) El etiquetado de los tubos del ensayo debe realizarse en el orden siguiente:
 - 1, 2 recuentos totales (**TC**),
 - 3, 4 calibrador cero (**B₀**),
 - 5 - 18 duplicados de calibradores (**1-7**),
 - 19, 20 duplicados del control (**1**),
 - 21, 22, etc. duplicados de muestras.
- 2) Añada **25 µl** de **tampón de ensayo** a los tubos 3 y 4.
 Añada **25 µl** de **calibradores** a los tubos 5 - 18:
 - 5, 6 calibrador **1**
 - 7, 8 calibrador **2**, etc.
- 3) Añada **25 µl** de **control 1** a los tubos 19 y 20.
- 4) Añada **25 µl** de la primera **muestra** a los tubos 21 y 22, etc.
- 5) Añada **50 µl** de **anticuerpo de captura** empezando por el tubo 3.
- 6) Añada **50 µl** de **anticuerpo específico** empezando por el tubo 3.
- 7) Añada **100 µl** de **trazador** a todos los tubos.
- 8) Retire los tubos 1 y 2 (recuentos totales) o tape con un tapón.
- 9) Agite los tubos en un dispositivo de agitación (350 rpm) **por la noche** (al menos 15 h) **a temperatura ambiente** (los pasos 9 al 12 pueden no realizarse con los tubos 1 y 2).
- 10) Aspire el líquido (excepto el de los tubos 1 y 2) completamente.

 Tenga cuidado de que el recubrimiento de los tubos permanezca intacto. Dependiendo del equipo del laboratorio y de las prácticas habituales de este, la aspiración del líquido puede sustituirse por una cuidadosa decantación.
- 11) Añada **500 µl** de **tampón de ensayo** a los tubos (excepto los tubos 1 y 2).
- 12) Aspire el líquido (véase el paso 10).
- 13) Mida la radiactividad de **todos** los tubos en un contador gamma durante 1 a 3 min.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Establecimiento de la curva de calibración

Calibrador	B ₀	1	2	3	4	5	6	7
ng/ml	0	1	2	4	8	16	32	64

1. Calcule el promedio de recuentos de cada par de tubos. Esto es igual al valor de unión B.
2. La media del patrón cero (tubos 3 y 4) es igual a B₀.
3. Calcule el porcentaje unido (% B/B₀) dividiendo los valores de B entre B₀:
 $\% B/B_0 = B/B_0 \times 100 \%$
4. Represente el % B/B₀ en función de las concentraciones de los calibradores en papel semilogarítmico o logit-log, respectivamente. Se recomienda por comodidad utilizar programas informáticos de reducción de datos.
5. Calcule el 'porcentaje unido del calibrador cero':
 El promedio de los tubos 3, 4 (B₀) dividido por el promedio de los tubos 1, 2 (recuentos totales) multiplicado por el 100 %.
 Debería ser % B₀/TC > 20 %.

Evaluación de las concentraciones de las muestras:

Lea el valor de la concentración (abscisas) correspondiente al % B/B₀ de la muestra según el ejemplo que se indica a continuación:

Promedio de recuentos del calibrador cero (B₀): 8648 cpm
 Promedio de recuentos del tubo de muestra: 4283 cpm

$$\begin{aligned} \% B/B_0 &= \text{recuentos de muestras} / B_0 \times 100 \% \\ &= 4283 / 8648 \times 100 \% \\ &= 0,495 \times 100 \% = 49,5 \% \end{aligned}$$

Para un valor del 49,5 % en el eje de las Y (ordenadas) puede obtenerse un valor de 7,28 ng/ml en el eje de las X (abscisas). En el caso de dilución de las muestras, la multiplicación de este valor determinado gráficamente o mediante la ayuda de un programa informático por el factor de dilución da la concentración de leptina de la muestra.

Concentración del control:

El control 1 debe encontrarse dentro del intervalo de concentración de la etiqueta. La concentración de leptina medida solo es válida si el valor medido del control está dentro del intervalo de concentración etiquetado. De lo contrario, es preciso un análisis del proceso y dependiendo de los resultados se aceptarán o no los valores medidos.

VALORES NORMALES ESPERADOS

Los niveles de leptina sérica se determinan principalmente mediante la masa de grasa corporal con niveles bajos en individuos delgados y niveles altos en sujetos obesos. Además, existe una clara diferencia según el sexo, con niveles más altos en las mujeres para un porcentaje dado de grasa corporal. Lo que es más, el desarrollo puberal influye en los niveles de leptina. Por tanto, toda tentativa de proporcionar intervalos de los niveles de leptina esperados debe tener en cuenta estas relaciones.

Existen varios métodos para la estimación de la grasa corporal como el cálculo del índice de masa corporal (IMC) (peso, en kg, dividido por el cuadrado de la altura, en m), el análisis por impedancia bioeléctrica (AIB) o la absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) corporal total. Aunque la exactitud del IMC con respecto a reflejar la verdadera masa de grasa es inferior a la de otros métodos más sofisticados como el AIB o la DXA, el IMC proporciona una serie de ventajas:

- 1) Es independiente de los modelos de regresión aplicados.
- 2) Es fácil de determinar, solo se necesitan medidas del peso y la altura.
- 3) Está disponible generalmente retrospectivamente.
- 4) Es la medida más precisa durante los cambios a corto plazo de la masa de grasa, p. ej. durante el ayuno.

Por tanto, los siguientes intervalos de los niveles de leptina sérica esperados se refirieron al IMC como la principal variable independiente de confusión y se estratificaron por sexo y desarrollo puberal (45; véanse las figuras 1-8 y las tablas 4-11). Después de los 20 años, no se observó ninguna dependencia significativa de la edad. Estos intervalos esperados ajustados por sexo y edad pueden utilizarse para comparar un nivel de leptina medido para un IMC determinado con sujetos normales a fin de detectar desviaciones patológicas.

Las líneas de regresión de mejor ajuste de los diversos subgrupos son curvas exponenciales de la forma leptina = $a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC})}$. Los percentiles 5 y 75 vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$\text{leptina} = a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC} - c)} \text{ y } \text{leptina} = a \cdot e^{(b \cdot \text{IMC} + c)}, \text{ respectivamente.}$$

En una representación semilogarítmica (eje Y = log leptina), estas curvas dan líneas rectas. Los valores de a, b y c se indican en la tabla 3 por sexo y estadio puberal, y también para adultos. Con estos valores, los intervalos de los niveles de leptina esperados se pueden extender fácilmente a intervalos del IMC menores o mayores si es preciso.

Ejemplo:

El percentil 50 de los chicos en los estadios de Tanner 3 y 4 viene determinado por la curva siguiente:

$$\text{leptina} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC})}$$

$$\text{El percentil 5 viene dado por: } \text{leptina} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC} - 1,1919)}$$

$$\text{y el percentil 95 viene dado por: } \text{leptina} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC} + 1,1919)}$$

En una representación semilogarítmica, estas líneas son paralelas con una distancia igual al percentil 50.

Cálculo de las puntuaciones de la desviación estándar (PDE; puntuaciones Z)

Un método práctico de detectar cualquier desviación de un nivel de leptina medido del intervalo de referencia correspondiente es calcular su puntuación de desviación estándar relacionando el nivel de leptina para el IMC del paciente con el valor promedio de la leptina del sexo y grupo de edad correspondiente y expresando su desviación por X veces la desviación estándar. Este método puede considerarse como la normalización para la cohorte de referencia normal. Así, se pueden ajustar los niveles de leptina para el IMC, el sexo y estadio/edad puberal (es decir, se elimina la influencia del sexo, edad e IMC) y se pueden agrupar para posteriores análisis.

Teniendo en cuenta la distribución logarítmica de los niveles de leptina, la PDE de la leptina se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\text{PDE leptina} = (\ln(\text{leptina}) - \ln(a) - b \cdot \text{IMC}) / d$$

En esta ecuación, ln representa el logaritmo natural (referido a la base e). Las constantes a, b y d se indican en la tabla 3 por sexo y estadio/edad puberal.

Ejemplo:

Un chico en el estadio 3 de Tanner con un IMC = 25 kg/m², concentración de leptina medida = 5 ng/ml.

$$\begin{aligned} \text{PDE leptina} &= (\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 \cdot 25) / 0,6850 = \\ &= (1,6094 - (-4,0118) - 5,1675) / 0,6850 = 0,66 \end{aligned}$$

Estimación de la dilución óptima de las muestras

Como los niveles de leptina sérica varían mucho con respecto a varias órdenes de magnitud, dependiendo principalmente de la masa de grasa corporal, una dilución adecuada podría ser un requisito previo para obtener una medición precisa. Por tanto, las muestras deberían diluirse de modo que la concentración de leptina esté cerca de este valor para aprovechar al máximo la precisión del kit. Los intervalos de referencia proporcionan una herramienta útil para hacer una buena estimación del valor esperado de la leptina según el IMC, el sexo y la edad.

Ejemplo:

Mujer adulta, IMC = 45 kg/m² (130 kg, 1,70 m de altura). A partir del intervalo de referencia para mujeres adultas, el promedio del nivel de leptina para un IMC de 45 kg/m² es de 224 ng/ml aproximadamente. La dilución óptima sería de 1:30.

APÉNDICE

Tabla 3: Las constantes a, b, c y d para el cálculo de los intervalos de referencia de la leptina y la PDE de la leptina se basan en el IMC. Los grupos de individuos sanos normales se estratificaron por sexo y estadio/edad puberal. TS = estadio de Tanner, n = números de sujetos, a, b, c y d = constantes definidas en el texto.

Grupos	n	a	b	c	d
Hombres					
TS 1 y 2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3 y 4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Adultos	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Mujeres					
TS 1 y 2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3 y 4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Adultos	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Tabla 4: Estadios de Tanner 1 y 2 para chicas

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.22	0.30	0.66	1.45	1.99
12	0.28	0.39	0.85	1.86	2.56
13	0.36	0.50	1.09	2.38	3.29
14	0.46	0.64	1.40	3.06	4.22
15	0.60	0.82	1.79	3.93	5.42
16	0.76	1.05	2.30	5.04	6.96
17	0.98	1.35	2.95	6.47	8.93
18	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
19	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
20	2.07	2.85	6.25	13.7	18.9
21	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
22	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
23	4.37	6.03	13.2	29.0	40.0
24	5.62	7.75	17.0	37.2	51.4
25	7.21	9.95	21.8	47.8	65.9
26	9.26	12.8	28.0	61.4	84.7
27	11.9	16.4	35.9	78.8	109.0
28	15.3	21.1	46.1	101.0	140.0
29	19.6	27.0	59.2	130.0	
30	15.2	34.7	76.1		
31	32.3	44.6	97.7		
32	41.5	57.2	125.0		
33	53.2	73.4			
34	68.4	94.3			
35	87.8	121.0			
36	113				
37	145				

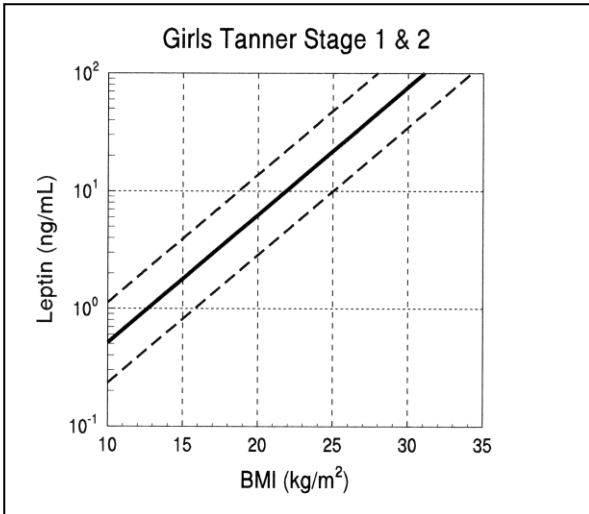


Figura 1: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadios de Tanner 1 y 2 para chicas (ver detalles en texto)

Tabla 5: Estadios de Tanner 1 y 2 para chicos

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				

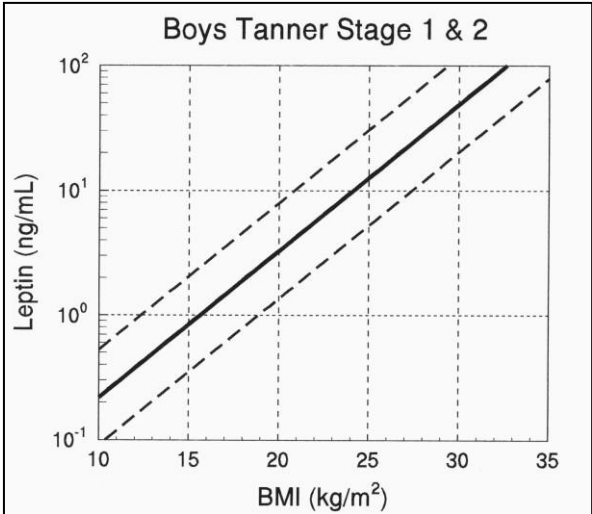


Figura 2: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadios de Tanner 1 y 2 para chicos (ver detalles en texto)

Tabla 6: Estadios de Tanner 3 y 4 para chicas

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.32	0.41	0.73	1.29	1.63
12	0.41	0.52	0.92	1.63	2.06
13	0.52	0.66	1.16	2.07	2.61
14	0.65	0.83	1.47	2.61	3.31
15	0.83	1.05	1.87	3.31	4.19
16	1.05	1.33	2.36	4.19	5.30
17	1.33	1.68	2.99	5.30	6.71
18	1.68	2.13	3.78	6.71	8.49
19	2.13	2.69	4.79	8.5	10.8
20	2.69	3.41	6.06	10.7	13.6
21	3.41	4.31	7.67	13.61	17.2
22	4.32	5.46	9.71	17.2	21.8
23	5.46	6.91	12.3	21.8	27.6
24	6.91	8.75	15.6	27.6	34.9
25	8.75	11.1	19.7	34.9	44.2
26	11.1	14.0	24.9	44.2	56.0
27	14.0	17.7	31.6	56.0	70.9
28	17.8	22.5	39.9	70.9	89.7
29	22.5	28.4	50.5	89.7	114.0
30	28.4	36.0	63.9	114.0	144.0
31	36.0	45.6	80.9	144.0	
32	45.6	57.7	80.2	144.0	
33	57.7	73.0	102.0		
34	73.0	92.4	130.0		
35	92.4	117.0			
36	117.0	148.0			
37	148.0				

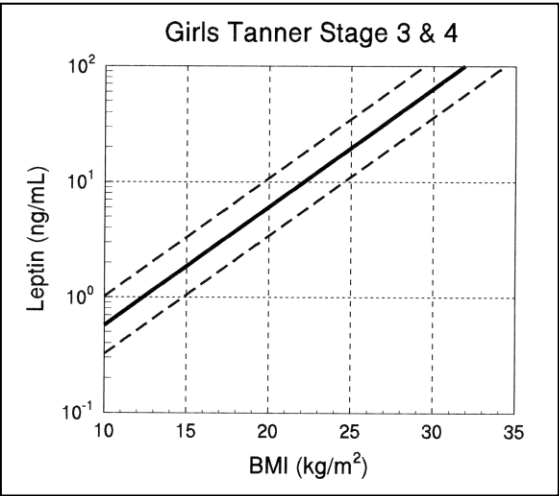


Figura 3: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadios de Tanner 3 y 4 para chicas (ver detalles en texto)

Tabla 7: Estadios de Tanner 3 y 4 para chicos

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.18	0.58	0.94
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		

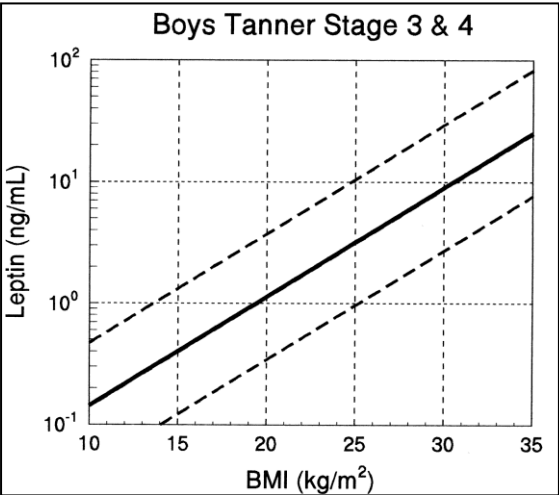


Figura 4: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadios de Tanner 3 y 4 para chicos (ver detalles en texto)

Tabla 8: Estadio de Tanner 5 para chicas

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
12	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
13	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
14	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
15	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
16	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
17	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
18	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
19	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
20	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
21	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
22	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
23	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
24	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
25	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
26	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
27	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
28	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
29	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
30	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
31	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
32	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
33	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
34	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
35	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
36	21.5	28.7	58.1	118.0	
37	25.0	33.4	67.6	137.0	
38	29.1	38.8	78.6		
39	33.8	45.1	91.4		
40	39.4	52.5	106.0		

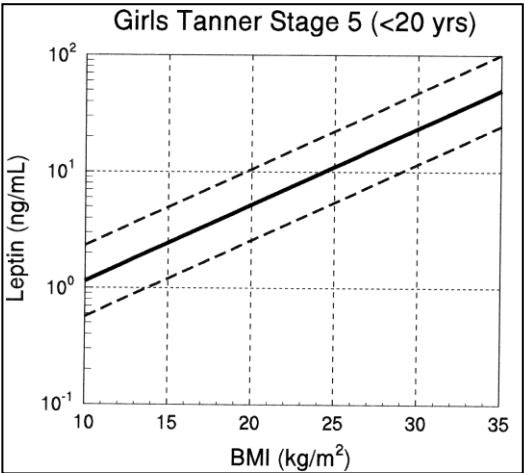


Figura 5: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadio de Tanner 5 para chicas (ver detalles en texto)

Tabla 9: Estadio de Tanner 5 para chicos

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

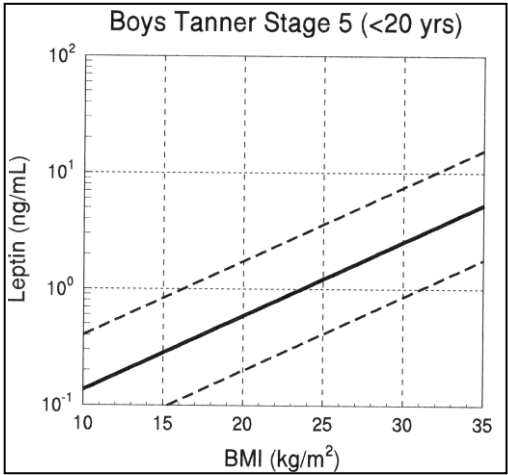


Figura 6: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: estadio de Tanner 5 para chicos (ver detalles en texto)

Tabla 10: Mujeres adultas

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.46	0.65	1.53	3.59	5.10
12	0.53	0.75	1.77	4.16	5.90
13	0.61	0.87	2.05	4.82	6.83
14	0.71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	7.82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0.95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10.0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1.99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7.67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8.88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28.0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46.0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7.87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9.97	14.1	33.3	78.2	111.0
33	11.5	16.4	38.5	90.5	129.0
34	13.4	19.0	44.6	105.0	149.0
35	15.5	22.0	51.6	121.0	
36	17.9	25.4	59.8	141.0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24.0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108.0		

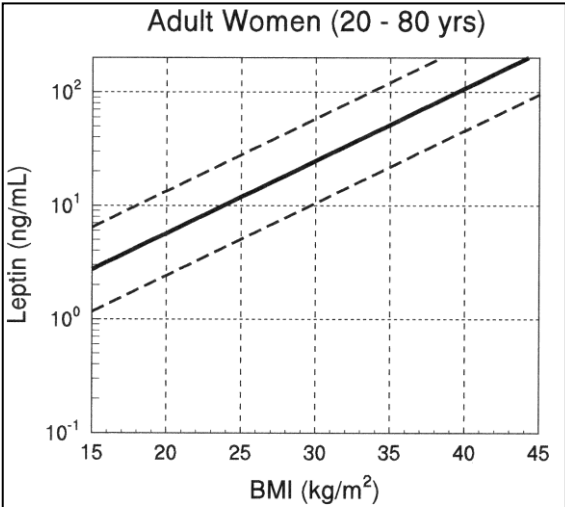


Figura 7: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: Mujeres adultas (ver detalles en texto)

Tabla 11: Hombres adultos

IMC (kg/m²)	Percentil (µg/l)				
	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		

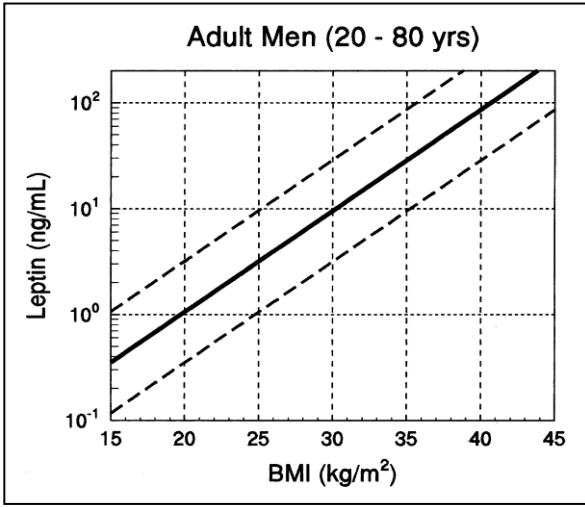


Figura 8: Intervalos de referencia de niveles séricos humanos referidos al IMC: Hombres adultos (ver detalles en texto)

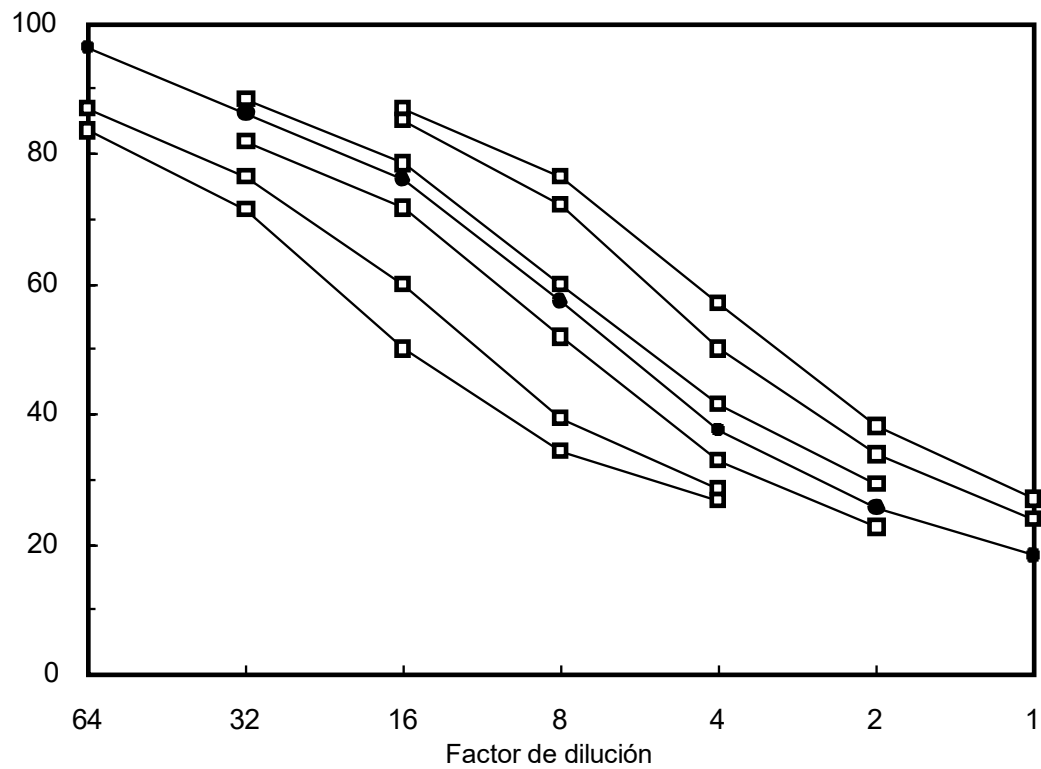


Figura 9: Dilución seriada del calibrador de leptina (círculo negro) y distintos sueros con concentraciones variables de leptina. El nivel de leptina del calibrador sin diluir fue de 16 ng/ml. Se muestran las medias de las mediciones duplicadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:515-519.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. RohnerJeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:312.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolarzinski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolarzinski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.
30. Saladin R, DeVos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, RohnerJeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolarzinski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskiran MR, Karonen SL, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. DeVos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and noninsulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, KasimKarakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-3427.

40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*. 98:201203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. *Horm Metab Res*. 28:718723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinalfluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 348:159161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol*. 27: 69-76.
44. Dirección NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Gran Bretaña.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin,s.318-326. In:Leptin -the voice of adipose tissue, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 88(11) 5169-5174
47. Guebra-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, *Nephrol Dial Transplant* 20: 129-134

RESUMEN – DIAsource Hu LEPTIN RIA KIPMR44

Preparación de los reactivos:	Reconstitución:
Anticuerpo de captura	En 7 ml de tampón de ensayo
Anticuerpo específico	En 7 ml de tampón de ensayo
Trazador	En 13 ml de tampón de ensayo
Control 1	en 750 µl de tampón de ensayo
Las muestras de plasma/suero se pueden utilizar sin diluir.	

Procedimiento de ensayo propuesto para la determinación doble

Adición de reactivo [µl]					
No. de tubos	Contenido de los tubos	Tampón de ensayo Calibradores Control 1 Muestras	Anticuerpo de captura	Anticuerpo específico	Trazador
1, 2	TC	–	–	–	100
3, 4	B ₀	Tampón ensayo: 25	50	50	100
5-18	Calibradores	CAL 1-7: 25	50	50	100
19, 20	Control 1	25	50	50	100
21, 22	Muestra 1	25	50	50	100
23, 24 (etc)	Muestra 2 (etc)	25	50	50	100

Retirar tubos no. 1 y 2 hasta medir la actividad
Incubar, por la noche, al menos 15 horas a temp. ambiente, 350 rpm
Aspire el líquido completamente. Tenga cuidado de que el recubrimiento de los tubos permanezca intacto.
Añada 500 µl de tampón de ensayo a los tubos.
Aspire el líquido completamente (como anteriormente).
Mida la radiactividad de todos los tubos.



Human-Leptin-RIA-CT

Dosage radio-immunologique avec des tubes revêtus de streptavidine pour la
détection quantitative de la leptine sérique et plasmatique chez l'homme
KIPMR44

Usage diagnostique in vitro

fr

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique - Tél. : +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

CARACTÉRISTIQUES +APPLICATIONS TECHNIQUES

- ♦ Mesure la concentration totale de leptine dans le **sérum, le plasma EDTA/hépariné**
- ♦ Calibré par rapport à la norme internationale de l'OMS : **Code NIBSC 97/594**
- ♦ Anticorps de haute affinité, aucune influence de la protéine de liaison de la leptine
- ♦ Calibrateurs prêts à l'emploi avec **0-64 ng/ml**
- ♦ Petit volume de sérum suffisant, mesure possible dans le sang capillaire
- ♦ Manipulation aisée

INTRODUCTION

Produit du gène ob (1,2), la leptine est une protéohormone à chaîne unique, découverte en 1994, d'un poids moléculaire de 16 kD, qui jouerait un rôle clé dans la régulation du poids corporel. Sa séquence d'acides aminés ne présente pas d'homologies majeures avec d'autres protéines (1). La leptine est presque exclusivement produite par des adipocytes différenciés (3-5). Elle agit sur le système nerveux central, en particulier l'hypothalamus, supprimant ainsi l'apport alimentaire et stimulant la dépense énergétique (2,6-9). Les récepteurs de la leptine - il existe d'autres formes épissurées qui diffèrent en longueur - appartiennent à la famille des récepteurs des cytokines de classe I (10-12). Ils sont omniprésents dans l'organisme (10, 11, 13, 14), ce qui indique un rôle général de la leptine, qui n'est pas encore totalement compris. Il existe une forme circulante du récepteur de la leptine qui agit comme l'une des nombreuses protéines de liaison à la leptine (15). Outre ses effets métaboliques, il a été démontré que la leptine exerce une forte influence sur un certain nombre d'axes endocriniens. Chez la souris mâle, elle a atténué la baisse marquée des teneurs en LH, testostérone, thyroxine et l'augmentation de l'ACTH et de la corticostérone provoquées par le jeûne. Chez la souris femelle, la leptine a empêché le retard de l'ovulation provoqué par le jeûne (16). Les souris ob/ob, qui sont déficientes en leptine en raison d'une mutation du gène ob, sont stériles. Ce défaut pourrait être corrigé par l'administration de la leptine, mais pas par une perte de poids due au jeûne (17), ce qui suggère que la leptine est essentielle aux fonctions de reproduction.

Toutes ces actions peuvent, au moins en partie, être expliquées par l'effet suppressif de la leptine sur l'expression du neuropeptide Y (NPY) et la sécrétion par les neurones du noyau arqué (6,18,19). Le NPY est un puissant stimulateur de l'appétit (20,21) et est connu pour être impliqué dans la régulation de diverses hormones hypophysaires, par exemple la suppression de la GH par la stimulation de la somatostatine (22,23), la suppression des gonadotrophines (23) ou la stimulation de l'axe hypophyso-surrénalien (21).

La variable la plus importante qui détermine les niveaux de leptine en circulation est la masse grasseuse (24-26). De toute évidence, dans des conditions de cycles alimentaires réguliers, la leptine reflète la proportion de tissu adipeux (27), affichant une relation exponentielle (37). Cette synthèse constitutive de la leptine est modulée par un certain nombre de variables non hormonales et hormonales. Les stimulateurs chez le rongeur et l'homme sont la suralimentation (28,29), l'insuline (3,5,30-33) et les glucocorticoïdes (5,34-36). La suppression a été démontrée pour le jeûne (27), l'AMPc et les agonistes des bêta-3-adrénocepteurs (35). Ces résultats montrent clairement que la leptine fait partie intégrante de diverses boucles de feedback métaboliques et endocriniennes (38).

À des fins cliniques, il est important de noter que les taux sériques de leptine présentent une variation circadienne modérée, avec un pic pendant la nuit vers 2 heures du matin (37). Les valeurs de leptine à ce moment sont environ 30 à 100 % plus élevées que les niveaux mesurés le matin ou en début d'après-midi. Cette variation, ainsi que l'influence de la consommation alimentaire, doivent être prises en compte lors de la collecte d'échantillons de sang.

Dans des conditions assez standardisées, c'est-à-dire des cycles alimentaires normaux et des prélèvements sanguins le matin ou en début d'après-midi, une seule mesure de la leptine apporter toutes les informations nécessaires.

Pour une interprétation appropriée des taux de leptine mesurés, des fourchettes de référence sont nécessaires. Comme la masse grasseuse est la principale variable de confusion, ces intervalles doivent se référer à des mesures du pourcentage de graisse corporelle telles que l'indice de masse corporelle (IMC) ou le pourcentage de graisse corporelle déterminé, par exemple, par l'analyse de l'impédance bioélectrique (BIA). Les taux de leptine sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes (38,39) et une dépendance à l'âge a été démontrée chez les enfants et les adolescents (40). Par conséquent, les plages de référence se rapportant aux mesures de la graisse corporelle doivent être stratifiées en fonction du sexe et du développement pubertaire.

Les taux de leptine sont élevés chez la plupart des patients obèses, ce qui suggère la présence d'une insensibilité à la leptine (20,26,37,38,41,42). Cependant, chez un petit pourcentage de patients, les taux de leptine se sont avérés anormalement bas par rapport à leur masse grasseuse. Il reste à prouver, par des études futures, que ces patients représentent une nouvelle entité physiopathologique : la déficience en leptine. Comme il a également été démontré que la leptine est d'une grande importance pour les fonctions de reproduction, de nouveaux mécanismes physiopathologiques pourraient être découverts, reliant l'infertilité à une production insuffisante de leptine.

La découverte de la leptine a déclenché une avalanche d'activités de recherche visant à comprendre la régulation et les actions de cette nouvelle hormone. Plus important encore, elle a fourni une clé pour mieux comprendre la physiologie de la régulation du poids corporel et pour dévoiler les éventuels mécanismes physiopathologiques de l'obésité et des troubles alimentaires. En outre, elle pourrait apporter de nouvelles connaissances sur certaines causes de l'infertilité.

UTILISATION PRÉVUE

Cette trousse de dosage radio immunologique est adaptée à la mesure de la leptine humaine dans le sérum ou le plasma (plasma EDTA/Héparine).

Dans des conditions de cycles alimentaires normaux, la mesure dans un seul échantillon de sang prélevé le matin ou en début d'après-midi est suffisante.

La comparaison avec les plages de référence liées à l'IMC peut être utile pour détecter des conditions de **déficience relative en leptine** comme cause possible d'obésité ou fournir une indication sur la **résistance à la leptine** respectivement.

En raison de sa forte corrélation avec la masse grasseuse corporelle, la mesure de la leptine dans des conditions normalisées peut être utilisée comme un test simple et peu coûteux pour déterminer la **masse grasseuse corporelle**.

PRINCIPE

Pour le dosage radioimmunologique de la leptine humaine, un anticorps polyclonal de lapin de haute spécificité est utilisé. La leptine est mesurée quantitativement et la protéine de liaison n'influence pas les résultats du test. Les tubes ont été revêtus de streptavidine et la séparation est facilitée par un anticorps de lapin biotinylé.

Des calibrateurs sont préparés à partir de leptine humaine recombinante à des concentrations comprises entre **1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 ng/ml**.

Étalonnage du dosage

Les dosages sont calibrés conformément à la norme internationale pour la leptine humaine. La préparation standard de l'OMS avec le code 97/594 (y) est disponible auprès de l'Institut national (britannique) des normes et du contrôle biologiques (NIBSC (z)). Une ampoule de la préparation, reconstituée dans 1 ml de tampon de dosage, sera quantifiée avec la teneur nominale de 5000 ng de leptine humaine.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Sensibilité

La **sensibilité** analytique du dosage donne **0,1 ng/ml** (2x ET des calibrateurs zéro)

Variation intra-essai

	Nombre de détermination	Valeur moyenne [ng/ml]	Écart-type (ng/ml)	%VC
Échantillon 1	6	19,67	0,87	4,4
Échantillon 2	6	6,95	0,33	4,8

Variation inter-essais

	Valeur moyenne (ng/ml)	Écart-type (ng/ml)	%VC (%)
Échantillon 1	8,975	0,48	5,3
Échantillon 2	6,3	0,32	5,1
Échantillon 3	20,9	1,05	5,0

Linéarité

Le test Leptin RIA KIPMR44 peut être utilisé pour des échantillons dilués. La linéarité des dilutions de sérum est excellente (Fig.9).

Récupération

Des expériences de dopage du sérum avec de la leptine humaine recombinante ont permis une récupération de 97% (± 2%).

PRÉLÈVEMENT, PRÉPARATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les **échantillons** de **sérum** ainsi que de **plasma** EDTA/hépariné sont appropriés (aucun écart significatif des niveaux de hLeptine dans les échantillons de sérum ou de plasma correspondants n'a été trouvé). Une préparation externe de l'échantillon avant le dosage n'est pas nécessaire.

Mise en garde

Des concentrations de biotine >125 ng/mL dans la trousse hLeptine ont montré une interférence significative avec le système de dosage et ont donné des valeurs faussement élevées. Par conséquent, les échantillons de patients sous biotine à forte dose (>10 mg/jour) ne peuvent pas être utilisés pour la mesure de la leptine par ce test.

Les échantillons doivent être manipulés selon les recommandations générales : le plus rapidement possible et réfrigérés dès que possible. Au cas où il y aurait une période plus longue entre le retrait de l'échantillon et la détermination, conserver les échantillons non dilués congelés à -20°C ou moins dans des tubes en plastique à fermeture étanche. Évitez principalement les cycles répétés de congélation-décongélation du sérum/plasma (si nécessaire, veuillez réaliser une sous-aliquote) bien que les niveaux de leptine se soient avérés non affectés par quelques cycles (5x) dans nos expériences.

La grande sensibilité de l'essai permet de mesurer la hLeptine dans de petits volumes d'échantillons. En raison de la large plage d'efficacité de cette trousse de RIA, une dilution préparatoire de l'échantillon n'est généralement pas nécessaire. Pour la plupart des déterminations (échantillons de sérum ou de plasma, et aucune valeur extrême attendue), **l'utilisation d'échantillons non dilués de 25 µl par tube devrait être appropriée**. Dans le cas où des niveaux de leptine supérieurs à 64 ng/ml sont attendus, par exemple chez les patients obèses (IMC>35), l'échantillon doit et peut être dilué, par exemple 1:10,

Les concentrations de hLeptine peuvent être complètement différentes dans les fluides corporels d'origine humaine autres que les surnageants de sérum ou de culture cellulaire.

RÉACTIFS FOURNIS

ASS	BUF	Tampon de dosage (1 bouteille, 125 ml ; prêt à l'emploi)
Ab	BIOT	anticorps de capture: IgG anti-lapin, conjuguée à la biotine. Reconstituer avec 7 ml de tampon (1 bouteille, 7 ml; lyophilisé)
Ab		Anticorps spécifique : anticorps de lapin anti-leptine humaine. Reconstituer avec 7 ml de tampon de dosage. (1 bouteille, 7 ml; lyophilisé)

Ag	¹²⁵ I
----	------------------

Traceur : ¹²⁵I-leptine; < 2,85 µCi ou < 105 kBq respectivement. Reconstituer avec 13 ml de tampon de dosage.
(1 bouteille, 13 ml; lyophilisé, coloré en rouge)

CAL	N
-----	---

Calibrateurs (1-7). (7 flacons, 750 µl chacun; prêt à utiliser). Contient de la leptine recombinante. Utiliser 25 µl / tube.
Voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon

CONTROL	1
---------	---

Contrôle 1
(1 flacon, 0,75 ml; sérum humain; lyophilisé). Reconstituer avec 750 µl de tampon de dosage.
Voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon



Tubes (125 tubes revêtus de streptavidine, prêt à utiliser)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI

Pipettes de précision (50, 100 et 500 µl) Micropipettes et pipettes multicanaux à embout plastique jetable
Mélangeur vortex
Dispositif pour aspirer le liquide des tubes (recommandé en raison du danger potentiel de radioactivité et d'infection par des échantillons humains)
Dispositif d'agitation : 350 tr/min
Compteur gamma.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

En effectuant le dosage, suivez scrupuleusement le protocole d'essai. Par incubation à température ambiante, nous entendons une incubation entre 20 et 25°C.

Les réactifs ayant des numéros de lot différents ne doivent pas être mélangés. Tous les réactifs sont stables sans être ouverts jusqu'à la date de péremption, s'ils sont conservés à l'obscurité entre 2° et 8°C (voir l'étiquette).

Le **Contrôle 1**, l'**Anticorps de capture**, l'**Anticorps spécifique** et le **Traceur** doivent être reconstitués dans un **tampon de dosage**. Il est recommandé de conserver les réactifs reconstitués à température ambiante pendant 30 minutes, puis de les mélanger soigneusement, mais délicatement (aucune mousse ne doit en résulter) avec un mélangeur Vortex.

La durée de conservation des réactifs après ouverture est conforme à la durée de conservation du traceur.

Les composants reconstitués (**Contrôle 1**, **Anticorps de capture**, **Anticorps spécifique** et **Traceur**) doivent être conservés à -20°C (ou moins). Les cycles répétés de congélation-décongélation doivent être évités.

Avant utilisation, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante. Les précipités, éventuellement dans des tampons, doivent être dissous avant l'utilisation par mélange et réchauffement.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à un usage professionnel.

La possession et l'utilisation de la trousse sont soumises à la réglementation des autorités nationales de réglementation nucléaire.

Les réactifs ayant des numéros de lot différents ne doivent pas être mélangés.

- Les réactifs contiennent de l'azote sodium comme agent de conservation qui est toutefois fortement dilué (0,02%).
- Fiche de données de sécurité disponible sur demande

Avant de commencer le test, lire les instructions complètement et attentivement. Utilisez la version valide de la notice d'accompagnement fournie avec le kit. Assurez-vous que tout est bien compris.

Avant l'utilisation, tous les composants de la trousse doivent être portés à **température ambiante entre 20 et 25°C**. Les précipités dans les tampons doivent être dissous avant l'utilisation en les mélangeant et en les réchauffant soigneusement. **La température aura une incidence** sur le dosage. Cependant, les valeurs des échantillons des patients ne seront pas affectées.

N'utilisez pas de matériel manifestement endommagé ou contaminé par des microbes ni de matériel renversé.

Attention : Cette trousse contient des composants d'origine humaine et/ou animale. Le sérum humain source pour le Contrôle 1 fourni dans cette trousse a été testé selon les méthodes recommandées et s'est révélé non réactif pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), le virus de l'hépatite C (HCV) et l'anticorps du virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (HIV). Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale de l'absence d'agents infectieux ; par conséquent, tous les composants et les échantillons du patient doivent être traités comme potentiellement infectieux.

Radioactivité - Avant de commander ou d'utiliser du matériel radioactif, il est nécessaire de prendre les mesures appropriées pour garantir le respect des réglementations nationales régissant leur utilisation. Les règles locales de chaque établissement, qui définissent les actions et le comportement dans les zones de travail de la radioactivité, doivent également être respectées. Les conseils donnés ici ne remplacent pas les règles locales, les instructions ou la formation dans l'établissement, ni les conseils des conseillers en radioprotection. Il est important de suivre le code de bonnes pratiques de laboratoire en plus des précautions spécifiques relatives au radionucléide I-125 utilisé.

L'iode 125 a une demi-vie radioactive T_{1/2} de 60 jours et émet des rayons gamma de 35,5 keV, des rayons X de 27 à 32 keV et aucun rayonnement bêta. Le blindage est efficace avec le plomb, la première couche de demi-valeur est de 0,02 mm de plomb, la réduction à 10 % se fait par tranche 0,2 mm.

Pour réduire la dose de rayonnement, le temps passé à manipuler la radioactivité doit être réduit au minimum (planification obligatoire), et la distance de la source de rayonnement doit être maximisée (en doublant la distance de la source, vous divisez par quatre la dose de rayonnement).

La formation d'aérosols, par exemple par une ouverture et un mélange incorrects des flacons ou par le pipetage de solutions qui peuvent entraîner la mise en suspension dans l'air de minuscules gouttelettes de radioactivité, constitue un risque et doit être évitée.

Les solutions contenant de l'iode ne doivent pas être rendues acides, car cela pourrait entraîner la formation d'iode élémentaire volatil. Comme certains composés iodés peuvent pénétrer dans les gants en caoutchouc, il est conseillé de porter deux paires de gants ou des gants en polyéthylène sur le caoutchouc.

Pour le nettoyage des zones ou des équipements contaminés, l'iode 125 doit être rendu chimiquement stable en utilisant une solution alcaline de thiosulfate de sodium avec du papier ou du tissu de cellulose.

Procédures générales de premiers secours :

Contact avec la peau : Laver soigneusement la zone affectée avec de l'eau. Jeter les vêtements et les chaussures contaminés.

Contact avec les yeux : En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau pendant au moins 15 minutes. Afin d'assurer un rinçage efficace, écarter les paupières.

Ingestion : En cas d'ingestion, se rincer soigneusement la bouche avec de l'eau. Consulter immédiatement un médecin.

Ne pas manger, boire ou fumer dans ces zones.

Ne jamais pipetter le matériel radioactif avec la bouche.

Le produit renversé doit être essuyé immédiatement et il faut procéder à une désinfection de la zone. Nettoyez les zones et les équipements contaminés avec un détergent approprié.

La manipulation de matériel radioactif et potentiellement infectieux doit être conforme aux instructions suivantes :

Le matériel doit être stocké et utilisé dans une zone spéciale désignée.

Ne pas manger, boire ou fumer dans ces zones.

Ne jamais pipetter le matériel radioactif avec la bouche.

Évitez tout contact direct avec ces matériaux en portant des blouses de laboratoire et des gants jetables.

Le matériel renversé doit être essuyé immédiatement. Nettoyez les zones et les équipements contaminés avec un détergent approprié.

Le matériel radioactif non utilisé et les déchets radioactifs doivent être éliminés conformément aux recommandations des autorités réglementaires nationales.

Mise en garde

Des concentrations de biotine >125 ng/mL dans la trousse hLeptine ont montré une interférence significative avec le système de dosage et ont donné des valeurs faussement élevées. Par conséquent, les échantillons de patients sous biotine à forte dose (>10 mg/jour) ne peuvent pas être utilisés pour la mesure de la leptine par ce test.

PROCÉDURE DE TEST

NOTES : Toutes les déterminations (Calibrateurs, Contrôle 1 et échantillons) doivent être testées en double. Pour obtenir des résultats optimaux, il est recommandé d'effectuer un pipetage précis et de respecter le protocole.

Lors de la réalisation du dosage, les Calibrateurs, le Contrôle 1 et les échantillons doivent être pipetés aussi vite que possible.

Flow Chart du protocole de dosage

#	Tubes	Tampon de dosage, Calibrateurs, Contrôle 1, Échantillons µl	Anticorps de capture µl	Anticorps spécifique µl	Traceur : µl
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B0	Tampon de dosage : 25	50	50	100
5-18	Calibrateurs	CAL 1-7 : 25	50	50	100
19,20	Contrôle 1	Contrôle 1 : 25	50	50	100
21,22	Échantillon 1	25	50	50	100
23,24	Échantillon 2	25	50	50	100
etc.					

1) L'étiquetage des tubes à essai doit être effectué dans l'ordre suivant :

1, 2 coups totaux (**TC**),
3, 4 calibrateur zéro (**B₀**),
5 - 18 doubles des calibrateurs (**1-7**),
19, 20 doubles du contrôle (**1**),
21, 22 etc. doubles des échantillons.

2) Ajouter **25 µl** de **tampon de dosage** aux tubes 3 et 4.

Ajouter **25 µl** de **calibrateurs** aux tubes 5 - 18:

5, 6 calibrateur **1**
7, 8 calibrateur **2**, etc.

3) Ajouter **25 µl** de **contrôle 1** aux tubes 19 et 20,

4) Ajouter **25 µl** du premier **échantillon** aux tubes 21 et 22, etc.

5) Ajouter **50 µl** d'**anticorps de capture** en commençant avec le tube 3.

6) Ajouter **50 µl** d'**anticorps spécifique** en commençant avec le tube 3.

7) Ajouter **100 µl** de **traceur** à tous les tubes.

8) Retirer les tubes 1 et 2 (coups totaux) ou les fermer avec un bouchon.

- 9) Agiter les tubes sur un dispositif d'agitation (350 tr/min) **pendant la nuit** (au moins 15 h) à **température ambiante**. (les étapes 9 à 12 ne peuvent pas être effectuées avec les tubes 1 et 2)
- 10) Aspirez le liquide (sauf les tubes 1 et 2 !) complètement.
Veillez à ce que le revêtement des tubes reste intact. En fonction de l'équipement et des pratiques de laboratoire courantes, l'aspiration du liquide peut être remplacée par une décantation minutieuse.
- 11) Ajouter **500 µl du tampon de dosage** aux tubes (sauf les tubes 1 et 2 !).
- 12) Aspirer le liquide (voir étape 10).
- 13) Comptez la radioactivité de **tous** les tubes dans un compteur gamma pendant 1 à 3 min.

CALCUL DES RÉSULTATS

Établir la courbe de calibration

Calibrateur	B	0	1	2	3	4	5	6	7
(ng/ml)	0	1	2	4	8	16	32	64	

1. Calculez la moyenne des comptages/coups de chaque paire de tubes. Elle est égale à la valeur de liaison B.
2. La moyenne du calibrateur zéro (tubes 3 et 4) est égale à B₀.
3. Calculez le pourcentage lié (% B/B₀) en divisant les valeurs B par B₀ :
 $\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$.
4. Tracez le % B/B₀ en fonction des concentrations du calibrateur sur un papier semi-logarithmique ou logit-log respectivement. Pour des raisons pratiques, il est recommandé d'utiliser des programmes de réduction des données assistés par ordinateur.
5. Calculer le « pourcentage lié du calibrateur zéro » :
Moyenne des tubes 3, 4 (B₀) divisée par la moyenne des tubes 1, 2 (coups totaux) multipliée par 100 %.
Il faut que %B₀/TC > 20%.

Évaluation des concentrations d'échantillon :

Lire la valeur de la concentration (en abscisse) correspondant au %B/B₀ de l'échantillon comme dans l'exemple donné ci-dessous :

coups moyens du calibrateur zéro (B₀) : 8648 cpm
coups moyens du tube d'échantillon : 4283 cpm

$\%B/B_0 = \text{coups échantillon} / B_0 \times 100\%$
 $= 4283 / 8648 \times 100\%$
 $= 0,495 \times 100\% = 49,5\%$

Pour une valeur de 49,5 % sur l'axe des y (ordonnée), on peut obtenir une valeur de 7,28 ng/ml sur l'axe des x (abscisse).

En cas de dilution des échantillons, la multiplication de cette valeur déterminée graphiquement ou à l'aide d'un programme informatique par le facteur de dilution donne la concentration en leptine de l'échantillon.

Concentration du contrôle :

Le contrôle 1 doit correspondre à la plage de concentration indiquée. La concentration de leptine mesurée n'est valable que si la valeur mesurée du contrôle se situe dans la plage de concentration indiquée. Dans le cas contraire, une analyse du processus est nécessaire et, en fonction des résultats, les valeurs mesurées seront acceptées ou non.

VALEURS NORMALES ATTENDUES

Les taux de leptine sérique sont principalement déterminés par la masse grasseuse, avec des taux faibles chez les individus maigres et élevés chez les sujets obèses. En outre, il existe une nette différence entre les sexes, les taux étant plus élevés chez les femmes pour un pourcentage de graisse corporelle donné. En outre, les niveaux de leptine sont influencés par le développement pubertaire. Par conséquent, toute tentative de donner des fourchettes de niveaux de leptine attendus doit tenir compte de ces relations.

Différentes méthodes d'estimation de la masse grasse sont disponibles, telles que le calcul de l'indice de masse corporelle (poids (kg) divisé par le carré de la taille (m)) (IMC), l'évaluation de l'impédance bioélectrique (BIA) ou l'absorptiométrie à rayons X en double énergie (DEXA). Bien que la précision de l'IMC en ce qui concerne la réflexion de la masse grasse réelle soit inférieure à celle d'autres méthodes plus sophistiquées telles que la BIA ou la DEXA, l'IMC présente un certain nombre d'avantages :

- 1) Elle est indépendante des modèles de régression appliqués.
- 2) Elle est facile à déterminer, seules les mesures du poids et de la taille sont nécessaires.
- 3) Elle est le plus souvent disponible rétrospectivement.
- 4) C'est la mesure la plus précise lors de changements de masse grasse à court terme, par exemple lors d'un jeûne.

Par conséquent, les fourchettes de probabilité suivantes des taux de leptine sérique ont été désignées comme la principale variable indépendante confondante et ont été stratifiées en fonction du sexe et du développement pubertaire (45 ; voir figures 1-8 et tableaux 4 - 11). Après l'âge de 20 ans, aucune dépendance significative à l'égard de l'âge n'a été observée. Ces fourchettes de probabilité ajustées en fonction du sexe et de l'âge peuvent être utilisées pour comparer un taux de leptine mesuré à un IMC donné avec des sujets normaux afin de détecter des anomalies pathologiques.

Les lignes de régression les mieux adaptées pour les différents sous-groupes sont des courbes exponentielles de la formule leptine = a·e^(b·BMI).

Les 5e et 95e percentiles sont donnés par les équations suivantes :

$$\text{leptine} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)} \text{ et } \text{leptine} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)} \text{ respectivement.}$$

Dans un tracé semi-logarithmique (axe des y = log leptine), ces courbes donnent des lignes droites. Les valeurs de a, b et c sont données dans le tableau 3 en fonction du sexe et du stade de la puberté, ainsi que pour les adultes. À l'aide de ces valeurs, les fourchettes de probabilité des niveaux de leptine peuvent être facilement étendues à des plages d'IMC plus basses ou plus élevées si nécessaire.

Exemple :

Le 50e percentile pour les garçons aux stades 3 et 4 de Tanner est donné par la courbe suivante :

$$\text{leptine} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC})}$$

Le 5e percentile est donné par : $\text{leptine} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC} - 1,1919)}$

Et le 95e percentile est donné par : $\text{leptine} = 0,0181 \cdot e^{(0,2067 \cdot \text{IMC} + 1,1919)}$

Dans un tracé semi-logarithmique, ces lignes sont parallèles avec une distance égale au 50e percentile.

Calcul des scores d'écart-type (SDS ou Z-scores)

Une méthode pratique pour détecter tout écart d'un niveau de leptine mesuré par rapport à la plage de référence correspondante consiste à calculer son score d'écart-type en mettant en relation le niveau de leptine de l'IMC du patient avec la valeur moyenne de leptine du sexe et du groupe d'âge correspondants et en exprimant son écart par un multiple de l'écart-type. Cette méthode peut être considérée comme une normalisation par rapport à la cohorte de référence normale. Par conséquent, les valeurs de la leptine peuvent être ajustées en fonction de l'IMC, du sexe et du stade/âge pubertaire (c'est-à-dire que l'influence du sexe, de l'âge et de l'IMC est supprimée) et peuvent être mises en commun pour une analyse plus approfondie.

En tenant compte de la distribution logarithmique des niveaux de leptine, le SDS de la leptine peut être calculé par l'équation suivante :

$$\text{SDS leptine} = (\ln(\text{leptine}) - \ln(a) - b \cdot \text{IMC}) / d$$

Dans cette équation, ln représente le logarithme naturel (en référence à la base e). Les constantes a, b et d sont données dans le tableau 3 en fonction du sexe et du stade/âge de la puberté.

Exemple :

Un garçon au stade 3 de Tanner, IMC = 25 kg/m², concentration de leptine mesurée = 5 ng/ml.

$$\begin{aligned} \text{SDS leptine} &= (\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 \cdot 25) / 0,6850 = \\ &= (1,6094 - (-4,0118) - 5,1675) / 0,6850 = 0,66 \end{aligned}$$

Estimation de la dilution optimale des échantillons

Comme les taux de leptine sérique varient considérablement sur plusieurs ordres de grandeur, en fonction principalement de la masse grasseuse, une dilution adéquate pourrait être une condition préalable à une mesure précise. C'est pourquoi les échantillons doivent être dilués de telle sorte que la concentration de leptine soit proche de cette valeur afin de tirer le meilleur parti de la précision de la trousse de dosage. Les plages de référence fournissent un outil utile pour une bonne estimation de la valeur attendue de la leptine en fonction de l'IMC, du sexe et de l'âge.

Exemple :

Femme adulte, IMC = 45 kg/m² (130 kg, taille : 1,70 m). À partir de la plage de référence pour les femmes adultes, le taux moyen de leptine pour un IMC de 45 kg/m² est d'environ 224 ng/ml. La dilution optimale serait de 1:30.

ANNEXES

Tableau 3 : Constantes a, b, c et d pour le calcul des plages de référence de la leptine et du SDS de la leptine sur la base de l'IMC. Les groupes d'individus normaux en bonne santé ont été stratifiés en fonction du sexe et du stade de la puberté/âge. TS= stade de Tanner, n= nombre de sujets, a,b,c et d = constantes telles que définies dans le texte.

Groupe	n	a	b	c	d
Hommes					
TS 1&2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3&4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Adultes	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Femmes					
TS 1&2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3&4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Adultes	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Tableau 4 : Filles - Stade de Tanner 1 et 2

IMC (kg/m²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,22	0,30	0,66	1,45	1,99
12	0,28	0,39	0,85	1,86	2,56
13	0,36	0,50	1,09	2,38	3,29
14	0,46	0,64	1,40	3,06	4,22
15	0,60	0,82	1,79	3,93	5,42
16	0,76	1,05	2,30	5,04	6,96
17	0,98	1,35	2,95	6,47	8,93
18	1,25	1,73	3,79	8,31	11,5
19	1,61	2,22	4,87	10,7	14,7
20	2,07	2,85	6,25	13,7	18,9
21	2,65	3,66	8,03	17,6	24,3
22	3,41	4,70	10,3	22,6	31,2
23	4,37	6,03	13,2	29,0	40,0
24	5,62	7,75	17,0	37,2	51,4
25	7,21	9,95	21,8	47,8	65,9
26	9,26	12,8	28,0	61,4	84,7
27	11,9	16,4	35,9	78,8	109,0
28	15,3	21,1	46,1	101,0	140,0
29	19,6	27,0	59,2	130,0	
30	15,2	34,7	76,1		
31	32,3	44,6	97,7		
32	41,5	57,2	125,0		
33	53,2	73,4			
34	68,4	94,3			
35	87,8	121,0			
36	113				
37	145				

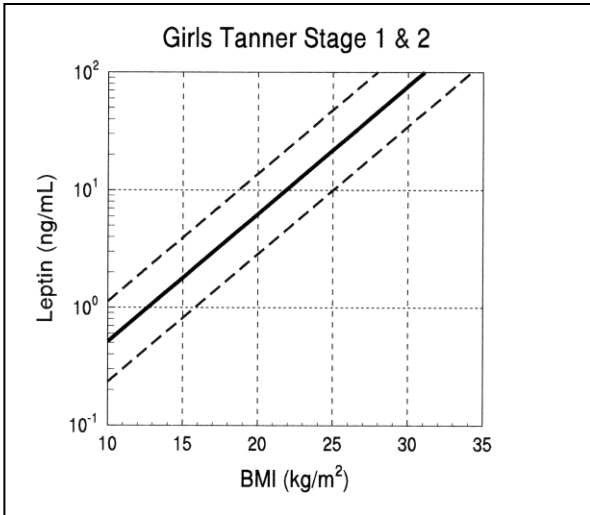


Figure 1 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Filles - Stade de Tanner 1 et 2 (cf. texte pour plus de détails)

Tableau 5 : Garçons - Stades de Tanner 1 et 2

IMC (kg/m²)	Percentile / Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,08	0,12	0,29	0,69	0,99
12	0,01	0,16	0,38	0,91	1,30
13	0,14	0,20	0,49	1,19	1,71
14	0,19	0,26	0,65	1,56	2,24
15	0,24	0,35	0,85	2,04	2,93
16	0,32	0,46	1,11	2,68	3,84
17	0,41	0,60	1,45	3,51	5,04
18	0,55	0,79	1,90	4,60	6,60
19	0,72	1,03	2,50	6,03	8,66
20	0,94	1,35	3,27	7,90	11,3
21	1,24	1,77	4,29	10,4	14,9
22	1,62	2,33	5,62	13,6	19,5
23	2,12	3,05	7,37	17,8	25,5
24	2,78	3,99	9,66	23,3	33,5
25	3,65	5,24	12,7	30,6	43,9
26	7,78	6,87	16,9	40,1	57,5
27	6,27	9,0	21,7	52,5	75,4
28	8,22	11,8	28,5	68,9	98,8
29	10,7	15,5	37,4	90,3	129,0
30	14,1	20,3	48,9	118,0	
31	18,5	26,6	64,2		
32	24,3	34,8	84,1		
33	31,8	45,6	110,0		
34	41,7	59,8	144,0		
35	54,6	78,4			
36	71,6	102,0			
37	93,9	134,0			
38	123,0				

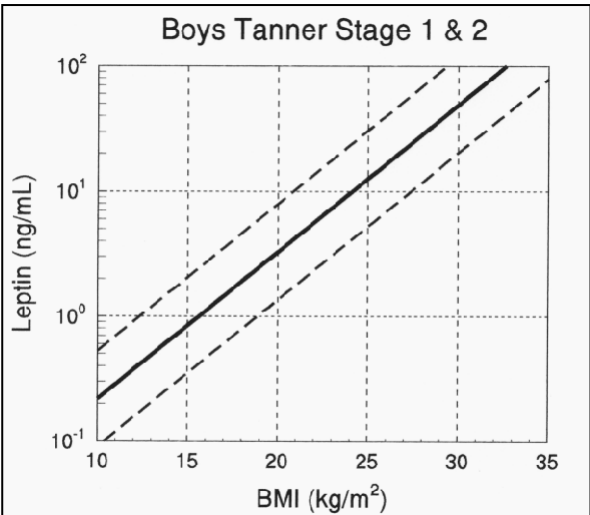


Figure 2 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Garçons - Stades de Tanner 1 et 2 (cf. texte pour plus de détails)

Tableau 6 : Filles - Stades de Tanner 3 et 4.

IMC (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,32	0,41	0,73	1,29	1,63
12	0,41	0,52	0,92	1,63	2,06
13	0,52	0,66	1,16	2,07	2,61
14	0,65	0,83	1,47	2,61	3,31
15	0,83	1,05	1,87	3,31	4,19
16	1,05	1,33	2,36	4,19	5,30
17	1,33	1,68	2,99	5,30	6,71
18	1,68	2,13	3,78	6,71	8,49
19	2,13	2,69	4,79	8,5	10,8
20	2,69	3,41	6,06	10,7	13,6
21	3,41	4,31	7,67	13,61	17,2
22	4,32	5,46	9,71	17,2	21,8
23	5,46	6,91	12,3	21,8	27,6
24	6,91	8,75	15,6	27,6	34,9
25	8,75	11,1	19,7	34,9	44,2
26	11,1	14,0	24,9	44,2	56,0
27	14,0	17,7	31,6	56,0	70,9
28	17,8	22,5	39,9	70,9	89,7
29	22,5	28,4	50,5	89,7	114,0
30	28,4	36,0	63,9	114,0	144,0
31	36,0	45,6	80,9	144,0	
32	45,6	57,7	80,2	144,0	
33	57,7	73,0	102,0		
34	73,0	92,4	130,0		
35	92,4	117,0			
36	117,0	148,0			
37	148,0				

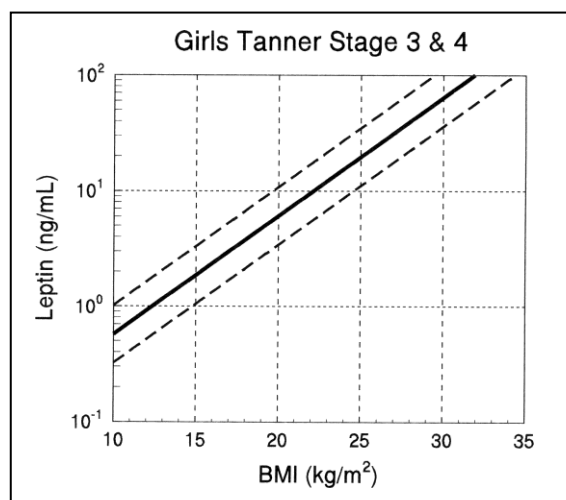


Figure 3 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Filles - Stades de Tanner 3 & 4 (cf. texte pour plus de détails).

Tableau 7 : Garçons - Stades de Tanner 3 & 4

IMC (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,18	0,58	0,94
12	0,04	0,07	0,22	0,71	1,16
13	0,49	0,08	0,27	0,88	1,43
14	0,06	0,10	0,33	1,08	1,75
15	0,07	0,12	0,40	1,32	2,16
16	0,09	0,15	0,49	1,63	2,65
17	0,11	0,18	0,61	2,00	3,26
18	0,14	0,23	0,75	2,46	4,01
19	0,17	0,28	0,92	3,03	4,93
20	0,21	0,34	1,13	3,72	6,06
21	0,26	0,42	1,39	4,58	7,46
22	0,32	0,52	1,71	5,63	9,17
23	0,39	0,64	2,10	6,92	11,3
24	0,48	0,78	2,58	8,51	13,9
25	0,59	0,96	3,18	10,5	17,0
26	0,73	1,19	3,91	12,9	21,0
27	0,89	1,46	4,80	15,8	25,8
28	1,10	1,79	5,90	19,4	31,7
29	1,35	2,20	7,26	23,9	39,0
30	1,66	2,71	8,93	29,4	48,0
31	2,05	3,33	11,0	36,2	58,9
32	2,51	4,09	13,5	44,5	72,4
33	3,09	5,04	16,6	54,7	89,1
34	3,80	6,20	20,4	67,2	109,0
35	4,68	7,62	25,1	82,6	134,0
36	5,75	9,37	30,9	101,0	
37	7,07	11,5	37,9	124,0	
38	8,7	14,2	46,7		
39	10,7	17,4	57,4		
40	13,1	21,4	70,5		

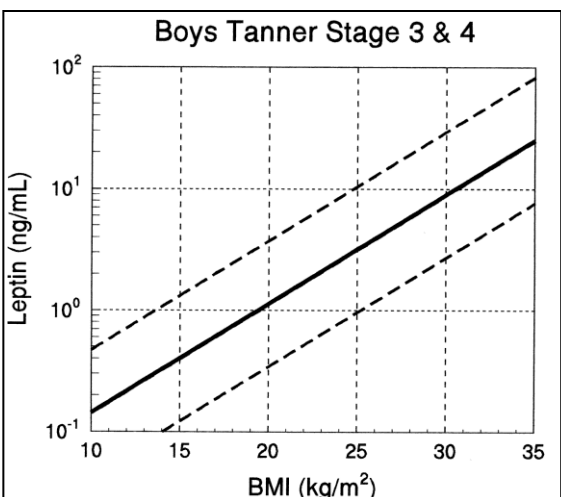


Figure 4 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Garçons - Stades de Tanner 3 et 4 (cf. texte pour plus de détails).

Tableau 8 : Filles - Stade de Tanner 5.

IMC (kg/m²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,50	0,66	1,34	2,71	3,62
12	0,58	0,77	1,56	3,15	4,21
13	0,67	0,89	1,81	3,67	4,89
14	0,78	1,04	2,11	4,26	5,69
15	0,91	1,21	2,45	4,96	6,62
16	1,05	1,41	2,85	5,76	7,70
17	1,22	1,64	3,31	6,70	8,95
18	1,42	1,90	3,85	7,79	10,4
19	1,66	2,21	4,48	9,06	12,1
20	1,93	2,57	5,20	10,5	14,1
21	2,24	2,99	6,05	12,3	16,4
22	2,60	3,48	7,03	14,2	19,0
23	3,03	4,04	8,18	16,6	22,1
24	3,52	4,70	9,51	19,3	25,7
25	4,09	5,46	11,0	22,4	29,9
26	4,76	6,35	12,9	26,0	34,8
27	5,53	7,39	15,0	30,3	40,4
28	6,43	8,59	17,39	35,2	47,0
29	7,48	9,99	20,2	40,9	54,7
30	8,70	11,6	23,5	47,6	63,5
31	10,1	13,5	27,3	55,3	73,9
32	11,8	15,7	31,8	64,4	85,9
33	13,7	18,3	37,0	74,9	99,9
34	15,9	21,2	43,0	87,0	116,0
35	18,5	24,7	50,0	101,0	135,0
36	21,5	28,7	58,1	118,0	
37	25,0	33,4	67,6	137,0	
38	29,1	38,8	78,6		
39	33,8	45,1	91,4		
40	39,4	52,5	106,0		

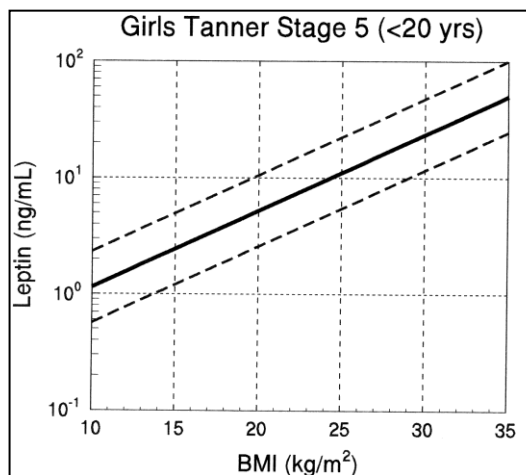


Figure 5 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Filles - Stade de Tanner 5 (cf. texte pour plus de détails)

Tableau 9 : Garçons - Stade de Tanner 5

IMC (kg/m²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,16	0,47	0,73
12	0,04	0,06	0,18	0,54	0,84
13	0,05	0,07	0,21	0,62	0,97
14	0,05	0,08	0,24	0,72	1,12
15	0,06	0,10	0,28	0,84	1,30
16	0,07	0,11	0,33	0,97	1,51
17	0,08	0,13	0,38	1,12	1,74
18	0,1	0,15	0,44	1,3	2,02
19	0,11	0,17	0,51	1,50	2,34
20	0,13	0,2	0,59	1,74	2,7
21	0,15	0,23	0,68	2,01	3,13
22	0,17	0,27	0,79	2,33	3,62
23	0,20	0,31	0,91	2,69	4,19
24	0,23	0,36	1,05	3,12	4,85
25	0,27	0,41	1,22	3,61	5,62
26	0,31	0,48	1,41	4,17	6,5
27	0,36	0,55	1,63	4,83	7,52
28	0,41	0,64	1,89	5,59	8,71
29	0,48	0,74	2,19	6,47	10,1
30	0,55	0,86	2,54	7,49	11,7
31	0,64	1,00	2,94	8,67	13,5
32	0,74	1,15	3,4	10,0	15,6
33	0,86	1,33	3,94	11,6	18,1
34	0,99	1,54	4,55	13,4	20,9
35	1,15	1,79	5,27	15,6	24,2
36	1,33	2,07	6,10	18,0	28,1
37	1,54	2,39	7,06	20,8	32,5
38	1,78	2,77	8,17	24,1	37,6
39	2,06	3,21	9,46	27,9	43,5
40	2,38	3,71	10,9	32,3	50,3

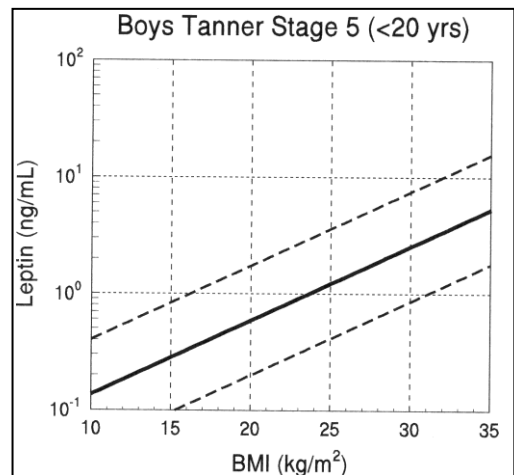


Figure 6 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Garçons - Stade de Tanner 5 (cf. texte pour plus de détails).

Tableau 10 : Femmes adultes

IMC (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,46	0,65	1,53	3,59	5,10
12	0,53	0,75	1,77	4,16	5,90
13	0,61	0,87	2,05	4,82	6,83
14	0,71	1,01	2,37	5,58	7,91
15	7,82	1,17	2,75	6,46	9,17
16	0,95	1,35	3,18	7,48	10,61
17	1,10	1,57	3,68	8,66	12,3
18	1,28	1,81	4,27	10,0	14,2
19	1,48	2,10	4,94	11,6	16,5
20	1,71	2,43	5,72	13,4	19,1
21	1,99	2,82	6,62	15,6	22,1
22	2,30	3,26	7,67	18,0	25,6
23	2,66	3,78	8,88	20,9	29,3
24	3,08	4,38	10,3	24,2	34,3
25	3,57	5,07	11,9	28,0	39,7
26	4,13	5,87	13,8	32,4	46,0
27	4,79	6,79	16,0	37,5	53,3
28	5,54	7,87	18,5	43,5	61,7
29	6,42	9,11	21,4	50,4	71,5
30	7,43	10,6	24,8	58,3	82,8
31	8,61	12,2	28,7	67,5	95,8
32	9,97	14,1	33,3	78,2	111,0
33	11,5	16,4	38,5	90,5	129,0
34	13,4	19,0	44,6	105,0	149,0
35	15,5	22,0	51,6	121,0	
36	17,9	25,4	59,8	141,0	
37	20,8	29,5	69,3		
38	24,0	34,1	80,2		
39	27,8	39,5	92,9		
40	32,2	45,7	108,0		

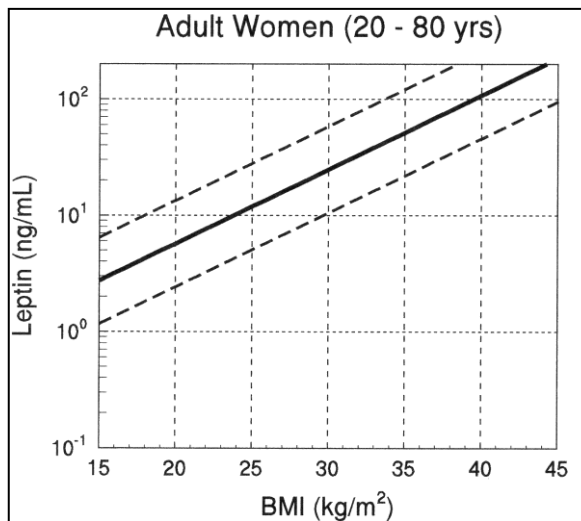


Figure 7 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Femmes adultes (cf. Texte pour plus de détails)

Tableau 11 Hommes adultes

IMC (kg/m ²)	Percentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0,03	0,05	0,15	0,44	0,69
12	0,04	0,06	0,18	0,55	0,87
13	0,05	0,08	0,23	0,69	1,08
14	0,06	0,09	0,28	0,85	1,34
15	0,07	0,12	0,35	1,06	1,67
16	0,09	0,15	0,44	1,33	2,09
17	0,12	0,18	0,55	1,65	2,60
18	0,14	0,23	0,68	2,06	3,24
19	0,18	0,28	0,85	2,57	4,04
20	0,22	0,35	1,06	3,20	5,03
21	0,23	0,44	1,32	3,98	6,27
22	0,35	0,54	1,64	4,97	7,81
23	0,43	0,78	2,05	6,19	9,73
24	0,54	0,85	2,55	7,71	12,1
25	0,67	1,05	3,18	9,61	15,1
26	0,83	1,31	3,96	12,0	18,8
27	1,04	1,64	4,94	14,9	23,5
28	1,30	2,04	6,15	18,6	29,2
29	1,61	2,54	7,67	23,2	36,4
30	2,01	3,16	9,56	28,9	45,4
31	2,51	3,94	11,9	36,0	56,6
32	3,12	4,91	14,8	44,9	70,5
33	3,89	6,12	18,5	55,8	87,8
34	4,85	7,63	23,0	69,6	109,0
35	6,04	9,51	28,7	86,7	136,0
36	7,53	11,8	35,8	108,0	
37	9,38	14,8	44,6	135,0	
38	11,7	18,4	55,5		
39	14,6	22,9	69,2		
40	18,2	28,6	86,2		

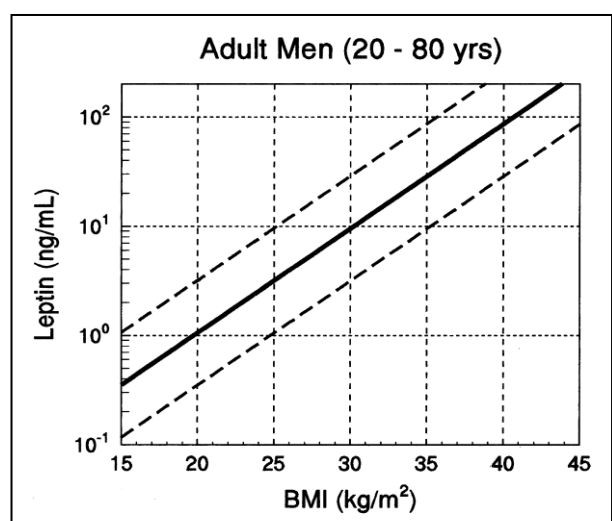


Figure 8 : Plages de référence des teneurs sériques en se référant à l'IMC : Hommes adultes (cf. texte pour plus de détails).

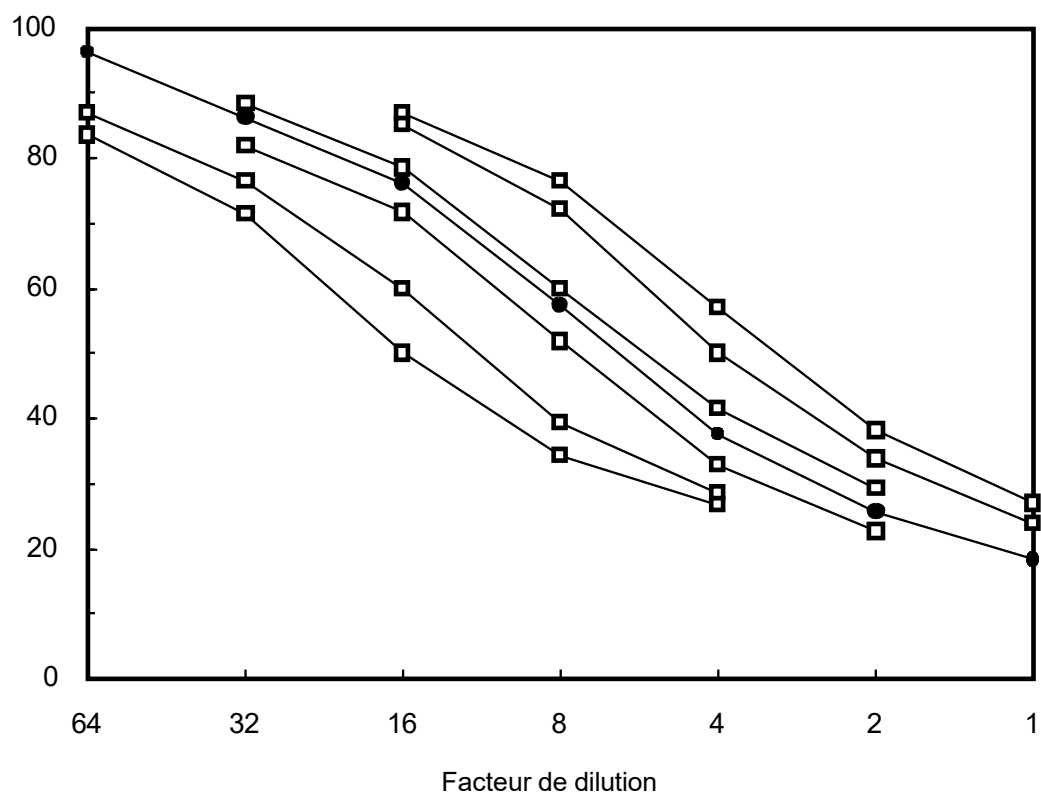


Figure 9 : Dilution en série du calibrateur de leptine (cercle rempli) et de différents sérums avec des concentrations variables de leptine. Le niveau de leptine du calibrateur non dilué était de 16 ng/ml. Les moyennes de mesures en double sont indiquées.

RÉFÉRENCES

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catefflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.
30. Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-3427.

40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*. 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. *Horm Metab Res*. 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 348:159-161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol*. 27: 69-76.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin, s.318-326. In: *Leptin -the voice of adipose tissue*, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 88(11) 5169-5174
47. Guebre-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, *Nephrol Dial Transplant* 20: 129-134

RÉSUMÉ – DIASource Hu LEPTIN RIA KIPMR44

Préparation des réactifs	Reconstitution :
Anticorps de capture	dans un tampon de dosage de 7 ml
Anticorps spécifique	dans un tampon de dosage de 7 ml
Traceur	dans un tampon de dosage de 13 ml
Contrôle 1	dans 750 µl de tampon de dosage
Les échantillons de plasma/sérum peuvent être utilisés non dilués.	

Procédure de dosage proposée pour la double détermination

Ajout de réactif [µl]					
N° de tubes	Contenu des tubes	Tampon de dosage Calibrateurs Contrôle 1 Échantillon	Anticorps de capture	Anticorps spécifique	Traceur
1,2	TC	–	–	–	100
3,4	B0	Tampon de dosage: 25	50	50	100
5-18	Calibrateurs	CAL 1-7: 25	50	50	100
19,20	Contrôle 1	25	50	50	100
21,22	Échantillon 1	25	50	50	100
23,24 (etc.)	Échantillon 2 (etc.)	25	50	50	100

N° Tubes : 1,2 retirés jusqu'à ce que l'activité soit comptée
Incuber, au moins pendant une nuit. 15 heures à température ambiante, 350 tr/min
Aspirer complètement le liquide. Veillez à ce que le revêtement des tubes reste intact.
Ajouter 500 µl de tampon de dosage aux tubes.
Aspirer complètement le liquide (voir ci-dessus).
Comptez la radioactivité de tous les tubes.

Date de révision : 27-07-2023



Human-Leptin-RIA-CT

Radioimmunoassay with Coated Tubes for the Quantitative Detection of
human Leptin in serum and plasma
KIPMR44
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

pl

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

WŁAŚCIWOŚCI TECHNICZNE+ZASTOSOWANIE

- ☐ Pomiar całkowitego stężenia leptyny w surowicy, **osoczu EDTA/heparynizowanym**
- ☐ skalibrowany względem Międzynarodowej Normy **WHO: NIBSC Code 97/594**
- ☐ Przeciwciała o wysokim powinowactwie, odporne na oddziaływanie białka wiążącego leptynę.
- ☐ Gotowe do użycia kalibratory o stężeniu **0-64 ng/ml**
- ☐ Wymaga niewielkiej ilości surowicy, możliwość wykonania oznaczeń na krwi włośniczkowej
- ☐ Proste użycie

WSTĘP

Leptyna, produkt genu ob (1,2), jest odkrywcą jednołańcuchowego proteohormonu, odkrytego w 1994 r., o masie cząsteczkowej 16 kD, która, jak się uważa, odgrywa kluczową rolę w regulacji masy ciała. Sekwencje aminokwasów leptyny nie wykazują istotnej homologii z innymi białkami (1). Leptyna jest wytwarzana niemal wyłącznie przez zróżnicowane adipocyty (3-5). Oddziałuje na ośrodkowy układ nerwowy, w szczególności na podwzgórze, zmniejszając apetyt i nasilając wydatkowanie energii (2,6-9). Receptory leptyny - istnieją też formy połączone, które różnią się długością - należą do receptorów rodziny cytokin klasy 1 (10-12). Są one wszechobecne w organizmie (10, 11, 13, 14), co może potwierdzać zasadniczą rolę leptyny, której jak dotąd nie udało się jednoznacznie ustalić. Istnieje krążąca forma receptora leptyny, która działa jak jedno z kilkunastu białek wiążących leptynę (15). Poza działaniem metabolicznym wykazano też silny wpływ leptyny na szereg osi endokrynnych. U samców myszy leptyna osłabiała wywołany głodem znaczny spadek poziomu LH, testosteronu, tyroksyny i wzrost ACTH i kortykosteronu. U samic myszy leptyna zapobiegała wywołanemu głodem opóźnieniu owulacji (16). Myszy ob/ob, z niedoborem leptyny ze względu na mutację genu ob, są bezpłodne. Wadę tę można skorygować, podając leptynę – o ile nie występuje utrata masy ciała spowodowana postem (17) – co sugeruje, że leptyna ma decydujące znaczenie dla funkcji rozrodczych.

Wszystkie z tych działań można przynajmniej częściowo wytłumaczyć efektem supresyjnym leptyny na ekspresję i uwalnianie neuropeptydu Y (NPY) przez neurony w jądrze łukowatym (6,18,19). NPY jest silnym stymulatorem apetytu (20,21) oraz bierze udział w regulacji różnych hormonów przysadkowych, np. supresji GH przez stymulację somatostatyny (22,23), supresji gonadotropin (23) oraz stymulacji osi przysadkowo-nadnerczowej (21).

Najważniejszą zmienną determinującą poziom krążącej leptyny jest masa tkanki tłuszczowej w organizmie (24-26). W warunkach regularnych cykli jedzenia poziom leptyny odzwierciedla proporcję tkanki tłuszczowej (27) w stosunku wykładniczym (37). Konstytucyjna synteza leptyny jest modulowana przez wiele niehormonalnych i hormonalnych zmiennych. Stymulatory u gryzoni i ludzi to przekarmianie (28,29), insulina (3,5,30-33) i glukokortykoidy (5,34-36). Czynniki supresyjne to post (27), cAMP i agoniści beta-3 adrenoreceptorów (35). Ustalenia te jasno wskazują, że leptyna jest integralnym składnikiem różnorodnych metabolicznych i endokrynnych pętli sprzężenia zwrotnego (38).

Do celów klinicznych należy zwrócić uwagę, że poziomy leptyny w surowicy wykazują umiarkowaną zmienność dobową, przy czym wartość szczytowa przypada w nocy, ok. godz. 2. (37). W tym czasie wartości stężenia leptyny są ok. 30 do 100% wyższe niż poziomy mierzone w godzinach porannych lub wczesnopopołudniowych. Podczas pobierania próbek krwi należy uwzględnić tę zmienność wraz z wpływem poboru pokarmu.

We względnie standaryzowanych warunkach, tj. w warunkach normalnych cykli jedzenia i pobierania próbek krwi w godzinach porannych lub wczesnopopołudniowych, pojedynczy pomiar stężenia leptyny ma charakter informacyjny.

Aby prawidłowo zinterpretować zmierzone stężenia leptyny, wymagane są zakresy referencyjne. Masa tłuszczu w organizmie jest główną zmienną zakłócającą, więc zakresy te powinny odnosić się do pomiarów zawartości procentowej tłuszczu w organizmie, tj. wskaźnika masy ciała (BMI), lub zawartości procentowej tłuszczu w organizmie oznaczonej np. w ramach analizy impedancji bioelektrycznej (BIA). Stężenia leptyny są wyższe u kobiet niż u mężczyzn (38,39); wykazano zależność wiekową u dzieci i młodzieży (40). Z tego względu zakresy referencyjne odnoszące się do pomiarów zawartości tłuszczu w organizmie powinny być stratyfikowane wg płci i fazy dojrzewania.

Stężenia leptyny są wyższe u najbardziej otyłych pacjentów, co sugeruje występowanie niewrażliwości na leptynę (20,26,37,38,41,42). Niemniej jednak u niewielkiego odsetka pacjentów stwierdzono nieadekwatnie niskie stężenia leptyny w odniesieniu do masy tkanki tłuszczowej. W przyszłych badaniach należałoby ustalić, czy u tych pacjentów występuje nowa jednostka patofizjologiczna: niedobór leptyny. Wykazano również duże znaczenie leptyny dla funkcji rozrodczych, więc nie można wykluczyć, że zostanie odkryty potencjalnie nowy mechanizm patofizjologiczny wykazujący związek niepłodności z niewystarczającym wytwarzaniem leptyny.

Odkrycie leptyny uruchomiło lawinę przedsięwzięć badawczych, mających na celu odkrycie możliwości regulacji i działania tego nowego hormonu, a co najważniejsze, dostarczyło klucza do lepszego zrozumienia fizjologii regulacji masy ciała i ujawniło potencjalne mechanizmy patofizjologiczne w otyłości i zaburzeniach odżywiania. Ponadto wyniki tych badań mogą rzucić nowe światło na niektóre przyczyny niepłodności.

PRZEZNACZENIE

Niniejszy test radioimmunologiczny przeznaczony jest do mierzenia poziomu ludzkiej leptyny w surowicy lub osoczu (EDTA-/Heparynie -eseczu).

W warunkach normalnego cyklu odżywiania wystarczające jest wykonanie pomiaru w pojedynczej próbce krwi pobranej rano lub wczesnym popołudniem.

Porównanie wyniku z zależnymi od BMI zakresami referencyjnymi może pomóc w wykryciu względnego **niedobór leptyny** jako możliwej przyczyny otyłości lub dostarczyć informacji o potencjalnej **oporności na leptynę**.

Ze względu na dobrą korelację z tłuszczową masą ciała, pomiary poziomów leptyny wykonywane w znormalizowanych warunkach mogą stanowić prosty i niedrogi test na oznaczanie **zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie**.

ZASADA DZIAŁANIA

Do radioimmunologicznego oznaczenia ludzkiej leptyny wykorzystuje się wysoce swoiste królicze przeciwciała poliklonalne. Poziom leptyny oznacza się ilościowo, a białko wiążące nie wpływa na uzyskiwany wynik. Probówki powlekane są streptawidyną, a rozdział jest możliwy dzięki biotynylowaniu przeciwciała przeciwnokróliczego.

Przygotowuje się roztwory kalibracyjne rekombinowanej leptyny ludzkiej o stężeniach z zakresu **1, 2, 4, 8, 16, 32 i 64 ng/ml**.

Kalibracja testu

Testy kalibruje się względem międzynarodowego wzorca leptyny ludzkiej. Preparat wzorcowy o numerze WHO 97/594 (y) oferowany jest przez NIBSC (z). Jedna ampulka preparatu rozrobiona z 1 ml Buforu Testowego charakteryzuje się nominalną zawartością 5000 ng leptyny.

PARAMETRY TESTU

Czułość

Czułość analityczna testu w0ynosi **0,1 ng/ml** (dwukrotność odchylenia standardowego dla kalibratorów zera)

Wariacja w ramach tej samej reakcji

	Liczba oznaczeń	Wqartość średnia [ng/ml]	Odchylenie standardowe [ng/ml]	VC%
Próbka 1	6	19.67	0.87	4.4
Próbka 2	6	6.95	0.33	4.8

Inter-Assay-Variation

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	VC% (%)
Próbka 1	8.975	0.48	5.3
Próbka 2	6.3	0.32	5.1
Próbka 3	20.9	1.05	5.0

Liniowość

Test radioimmunologiczny KIPMR44 może być używany do oznaczania próbek rozcieńczonych. Test charakteryzuje się doskonałą liniowością oznaczeń dla rozcieńczeń próbek surowiczych (Ryc. 9).

Poziom odzysku

Doświadczenia z wykorzystaniem prób wzbogacanych rekombinowaną ludzką leptyną wykazały odzysk na poziomie 97% ($\pm$ 2%).

POBIERANIE, PRZYGOTOWYWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

Do oznaczeń nadają się próbki surowicy oraz osocza na EDTA/heparynie (nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach h-leptyny w odpowiadających sobie próbkach surowicy lub osocza). Nie jest wymagane zewnętrzne przygotowywanie próbki przed oznaczeniem.

Oświadczenie ostrzegawcze

Stężenia biotyny > 125 ng / ml w hLeptiny wykazywały znaczącą interferencję z układem oznaczania i skutkowały fałszywie wysokimi wartościami. W związku z tym możliwe jest zastosowanie terapii biotyną (> 10 mg / dzień) do pomiaru leptyny w tym teście.

Z próbkami należy postępować zgodnie z ogólnymi zaleceniami: należy je pobierać jak najszybciej i schładzać jak najwcześniej. W przypadku dłuższego odstępu czasowego między pobraniem próbki a oznaczeniem, nierozcieńczone próbki należy przechowywać w temperaturze -20°C lub niższej w szczelnie zamykanych probówkach plastikowych. Choć w naszych doświadczeniach kilka cykli zamrażania/rozmarzania surowicy/osocza (5x) nie miało wpływu na poziom leptyny, należy charakterze reguły unikać cyklicznego zamrażania/rozmarzania próbek (w razie potrzeby próbkę można podzielić na podwielokrotności).

Wysoka czułość oznaczenia pozwala na dokonywanie pomiarów poziomu leptyny ludzkiej w próbkach o małej objętości. Ze względu na szeroki zakres skuteczności testu z reguły nie jest konieczne preparatywne rozcieńczanie próbki. W większości oznaczeń (próbki surowicy lub osocza, brak oczekiwanych wartości skrajnych wystarczające powinno być użycie nierozcieńczonych próbek w ilości 25 μ l na probówkę. W przypadku, gdy oczekuje się poziomu leptyny przekraczającego 64 ng/ml, np. u pacjentów otyłych (BMI>35), można i należy zastosować próbkę rozcieńczoną, na przykład w stosunku 1:10.

Pomiary leptyny ludzkiej w płynach innych niż surowica lub nadsącze z pożywek hodowlanych mogą dawać zupełnie różne wyniki.

ODCZYNNIKI WCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

ASS	BUF	Bufor testowy (1 butelka, 125 ml; gotowy do użycia)
Ab	BIOT	Przeciwciało wychwytyjące: przeciwekrólicza IgG, sprzężona z biotyną. Rozpuścić w 7 ml buforu testowego. (1 butelka, 7 ml; liofilizat)
Ab		Przeciwciało swoiste: królicze przeciwciało przeciwko leptynie ludzkiej. Rozpuścić w 7 ml buforu testowego. (1 butelka, 7 ml; liofilizat)
Ag	125I	Znacznik: 125I-leptyna; < 2,85 pCi lub < 105 kBq. Rozpuścić w 13 ml buforu. (1 butelka, 13 ml; liofilizat, kolor czerwony)
CAL	N	Kalibratory 1-7. (7 fiolek po 750 µl; gotowe do użycia) . Zawiera rekombinowaną leptynę. Użyć w ilości 25 µl / próbkę. Dokładne wartości podano na etykiecie fiołki
CONTROL	1	Próbka kontrolna 1 (1 fiołka, 0.75 ml; surowica ludzka; liofilizat). Rozpuścić w 750 µl buforu testowego. Dokładne wartości podano na etykiecie fiołki.
		Probówki (125 probówek powlekanych streptawidyną, gotowych do użycia)

MATERIAŁY WYMAGANE, LECZ NIEWCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

Pipety precyzyjne (50, 100 i 500 µl)
Mikropipety i pipety wielokanałowe z jednorazowymi końcówkami
Wytrząsarka typu vortex
Urządzenie do zasysania cieczy z probówek (zalecane ze względu na potencjalne niebezpieczeństwo związane z radioaktywnością i możliwością zakażenia zawartością próbek pochodzących od ludzi)
Urządzenie wytrząsające: 350 obr./min
Licznik promieniowania gamma

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKA

Wykonując oznaczenie należy postępować dokładnie z protokołem. Inkubacja w temperaturze pokojowej oznacza Inkubację w temperaturze 20-25°C.

Nie należy mieszać ze sobą odczynników o różnych numerach serii. Wszystkie odczynniki przechowywane w ciemności w temperaturze 2-8°C (patrz etykieta) zachowują trwałość do daty ważności.

Próbkę kontrolną 1, przeciwciało wychwytyjące, przeciwciało swoiste i znacznik radioaktywny należy rozpuścić w **buforze** testowym. Rozpuszczone odczynniki zaleca się odstawić na 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dokładnie, lecz delikatnie wymieszać (nie pozwalając na powstanie piany) przy użyciu wytrząsarki typu vortex.

Okres ważności odczynników po otwarciu jest zgodny z trwałością produktu Tracer. Składniki rozpuszczone (**próbkę kontrolną 1, przeciwciało wychwytyjące, przeciwciało swoiste i znacznik radioaktywny**) należy przechowywać w temperaturze -20°C (lub niższej). Należy unikać wielokrotnych cykli zamrażania i rozmrażania.

Wszystkie składniki zestawu należy przed użyciem doprowadzić do temperatury pokojowej. **Mogące występować w buforowanych roztworach osady należy przed użyciem odczynnika rozpuścić poprzez mieszanie i ogrzewanie roztworu.**

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw wyłącznie do zastosowań diagnostycznych in vitro. Przeznaczony do użytku wyłącznie przez profesjonalistów.

Posiadanie i stosowanie niniejszego zestawu podlega przepisom właściwych władz krajowych odpowiedzialnych za obrót materiałów radioaktywnych.

Nie należy mieszać ze sobą odczynników o różnych numerach serii.

- Odczynniki zawierają azydek sodu w charakterze substancji konserwującej; choć w dużym rozcieńczeniu (0,02%).
- Karta bezpieczeństwa dostępna na żądanie.

Przed rozpoczęciem oznaczenia należy dokładnie i w całości przeczytać instrukcję użycia. Należy korzystać z ważnej wersji wkładki do opakowania dostarczonej wraz z zestawem. Należy upewnić się co do dokładnego zrozumienia instrukcji.

Przed użyciem wszystkie składniki zestawu należy doprowadzić do temperatury pokojowej 20-25°C. Mogące występować w buforowanych roztworach osady należy przed użyciem rozpuścić poprzez mieszanie i ogrzewanie. Temperatura MA WPŁYW na oznaczenie. Nie ma jednak wpływu na wartości w próbkach pobranych od pacjentów.

Nie używaj widocznego zanieczyszczonego lub zanieczyszczonego mikrobiologicznie lub rozlanego materiału.

Przeostroga: Zestaw zawiera materiał pochodzenia ludzkiego i/lub zwierzęcego. Źródłowa surowica ludzka użyta w Próbcie kontrolnej 1 została poddana badaniom metodami zalecanymi, wykazując brak reaktywności z antygenem powierzchniowym wirusowego zapalenia wątroby typu B (HBsAg), przeciwciałami przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV) oraz ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV) 1 i 2. Żadna ze znanych metod analitycznych nie może zagwarantować całkowitej pewności braku środków zakaźnych; w związku z tym, wszystkie składniki zestawu i próbki pobrane od pacjentów należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

Radioaktywność - Przed zamówieniem lub użyciem materiałów radioaktywnych należy podjąć odpowiednie kroki mające na celu zapewnienie zgodności z krajowymi przepisami dotyczącymi stosowania tego rodzaju materiałów. Należy również przestrzegać lokalnych reguł określających czynności i zachowania w strefach pracy z materiałami radioaktywnymi w placówce. Porady przedstawione w niniejszym dokumencie nie zastępują lokalnych procedur, instrukcji, lub przeszkolenia personelu w placówce ani zaleceń doradców ds. ochrony przed promieniowaniem. Należy przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej oraz szczegółowych środków ostrożności związanych ze stosowaniem radionuklidu I-125.

Jod 125 charakteryzuje się czasem połowicznego rozpadu T_{1/2} wynoszącym 60 dni i emituje promieniowanie gamma o energii 35,5 keV i promieniowanie rentgenowskie o energii 27-32 keV, bez emisji promieniowania beta. Skuteczną osłonę przed promieniowaniem zapewnia ołów; pierwsza warstwa osłabienia połowkowego wynosi 0,02 mm, redukcję do wartości 10 % zapewnia warstwa 0.2.

W celu zmniejszenia dawki promieniowania należy minimalizować czas spędzany na pracy z odczynnikami radioaktywnymi (należy go zaplanować z góry) oraz maksymalizować odległość od źródła promieniowania (podwojenie odległości od źródła zmniejsza dawkę promieniowania czterokrotnie).

Tworzenie aerozoli, np. w wyniku nieprawidłowego otwierania i mieszania zawartości fiolek lub pipetowania roztworów może powodować unoszenie się w powietrzu drobnych kropelek radioaktywnych, co stanowi niebezpieczeństwo, którego należy unikać.

Roztworów zawierających jod nie wolno zakwaszać, ponieważ mogłoby to prowadzić do powstania lotnego jodu pierwiastkowego. Ponieważ niektóre związki jodu mogą przenikać przez gumę rękawic, zaleca się zakładanie dwóch par rękawic lub rękawic polietylenowych na rękawice gumowe.

W ramach czyszczenia zabrudzonych powierzchni lub urządzeń jod-125 należy chemicznie utrwalić używając do tego celu zasadowego roztworu tiosiarczanu sodu oraz ściereczki papierowej lub celulozowej.

Ogólne procedury pierwszej pomocy:

Styczność ze skórą: Dokładnie przemyć skażony obszar wodą. Zdjąć zanieczyszczoną odzież i obuwie.

Styczność z oczami: W przypadku styczności z oczami natychmiast rozpocząć przemywanie dużą ilością wody. Kontynuować przez co najmniej 15 minut. Rozchylić powieki, aby zapewnić skuteczne przemywanie oka.

Połknięcie: W przypadku połknięcia dokładnie wypłukać jamę ustną wodą. Niezwłocznie skontaktować się z lekarzem.

Nie spożywać posiłków, nie pić napojów i nie palić tytoniu w miejscach pracy z materiałem.

Materiału nie należy nigdy pipetować ustami.

Rozlany materiał należy niezwłocznie zetrzeć, a powierzchnię zdezynfekować. Zanieczyszczone powierzchnie i urządzenia należy oczyścić przy użyciu odpowiedniego detergentu.

Postępowanie z materiałami radioaktywnymi i potencjalnie zakaźnymi musi być zgodne z następującymi wytycznymi:

Materiał należy przechowywać i użytkować w specjalnie oznaczonym obszarze.

Nie spożywać posiłków, nie pić napojów i nie palić tytoniu w miejscach pracy z materiałem.

Materiału nie należy nigdy pipetować ustami.

Unikać bezpośredniego kontaktu z materiałem; zakładać fartuchy laboratoryjne i rękawice jednorazowe.

Rozlany/rozsypany materiał należy natychmiast zetrzeć. Zanieczyszczone powierzchnie i urządzenia należy oczyścić przy użyciu odpowiedniego detergentu.

Nieużyty materiał radioaktywny i odpady radioaktywne należy usuwać zgodnie z zaleceniami właściwych organów krajowych.

Oświadczenie ostrzegawcze

Stężenia biotyny > 125 ng / ml w hLeptiny wykazywały znaczącą interferencję z układem oznaczania i skutkowały fałszywie wysokimi wartościami. W związku z tym możliwe jest zastosowanie terapii biotyną (> 10 mg / dzień) do pomiaru leptyny w tym teście.

PROCEDURA OZNACZANIA

UWAGI: Wszystkie oznaczenia (roztwory kalibracyjne, próbka kontrolna 1 i próbki właściwe) należy wykonywać dwukrotnie. W celu uzyskania optymalnych wyników zaleca się dokładne pipetowanie i przestrzeganie protokołu. Podczas wykonywania oznaczenia roztwory kalibracyjne, próbka kontrolna 1 i próbki właściwe powinny być pipetowane tak szybko, jak to możliwe.

When performing the assay, the Calibrators, Control 1 and the Probes should be pipetted as fast as possible.

Schemat przebiegu protokołu oznaczenia

Nr	Probówka	Bufor testowy, kalibratory, próbka kontrolna 1, próbki μl	Przeciwciało wychwytyjące μl	Przeciwciało swoiste μl	Znacznik μl
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B0	Bufor testowy: 25	50	50	100
5-18	Kalibratory	Cal 1-7: 25	50	50	100
19,20	Próbka kontrolna 1	Próbka kontrolna 1: 25	50	50	100
21,22	Próbka 1	25	50	50	100
23,24	Próbka 2	25	50	50	100

itd.					
------	--	--	--	--	--

- 1) Probówki należy numerować w następującej kolejności:
 - 1,2 radioaktywność całkowita (**TC**),
 - 3,4 kalibrator zera (**B₀**),
 - 5-18 duplikowane kalibratory (**1-7**),
 - 19,20 duplikowana próbka kontrolna (**1**),
 - 21,22 itd. Duplikowane próbki.
- 2) Dodać **25** µl buforu testowego do probówek 3 i 4.
Dodać **25** µl buforu testowego do probówek 5-18.
 - 5,6 kalibrator 1
 - 7,8 kalibrator 2, itd.
- 3) Dodać **25** µl próbki **kontrolnej 1** do probówek 19 i 20.
- 4) Dodać **25** µl pierwszej próbki 1 do probówek 21 i 22 itd.
- 5) Dodać **50** µl przeciwciała wychytującego poczynawszy od próbki 3.
- 6) Dodać **50** µl przeciwciała swoistego poczynawszy od próbki 3.
- 7) Dodać **100** µl znacznika do wszystkich probówek.
- 8) Wyjąć probówki 1 i 2 (radioaktywność całkowita) lub zatkać je korkiem.
- 9) Wytrząsać próbki przy użyciu wytrząsarki (350 obr./min.) **przez noc** (co najmniej 15 h) **w temperaturze pokojowej**. (W przypadku probówek 1 i 2 nie trzeba wykonywać kroków 9-12)
- 10) Całkowicie odciągnąć ciecz (z wyjątkiem probówek 1 i 2!).
Należy uważać, by nie naruszyć powłoki probówek. W zależności od wyposażenia dostępnego w laboratorium i przyjętej praktyki, odciągnięcie cieczy można zastąpić dokładną dekantacją.
- 11) Dodać **500** µl buforu testowego do probówek (z wyjątkiem probówek 1 i 2!).
- 12) Odciągnąć ciecz (patrz krok 10).
- 13) Poddać wszystkie probówki badaniu radioaktywności przy użyciu licznika promieniowania gamma przez okres 1-3 minuty.

OBLICZANIE WYNIKÓW

Wyznaczanie krzywej kalibracyjnej

Kalibrator	B ₀	1	2	3	4	5	6	7
ng/ml	0	1	2	4	8	16	32	64

1. Wyznaczyć średnią liczbę zliczeń dla każdej pary probówek. Wyznaczona wartość jest wartością wiązania B.
2. Wartość B₀ jest średnią wzorca zerowego (probówki 3 i 4).
3. Obliczyć procent związania (% B/B₀) dzieląc B przez B₀:

$$\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$$
4. Wyznaczyć wykres % B/B₀ jako funkcji stężenia roztworów kalibracyjnych na papierze półlogarytmicznym lub papierze logit-log. Dla ułatwienia zaleca się korzystać z komputerowych programów redukcji danych.
5. Obliczyć procent związania kalibratora zera:
 Średni odczyt z probówek 3,4 (B₀) podzielić przez średni odczyt z probówek 1,2 (radioaktywność całkowita) pomnożony przez 100%. Wartość %B₀/TC powinna wynosić > 20%.

Ocena stężeń w próbkach:

Odczytać wartość stężenia (odciętą) odpowiadającą wartości %B/B₀ próbki w sposób podany w przykładzie poniżej:

Średnia liczba zliczeń dla kalibratora zera (B₀): 8648 cpm
 Średnia liczba zliczeń dla próbki z próbką: 4283 cpm

$$\begin{aligned} \%B/B_0 &= \text{liczba zliczeń dla próbki} / B_0 \times 100\% \\ &= 4283 / 8648 \times 100\% \\ &= 0.495 \times 100\% = 49.5\% \end{aligned}$$

Dla wartości 49,5% na osi y (rzędnych) otrzymuje się na osi x (odciętych) wartość 7,28 ng/ml.

W przypadku próbek rozcieńczonych, pomnożenie wartości wyznaczonej graficznie lub z pomocą programu komputerowego przez współczynnik rozcieńczenia daje w wyniku stężenie leptyny w próbce.

Stężenie próbki kontrolnej:

Stężenie próbki kontrolnej 1 powinno mieścić się w zakresie stężeń podanym na etykiecie. Mierzone stężenia leptyny są ważne jedynie wówczas, gdy wartość zmierzona dla próbki kontrolnej znajduje się w zakresie stężeń podanym na etykiecie. W przeciwnym wypadku wymagana jest analiza procesu, a następnie akceptacja lub odrzucenie wyników w oparciu o rezultaty tej analizy.

SPODZIEWANE WARTOŚCI NORMALNE

Poziom leptyny w surowicy determinowany jest głównie przez tłuszczową masę ciała: wartości u osób szczupłych są mniejsze, zaś u osób otyłych wysokie. Ponadto, istnieje wyraźna różnica między płciami: poziom leptyny przy danym procentowym udziale tkanki tłuszczowej jest wyższy u kobiet niż u mężczyzn. Ponadto wpływ na poziom leptyny ma również faza dojrzewania płciowego. Tym samym wszelkie próby wyznaczenia zakresów spodziewanych poziomów leptyny powinny brać pod uwagę wymienione powyżej czynniki.

Istnieją różne metody oceny zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie, na przykład obliczanie wskaźnika masy ciała (masa (kg) podzielona przez kwadrat wysokości (m)) (BMI), ocena impedancji bioelektrycznej (BIA) lub absorpcjometria podwójnej energii promieni RTG (DXA) całego ciała. Choć dokładność metody BMI w odzwierciedlaniu faktycznej tłuszczowej masy ciała jest gorsza niż dokładność bardziej złożonych metod takich, jak BIA czy DXA, metoda ta charakteryzuje się licznymi zaletami:

- 1) Niezależność od stosowanych modeli regresji.
- 2) Łatwość wyznaczania: wymagane jedynie pomiary wzrostu i masy ciała.
- 3) W większości przypadków dostępność danych retrospektywnych.
- 4) Największa precyzja w przypadku krótkoterminowych zmian tłuszczowej masy ciała, np. podczas głodówek.

W związku z powyższym, przedstawione poniżej zakresy oczekiwanych wartości stężenia leptyny w surowicy zostały powiązane z wartościami BMI jako główną niezależną zmienną zakłócającą, oraz poddane stratyfikacji w zależności od płci i stadium dojrzalności (45; patrz ryciny 1-8 i tabele 4-11). Dla pacjentów w wieku powyżej 20 nie obserwuje się istotnej zależności wyników od wieku. Podane zakresy wartości spodziewanych skorygowane o płeć i wiek można wykorzystać do porównywania stężeń leptyny mierzonych przy danym BMI z pacjentami zdrowymi o tym samym BMI w celu wykrycia patologicznych odchyłek od normy.

Najlepiej dopasowanymi liniami regresji dla poszczególnych podgrup były krzywe wykładnicze o wzorze $\text{leptyna} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI})}$.

Wartości 5. - i 95. percentyla wyznaczone są następującymi wzorami:

$$\text{leptyna} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)} \quad \text{ i } \quad \text{leptyna} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)}$$

Na wykresach półlogarytmicznych (oś y = log stężenia leptyny) krzywe te są liniami prostymi. Wartości stałych a, b i c dla pacjentów poszczególnych płci i stadiów dojrzewania, a także pacjentów dorosłych, podano w tabeli 3. W oparciu o podane wartości, zakresy spodziewanych stężeń leptyny można z łatwością rozszerzyć na zakresy niższych lub wyższych wartości BMI.

Przykład:

50 percentyl dla chłopców w fazie Tannera 3 i 4 ilustruje następująca krzywa::

$$\text{leptyna} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI})}$$

$$5 \text{ percentyl: } \text{leptyna} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} - 1,1919)}$$

$$95 \text{ percentyl: } \text{leptyna} = 0.0181 \cdot e^{(0.2067 \cdot \text{BMI} + 1,1919)}$$

Na wykresie półlogarytmicznym wskazane linie są równoległe, z zachowaniem równej odległości do 50 percentyla.

Przeliczenie na wskaźniki standaryzowane (SDS; Z-score)

Odchylenia mierzonego poziomu leptyny od wartości referencyjnych można wykryć, wyliczając wartość SDS poprzez odniesienie stężenia leptyny do wartości wskaźnika BMI pacjenta, aby uzyskać średnią wartość leptyny dla danej płci i grupy wiekowej, a odchylenie wyrazić jako odchylenie standardowe będące wielokrotnością x. Przedstawioną metodę można uznać za standaryzację względem normalnej kohorty referencyjnej. Wartości leptyny można zatem skorygować względem wskaźnika BMI, płci, etapu dojrzewania płciowego/wieku (tj. zneutralizować wpływ płci, wieku i wskaźnika BMI) i uzyskać zbiorcze dane do dalszych analiz.

SDS leptyny można wyliczyć z następującego wzoru, przy uwzględnieniu logarytmicznego rozkładu poziomów leptyny:

$$\text{SDS leptyny} = (\ln(\text{leptyna}) - \ln(a) - b \cdot \text{BMI}) / d$$

W powyższym wzorze ln oznacza logarytm naturalny (odnoszący się do podstawy e). Stałe a, b i d przedstawiono w Tabeli nr 3 w podziale na płeć i etap dojrzewania płciowego/wiek.

Przykład:

Chłopiec w fazie Tannera 3, BMI = 25 kg/m², zmierzone stężenie leptyny = 5 ng/ml.

$$\begin{aligned} \text{SDS leptyny} &= (\ln(5) - \ln(0.0181) - 0.2067 \cdot 25) / 0.6850 = \\ &= (1.6094 - (-4.0118) - 5.1675) / 0.6850 = 0.66 \end{aligned}$$

Szacowanie optymalnego rozcieńczenia próbek

Ponieważ wartości stężeń leptyny w surowicy mogą różnić się o kilka rzędów wielkości, głównie w zależności od tłuszczowej masy ciała, precyzyjny pomiar może wymagać odpowiedniego rozcieńczenia próbki. W związku z tym, w celu możliwie najlepszego wykorzystania precyzji zestawu, próbki należy rozcieńczać tak, aby stężenie leptyny było bliskie spodziewanej wartości. Zakresy referencyjne stanowią przydatne narzędzie do dobrego szacowania spodziewanych stężeń leptyny dla danej wartości BMI oraz płci i wieku pacjenta.

Przykład:

Dorośła kobieta, BMI = 45 kg/m² (130 kg, wzrost 1.70 m). Na podstawie zakresu referencyjnego dla dorosłych kobiet można ustalić, że średni poziom leptyny przy wskaźniku BMI 45 kg/m² wynosi około 224 ng/ml. Optymalne rozcieńczenie wyniosłoby 1:30.

ZAŁĄCZNIK

Tabela 3: Stałe a, b, c i d do obliczania zakresów referencyjnych stężeń leptyny i wskaźnik odchylenia standardowego dla oznaczenia poziomu leptyny w oparciu o wartość BMI. Grupy zdrowych ochotników poddano stratyfikacji w oparciu o płeć i stadium dojrzałości płciowej/wiek. TS = stadium Tannera, n = liczba badanych, a,b,c i d = stałe (definicje podano w tekście).

Grupa	n	a	b	c	d
Mężczyźni					
TS 1&2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3&4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Dorośli	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
Kobiety					
TS 1&2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3&4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Dorośli	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Tabela 4: 1 i 2 faza rozwoju wg. skali Tanner (kobiety)

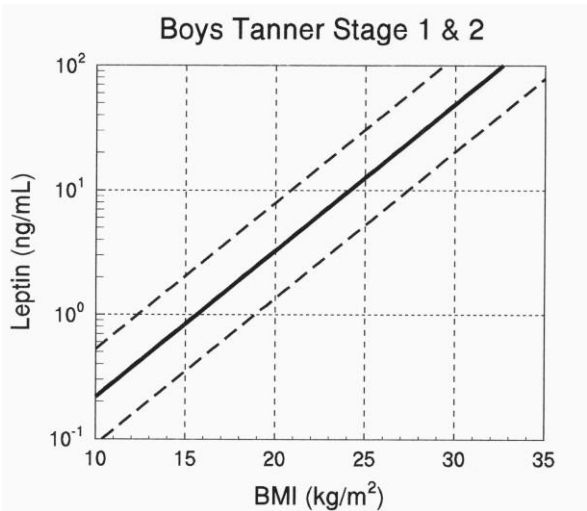
BMI (kg/m ²)	Percentyl (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.22	0.30	0.66	1.45	1.99
12	0.28	0.39	0.85	1.86	2.56
13	0.36	0.50	1.09	2.38	3.29
14	0.46	0.64	1.40	3.06	4.22
15	0.60	0.82	1.79	3.93	5.42
16	0.76	1.05	2.30	5.04	6.96
17	0.98	1.35	2.95	6.47	8.93
18	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
19	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
20	2.07	2.85	6.25	13.7	18.9
21	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
22	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
23	4.37	6.03	13.2	29.0	40.0
24	5.62	7.75	17.0	37.2	51.4
25	7.21	9.95	21.8	47.8	65.9
26	9.26	12.8	28.0	61.4	84.7
27	11.9	16.4	35.9	78.8	109.0
28	15.3	21.1	46.1	101.0	140.0
29	19.6	27.0	59.2	130.0	
30	15.2	34.7	76.1		
31	32.3	44.6	97.7		
32	41.5	57.2	125.0		
33	53.2	73.4			
34	68.4	94.3			
35	87.8	121.0			
36	113				
37	145				



Rycina 1: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 1 i 2 faza rozwoju wg. skali Tanner (kobiety) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 5: 1 i 2 faza rozwoju wg. skali Tanner (mężczyźni)

BMI (kg/m ²)	Percentyl (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				



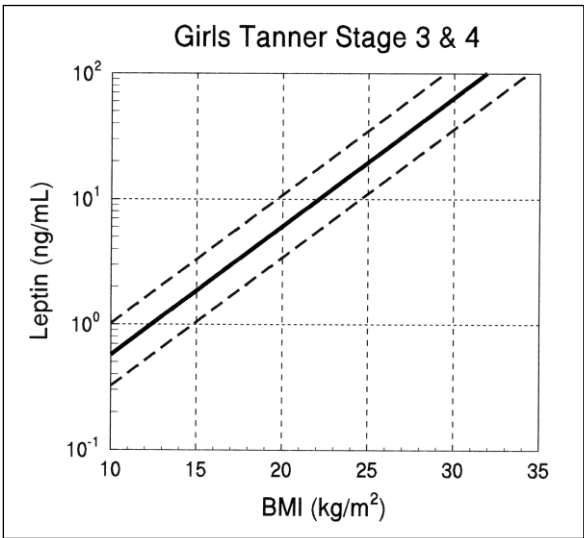
Rycina 2: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 1 i 2 faza rozwoju wg. skali Tanner (mężczyźni) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 6: 3 i 4 faza rozwoju wg. skali Tannera (kobiety)

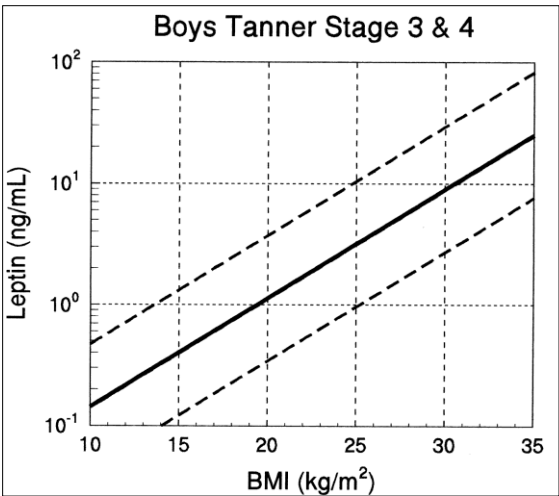
Percentyl (µg/L)					
BMI (kg/m²)	1	5	50	95	99
11	0.32	0.41	0.73	1.29	1.63
12	0.41	0.52	0.92	1.63	2.06
13	0.52	0.66	1.16	2.07	2.61
14	0.65	0.83	1.47	2.61	3.31
15	0.83	1.05	1.87	3.31	4.19
16	1.05	1.33	2.36	4.19	5.30
17	1.33	1.68	2.99	5.30	6.71
18	1.68	2.13	3.78	6.71	8.49
19	2.13	2.69	4.79	8.5	10.8
20	2.69	3.41	6.06	10.7	13.6
21	3.41	4.31	7.67	13.61	17.2
22	4.32	5.46	9.71	17.2	21.8
23	5.46	6.91	12.3	21.8	27.6
24	6.91	8.75	15.6	27.6	34.9
25	8.75	11.1	19.7	34.9	44.2
26	11.1	14.0	24.9	44.2	56.0
27	14.0	17.7	31.6	56.0	70.9
28	17.8	22.5	39.9	70.9	89.7
29	22.5	28.4	50.5	89.7	114.0
30	28.4	36.0	63.9	114.0	144.0
31	36.0	45.6	80.9	144.0	
32	45.6	57.7	80.2	144.0	
33	57.7	73.0	102.0		
34	73.0	92.4	130.0		
35	92.4	117.0			
36	117.0	148.0			
37	148.0				

Tabela 7: 3 i 4 faza rozwoju wg. skali Tannera (mężczyźni)

Percentyl (µg/L)					
BMI (kg/m²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.18	0.58	0.94
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		



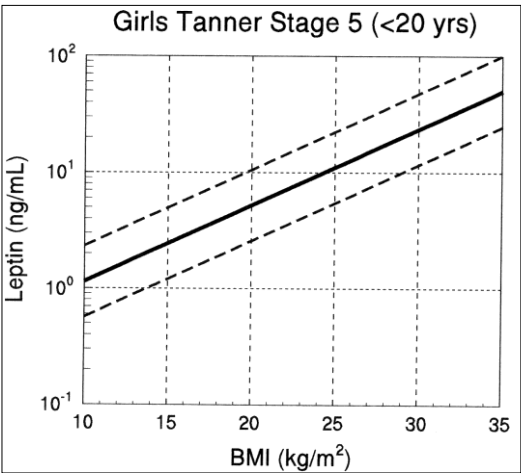
Rycina 3: Zakres odniesienia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 3 i 4 faza rozwoju wg. skali Tannera (kobiety) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]



Rycina 4: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 3 i 4 faza rozwoju wg. skali Tannera (mężczyźni) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 8 : 5 faza rozwoju wg. skali Tannera (kobiety)

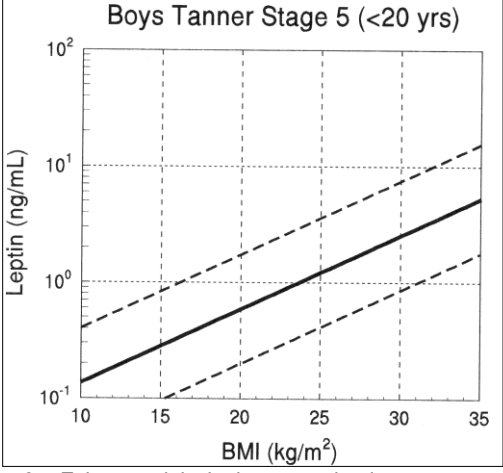
Percentyl (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
12	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
13	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
14	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
15	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
16	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
17	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
18	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
19	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
20	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
21	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
22	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
23	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
24	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
25	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
26	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
27	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
28	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
29	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
30	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
31	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
32	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
33	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
34	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
35	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
36	21.5	28.7	58.1	118.0	
37	25.0	33.4	67.6	137.0	
38	29.1	38.8	78.6		
39	33.8	45.1	91.4		
40	39.4	52.5	106.0		



Rycina 5: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 5 faza rozwoju wg. skali Tannera (kobiety) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 9 : 5 faza rozwoju wg. skali Tannera (mężczyźni)

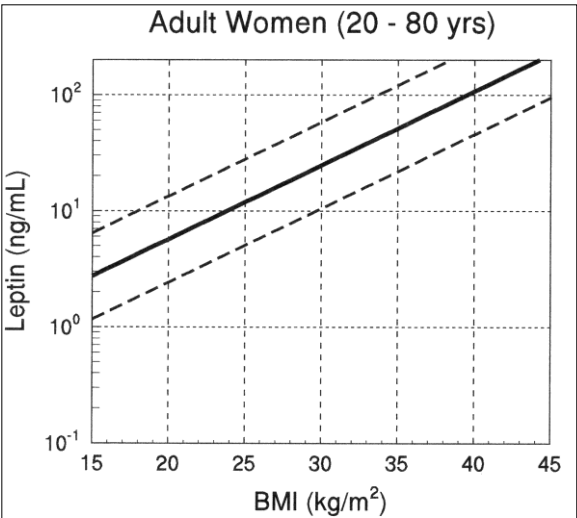
Percentyl (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3



Rycina 6: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: 5 faza rozwoju wg. skali Tannera (mężczyźni) [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 10 Dorosłe Kobiety

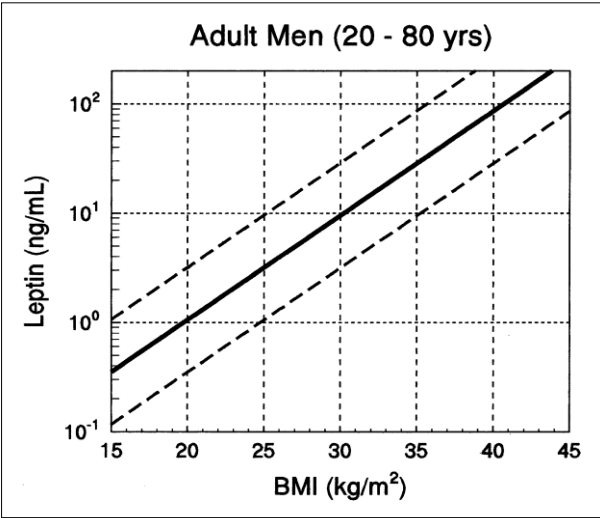
Percentyl ($\mu\text{g/L}$)					
BMI (kg/m^2)	1	5	50	95	99
11	0.46	0.65	1.53	3.59	5.10
12	0.53	0.75	1.77	4.16	5.90
13	0.61	0.87	2.05	4.82	6.83
14	0.71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	7.82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0.95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10.0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1.99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7.67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8.88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28.0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46.0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7.87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9.97	14.1	33.3	78.2	111.0
33	11.5	16.4	38.5	90.5	129.0
34	13.4	19.0	44.6	105.0	149.0
35	15.5	22.0	51.6	121.0	
36	17.9	25.4	59.8	141.0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24.0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108.0		



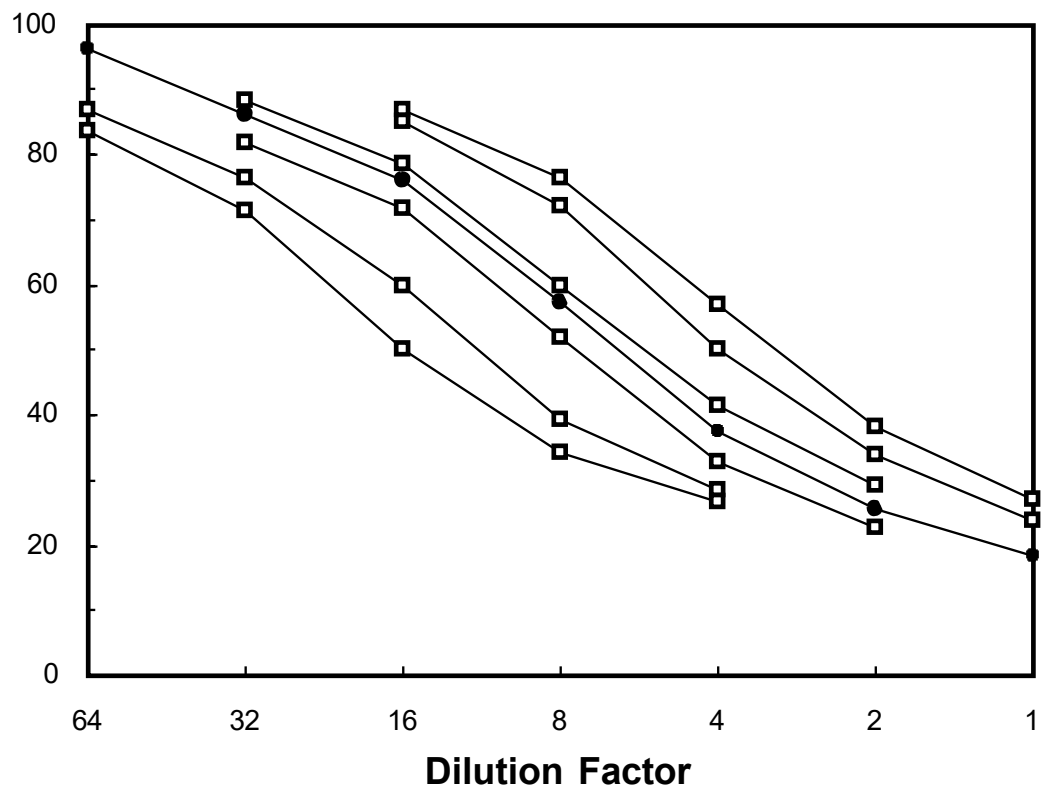
Rycina 7: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: dorosłe kobiety [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]

Tabela 11 Dorosli mężczyźni

Percentyl ($\mu\text{g/L}$)					
BMI (kg/m^2)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		



Rycina 8: Zakres odniesienia stężenia leptyny w surowicy człowieka względem BMI: dorośli mężczyźni [patrz tekst w celu uzyskania szczegółów]



Współczynnik rozcieńczania

Rycina 9: Seria rozcieńczeń roztworów kalibracyjnych leptyny (kółka pełne) i różnych surowic o różnych stężeniach leptyny. Poziom leptyny w nierozcieńczonym kalibratorze wynosił 16 ng/ml. Na ilustracji przedstawiono średnie wartości dwukrotnych oznaczeń.

Odnosniki

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.
30. Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.

39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. J Clin Endocrinol Metab. 81:3424-3427.
40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. Pediatrics. 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. Horm Metab Res. 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. Lancet. 348:159-161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. J Molecular Endocrinol. 27: 69-76.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin,s.318-326. In:Leptin -the voice of adipose tissue, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 88(11) 5169-5174
47. Guebra-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, Nephrol Dial Transplant 20: 129-134

PODSUMOWANIE – Test DAsource Hu LEPTIN RIA KIPMR44

Przygotowanie odczynnika:	Reconstitution:
Przeciwciało wychwytyjące	w 7 ml buforu testowego
Przeciwciało swoiste	w 7 ml buforu testowego
Znacznik	w 13 ml buforu testowego
Próbka kontrolna	w 750 µl buforu testowego
róbki osocza/surowicy można stosować w postaci nierozcieńczonej.	

Proponowana procedura podwójnego oznaczania

Dodanie odczynnika [µl]					
Liczba probówek	Zawartość probówek	Bufor testowy, kalibratory, próbka kontrolna 1, próbki	Przeciwciało wychwytyjące	Przeciwciało swoiste	Znacznik
1,2	TC	–	–	–	100
3,4	B ₀	Ass Buf: 25	50	50	100
5-18	Kalibratory	CAL 1-7: 25	50	50	100
19,20	Próbka kontrolna 1	25	50	50	100
21,22	Próbka 1	25	50	50	100
23,24 (etc)	Próbka 2 (etc)	25	50	50	100

Probówki nr 1,2: wyjąć do momentu badania radioaktywności
Poddać inkubacji, co najmniej przez noc. 15 godzin w temp. pok., 350 obr./min.
Całkowicie odciągnąć ciecz. Należy uważać, by nie naruszyć powłoki probówek.
Dodać 500 µl buforu testowego do probówek.
Całkowicie odciągnąć ciecz (patrz wyżej).
Dokonać zliczania radioaktywności dla wszystkich probówek.



Human-Leptin-RIA-CT

Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen für die quantitative
Bestimmung von humanem Leptin
KIPMR44
für in-vitro-Diagnostik

de

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium -
Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ♦ Messung der gesamt-Leptin-Konzentration in **Serum, Plasma**
- ♦ Kalibriert am Internationalen Standard der **WHO: NIBSC Code 97/594**
- ♦ Hoch affine Antikörper keine Beeinträchtigungen durch Leptin-Bindungsproteine
- ♦ **Einzelstandards** mit **0 - 64 ng/ml** sind im Kit enthalten
- ♦ Einfache Handhabung: gebrauchsfertiger Standard/ weiter Standardbereich
- ♦ Einsatz kleiner Serumvolumina, Messungen von Kapillarblut

EINFÜHRUNG

1994 wurde das Proteohormon Leptin als das Produkt des ob-Gens identifiziert (1,2). Es besitzt ein Molekulargewicht von 16 kD und man nimmt an, daß es eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Körpergewichts spielt. Seine Aminosäuresequenz weist keine größeren Homologien zu anderen Proteinen auf (1). Leptin wird fast ausschließlich von differenzierten Fettzellen produziert (3-5). Es wirkt auf das zentrale Nervensystem ein, vor allem auf den Hypothalamus, wobei es die Nahrungsaufnahme unterdrückt und den Energieverbrauch steigert (2,6-9). Es existieren unterschiedlich gespleißte Formen des Leptin-Rezeptors, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Sie gehören zu der Cytokin-Klasse-1-Rezeptor-Familie (10-12) und kommen ubiquitär im Körper vor (10,11,13,14). Dies läßt auf eine umfassende Funktion von Leptin schließen, die bis jetzt aber noch nicht völlig verstanden wird.

Eines der vielen Leptin Bindungsproteine stellt eine zirkulierende Form eines Leptin-Rezeptors dar (15). Neben seinem Einfluß auf den Stoffwechsel besitzt Leptin auch einen starken Einfluß auf eine Anzahl endokriner Achsen. In männlichen Mäusen schwächte es die durch Hungern induzierte

ausgeprägte Abnahme von LH, Testosteron und Thyroxin bzw. die Zunahme von ACTH und Corticosteron ab. In weiblichen Mäusen verhinderte Leptin die durch Hungern induzierte Verzögerung des Eisprungs (16). Ob/ob-Mäuse, die aufgrund einer ob-Genmutation einen Leptin-Mangel aufweisen, sind unfruchtbar. Dieser Defekt konnte durch Leptinapplikation korrigiert werden, jedoch nicht durch Gewichtsverlust infolge von Nahrungskarenz (17). Dies läßt darauf schließen, dass Leptin eine wichtige Rolle für die Reproduktion spielt.

Die Wirkung von Leptin kann wenigstens teilweise auf den supprimierenden Effekt von Leptin auf die Bildung und Sekretion von Neuropeptid Y (NPY) durch Neuronen des Nucleus arcuatus erklärt werden (6,18,19). NPY ist ein starker Stimulator für den Appetit (20,21) und ist bekanntermaßen an der Regulation verschiedener Hypophysen-Hormone beteiligt. Dazu gehören z.B. die Suppression von Wachstumshormon durch Stimulierung von Somatostatin (22,23), die Suppression von Gonadotropinen (23) und die Stimulierung der Hypophysen-Nebennieren-Achse (21).

Die wichtigste Variable, die die zirkulierende Leptinkonzentration bestimmt, ist die Körperfettmasse (24-26). Bei regelmäßiger Nahrungszufuhr reflektiert Leptin den Anteil von Fettgewebe (27). Die Leptinkonzentration steigt exponentiell mit der Fettmasse an. Diese konstitutive Synthese von Leptin wird durch eine Vielzahl von nicht-hormonellen und hormonellen Faktoren moduliert. Stimulatoren bei Nagern und Menschen sind Überernährung (28,29), Insulin (3,5,30-33) und Glucocorticoide (5,34-36). Hemmfaktoren sind Fasten (27), cAMP und β 3-Adrenozeptor-Agonisten (35).

Generell läßt sich sagen, daß Leptin einen wesentlichen Bestandteil einer Vielzahl von metabolischen und endokrinen Feedback-Schleifen darstellt.

Für die klinische Verwendung ist es wichtig zu wissen, daß die Leptinwerte eine moderate zirkadiane Variation zeigen, mit einem Maximum gegen 2 Uhr nachts (37). Die Leptinwerte zu dieser Zeit sind um etwa 30 - 100% höher als die Werte, die morgens oder am frühen Nachmittag gemessen werden. Zusammen mit der Nahrungsaufnahme müssen diese Schwankungen bei der Entnahme von Blutproben berücksichtigt werden. Unter standardisierten Bedingungen, z.B. normaler Essensrhythmus und Blutabnahme am Morgen oder frühen Nachmittag, reicht eine

Leptin-Messung für eine informative Aussage aus.

Für eine aussagekräftige Interpretation der gemessenen Leptin-Werte werden Referenz-Bereiche benötigt. Da die Körperfettmasse die Werte am meisten beeinflusst, sollten Referenz-Bereiche auf Körperfettmasse bezogen sein (Body Mass Index, BMI, oder Prozent Körperfett, bestimmt durch

Bioelektrische Impedanz-Schätzung, BIA). Es besteht eine Altersabhängigkeit (38) der Leptinwerte. Außerdem besitzen Frauen bei gleicher Fettmasse einen höheren Leptinspiegel als Männer (39,40). Daher sollten die Referenzbereiche zusätzlich noch das Geschlecht und die pubertäre Entwicklung berücksichtigen.

Der bei fettleibigen Menschen vorliegende meist hohe Leptinspiegel läßt auf eine Leptin-Unempfindlichkeit schließen (20, 26, 37, 38, 41, 42). Bei einer kleinen Anzahl von Patienten wurden jedoch unverhältnismäßig niedrige Leptinwerte, bezogen auf die Körperfettmasse, gefunden. Weitere Studien werden nötig sein, um zu beweisen, daß diese Patienten ein neues pathophysiologisches Krankheitsbild repräsentieren: Leptinmangel. Da Leptin von großer Wichtigkeit für reproduktive Funktionen ist, können möglicherweise neue pathophysiologische Mechanismen entdeckt werden, die Unfruchtbarkeit mit einer ungenügenden Leptin-Produktion verknüpfen.

VERWENDUNGSZWECK

Mit diesem Immunoassay Kit kann humanes Leptin in Serum oder Plasma (EDTA-/Heparin-Plasma) bestimmt werden.

Sofern ein normaler Essrhythmus vorliegt, reicht die Einzel-Messung einer Blutprobe, die morgens oder am frühen Nachmittag gewonnen wurde, völlig aus.

Der Vergleich der Ergebnisse mit BMI-bezogenen Referenzwerten kann bei der Einschätzung eines relativen Leptinmangels als mögliche Ursache für Fettleibigkeit helfen bzw. Hinweise auf eine Leptin-Resistenz geben. Aufgrund seiner hohen Korrelation mit der Körperfettmasse kann die Leptin-Bestimmung unter standardisierten Bedingungen als einfacher und kostengünstiger Test für die Bestimmung des Körperfettes genutzt werden.

METHODIK

Der Radioimmunoassay für humanes Leptin verwendet einen polyklonalen Antikörper mit hoher spezifischer Affinität für Leptin. Leptin wird quantitativ erkannt, eventuell vorhandene Bindungsproteine von Leptin stören den Test nicht. Die Röhrchen wurden mit Streptavidin beschichtet. Die Separation erfolgt durch einen biotinylierten Sekundär-Antikörper mit Bindungsspezifität für den Primär-Antikörper. Die Standards und der 125I-Tracer wurden aus rekombinantem Leptin hergestellt.

Kalibrierung des Assays:

Der Assay ist am Internationalen Standard für human Leptin kalibriert. Der Standard der WHO wird unter Code 97/594 (43) vom NIBSC (44) vertrieben. Eine Ampulle der Präparation, in 1 ml Verdünnungspuffer des Kits rekonstituiert, wird mit dem Nominalgehalt von 5000 ng rekombinanten human Leptin bestimmt. Die Standards bestehen aus rekombinantem Leptin in Konzentrationen von **1, 2, 4, 8, 16, 32 und 64 ng/ml**.

ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

Die **analytische Sensitivität** des Lep-R44 beträgt **0,1 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards).

Der DIASource Leptin RIA KIPMR44 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die **Linearität von Serienverdünnungen** ist hervorragend (s. Abb 9)

Die **Wiederfindung** von rekombinantem hLeptin in verschiedenen Humansenen betrug im **Mittel 97%** der theoretisch zu erwartenden Menge.

Die Inter- und Intraassay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10%. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Inter-Assay-Varianz

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	8.975	0.48	5.3
Probe 2	6.3	0.32	5.1
Probe 3	20.9	1.05	5.0

Tabelle 2: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	6	19,67	0.87	5.3
Probe 2	6	6,95	0.33	5.1

PROBEN: EIGNUNG, VORBEREITUNG UND LAGERUNG

Geeignet sind Serum- und Heparin/EDTA-Plasmaproben (in korrespondierenden Serum- und EDTA-Plasma-Proben wurden keine signifikanten Abweichungen im hLeptin-Gehalt gefunden). Eine spezielle externe Probenvorbehandlung ist nicht nötig.

Warnhinweis

Biotin-Konzentrationen von >125 ng/ml in hLeptin kit zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die Leptinmessung mit diesem Test nicht verwendet werden.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare hLeptin Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt hLeptin Messungen in kleinen Probenvolumina. Im Allgemeinen ist durch den großen Messbereich des Kits eine vorbereitende Serum- oder Plasma-Verdünnung nicht notwendig. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten unverdünnte Proben mit 25 µl pro Röhrchen eingesetzt, geeignet sein. Falls Werte von über 64 ng/ml erreicht werden können, sollte und kann die Probe vorab in Testpuffer A verdünnt werden, z.B. bei stark adipösen Patienten (BMI>35kg/m²) wird eine Vorverdünnung von 1:10 empfohlen.

Die hLeptin-Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

ASS	BUF	Testpuffer, gebrauchsfertig , 125 ml
Ab	BIOT	Fang-Antikörper, lyophilisiert, 7 ml, biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG. Rekonstituieren in 7 ml Testpuffer.
Ab		Spezifischer Antikörper, lyophilisiert, 7 ml, Rekonstituieren in 7ml Testpuffer.
Ag	125I	Tracer, lyophilisiert, 13 ml, 2,85 µCi bzw. < 105 kBq. in 13 ml A rekonstituieren, rot gefärbt
CAL	N	Standards, gebrauchsfertig, 750 µl, enthalten rekombinantes humanes Leptin Die Standardkurve deckt einen Bereich von 1-64 ng/ml (1;2;4;8;16;32 und 64 ng/ml) Leptin ab. Für den Assay werden jeweils 25 µl pro Röhrchen eingesetzt.
CONTROL	1	Kontrolle 1, lyophilisiert, 750 µl, in 750 µl A rekonstituieren. Soll-Konzentration auf dem Zertifikat +/- 2SD.
		Röhrchen, 125 Stück, beschichtet mit Streptavidin

Zusätzlich benötigte Materialien

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
Vortex-Mischgerät
Gamma-Zähler
Schüttler

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten muss der im Kit erhaltene Testpuffer A verwendet werden. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden. Dies gilt insbesondere für die Kontrolle N!

Die Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien entspricht der Tracer Haltbarkeit

Rekonstituierte Komponenten sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Alle Komponenten des Kits müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der DIAsource Kit ist nur zur In-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. DIAsource ImmunoAssays SA kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös seien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **N**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen human Immuninsuffizienz Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

NaAzid

< 0,02% Natriumazid

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr verdünnt (0,02%). Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr stark verdünnt (0,02%). Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

Beim Umgang mit radioaktivem und potentiell infektiösem Material müssen folgende Richtlinien befolgt werden:

Das Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert und verwendet werden.

Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!

Niemals mit dem Mund pipettieren!

Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.

Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergenz gereinigt werden.

Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichtsbehörden gelagert werden.

Radioaktivität

Vor der Bestellung oder dem Gebrauch radioaktiver Produkte ist es notwendig, die **Einhaltung der nationalen Bestimmungen** oder Gesetze die deren Anwendung regeln, sicherzustellen. Örtliche Vorschriften der jeweiligen Einrichtung, die Umgang und Verhalten im Radioaktiv-Arbeitsbereich regeln, müssen befolgt werden. Die hier gegebenen Ratschläge ersetzen nicht die lokalen Regeln, Anweisungen oder Ausbildungen der jeweiligen Einrichtung, ebenso wenig die Anordnungen des zuständigen Strahlenschutzbeauftragten. Es ist wichtig, die Richtlinien der guten Laborpraxis zu erfüllen, daneben gilt es die Besonderheiten im Umgang mit dem Radionuklid Jod-125 zu beachten.

Jod-125 hat eine Halbwertszeit T_{1/2} von 60 Tagen und emittiert 35,5 keV Gamma-Strahlung, 27 – 32 keV Röntgen-Strahlung und keine Beta-Strahlung. Effektive Abschirmung ist durch Blei möglich, die Halbwertschichtdicke beträgt 0,02 mm Blei, Reduktion auf 10% ist durch 0,2 mm zu bewerkstelligen.

Zur Reduzierung der Strahlendosis sollte die Zeit des Umgangs mit Radioaktivität minimiert werden (Arbeitsschritte vorplanen), sowie die Entfernung zur Strahlenquelle maximiert werden (Verdopplung der Entfernung reduziert die Strahlendosis auf ein Viertel). Unsachgemäßes Öffnen von Gefäßen oder Pipettieren von Lösungen kann zur Bildung von Aerosolen, also Freisetzung von Radioaktivität in Tröpfchenform, führen und muss vermieden werden. Der pH-Wert von Lösungen, die Jod enthalten, sollte nicht im sauren Bereich sein, da dies zur Freisetzung von flüchtigem elementarem Jod führen kann.

Einige Jod-Verbindungen können durch Gummihandschuhe diffundieren, deshalb sollten zwei Paar oder Polyethylen- und Gummihandschuhe getragen werden.

Zur Reinigung von kontaminierten Flächen oder Gegenständen sollte, um das Jod-125 chemisch zu stabilisieren, alkalische Natriumthiosulfatlösung und Papier od. Zellstoff verwendet werden.

Warnhinweis

Biotin-Konzentrationen von >125 ng/ml in hLeptin zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die Leptinmessung mit diesem Test nicht verwendet werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Nr.	Röhrchen	Testpuffer, Standards, Kontrolle , Proben	Fang-Antikörper	Spezifischer Antikörper	Tracer
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B ₀	Testpuffer: 25	50	50	100
5-18	Standards	Standards: 25	50	50	100
19,20	Kontrolle	Kontrolle: 25	50	50	100
21,22	Probe 1	25	50	50	100
23,24	Probe 2	25	50	50	100
etc...					

(Alle Volumina in µl)

1) Beschriftung der Röhrchen:

- 1, 2 Gesamtaktivität (total counts, TC),
 - 3, 4 Nullstandard (B_0),
 - 5 - 18 Standards als Doppelwerte,
 - 19, 20 Kontrolle ,
 - ab 21 Proben als Doppelwerte.
- 2) Zugabe von je 25 µl Testpuffer in Röhrchen 3, 4.
Zugabe von je 25 µl der Standards in Röhrchen 5-18:
5, 6 Standard 1,
7, 8 Standard 2; usw. bis 18.
 - 3) Zugabe von je 25 µl Kontrolle in Röhrchen 19 und 20.
 - 4) Zugabe von je 25 µl Probe ab Röhrchen 21.
 - 5) Zugabe von 50 µl Fang-Antikörper, ab Röhrchen 3.
 - 6) Zugabe von 50 µl Spezifischer Antikörper , ab Röhrchen 3.
 - 7) Zugabe von 100 µl Tracer in alle Röhrchen.
Röhrchen 1 und 2 (Gesamtaktivität) mit Stopfen verschließen und bis zum Schritt 12) beiseite stellen.
 - 8) Die restlichen Röhrchen über Nacht (mindestens 15 Stunden) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 350 upm inkubieren.
 - 9) Flüssigkeit ab Röhrchen 3 dekantieren oder vollständig absaugen, dabei darf die Beschichtung der Röhrchen nicht beschädigt werden.
 - 10) Zugabe von je 500 µl Testpuffer
 - 11) Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, siehe Punkt 9).
 - 12) Alle Röhrchen im Gamma-Counter für 1 (bis 3) min zählen.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Leptin-Konzentrationen:

Standard	B_0	1	2	3	4	5	6	7
ng/ml	0	1	2	4	8	16	32	64

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** (MW) der Doppelbestimmungen (entspricht der Bindung B).
- 2) Der Mittelwert des Nullstandards (Röhrchen 3&4) entspricht B_0 .
- 3) Berechnung der Prozentverhältnisse ($\%B/B_0$).
- 4) Auftragen von $\%B/B_0$ gegen die Konzentrationen der Standards in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder per Computerauswertung
- 5) Qualitätskontrolle, Berechnung des Nullstandards in %:
 $B_0/\text{Gesamtaktivität (MW Röhrchen 3\&4 / MW Röhrchen 1\&2)} \diamond 100\%$. Soll: $\%B_0/TC > 20\%$

Ermittlung der Proben-Konzentrationen:

Die Leptin-Konzentration (Abszisse, x-Achse) wird entsprechend dem $\%B/B_0$ -Wert der Probe aus dem Schaubild abgelesen.

Beispiel:

Mittelwert der Röhrchen 3 und 4 (Nullstandard, B_0): 8648 cpm

Mittelwert der Röhrchen 21 und 22 (Probe 1): 4283 cpm

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Probe}}{B_0} \times 100\% = \frac{4283}{8648} \times 100\% = 49,5\%$$

Ein Wert von 49,5% auf der Ordinate (y-Achse) entspricht in dem hier gewählten Beispiel einem Abszissen-Wert von 7,28 ng/ml.

Bei vorausgegangener Verdünnung der Probe ergibt sich die Leptin-Konzentration der Probe durch Multiplikation des aus der Grafik (oder mit Hilfe eines Computer-Programms) ermittelten Werts mit dem Verdünnungsfaktor.

Konzentration der Kontrolle:

Der aus der Standardkurve ermittelte Wert für die Kontrolle N sollte innerhalb des zertifizierten Bereichs liegen. Die ermittelten Leptin-Konzentrationen der Proben können nur als valide angesehen werden, wenn die Kontrolle mit einem Wert innerhalb des Sollbereichs gefunden wird. Andernfalls ist eine Fehleranalyse durchzuführen als deren Resultat die Ergebnisse des Testes akzeptiert oder verworfen werden.

Referenzwerte

Die Serum-Leptin-Konzentrationen spiegeln hauptsächlich die Körper-Fettmasse wieder. Schlanke Personen besitzen niedrige, fettleibige Personen hohe Leptin-Werte. Außerdem besteht ein eindeutiger Geschlechtsunterschied zwischen Mann (niedrigere Werte) und Frau (höhere Werte) bei gegebenem Körperfett-Verhältnis. Die Entwicklung während der Pubertät besitzt ebenfalls einen Einfluss auf den Leptin-Wert. Diese Abhängigkeiten müssen mit in Betracht gezogen werden, bevor Erwartungsbereiche für Leptin-Werte aufgestellt werden können.

Es gibt verschiedene Methoden, den Körperfett-Anteil zu bestimmen, z.B. Berechnung des Body Mass Index (BMI, Gewicht (in kg) dividiert durch das Quadrat der Größe (in m)), Bioelektrische Impedanz-Schätzung (BIA) oder total body dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Obwohl die Genauigkeit bei der Einschätzung der tatsächlichen Körperfettmasse durch den BMI schlechter ist als bei den höherentwickelten Methoden wie BIA oder DXA, besitzt die Angabe des BMI mehrere Vorteile:

- 1) Der BMI ist unabhängig von den angewandten Regressionsmodellen.
- 2) Der BMI ist leicht zu bestimmen, da nur Größe und Gewicht angegeben werden müssen.
- 3) Der BMI ist meist auch nachträglich noch bestimmbar.
- 4) Der BMI ist die präziseste Messung bei kurzfristigen Änderungen der Fettmasse, z.B. während des Fastens.

Daher wurden die folgenden Erwartungsbereiche für Serum-Leptinkonzentrationen auf der Basis des BMI als die wichtigste einschränkende, unabhängige Variable, unter Einbeziehung des Geschlechts und der pubertären Entwicklung, erstellt (45; s. nachstehende Abbildungen 1 bis 8 und Tabellen 4 bis 11). Ab einem Alter von 20 Jahren wurde keine signifikante Altersabhängigkeit der Werte mehr gefunden. Die aufgeführten und nach Geschlecht und Alter getrennten Erwartungswerte können bei gegebenem BMI des Patienten zum Vergleich mit gemessenen Leptin-Werten von normalen Patienten genutzt werden, um pathologische Abweichungen festzustellen. Die besten Regressionen für die verschiedenen Personengruppen (siehe Abbildungen 1 bis 8) ergeben sich mit folgender Exponentialfunktion:

$$\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI})}$$

Die 5. und 95. Perzentile werden durch folgende Gleichungen wiedergegeben:

$$\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} - c)}$$

bzw.

$$\text{Leptin} = a \cdot e^{(b \cdot \text{BMI} + c)}$$

Bei halb-logarithmischer Auftragung (y-Achse = log Leptin) ergeben diese Funktionen Geraden.

Die Werte für a, b und c sind in Tabelle 3 getrennt nach Geschlecht, pubertärer Entwicklung und für Erwachsene angegeben. Mit diesen Werten können die Erwartungsbereiche für Leptin im Bedarfsfall leicht auch auf höhere oder niedrigere BMI-Bereiche ausgeweitet werden.

Beispiel:

Die 50. Perzentile für Jungen im Tanner-Stadium 3 & 4 wird durch die folgende Kurve wiedergegeben:

$$(0,2067 \cdot \text{BMI}) \quad \text{Leptin} = 0,0181$$

Die 5. Perzentile entspricht:

$$\text{Leptin} = 0,0181 e^{(0,2067 \cdot \text{BMI} - 1,1919)}$$

und die 95. Perzentile entspricht:

$$\text{Leptin} = 0,0181 e^{(0,2067 \cdot \text{BMI} + 1,1919)}$$

In einem halb-logarithmischen Diagramm entsprechen diese Funktionen parallelen Geraden mit gleichen Abständen zur 50. Perzentile.

Berechnung der Standardabweichung (SA; Z-Werte):

Eine geeignete Methode, die Abweichung einer gemessenen Leptin-Konzentration vom entsprechenden Referenzbereich festzustellen, ist die Berechnung der Standardabweichung. Hierbei wird der gemessene Leptin-Wert bei gegebenem BMI des Patienten zu dem Leptin-Wert der entsprechenden Geschlechts- und Altersgruppe in das Verhältnis gesetzt. Die berechnete Abweichung entspricht der x-fachen Standardabweichung. Auf diese Weise können die Leptin-Werte nach BMI, Geschlecht und pubertäre/s Entwicklung/Alter eingestuft werden und für weitere Analysen gepoolt werden. Dadurch kann z.B. der Einfluss von BMI, Geschlecht und Alter für die weiteren Analysen eliminiert werden.

Aufgrund der logarithmischen Abhängigkeit der Leptin-Werte berechnet sich die Leptin-SA wie folgt:

$$\text{Leptin SA} = \frac{\ln(\text{Leptin}) - \ln(a) - b \cdot \text{BMI}}{d}$$

In dieser Gleichung steht "ln" für den natürlichen Logarithmus (bezogen auf die Basis e). Die Konstanten a, b und d sind in Tabelle 3 getrennt für Geschlecht und Alter angegeben.

Beispiel:

Ein Junge im Tanner-Stadium 3, BMI = 25 kg/m², gemessene Leptin-Konzentration = 5 ng/ml:

$$\text{LeptinSA} = \frac{\ln(5) - \ln(0,0181) - 0,2067 \cdot 25}{0,6850} = 0,66$$

Abschätzung der optimalen Probenverdünnung:

Da die Serum-Leptin-Werte abhängig von der Körperfettmasse über mehrere Größenordnungen variieren, ist eine adäquate Verdünnung Voraussetzung für eine hohe Messgenauigkeit. Um die Messgenauigkeit optimal auszunutzen, können die Proben daher so verdünnt werden, dass die End-Konzentrationen nahe an diesen Wert herankommen. Die Erwartungsbereiche stellen eine nützliche Hilfe dar, um die erwarteten Leptin-Werte bezogen auf BMI, Geschlecht und Alter einzuschätzen.

Beispiel:

Erwachsene Frau, BMI = 45 kg/m² (130 kg, 1,70 m Größe). Der durchschnittliche Leptin-Wert bei einem BMI von 45 kg/m² liegt nach den Referenzbereichen für erwachsene Frauen bei ca. 224 ng/ml. Die gut geeignete Verdünnung wäre hier also z.B. 1:30.

ANHANG

Tabelle 3: Konstanten a, b, c und d für die Berechnung der Referenzbereiche und Leptin Standardabweichungen basierend auf dem BMI. Gruppen von normalen, gesunden Personen wurden nach Geschlecht und pubertärem Entwicklungsstadium/Alter getrennt. TS = Tanner-Stadium, n = Anzahl der Personen, a, b, c und d = Konstanten (siehe Text).

Gruppe	n	a	b	c	d
männlich					
TS 1&2	136	0,0146	0,2706	0,8821	0,5379
TS 3&4	50	0,0181	0,2067	1,1919	0,6850
TS 5	112	0,0316	0,1462	1,0821	0,6558
Erwachsene	380	0,0130	0,2200	1,1053	0,6740
weiblich:					
TS 1&2	136	0,0422	0,2499	0,7849	0,4786
TS 3&4	43	0,0543	0,2357	0,5745	0,3379
TS 5	157	0,2550	0,1508	0,7053	0,4301
Erwachsene	587	0,3042	0,1467	0,8548	0,5212

Tabelle 4: Mädchen im Tanner-Stadium 1 und 2

Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.22	0.30	0.66	1.45	1.99
12	0.28	0.39	0.85	1.86	2.56
13	0.36	0.50	1.09	2.38	3.29
14	0.46	0.64	1.40	3.06	4.22
15	0.60	0.82	1.79	3.93	5.42
16	0.76	1.05	2.30	5.04	6.96
17	0.98	1.35	2.95	6.47	8.93
18	1.25	1.73	3.79	8.31	11.5
19	1.61	2.22	4.87	10.7	14.7
20	2.07	2.85	6.25	13.7	18.9
21	2.65	3.66	8.03	17.6	24.3
22	3.41	4.70	10.3	22.6	31.2
23	4.37	6.03	13.2	29.0	40.0
24	5.62	7.75	17.0	37.2	51.4
25	7.21	9.95	21.8	47.8	65.9
26	9.26	12.8	28.0	61.4	84.7
27	11.9	16.4	35.9	78.8	109.0
28	15.3	21.1	46.1	101.0	140.0
29	19.6	27.0	59.2	130.0	
30	15.2	34.7	76.1		
31	32.3	44.6	97.7		
32	41.5	57.2	125.		
33	53.2	73.4			
34	68.4	94.3			
35	87.8	121.			
36	113				
37	145				

Abb.1: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text).

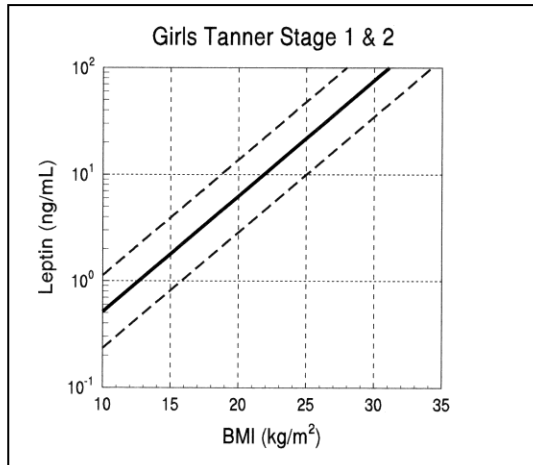


Tabelle 5: Jungen im Tanner-Stadium 1 und 2

BMI (kg/m ²)	Perzentile (µg/L)				
	1	5	50	95	99
11	0.08	0.12	0.29	0.69	0.99
12	0.01	0.16	0.38	0.91	1.30
13	0.14	0.20	0.49	1.19	1.71
14	0.19	0.26	0.65	1.56	2.24
15	0.24	0.35	0.85	2.04	2.93
16	0.32	0.46	1.11	2.68	3.84
17	0.41	0.60	1.45	3.51	5.04
18	0.55	0.79	1.90	4.60	6.60
19	0.72	1.03	2.50	6.03	8.66
20	0.94	1.35	3.27	7.90	11.3
21	1.24	1.77	4.29	10.4	14.9
22	1.62	2.33	5.62	13.6	19.5
23	2.12	3.05	7.37	17.8	25.5
24	2.78	3.99	9.66	23.3	33.5
25	3.65	5.24	12.7	30.6	43.9
26	7.78	6.87	16.9	40.1	57.5
27	6.27	9.0	21.7	52.5	75.4
28	8.22	11.8	28.5	68.9	98.8
29	10.7	15.5	37.4	90.3	129.0
30	14.1	20.3	48.9	118.0	
31	18.5	26.6	64.2		
32	24.3	34.8	84.1		
33	31.8	45.6	110.0		
34	41.7	59.8	144.0		
35	54.6	78.4			
36	71.6	102.0			
37	93.9	134.0			
38	123.0				

Abb.2: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 1 + 2 (s. Text)

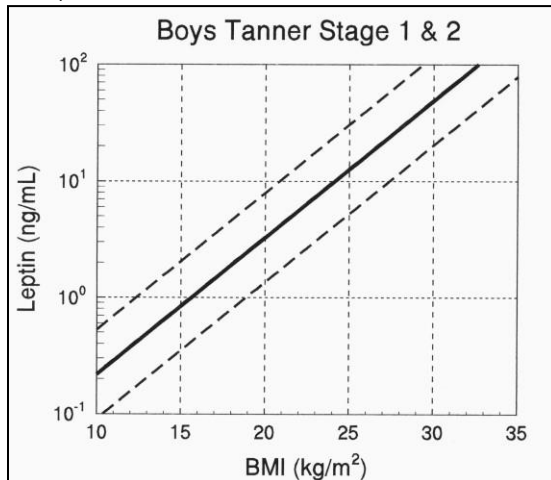


Tabelle 6: Mädchen im Tanner-Stadium 3 und 4

Percentile / Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.32	0.41	0.73	1.29	1.63
12	0.41	0.52	0.92	1.63	2.06
13	0.52	0.66	1.16	2.07	2.61
14	0.65	0.83	1.47	2.61	3.31
15	0.83	1.05	1.87	3.31	4.19
16	1.05	1.33	2.36	4.19	5.30
17	1.33	1.68	2.99	5.30	6.71
18	1.68	2.13	3.78	6.71	8.49
19	2.13	2.69	4.79	8.5	10.8
20	2.69	3.41	6.06	10.7	13.6
21	3.41	4.31	7.67	13.61	17.2
22	4.32	5.46	9.71	17.2	21.8
23	5.46	6.91	12.3	21.8	27.6
24	6.91	8.75	15.6	27.6	34.9
25	8.75	11.1	19.7	34.9	44.2
26	11.1	14.0	24.9	44.2	56.0
27	14.0	17.7	31.6	56.0	70.9
28	17.8	22.5	39.9	70.9	89.7
29	22.5	28.4	50.5	89.7	114.0
30	28.4	36.0	63.9	114.0	144.0
31	36.0	45.6	80.9	144.0	
32	45.6	57.7	80.2	144.0	
33	57.7	73.0	102.0		
34	73.0	92.4	130.0		
35	92.4	117.0			
36	117.0	148.0			
37	148.0				

Abb.3: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

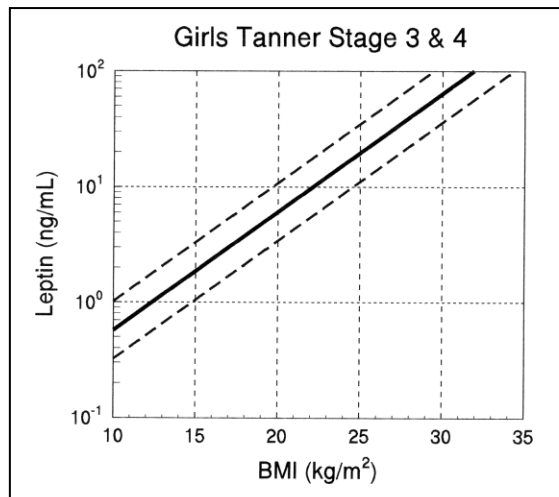


Tabelle 7 : Jungen im Tanner-Stadium 3 und 4

Percentile / Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.18	0.58	0.94
12	0.04	0.07	0.22	0.71	1.16
13	0.49	0.08	0.27	0.88	1.43
14	0.06	0.10	0.33	1.08	1.75
15	0.07	0.12	0.40	1.32	2.16
16	0.09	0.15	0.49	1.63	2.65
17	0.11	0.18	0.61	2.00	3.26
18	0.14	0.23	0.75	2.46	4.01
19	0.17	0.28	0.92	3.03	4.93
20	0.21	0.34	1.13	3.72	6.06
21	0.26	0.42	1.39	4.58	7.46
22	0.32	0.52	1.71	5.63	9.17
23	0.39	0.64	2.10	6.92	11.3
24	0.48	0.78	2.58	8.51	13.9
25	0.59	0.96	3.18	10.5	17.0
26	0.73	1.19	3.91	12.9	21.0
27	0.89	1.46	4.80	15.8	25.8
28	1.10	1.79	5.90	19.4	31.7
29	1.35	2.20	7.26	23.9	39.0
30	1.66	2.71	8.93	29.4	48.0
31	2.05	3.33	11.0	36.2	58.9
32	2.51	4.09	13.5	44.5	72.4
33	3.09	5.04	16.6	54.7	89.1
34	3.80	6.20	20.4	67.2	109.0
35	4.68	7.62	25.1	82.6	134.0
36	5.75	9.37	30.9	101.0	
37	7.07	11.5	37.9	124.0	
38	8.7	14.2	46.7		
39	10.7	17.4	57.4		
40	13.1	21.4	70.5		

Abb.4: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 3 + 4 (s. Text).

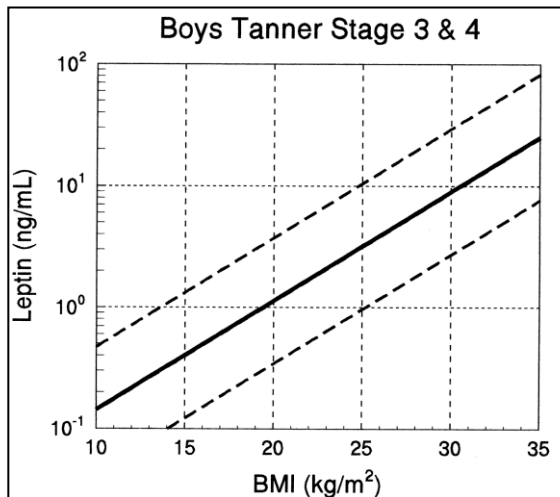


Tabelle 8 : Mädchen im Tanner-Stadium 5

Percentile /Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.50	0.66	1.34	2.71	3.62
12	0.58	0.77	1.56	3.15	4.21
13	0.67	0.89	1.81	3.67	4.89
14	0.78	1.04	2.11	4.26	5.69
15	0.91	1.21	2.45	4.96	6.62
16	1.05	1.41	2.85	5.76	7.70
17	1.22	1.64	3.31	6.70	8.95
18	1.42	1.90	3.85	7.79	10.4
19	1.66	2.21	4.48	9.06	12.1
20	1.93	2.57	5.20	10.5	14.1
21	2.24	2.99	6.05	12.3	16.4
22	2.60	3.48	7.03	14.2	19.0
23	3.03	4.04	8.18	16.6	22.1
24	3.52	4.70	9.51	19.3	25.7
25	4.09	5.46	11.0	22.4	29.9
26	4.76	6.35	12.9	26.0	34.8
27	5.53	7.39	15.0	30.3	40.4
28	6.43	8.59	17.39	35.2	47.0
29	7.48	9.99	20.2	40.9	54.7
30	8.70	11.6	23.5	47.6	63.5
31	10.1	13.5	27.3	55.3	73.9
32	11.8	15.7	31.8	64.4	85.9
33	13.7	18.3	37.0	74.9	99.9
34	15.9	21.2	43.0	87.0	116.0
35	18.5	24.7	50.0	101.0	135.0
36	21.5	28.7	58.1	118.0	
37	25.0	33.4	67.6	137.0	
38	29.1	38.8	78.6		
39	33.8	45.1	91.4		
40	39.4	52.5	106.0		

Abb.5: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Mädchen im Tanner-Stadium 5 (s. Text).

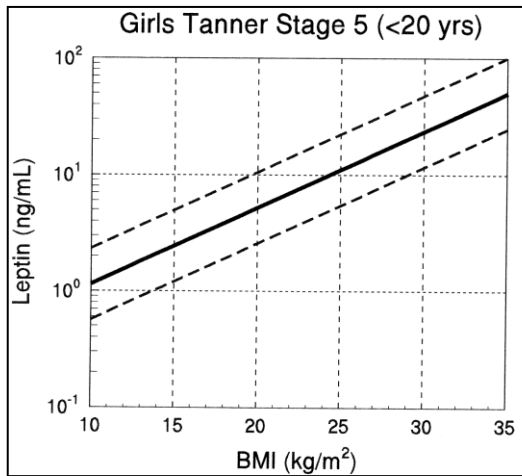


Tabelle 9: Jungen im Tanner-Stadium 5

Percentile / Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.16	0.47	0.73
12	0.04	0.06	0.18	0.54	0.84
13	0.05	0.07	0.21	0.62	0.97
14	0.05	0.08	0.24	0.72	1.12
15	0.06	0.10	0.28	0.84	1.30
16	0.07	0.11	0.33	0.97	1.51
17	0.08	0.13	0.38	1.12	1.74
18	0.1	0.15	0.44	1.3	2.02
19	0.11	0.17	0.51	1.50	2.34
20	0.13	0.2	0.59	1.74	2.7
21	0.15	0.23	0.68	2.01	3.13
22	0.17	0.27	0.79	2.33	3.62
23	0.20	0.31	0.91	2.69	4.19
24	0.23	0.36	1.05	3.12	4.85
25	0.27	0.41	1.22	3.61	5.62
26	0.31	0.48	1.41	4.17	6.5
27	0.36	0.55	1.63	4.83	7.52
28	0.41	0.64	1.89	5.59	8.71
29	0.48	0.74	2.19	6.47	10.1
30	0.55	0.86	2.54	7.49	11.7
31	0.64	1.00	2.94	8.67	13.5
32	0.74	1.15	3.4	10.0	15.6
33	0.86	1.33	3.94	11.6	18.1
34	0.99	1.54	4.55	13.4	20.9
35	1.15	1.79	5.27	15.6	24.2
36	1.33	2.07	6.10	18.0	28.1
37	1.54	2.39	7.06	20.8	32.5
38	1.78	2.77	8.17	24.1	37.6
39	2.06	3.21	9.46	27.9	43.5
40	2.38	3.71	10.9	32.3	50.3

Abb.6: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Jungen im Tanner-Stadium 5 (s. Text)

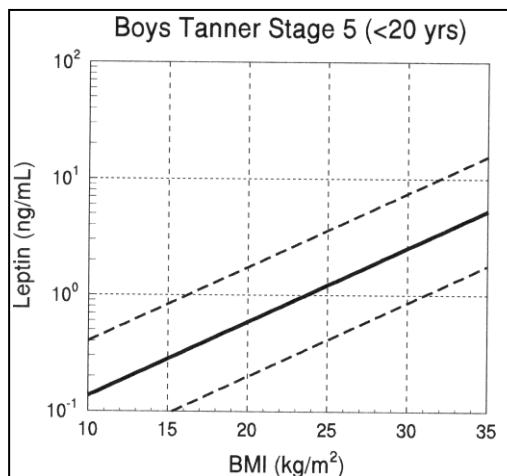


Tabelle 10: Erwachsene Frauen

Percentile / Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.46	0.65	1.53	3.59	5.10
12	0.53	0.75	1.77	4.16	5.90
13	0.61	0.87	2.05	4.82	6.83
14	0.71	1.01	2.37	5.58	7.91
15	7.82	1.17	2.75	6.46	9.17
16	0.95	1.35	3.18	7.48	10.61
17	1.10	1.57	3.68	8.66	12.3
18	1.28	1.81	4.27	10.0	14.2
19	1.48	2.10	4.94	11.6	16.5
20	1.71	2.43	5.72	13.4	19.1
21	1.99	2.82	6.62	15.6	22.1
22	2.30	3.26	7.67	18.0	25.6
23	2.66	3.78	8.88	20.9	29.3
24	3.08	4.38	10.3	24.2	34.3
25	3.57	5.07	11.9	28.0	39.7
26	4.13	5.87	13.8	32.4	46.0
27	4.79	6.79	16.0	37.5	53.3
28	5.54	7.87	18.5	43.5	61.7
29	6.42	9.11	21.4	50.4	71.5
30	7.43	10.6	24.8	58.3	82.8
31	8.61	12.2	28.7	67.5	95.8
32	9.97	14.1	33.3	78.2	111.0
33	11.5	16.4	38.5	90.5	129.0
34	13.4	19.0	44.6	105.0	149.0
35	15.5	22.0	51.6	121.0	
36	17.9	25.4	59.8	141.0	
37	20.8	29.5	69.3		
38	24.0	34.1	80.2		
39	27.8	39.5	92.9		
40	32.2	45.7	108.0		

Abb. 7: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: adulte Frauen (s. Text).

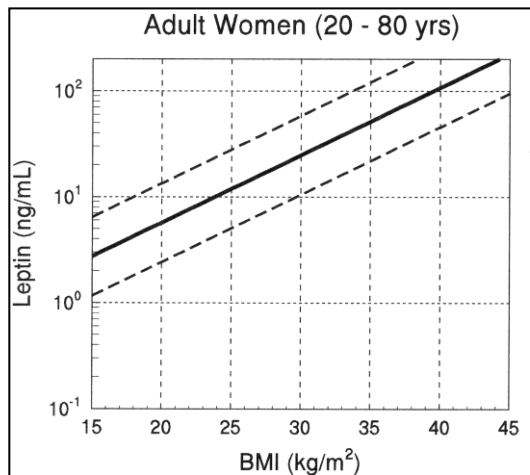


Tabelle 11: Männer

Percentile / Perzentile (µg/L)					
BMI (kg/m ²)	1	5	50	95	99
11	0.03	0.05	0.15	0.44	0.69
12	0.04	0.06	0.18	0.55	0.87
13	0.05	0.08	0.23	0.69	1.08
14	0.06	0.09	0.28	0.85	1.34
15	0.07	0.12	0.35	1.06	1.67
16	0.09	0.15	0.44	1.33	2.09
17	0.12	0.18	0.55	1.65	2.60
18	0.14	0.23	0.68	2.06	3.24
19	0.18	0.28	0.85	2.57	4.04
20	0.22	0.35	1.06	3.20	5.03
21	0.23	0.44	1.32	3.98	6.27
22	0.35	0.54	1.64	4.97	7.81
23	0.43	0.78	2.05	6.19	9.73
24	0.54	0.85	2.55	7.71	12.1
25	0.67	1.05	3.18	9.61	15.1
26	0.83	1.31	3.96	12.0	18.8
27	1.04	1.64	4.94	14.9	23.5
28	1.30	2.04	6.15	18.6	29.2
29	1.61	2.54	7.67	23.2	36.4
30	2.01	3.16	9.56	28.9	45.4
31	2.51	3.94	11.9	36.0	56.6
32	3.12	4.91	14.8	44.9	70.5
33	3.89	6.12	18.5	55.8	87.8
34	4.85	7.63	23.0	69.6	109.0
35	6.04	9.51	28.7	86.7	136.0
36	7.53	11.8	35.8	108.0	
37	9.38	14.8	44.6	135.0	
38	11.7	18.4	55.5		
39	14.6	22.9	69.2		
40	18.2	28.6	86.2		

Abb.8: Referenzbereiche für humane Serumwerte bezogen auf den BMI: Männer (s. Text).

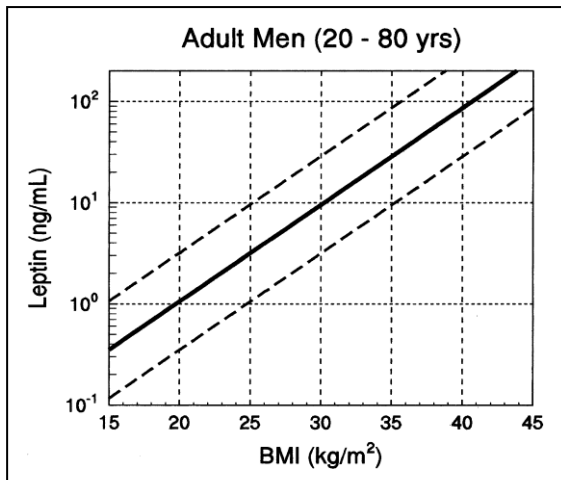
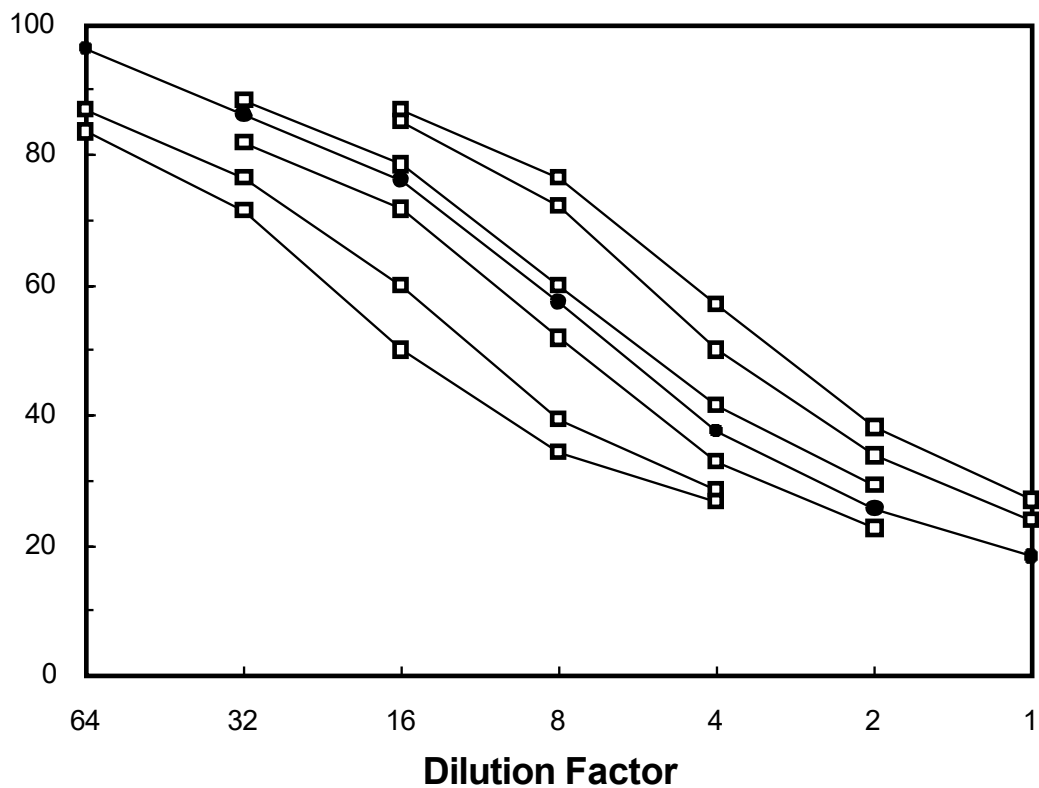


Abb. 9: Verdünnungsreihe des Leptin-Standards (schwarze Kreise) und verschiedene Serumproben mit unterschiedlichen Leptin-Konzentrationen. Der Leptin-Gehalt des unverdünnten Standards beträgt 16 ng/ml. Es sind jeweils die Mittelwerte der Doppelmessungen aufgeführt.



LITREATURE / LITERATUR

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.
2. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.
3. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. 1995 Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9034-9037.
4. Rentsch J, Chiesi M. 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*. 379:55-59.
5. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45:1435-1438.
6. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. 1995 The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377:530-532.
7. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543.
9. Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de-Sauvage F. 1996 Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:1726-1730.
10. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83:1263-1271.
11. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 84:491-495.
12. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379:632-635.
13. Lynn RB, Cao GY, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996 Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 219:884-889.
14. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 45:992-994.
15. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.
16. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382:250-252.
17. Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 12:318-320.
18. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al. 1996 Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 45:531-535.
19. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-1106.
20. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. 1996 The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 28:619-632.
21. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B. 1996 The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res*. 28:642-648.
22. Chan YY, Steiner RA, Clifton DK. 1996 Regulation of hypothalamic neuropeptide-Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinol*. 137:1319-1325.
23. Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. 1996 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinol*. 137:3-12.
24. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1:1311-1314.
25. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1:1155-1161.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334:292-295.
27. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. 1996 Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: A link with keto-genesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 45:1511-1515.
28. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. 1996 Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 97:2020-2026.
29. Kolaczynski JW, Ohannesian J, Considine RV, Marco C, Caro JF. 1996 Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:4162-4165.

30. Saladin R, De-Vos P, Guerre-Millo M, et al. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-529.
31. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995 The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44:1467-1470.
32. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. 1996 Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45:699-701.
33. Malström R, Taskinen M-R, Karonen S-L, Yki-Järvinen H. 1996 Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia*. 39:993-996.
34. De-Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*. 270:15958-15961.
35. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 271:5301-5304.
36. Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996 Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res*. 28:704-707.
37. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, et al. 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 97:1344-1347.
38. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. 1996 Gender difference in plasma leptin concentrations. *Nature Med*. 2:949-950.
39. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-3427.
40. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*. 98:201-203.
41. Scholz GH, Englaro P, Thiele I, et al. 1996 Dissociation of serum leptin concentration and body fat content during long term dietary intervention in obese individuals. *Horm Metab Res*. 28:718-723.
42. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 348:159-161.
43. Robinson CJ, Gaines-Das R, Woollacott D, et al. 2001 The first international standard for human leptin and the first international standard for mouse leptin: comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *J Molecular Endocrinol*. 27: 69-76.
44. Adresse NIBSC: Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.
45. Blum WF, Juul A; Reference ranges of serum leptin, s.318-326. In: *Leptin -the voice of adipose tissue*, Blum WF et al, eds., Johann Ambrosius Verlag, Heidelberg, 1997.
46. Holtkamp K, Blum WF, et al., 2006, Elevated Physical Activity and Low Leptin Levels Co-Occur in Patients with Anorexia Nervosa, *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 88(11) 5169-5174
47. Guebra-Egziabher, Bernhard J., et al. 2005, Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function, *Nephrol Dial Transplant* 20: 129-134

KURZANLEITUNG –hLEPTIN RIA CT KIPMR44

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:
Fang-Antikörper	in 7 ml Testpuffer
Spezifischer Antikörper	in 7 ml Testpuffer
Tracer	in 13 ml Testpuffer
Kontrolle	in 750 µl Testpuffer
Plasma/Serum Proben können unverdünnt eingesetzt werden.	

Vorschlag zur Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Zugabe von Reagenz [μ l]					
Nr. der Röhrchen	Inhalt der Röhrchen	Testpuffer Standards Kontrolle Proben	Fang- Antikörper	Spezifischer Antikörper	Tracer
1,2	TC	–	–	–	100
3,4	B ₀	Assay buffer: 25	50	50	100
5-18	Standards	1-7: 25	50	50	100
19,20	Kontrolle	25	50	50	100
21,22	Probe 1	25	50	50	100
23,24 (etc)	Probe 2 (etc)	25	50	50	100

Nr.:1,2 bis zum Zählen der Aktivität beiseite stellen

Inkubation, über Nacht mind. **15 Stunden**, bei **RT, 350 upm**

Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, ohne die Beschichtung der Röhrchen dabei zu beschädigen.
Waschen durch Zugabe von je 500 μl Testpuffer
Flüssigkeit vollständig absaugen (s.o.)
Zählen der Aktivität aller Röhrchen mit einem Gammaz�hler

Revision date: 2023-07-27