

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της Σεβαστής Ι. Καραλιώτα

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ $\omega 3$ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής Επιτροπή:

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής

Δεδούσης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Καλιώρα Ανδριάννα, Λέκτορας

Αθήνα 2010

Στην οικογένειά μου.....

ANTI ΠΡΟΛΟΓΟΥ...

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2009-2010 στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας- Φυσικοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολόγιας- Διατροφής, του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό την καθοδήγηση του Επίκουρου Καθηγητή κ. Ν. Καλογερόπουλου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα για την καθοδήγηση και τη συμπαράσταση του τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη ευχαριστώ θερμά για τη φιλοξενία της στο εργαστήριο, την εποικοδομητική συνεργασία, τη συμπαράσταση και το ενδιαφέρον της για μένα.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Δεδούση Γεώργιο και τη Λέκτορα Α. Καλιώρα ευχαριστώ για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Α. Ψαρρά για την ευκαιρία που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω τον κυτταρομετρητή ροής στο Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητα, Γ.Ν.Α. «Ευαγγελισμός» και για την πολύτιμη βοήθειά της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων Καθηγητή κ. Ν. Ανδρικόπουλο, και όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου για τη φιλική διάθεση και τη ζεστή ατμόσφαιρα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δ. Στέλλα για την βοήθεια του και για την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, ευχαριστώ τους φίλους μου και ιδιαίτερα τη Χ. Γκοντίνου και Ε. Λοΐζου, που είχαν την υπομονή να με ακούν και να με στηρίζουν.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και την αγάπη μου στην οικογένειά μου για την κατανόηση, τη διαρκή ηθική τους συμπαράσταση και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ..... VI

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....1

1 ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ.....2

1.1. Γενικά2

1.2. Κατηγορίες παχυσαρκίας.....3

1.3. Αιτίες παχυσαρκίας4

1.3.1. Κληρονομικοί παράγοντες4

1.3.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες5

1.4. Παχυσαρκία και ασθένειες6

1.4.1. Διαβήτης τύπου 26

1.4.2. Καρδιαγγειακές παθήσεις7

1.4.3. Καρκίνος8

1.4.4. Υπέρταση8

1.4.5. Αναπνευστικά προβλήματα.....8

1.4.6. Μεταβολικό σύνδρομο.....9

1.5. Είναι η παχυσαρκία μια φλεγμονώδης κατάσταση;.....9

1.6. Αντιμετώπιση της παχυσαρκίας.....10

1.6.1. Δίαιτες.....11

1.6.2. Φαρμακευτική αγωγή11

1.6.3. Χειρουργικές επεμβάσεις.....12

2 ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ.....14

2.1. Εισαγωγή14

2.2. Μορφολογία του λιπώδους ιστού14

2.3. Λευκός λιπώδης ιστός15

2.4. Φαιός λιπώδης ιστός.....17

2.5. Μεταβολικές πορείες στο λιπώδη ιστό.....17

2.6. Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο20

2.6.1. Λεπτίνη20

2.6.2. Αδιπονεκτίνη21

2.6.3. Αδιψίνη22

2.6.4. Βισφατίνη και Βασπίνη.....23

2.6.5. Ρεξιστίνη	23
2.6.6. Ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	24
2.6.7. TNFα και IL-6	24
3 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	25
3.1. Ορισμός διαφοροποίησης	25
3.2. Μοντέλα μελέτης της διαφοροποίησης.....	25
3.3. Στάδια της διαφοροποίησης.....	27
3.3.1. Στάδιο αναστολής του πολλαπλασιασμού	28
3.3.2. Στάδιο κλωνικής επέκτασης.....	28
3.3.3. Αρχικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων	29
3.3.4. Τελικά γεγονότα κατά τη διαφοροποίηση	31
3.4. Ρύθμιση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διαφοροποίηση	32
3.4.1. Οικογένεια C/EBP	32
3.4.2. Οικογένεια PPAR	36
3.5. Παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση	41
3.6. Παράγοντες που παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση.....	43
3.7. Δείκτες διαφοροποίησης.....	44
4 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	46
4.1. Δομή και ονοματολογία των λιπαρών οξέων	46
4.2. Είσοδος των λιπαρών οξέων στα κύτταρα	47
4.3. Ο ρόλος των λιπαρών οξέων.....	48
4.4. ω3 λιπαρά οξέα	50
4.4.1. Γενικά.....	50
4.4.2. Ρόλος των ω3 λιπαρών οξέων στη διατροφή και την υγεία.....	51
4.4.3. ω3 λιπαρά οξέα και διαφοροποίηση.....	52
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	55
6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	56
6.1. Παραλαβή επιδιδυμικού λιπώδους ιστού αρουραίου.....	56
6.2. Καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου	57
6.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια προλιποκυττάρων αρουραίου	58
6.2.2. Διαφοροποίηση προλιποκυττάρων αρουραίου	59
6.3. Έλεγχος της διαφοροποίησης μέσω προσδιορισμού TG με τη χρωστική Oil Red O.....	60
6.4. Προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής.....	61
6.5. Εκχύλιση λιπιδίων από προλιποκύτταρα και διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου.....	65

6.6. Αέρια χρωματογραφία (GC).....	66
6.7. Απομόνωση ολικού RNA	67
6.8. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	70
6.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	70
6.10. Ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης ενός γονιδίου με χρήση εσωτερικού προτύπου 18S.....	72
6.11. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	74
6.12. Ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR.....	75
7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
7.1. Μελέτη της επίδρασης DHA και ALA στην πορεία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αρουραίου	76
7.1.1. Μελέτη της επίδρασης του ALA στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση.....	77
7.1.2. Μελέτη της επίδρασης του DHA στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση.....	81
7.1.3. Προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των ALA και DHA στην πορεία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αρουραίου.....	83
7.2. Μελέτη του μεταβολισμού των DHA και ALA σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου	88
8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	94
9 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	97
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

3T3	ινοβλαστική σειρά κυττάρων
AA	αραχιδονικό οξύ
ACC1	καρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου A
ACS	ακυλο-CoA συνθετάση
ALA	α-λινολενικό οξύ
ALBP	πρωτεΐνη σύνδεσης λιπαρών οξέων του λιποκυττάρου
AMPK	κινάση που ενεργοποιείται από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη
ASP	πρωτεΐνη διέγερσης ακυλίωσης
BAT	φαιός λιπώδης ιστός
BMI	δείκτης μάζας σώματος
BSA	βόειος αλβουμίνη ορού
C/EBP	ενισχυτική πρωτεΐνη σύνδεσης σε CCAAT
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CGRP	πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης
CHD	στεφανιαία νόσος
Chol	χοληστερόλη
CoA	συνένζυμο A
COX	κυκλοξυγονάση
CRE	αλληλουχίες που ανταποκρίνονται στο cAMP
CREB	πρωτεΐνη που προσδένεται στις CRE
CRP	C αντιδρώσα πρωτεΐνη
Dex	δεξαμεθαζόνη
DHA	εικοσιδυεξαενοϊκού οξύ
DIO	δίαιτα αυξημένης κατανάλωσης τροφής που οδηγεί στην κατάσταση της παχυσαρκία
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DPA	εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ
ECM	εξωκυττάρια ύλη

EDTA	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EPA	εικοσαπενταενοϊκό οξύ
ER	ενδοπλασματικό δίκτυο
FA	λιπαρά οξέα
FABP	πρωτεΐνη σύνδεσης λιπαρών οξέων
FABP _{pm}	πρωτεΐνη σύνδεσης λιπαρών οξέων με την πλασματική μεμβράνη
FAS	συνθάση των λιπαρών οξέων
FAT	μεταφορέας των λιπαρών οξέων
FATP	πρωτεϊνικοί μεταφορείς λιπαρών οξέων
FBS	ορός εμβρύου βοός
FFA	ελεύθερα λιπαρά οξέα
G3PDH	αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης
GH	αυξητική ορμόνη
GLUT	μεταφορέας γλυκόζης
GR	υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών
GSK3β	κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου
GTP	τριφωσφορική γουανοσίνη
HDL	λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
HPETE	υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ
HSL	ορμονοευαίσθητη λιπάση
IBMX	μεθυλοϊσοβουτυλοξανθίνη
IGF-I	ινσουλινομιμητικός παράγοντας τύπου-I
IL	ιντερλευκίνη
IR	υποδοχέας ινσουλίνης
IRS-I	υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης
LA	λινελαϊκό οξύ
LCD	δίαιτα χαμηλού θερμιδικού επιπέδου
LCFA	μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα
LDL	λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας

L-FABP	πρωτεΐνη σύνδεσης λιπαρών οξέων στο συκώτι
LPL	λιποπρωτεϊνική λιπάση
MAPK	πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
MUFA	μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NIDDM	μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2
NL	ουδέτερα λιπίδια
NOS	συνθάση του οξειδίου του αζώτου
NPY	νευροπεπτίδιο Y
NSAID	μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
OB-R	λειτουργικός υποδοχέας της λεπτίνης
Oil Red O	χρωστική ποσοτικοποίησης τριγλυκεριδίων
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAI-1	αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PAGE	ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου
PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PG	προσταγλανδίνη
PGE ₂ , F _{2a} , J ₂	προσταγλανδίνη E ₂ , F _{2a} , J ₂
PGI ₂	προστακυκλίνη
PI3K	κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PKA, B, C	πρωτεϊνική κινάση A, B, C
PPAR	υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωμάτων
PPRE	ειδική αλληλουχία γονιδίου στην οποία προσδένεται ο PPARγ
Pref-1	παράγοντας προλιποκυττάρων
PUFA	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RT	αντίστροφη μεταγραφή
RXR	υποδοχέας του 9-cis ρετινοϊκού οξέος

SA	αλβουμίνη ορού
SDS	δωδεκυλοθειικό νάτριο
SFA	κορεσμένα λιπαρά οξέα
SREBP1/ADD1	Sterol Regulatory Element Binding Protein/ Adipocyte Determination and Differentiation factor 1
S-V	στρωματικά κύτταρα
TG	τριγλυκερίδια
TGF	παράγοντας αύξησης μετασχηματισμού
TGH	υδρολάση των τριγλυκεριδίων
TNF α	παράγοντας νέκρωσης όγκων α
TZD	θειαζολιδινεδιόνη
UCP	πρωτεΐνες αποσύζευξης
VLCD	δίαιτα πολύ χαμηλού θερμιδικού επιπέδου
VLDL	λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας
WAT	λευκός λιπώδης ιστός
WHO	World Health Organization, Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Παχυσαρκία

1.1.Γενικά

Η παχυσαρκία αποτελεί μια σύγχρονη μορφή επιδημίας, αφού πλέον αφορά το 15% του παγκόσμιου πληθυσμού.¹ Πιο συγκεκριμένα, 1,1 δισεκατομμύρια ενήλικων κατατάσσονται ως υπέρβαροι ενώ 312 εκατομμύρια απ' αυτούς ως παχύσαρκοι. Τα ποσοστά της παιδικής παχυσαρκίας είναι επίσης ανησυχητικά, καθώς το 10% των ανηλίκων είναι υπέρβαροι.² Στις ανεπτυγμένες χώρες, ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και στην Ευρώπη, τα ποσοστά των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων συνεχώς αυξάνονται ενώ παρατηρείται αυξανόμενη τάση και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στην Ευρώπη το 2007, το 25.6% των ενήλικων ήταν παχύσαρκοι, συγκριτικά με το 23.9%, το 2005 (Center for Disease Control and Prevention's Morbidity and Mortality Weekly Report). Νέα στοιχεία από το 16^ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο της Παχυσαρκίας το Μαΐο του 2008, στη Γενεύη, για όλες σχεδόν τις ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, δείχνουν ότι τα ποσοστά παχυσαρκίας αυξήθηκαν και για τα δυο φύλα, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα προγενέστερων ερευνών. Στην Ελλάδα, το 35.2% του γενικού πληθυσμού είναι υπέρβαρο, ενώ το 22.5% παχύσαρκο, με τα ελληνόπουλα να είναι τα πιο παχύσαρκα παιδιά σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Οι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι αν δεν ληφθούν άμεσα μέτρα για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, το 2030, το 86.3% του παγκόσμιου πληθυσμού θα είναι παχύσαρκο ή υπέρβαρο, ενώ το ποσοστό των παχύσαρκων παιδιών θα διπλασιαστεί.³

Σύμφωνα με τον Ιπποκράτη, «η παχυσαρκία δεν είναι μόνο μια ασθένεια αλλά ο προάγγελος για άλλες», γεγονός που αποδεικνύεται σήμερα, αφού η παχυσαρκία συνδέεται με μια σειρά από ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 2, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, τα εγκεφαλικά, τα αναπνευστικά προβλήματα και μερικοί τύποι καρκίνου.² Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) περιγράφει την παχυσαρκία ως ένα από τα πιο σκανδαλώδη ορατά προβλήματα υγείας, και ταυτόχρονα το πιο παραμελημένο, που απειλεί να κατακλύσει τόσο τις ανεπτυγμένες όσο και τις αναπτυσσόμενες χώρες⁴ και συγκαταλέγει την παχυσαρκία ανάμεσα στην πρώτη δεκάδα των παγκόσμιων προβλημάτων υγείας.⁵ Η παχυσαρκία είναι μια πολύπλοκη ασθένεια με πολύπλευρες αιτιολογίες και συνέπειες, και παρόλο που έχει χαρακτηριστεί ως τέτοια από το 1985, δεν είχε μέχρι πρόσφατα προσελκύσει το απαιτούμενο ιατρικό, αλλά και το γενικότερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Δυστυχώς, σε κοινωνικό επίπεδο, αντιμετωπίζεται σαν μία κατάσταση στην οποία το άτομο έχει εισέλθει με δική του επιλογή ή, στην καλύτερη περίπτωση, ως κάποιο πρόβλημα υγείας και όχι ως ασθένεια.⁶

Ως παχυσαρκία ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται αύξηση του σωματικού λίπους. Οι τρόποι που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση αυτή χωρίζονται σε τρεις κυρίως κατηγορίες: α) ανθρωπομετρικές μέθοδοι (δείκτης μάζας σώματος, διαστάσεις περιφέρειας μέσης), β) μέθοδοι που βασίζονται στην διαφορά πυκνότητας του λίπους και του υπόλοιπου μη λιπώδους ιστού (0,7 g/mL και 1g/mL αντίστοιχα) και τέλος γ) μέθοδοι απεικόνισης (π.χ. μαγνητική τομογραφία). Οι τελευταίες δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται λιγότερο αφού παρουσιάζουν δυσκολίες στην εφαρμογή τους, η κάθε μια για διαφορετικούς λόγους (χρονοβόρα, μεγάλου κόστους).⁷

Ο δείκτης μάζας σώματος, ΔΜΣ (body mass index, BMI) υπολογίζεται με τη διαίρεση του βάρους του σώματος (kg), με το τετράγωνο του ύψους του σώματος (m). Υψηλές τιμές υποδεικνύουν υπερβολικό σωματικό λίπος και σχετίζονται με αυξημένους κινδύνους για την υγεία και με την εκδήλωση νοσηρότητας. Εξαιρέση αποτελούν οι περιπτώσεις αθλητών, όπου οι αυξημένες τιμές του δείκτη οφείλονται στην αύξηση του μυϊκού και όχι του λιπώδους ιστού.⁸

Πίνακας 1: Κατάταξη των ατόμων με βάση τον BMI.

BMI (kg/m²)	Κατάταξη ατόμου
<18,5	Ελλειποβαρές
18,5-24,9	Φυσιολογικό
25-29,9	Υπέρβαρο
30-39,9	Παχύσαρκο
>40	Νοσηρά παχύσαρκο

Η μέτρηση της περιφέρειας της μέσης, αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ως μια απλή μέθοδος και ως πιθανά καλύτερος δείκτης για τον κίνδυνο υγείας σε σχέση με τον BMI. Αποτελεί έναν εξίσου καλό δείκτη του συνολικού σωματικού λίπους όπως και ο BMI, και επίσης είναι ο καλύτερος ανθρωπομετρικός δείκτης πρόβλεψης του κοιλιακού λίπους.⁷

1.2.Κατηγορίες παχυσαρκίας

Το λίπος στο ανθρώπινο σώμα αποθηκεύεται στα λιποκύτταρα του λιπώδους ιστού και αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση τόσο του αριθμού όσο και του μεγέθους των λιποκυττάρων. Υπάρχουν δύο τύποι παχυσαρκίας που σχετίζονται και με την ηλικία στην οποία εμφανίζονται: α) η υπερπλαστική παχυσαρκία, που συναντάται κυρίως στην παιδική ή εφηβική ηλικία αλλά νεώτερες μελέτες υποστηρίζουν ότι παρατηρείται και στους ενήλικες και β) η υπερτροφική παχυσαρκία, που εμφανίζεται κυρίως σε ώριμη ηλικία.⁹

Στο τέλος της παιδικής ηλικίας και στην αρχή της εφηβικής, ο αριθμός των λιποκυττάρων αυξάνεται ταχύτερα. Έτσι, στις περιπτώσεις των παχύσαρκων παιδιών, ο ρυθμός αύξησης των λιποκυττάρων είναι πιο έντονος, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά παιδιά και είναι δυνατό

παχύσαρκα παιδιά που μπαίνουν στην εφηβεία να έχουν τον ίδιο αριθμό λιποκυττάρων με έναν ενήλικα φυσιολογικού βάρους. Στη φάση αυτή παρατηρείται και αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων αλλά και του μεγέθους τους, μια αρκετά δύσκολη κατάσταση, αφού με την απώλεια βάρους μπορεί να μειωθεί μόνο το μέγεθος τους και όχι ο αριθμός τους.

Η παχυσαρκία που πρωτοεμφανίζεται σε ενήλικα άτομα συνοδεύεται κυρίως από την αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από την αύξηση του αριθμού τους. Αυτός ο τύπος παχυσαρκίας μπορεί να αντιμετωπισθεί ευκολότερα, αφού τα άτομα που έχουν ένα σταθερό μέσο αριθμό λιποκυττάρων πετυχαίνουν να διατηρούν το βάρος τους καλύτερα από τα άτομα εκείνα που έχουν αυξημένο αριθμό.²

1.3. Αιτίες παχυσαρκίας

Οι παράγοντες που επιδρούν στην αύξηση του βάρους είναι κυρίως κληρονομικοί και περιβαλλοντικοί.

1.3.1. Κληρονομικοί παράγοντες

Έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια που συνδέονται με τον γενικό μηχανισμό ρύθμισης του βάρους που έχει δυο συνιστώσες. Υπάρχει ένας πρώτος μηχανισμός που αφορά στη βραχυπρόθεσμη ρύθμιση δηλαδή πόσο συχνά και τι ποσότητες καταναλώνει το άτομο σε ημερήσια βάση και ένας δεύτερος που αφορά στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση του βάρους.

Η παχυσαρκία μπορεί να έχει πολυγονιδιακή αιτιολογία, με πάνω από 200 γονίδια ή χρωμοσωμιακές περιοχές να εμπλέκονται σε αυτή. Η μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα γονίδια ή ο συνδυασμός των μεταλλαγμένων γονιδίων κάνουν το άτομο πιο επιρρεπές στην ασθένεια. Έρευνες έχουν δείξει μεταλλάξεις γονιδίων, των πρωτεϊνών αποσύζευξης (uncoupling proteins, UCPs), του TNF α (Tumor Necrosis Factor α) και της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL), να εμπλέκονται ή να οδηγούν στην αύξηση του σωματικού λίπους.⁶

Πιο συγκεκριμένα, οι **UCPs** είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και διεγείρουν την παραγωγή θερμότητας μέσω αποσύζευξης της οξείδωσης από το σχηματισμό του ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Υπάρχουν πολλές ισομορφές UCPs που συναντιούνται σε πολλούς ιστούς θηλαστικών και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην παχυσαρκία και στην καχεξία, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Σε πειράματα που έγιναν σε παχύσαρκους αρουραίους, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της UCP2 στο λιπώδη ιστό και χαμηλότερα επίπεδα mRNA της UCP3 στους μυς, σε σχέση με αυτά των αρουραίων φυσιολογικού βάρους. Επιπλέον, έρευνες υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση του *ucp3* προστατεύει από την παχυσαρκία αφού σε πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την ανθρώπινη UCP3 παρατηρήθηκε μείωση του βάρους τους και μικρότερη

ποσότητα λιπώδους ιστού, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου, παρ' όλο που κατανάλωναν μεγαλύτερες ποσότητες τροφής.¹⁰

Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε η **γκρελίνη**, ορμόνη πεπτίδιο που παράγεται από τα στομαχικά κύτταρα και συμβάλλει στη βραχυπρόθεσμη ρύθμιση του βάρους. Ως κύρια δράση της είναι η διέγερση της όρεξης: παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα γκρελίνης μια με δύο ώρες πριν το γεύμα, τα οποία μειώνονται αμέσως μετά την πρόσληψη τροφής. Αυτό εξηγεί γιατί οι περισσότεροι άνθρωποι πεινάνε το μεσημέρι ακόμα και όταν δεν υπάρχει φαγητό γύρω τους, που να διεγείρει την όρεξή τους.^{11,12} Η υπερέκφραση της μπορεί να οδηγήσει στην παχυσαρκία. Στο σύνδρομο Prader-Willi, μια κληρονομική νόσος, τα άτομα είναι κλινικά παχύσαρκα και συνήθως πεθαίνουν πριν την ηλικία των 30, από σχετιζόμενες με την παχυσαρκία ασθένειες. Σε αυτά τα άτομα τα επίπεδα γκρελίνης είναι πολύ υψηλά. Το σύνδρομο αυτό όμως αποτελεί σπάνια περίπτωση αφού οι περισσότεροι παχύσαρκοι τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα γκρελίνης, από άτομα φυσιολογικού βάρους. Μέσα από έρευνες που έγιναν, υποδεικνύεται ένας άλλος πιθανός τρόπος με τον οποίο η ορμόνη συνεισφέρει στην παχυσαρκία. Άτομα που έχουν μειώσει το βάρος μέσω προσεχτικής διατροφής εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα γκρελίνης, κάτι που δεν παρατηρείται σε άτομα που έχασαν βάρος ύστερα από τοποθέτηση γαστρικού δακτυλίου.¹¹

Η **λεπτίνη** είναι η κύρια ορμόνη του λιπώδους ιστού και συνδέεται με τον μακροπρόθεσμο μηχανισμό ρύθμισης του βάρους. Η δράση της επικεντρώνεται κυρίως στον υποθάλαμο και φαίνεται ότι προάγει αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο, με το να καταστέλλει την όρεξη και να αυξάνει την κατανάλωση ενέργειας.¹¹ Μικρός μόνο αριθμός παχύσαρκων ατόμων παρουσιάζει μετάλλαξη στο γονίδιο της ορμόνης ή του υποδοχέα της, περίπου το 4% των νοσηρά παχύσαρκων.² Η πλειοψηφία των παχύσαρκων ατόμων εμφανίζει υψηλά επίπεδα λεπτίνης στο αίμα, τα οποία αυξάνονται ανάλογα με το σωματικό λίπος, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα παχύσαρκα άτομα να αναπτύσσουν αντίσταση στη δράση της. Η αύξηση αυτή της λεπτίνης, αποτελεί μια προσπάθεια του οργανισμού να καταστείλει την όρεξη και να παρεμποδίσει την αποθήκευση λίπους.¹¹

1.3.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ενώ οι γενετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το βάρος του σώματος είναι κληρονομικό χαρακτηριστικό, δεν μπορούν να εξηγήσουν πλήρως όλες τις περιπτώσεις παχυσαρκίας. Το περιβάλλον αλληλεπιδρά με τις γενετικές προδιαθέσεις και τελικά καθορίζεται το βάρος του σώματος. Το περιβάλλον περιλαμβάνει όλες εκείνες τις συνθήκες που επηρεάζουν το άτομο καθημερινά και το οδηγούν στην αύξηση ή στην απώλεια βάρους.

Το σύγχρονο περιβάλλον είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να δημιουργεί ανενεργά άτομα. Η αύξηση της χρήσης των αυτοκινήτων, της τηλεόρασης και των ηλεκτρονικών υπολογιστών έχουν οδηγήσει στη μείωση της κατανάλωσης ενέργειας. Ο συνδυασμός αυτός με την μείωση της φυσικής άσκησης αποτελούν παράγοντες επιβαρυντικούς για την παχυσαρκία. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια οι διατροφικές συνήθειες των ατόμων έχουν αλλάξει πολύ. Η αφθονία και η ποικιλία τροφής σε ευχάριστες γεύσεις και χαμηλές τιμές, πλούσιας σε λίπη και θερμίδες, αυξάνουν αλόγιστα την κατανάλωση της. Σημαντικό ρόλο σε αυτό έπαιξε και η διαφήμιση τροφίμων από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης, μια συνέπεια του έντονου ανταγωνισμού και της απαίτησης για όλο και περισσότερα κέρδη.^{2,6}

1.4. Παχυσαρκία και ασθένειες

Η αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των λιποκυττάρων έχει συχνά ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών που οφείλονται είτε στο υπερβολικό βάρος του ατόμου είτε στην αυξημένη κυκλοφορία λιπιδίων και διαφόρων πεπτιδίων στο αίμα. Οι πιο συνηθισμένες ασθένειες που συνδέονται με την παχυσαρκία είναι: η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο διαβήτης τύπου 2, η στεφανιαία νόσος (Coronary Heart Disease, CHD), ασθένειες της χοληδόχου κύστης, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, οστεοπόρωση, αποφρακτική υπνική άπνοια, και κάποιοι τύποι καρκίνου.¹³

1.4.1. Διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM), είναι η κυρίαρχη μορφή σακχαρώδους διαβήτη, αντιπροσωπεύοντας το 90 με 95% των περιπτώσεων. Ονομάζεται και “adult-onset diabetes” γιατί παρουσιάζεται σε άτομα ηλικίας 40 ετών και άνω αλλά και σε παχύσαρκα άτομα μικρότερης ηλικίας ακόμα και σε παιδιά. Η σχέση παχυσαρκίας και NIDDM είναι πολύ στενή. Αν και η βασική αιτία δεν είναι γνωστή, η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα και η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου.¹⁴ Ο όρος αντίσταση στην ινσουλίνη αναφέρεται στην κατάσταση όπου φυσιολογικές συγκεντρώσεις ινσουλίνης παράγουν μικρότερη από την κανονική απόκριση. Η μέγιστη μεταβολική συνέπεια την αντίστασης στην ινσουλίνη είναι η υπεργλυκαιμία που προκύπτει από την αποτυχία της ινσουλίνης να καταστείλει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ και να προάγει την πρόσληψη και το μεταβολισμό της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς. Τα β παγκρεατικά κύτταρα αποκρίνονται στην περίσσεια γλυκόζης στο πλάσμα εκκρίνοντας περισσότερη ινσουλίνη για να αντιμετωπίσουν τις επιπτώσεις της αντίδρασης στην ινσουλίνη και να διατηρήσουν φυσιολογικές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πλάσμα. Όταν η αντίσταση στην ινσουλίνη

εξελίσσεται και τα β κύτταρα δεν είναι πλέον ικανά να διατηρήσουν την απαιτούμενη έκκριση ινσουλίνης, τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα αυξάνονται και αναπτύσσεται NIDDM.¹⁵ Έρευνες δείχνουν πως περίπου το 90% των ατόμων που αναπτύσσουν NIDDM έχουν BMI υψηλότερο από 23kg/m², γεγονός που αναδεικνύει τον κίνδυνο του NIDDM να εμφανίζεται από τα αρχικά στάδια της παχυσαρκίας.² Ο TNFα, που επίσης εμφανίζει αυξημένα επίπεδα στην παχυσαρκία, συνδέεται με την ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη σε καταστάσεις παχυσαρκίας⁶ αφού παρεμποδίζει τη δράση της ινσουλίνης αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης (insulin receptor, IR) και του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (insulin receptor substrate-1, IRS1).¹⁶ Πέρα από τη φωσφορυλίωση του IRS1, ο TNFα μπορεί να προκαλέσει αντίσταση στην ινσουλίνη και μέσω της λιπόλυσης που διεγείρει στο λιπώδη ιστό. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids, FFA) στο πλάσμα που προκύπτουν συμβάλλουν στον φαινότυπο αντίστασης στην ινσουλίνη, ήτοι υπερβολική παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ και μειωμένη πρόσληψη και μεταβολισμό της γλυκόζης στους μυς. Άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους ο TNFα προκαλεί εξασθένηση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, περιλαμβάνουν καταστολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών IRS-1, Glut4, CEBP-α, PPARγ, περιλιπίνη και αδιπονεκτίνη στα λιποκύτταρα.¹⁵

1.4.2. Καρδιαγγειακές παθήσεις

Η κύρια αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, που αριθμούν σχεδόν 700.000 θανάτους ετησίως.

Στα παχύσαρκα άτομα ο κίνδυνος καρδιακής ανεπάρκειας διπλασιάζεται. Λόγω του επιπλέον βάρους, οι απαιτήσεις του μεταβολισμού μεγαλώνουν και αυξάνεται ο όγκος του αίματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μεγαλώνει το μυοκάρδιο ώστε να μπορεί να δεχτεί την αυξημένη ποσότητα αίματος και μάλιστα παρατηρείται σε όλα τα παχύσαρκα άτομα αύξηση του μεγέθους της καρδιάς, ανάλογη με το βάρος του σώματος. Έτσι η καρδιά αυξάνει την απόδοση της και παρ' όλο που αυξάνεται η μυϊκή της μάζα, σε πολλές περιπτώσεις παχύσαρκων ατόμων, αδυνατεί να αναπληρώσει το επιπλέον στρες. Αυτό έχει ως συνέπεια να οδηγείται ο οργανισμός σε καρδιακή ανεπάρκεια.⁶

Ένας επιπλέον επιβαρυντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων στους παχύσαρκους είναι η δυσλιπιδαιμία. Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων (Triglycerides, TG), χαμηλή συγκέντρωση HDL, μη φυσιολογική σύσταση των LDL και εξελίσσεται προοδευτικά, καθώς αυξάνεται ο BMI. Μελέτες αναδεικνύουν τη συμβολή της δυσλιπιδαιμίας που σχετίζεται με την παχυσαρκία, στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών και στην αρτηριοσκλήρωση. Η απώλεια βάρους και η αύξηση της σωματικής άσκησης μπορεί να μειώσει αυτού του είδους την δυσλιπιδαιμία.

Συγκεκριμένα, μείωση βάρους κατά 10 κιλά οδηγεί σε μείωση έως και 5% της συνολικής χοληστερόλης.¹⁷

1.4.3. Καρκίνος

Η παχυσαρκία είναι μια από τις πιο γνωστές αιτίες καρκίνου. Περίπου το 10% των καρκινικών θανάτων στους μη καπνιστές σχετίζεται με την παχυσαρκία. Ο καρκίνος του μαστού, του οισοφάγου, του ενδομητρίου και του παχέος εντέρου είναι οι πιο συνήθεις μορφές καρκίνου στα παχύσαρκα άτομα.

Στις παχύσαρκες γυναίκες, ιδιαίτερα την περίοδο μετά την εμμηνόπαυση αυξάνεται ο κίνδυνος για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και του ενδομητρίου. Αυτά τα είδη καρκίνου φαίνεται να σχετίζονται με τις υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις των οιστρογόνων στον ορό, που παράγονται λόγω της αυξημένης δράσης της αρωματάσης του λιπώδους ιστού.² Η παχυσαρκία αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης του αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου-όχι όμως των επιθηλιακών του κυττάρων- πιθανότατα γιατί ευνοεί την δημιουργία γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης κατά την οποία το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου τραυματίζει το οισοφαγικό επιθήλιο. Η αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης που παρατηρείται στην παχυσαρκία, προκαλεί αύξηση ορισμένων παραγόντων όπως του ινσουλινομιμητικού παράγοντα τύπου-I (Insulin like Growth Factor-I, IGF-I) οι οποίοι συσχετίζονται με την πρόκληση καρκίνου του παχέος εντέρου.¹⁸

1.4.4. Υπέρταση

Ο κίνδυνος της υπέρτασης για τα παχύσαρκα άτομα είναι 5 φορές μεγαλύτερος από ότι για τα φυσιολογικά. Μελέτες δείχνουν πως υπέρτασικοί σε ποσοστά μεγαλύτερα του 85% έχουν BMI πάνω από 25kg/m². Η αύξηση της πίεσης του αίματος, λόγω της αύξησης του βάρους, οφείλεται εν μέρει στην απελευθέρωση του αγγειοτενσινογόνου (πρόδρομης ένωσης της αγγειοτενσίνης) από τα λιποκύτταρα, καθώς και στον αυξημένο όγκο και ιξώδες του αίματος. Επίσης οι διατροφικές συνήθειες των παχύσαρκων και υπέρβαρων ατόμων μπορούν να επιβαρύνουν την κατάσταση. Τα λίπη που λαμβάνουν μέσω της τροφής, ιδιαίτερα τα κορεσμένα, προάγουν την αύξηση της συστολικής και διαστολικής πίεσης του αίματος.²

1.4.5. Αναπνευστικά προβλήματα

Το επιπλέον λίπος του σώματος προκαλεί αλλαγή στη χωρητικότητα των πνευμόνων και τροποποίηση στον αναπνευστικό έλεγχο. Οι πνεύμονες χάνουν περίπου το 25% της ελαστικότητας τους λόγω του μεγαλύτερου βάρους στον θώρακα.⁶ Η δύσπνοια, κοινό σύμπτωμα της παχυσαρκίας, συσχετίζεται άμεσα με τις παραπάνω αλλαγές. Επιπλέον, η συσσώρευση

λίπους γύρω από τον λαιμό στις περιπτώσεις νοσηρής παχυσαρκίας, οδηγεί στη διακοπή της αναπνοής κατά την διάρκεια του ύπνου, φαινόμενο που δημιουργεί υπέρταση, καρδιακή ανακοπή, εγκεφαλικά επεισόδια κ.α.^{2,6}

1.4.6. Μεταβολικό σύνδρομο

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί μια κατάσταση που εξαπλώνεται το ίδιο ανησυχητικά με την παχυσαρκία. Εκτιμάται ότι 47 εκατομμύρια, το 22% των ενηλίκων στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής πάσχουν από αυτό. Η επιστημονική κοινότητα το χαρακτηρίζει ως σύμπλεγμα από τους εξής παράγοντες κινδύνου: αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία και υπέρταση. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ώστε να καθοριστούν κλινικά κριτήρια για την διάγνωση του. Έτσι έχουν προσδιοριστεί έξι κύριες συνιστώσες: α) παχυσαρκία, β) αντίσταση στην ινσουλίνη, γ) υπέρταση, δ) δυσλιπιδαιμία, ε) προθρομβωτικό στάδιο και στ) προφλεγμονώδης κατάσταση. Από αυτά τα έξι συστατικά, η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη θεωρούνται τα κύρια γνωρίσματα του μεταβολικού συνδρόμου.¹⁹

1.5.Είναι η παχυσαρκία μια φλεγμονώδης κατάσταση;

Γενικά το ήπαρ και οι λεμφαδένες είναι οι κύριοι τόποι παραγωγής φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως ο λευκός λιπώδης ιστός εκφράζει και αυτός πολλούς προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και πιθανόν συνεισφέρει στην αύξηση της κυκλοφορίας φλεγμονωδών μορίων κατά την παχυσαρκία.

Όντως έχει αποδειχτεί πως ο λιπώδης ιστός παράγει φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως τον TNFα, ιντερλευκίνες (interleukins, ILs), όπως IL-1, IL-6 κ.α., παράγοντες του συμπληρώματος, όπως τον αναστολέα του Ενεργοποιητή Πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1), ινωδογόνο, κυτοκίνες και άλλα.²⁰ Κάποιες από τις παραπάνω ουσίες προσδιορίζονται ως πρωτεΐνες της οξείας φάσης της φλεγμονής, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP). Από την άλλη μεριά, η παχυσαρκία σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή της αδιπονεκτίνης, που θεωρείται παράγοντας με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις φλεγμονώδεις καταστάσεις, στην παχυσαρκία παρατηρείται μια «λογική» αλλά χρόνια αύξηση των φλεγμονωδών παραγόντων, που όμως είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η συνεισφορά των διαφόρων οργάνων ή ιστών σε αυτούς. Έτσι η παχυσαρκία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια «χαμηλού βαθμού» φλεγμονώδης κατάσταση.²¹

Σε αυτό το συμπέρασμα συνηγορούν πρόσφατες έρευνες που αναδεικνύουν τον λευκό λιπώδη ιστό των παχύσαρκων ατόμων ως στόχο για μια σημαντική διείσδυση μακροφάγων, η οποία μάλιστα αυξάνεται ανάλογα με τον BMI και το μέγεθος των λιποκυττάρων.

Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται πως τα μακροφάγα συσσωρεύονται και περικυκλώνουν τα λιποκύτταρα, ενώ με την απώλεια βάρους παρατηρείται οπισθοχώρηση αυτού του φαινομένου. Η ενεργοποίηση και η διείσδυση των μακροφάγων στο λιπώδη ιστό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Πολλές χημειοτακτικές κυτοκίνες και κάποιες ειδικευμένες κυτοκίνες, όπως η λεπτίνη, μπορεί να εμπλέκονται στην στρατολόγηση των μακροφάγων, όπως υποδεικνύουν διάφορες έρευνες. Επίσης υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις πως η τοπική υποξία που δημιουργείται στο λιπώδη ιστό λόγω της μερικής οξυγόνωσης του, μπορεί να εμπλέκεται στην έλξη και στην παραμονή των μακροφάγων σε αυτόν.²²

Ο σκοπός αυτής της διείσδυσης των μακροφάγων δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Διάφορες έρευνες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα μακροφάγα έχουν ως ρόλο την καταστροφή των λιποκυττάρων και τον περιορισμό του αριθμού τους, ως τρόπο άμυνας του οργανισμού στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Πρόσφατη μελέτη δείχνει πως η πλειοψηφία των μακροφάγων εντοπίζεται γύρω από νεκρά λιποκύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει πως μια από τις φυσιολογικές τους λειτουργίες είναι να απομακρύνουν τα νεκρά τμήματα κυττάρων από το λιπώδη ιστό. Επιπλέον η συγκέντρωση των μακροφάγων φαίνεται να είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, κυρίως στην περιοχή της φλεγμονής. Έτσι ο ρόλος των μακροφάγων στην αγγειογένεση μπορεί να συντελεί στην ταχεία εξάπλωση του λιπώδους ιστού, που τελικά οδηγεί σε υποξία. Τέλος, έρευνες δείχνουν πως η συσσώρευση των μακροφάγων μπορεί να συνεισφέρει στα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών στο αίμα. Η δράση αυτών των μορίων μπορεί να αποτελεί τον μοριακό κρίκο μεταξύ του λιπώδους ιστού και των μεταβολικών, καρδιαγγειακών ακόμα και των ηπατικών διαταραχών που προκαλεί η παχυσαρκία.²¹

1.6. Αντιμετώπιση της παχυσαρκίας

Οι στόχοι της θεραπείας της παχυσαρκίας είναι η μείωση των περιττών κιλών, η διατήρηση της απώλειάς τους και έμμεσα η ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων προσβολής από ασθένειες που σχετίζονται με αυτή. Έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και μείωση από 5 έως 10% του αρχικού βάρους έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές ωφέλειες όσον αφορά την υγεία. Ερευνητές εκτιμούν ότι το 21% των υπέρβαρων ή παχύσαρκων ενηλίκων επιτυγχάνουν να μειώσουν το βάρος τους το πρώτο χρόνο, αλλά η απώλεια βάρους σπάνια διατηρείται για μακρύ χρονικό διάστημα.

Πολλές είναι οι επιλογές για τη μείωση του βάρους όπως δίαιτα χαμηλού θερμιδικού περιεχομένου, σωματική άσκηση και φαρμακευτική αγωγή ενώ σε περιπτώσεις υπερβολικής παχυσαρκίας ($BMI > 40 \text{ kg/m}^2$) προτείνονται και οι χειρουργικές επεμβάσεις.

1.6.1. Δίαιτες

Οι δίαιτες μπορεί να είναι πολύ χαμηλού θερμιδικού περιεχομένου (Very Low Kcalorie Diets, VLCDs) και χαμηλού θερμιδικού περιεχομένου δίαιτες (Low Kcalorie Diets, LCDs). Η γρήγορη απώλεια σωματικού βάρους, μέσω των VLCDs, έχει το μειονέκτημα ότι δε συντελείται μέσω απώλειας σωματικού λίπους αλλά και μέσω απώλειας άλιπου ιστού (μυϊκή μάζα, γλυκογόνου, ανόργανων ουσιών, νερού κ.λ.π.). Η απώλεια του άλιπου ιστού, ανάλογα με την δίαιτα και τη διάρκεια της μπορεί να κυμαίνεται από 35-45% με άμεσες καταστροφικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Επιπλέον, η απώλεια με αυτόν τον τρόπο συνήθως δεν είναι μόνιμη. Αντιθέτως, οι LCDs είναι πιο ασφαλείς, έχουν λιγότερες επιπτώσεις στην υγεία και έχουν πιο μόνιμα αποτελέσματα. Η ελάττωση σωματικού βάρους που παρατηρείται στις πρώτες ημέρες μιας δίαιτας αδυνατίσματος οφείλεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό σε απώλεια νερού και γλυκογόνου. Με την πάροδο του χρόνου όμως το μεγαλύτερο ποσοστό του σωματικού βάρους που χάνεται οφείλεται στο αποθηκευμένο λίπος. Έρευνες αποδεικνύουν καθημερινά ότι η απώλεια βάρους είναι πιο αποτελεσματική και πιο ακίνδυνη όταν συνδυάζεται η κατάλληλη διατροφή με σωματική άσκηση.²³

1.6.2. Φαρμακευτική αγωγή

Τα φάρμακα κατά της παχυσαρκίας δεν έχουν ακόμα ικανοποιητικά αποτελέσματα αφού η πλειοψηφία τους εμφανίζει παρενέργειες.

Μόνο δύο φαρμακευτικές ουσίες, που κυκλοφόρησαν στο παρελθόν είχαν έγκριση για μακροχρόνια θεραπεία: η σιβουτραμίνη και η ορλιστάτη. Η σιβουτραμίνη μειώνει την όρεξη με το να αναστέλλει την επαναπορρόφηση της σεροτονίνης και της νοραδρεναλίνης στις συνάψεις. Επειδή όμως αυτοί οι δυο νευροδιαβιβαστές ρυθμίζουν ένα μεγάλο αριθμό σωματικών λειτουργιών, παρουσιάστηκαν επιπλοκές. Μεταξύ Φεβρουαρίου 1998 και Σεπτεμβρίου 2001, 150 παχύσαρκοι που τους χορηγήθηκε η σιβουτραμίνη νοσηλεύτηκαν, από τους οποίους 29 κατέληξαν από καρδιαγγειακά νοσήματα. Το Μάρτιο του 2002, ο FDA απέσυρε το φάρμακο από την αγορά.

Η ορλιστάτη αναστέλλει ειδικά την παγκρεατική λιπάση με αποτέλεσμα να μειώνει την απορρόφηση των λιπών από τον πεπτικό σωλήνα. Η χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παρενεργειών, όπως σπασμών και διάρροιας γιατί παρεμποδίζεται η απορρόφηση του νερού από το έντερο και υπάρχει έντονη αποβολή TG. Έρευνες έδειξαν ότι η απώλεια βάρους των ατόμων, σε κιλά, μετά από ένα χρόνο λήψης της ορλιστάτης, ήταν ακριβώς ίση με τον αριθμό των χαπιών του φαρμάκου που κατανάλωσαν και στις περισσότερες περιπτώσεις, μετά από τη διακοπή της θεραπείας, οι ασθενείς ξανάπαιρναν τα κιλά που είχαν χάσει.^{11, 24}

Κλινικές μελέτες σε πειραματόζωα ανέδειξαν τη στενή σύνδεση του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος (περιγράφεται αναλυτικότερα σε επόμενο κεφάλαιο) με τη ρύθμιση της όρεξης και τους βάρους του σώματος. Σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές, μελετήθηκε η επίδραση του SR141716 (εμπορική ονομασία rimonabant), ενός ανταγωνιστή του κανναβινοειδούς υποδοχέα 1 (cannabinoid receptor 1, CB1) στην ανθρώπινη παχυσαρκία. Στις δοκιμές αυτές πήραν μέρος περισσότεροι από 6.600 εθελοντές, γυναίκες και άντρες, με BMI > 30kg/m² ή με BMI > 27kg/m² και ασθένειες που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Η χορήγηση rimonabant για ένα ή δυο χρόνια είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση: i) του σωματικού βάρους, ii) της περιφέρειας της μέσης, iii) της αντίστασης στην ινσουλίνη iv) των επιπέδων των TG, της γλυκόζης και της λεπτίνης στον ορό ενώ παράλληλα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της HDL και της αδιπονεκτίνης στον ορό των ασθενών. Το rimonabant διατίθεται σε 42 χώρες ως φάρμακο κατά της παχυσαρκίας και ως αντενδείξεις κατά χορήγηση του αναφέρονται ψυχιατρικά συμπτώματα (κατάθλιψη, νευρική υπερκινητικότητα, διαταραχές ύπνου).²⁵

1.6.3. Χειρουργικές επεμβάσεις

Οι γαστρικές χειρουργικές επεμβάσεις αποτελούν τον τελευταίο τρόπο αντιμετώπισης της παχυσαρκίας και επιτρέπονται σε περιπτώσεις υπερβολικής παχυσαρκίας (BMI>40kg/m²). Οι χειρουργικές τεχνικές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

I. Περιοριστικές, οι οποίες ελαττώνουν την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής. Από αυτές οι σημαντικότερες είναι ο δακτύλιος παχυσαρκίας και το ενδογαστρικό μπαλόνι.

II. Μικτές, οι οποίες ελαττώνουν την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής σε συνδυασμό με δυσασπορρόφηση κυρίως του λίπους.

Ενδογαστρικό μπαλόνι με αέρα

Είναι μία επεμβατική ενδοσκοπική τεχνική χωρίς χειρουργείο. Εισάγεται ένα μπαλόνι ξεφούσκωτο από το στόμα στο στομάχι και στη συνέχεια φουσκώνεται με αέρα. Είναι τεχνική χαμηλής νοσηρότητας (χωρίς ενοχλήματα) και αρκετά αποτελεσματική, αν συνοδεύεται από ειδική διατροφική αγωγή. Το ενδογαστρικό μπαλόνι πρέπει να αφαιρείται στους 6 με 8 μήνες. Ο ασθενής θα παρουσιάσει ικανοποιητική απώλεια κιλών, αν όμως μετά τους 6 με 8 μήνες δεν αλλάξει διατροφικές συνήθειες και τρόπο ζωής, υπάρχει πιθανότητα να υποτροπιάσει η παχυσαρκία.

Δακτύλιος παχυσαρκίας

Είναι μία μόνιμη και ριζική τεχνική για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας. Είναι λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση μικρής νοσηρότητας. Δεν προκαλεί καμία κάκωση στο

στόμαχο απλώς του δίνει το σχήμα κλεψύδρας. Μετά την κατανάλωση του γεύματος, η τροφή πάει στο 1ο διαμέρισμα της κλεψύδρας και το άτομο νιώθει σύντομο κορεσμό, σιγά-σιγά περνάει στο άλλο διαμέρισμα και προωθείται φυσιολογικά προς το έντερο. Η τεχνική αυτή μπορεί να έχει μόνιμα και ριζικά αποτελέσματα, μπορεί όμως και να έχει σχετική αποτυχία αν ο ασθενής έχει ή αποκτήσει στο μέλλον διατροφικές συνήθειες μεγάλης κατανάλωσης υγρών τροφών υψηλής θερμιδικής αξίας.

Μικτές τεχνικές - Bypass

Οι μικτές τεχνικές προκαλούν ελάττωση τροφής και δυσαπορρόφηση κυρίως του λίπους. Η εντερική παράκαμψη μπορεί να συνδυαστεί με οριζόντια ή κάθετη εκτομή του στομάχου. Αν διατηρηθεί ανέπαφο το στομάχι πρέπει να τοποθετηθεί δακτύλιος παχυσαρκίας. Παρουσιάζει μόνιμα και σίγουρα αποτελέσματα σε όλους τους ασθενείς ανεξαρτήτως από τις διατροφικές συνήθειες τους. Είναι όμως σχετικά μεγαλύτερης νοσηρότητας χειρουργική επέμβαση ενώ ασθενής μπορεί να παρουσιάζει σε μόνιμη βάση ρευστοποιημένες κενώσεις και πιθανόν να έχει ανάγκη συμπληρωμάτων διατροφής κυρίως βιταμινών και ασβεστίου.²⁶

2 Λιπώδης ιστός

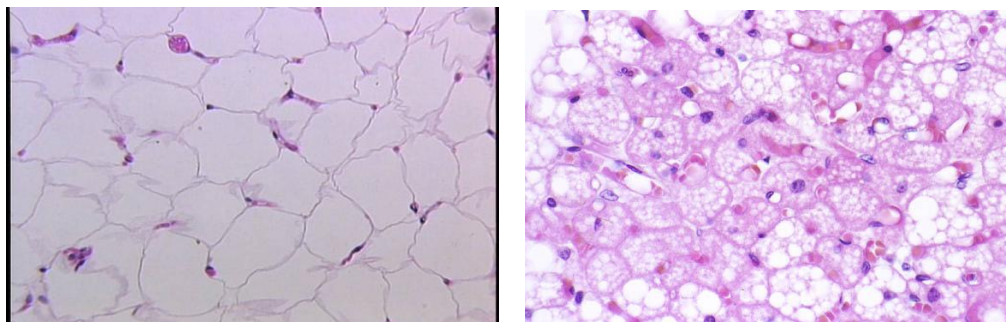
2.1.Εισαγωγή

Ο λιπώδης ιστός χαρακτηριζόταν για αρκετό καιρό ως μία παθητική αποθήκη ενέργειας στην οποία απλά συσσωρεύεται ή από την οποία κινητοποιείται λίπος, σε αντανάκλαση στα ρυθμιστικά σήματα που προέρχονται από άλλα μακρινά σημεία του σώματος. Μάλιστα, η παχυσαρκία ως ασθένεια απασχολούσε μόνο τους ψυχολόγους και τους ψυχιάτρους, και μόνο τα τελευταία χρόνια έχει τραβήξει την προσοχή και των επιστημόνων, ως μια ασθένεια που επηρεάζεται από τη σωστή λειτουργία του λιπώδους ιστού. Μόλις το 1987 αναγνωρίστηκε ως η κύρια περιοχή του μεταβολισμού των γενετικών στεροειδών²⁷ και της παραγωγής ενός ενδοκρινούς παράγοντα, της αδιψίνης.²⁸ Η εύρεση και η αναγνώριση της λεπτίνης το 1994, οδηγεί στον χαρακτηρισμό του λιπώδους ιστού ως ενδοκρινούς οργάνου.²⁹ Τώρα πλέον είναι γνωστό πως ο λιπώδης ιστός εκφράζει και εκκρίνει μια ποικιλία βιοενεργών πεπτιδίων, που είναι γνωστά ως λιποκίνες, οι οποίες δρουν τόσο με αυτοκρινή-παρακρινή τρόπο όσο και με ενδοκρινή. Επιπλέον ο λιπώδης ιστός εκφράζει πολλούς υποδοχείς, που του επιτρέπουν να αντιδρά σε σήματα παραδοσιακών ορμονικών συστημάτων καθώς και σε σήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.). Έτσι, εκτός από τους βιολογικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την αποθήκευση και την απελευθέρωση ενέργειας, ο λιπώδης ιστός διαθέτει και το μεταβολικό «μηχανισμό» ώστε να επικοινωνεί με απομακρυσμένα όργανα. Συνοψίζοντας, ο λιπώδης ιστός θεωρείται πλέον ως ένα όργανο, υπεύθυνο για ποικιλία βιολογικών διαδικασιών όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός, η εκκριτική λειτουργία και η ανοσοποιητική λειτουργία.³⁰

2.2.Μορφολογία του λιπώδους ιστού

Ο λιπώδης ιστός είναι ένας ειδικός τύπος συνδετικού ιστού που βρίσκεται σε όλα τα σπονδυλωτά. Επεκτείνεται σε όλο το σώμα και αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα όργανά του. Είναι ο μόνος ιστός του σώματος που μπορεί να αλλάξει σημαντικά τη μάζα του μετά την ενηλικίωση του ατόμου. Οι φυσιολογικές τιμές για το σωματικό λίπος είναι 9 με 18% στους άνδρες και 14 με 28% στις γυναίκες.³¹ Στα θηλαστικά, ο λιπώδης ιστός εντοπίζεται στην υποδόρια περιοχή του δέρματος και σε κενά που δημιουργούνται μεταξύ των γειτονικών οργάνων π.χ. του εντερικού σωλήνα, τους νεφρούς, της καρδιάς, συγκρατώντας τα στη θέση τους.³² Αντίθετα, στα κατώτερα σπονδυλωτά βρίσκεται σε λίγες, μεγάλες συσσωρεύσεις στην κοιλιακή χώρα, τοποθετημένες έτσι ώστε να μπορούν να υποστούν αλλαγές στη μάζα τους χωρίς να επηρεάζουν το κέντρο βάρους του σώματος του ζώου.³³ Ο λιπώδης ιστός, πέρα από τις

βασικές λειτουργίες του ως αδένας και ως αποθήκη ενέργειας, βρίσκεται σε κατάσταση συνεχούς ανανέωσης και είναι ευαίσθητος σε νευρικά και ορμονικά ερεθίσματα, βοηθά στη διαμόρφωση της επιφάνειας του σώματος και στην εξασθένηση των δονήσεων και συντελεί στη θερμική μόνωση.³² Υπάρχουν δυο είδη λιπώδους ιστού: α) ο λευκός λιπώδης ιστός και β) ο φαιός λιπώδης ιστός, που διαφέρουν τόσο στη μορφολογία όσο και στη λειτουργία (σχήμα 1).



Σχήμα 1: Φωτογραφίες του λευκού και του φαιού λιπώδους ιστού αντίστοιχα.

2.3.Λευκός λιπώδης ιστός

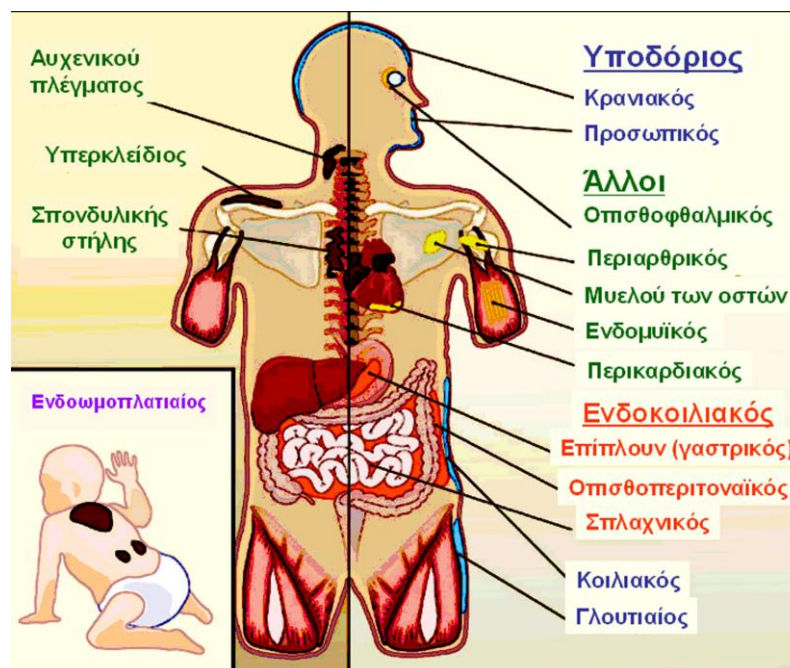
Ο λευκός λιπώδης ιστός (White Adipose Tissue, WAT) τοποθετείται κυρίως σε τρεις ανατομικές περιοχές, την υποδόρια, την δερματική και την σπλαχνική.³⁴ Ο συνδυασμός των διαφόρων περιοχών-τύπων του λιπώδους ιστού σε έναν οργανισμό ορίζεται ως «λιπώδες όργανο».³¹ Η βασική οργάνωση του λιπώδους ιστού περιλαμβάνει ώριμα λιποκύτταρα, στρωματικά κύτταρα (stromal-vascular cells, S-V), αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά αγγεία και νευρικές ίνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος.^{31, 35}

Το κύριο κυτταρικό συστατικό του ιστού είναι τα λιποκύτταρα. Τα λιποκύτταρα είναι σφαιρικά και το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου καταλαμβάνεται από μια μεγάλη σφαιρική λιποσταγόνα, αποτελούμενη κυρίως από TG. Μεταξύ της λιποσταγόνας και της πλασματικής μεμβράνης βρίσκεται το κυτταρόπλασμα, υπό μορφή δακτυλίου λεπτού πάχους, που περιέχει τον πυρήνα και τα υπόλοιπα οργάνδια του κυττάρου.³² Ο πληθυσμός των ώριμων λιποκυττάρων αποτελείται από κύτταρα με διαφορετικά μεγέθη, τα οποία κατά την ανάπτυξη του οργανισμού ή την εξέλιξη της παχυσαρκίας, αυξάνονται τόσο στο μέγεθος όσο και στον αριθμό και η ετερογένεια τους τείνει να εξαφανιστεί.

Τα λεπτά διακλαδισμένα τριχοειδή αγγεία μεταφέρουν μεταβολίτες προς και από τα κύτταρα. Παρ' όλο που η ροή του αίματος είναι χαμηλή στο λιπώδη ιστό σε σύγκριση με άλλα όργανα, έχει παρατηρηθεί πως κάθε λιποκύτταρο βρίσκεται κοντά σε ένα αιμοφόρο αγγείο.³¹ Τα λεμφικά αγγεία στο λιπώδη ιστό μεταφέρουν τα εκκρινόμενα μόρια σε όλο το σώμα.³³

Η περιοχή που εντοπίζεται ο λιπώδης ιστός, η παροχή μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών και η παρουσία άλλων κυτταρικών τύπων, συνεισφέρουν στη διαφορετικότητα της

μορφολογίας, της λειτουργίας και της εμπλοκής κάθε λιπώδους ιστού στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων όπως της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου.^{9, 36} Η κατανομή του λευκού λιπώδους ιστού διαφέρει ανάμεσα στα είδη αλλά και ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους. Στον άνθρωπο, η ποικιλομορφία του WAT (σχήμα 2) έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της σχέσης του λιπώδων ιστών με την ανάπτυξη μεταβολικών ασθενειών. Ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη της περιφερικής και της ηπατικής ινσουλινοαντίστασης³⁷ ενώ απομάκρυνση του σπλαχνικού λιπώδους ιστού και όχι του υποδόριου, βελτιώνει την ευαισθησία στην ινсуλίνη.³⁸



Σχήμα 2: Είδη και ανατομική θέση των λιπωδών ιστών ανθρώπου.³⁹ Ο ενδοκοιλιακός λιπώδης ιστός διακρίνεται στο επίπλουν ή γαστρικό λίπος (πτυχή του περιτόναιου, με την οποία ο στόμαχος προσφύεται σε ένα άλλο όργανο), στο οπισθοπεριτοναϊκό και στο σπλαχνικό λίπος. Ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός διακρίνεται, με τη σειρά του, στο μεσεντερικό, στον επιδιδυμικό και στον περινεφρικό λιπώδη ιστό. Ο μεσεντερικός λιπώδης ιστός εντοπίζεται κοντά στο λεπτό και παχύ έντερο, στο πίσω μέρος της κοιλιακής χώρας.⁴⁰

Δυο θεωρίες έχουν αναπτυχθεί ώστε να εξηγηθεί γιατί τα διαφορετικά είδη των λιπωδών ιστών συμμετέχουν διαφορετικά στην ανάπτυξη μεταβολικών παρενεργειών.³⁹ Με βάση την πρώτη θεωρία, που βασίζεται στην ανατομική θέση του κάθε λιπώδους ιστού, ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός εκκρίνει τα προϊόντα μεταβολισμού του (όπως λιπαρά οξέα και αδιποκίνες) στην πυλαία φλέβα, όπου μπορούν να δράσουν κυρίως στο ήπαρ, επηρεάζοντας το βασικό μεταβολισμό.⁴¹ Η δεύτερη θεωρία βασίζεται στη βιολογία του κυττάρου προτείνοντας ότι τα κύτταρα του κάθε λιπώδους ιστού έχουν διαφορετικές προτεραιότητες και διαφορετική προέλευση, συμβάλλοντας έτσι με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη των ασθενειών.⁴² Η αντίληψη ότι τα κύτταρα των διαφόρων λιπωδών ιστών προέρχονται από διαφορετικούς

προγόνους, υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι τα διάφορα είδη του λιπώδους ιστού έχουν διαφορετική χρονική ανάπτυξη. Στους ανθρώπους, η ανάπτυξη του WAT αρχίζει από το 2^ο τρίμηνο της κύησης και μέχρι τη γέννηση έχει αναπτυχθεί ο υποδόριος και ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός ενώ στα τρωκτικά, ο WAT αναπτύσσεται κυρίως μετά τη γέννηση, αρχικά στην υποδέρια περιοχή και αργότερα στην κοιλιακή χώρα. Επίσης, διαφορές έχουν επισημανθεί στην έκφραση των γονιδίων και στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων από τα διάφορα είδη των λιπωδών ιστών.^{9, 39}

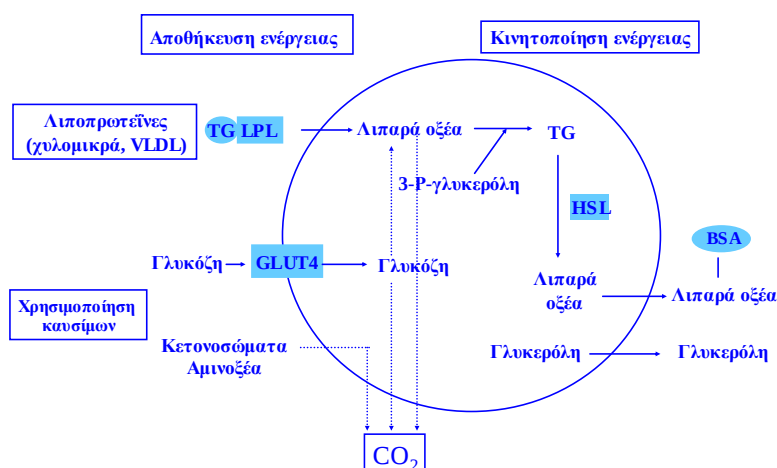
2.4. Φαίος λιπώδης ιστός

Η κύρια λειτουργία του φαίου λιπώδους ιστού (Brown Adipose Tissue, BAT) είναι η θερμογένεση, μια πορεία κατά την οποία καταναλώνεται ενέργεια για την παράγωγή θερμότητας. Υπεύθυνες για το φαινόμενο αυτό είναι οι UCPs. Σήμερα είναι γνωστή η ύπαρξη πολλών ισομορφών των UCPs, μια εκ των οποίων, η UCP1, εντοπίζεται αποκλειστικά στο φαίο λιπώδη ιστό και αποτελεί δείκτη για το διαχωρισμό ανάμεσα στα δυο είδη του λιπώδους ιστού.^{43, 44}

Ο φαίος λιπώδης ιστός οφείλει το χρώμα του στα πολυάριθμα τριχοειδή αγγεία του αίματος και στα πολυάριθμα μιτοχόνδρια που περιέχει. Αναπτύσσεται πλήρως κατά την εμβρυϊκή ηλικία και εξαφανίζεται στα περισσότερα είδη λίγο μετά τη γέννηση. Κυρίως τα ζώα που πέφτουν σε χειμερία νάρκη έχουν φαίο λιπώδη ιστό, προκειμένου να διατηρήσουν τη θερμοκρασία του σώματος σταθερή κατά την περίοδο της νάρκης. Τα κύτταρα του φαίου λιπώδους ιστού είναι πολυγωνικά και μικρότερα από αυτά του WAT, έχουν κεντρικό πυρήνα και περιέχουν πολλές λιποσταγόνες διαφορετικού μεγέθους.³²

2.5. Μεταβολικές πορείες στο λιπώδη ιστό

Η αποθήκευση της ενέργειας στο λιπώδη ιστό γίνεται με την μορφή TG. Τα TG που είναι εστέρες της γλυκερόλης, λόγω των λιπαρών οξέων που περιέχουν είναι ιδιαίτερα ανηγμένα μόρια και η οξείδωσή τους αποδίδει μεγάλα ποσά ενέργειας. Η ενεργειακή απόδοση από την πλήρη οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι περίπου 9 kcal/g, σε αντίθεση με τις περίπου 4 kcal/g για τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, οι TG είναι μη πολικές ενώσεις και έτσι αποθηκεύονται σε σχεδόν άνυδρη μορφή, ενώ οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, ως περισσότερο πολικά μόρια, είναι πολύ ενυδατωμένα.⁴⁵ Η πορεία σχηματισμού και αποθήκευσης των TG ονομάζεται λιπογένεση και η αποικοδόμηση τους λιπόλυση. Οι δύο αυτές πορείες δεν είναι αμφίδρομες πορείες, αλλά δύο διαφορετικές στις οποίες συμμετέχουν διαφορετικά ένζυμα (σχήμα 3).



Σχήμα 3: Μεταβολικές πορείες στο λιπώδη ιστό.

Η πορεία της λιπογένεσης ξεκινά με τη μεταφορά στο λιπώδη ιστό των TG, που υπάρχουν αφ' ενός μεν στα χυλομικρά που προέρχονται από τον πεπτικό σωλήνα και αφ' ετέρου στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL, very low density lipoproteins) που προέρχονται από το ήπαρ. Οι TG δεν προσλαμβάνονται άμεσα από τα λιποκύτταρα, αλλά υδρολύονται πρώτα από μια εξωκυτταρική λιπάση, LPL, που βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων που αιματώνουν το λιπώδη ιστό. Τα FFA που παράγονται, μεταφέρονται στο εσωτερικό των λιποκυττάρων με τη βοήθεια ειδικών μεμβρανικών μεταφορέων. Εκεί, συνδέονται με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που τα μεταφέρουν στην επιφάνεια της λιποσταγόνας και στα οργανίδια του κυττάρου. Ακολουθεί η εστεροποίηση τους με το συνένζυμο-A (CoA) και τα παραγόμενα ακυλο-CoA εστεροποιούνται με τη 3-φωσφορική γλυκερόλη σχηματίζοντας τελικά TG, τα οποία συνενώνονται με την υπάρχουσα λιποσταγόνα με δυνάμεις Van der Waals που ασκούνται ανάμεσα στις υδρόφοβες αλυσίδες των λιπαρών οξέων.⁴⁶ Η 3-φωσφορική γλυκερόλη προέρχεται από την αναγωγή του γλυκολυτικού ενδιάμεσου φωσφορική διυδροξυακετόνη. Έτσι, τα λιποκύτταρα χρειάζονται γλυκόζη για την σύνθεση τριγλυκεριδίων.⁴⁵

Κατά την πορεία της λιπόλυσης, τα TG υδρολύονται προς γλυκερόλη και FFA. Αρχικά η ορμονοευαίσθητη λιπάση (Hormone-Sensitive Lipase, HSL) υδρολύει τους εστερικούς δεσμούς στις θέσεις 1 και 3, ενώ στη συνέχεια η λιπάση της 2-μονοακυλογλυκερόλης (monoacylglycerol lipase-2, MAGL-2) καταλύει την υδρόλυση στη θέση 2. Η γλυκερόλη που παράγεται επιστρέφει στο ήπαρ όπου θα οξειδωθεί ή θα χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη στη γλυκονεογένεση⁴⁶. Το μεγαλύτερο μέρος των λιπαρών οξέων που παράγονται από την υδρόλυση επανεστεροποιούνται

εάν υπάρχει αφθονία 3-φωσφορικής γλυκερόλης. Αντίθετα, τα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται στο πλάσμα, εάν η 3-φωσφορική γλυκερόλη σπανίζει, λόγω έλλειψης γλυκόζης.⁴⁵

Η λιπογένεση και η λιπόλυση είναι αυστηρά ρυθμιζόμενες μεταβολικές πορείες ώστε να επιτυγχάνεται η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της αποθήκευσης και της κατανάλωσης ενέργειας. Κύριοι στόχοι των ρυθμιστικών μηχανισμών είναι τα ένζυμα LPL και HSL.

Η LPL είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που απαντάται σε πολλούς ιστούς. Η ενεργός μορφή της είναι ένα εκκρινόμενο ομοδιμερές το οποίο συνδέεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων που αιματώνουν τον ιστό. Η LPL του λιπώδους ιστού βρίσκεται κάτω από αυστηρό ορμονικό έλεγχο. Η ινσουλίνη αυξάνει τη σύνθεση του ενζύμου και ρυθμίζει το ρυθμό έκκρισής του από τα λιποκύτταρα. Επιπλέον, ενεργοποιεί την καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (acetyl-CoA carboxylase, ACC) και τη συνθετάση του ακυλο-CoA (acyl-CoA synthetase, ACS), ένζυμα απαραίτητα για τη *de novo* βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και των TG, αντίστοιχα.⁴⁶ Η αυξητική ορμόνη και η τριωδοθυρονίνη αυξάνουν την έκφραση της LPL ενώ τα γλυκοκορτικοειδή, πολλές κυτοκίνες και οι κατεχολαμίνες έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα.⁴⁷

Ο έλεγχος της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό από την HSL γίνεται κυρίως σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο ή και σε επίπεδο μεταγραφής. Το ένζυμο ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση της Ser-563, από μια πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic adenosine monophosphate, cAMP). Οι κατεχολαμίνες, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη ενεργοποιούν τη HSL, μετά από σύνδεσή τους με τους ειδικούς β-αδρενεργικούς υποδοχείς της μεμβράνης των λιποκυττάρων. Λιπολυτική δράση, μέσω της HSL, παρουσιάζουν η γλυκαγόνη, τα γλυκοκορτικοειδή καθώς επίσης και οι θυρεοειδείς ορμόνες.^{47, 48} Η HSL αναστέλλεται από την αδενοσίνη και τα κετονοσώματα ενώ αντιλιπολυτικά δρα και η μικρή ροή του αίματος εξαιτίας του κορεσμού των θέσεων σύνδεσης των παραγόμενων κατά την αντίδραση FFA στην αλβουμίνη του ορού (serum albumin, SA).⁴⁸

Η δραστηριότητα των λιπασών επηρεάζεται από την επιφάνεια επαφής με το υπόστρωμά τους. Η HSL ειδικά, πρέπει να έρθει σε επαφή με τη λιποσταγόνα του λιποκυττάρου, κάτι που επιτυγχάνεται με βοήθεια των περιλιπινών. Οι περιλιπίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους που εντοπίζονται στην επιφάνεια της λιποσταγόνας.⁴⁹ Την προσέγγιση αυτή φαίνεται ότι επηρεάζουν κάποιες ουσίες που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στην επιφάνεια της λιποσταγόνας. Ειδικότερα, η φωσφατιδυλοχολίνη (Phosphatidyl Chol, PC) και σε μικρότερο βαθμό η χοληστερόλη (Cholesterol, Chol) μειώνουν αυτήν την προσέγγιση ενώ η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (Phosphatidyl Ethanolamine, PE) την αυξάνει ελαφρώς.⁵⁰

2.6.Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο

Ο λιπώδης ιστός, όπως ήδη αναφέρθηκε, εκκρίνει μια μεγάλη ποικιλία πεπτιδίων. Μερικά από αυτά χαρακτηρίστηκαν ως ρυθμιστές του μεταβολισμού ενώ άλλα ως ρυθμιστές φλεγμονωδών καταστάσεων.

2.6.1. Λεπτίνη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η λεπτίνη είναι μια πεπτιδοορμόνη, που ανακαλύφθηκε το 1994 στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων αρουραίων (*ob/ob*). Ο λιπώδης ιστός είναι η κύρια πηγή λεπτίνης, η οποία στη συνέχεια εκκρίνεται και μπορεί να δράσει αυτοκρινικά, παρακρινικά και ενδοκρινικά. Από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού το μεγαλύτερο ποσοστό λεπτίνης εκφράζεται στα ώριμα λιποκύτταρα, αλλά φαίνεται ότι εκφράζεται και στα προλιποκύτταρα στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης.⁵¹

Ο ρόλος αυτής της λιποκίνης είναι η μεταφορά μηνυμάτων από την περιφέρεια στο Κ.Ν.Σ. Πιο συγκεκριμένα, η λεπτίνη εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, κυκλοφορεί δεσμευμένη σε πρωτεΐνες του πλάσματος και εισέρχεται στον εγκέφαλο.⁵² Στον υποθάλαμο, δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς και από την μια ενεργοποιεί ανορεξιογόνα πεπτίδια ενώ από την άλλη αναστέλλει ορεξιογόνα πεπτίδια, όπως το νευροπεπτίδιο Υ (*neuropeptide Y, NPY*).⁵³ Η κύρια δράση της λεπτίνης εντοπίζεται κυρίως στην περίοδο της νηστείας, όπου λειτουργεί ως «σήμα πείνας». Όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε αυτή την κατάσταση, τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα μειώνονται ταχύτατα, με συνέπεια την μείωση των γενετικών ορμονών, των ορμονών ανάπτυξης, της θερμογένεσης, του ρυθμού μεταβολισμού και την αύξηση της κατανάλωσης τροφής με τελικό σκοπό την ανάκτηση του ενεργειακού ισοζυγίου.⁵⁴

Έχει παρατηρηθεί πως ποντίκια με μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης ή του υποδοχέα της, καθώς επίσης και άτομα με μεταλλάξεις σ' αυτά τα γονίδια είναι υπερβολικά παχύσαρκα. Η χορήγηση λεπτίνης σ' αυτές τις περιπτώσεις οδηγεί σε θεαματικά αποτελέσματα.⁵⁵ Έχει διαπιστωθεί πως τα επίπεδα λεπτίνης σχετίζονται με την μάζα του λιπώδους ιστού και μάλιστα με αναλογικό τρόπο.⁵⁶ Τα παχύσαρκα άτομα, αν εξαιρέσουμε το μικρό ποσοστό εκείνων που φέρουν κάποιες από τις παραπάνω μεταλλάξεις, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα. Τα ενδογενώς υψηλά της επίπεδα αλλά και η θεραπεία με εξωγενή λεπτίνη δεν βοηθούν τον οργανισμό να αντιμετωπίσει την παχυσαρκία, γεγονός που υποδεικνύει την εμφάνιση αντίστασης στη δράση της στους ιστούς.³⁰ Ο μηχανισμός με τον οποίο αναπτύσσεται η αντίσταση στην λεπτίνη δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Η λεπτίνη, εκτός από την επίδρασή της στην ενεργειακή ομοιόσταση, εμφανίζει επιπλέον σημαντικές δράσεις, όπως στη ρύθμιση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού, στην αιμοποίηση, στην αγγειογένεση και στην ανάπτυξη των οστών.³⁰ Συγκεκριμένα, αλλάζει την παραγωγή

κυτοκινών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, προάγει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, ενεργοποιεί την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και άρα την αγγειογένεση, και τέλος μειώνει την οστική μάζα μέσω της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.^{57, 58} Τέλος, μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα λιπιδίων στους σκελετικούς μυς, στο ήπαρ και στα β-κύτταρα του παγκρέατος, με αποτέλεσμα να βελτιώνει την ευαισθησία των ιστών αυτών στην ινσουλίνη.⁵⁹

Η έκφραση της λεπτίνης είναι μεγαλύτερη στον υποδόριο από ότι στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό.⁶⁰ Ο λειτουργικός υποδοχέας της λεπτίνης (obesity receptor, OB-R) εκφράζεται στα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα.⁵¹ Σε πιο πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι υποδοχείς OB-Ra και OB-Rb εκφράζονται και στα προλιποκύτταρα και η έκφρασή τους αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση.⁶¹

Η έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης σε κύτταρα του λιπώδους ιστού καθώς και η παρατήρηση ότι η λεπτίνη διεγείρει τη λιπόλυση υποστηρίζουν την ιδέα ότι η λεπτίνη μπορεί να δρα αυτοκρινικά ρυθμίζοντας λειτουργίες του λιπώδους ιστού.^{62, 63} Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η λεπτίνη ενεργοποιεί το μονοπάτι της ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen activated-protein kinase, MAPK) μέσω φωσφορυλίωσης των ισομορφών p42/p44 σε προλιποκύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση συμβολής αλλά και σε διαφοροποιημένα.⁶¹ Η κύρια, ωστόσο, δράση της λεπτίνης στα λιποκύτταρα φαίνεται ότι είναι η παρεμπόδιση της δράσης της ινσουλίνης. Αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης εξασθενούν την ινσουλινοεπαγόμενη δραστικότητα της MAPK, τη φωσφορυλίωση της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (glycogen synthase kinase 3β, GSK3β) και τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης.⁶⁴ Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η λεπτίνη αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης στα λιποκύτταρα, μειώνει την ενσωμάτωση γλυκόζης στα λιπίδια που διεγείρει η ινσουλίνη.⁶⁵ Τέλος, η λεπτίνη προάγει τη λιπόλυση άμεσα αλλά και έμμεσα μειώνοντας την ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στη λιπόλυση, παρεμποδίζοντας την οξειδωση της γλυκόζης και διεγείροντας την οξειδωση των λιπαρών οξέων ενώ αναστέλλει την επανεστεροποίησή τους.^{66, 67}

2.6.2. Αδιπονεκτίνη

Η αδιπονεκτίνη είναι μια πρωτεΐνη 30 kDa που εκκρίνεται, σχεδόν αποκλειστικά, από τα λιποκύτταρα και κυκλοφορεί στο αίμα ως τριμερές, εξαμερές ή ολιγομερές λόγω μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων μέσω υδροξυλίωσης και γλυκοζυλίωσης.⁵² Χαρακτηρίστηκε ανεξάρτητα από τέσσερις ομάδες που χρησιμοποίησαν διαφορετικές μεθόδους και έτσι τα εναλλακτικά της ονόματα είναι apM1 (adipose most abundant gene transcript 1), Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), adipoQ και GBP28 (gelatin binding protein of 28 kDa). Η συγκέντρωσή της είναι υψηλή (500-30,000 μg/l), αποτελεί το 0,01% της

συνολικής πρωτεΐνης του πλάσματος.⁵² Έως τώρα, έχουν βρεθεί δύο υποδοχείς της αδιπονεκτίνης, ο Adipo R1 και ο Adipo R2, που εκφράζονται κυρίως στους μυς και στο ήπαρ, αντίστοιχα.³⁰ Οι δύο αυτοί υποδοχείς εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια στις διάφορες μορφές της πρωτεΐνης, γεγονός που εξηγεί τις διαφορετικές επιδράσεις των ισομορφών αυτών.⁶⁸

Η αδιπονεκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων. Μειώνει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ, αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης στους μυς και ενεργοποιεί την οξείδωση των λιπαρών οξέων και στους δύο ιστούς.⁶⁹ Αντίθετα με σχεδόν όλες τις λιποκίνες, η έκφραση και η συγκέντρωση της στον ορό μειώνεται στα παχύσαρκα άτομα και σε καταστάσεις που εμφανίζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Ύστερα από απώλεια βάρους ή θεραπεία με φάρμακα που δρουν κατά της αντίστασης στην ινσουλίνη, έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης.^{30, 56} Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει πως χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης στο αίμα σχετίζονται με αυξημένη αρτηριακή πίεση ενώ υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης σχετίζονται με υψηλά επίπεδα HDL και με μειωμένο κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιακού εμφράγματος.⁵² Πρόσφατα επισημάνθηκε ότι η έκφραση της αδιπονεκτίνης είναι πιο αυξημένη στα λιποκύτταρα του υποδόριου λιπώδους ιστού, συγκριτικά με τα λιποκύτταρα του σπλαχνικού λιπώδους ιστού. Το αντίθετο παρατηρείται με την έκκριση της ορμόνης που είναι μεγαλύτερη στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό, προτείνοντας ότι η έκφραση και η έκκριση της αδιπονεκτίνης ρυθμίζονται διαφορετικά σε κάθε τύπο λιπώδους ιστού.³⁶ Η αδιπονεκτίνη ρυθμίζεται γονιδιακά από τις C/EBP,⁷⁰ που είναι ιδιαίτερα αυξημένες στον υποδόριο ιστό ενώ ο μηχανισμός της έκκρισής της χρήζει περισσότερης διερεύνησης.³⁶

Ο μηχανισμός με τον οποίο συνδέονται τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως. Η έκκριση της ορμόνης από τα λιποκύτταρα κοιλιακού λιπώδους ιστού παχύσαρκων ασθενών συσχετίζεται αρνητικά με το BMI ενώ δεν επηρεάζεται η έκκριση της από το μέγεθος του υποδόριου λιπώδους ιστού.⁷¹ Πιθανόν, ο TNFα, που αυξάνεται στο λιπώδη ιστό των παχύσαρκων ατόμων, παρεμποδίζει την παραγωγή της λιποκίνης αυτής. Από την άλλη μεριά, η αδιπονεκτίνη μειώνει την παραγωγή και την ενεργότητα του TNFα και της IL-6, ενώ παράλληλα προάγει την έκφραση αντιφλεγμονωδών παραγόντων.⁵⁵

2.6.3. Αδιψίνη

Η αδιψίνη ή αλλιώς θρυψίνη των λιποκυττάρων είναι μια εκκρινόμενη σερίνοπρωτεάση που σχετίζεται με τον παράγοντα συμπληρώματος D και αποτελεί το ένζυμο που ελέγχει την ταχύτητα στο εναλλακτικό μονοπάτι της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.⁵² Στον άνθρωπο εκφράζεται από τα λιποκύτταρα και τα μακροφάγα ενώ στο ποντίκι κυρίως από τα λιποκύτταρα.⁷² Ο κύριος ρόλος της είναι η ενεργοποίηση της παραγωγής της πρωτεΐνης

διέγερσης ακυλίωσης (acylation-stimulating protein, ASP), μιας πρωτεΐνης του συμπληρώματος που επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Η ASP προάγει την πρόσληψη λιπαρών οξέων και την σύνθεση TG με το να αυξάνει την δραστικότητα τόσο της LPL όσο και της ακυλοτρανσφεράσης της διακυλογλυκερόλης (diacyloglycerol acyl- transferase, DGAT). Επιπλέον προωθεί την μεταφορά γλυκόζης στα λιποκύτταρα και προάγει την έκκριση ινσουλίνης από τα Β- κύτταρα του παγκρέατος.⁷³

Τα επίπεδα της αδιψίνης μειώνονται σε παχύσαρκα ζώα ενώ στους παχύσαρκους ανθρώπους αυξάνονται ή παραμένουν τα ίδια.⁵⁵ Στις περισσότερες έρευνες που αφορούν τον άνθρωπο, η ASP αυξάνεται στα παχύσαρκα άτομα, όμως δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα αν αυτά τα υψηλά επίπεδα στην κυκλοφορία του αίματος αντιστοιχούν στην αυξημένη δραστικότητα της ASP ή στην αντίσταση των ιστών σ' αυτήν.⁵²

2.6.4. Βισφατίνη και Βασπίνη

Η βισφατίνη (52 kDa) και η βασπίνη (45 kDa), δύο πρόσφατα αναγνωρισμένες λιποκίνες, εκκρίνονται κυρίως από τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό στον άνθρωπο και στο ποντίκι και τα επίπεδα τους στο αίμα αυξάνονται κατά την αύξηση του βάρους του σώματος.^{56, 74} Και οι δύο λιποκίνες επιδρούν στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η βασπίνη παίζει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη του NIDDM, όπως έχει αναφερθεί σε έρευνες σε ποντίκια, ενώ η δράση της στον άνθρωπο δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.⁷⁵ Η βισφατίνη έχει δράσεις παρόμοιες με εκείνες της ινσουλίνης και μπορεί να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα της ινσουλίνης, μειώνοντας την απελευθέρωση της γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα και διεγείροντας την χρησιμοποίηση του υδατάνθρακα από τους περιφερικούς ιστούς.⁷⁶ Η δράση της πιθανότατα πραγματοποιείται με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, παρά με ενδοκρινή, αφού η συγκέντρωση της στο πλάσμα είναι μικρότερη από ότι η συγγένεια που εμφανίζει για τον υποδοχέα της ινσουλίνης.⁶⁸

2.6.5. Ρεζιστίνη

Η ρεζιστίνη, μια πρωτεΐνη 10 kDa, εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα αρουραίων και εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης.⁷⁷ Στους ανθρώπους, αντίθετα με τους αρουραίους, η κύρια πηγή αυτής της λιποκίνης είναι τα μακροφάγα.⁷⁸ Έρευνες σε ποντίκια που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, δείχνουν πως μέσω της σταθεροποίησης των επιπέδων ρεζιστίνης ανακτάται η ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη, ενώ ανάλογες μελέτες στον άνθρωπο εμφανίζουν αντιφατικά αποτελέσματα.⁵⁶

2.6.6. Ελεύθερα λιπαρά οξέα

Τα FFA που ελευθερώνονται από το λιπώδη ιστό αποτελούν την κύρια πηγή των FFA του πλάσματος. Σε παχύσαρκα άτομα εμφανίζονται υψηλά επίπεδα στην κυκλοφορία, γεγονός που οφείλεται στη μεγαλύτερη μάζα του λιπώδους ιστού στον οργανισμό.⁶⁹ Αυτή η αύξηση συνδέεται με την ανάπτυξη αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης στους μυς και στο ήπαρ. Επιπλέον, τα FFA εμπλέκονται στην παθογένεση καρδιοπαθειών, όπως έχουν αναδείξει έρευνες σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα στις οποίες τροφοδοτείται η καρδιά με αυξημένη ποσότητα λιπαρών οξέων.⁶⁸

2.6.7. TNFα και IL-6

Ο λιπώδης ιστός εκφράζει μια μεγάλη ποικιλία κυτοκινών. Ο TNFα και η IL-6 αποτελούν τις πιο σημαντικές αλλά και τις περισσότερο μελετημένες κυτοκίνες που εκκρίνονται από αυτόν.⁷⁹

Ο TNFα είναι μια προφλεγμονώδης λιποκίνη που επάγει την έκφραση και άλλων φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως της λεπτίνης και της IL-6 ενώ παράλληλα παρεμποδίζει την έκφραση και την έκκριση αντιφλεγμονωδών λιποκινών. Σε περιόδους αύξησης του βάρους τα επίπεδα του TNFα αυξάνονται, ενώ παρατηρείται το αντίθετο κατά την απώλεια βάρους.⁶⁹ Ο TNFα παράγεται και εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, ενώ τα λιποκύτταρα εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του, δίνοντας σε αυτή την κυτοκίνη έναν σημαντικό παρακρινή και αυτοκρινή ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών των λιποκυττάρων.⁸⁰ Επίσης, ο TNFα διεγείρει το μεταβολισμό του λυσο- παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet-activating factor, PAF) σε PAF σε λιποκύτταρα και προλιποκύτταρα. Ωστόσο, η απόκριση των δύο τύπων κυττάρων σε αυτή τη διέγερση είναι πολύ διαφορετική. Ενώ, τα βασικά επίπεδα σύνθεσης του PAF είναι ίδια και στους δύο τύπους κυττάρων, η αύξηση της σύνθεσης μετά από διέγερση με TNFα είναι 7 φορές μεγαλύτερη στα ώριμα λιποκύτταρα από ότι στα προλιποκύτταρα.²⁰

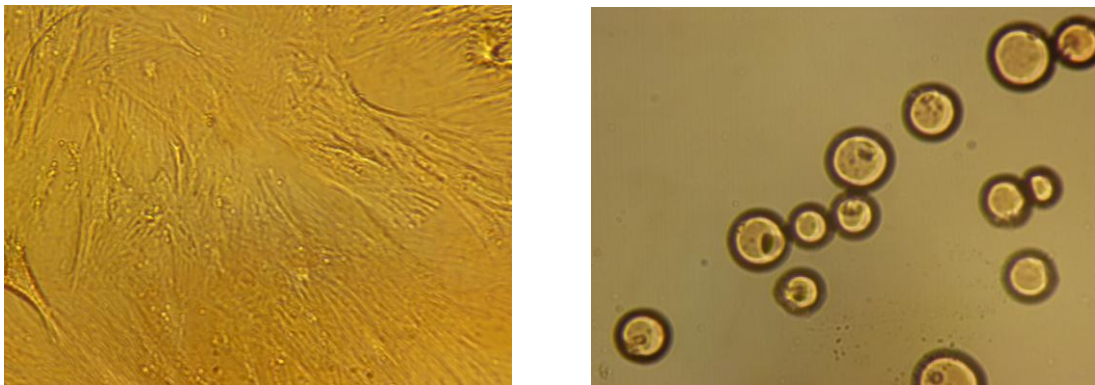
Έρευνες έχουν δείξει πως ο TNFα διεγείρει την λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, ενώ τα αυξημένα επίπεδα του σχετίζονται άμεσα με την αντίσταση στην ινσουλίνη, την υπερινσουλιναιμία και την υπέρταση.^{30, 55, 68}

Η IL-6 είναι μια πρωτεΐνη 26 kDa, η οποία εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό σε υψηλά επίπεδα. Εκτιμάται ότι ο λευκός λιπώδης ιστός συνεισφέρει σχεδόν στο 30% της συνολικής IL-6 του αίματος.^{55, 69} Η αύξηση στην έκφραση της IL-6 από το λιπώδη ιστό καθώς και των επιπέδων της στην κυκλοφορία του αίματος, επηρεάζει την ομοιόσταση της γλυκόζης και οδηγεί σε αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης.³⁰ Επιπλέον, η συγκέντρωση της στο πλάσμα αποτελεί έναν παράγοντα πρόβλεψης για την ανάπτυξη NIDDM και καρδιαγγειακών παθήσεων.⁸¹

3 Διαφοροποίηση των λιποκυττάρων

3.1.Ορισμός διαφοροποίησης

Ως διαφοροποίηση ορίζεται η μετατροπή των αδιαφοροποίητων προλιποκυττάρων, με τη μορφή ινοβλαστών, σε ώριμα, στρογγυλά λιποκύτταρα που περιέχουν τη χαρακτηριστική λιποσταγόνα (σχήμα 4). Τα ιδιαίτερα στάδια αυτής της διαδικασίας καθώς και η χρονική τους διάρκεια και οι παράγοντες που τα επηρεάζουν εξαρτώνται από την ηλικία του οργανισμού και την ανατομική θέση του λιπώδους ιστού. Αν και σε μοριακό επίπεδο τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη πορεία της διαφοροποίησης δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, οι μορφολογικές μεταβολές έχουν εξακριβωθεί χάρη στην εξέλιξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που επιτρέπει παρατηρήσεις και των ενδοκυτταρικών σωματιδίων.⁸²



Σχήμα 4: Φωτογραφίες προλιποκυττάρων και λιποκυττάρων, αντίστοιχα.

3.2.Μοντέλα μελέτης της διαφοροποίησης

Τα λιποκύτταρα προέρχονται από το εμβρυϊκό αρχέγονο κύτταρο, που έχει την ικανότητα να διαφοροποιείται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του μεσοδέρματος και να προκύπτουν, κάτω από ειδικές συνθήκες, εκτός από λιποκύτταρα, και άλλα είδη κυττάρων όπως χονδροβλάστες, οστεοβλάστες και μυοκύτταρα.⁸³ Ο σχηματισμός των λιποκυττάρων ξεκινά από τα μέσα έως τα τέλη της περιόδου κύησης. Μετά την γέννηση πραγματοποιείται ταχέως η εμφάνιση του λευκού λιπώδους ιστού, τόσο με την αύξηση του μεγέθους των υπαρχόντων λιποκυττάρων όσο και με τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων προλιποκυττάρων. Κατά την διάρκεια της ζωής του ατόμου, νέα λιποκύτταρα μπορούν να σχηματιστούν ως συνέπεια των περιβαλλοντικών παραγόντων και ιδιαίτερα των συνθηκών διατροφής.⁸⁴

Η γνώση που έχουμε για τους μοριακούς μηχανισμούς και τις πορείες μεταγωγής σήματος κατά την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα προέρχεται κυρίως από *in vitro*

μελέτη. Η *in vivo* μελέτη της διαφοροποίησης αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία. Μόλις το 1/3 των κυττάρων που αποτελούν το λιπώδη ιστό είναι λιποκύτταρα ενώ τα υπόλοιπα 2/3 περιλαμβάνουν μικρά αιμοφόρα αγγεία, νευρικό ιστό, ινοβλάστες και προλιποκύτταρα σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Η δύσκολη διάκριση των προλιποκυττάρων από τους ινοβλάστες και η μη δυνατότητα να ευθυγραμμιστούν τα προλιποκύτταρα σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης, καθιστούν τις *in vivo* μελέτες ακατάλληλες να παρέχουν πληροφορίες για τον μηχανισμό της διαφοροποίησης.⁸⁵ Επιπλέον, τα *in vitro* διαφοροποιημένα λιποκύτταρα έχουν παρόμοια μορφολογία και λειτουργία με τα *in vivo* διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. Μάλιστα σε μελέτες εμφύτευσης κυτταρικών σειρών σε ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη λιπώδους ιστού από τα κύτταρα αυτά, γεγονός που αναδεικνύει τις κυτταρικές σειρές ως πολύτιμο εργαλείο για την μελέτη της διαφοροποίησης.⁸³

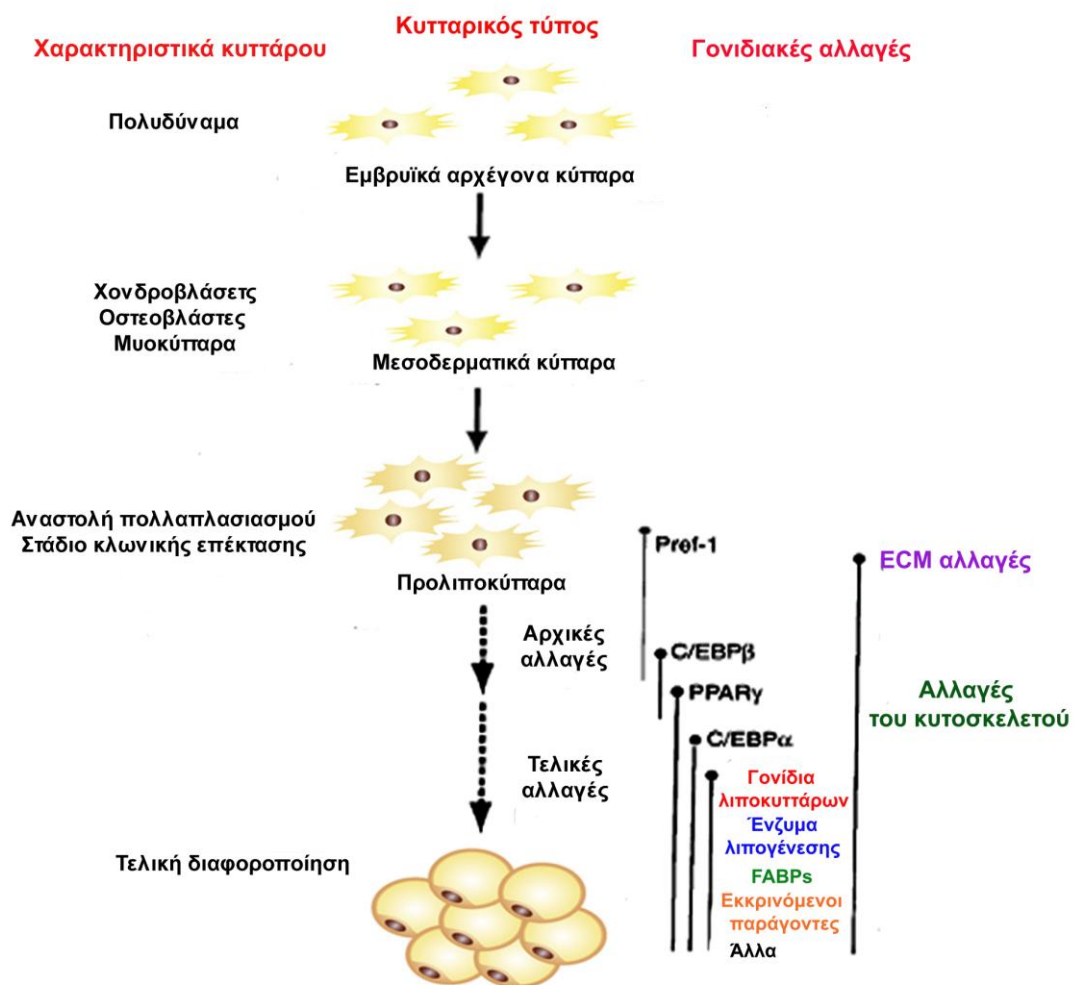
Στις *in vitro* μελέτες, το πειραματικό εργαλείο για την κατανόηση της πορείας της διαφοροποίησης είναι κυρίως οι κυτταρικές σειρές προλιποκυττάρων. Αν και οι πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αποτελούν χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την διαφοροποίηση και τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων, η χρήση τους περιορίζεται λόγω της μικρής ικανότητας πολλαπλασιασμού τους και της μείωσης της τάσης για διαφοροποίηση ύστερα από συνεχείς ανακαλλιέργειες.⁸⁴ Επίσης, η ικανότητα διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων εξαρτάται από την ηλικία του πειραματόζωου καθώς και από τον τύπο του λιπώδους ιστού. Προλιποκύτταρα που έχουν απομονωθεί από τον υποδόριο λιπώδη ιστό έχουν μεγαλύτερη τάση για διαφοροποίηση, συγκριτικά με αυτά του κοιλιακού λιπώδους ιστού,⁹ ενώ μεγαλύτερη τάση για διαφοροποίηση χαρακτηρίζει προλιποκύτταρα πειραματόζων μικρότερης ηλικίας, συγκριτικά με αυτά που προέρχονται από πειραματόζωα μεγαλύτερης ηλικίας.⁸⁶

Κυρίως χρησιμοποιούνται δύο τύποι κυτταρικών σειρών: (α) σειρές πολυδύναμων κυττάρων που έχουν την δυνατότητα να μετατρέπονται σε διάφορα είδη κυττάρων και (β) κυτταρικές σειρές προλιποκυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε λιποκύτταρα.⁸⁷ Οι κύριοι αντιπρόσωποι του πρώτου τύπου είναι οι κυτταρικές σειρές 3T3 και C3H10T1/2, που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, όταν επωαστούν με ένα αναστολέα της μεθυλίωσης του DNA, όπως η 5-αζακυτιδίνη.⁸⁸ Οι κυτταρικές σειρές 3T3-L1, 3T3-F442A, 1246, TA1, 30A5 και Ob1771 ανήκουν στο δεύτερο τύπο και μπορούν είτε να παραμείνουν ως προλιποκύτταρα είτε να μετατραπούν σε λιποκύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές 3T3-L1 και 3T3-F442A έχουν απομονωθεί από έμβρυα ποντικών Swiss, 17 έως 19 ημερών, και αποτελούν τις πιο χρησιμοποιούμενες σειρές. Τα 3T3-C2 προέρχονται από την ίδια πηγή αλλά δεν είναι προλιποκύτταρα. Δεν διαφοροποιούνται αλλά χρησιμοποιούνται για σύγκριση με κύτταρα που είναι ικανά να διαφοροποιηθούν. Τα

προλιποκύτταρα Ob1771 προέρχονται από τον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό γενετικά παχύσαρκων ενήλικων ποντικών και χρησιμοποιούνται κυρίως για την μελέτη της διαφοροποίησης στη γενετική παχυσαρκία.^{83, 85}

3.3.Στάδια της διαφοροποίησης

Τα προλιποκύτταρα, που διατηρούν την ιδιότητά τους να πολλαπλασιάζονται, πρέπει να αποσυρθούν από τον κυτταρικό κύκλο πριν την μετατροπή τους σε λιποκύτταρα. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης πραγματοποιούνται αλλαγές στην έκφραση αρκετών γονιδίων ώστε τελικά να αποκτηθεί ο φαινότυπος των λιποκυττάρων. Αυτές συμπίπτουν με την εμφάνιση πρώιμων, ενδιάμεσων και τελικών πρωτεϊνών-δεικτών, με την έκφραση τμημάτων mRNA, καθώς και τη συσσώρευση TG. Αυτές οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα, κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο, ωστόσο μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις συμβαίνουν για κάποιες πρωτεΐνες. Παράλληλα με την ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων, παρατηρείται η καταστολή γονιδίων που είτε δρουν ανασταλτικά είτε είναι περιττά για τη λειτουργία των λιποκυττάρων (σχήμα 5).⁸³



Σχήμα 5: Απλοποιημένο σχήμα που απεικονίζει τη προέλευση των λιποκυττάρων και τα στάδια της διαφοροποίησής τους προς λιποκύτταρα.⁸³

Στα παρακάτω υποκεφάλαια, θα επιχειρηθεί να ερμηνευτούν οι λειτουργικές μεταβολές που συντελούνται κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης τόσο σε γονιδιακό όσο και σε μορφολογικό επίπεδο.

3.3.1. Στάδιο αναστολής του πολλαπλασιασμού

Η διαφοροποίηση για να πραγματοποιηθεί φαίνεται ότι απαιτεί την αναστολή του πολλαπλασιασμού και όχι την συμβολή των κυττάρων ή την επαφή κυττάρου-κυττάρου αυτή καθ' αυτή. Αντίθετα απ' ότι συμβαίνει στις πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου, μελέτες σε κυτταρικές σειρές 3T3^{83, 87} αλλά και σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων προλιποκυττάρων⁸⁹ δείχνουν πως αν και η συμβολή οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού, η επαφή κυττάρου-κυττάρου δεν είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση. Έτσι σε καλλιέργειες όπου η πυκνότητα προλιποκυττάρων είναι χαμηλή, δηλαδή δεν υπάρχει η επαφή κυττάρου-κυττάρου, η διαδικασία της διαφοροποίησης προχωρά κανονικά.

Δυο μεταγραφικοί παράγοντες, η ενισχυτική πρωτεΐνη-α σύνδεσης σε CCAAT (CCAAT/Enhancer Binding Protein-α, C/EBPα) και ο και ο υποδοχέας-γ που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωμάτων (Peroxisomal Proliferator Activator Receptor-γ, PPARγ) εμφανίζονται να έχουν αντιμιτωτική δράση. Αν και η έκφρασή τους αυξάνεται εντυπωσιακά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, το μικρό επίπεδο έκφρασης αυτών των παραγόντων στα προλιποκύτταρα ίσως είναι απαραίτητο για να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό που προηγείται της διαφοροποίησης.^{83, 87}

Έρευνες, ωστόσο, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε θυμιδίνη επισημασμένη με τρίτιο με σκοπό να παρακολουθηθεί ο ρυθμός και η ικανότητα σύνθεσης DNA, αποκάλυψαν ότι το πρώτο βήμα της διαφοροποίησης συνοδεύεται από αύξηση της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας που μειώνεται ξανά μόνο όταν τα κύτταρα έχουν ενσωματώσει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Οι ίδιοι ερευνητές, διατυπώνουν επιφυλάξεις αν οι ενδείξεις που λαμβάνουν στα πειράματά τους αντικατοπτρίζουν κυτταρική διαίρεση ή αντιγραφική τμημάτων του DNA, λόγω της έναρξης της διαφοροποίησης.⁹⁰

3.3.2. Στάδιο κλωνικής επέκτασης

Μετά την αναστολή του πολλαπλασιασμού, όταν τα προλιποκύτταρα φτάσουν στη συμβολή, πρέπει να λάβουν ένα κατάλληλο συνδυασμό από μιτογονικά και λιπογενετικά σήματα ώστε να συνεχιστεί η διαφοροποίηση. Μελέτες δείχνουν ότι τα προλιποκύτταρα κυτταρικών σειρών που έχουν υποστεί αναστολή πολλαπλασιασμού, υφίστανται μια ακόμη μίτωση, οπότε ενισχύονται οι κλώνοι των κυττάρων στους οποίους έχει ξεκινήσει η πορεία της διαφοροποίησης (clonal expansion of committed cells).⁸³ Ωστόσο, σε προλιποκύτταρα από

ανθρώπινο λιπώδη ιστό δεν απαιτείται η διαίρεση κυττάρων για να αρχίσουν να διαφοροποιούνται ίσως γιατί έχουν υποστεί την απαιτούμενη κλωνική επέκταση *in vivo*.

Η αντιγραφή του DNA και οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης που παρατηρούνται κατά την διάρκεια της κλωνικής επέκτασης, θεωρείται πως αυξάνουν την προσβασιμότητα διαφόρων παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για τον φαινότυπο των λιποκυττάρων.⁸⁷ Οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην κλωνική επέκταση είναι οι C/EBPα και PPARγ και ένα μέλος της οικογένειας των bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) μεταγραφικών παραγόντων, ο ADD1/SREBP-1c (adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c). Η δράση των παραγόντων αυτών είναι συνεργιστική, αφού η ενεργοποίηση του PPARγ πιθανόν να οφείλεται στην επαγωγή της σύνθεσης λιπαρών οξέων από τον ADD1/SREBP-1c.⁸³

Πολλές μελέτες δείχνουν πως το στάδιο της κλωνικής επέκτασης είναι προαπαιτούμενο για την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων. Συγκεκριμένα, όταν παρεμποδίζεται η κλωνική επέκταση με χρήση ουσιών όπως ραπαμυκίνης, αφιδικολίνης ή ροσκοβιτίνης ταυτόχρονα εμποδίζεται και η διαφοροποίηση. Επιπλέον σε πειράματα όπου διαταράχθηκε η σηματοδότηση της C/EBPβ, διαταράχθηκε και η κλωνική επέκταση.⁸⁷ Φαίνεται λοιπόν πως υπάρχουν δυο διαφορετικοί τρόποι ρύθμισης του κύκλου του κυττάρου, ο ένας αφορά τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου πριν τη συμβολή και ο άλλος την κλωνική επέκταση μετά την συμβολή που υποκινείται ορμονικά.^{83, 91}

3.3.3. Αρχικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η κλωνική επέκταση συνοδεύονται από πολύπλοκες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με το είδος της κυτταρικής καλλιέργειας και με τα ειδικά για την διαφοροποίηση πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται.

Η έκφραση του mRNA της LPL, είναι ένα αρχικό σήμα της διαφοροποίησης. Η LPL εκκρίνεται από ώριμα λιποκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της συσσώρευσης λιπιδίων. Ωστόσο η LPL εκφράζεται αυθόρμητα κατά την συμβολή και αυτό είναι ανεξάρτητο από τους παράγοντες που χρειάζονται για την διαφοροποίηση. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η έκφραση της μπορεί να απεικονίσει το στάδιο της αναστολής του πολλαπλασιασμού αλλά όχι ένα αρχικό στάδιο της διαφοροποίησης. Η LPL δεν είναι ειδική για τα λιποκύτταρα γιατί εκφράζεται και σε άλλους τύπους κυττάρων όπως στα μακροφάγα και στα κύτταρα του μυοκαρδίου. Επειδή η έκφραση της δεν είναι ειδική για τα λιποκύτταρα και είναι ανεξάρτητη από την προσθήκη διαφοροποιητικών παραγόντων, αποφεύγεται να χαρακτηριστεί ως δείκτης διαφοροποίησης.

Τουλάχιστον δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, οι PPAR και C/EBP, εκφράζονται πρόωρα κατά την διαφοροποίηση. Ο PPAR γ είναι κατά κύριο λόγο ειδικός στα λιποκύτταρα και εκφράζεται σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα στα προλιποκύτταρα. Η έκφρασή του αυξάνεται γρήγορα μετά από ορμονική επαγωγή της διαφοροποίησης.

Μια παροδική αύξηση της έκφρασης των C/EBP- β και C/EBP- δ προηγείται αυτής του PPAR γ .⁷⁷ Το γεγονός ότι στα 3T3-L1 τα επίπεδα των C/EBP- β και C/EBP- δ αυξάνονται με τα αντιδραστήρια μεθυλοϊσοβουτυλοξανθίνη (isobutylo methyl-xanthine, IBMX) και δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, Dex) αντίστοιχα, έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες εκμαιεύουν το επιθυμητό αποτέλεσμα από τα δυο αντιδραστήρια κατά την έναρξη της διαφοροποίησης. Η δράση των ισομορφών και των δυο οικογενειών των μεταγραφικών αυτών παραγόντων θα αναλυθεί σε επόμενο υποκεφάλαιο.

Στην έκφραση γονιδίων λιποκυττάρων πιθανώς συμμετέχει και ο παράγοντας ADD1/SREBP-1c μέσω της ενεργοποίησης του PPAR γ . Η θετική επίδραση αυτών στη διαφοροποίηση, παρεμποδίζεται από την υπερβολική έκφραση των Id, ομάδα πυρηνικών πρωτεϊνών, που διαθέτουν δομή τύπου έλικα-θηλειά-έλικα και συναγωνίζονται με τις bHLH για το σχηματισμό διμερών με άλλους παράγοντες. Η μείωση των Id3 θεωρείται ειδικό χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης, καθώς η έκφρασή τους ελαττώνεται αμέσως μετά την κατάσταση συμβολής.

Στη διατήρηση του φαινοτύπου των προλιποκυττάρων φαίνεται ότι αναμιγνύεται ο παράγοντας προλιποκυττάρων-1 (preadipocyte factor-1, pref-1). Αυτός εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα στα προλιποκύτταρα ενώ δεν είναι ανιχνεύσιμος στα ώριμα λιποκύτταρα. Κατά την διαφοροποίηση παρατηρείται μια δραματική μείωση της έκφρασης του και είναι το μόνο γνωστό γονίδιο του οποίου η έκφραση καταστέλλεται εντελώς κατά τη διαδικασία αυτή.^{92, 93}

Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης το σχήμα του κυττάρου μεταπίπτει από αστεροειδές (χαρακτηριστικό σχήμα των ινοβλαστών) σε σφαιρικό σχήμα, φαινόμενο που αντικατοπτρίζει τις μεταβολές σε συστατικά του κυτοσκελετού και της εξωκυττάριας ύλης (ExtraCellular Matrix, ECM). Πολλές μελέτες δείχνουν πως είναι πιθανόν οι αλλαγές αυτές να μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και την δράση των PPAR και/ή των C/EBP κατά την διαφοροποίηση αφού προηγούνται αυτών. Μια πρώιμη εκδήλωση της διαφοροποίησης είναι η μείωση της έκφρασης της τουμπουλίνης που προηγείται από τις αλλαγές στη μορφολογία και στην έκφραση των ειδικών γονιδίων. Αυτές οι αλλαγές στο σχήμα του κυττάρου αποτελούν μια διακριτή διαδικασία της διαφοροποίησης και δεν είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης λιπιδίων.⁸³

Μια αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου είναι επίσης ένα αρχικό γεγονός της διαφοροποίησης. Τα επίπεδα του mRNA του προκολλαγόνου τύπου I και III που εκφράζεται στους ινοβλάστες μειώνεται κατά 80-90 % κατά την εξέλιξη της διαφοροποίησης των 3T3-L1

ενώ η έκκριση του κολλαγόνου τύπου IV αυξάνεται. Ακόμα, η ποσότητα της περικυτταρικής φιβρονεκτίνης, που συμμετέχει στην κυτταρική συγκόλληση, καθώς και η κυτταρική σύνθεσή της μειώνεται στο 1/4 με 1/5 κατά τη διαφοροποίηση.^{83, 94}

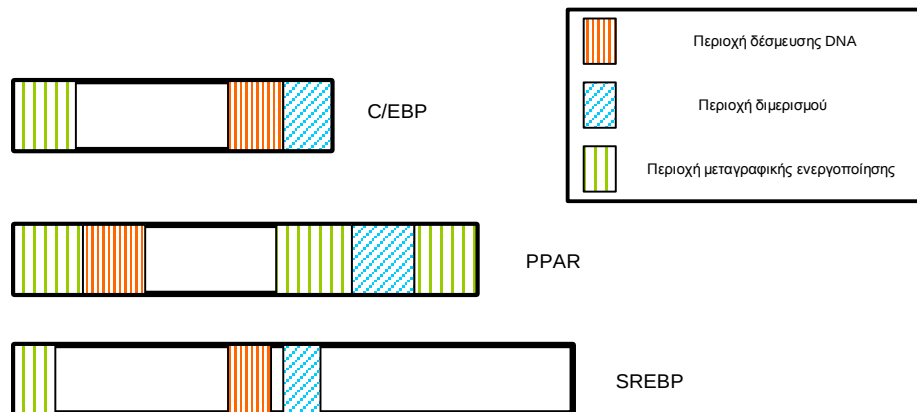
3.3.4. Τελικά γεγονότα κατά τη διαφοροποίηση

Κατά την τελική φάση της διαφοροποίησης τα λιποκύτταρα αυξάνουν εμφανώς την διαδικασία της λιπογένεσης και αποκτούν ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η δραστηριότητα και τα επίπεδα του mRNA ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των TG αυξάνονται από 10 έως 100 φορές. Με βάση το γεγονός αυτό, μετά τη συμβολή το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά τους.⁹⁵ Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση των ουδέτερων λιπιδίων ενώ το ποσό των πολικών λιπιδίων παρέμεινε σταθερό. Αύξηση παρατηρείται στη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της 6-φωσφογλυκόζης (glucose phosphate dehydrogenase, G6PDH), ενός ενζύμου που καταλύει το πρώτο στάδιο της πορείας των φωσφορικών πεντοζών, κατά το οποίο παράγεται NADPH απαραίτητο στη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Επίσης, η εντυπωσιακή αύξηση στη δραστηριότητα της ACS και της ακυλοτρανσφεράσης των διγλυκεριδίων (diglyceride acyltransferase, DGAT) δικαιολογείται από την επαγόμενη αύξηση της συσσώρευσης των TG στα κύτταρα. Εκτός από την αύξηση του mRNA πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με το μεταβολισμό των λιπιδίων, τα λιποκύτταρα συνθέτουν προϊόντα ειδικά για το λιπώδη ιστό. Σε αυτά περιλαμβάνονται η αP2, μια πρωτεΐνη πρόσδεσης λιπαρών οξέων (adipocyte lipid binding protein, ALBP), ο μεταφορέας λιπαρών οξέων FAT/CD36 και περιλιπίνες, πρωτεΐνες που συνδέονται με τη λιποσταγόνα.

Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης αυξάνονται οι μεταφορείς γλυκόζης (glucose transporter, GLUT), ο αριθμός των υποδοχέων ινσουλίνης καθώς και η ευαισθησία στην ορμόνη αυτή. Επιπλέον, παρατηρείται απώλεια των β_1 αδρενεργικών υποδοχέων (adrenergic receptors, AR) και αύξηση των υποκατηγοριών β_2 και β_3 γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του συνολικού αριθμού των αδρενεργικών υποδοχέων. Τα επίπεδα λεπτίνης επίσης αυξάνονται κατά την *in vitro* διαφοροποίηση αν και είναι πολύ πιο χαμηλά από αυτά των λιποκυττάρων. Επίσης, τα λιποκύτταρα εκκρίνουν διάφορες ουσίες όπως αγγειοτενσίνη II, προϊόν της διάσπασης του αγγειοτενσινογόνου που εμπλέκεται στη διέγερση της παραγωγής της προστακυκλίνης από ώριμα λιποκύτταρα προωθώντας τη διαφοροποίηση μέσω παρακρινικού/ αυτοκρινικού μηχανισμού.^{83, 96}

3.4. Ρύθμιση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διαφοροποίηση

Κατόπιν επώασης των προλιποκυττάρων με μίγμα από παράγοντες που επάγουν την διαφοροποίηση, τα κύτταρα εισάγονται εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο (σχεδόν ταυτόχρονα) και ξεκινούν να εκφράζουν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που τελικά θα προάγουν τον φαινότυπο των λιποκυττάρων. Παρακάτω θα αναφερθεί ο ρόλος και ο τρόπος ενεργοποίησης των κυριότερων μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν τη λιπογένεση (σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σχηματική παρουσίαση των δομών των τριών πιο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων.

3.4.1. Οικογένεια C/EBP

Η C/EBPα, η πρώτη πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας που αναγνωρίστηκε, απομονώθηκε από ήπαρ αρουραίου και χαρακτηρίστηκε από την ιδιότητα της να δεσμεύεται σε μοτίβα CCAAT τα οποία βρίσκονται σε διάφορους προαγωγείς γονιδίων. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί και κλωνοποιηθεί πέντε ακόμα ισομορφές των C/EBP: C/EBPβ, C/EBPγ, C/EBPδ, C/EBPε και C/EBPζ (CHOP10). Αυτές οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν και επηρεάζουν πολλές λειτουργίες του κυττάρου, σε ποικιλία ιστών, όπως την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ανοσοποίηση. Συγκεκριμένα στην πορεία της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν οι ισομορφές C/EBPα, β, δ καθώς και η CHOP10.⁸⁴

Όλα τα μέλη της οικογένειας C/EBP περιλαμβάνουν μια περιοχή ενεργοποίησης, μια βασική περιοχή δέσμευσης με το DNA και μια περιοχή διμερισμού πλούσια σε λευκίνη. Οι δύο τελευταίες καλά διατηρημένες περιοχές βρίσκονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο και αναφέρονται στην ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύεται στο DNA και να σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειας C/EBP, αντίστοιχα. Ο διμερισμός αποτελεί βασική προϋπόθεση για την δέσμευση του μορίου στο DNA. Η CHOP10 περιέχει μια μη λειτουργική

περιοχή δέσμευσης με το DNA και έτσι ο ετεροδιμερισμός με αυτήν την ισομορφή λειτουργεί ανασταλτικά στη λειτουργία των C/EBP.

Οι C/EBPα και β μπορούν να παραχθούν σε διάφορες μορφές στις οποίες απουσιάζουν τμήματα της αμινο-τελικής περιοχής είτε λόγω εναλλακτικής ματίσματος είτε λόγω ελεγχόμενης πρωτεόλυσης. Από το mRNA της C/EBPα λαμβάνονται δύο πρωτεΐνες 42 και 30 kDa. Η πρωτεΐνη των 30 kDa είναι λιγότερο ισχυρός ενεργοποιητής από εκείνη των 42 kDa και στερείται αντιμιτωτικής δραστηριότητας. Το mRNA της C/EBPβ μεταφράζεται σε τουλάχιστον τρεις ισομορφές, μια πλήρη πρωτεΐνη 38 kDa, μια 35 kDa (LAP) και μια 20 kDa (LIP). Η LIP πρωτεΐνη δεν περιέχει την αμινο-τελική περιοχή ενεργοποίησης και πιθανότατα λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής, που επάγεται από τις C/EBP.⁸⁸

C/EBPβ και C/EBPδ

Οι πρωτεΐνες C/EBPβ και δ ανήκουν στους αρχικούς ρυθμιστές της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Η έκφραση αυτών των ισομορφών επάγεται ταχέως και τα μέγιστα πρωτεϊνικά τους επίπεδα εντοπίζονται μέσα σε τέσσερις ώρες από την επαγωγή της διαφοροποίησης. Η αναγκαιότητα τους στη διαφοροποίηση είναι φανερή από μελέτες σε προλιποκύτταρα 3T3-L1, όπου η υπερέκφραση και των δύο πρωτεϊνών επιταχύνει τη λιπογένεση. Η εκτοπική έκφραση του C/EBPβ αλλά όχι του C/EBPδ, μπορεί να προωθήσει την διαφοροποίηση απουσία ορμονικών επαγωγέων. Αν και οι δύο ισομορφές εκφράζονται αμέσως μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης είναι πολύ αργότερα «ικανές» να δεσμευτούν στο DNA. Την ιδιότητα αυτή την αποκτούν ανάμεσα στις 12 με 16 ώρες, ενώ τα κύτταρα εισέρχονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, την κλωνική επέκταση. Η δέσμευση τους στο DNA γίνεται στα κεντρομερή μέσω των C/EBP θέσεων δέσμευσης στο κεντρομερικό δορυφορικό DNA.⁸⁷

Ενώ η έκφραση του C/EBPβ σε κυτταρικές καλλιέργειες είναι αναγκαία για την διαφοροποίηση, έχει παρατηρηθεί σε ποντίκια C/EBPβ (-/-) φυσιολογική ανάπτυξη του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού. Προφανώς η λειτουργία του C/EBPβ δεν είναι απαραίτητη κατά την *in vivo* διαφοροποίηση. Παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται σε μελέτες με ποντίκια C/EBPδ (-/-). Ωστόσο, και στα δύο είδη μεταλλαγμένων ποντικών, η μάζα επιδιδυμικού λιπώδους ιστού μειώθηκε αισθητά σε σύγκριση με εκείνη των ποντικών αγρίου τύπου, αν και τα λιποκύτταρα τους ήταν φυσιολογικά τόσο σε μέγεθος όσο και σε μορφολογία. Έτσι η μείωση της μάζας του λιπώδους ιστού πιθανότατα οφείλεται στη μείωση του αριθμού των κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία του C/EBPβ και δ επηρεάζει την αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων.⁹⁷

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του C/EBPβ ελέγχεται από την πρωτεΐνη CREB (cAMP response element -binding protein), η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται σε ειδικές cAMP

αλληλουχίες (cAMP response elements, CRE). Η C/EBPβ περιέχει δύο τέτοιες αλληλουχίες στον προαγωγέα της και είναι απαραίτητες για την μεταγραφική της ενεργοποίηση. Η CREB εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης, σε φωσφορυλιωμένη μορφή, και το γεγονός αυτό αναδεικνύει πως η φωσφορυλίωση της CREB και επομένως η ενεργοποίησή της σχετίζεται με την έκφραση της C/EBPβ. Από πειράματα σε προλιποκύτταρα 3T3-L1 φαίνεται πως η φωσφο-CREB δεσμεύεται στον προαγωγέα της C/EBPβ μόλις μια ώρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Επιπλέον, σε ποντικούς CREB(-/-) η έκφραση της C/EBPβ και η συσσώρευση TG μειώθηκαν αισθητά. Η φωσφορυλίωση της CREB είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται από το cAMP και από την ινσουλίνη, δύο επαγωγείς της διαφοροποίησης.^{84, 87} Γονιδιακή αποσιώπηση της CREB έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης σε 3T3-L1 προλιποκυττάρων ακόμα και μετά από εκτοπική έκφραση των C/EBPα ή C/EBPβ ή PPARγ2.⁹⁸

Η κλωνική επέκταση εξαρτάται από την C/EBPβ, καθώς αυτό το στάδιο παρεμποδίζεται σε ποντικούς C/EBPβ (-/-). Επιπλέον στοιχεία που στηρίζουν το ρόλο της C/EBPβ στην κλωνική επέκταση προκύπτουν από την χρήση της A-C/EBP. Η A-C/EBP είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει την περιοχή διμερισμού των C/EBP αλλά απουσιάζουν από αυτή η λειτουργική περιοχή δέσμευσης με το DNA και οι περιοχές ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα να δρα ως αρνητικός παράγοντας για την λειτουργία των C/EBP πρωτεϊνών. Σε προλιποκύτταρα 3T3-L1, η έκφραση της A-C/EBP διαταράσσει τόσο την κλωνική επέκταση όσο και την διαφοροποίηση. Η εξέταση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου κατά την διάρκεια της κλωνικής επέκτασης έδειξε ότι η αποικοδόμηση της p27 παρεμποδίζεται από την A-C/EBP. Η αποικοδόμηση της p27 είναι απαραίτητη για τα κύτταρα ώστε να προχωρήσουν στην κλωνική επέκταση. Επιπλέον η A-C/EBP παρεμποδίζει την είσοδο της C/EBPβ στον πυρήνα, όπως έχει παρατηρηθεί σε πειράματα ανοσοφθορισμού. Πιθανόν η A-C/EBP ετεροδιμερίζεται με την C/EBPβ και σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με μία ελικοειδή προέκταση που επικαλύπτει το σήμα πυρηνικής δέσμευσης.^{99, 100}

Αρκετές κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν την C/EBPβ, όπως η πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA), η πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC), οι MAPK, η cdk2 και η GSK-3. Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση της C/EBPβ κατά την οποία η πρωτεΐνη αποκτά την βασική λειτουργία δέσμευσης στο DNA, τη στιγμή που το κύτταρο εξέρχεται από την φάση S της κλωνικής επέκτασης. Η C/EBPβ φωσφορυλιώνεται διαδοχικά, πρώτα από τις MAPK και πολύ αργότερα από την GSK-3β. Η φωσφορυλίωση της C/EBPβ στην Thr188 από μια MAPK λαμβάνει χώρα μέσα στις τέσσερις πρώτες ώρες από την επαγωγή της διαφοροποίησης και είναι απαραίτητη για το στάδιο της

κλωνικής επέκτασης, την ενεργοποίηση της περιοχής δέσμευσης με το DNA και την τελική διαφοροποίηση.^{87, 101}

C/EBPα

Η C/EBPα αποτελεί ένα πλειοτροπικό μεταγραφικό παράγοντα των γονιδίων που σχετίζονται με τον φαινότυπο των λιποκυττάρων. Οι προαγωγείς αυτών των γονιδίων περιέχουν την ρυθμιστική αλληλουχία των C/EBP και ενεργοποιούνται κυρίως από τον C/EBPα. Σε προλιποκύτταρα 3T3-L1, η υπερέκφραση αυτής της ισομορφής επάγει τη λιπογένεση απουσία οποιουδήποτε ορμονικού επαγωγέα. Επιπλέον η παρεμπόδιση της έκφρασης της C/EBPα εμποδίζει την διαφοροποίηση. Επιπροσθέτως, ποντικοί C/EBPα (-/-) παρουσιάζουν ελαττωματική συσσώρευση λιπιδίων. Αυτές οι παρατηρήσεις στοιχειοθετούν την αναγκαιότητα της C/EBPα στη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων.^{88,102}

Αρχικά η C/EBPα ενεργοποιείται μεταγραφικά από τις C/EBPβ και δ, μέσω της ρυθμιστικής αλληλουχίας C/EBP στον προαγωγέα της. Από την στιγμή που η C/EBPα εκφράζεται, φαίνεται πως διατηρείται η έκφραση της μέσω αυτοενεργοποίησης. Η C/EBPα ενεργοποιεί την δέσμευση USF (upstream stimulatory factor) σε μια ειδική αλληλουχία στον προαγωγέα της και με αυτόν τον τρόπο αυτοενεργοποιείται η έκφραση της. Ο αυστηρός έλεγχος της μεταγραφής της C/EBPα συμβαίνει κυρίως γιατί εμφανίζει αντιμιτωτική δράση και η έκφραση της στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης μπορεί να αποτρέψει τα προλιποκύτταρα από το στάδιο της κλωνικής επέκτασης, που είναι απαραίτητο για να επακολουθήσει η διαφοροποίηση. Συνεπώς, η έκφραση της C/EBPα πρέπει να κατασταλεί ως την κατάλληλη χρονική στιγμή. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που καθυστερούν την έκφραση της, όπως η δέσμευση της ισομορφής AP-2α (activator protein-2α) και της Sp1 στον προαγωγέα της, καθώς και η καθυστέρηση της ιδιότητας των C/EBPβ και δ να δεσμεύονται στο DNA.^{103, 104}

Η φωσφορυλίωση της C/EBPα πραγματοποιείται σε τρεις θέσεις σε προλιποκύτταρα 3T3-L1. Οι δύο από αυτές τις θέσεις, Thr222 και Thr226, είναι ευαίσθητες στην ινσουλίνη και φωσφορυλιώνονται από την GSK-3. Η τρίτη θέση, Ser230, φωσφορυλιώνεται από μια κινάση που δεν έχει αναγνωριστεί ακόμα.¹⁰⁵

CHOP-10

Η CHOP-10 αρχικά βρέθηκε σε κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ και αργότερα κλωνοποιήθηκε από μια βιβλιοθήκη γονιδίων λιποκυττάρων 3T3-L1 λόγω της ιδιότητας της να αλληλεπιδρά με την περιοχή διμερισμού των C/EBP πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη αυτή αν και αποτελεί μέλος της οικογένειας των C/EBP πρωτεϊνών, εμφανίζει μια μοναδικότητα. Τα κατάλοιπα προλίνης και γλυκίνης στην περιοχή δέσμευσης με το DNA δεν επιτρέπουν στην

πρωτεΐνη να δεσμευτεί στο DNA αλλά από την άλλη δεν αλλάζουν την ικανότητα της να σχηματίζει ετεροδιμερή. Για αυτό το λόγο η CHOP-10 λειτουργεί ως αρνητικός παράγοντας για την δράση των C/EBP πρωτεϊνών. Όντως, η εκτοπική έκφραση της CHOP-10 σε προλιποκύτταρα 3T3-L1 παρεμποδίζει τη λιπογένεση. Η CHOP-10 εκφράζεται στα προλιποκύτταρα στο στάδιο της αναστολής του πολλαπλασιασμού και η έκφραση της μειώνεται κατά την τοποθέτηση της C/EBPβ στα κεντρομερή. Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης, η CHOP-10 ετεροδιμερίζεται με την C/EBPβ και αποτρέπει την δέσμευση της τελευταίας στο DNA, στις περιοχές δέσμευσης της C/EBP. Φαίνεται πως η αλληλεπίδραση της CHOP-10 με την C/EBPβ παρέχει έναν επιπλέον μηχανισμό ασφαλείας που αποτρέπει την C/EBPβ να αποκτήσει ενεργοποιημένη περιοχή δέσμευσης με το DNA έως ότου τα προλιποκύτταρα προχωρήσουν στο στάδιο της κλωνικής επέκτασης.^{87,106}

3.4.2. Οικογένεια PPAR

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές των υπεροξυσωμάτων (Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor, PPAR) είναι μέλη της οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος, τους υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών και τους υποδοχείς της βιταμίνης D₃. Όπως και οι περισσότεροι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς, οι PPAR ενεργοποιούνται μέσω της πρόσδεσής τους με κάποιον αγωνιστή και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Ο πρώτος PPAR που ανακαλύφθηκε, ο PPARα, κλωνοποιήθηκε ως ο υποδοχέας που ενεργοποιείται από την φαρμακευτική ουσία clofibrate, η οποία χρησιμοποιείται για την μείωση των λιπιδίων στο αίμα και επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωμάτων στα τρωκτικά. Από την ανακάλυψη του και μετά, έχουν αναγνωριστεί δύο ακόμα μέλη, ο PPARγ και ο PPARδ. Οι τελευταίοι δύο υποδοχείς, αντίθετα με τον PPARα, δεν επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων.^{107,108}

Η δυνατότητα διαφόρων χημικών μορίων να ενεργοποιούν τους PPAR εξαρτάται από την κάθε ισομορφή ενώ η έκφρασή τους ποικίλει ανάλογα με τον ιστό.¹⁰⁹ Ο PPARα εκφράζεται έντονα στο ήπαρ, την καρδιά, τους νεφρούς, τους σκελετικούς μυς και το φαιό λιπώδη ιστό καθώς και στα κύτταρα του εντερικού σωλήνα,¹¹⁰ το θύμο αδένα και τους όρχεις.¹¹¹ Η γ ισομορφή εντοπίζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό ενώ η έκφρασή της παρατηρείται και στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος,¹⁰⁹ το παχύ έντερο, στο ήπαρ και τον σπλήνα. Σε αντίθεση με τις παραπάνω ισομορφές, ο PPARδ είναι πανταχού παρών.¹¹⁰ Η κατανομή αυτή των PPAR στους διάφορους ιστούς αντικατοπτρίζει το διαφορετικό βιολογικό ρόλο των ισομορφών αυτών. Πιο συγκεκριμένα ο PPARα δεσπόζει στο μεταβολισμό των λιπαρών υλών στο ήπαρ ενώ καίρια είναι η δράση του PPARγ στην ανοσολογική απόκριση και τη λιπογένεση.¹⁰⁹

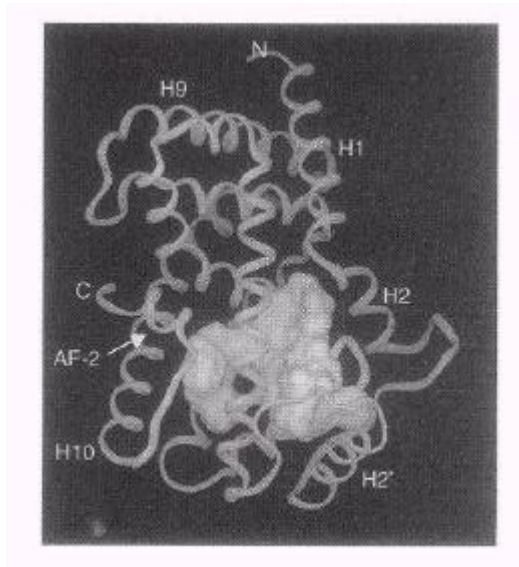
Τα μέλη της οικογένειας PPAR περιέχουν μια περιοχή δέσμευσης με το DNA που περιλαμβάνει δυο πολύ καλά διατηρημένα δάκτυλα Zn, ενώ η περιοχή στο C-τελικό άκρο θεωρείται ότι συμμετέχει στη δέσμευση του αγωνιστή (Ligand-Binding Domain, LBD). Η LBD περιέχει, επίσης, περιοχές που είναι υπεύθυνες για το διμερισμό του υποδοχέα καθώς και για την ενεργοποίηση των μεταγραφικών του ιδιοτήτων (Transcriptional Activation Function-2, AF-2). Το αμινοτελικό άκρο των PPAR φαίνεται να περιέχει μια πρόσθετη περιοχή μεταγραφής.

Όπως πολλά μέλη των πυρηνικών υποδοχέων, οι PPAR μετά την πρόσδεσή τους με τον αγωνιστή τους και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους, συνδέονται με τον υποδοχέα του 9-cis ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid Receptor, RXR) σχηματίζοντας ετεροδιμερές της μορφής PPAR/RXR. Το ετεροδιμερές αυτό, προσδένεται σε ειδική αλληλουχία γονιδίου, τη PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) επάγοντας την έκφραση του. Οι PPRE εντοπίζονται στις περιοχές μεταγραφής πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων.¹¹⁰

PPAR γ

Ο PPAR γ , με τη μεγαλύτερη εξειδίκευση για το λιπώδη ιστό, υφίσταται σε τρεις ισομορφές, PPAR γ 1, PPAR γ 2 και PPAR γ 3, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικές εναρκτήριες μεταγραφικές περιοχές και εναλλακτικό μάτισμα.¹⁰⁹ Ο PPAR γ 2 έχει μια περιοχή 30 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο, που δεν παρουσιάζεται στον PPAR γ 1 και στον PPAR γ 3, και αποτελεί την ειδική ισομορφή των λιποκυττάρων.¹¹² Εντοπίζεται στο πυρήνα του κυττάρου αλλά και στο κυτταρόπλασμα ενώ η σύνδεσή του με τους αγωνιστές του έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του στον πυρήνα. Ο PPAR γ 1 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του λιπώδους ιστού, ενώ ο PPAR γ 3 έχει βρεθεί στο λιπώδη ιστό, στο παχύ έντερο και στα μακροφάγα.⁸⁷

Από κρυσταλλογραφία ακτίνων X διευκρινίστηκε η τρισδιάστατη δομή του PPAR γ , παρουσία και απουσία αγωνιστή. Η τρισδιάστατη δομή της LBD αποτελείται από 13 α -έλικες και μια μικρή (τετραπλά στριφτή) β -πτυχωτή επιφάνεια, δημιουργώντας ένα ελικοειδές πάκτωμα. Αν και η δομή αυτή παρουσιάζεται και σε άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, ο PPAR γ παρουσιάζει και μια επιπλέον 2' έλικα, ανάμεσα στις έλικες 2 και 3. Ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της δομής του, επίσης είναι και ο τεράστιος όγκος (1000 Å) της κοιλότητας που προσδένονται οι αγωνιστές, χάρη στην παρουσία της έλικας 2' και της θέσης της έλικας 2. Η θέση αυτών των ελίκων δημιουργεί ένα κανάλι μέσα από το οποίο περνάει ο αγωνιστής (σχήμα 7).¹⁰⁸



Σχήμα 7: Κρυσταλλική δομή της LBD περιοχής του PPARγ. Φαίνεται έντονα η κοιλότητα, τεραστίου όγκου (1000 Å), στην οποία προσδένονται οι αγωνιστές.¹⁰⁸

Η κρυσταλλική δομή του PPARγ αποκάλυψε επίσης, τον τρόπο σταθεροποίησης του ετεροδιμερούς PPARγ/RXR. Η μεσεπιφάνεια του ετεροδιμερούς περιλαμβάνει ένα σύνθετο δίκτυο από υδροφοβικές και πολικές αλληλεπιδράσεις. Τα αμινοξέα που λαμβάνουν μέρος σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι εξελικτικά διατηρημένα και σε άλλους πυρηνικούς υποδοχείς που ετεροδιμερίζονται με τους RXRs. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι η μεσεπιφάνεια παρουσιάζει μια ασυμμετρία που προκαλεί επιπλέον αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή του PPARγ -μεταξύ του τέλους της AF-2 έλικας και της φουρκέτας που δημιουργείται από τις έλικες 8 και 9- και μιας θετικά φορτισμένης του RXR. Οι τελευταίες αυτές αλληλεπιδράσεις αυξάνουν την μεσεπιφάνεια του ετεροδιμερούς δικαιολογώντας την προτίμηση του PPARγ (και γενικότερα των PPAR) να σχηματίζουν ετεροδιμερή παρά ομοδιμερή.¹¹⁰

PPARγ και διαφοροποίηση

Ο PPARγ επάγεται κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης και αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή αυτής της πορείας. Είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την δέσμευση, την πρόσληψη και την αποθήκευση λιπαρών οξέων, όπως της LPL, aP2, ACS κ.α. Η σημασία του PPARγ στη λιπογένεση έχει αναδειχτεί με διάφορους τρόπους. Η υπερέκφραση του PPARγ σε ινοβλάστες διεγείρει τη λιπογένεση. Ποντίκια PPARγ (-/-) πεθαίνουν πριν γεννηθούν λόγω ελαττωματικού πλακούντα, ενώ αυτά που διασώζονται εμφανίζουν ανεπάρκεια φαιού λιπώδους ιστού. Ποντίκια PPARγ (+/-), στα οποία έχει παρατηρηθεί ότι δεν μπορεί να προκληθεί παχυσαρκία μέσω διαίτας υψηλής

θερμιδικής αξίας (Diet induced obesity, DIO), εμφανίζουν ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης και ο λευκός λιπώδης ιστός αναπτύσσεται εκεί όπου εκφράζεται ο PPAR γ . Από το γεγονός αυτό φαίνεται πως η έκφραση του PPAR γ είναι αναγκαία για την ανάπτυξη του λευκού λιπώδους ιστού.^{85, 113}

Αν και η έκφραση του PPAR γ 1 είναι πιο αυξημένη από αυτή του PPAR γ 2 στα προλιποκύτταρα,¹¹⁴ τα επίπεδα αυτών των δυο ισομορφών είναι παρόμοια στα λιποκύτταρα, γεγονός που καθιστούσε δύσκολη τη διευκρίνιση του ακριβή ρόλου κάθε ισομορφής στη διαφοροποίηση. Για να επιλυθεί αυτό το ζήτημα, «παρασκευάστηκαν» προλιποκύτταρα 3T3-L1 τα οποία δεν εκφράζαν καμία από τις δύο ισομορφές PPAR γ 1 και PPAR γ 2, με στόχευση πρωτεϊνών καταστολέων με δομή δακτυλίου ψευδαργύρου στις ειδικές περιοχές του γονιδίου του PPAR γ . Η εκτοπική έκφραση του PPAR γ 2, και όχι του PPAR γ 1, αποδείχθηκε ικανή να διεγείρει ξανά τη λιπογένεση. Από τα παραπάνω στοιχεία αναδεικνύεται πως ο PPAR γ 2 κατέχει ένα μοναδικό ρόλο στο πρόγραμμα της διαφοροποίησης¹¹⁵ και πως οι δυο ισομορφές του μεταγραφικού αυτού παράγοντα ρυθμίζουν και ρυθμίζονται διαφορετικά κατά την πορεία της διαφοροποίησης.¹¹⁶ Η δράση του PPAR γ 1 δεν είναι ξεκάθαρη αφού υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι α) ο PPAR γ 1 δεν έχει λιπογενετική δράση¹¹⁵ β) ο PPAR γ 1 έχει λιπογενετική δράση αλλά μικρότερη από αυτή του PPAR γ 2¹¹⁷ γ) η έκφραση του PPAR γ 1 μειώνεται με την αύξηση της λιπογένεσης¹¹⁴ και δ) η έκφραση του PPAR γ 1 αυξάνεται στα αρχικά στάδια της λιπογένεσης ενώ στη συνέχεια μειώνεται.¹¹⁶

Οι φυσικοί αγωνιστές του PPAR γ περιλαμβάνουν κυρίως λιπαρά οξέα και παράγωγα τους ενώ σχετικά πρόσφατα επισημάνθηκε η ικανότητα των ενδοκανναβινοειδών (κεφάλαιο 4) να προσδένονται και να ενεργοποιούν αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα.^{118,119} Η προσταγλανδίνη J₂ (prostaglandin J₂, PGJ₂) είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του PPAR γ .¹²⁰ Οι θειαζολιδινοδιόνες (thiazolidinediones, TZD) αποτελούν υψηλής συγγένειας συνθετικούς αγωνιστές του PPAR γ και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του NIDDM. Ωστόσο, ο ενδογενής αγωνιστής του είναι έως τώρα άγνωστος.¹²¹ Ο παράγοντας ADD1/SREBP-1c εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της παραγωγής του ενδογενή αγωνιστή του PPAR γ , χωρίς ακόμα να έχει διευκρινιστεί ο τρόπος.¹²²

Ο PPAR γ 2 ενεργοποιείται μεταγραφικά από τους C/EBP β και δ , και από την στιγμή που θα εκφραστεί, ο C/EBP α και ο PPAR γ ρυθμίζουν θετικά ο ένας την έκφραση του άλλου.^{123,116} Ειδικά, ο προαγωγέας του PPAR γ 2, περιέχει CRE, στην οποία δεσμεύεται η CREB και ρυθμίζει την έκφρασή του.⁹⁸

Στο παρελθόν υπήρχε μεγάλη διαμάχη για τους ειδικούς ρόλους του PPAR γ και του C/EBP α κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Ινοβλάστες απομονωμένοι από ποντικούς C/EBP α (-/-) εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του PPAR γ και μειωμένη ικανότητα να προχωρήσουν σε λιπογένεση.¹²³ Η εκτοπική έκφραση του PPAR γ σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να

προωθήσει τη διαφοροποίηση, ωστόσο τα κύτταρα αυτά δεν είναι ευαίσθητα στη δράση της ινσουλίνης. Δεν συμβαίνει το ίδιο και με τον παράγοντα C/EBPα, όπου η υπερέκφραση του σε ινοβλάστες PPARγ (-/-) δεν είναι ικανή να προάγει τη λιπογένεση.¹²⁴ Έτσι, αν και ο C/EBPα χρειάζεται για την διαφοροποίηση, φαίνεται πως ο κύριος ρυθμιστής της είναι ο PPARγ. Βέβαια, υπάρχουν γονίδια που μόνο ο C/EBPα μπορεί να ενεργοποιήσει μεταγραφικά, αλλά το πιο πιθανό είναι ότι αυτά εμπλέκονται στην ευαισθησία της ινσουλίνης και στην επαγωγή και διατήρηση της έκφρασης του PPARγ.¹²⁵

Οικογένεια SREBP

Οι πρωτεΐνες SREBPs είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμίζουν την μεταγραφή πολλών γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί τρία μέλη αυτής της οικογένειας: η SREBP-1a, η SREBP-1c και η SREBP-2. Ο παράγοντας ADD1 ύστερα από κλωνοποίηση από μια βιβλιοθήκη cDNA λιποκυττάρων αρουραίου βρέθηκε ομόλογος με την ανθρώπινη SREBP-1c. Η SREBP-1a και ο ADD1/SREBP-1c προέρχονται από το ίδιο γονίδιο μέσω εναλλακτικής χρήσης προαγωγέα κατά τη μεταγραφή, ενώ ο SREBP-2 παράγεται από διαφορετικό γονίδιο. Οι SREBPs εκφράζονται ως πρόδρομες πρωτεΐνες που παραμένουν δεσμευμένες στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum, ER). Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης στο ER διευκολύνουν την απελευθέρωση της SREBP-2 και την μεταφορά της στο σύστημα Golgi. Η πρωτεόλυση που πραγματοποιείται στο σύστημα Golgi ελευθερώνει τελικά την SREBP-2 στο κυτταρόπλασμα, όπου μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να δεσμευτεί στα γονίδια-στόχους μέσω ρυθμιστικών στοιχείων στερόλης. Ο ADD1/SREBP-1c μπορεί επίσης να αναγνωρίσει το μοτίβο E-BOX ενώ η SREBP-1a είναι ισχυρός ενεργοποιητής όλων των γονιδίων που φέρουν αλληλουχία SREBP. Ο ADD1/ SREBP-1c ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για την σύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ η SREBP-2 την σύνθεση της χοληστερόλης.¹²⁶

ADD1/ SREBP-1c

Ο ADD1/SREBP-1c είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της σύνθεσης και της πρόσληψης των λιπαρών οξέων, καθώς και της σύνθεσης των TG. Τα επίπεδα του mRNA του ADD1/SREBP-1c αυξάνονται μέσα σε 24 ώρες μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης, υποδεικνύοντας την σημασία του στα αρχικά στάδια της λιπογένεσης. Πράγματι, η υπερέκφραση του ADD1/SREBP-1c σε κύτταρα NIH-3T3 επάγει την διαφοροποίηση με την παρουσία όμως αγωνιστών του PPARγ.⁹² Ποντίκια ADD1/SREBP-1c (-/-) εμφανίζουν φυσιολογική μάζα λιπώδους ιστού και πιθανότατα ο SREBP-2 αναπληρώνει την απώλεια του ADD1/SREBP-1c.¹²⁷

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω ο ADD1/SREBP-1c εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση του PPAR γ .¹²² Αυτή η ενεργοποίηση είναι ειδική για την ισομορφή του PPAR γ και φαίνεται να περιορίζεται και στην περιοχή δέσμευσης του αγωνιστή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μέσο καλλιέργειας κυττάρων που εκφράζουν τον ADD1/SREBP-1c μπορεί να αυξήσει την μεταγραφική δραστηριότητα του PPAR γ . Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει πως η έκφραση του ADD1/SREBP-1c προωθεί την σύνθεση και την έκκριση του φυσικού αγωνιστή του PPAR γ . Επιπλέον, ο ADD1/SREBP-1c πιθανόν ενεργοποιεί μεταγραφικά τον PPAR γ αφού η υπερέκφραση του ADD1/SREBP-1c σε λιποκύτταρα 3T3-L1 αυξάνει τα επίπεδα mRNA του PPAR γ , χωρίς ακόμα να είναι γνωστό αν αυτή η ενεργοποίηση είναι άμεση ή έμμεση.¹²⁸

3.5. Παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση

In vitro μελέτες έχουν αναδείξει την ινσουλίνη ως απαραίτητο παράγοντα για την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων,^{83, 102} επάγοντας την έκφραση του PPAR γ 2 αλλά όχι του PPAR γ 1.¹²⁹ Η ινσουλίνη αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων που διαφοροποιούνται καθώς και το ποσό των TG που συσσωρεύονται σε κάθε λιποκύτταρο. Επιπλέον, η ινσουλίνη εμφανίζει αντιαποπτωτική δράση. Τα προλιποκύτταρα διαθέτουν ελάχιστους υποδοχείς ινσουλίνης στην επιφάνειά τους και έτσι η δράση της πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσης της στον IGF-I, ο οποίος έχει δράση τυροσινικής κινάσης. Ο IGF-I είναι σημαντικό συστατικό του ορού βοοειδούς και η συμπλήρωση του μέσου διαφοροποίησης που δεν περιέχει ορό, με αυτόν τον παράγοντα, καθιστά ικανή την πρόοδο της διαφοροποίησης. Ο IGF-I και η ινσουλίνη ενεργοποιούν διάφορα ξεχωριστά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία, το καθένα ή και όλα μαζί, διαμεσολαβούν ώστε να επιτευχθούν οι λιπογενετικές επιδράσεις αυτών των παραγόντων. Και τα δύο μόρια ενεργοποιούν την πρωτεΐνη Ras ενώ αυτή με την σειρά της επάγει την διαφοροποίηση χωρίς να είναι απαραίτητη περαιτέρω ορμονική επαγωγή. Αντίστροφα, η μείωση στην έκφραση της Ras επιφέρει αναστολή στη διαφοροποίηση. Παραδόξως, η Ras είναι ενεργοποιητής του μονοπατιού των MAPK, μέσω του οποίου παρεμποδίζεται η διαφοροποίηση. Η χρονική στιγμή στην πορεία της διαφοροποίησης όπου θα ενεργοποιηθεί η Ras, είναι κρίσιμη για το αν τελικά θα δράσει με θετικό ή αρνητικό τρόπο, προωθώντας ή παρεμποδίζοντας την διαφοροποίηση. Για αυτόν το λόγο, σε προλιποκύτταρα που έχει επιδράσει είτε η ινσουλίνη, είτε ο IGF-I, ο ακριβής ρόλος της Ras στη σηματοδότηση δεν είναι ξεκάθαρος. Μελέτες σε κύτταρα 3T3-L1 έχουν αναδείξει έναν επιπλέον μεσολαβητή της δράσης της ινσουλίνης, την πρωτεϊνική κινάση B (Protein Kinase B, PKB).^{83, 102}

Η βισφατίνη, όπως και η ινσουλίνη, έχει αναγνωριστεί ως επαγωγέας της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αφού αυξάνει τη σύνθεση των TG από τη γλυκόζη και επάγει την ενεργοποίηση του PPAR γ .

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια ως επαγωγείς της διαφοροποίησης σε σειρές προλιποκυττάρων και σε πρωτογενείς καλλιέργειες. Στις περισσότερες μελέτες, τα γλυκοκορτικοειδή εκπροσωπούνται από Dex. Η Dex θεωρείται πως λειτουργεί μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoids receptors, GR), ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Οι μεταγραφικοί στόχοι του GR που εμπλέκονται στη λιπογένεση δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Η Dex φαίνεται να επάγει την C/EBP δ και σε αυτό οφείλεται εν μέρει η λιπογενετική της δράση. Ωστόσο ο ρόλος της είναι περισσότερο πολύπλοκος αφού τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την C/EBP δ χρειάζονται χορήγηση Dex ώστε να προχωρήσουν στη διαφοροποίηση. Επιπλέον, η Dex μειώνει την έκφραση του p α ref-1, ο οποίος αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της λιπογένεσης. *In vivo*, ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών δεν είναι απαραίτητα ο ίδιος. Τα προλιποκύτταρα των περισσότερων θηλαστικών χρειάζονται αυτές τις ορμόνες για την επαρκή διαφοροποίησή τους. Ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο Cushing, όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία, εμφανίζουν συσσώρευση λίπους στην κοιλιακή χώρα και ταυτόχρονα έλλειψη υποδόριου λίπους.⁸⁴

Και άλλες ορμόνες επιδρούν στη διαφοροποίηση με περισσότερο όμως αμφιλεγόμενο τρόπο. Για παράδειγμα, η ορμόνη ανάπτυξης (growth hormone, GH) επάγει εμφανώς τη λιπογένεση σε καλλιέργειες προλιποκυττάρων διαφόρων κυτταρικών σειρών, ενώ αντίθετα φαίνεται να παρεμποδίζει την διαφοροποίηση σε πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων. Τα άτομα που εμφανίζουν ανεπάρκεια σ' αυτή την ορμόνη, έχουν φυσιολογικά αποθέματα λίπους ή και αυξημένα. Επίσης, οι ορμόνες του θυρεοειδούς αδένα και το ρητινοϊκό οξύ ανήκουν σε μια μεγάλη ποικιλία μεσολαβητών, οι οποίες επηρεάζουν *in vitro* την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων, ενώ *in vivo* δεν μπορεί να υποστηριχθεί η ίδια δράση.⁹⁶

Το cAMP είναι μια ακόμη ένωση που επάγει την διαφοροποίηση. Ο συνδυασμός cAMP, ινσουλίνης και Dex αποτελεί ακόμα και σήμερα την προτεινόμενη αγωγή ώστε να επιτευχθεί η διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων 3T3-L1. Αρχικές έρευνες σε καλλιέργειες προλιποκυτταρικών σειρών ανέδειξαν πως η προσθήκη IBMX προωθεί τη λιπογένεση. Παρόλο που στη βιβλιογραφία υπάρχει έντονη αντιπαράθεση για το αν η IBMX δρα κατά κύριο λόγο μέσω της αύξησης των επιπέδων του cAMP, πολλές έρευνες υποστηρίζουν πως συνθετικά ανάλογα του cAMP μπορούν να υποκαταστήσουν την IBMX στο μέσο διαφοροποίησης. Τα αυξημένα επίπεδα του cAMP ενεργοποιούν PKA, η οποία μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και ενεργοποιεί την CREB. Η τελευταία έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στις CRE

προάγοντας την έκφραση πολλών γονιδίων. Η IBMX αυξάνει τα επίπεδα της C/EBPβ¹⁰² και του PPARγ2,¹¹⁶ ενώ πιο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν πως το cAMP και ο ενεργοποιημένος μεταγραφικός παράγοντας CREB είναι απαραίτητα και επαρκή ώστε να προωθήσουν την πλήρη διαφοροποίηση των κυττάρων 3T3-L1. Επιπλέον, η IBMX και το cAMP μειώνουν τα κυτταρικά επίπεδα του Sp1, ενός μεταγραφικού παράγοντα που διαμεσολαβεί για την καταστολή του προαγωγέα του C/EBPα γονιδίου,¹⁰² ενώ το cAMP έχει εμπλακεί στην παραγωγή αγωνιστών του PPARγ στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης¹³⁰ και στη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης σε λιποκύτταρα αρουραίου.¹³¹

3.6. Παράγοντες που παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση

Φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNFα, IL1, IL6, IL11, ιντερφερόνη-γ κ.α., μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της διαφοροποίησης ή ακόμα και να προάγουν την αποδιαφοροποίηση ώριμων λιποκυττάρων. Είτε TNFα που έχει εκκριθεί είτε μεμβρανοσύνδετος TNFα μπορεί να δράσει μέσω του υποδοχέα του, TNFR1, για να παρεμποδίσει τη δημιουργία λιποκυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την ενεργοποίηση των MAP κινάσων και του μονοπατιού της ERK1/2.¹³² Αυτή η ενεργοποίηση του ERK1/2 μονοπατιού έχει προταθεί ότι εμποδίζει την δημιουργία λιποκυττάρων, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω φωσφορυλίωσης και έτσι αναστολής λειτουργίας του PPARγ.¹³³ Αυτές οι κινάσες, καθώς και η JNKMAP κινάση, φωσφορυλιώνουν την Ser112 στην αμινο-τελική περιοχή του PPARγ2 ή την Ser82 στον PPARγ1 και με αυτόν τον τρόπο μειώνουν την μεταγραφική του ενεργότητα. Ο RXR, με τον οποίο σχηματίζει ετεροδιμερές ο PPARγ, φωσφορυλιώνεται επίσης από τις MAPKs και παρεμποδίζεται η δράση του ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει πως ο TNFα και η IL1 καταστέλλουν την διαφοροποίηση μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη TAK1/TAB1/NIK, με τελικό αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενεργότητα του PPARγ.^{83, 102} Επίσης, ο TNFα μειώνει την έκφραση και παράλληλα, τη δεσμευτική ικανότητα του PPARγ με το DNA. Σχεδόν ταυτόχρονα μειώνονται και τα επίπεδα του C/EBPα και του aP2.^{83, 91} Στην πραγματικότητα, οι κυτοκίνες φαίνεται να μπορούν να μειώνουν τον αριθμό των λιποκυττάρων δρώντας σε πολλά σημεία στην πορεία της διαφοροποίησης και ενεργοποιώντας διαφορετικά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια.^{83,102}

Η οικογένεια των εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών Wnt δρα με παρακρινείς ή αυτοκρινείς μηχανισμούς και επηρεάζει την ανάπτυξη πολλών ειδών κυττάρων. Η έκφραση του Wnt1 γονιδίου φαίνεται να καταστέλλει τη λιπογένεση, αφού παρεμποδίζει εντελώς την επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων PPARγ και C/EBPα που κατέχουν ρόλο κλειδί στη διαφοροποίηση. Επιπλέον η παρεμπόδιση της σηματοδότηση των Wnt σε προλιποκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη διαφοροποίηση τους αναδεικνύοντας έτσι πως τα προλιποκύτταρα παράγουν

ενδογενώς Wnts οι οποίοι δρουν ως ισχυροί αναστολείς της διαφοροποίησης. Από τα μέλη της οικογένειας αυτής, ο Wnt10b είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας της διαφοροποίησης, όπως υποστηρίζουν αρκετές μελέτες. Ο Wnt10b εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα προλιποκύτταρα ενώ η έκφραση του μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση. Η ανεπάρκεια του συνεισφέρει στην αύξηση της συσσώρευσης λίπους στα ινίδια των μυών, ενώ αυξάνει την πιθανότητα μετατροπής των μυοβλαστών σε λιποκύτταρα. Επιπλέον, η υπερέκφραση του παρεμποδίζει την ανάπτυξη του λευκού καθώς και του φαιού λιπώδους ιστού⁸⁴ ενώ η αυξημένη έκφραση του Wnt10b, παρουσία TNFα, αποκλείει την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα και προάγει την μετατροπή των κυττάρων αυτών σε μακροφάγα κύτταρα με τη σύγχρονη έκφραση προφλεγμονωδών παργόντων.¹³⁴

Ο παράγοντας αύξησης μετασχηματισμού-β (Transformer Growth Factor-β, TGF-β) είναι μια κυτοκίνη που προωθεί τον πολλαπλασιασμό των προλιποκυττάρων και παρεμποδίζει την διαφοροποίηση *in vitro*. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με πειράματα σε ποντικούς που υπερεκφράζουν τον TGF-β και εμφανίζουν μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης του λιπώδους ιστού. Η επίδραση του TGF-β πραγματοποιείται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα SMAD3 ο οποίος παρεμποδίζει την επαγωγή του PPARγ και του C/EBPα.⁸³

Η διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα μπορεί επίσης να ρυθμιστεί μέσω της έκφρασης ενός διαμεμβρανικού ή/και διαλυτού μορίου, του pref-1, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που περιέχουν αλληλουχίες παρόμοιες με εκείνες του επιδερμικού παράγοντα αύξησης. Ο pref-1 είναι παρών στα προλιποκύτταρα, ενώ η έκφραση του μειώνεται κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης. Έχει παρατηρηθεί πως όταν υπερεκφράζεται, παρεμποδίζεται η λιπογένεση, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο pref-1 μπορεί να αποτελεί έναν αυτοκρινή ή/και παρακρινή αρνητικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης.¹⁰²

Τέλος, αντικρουόμενες είναι οι αναφορές για το ρόλο του ενδοκυτταρικού ασβεστίου $[(Ca)_i]$ στην πορεία της διαφοροποίησης. Αύξηση των επιπέδων $[(Ca)_i]$ κατά τη διαφοροποίηση 3T3-L1 προλιποκυττάρων, ενέστειλε^{135, 136} ή δεν είχε επίδραση στην πορεία της διαφοροποίησης¹³⁷ ενώ σε ανθρώπινα προλιποκύτταρα η, η αύξηση των επιπέδων του $[(Ca)_i]$ είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ή την επαγωγή της πορείας της διαφοροποίησης, στα αρχικά στάδια και στα τελικά στάδια, αντίστοιχα.¹³⁸

3.7. Δείκτες διαφοροποίησης

Η ανάγκη παρακολούθησης της πορείας διαφοροποίησης οδήγησε στην αναζήτηση των δεικτών διαφοροποίησης. Δείκτης διαφοροποίησης ορίζεται εκείνο το μόριο του οποίου η συγκέντρωση ή η δραστηριότητα αυξάνεται (ή μειώνεται) προοδευτικά κατά τη διαφοροποίηση

και η μεταβολή αυτή είναι ανάλογη (ή αντιστρόφως ανάλογη) με το ποσοστό μετατροπής των κυττάρων από προλιποκύτταρα σε λιποκύτταρα. Οι δείκτες διαφοροποίησης, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο σημειώνεται μεταβολή της συγκέντρωσης ή της δραστηρότητας τους, διακρίνονται σε πρώιμους και τελικούς. Ένας από τους βασικούς δείκτες είναι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ 2 ενώ στους τελικούς δείκτες συγκαταλέγονται η έκφραση και η δραστηρότητα της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, G3PDH) και της FAS. Επειδή όμως το κύριο χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης είναι η συσσώρευση των TG, η συγκέντρωση TG αποτελεί τον βασικότερο δείκτη διαφοροποίησης.⁸³

4 Λιπαρά οξέα

4.1. Δομή και ονοματολογία των λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα (Fatty Acids, FA) είναι μόρια πολύ μεγάλης βιολογικής σημασίας. Αποτελούνται από μια μακριά υδρογονανθρακική αλυσίδα, συνήθως με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ 12 και 20, και μια πολική, υδρόφιλη κεφαλή καρβοξυλίου, η οποία επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητές τους.

Η ονοματολογία ενός λιπαρού οξέως, προκύπτει από το όνομα του αρχικού υδρογονάνθρακα, με αντικατάσταση της κατάληξης -ιο σε -ικό. Διακρίνονται σε κορεσμένα και ακόρεστα, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία διπλών δεσμών. Το παλμιτικό οξύ, με 16 άτομα άνθρακα (C16), και το στεατικό, C18, είναι τα πιο διαδεδομένα κορεσμένα λιπαρά οξέα (Saturated Fatty Acid, SFA) ενώ το πιο διαδεδομένο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (Monounsaturated Fatty Acid, MUFA) είναι το ελαιϊκό οξύ. Ένα λιπαρό οξύ με δυο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς λέγεται πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA). Τέτοια οξέα είναι το λινελαϊκό οξύ (C18) που έχει δυο διπλούς δεσμούς, το λινολενικό οξύ (C18) με τρεις διπλούς δεσμούς και το αραχιδονικό (C20) με τέσσερις διπλούς δεσμούς. Ο συμβολισμός 18:0 υποδηλώνει λιπαρό οξύ C18 χωρίς διπλούς δεσμούς, ενώ ο συμβολισμός 18:2 υποδηλώνει ότι υπάρχουν δυο διπλοί δεσμοί. Ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει ακόρεστα λιπαρά οξέα με περισσότερους από ένα διπλούς δεσμούς. Συνεπώς έχει ανάγκη να παίρνει με την τροφή μια μικρή ποσότητα PUFA, κυρίως λινελαϊκού και λινολενικού οξέος, τα οποία ονομάζονται απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acid, EFA).^{139, 140}

Η αρίθμηση των λιπαρών οξέων αρχίζει από τον άνθρακα της καρβοξυλομάδας που χαρακτηρίζεται σαν α-άτομο ή της μεθυλομάδας που χαρακτηρίζεται σαν ω. Τα ω3 λιπαρά οξέα είναι αυτά που έχουν τον πρώτο διπλό δεσμό μετρώντας από το ω άκρο, μεταξύ 3ου και 4ου ατόμου άνθρακα, ενώ τα ω6 λιπαρά οξέα αυτά που έχουν τον πρώτο διπλό δεσμό μεταξύ 6ου και 7ου ατόμου άνθρακα. Ο αριθμός, η θέση των διπλών δεσμών και το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων επηρεάζει τις ιδιότητες των λιπιδίων στα οποία περιέχονται. Για παράδειγμα τα λίπη των οποίων τα TG περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι στερεά, π.χ. τα ζωικά λίπη, ενώ αυτά που περιέχουν ακόρεστα είναι υγρά, π.χ. τα φυτικά λάδια. Πέρα όμως από την υφή επηρεάζεται και η λειτουργία των λιπαρών οξέων στον οργανισμό.¹³⁹

4.2.Είσοδος των λιπαρών οξέων στα κύτταρα

Η είσοδος των λιπαρών οξέων γίνεται με δυο τρόπους. Ο πρώτος μηχανισμός είναι ένας παθητικός μηχανισμός διάχυσης, ο οποίος είναι πολύ αργός και παρατηρείται σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξέων. Ουσιαστικά κατά το μηχανισμό αυτό παρατηρείται είσοδος των οξέων με τη μορφή των ουδέτερων μορίων. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις FFA επικρατεί η διευκολυνόμενη διάχυση, κατά την οποία ιόντα των FFA εισέρχονται μέσω πρωτεϊνικών φορέων. Για μεγάλο χρονικό διάστημα ήταν κοινώς αποδεκτό ότι αυτός ήταν ο μόνος τρόπος εισόδου των FFA στο εσωτερικό των κυττάρων. Πρόσφατες σχετικά μελέτες σε πολλά είδη κυττάρων, έδειξαν ότι η είσοδος των οξέων υπακούει σε όλες τις αρχές της κινητικής που διέπουν το φαινόμενο της διευκολυνόμενης διάχυσης όπως τη *trans*- ενεργοποίηση, την στερεοεκλεκτικότητα και την αντιμεταφορά.¹⁴¹ Η μεταφορά των FFA με πρωτεϊνικούς φορείς έχει βρεθεί ότι συμβαίνει σε πολλά είδη κυττάρων όπως λιποκύτταρα, ηπατικά, καρδιακά και μυϊκά.¹⁴²

Μέχρι στιγμής έχουν προσδιοριστεί πέντε FFA-φορείς σε κύτταρα θηλαστικών: η 43-kD πρωτεΐνη σύνδεσης FFA πλασματικής μεμβράνης (Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein, FABPm), η πρωτεΐνη μεταφοράς των FFA (Fatty Acid Transport Protein, FATP) και η 88-kD τρανσλοκάση των FFA (Fatty Acid Translocase, FAT) που βρέθηκε σε λιποκύτταρα ποντικού και είναι ομόλογη της CD36, ενός υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών που έχει βρεθεί στον άνθρωπο. Εντοπίζεται στο λιπώδη ιστό, την καρδιά, τους μυς και τα έντερα που χρησιμοποιούν εξωγενή λιπαρά οξέα αλλά απουσιάζει από τον εγκέφαλο. Προσλαμβάνει μεγάλης αλυσίδας λιπαρά οξέα και όχι λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδα. Οι άλλες δυο πρωτεΐνες μεταφοράς FFA, η 22 kDa μεμβρανική πρωτεΐνη που βρέθηκε στη 3T3-L1 προλιποκυτταρική σειρά και η 50-60 kDa πρωτεΐνη, που απομονώθηκε από κύτταρα της καρδιάς και των μυών ποντικού, δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως και δεν έχουν κλωνοποιηθεί.¹⁴²

Τα FFA είναι προσδεδεμένα στην αλβουμίνη ορού (serum albumin, SA) και για να εισέλθουν στο κύτταρο πρέπει να αποδεσμευτούν από αυτή. Αν και ο ρυθμός αποδέσμευσης των μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων (Long Chain Fatty Acid, LCFA) από την αλβουμίνη είναι πολύ γρήγορος, της τάξης του $0.04-0.14s^{-1}$, φαίνεται ότι μια πολύ μικρή συγκέντρωση SA είναι απαραίτητη για την έναρξη της εισόδου των LCFA στα κύτταρα. Η SA προσδένεται στους ειδικούς υποδοχείς της στην επιφάνεια του κυττάρου παραδίδοντας το λιπαρό οξύ στην κυτταρική μεμβράνη. Έχει παρατηρηθεί ότι η ιοντική αλλά και η πρωτονιωμένη (ουδέτερη) μορφή του λιπαρού οξέος έχει την ικανότητα να προσδένεται στη μεμβράνη, γεγονός που εξυπηρετεί την είσοδο του στο εσωτερικό του κυττάρου με διευκολυνόμενη ή με παθητική διάχυση, αντίστοιχα.¹⁴³

Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, τα PUFA παραλαμβάνονται από κυτοσολικές πρωτεΐνες πρόσδεσης λιπαρών οξέων (Fatty Acid Binding Proteins, FABP) που τα κατανέμουν σε διάφορα μέρη του κυττάρου και στην επιφάνεια της λιποσταγόνας, στην περίπτωση των λιποκυττάρων. Οι FABP είναι μια οικογένεια 14-15 kDa πρωτεϊνών, που περιέχονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 6% του πρωτεϊνικού κυτοσολικού περιεχομένου ανάλογα με το τύπο του κυττάρου. Όλες οι FABP έχουν τουλάχιστον μία θέση πρόσδεσης για PUFA, όπως η ισομορφή των λιποκυττάρων, ALBP, ενώ κάποιες άλλες, όπως η ισομορφή που βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ, L-FABP, παρουσιάζει τρεις περιοχές πρόσδεσης λιπαρών οξέων.^{144, 145}

Η είσοδος των λιπαρών οξέων στα κύτταρα και η κυκλοφορία τους σε αυτά είναι ένας μηχανισμός ιδιαίτερα ευαίσθητος και άρρηκτα συνδεδεμένος με τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στο εξωτερικό του κυττάρου. Σπουδαίο ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση κατέχει και η LPL, αφού το 90-95 % των FFA που εισέρχονται στα κύτταρα, προέρχονται από τις VLDL και τα χυλομικρά.¹⁴³ Η LPL αναφέρεται ως ένζυμο κλειδί στη ρύθμιση της εισόδου λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα και θεωρείται ότι υπόκειται σε παλίνδρομη ρύθμιση από τα κύρια προϊόντα της, σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο.¹⁴⁶ Σε αντίθεση με το ποσό των FFA στον εξωκυττάριο χώρο, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση αυτών παραμένει σχετικά σταθερή χάρη στην εστεροποίηση, την οξείδωση αλλά και την έκκριση των λιπαρών οξέων.¹⁴³

Οι ειδικές δράσεις των διαφορετικών λιπαρών οξέων καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες των μεταβολιτών τους. Το μήκος της αλυσίδας, η θέση, ο αριθμός και το είδος των διπλών δεσμών προσδιορίζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των λιπαρών οξέων καθώς και την μεταβολική τους «μοίρα». Οι περισσότερες επιδράσεις των λιπαρών οξέων στην ομοιόσταση του κυττάρου επιτελούνται από τους μεταβολίτες τους. Στο εσωτερικό του κυττάρου τα λιπαρά οξέα επιμηκύνονται, οξειδώνονται, αποκορεσματοποιούνται και ενσωματώνονται σε φωσφολιπίδια και άλλα πολύπλοκα λιπίδια όπως κηραμίδια και σφιγγολιπίδια, καθώς επίσης συμμετέχουν και στη σύνθεση των εικοσανοειδών.¹⁴⁷ Τα δομικά όμοια με το αραχιδονικό οξύ (Arachidonic Acid, AA) ω3 PUFA μπορούν να αντικαταστήσουν το AA στα φωσφολιπίδια. Κάποια ω3 PUFA μετατρέπονται σε προϊόντα με διαφορετικές ιδιότητες από εκείνα που προκύπτουν από το AA, ενώ άλλα όπως το 22:6ω3 εικοσιδυεξαενοϊκού οξύ είναι αναστολείς των κυκλοξυγονασών (Cyclooxygenases, COX). Η χορήγηση μιας πλούσιας διατροφής σε ω3 PUFA μπορεί να επηρεάσει την βιοσύνθεση των εικοσανοειδών.¹⁴⁸

4.3.Ο ρόλος των λιπαρών οξέων

Τα FA αποτελούν μια από τις κυριότερες πηγές ενέργειας και αποθηκεύονται με τη μορφή των TG, τα οποία είναι μη φορτισμένοι εστέρες της γλυκερόλης. Επίσης, είναι συστατικά των εστέρων της χοληστερόλης που παράγονται από ηπατικά κύτταρα, επινεφρίδια, μακροφάγα και

λιποκύτταρα και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των PG και δομικούς λίθους των φωσφολιπιδίων, τα οποία είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών.

Τα τελευταία χρόνια, όμως αποδείχθηκε η δράση των FA ως ρυθμιστών πολλών βιολογικών διεργασιών. Έχει βρεθεί ότι τα FA τροποποιούν τη δραστηριότητα καναλιών ιόντων, την ενζυμική λειτουργία και την συναπτική διάδοση ενώ παράλληλα ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό τους. Ακόμα, ζωτικός είναι ο ρόλος τους στη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και το φαινόμενο της απόπτωσης των κυττάρων.^{144,149}

Όπως αναφέρθηκε, ανάλογα με το μήκος τους και τον αριθμό των διπλών δεσμών τα λιπαρά οξέα δρουν με διαφορετικό τρόπο στους ιστούς. Έχει επισημανθεί ότι τα μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα (Short Chain Fatty Acid, SCFA) και τα SFA κινητοποιούνται γρηγορότερα ενώ τα LCFA εμπλέκονται κυρίως στη γονιδιακή ρύθμιση. Τα μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα (Middle Chain Fatty Acid, MCFA) ενεργοποιούνται γρηγορότερα στη μιτοχονδριακή μήτρα από ότι τα LCFA, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρότερη διαθεσιμότητα των MCFA για εστεροποίηση σε αντίθεση με τα LCFA που αποθηκεύονται ή οξειδώνονται ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι άλλων καυσίμων.¹⁵⁰

Τα SCFA κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα ενώ τα LCFA για να μεταφερθούν στους διάφορους ιστούς προσδένονται στη SA. Έτσι οι ιστοί που έχουν μικρή ή καθόλου ικανότητα να συνθέτουν FA, τα προσλαμβάνουν από τη κυκλοφορία για να ικανοποιήσουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Τα FA που πηγαίνουν στα διάφορα όργανα, κυρίως στο ήπαρ, μπορεί να οξειδωθούν, να απελευθερωθούν ως TG με τη μορφή των VLDL ή ως κετόνες, και να επαναπροσληφθούν από το λιπώδη ιστό.

Αν η συγκέντρωση των FA είναι πολύ μικρή, δεσμεύονται στις υψηλές θέσεις συγγένειας SA και είναι δύσκολο να αποδεσμευτούν και να χρησιμοποιηθούν για ενεργειακούς σκοπούς. Αντίθετα, υψηλές συγκεντρώσεις FA εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως της δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας, της αρτηριοσκλήρυνσης, του καρκίνου, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας. Η παχυσαρκία επηρεάζει και το λειτουργικό ρόλο των FA, αφού σε παχύσαρκα ποντίκια με ανεπάρκεια λεπτίνης, τα LCFA δεν καταναλώνονται από ιστούς όπως το ήπαρ ή την καρδιά, αλλά αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό. Επίσης, έχει αναφερθεί, η τοξική επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης των FA του πλάσματος στον οργανισμό.¹⁵¹

4.4.ω3 λιπαρά οξέα

4.4.1. Γενικά

Τα ω3 λιπαρά οξέα είναι μια ιδιαίτερη κατηγορία των PUFA. Τα ω3 PUFA είναι παρόντα στη δίαιτα κυρίως ως α-λινολενικό οξύ (α-Linolenic acid, ALA, C18:3ω3) από φυτικά λίπη και ως εικοσαπενταενοϊκό οξύ (Eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5ω3), εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (Docosahexaenoic acid, DHA, C22:6ω3) και εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (Docosapentaenoic acid, DPA, 22:5ω3) στα ψάρια και στα έλαια ψαριών. Τα ω3 λιπαρά οξέα μπορούν να ληφθούν και από άλλες πηγές όπως αυγά που προέρχονται από όρνιθες που έχουν τραφεί με έντομα και γρασίδι ενώ ο λιναρόσπορος περιέχει μέχρι και 55% ALA.^{140,152}

Το ALA, που ανήκει στα απαραίτητα λιπαρά οξέα, μπορεί να μεταβολιστεί σε EPA, DPA και DHA στον ανθρώπινο οργανισμό (σχήμα 8) ενώ η ελάχιστη ημερήσια πρόσληψη ώστε να αποφευχθεί η ανεπάρκεια ω3 λιπαρών οξέων είναι 0.2% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης που ισοδυναμεί με 0.5g/ημέρα.^{140,153} Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση του ALA επηρεάζει την ποσότητα και την κατανομή των EPA και DHA στους περισσότερους ιστούς ενώ ο λιπώδης ιστός αντανakλά τη μακροχρόνια κατανάλωση των ω3 λιπαρών οξέων μιας και η σύστασή του σε EPA και DHA είναι σχετικά ανεπηρέαστη στην κατανάλωση του ALA. Τα λιπαρά οξέα DPA και DHA κυριαρχούν στο λιπώδη ιστό ενώ η συγκέντρωση του EPA είναι πολύ μικρή πιθανότατα γιατί μετατρέπεται σε DPA πριν την αποθήκευσή του.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶



Σχήμα 8: Μεταβολισμός του ALA σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας και ακορεστότητας.

4.4.2. Ρόλος των ω3 λιπαρών οξέων στη διατροφή και την υγεία

Είναι γνωστό πως η επίδραση των λιπών της διατροφής στην υγεία του ανθρώπου εξαρτάται από τις πηγές και την φύση των λιπαρών οξέων. Τα λίπη που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο της δυσλιπιδαιμίας καθώς και των καρδιαγγειακών παθήσεων είναι κυρίως η χοληστερόλη, τα SFA και τα *trans* λιπαρά οξέα. Γενικά τα SFA που προέρχονται από τις ζωικές τροφές φαίνεται να είναι περισσότερο επιβλαβή στην υγεία του ανθρώπου σε σχέση με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα από φυτά και ψάρια.^{147,157}

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ερευνών για τον άνθρωπο έχει αναδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των PUFA στις διαταραχές που σχετίζονται με τα λιπίδια. Ιδιαίτερη έμφαση έχει κυρίως δοθεί στα ω3 και ω6 απαραίτητα λιπαρά οξέα. Οι κύριοι αντιπρόσωποι αυτών των ομάδων, ALA (ω3) και λινελαϊκό (ω6) (Linoleic Acid, LA) θεωρούνται απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού. Η βέλτιστη αναλογία πρόσληψης ω6/ω3 έχει βρεθεί ότι είναι από 4/1 έως 10/1, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η άριστη λειτουργία των ιστών.^{154,155}

Το DHA είναι το πιο άφθονο ω3 λιπαρό οξύ στους περισσότερους ιστούς και βρίσκεται, συνήθως, στη sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων. Ανεπάρκεια σε ω3 λιπαρά οξέα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του DHA στον εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή με αποτέλεσμα την απώλεια μνήμης, μαθησιακές δυσκολίες, ελαττωμένη όραση. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει τα ω3 λιπαρά οξέα ασκούν προστατευτική δράση σε πολλές παθολογικές καταστάσεις και ειδικά στις καρδιαγγειακές παθήσεις αποτρέποντας τις θανατηφόρες αρρυθμίες μέσω σταθεροποίησης της ανταλλαγής ιόντων στις κυτταρικές μεμβράνες. Ειδικότερα, άτομα με αυξημένα επίπεδα ω3 λιπαρών οξέων στο πλάσμα έχουν 90% λιγότερες πιθανότητες ξαφνικού καρδιακού θανάτου.¹⁵³ Ο ρόλος αυτός των ω3 λιπαρών οξέων έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές τυχαιοποιημένες μελέτες με αποτέλεσμα η American Heart Association να συστήνει την κατανάλωση 1g EPA&DHA/ημέρα.^{158,159}

Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα ω3 λιπαρά οξέα έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθιστώντας τα απαραίτητα στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών καταστάσεων και αυτοάνοσων νοσημάτων όπως καρκίνο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, νόσο του Crohn. Τα μακριάς αλυσίδας ω3 PUFA, και ειδικά τα EPA και DHA, μειώνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων όπως εικοσανοειδών, κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης. Τα παραπάνω λιπαρά οξέα αναστέλλουν το μεταβολισμό του AA, αυξάνουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων και επάγουν την έκφραση αντιφλεγμονωδών γονιδίων.¹⁵³

Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα ω3 PUFA περιορίζουν τα κλινικά συμπτώματα παθήσεων όπως της υπέρτασης και του διαβήτη τύπου 2. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη ικανότητα των ω3 PUFA να μειώνουν τη συγκέντρωση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων μέσω της

κινητοποίησης του καταβολισμού των VLDL και των χυλομικρών, που παράγονται από το ήπαρ και τον εντερικό σωλήνα, αντίστοιχα και/ή μέσω της αύξησης της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και στους μύες.³¹

4.4.3. ω3 λιπαρά οξέα και διαφοροποίηση

Είναι γνωστό πως μια δίαιτα πλούσια σε λιπαρά οξέα οδηγεί στην αύξηση του σωματικού λίπους. Τα PUFA, που είναι λιγότερο πιθανό να αυξήσουν τον αριθμό των λιποκυττάρων *in vivo*, μπορούν να επάγουν την *in vitro* διαφοροποίηση σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα SFA. Η επίδραση τους αυτή σχετίζεται με την ικανότητα τους να δρουν τα ίδια ή τα παράγωγα τους ως αγωνιστές του PPARγ και συγκεκριμένα ενεργοποιώντας τον PPARγ2.¹⁶⁰ Από μελέτες δέσμευσης έχει βρεθεί ότι τα PUFA είναι καλύτεροι αγωνιστές του PPARγ από τα MUFA και τα SFA.¹⁴⁷

Η συγκέντρωση του ALA στο πλάσμα και στους ιστούς είναι λιγότερο από το 0.5% της συνολικής ποσότητας των ολικών λιπαρών οξέων. Από την άλλη, το γεγονός ότι οι μεταβολίτες του ALA- DHA, DPA και EPA- βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στον οργανισμό, υποδεικνύει ότι ο βασικός ρόλος αυτού του ω3 λιπαρού οξέος είναι να λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση ανώτερων ω3 λιπαρών οξέων.¹⁶¹ Πολλές είναι οι μελέτες που επισημαίνουν την αρνητική επίδραση των DHA και του EPA στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας μέσω ρύθμισης του ενεργειακού ισοζυγίου, του μεταβολισμού των λιπιδίων, του νευροενδοκρινικού συστήματος καθώς και της λειτουργίας του λιπώδους ιστού.¹⁶² Τα ω3 PUFA περιορίζουν την υπερπλασία και την υπερτροφία του λιπώδους ιστού στην περιοχή της κοιλιάς. Εμπλουτισμένες δίαιτες με DHA και EPA μειώνουν το λιπώδη ιστό πειραματοζώων μέσω της αύξησης της θερμογένεσης στο φαιό λιπώδη ιστό^{147,163} και μείωσης της LPL στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό¹⁶⁴ ενώ οι Dos et al., επισήμαναν ότι τα DHA και EPA μειώνουν την ανάπτυξη του ενδοπεριτοναϊκού λιπώδους ιστού μέσω αναστολής της πορείας διαφοροποίησης των λιποκυττάρων στο τελικό στάδιο.¹⁶⁵

Η αναστολή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της έκφρασης του ADD1/SREBP1,¹⁶⁶ όπως στα λιποκύτταρα χοίρου, ή/και μέσω της μείωσης της έκφρασης του PPARγ, της C/EBPα¹⁶⁷ ή των COX, όπως σε κυτταρικές σειρές προλιποκυττάρων.^{147,168} Αντιθέτως, επίδραση DHA ή EPA σε 3T3-L1 κυτταρική σειρά προλιποκυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαφοροποίησης και τη συσσώρευση TG.¹⁴⁷ Εκτός από το λιπώδη ιστό, η επίδραση του DHA και του EPA στη ρύθμιση του σωματικού λίπους εντοπίζεται στο ήπαρ και στους μύες. Χορήγηση αυτών των οξέων σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων όπως της συνθάσης των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase, FAS), του

SREBP1¹⁶⁹ στο ήπαρ αλλά και την αύξηση της έκφρασης της παλμιτοϋλοτρανσεράσης-I της καρνιτίνης (Carnitine Palmitoyl Transferase-I, CPT-I), ενός ενζύμου που είναι στενά συνδεδεμένο με την β-οξείδωση, στο ήπαρ¹⁷⁰ και στους μύες.¹⁷¹

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5 Σκοπός της εργασίας

Η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα της μακροχρόνιας διατήρησης του οργανισμού σε κατάσταση θετικού ενεργειακού ισοζυγίου και κατατάσσεται σε δυο κύριες κατηγορίες, την υπερτροφική και την υπερπλαστική παχυσαρκία. Η υπερτροφική παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από την αύξηση του όγκου των λιποκυττάρων ενώ η υπερπλαστική από την αύξηση του αριθμού τους. Στη δεύτερη κατηγορία, που θεωρείται και η πιο επικίνδυνη καθώς η αντιμετώπισή της είναι δυσκολότερη, ο αριθμός των λιποκυττάρων αυξάνει κυρίως μέσω της αύξησης της ταχύτητας της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Τα προλιποκύτταρα είναι εξειδικευμένοι ινοβλάστες ενώ τα λιποκύτταρα έχουν στρογγυλό σχήμα και το εσωτερικό τους καταλαμβάνεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από μια λιποσταγόνα συσσωρευμένων TG. Όταν υπάρχει στον οργανισμό ισορροπημένο ενεργειακό ισοζύγιο, η ταχύτητα της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα ρυθμίζεται έτσι ώστε να αναπληρώνονται τα λιποκύτταρα που πεθαίνουν. Στην πορεία της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα επιδρούν, όπως έχει αποδειχθεί, πολλοί περιβαλλοντικοί αλλά και γενετικοί παράγοντες. Η παρούσα εργασία εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο μελέτης της επίδρασης λιπαρών οξέων, που προέρχονται απ' την τροφή, στην πορεία της διαφοροποίησης.

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ερευνών στον άνθρωπο έχει αναδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των PUFA στις διαταραχές που σχετίζονται με τα λιπίδια. Ιδιαίτερη έμφαση έχει κυρίως δοθεί στα $\omega 3$ λιπαρά οξέα. Έχει βρεθεί ότι τα $\omega 3$ PUFA περιορίζουν την υπερπλασία και την υπερτροφία του λιπώδους ιστού στην περιοχή της κοιλιάς. Εμπλουτισμένες δίαιτες με DHA και EPA μειώνουν το λιπώδη ιστό πειραματοζώων μέσω της αύξησης της θερμογένεσης στο φαιό λιπώδη ιστό και μειώνουν την ανάπτυξη του ενδοπεριτοναϊκού λιπώδους ιστού. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του απαραίτητου $\omega 3$ λιπαρού οξέος, ALA καθώς και του παραγώγου του DHA, στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου, για τη δράση των οποίων υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις στη βιβλιογραφία. Στόχος μας επίσης ήταν η μελέτη της ποσοτικής σύστασης του λιπώδους ιστού αρουραίου σε $\omega 3$ λιπαρά οξέα, καθώς και των μεταβολών της σύστασης τους, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.

6 Μέθοδοι και υλικά

6.1.Παραλαβή επιδιδυμικού λιπώδους ιστού αρουραίου

- ~ Φυσιολογικός ορός (υδατικό διάλυμα NaCl 0.9%)
- ~ Αιθέρας
- ~ Αιθανόλη
- ~ Τρυβλία petri (Corning)
- ~ Ψαλίδι, λαβίδα
- ~ Ηθμοί με διάμετρο πόρων 0,22μm, Millex GV (Millipore)
- ~ Αποστειρωμένες πλαστικές σύριγγες μίας χρήσης

Αποστείρωση σκευών και διαλυμάτων

Η αποστείρωση του φυσιολογικού ορού γίνεται με διήθησή του από μικροβιοκρατείς ηθμούς. Μετά την αποστείρωσή του φυλάσσεται στους 4°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 15 ημέρες. Αν παραμείνει περισσότερο πρέπει να επαναδιηθηθεί, γιατί υπάρχει κίνδυνος μόλυνσής του.

Τα ψαλίδια και οι λαβίδες που χρησιμοποιούνται αποστειρώνονται με θέρμανση στους 180°C για 1 ώρα.

Παραλαβή λιπώδους ιστού

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιείται επιδιδυμικός λιπώδης ιστός αρσενικού αρουραίου τύπου Wistar, βάρους 170-200g,⁸⁶ που τρεφόταν κατά βούληση με κατάλληλη τροφή τρωκτικών. Ο αρουραίος αναισθητοποιείται με αιθέρα. Αμέσως μετά, αφού διαβραχεί το τρίχωμά του με αιθανόλη 70%, τοποθετείται σε στείρο χώρο. Με τη χρήση αποστειρωμένων ψαλιδιού και λαβίδας ανοίγεται το εξωτερικό δέρμα της κατώτερης κοιλιακής χώρας. Κατόπιν με διαφορετικά ψαλίδι και λαβίδα, επίσης αποστειρωμένα, ανοίγεται η εσωτερική μεμβράνη και απομακρύνονται οι όρχεις με τις επιδιδυμίδες, στις οποίες είναι συνδεδεμένος λιπώδης ιστός υπό μορφή τεμαχίων λίπους (fat pads) και τοποθετούνται σε τριβλίο petri που περιέχει αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό προθερμασμένο στους 37°C.

6.2. Καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου

- ~ Φυσιολογικός ορός
- ~ Βόειος αλβουμίνη ορού (bovine serum albumin, BSA), κλάσμα V, pH 7.0 (Serva)
- ~ Κολλαγονάση από *Clostridium Histolyticum*, τύπος VIII (Sigma)
- ~ Ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) (Biochrom)
- ~ Αντιβιοτικά: διάλυμα πενικιλίνης (10.000 IU/ml) και στρεπτομυκίνης (10.000 µg/ml) (Biochrom)
- ~ Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Biochrom)
- ~ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom)
- ~ Alpha- Modified Eagle Medium (αMEM) (Biochrom)
- ~ Διάλυμα ινσουλίνης 500 µg/mL
- ~ Γλυκόζη (Serva)
- ~ Bovine NuSerum (BD)
- ~ Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- ~ Ανακινούμενο υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- ~ Θάλαμος νηματικής ροής (laminar air flow hood) (NUAIRE)
- ~ Επωαστήρας CO₂ (NUAIRE).
- ~ Αυτόκαυστο
- ~ Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- ~ Τρυβλία petri
- ~ Πλαστικοί κωνικοί σωλήνες καλλιέργειας των 15 και 50 mL (Greihner)
- ~ Πλαστικές αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης του 1 ml και των 3 ml (COPAN)
- ~ Διάλυμα σιλικόνης (Serva)
- ~ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- ~ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Serva)
- ~ Δοχείο Dewar αποθήκευσης υγρού αζώτου
- ~ Πλαστικές φιάλες καλλιέργειας 25 cm² (Greihner)
- ~ Πλαστικές φιάλες καλλιέργειας 75 cm² (Greihner)
- ~ Κρυογονικά φιαλίδια αποθήκευσης κυττάρων των 2 mL (Greihner)

Προετοιμασία διαλυμάτων και σκευών

Θρεπτικό υλικό απομόνωσης με BSA: Στο διάλυμα DMEM προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών ώστε να περιέχει 20 U/mL πενικιλίνη και 20 µg/mL στρεπτομυκίνη. Επίσης προστίθενται FBS και BSA σε συγκεντρώσεις 2% και 4%, αντίστοιχα. Το διάλυμα

διηθείται μέσω ηθμού και φυλάσσεται στους 4°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 2 ημέρες.

Θρεπτικό υλικό προλιποκυττάρων: Στο διάλυμα DMEM προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών, ώστε να περιέχει 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη, και FBS σε συγκέντρωση 10%. Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού και φυλάσσεται στους 4°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 15 ημέρες.

Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων: Υδατικό διάλυμα 1.154M NH₄Cl, 10mM NaHCO₃ και 0.1mM EDTA. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση του διηθείται μέσω ηθμού.

Διάλυμα πέψης: Στο θρεπτικό υλικό απομόνωσης λιποκυττάρων με BSA προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κολλαγονάσης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 3.3mg/mL. Το διάλυμα παρασκευάζεται τη μέρα που θα χρησιμοποιηθεί. Πριν τη χρήση διηθείται μέσω ηθμού.

Μέσο κατάψυξης: Σε FBS προστίθεται DMSO σε συγκέντρωση 10%. Το διάλυμα παρασκευάζεται τη μέρα που θα χρησιμοποιηθεί. Πριν τη χρήση διηθείται μέσω ηθμού.

Μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων αρουραίου: Στο διάλυμα αMEM προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών, ώστε να περιέχει 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη, 10μg/mL ινσουλίνη, 20mM γλυκόζη και 20% NuSerum. Επίσης προστίθεται, ανάλογα τη φύση του πειράματος, κατάλληλη ποσότητα BSA ή λιπαρό οξύ/BSA, σε αναλογία 4:1. Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού και φυλάσσεται στους 4°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 15 ημέρες.

6.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια προλιποκυττάρων αρουραίου

Ο λιπώδης ιστός απομακρύνεται από τις επιδιδυμίδες και τεμαχίζεται με αποστειρωμένο ψαλίδι σε όσο το δυνατόν μικρότερα τμήματα, ενώ ταυτόχρονα εκπλένεται με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, προθερμασμένο στους 37°C. Γίνονται τρεις εκπλύσεις στις οποίες απομακρύνονται το αίμα και τα υπολείμματα αγγείων και άλλων ιστών. Στη συνέχεια τα τεμάχια του λιπώδους ιστού μεταφέρονται σε κωνικό σωλήνα καλλιέργειας που περιέχει κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα πέψης. Από δοκιμές που έγιναν σε παλιότερη εργασία προέκυψε ότι η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος πέψης είναι 3mL διαλύματος για το λιπώδη ιστό ενός αρουραίου βάρους 170-200g.

Στη συνέχεια, ο σωλήνας αεροστεγώς κλεισμένος τοποθετείται σε ανακινούμενο υδρόλουτρο 37°C και αφήνεται για 1h. Τα πρώτα 10min και κατά τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται ανακίνηση με το χέρι με ήπιες κυκλικές κινήσεις ώστε να μη διαρραγούν οι κυτταρικές μεμβράνες.

Μετά την πέψη του ιστού, ο σωλήνας τοποθετείται σε φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται στα 500xg για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποκορυφωμένα λιποκύτταρα απομακρύνονται με πλαστική πιπέτα και το υπόλοιπο μέσο αποχύνεται. Τα κύτταρα που έχουν καταβυθιστεί εκπλένονται με 5mL Θ.Υ. καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 500xg για 5min και το υπερκείμενο αποχύνεται. Στα κύτταρα που καταβυθίζονται συμπεριλαμβάνονται στρωματικά κύτταρα (stromal vascular cells, SV) καθώς και ερυθροκύτταρα που προέρχονται από τα αγγεία που τροφοδοτούν το λιπώδη ιστό. Τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με την προσθήκη 5mL διαλύματος λύσης. Ακολουθεί επώαση για 5min και φυγοκέντρωση στα 500xg για 5min. Το διάλυμα αποχύνεται, τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 5mL Θ.Υ. καλλιέργειας προλιποκυττάρων και μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας 25cm².

Μετά από 12h, απομακρύνεται το Θ.Υ. με όσα κύτταρα δεν έχουν κολλήσει και η φιάλη εκπλένεται 2 φορές με 2.5mL PBS. Προστίθενται 2mL διαλύματος θρυψίνης και οι φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα για 5min, ώστε να δράσει η θρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα. Αφού διαπιστωθεί με μικροσκοπική παρατήρηση ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί, ακολουθεί προσθήκη 5mL θρεπτικού υλικού προλιποκυττάρων που περιέχει FBS το οποίο απενεργοποιεί την θρυψίνη. Το διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα μεταφέρεται σε σωλήνα καλλιέργειας και γίνεται φυγοκέντρωση στα 500xg για 5min. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μέσου (~2mL) και μετρώνται. Μοιράζονται σε φιάλες έτσι ώστε να υπάρχουν ~200.000κύτταρα/φιάλη και συμπληρώνεται ο όγκος με μέσο μέχρι τα 5mL.

Τα κύτταρα, που έχουν μορφολογία ινοβλαστών, παρατηρούνται κάθε μέρα στο μικροσκόπιο. Ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξής τους το Θ.Υ. ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες. Όταν τα κύτταρα καλύπτουν περίπου το 70% της επιφάνειας της φιάλης ανακαλλιεργούνται. Ακολουθείται η διαδικασία της αποκόλλησης με θρυψίνη που περιγράφεται παραπάνω. Μετά από μέτρηση τα κύτταρα μοιράζονται κατάλληλα σε φιάλες καλλιέργειας. Τα προλιποκύτταρα διατηρούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά ινοβλαστών για τουλάχιστον 6 γενιές.

6.2.2. Διαφοροποίηση προλιποκυττάρων αρουραίου

Η καλλιέργεια των προλιποκυττάρων, αφού φτάσει σε κατάσταση συμβολής, παραμένει για δύο επιπλέον ημέρες στο ίδιο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το Θ.Υ. προλιποκυττάρων και τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 2.5mL PBS. Κατόπιν προστίθενται 6mL μέσου διαφοροποίησης. Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο καθημερινά για να εντοπιστούν πιθανές αλλαγές στη μορφολογία τους. Το μέσο ανανεώνεται κάθε 2 ημέρες.

6.3. Έλεγχος της διαφοροποίησης μέσω προσδιορισμού TG με τη χρωστική Oil Red O

- ~ Κυψελίδες
- ~ PBS
- ~ Φορμόλη 10% σε PBS
- ~ Προπυλενογλυκόλη 100% (VIORYL)
- ~ Υδατικό διάλυμα προπυλενογλυκόλης 60%
- ~ Χρωστική Oil Red O (Sigma)
- ~ H₂O δις απεσταγμένο
- ~ Ισοπροπανόλη
- ~ Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης (COPAN)
- ~ Αυτόματη πιπέτα των 250-1000μL
- ~ Φωτόμετρο (Helios B UV-Visible Spectrophotometer V4.18)

Προετοιμασία διαλυμάτων και σκευών

Διάλυμα stock Oil Red O: Διαλύονται 4.2g της χρωστικής Oil Red O σε 1200mL απόλυτης ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αφήνεται για μία νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, σε ηρεμία και κατόπιν φιλτράρεται, μέσω φίλτρου πόρων 20-25μm. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναμιγνύεται με 900mL δις απεσταγμένο νερού και παραμένει μια νύχτα στους 4°C. Τέλος, φιλτράρεται δύο φορές και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας Oil Red O: Σε 1200mL διαλύματος stock Oil Red O προστίθενται 900mL δις απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα παραμένει για μια νύκτα στους 4°C. Την επόμενη μέρα, φιλτράρεται δύο φορές (μέσω φίλτρου πόρων 20-25μm) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχή Μεθόδου

Η χρωστική Oil Red O είναι ένα παράγωγο της β-ναφθόλης με χημικό τύπο C₆H₅N:NC₆H₄N:N-C₁₀H₆OH. Με τη χρωστική αυτή, οι χαρακτηριστικές λιποσταγόνες των λιποκυττάρων βάφονται έντονα κόκκινες και είναι ευδιάκριτες στο μικροσκόπιο. Η χρώση του συσσωρευμένου λίπους των κυττάρων βασίζεται στη μεγάλη διαλυτότητα της χρωστικής σε αυτό σε αντίθεση με την ελάχιστη διαλυτότητα που εμφανίζει στο νερό. Η χρωστική αυτή μάλιστα είναι πολύ ειδική για τα λιπίδια αφού δεν αλληλεπιδρά με κάποιο άλλο από τα συστατικά του ιστού.

Πορεία Μεθόδου

Μετά την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων απομακρύνεται το μέσο διαφοροποίησης από την φιάλη καλλιέργειας και τα κύτταρα εκπλένονται δυο φορές με 2.5mL PBS. Ακολουθεί προσθήκη 2mL διαλύματος φορμόλης 10% σε PBS όπου και παραμένει για τουλάχιστον 1h στους 4°C. Αφού περάσει ο χρόνος αυτός απομακρύνεται το διάλυμα και καλύπτεται η φιάλη με 1.5mL προπυλενογλυκόλης 100% για 3min. Απομακρύνεται το διάλυμα και προστίθενται 1.8mL διαλύματος εργασίας Oil Red O το οποίο αφήνεται να παραμείνει για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν απομακρύνεται η χρωστική και προστίθεται 1.5mL διαλύματος προπυλενογλυκόλης 60% για 1min ενώ η φιάλη ανακινείται ελαφρά. Στη συνέχεια γίνεται σχολαστική έκπλυση με δις απεσταγμένο νερό μέχρι την οριστική απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής από τα τοιχώματα της φιάλης. Ακολουθεί ξήρανση στους 37°C για τουλάχιστον 1h για να εξατμιστεί πλήρως το νερό, και προστίθεται ισοπροπανόλη 3 φορές από 1mL ώστε να εκχυλιστεί όλη η ποσότητα της χρωστικής από το εσωτερικό των κυττάρων. Η φιάλη ανακινείται ελαφρά ώστε να παραληφθεί όλη η χρωστική. Η ποσότητα της ισοπροπανόλης (3x1mL) τοποθετείται στην κυψελίδα όπου και φωτομετρείται στα 510nm.

Η ίδια πορεία ακολουθείται και σε μια φιάλη καλλιέργειας που δε περιέχει κύτταρα. Η τιμή της απορρόφησης αυτού του δείγματος αφαιρείται από τις τιμές απορρόφησης όλων των άλλων δειγμάτων.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Οι τιμές των απορροφήσεων, που λαμβάνονται για κάθε φιάλη, αντιπροσωπεύουν το ποσό των TG τα οποία έχουν βαφτεί με τη χρωστική Oil Red O (Oil Red O stained materials, OROSM). Οι OROSM εκφράζονται ανά αριθμό κυττάρων (OROSM/cell), που περιέχεται σε κάθε φιάλη καλλιέργειας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές χρωματισμένων προλιποκυττάρων σε κατάσταση συμβολής.

6.4.Προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής

- ~ PBS
- ~ Θρεπτικό υλικό προλιποκυττάρων
- ~ Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Biochrom)
- ~ Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- ~ Κυτταρομετρητής Beckman Coulter EPICS XL-MCL.

Αρχή μεθόδου¹⁷²

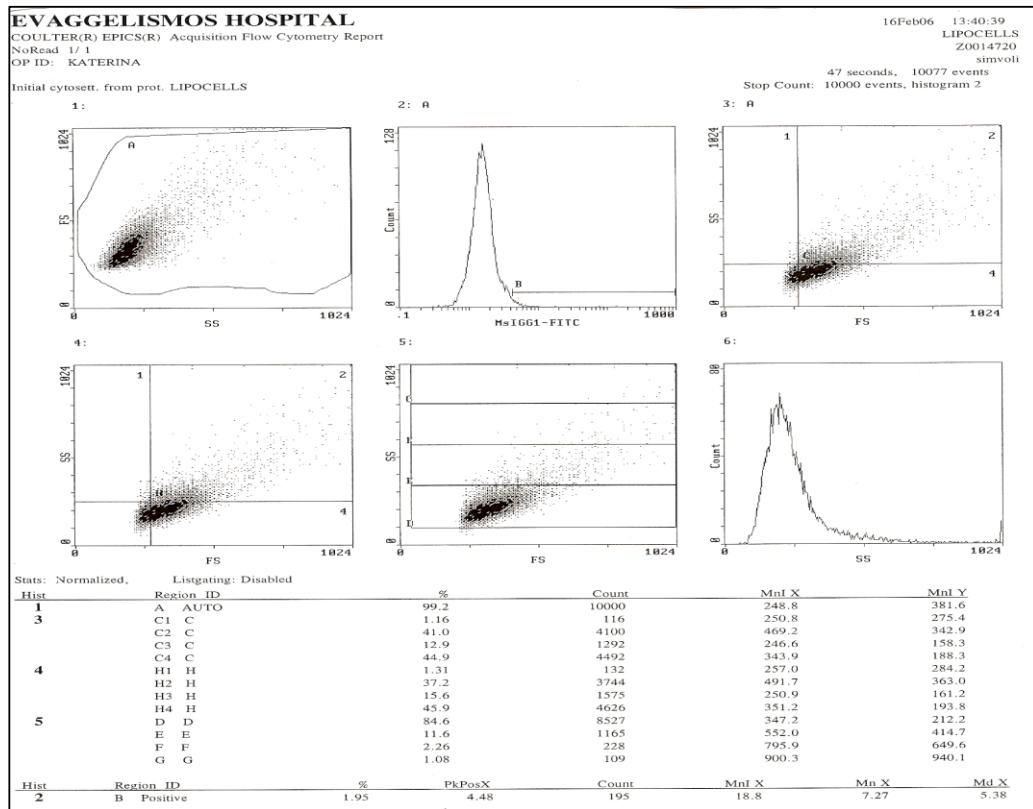
Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι ο οριζόντιος σκεδασμός του κυτταρομετρητή, που παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου, και ο κάθετος, που σχετίζεται με την δομή του κυττάρου και την εσωτερική πολυπλοκότητα του. Η μεταβολή της εσωτερικής πολυπλοκότητας και του μεγέθους των κυττάρων, που παρατηρείται κατά την διαφοροποίηση, συσχετίζεται με τη συσσώρευση λίπους στο εσωτερικό του κυττάρου και τη δημιουργία λιποσταγόνων.

Πορεία μεθόδου

Τα διαφοροποιημένα κύτταρα αποκολλώνται από την φιάλη καλλιέργειας με την επίδραση 2ml θρυψίνης, φυγοκεντρούνται στα 500g για 5 λεπτά, εκπλένονται με 2ml PBS και φυλάσσονται στους 4°C μέχρι την ανάλυση τους. Οι παράμετροι που προσδιορίζονται με την κυτταρομετρία ροής είναι ο οριζόντιος και ο κάθετος σκεδασμός. Οι μετρήσεις έγιναν στον κυτταρομετρητή Beckman Coulter EPICS XL-MCL. Ο αριθμός των κυττάρων που μετράται κάθε φορά είναι σταθερός, 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα.

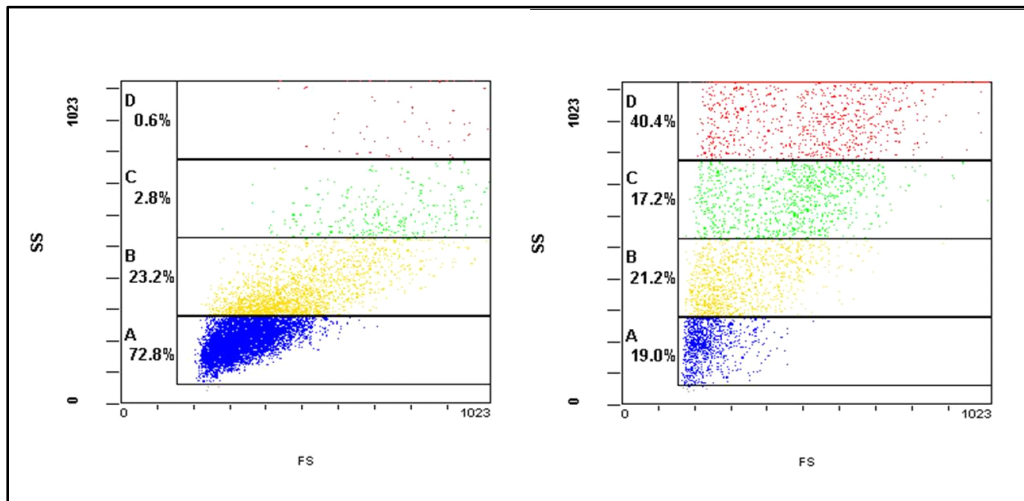
Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της μέτρησης από τον κυτταρομετρητή έχουν την μορφή που φαίνεται στο σχήμα 9.



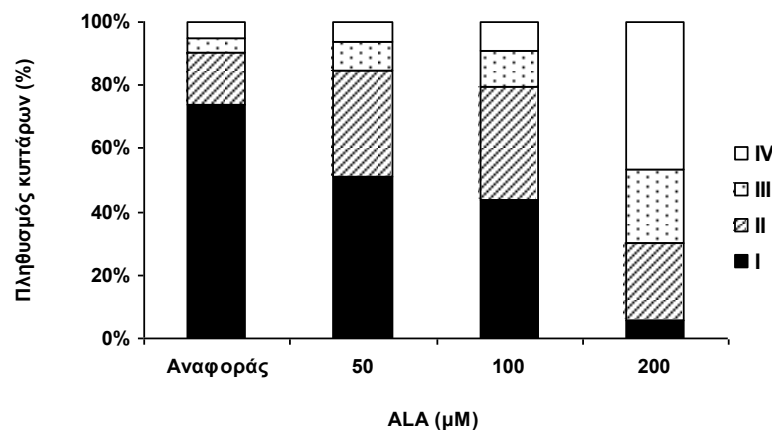
Σχήμα 9: Μετρήσεις από τον κυτταρομετρητή. Οι άξονες FS και SS αντιπροσωπεύουν το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων αντίστοιχα. Το διάγραμμα 5 χωρίζεται σε 4 περιοχές αυξανόμενης κοκκίωσης. Το διάγραμμα 6 απεικονίζει την κατανομή των κυττάρων βάσει της εσωτερικής τους πολυπλοκότητας.

Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε υπολογιστή και επεξεργάζονται με την χρήση ειδικού προγράμματος από όπου λαμβάνονται τα στικτογράμματα του σχήματος 10. Τα στικτογράμματα αυτά χωρίζονται σε τέσσερις περιοχές A, B, C και D. Τα κύτταρα κάθε περιοχής διαφέρουν ως προς την εσωτερική πολυπλοκότητα η οποία αντανακλά την διαφορετική συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την πορεία της διαφοροποίησης. Επομένως, τα κύτταρα της περιοχής A αντιστοιχούν σε αδιαφοροποίητα κύτταρα ενώ τα κύτταρα των περιοχών B, C και D αντιστοιχούν σε κύτταρα με διαφορετικό βαθμό διαφοροποίησης. Παρατηρείται προοδευτική αύξηση της συσσώρευσης τριγλυκεριδίων με τη μετατόπιση από την περιοχή A στην D.



Σχήμα 10: Διάγραμμα κυτταρομετρίας ροής. Οι άξονες FS (άξονας των x) και SS (άξονας των y), αντιπροσωπεύουν το μέγεθος των κυττάρων και την κοκκίωση των κυττάρων αντίστοιχα. Η Α περιοχή του διαγράμματος περιέχει τα αδιαφοροποίητα κύτταρα ενώ οι περιοχές Β έως D περιέχει τα διαφοροποιημένα κύτταρα με αυξανόμενο βαθμό διαφοροποίησης. Αριστερά: δείγμα αναφοράς. Δεξιά: Διαφοροποιημένα κύτταρα.

Στη συνέχεια σχεδιάζονται ραβδογράμματα με τα ποσοστά των περιοχών I έως IV (οι περιοχές I έως IV των ραβδογραμμάτων αντιστοιχούν στις περιοχές A έως D των στικτογραμμάτων) για κάθε δείγμα του πειράματος, όπως φαίνεται στο σχήμα 11.



Σχήμα 11: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του ALA στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 50μM, 100μM, 200μM ALA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Τα ραβδογράμματα δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων με τον αντίστοιχο βαθμό διαφοροποίησης. Η περιοχή I περιλαμβάνει κύτταρα παρόμοιας πολυπλοκότητας με εκείνα που βρίσκονται σε συμβολή ενώ τα επόμενα τρία κλάσματα (με τη σειρά που φαίνονται στο διάγραμμα) περιλαμβάνουν κύτταρα με αυξανόμενη πολυπλοκότητα.

6.5.Εκχύλιση λιπιδίων από προλιποκύτταρα και διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου

- ~ Χλωροφόρμιο αναλυτικής καθαρότητας
- ~ Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- ~ Απεσταγμένο νερό
- ~ Υδατικό διάλυμα NaCl 0.9%
- ~ Υδατικό διάλυμα NaCl 0.58%
- ~ Διάλυμα BHT σε n-εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας (0.010% w/v)
- ~ Αναδευτήρας δίνης
- ~ Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- ~ Φιάλη αζώτου
- ~ Γυάλινοι σωλήνες των 20mL
- ~ Πιπέτες Pasteur

Αρχή μεθόδου

Η εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Folch βασίζεται στην παραλαβή των λιπιδίων του δείγματος με κατάλληλο σύστημα διαλυτών και στη συνέχεια δημιουργία διφασικού συστήματος που θα επιτρέπει την κατανομή των λιπιδίων στην υδρόφοβη φάση. Αρχικά, στο δείγμα προστίθεται μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 για το σχηματισμό του μονοφασικού συστήματος. Ο διαχωρισμός των φάσεων επιτυγχάνεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υδατικού διαλύματος NaCl 0.9% ώστε η αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης- υδατικού διαλύματος να είναι 2:1:0.75. Στο διφασικό αυτό σύστημα η κάτω φάση (χλωροφορμική) αποτελείται από ένα μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-υδατικού διαλύματος NaCl 0.58% σε αναλογία 86:14:1. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων και την απομάκρυνση της χλωροφορμικής φάσης, η υδατική φάση επανεκχυλίζεται τρεις φορές με επαρκή ποσότητα “συνθετικής” κάτω φάσης, δηλαδή μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης-υδατικού διαλύματος NaCl 0.58% σε αναλογία 86:14:1. Όλες οι χλωροφορμικές φάσεις συνενώνονται.

Πορεία μεθόδου

Το δείγμα μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και προστίθενται 12mL μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 ανά mL δείγματος. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε αναδευτήρα δίνης και παραμονή σε παγόλουτρο για λίγη ώρα. Σε αυτό το σημείο το δείγμα μπορεί να παραμείνει στους -20°C για μια νύχτα. Στη συνέχεια προστίθενται 3mL υδατικού διαλύματος NaCl 0.9%. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι σε υδατικό μέσο, προστίθεται τόση ποσότητα

διαλύματος NaCl 0.9% ώστε ο τελικός όγκος του υδατικού διαλύματος να είναι 3mL. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε αναδευτήρα δίνης και παραμονή σε παγόλουτρο για περίπου 30min. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στα 600xg για 10min υπό ψύξη για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων. Μετά τη φυγοκέντρωση παραλαμβάνεται η κάτω, χλωροφορμική φάση με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και τοποθετείται σε παγόλουτρο. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται τόση ποσότητα “συνθετικής” κάτω φάσης, όση ποσότητα μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης προστέθηκε στο αρχικό δείγμα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε αναδευτήρα δίνης και παραμονή σε παγόλουτρο για περίπου 30min. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στα 600xg για 10min υπό ψύξη. Η κάτω φάση παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται στον ίδιο σωλήνα όπου τοποθετήθηκε και η αρχική χλωροφορμική φάση. Η διαδικασία της επανεκχύλισης της υδατικής φάσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Οι χλωροφορμικές φάσεις συλλέγονται όλες μαζί και εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Το λιπιδικό υπόλειμμα ζυγίζεται, αναδιαλύεται σε 1mL διαλύματος BHT σε *n*-εξάνιο και φυλάσσεται στους -20°C .

6.6. Αέρια χρωματογραφία (GC)

- ~ Αντιδραστήριο μετεστεροποίησης: διάλυμα BF_3 σε CH_3OH 14% (w/v) (Sigma)
- ~ NaOH/ CH_3OH (0.5N)
- ~ *n*-εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας
- ~ Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- ~ Διάλυμα BHT σε εξάνιο (0.010% w/v)
- ~ Υδατικό κορεσμένο διάλυμα NaCl
- ~ Πρότυποι μεθυλεστέρες (Supelco)
- ~ Αέριος χρωματογράφος Hewlett Packard/HP6890 (εφοδιασμένος με αυτόματο δειγματολήπτη Hewlett Packard 6890) και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και αντίστοιχο λογισμικό
- ~ Τριχοειδής στήλη BPX70 της SGE (60m x 0.25mm ID., πάχος φιλμ 0.25μm)
- ~ Οβίδες φέροντος αερίου He, κανσίμου αερίου αέρα/ H_2 .
- ~ Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- ~ Ειδικά φιαλίδια δειγμάτων για αέρια χρωματογραφία (GC vials)
- ~ Γυάλινοι σωλήνες των 20mL με ειδικό βιδωτό πώμα, καλυμένο εσωτερικά με teflon
- ~ Αναδευτήρας δίνης
- ~ Φυγόκεντρος
- ~ Πιπέτες Pasteur

Μέθοδος μετεστεροποίησης

Η μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων των λιπιδίων των προλιποκυττάρων και των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων γίνεται σε ήπιες συνθήκες με CH_3OH και BF_3 ως καταλύτη.¹⁷³ Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: το δείγμα των λιπιδίων μεταφέρεται σε προζυγισμένους ειδικούς γυάλινους σωλήνες και εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζεται και προστίθεται 1mL διαλύματος $\text{NaOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ 0.5N, αναδεύεται και μεταφέρεται σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 80°C για 10min. Μετά το τέλος της σαπωνοποίησης, τα δείγματα επανέρχονται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται 2mL αντιδραστηρίου μετεστεροποίησης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση στους 80°C για 4min. Αφού τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 2mL κορεσμένου διαλύματος NaCl και 1.2mL εξανίου, που περιέχει BHT. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση ($2500\times g$ για 5min). Παραλαμβάνεται 1mL από την υπερκείμενη φάση και μεταφέρεται σε φιαλίδια GC (GC vials).

Πορεία αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνει θερμοκρασιακό πρόγραμμα με αρχική θερμοκρασία 130°C , βήμα αύξησης της θερμοκρασίας με κλίση $3^\circ\text{C}/\text{min}$ και τελική θερμοκρασία 220°C . Η ροή του φέροντος αερίου, του καυσίμου και του οξειδωτικού αερίου ήταν 0.8, 40 και $450\text{mL}/\text{min}$, αντίστοιχα. Η πίεση της στήλης ήταν 21.77psi, η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος 220°C και η θερμοκρασία του ανιχνευτή 300°C .

Πρίν ενεθούν τα δείγματα στον αέριο χρωματογράφο, ενίεται μίγμα πρότυπων μεθυλεστέρων. Από τη σύγκριση των χρόνων ανάλυσης με αυτούς των προτύπων καθώς και με χρωματογραφήματα που έχουν ληφθεί στις ίδιες συνθήκες με ανιχνευτή μάζας, γίνεται ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων του δείγματος ενώ από τα εμβαδά των κορυφών που προκύπτουν προσδιορίζεται ποσοτικά η σύσταση του κάθε δείγματος στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα.

6.7. Απομόνωση ολικού RNA

- Kit απομόνωσης ολικού RNA (TRI Reagent, Ambion)
- Χλωροφόρμιο αναλυτικής καθαρότητας (χωρίς ισοαμυλική αλκοόλη)
- Ισοπροπανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- Απόλυτη αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- H_2O -ελεύθερο από RNάσες

- Σωλήνες eppendorf 2mL (Alfa)
- Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- Φωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Helios β (UNICAM)
- Kit DNase (Turbo DNase, Ambion)
- Υδατικό διάλυμα CH_3COONa (3M)
- Υδατικό διάλυμα EDTA (10mM)

Αρχή μεθόδου

Το TRI Reagent συνδυάζει φαινόλη και ισοκυανική γουανιδίνη σε ένα μονοφασικό διάλυμα που αναστέλλει ταχύτητα τη δράση της RNάσης. Η ισοκυανική γουανιδίνη είναι από τους πιο αποτελεσματικούς πρωτεϊνικούς αποδιατάκτες. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του RNA να παραμένει υδατοδιαλυτό σε διαλύματα φαινόλης/χλωροφορμίου που περιέχουν 4M ισοκυανική γουανιδίνη σε pH 4. Το βιολογικό δείγμα ομογενοποιείται στο TRI Reagent και το ομογενοποίημα χωρίζεται σε υδατική και οργανική φάση με την προσθήκη χλωροφορμίου. Το RNA κατανέμεται στην υδατική φάση, το DNA στη μεσόφαση και οι πρωτεΐνες στην οργανική φάση. Στη συνέχεια το RNA καταβυθίζεται με την προσθήκη ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με αιθανόλη και διαλυτοποιείται σε υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια, το απομονωμένο RNA κατεργάζεται με DNάση, ένζυμο που έχει την ικανότητα να διασπά εκλεκτικά το DNA. Ακολουθεί διαχωρισμός του RNA με καταβύθισή του με την προσθήκη υδατικών διαλυμάτων CH_3COONa και EDTA καθώς και απόλυτης αιθανόλης.

Πορεία μεθόδου

Για την απομόνωση RNA ακολουθείται το πρωτόκολλο που παρέχει η εταιρία. Από καλλιέργειες λιποκυττάρων και προλιποκυττάρων αφαιρείται το Θ.Υ. και χωρίς να γίνει έκπλυση προστίθεται στα κύτταρα 1mL TRI Reagent. Με συνεχείς εισροφήσεις και εκροφήσεις με την πιπέτα επιτυγχάνεται λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων, οπότε και τα προλιποκύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας. Τα ομογενοποιημένα μεταφέρονται σε σωλήνες eppendorf των 2mL και παραμένουν για 5min επώσης σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτή τη φάση τα δείγματα μπορούν να καταψυχθούν στους -70°C για τουλάχιστον ένα μήνα. Στην περίπτωση των λιποκυττάρων πραγματοποιείται μία φυγοκέντρωση στα 12.000xg για 10min στους 4°C . Το λίπος θα σχηματίσει μια στιβάδα πάνω από την υδατική φάση, οπότε απομακρύνεται. Στο μονοφασικό διάλυμα προστίθενται 200μL χλωροφόρμιο και ακολουθεί έντονη ανακίνηση με το χέρι για 15sec και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15min. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 12.000xg για 10-15min στους 4°C και το υπερκείμενο άχρωμο υδατικό διάλυμα μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα. Η

μεσόφαση και η υποκείμενη οργανική φάση μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C για μερικές μέρες ή στους -70°C για μερικούς μήνες, για μελλοντική απομόνωση DNA και πρωτεϊνών. Στην υδατική φάση προστίθενται 500μL ισοπροπανόλη, ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 5-10sec και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10min. Μετά από φυγοκέντρηση στα 12.000xg για 8min σε θερμοκρασία δωματίου απομακρύνεται το υπερκείμενο με προσοχή να μη διαταραχτεί το ίζημα το οποίο εκπλένεται με 1mL αιθανόλη 75%. Η αιθανόλη απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στα 7.500xg για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και, αν δεν έχει απομακρυνθεί όλη η ποσότητα, πραγματοποιείται μια γρήγορη φυγοκέντρηση και η αιθανόλη απομακρύνεται πλήρως με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας. Το ίζημα αφήνεται για 3-5min να στεγνώσει στον αέρα αλλά όχι πλήρως γιατί θα μειωθεί η διαλυτότητα. Το RNA διαλυτοποιείται σε νερό ελεύθερο από νοσήλευσες με συνεχείς εισροφές και εκροφές με την πιπέτα και vortex.

Προσδιορισμός απόδοσης και ποιότητας

Η συγκέντρωση του διαλύματος RNA υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά. Ένα μέρος του διαλύματος αραιώνεται με δις απεσταγμένο H₂O και φωτομετρείται στα 260nm. Για τον υπολογισμό της ποσότητας σε μg/mL χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος δεδομένου ότι 1 A₂₆₀ = 40μg RNA/mL:

$$A_{260} \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$$

Η ποιότητα του RNA μπορεί επίσης να εκτιμηθεί φασματοφωτομετρικά. Η αναλογία A₂₆₀/A₂₈₀ είναι ενδεικτική της καθαρότητας του δείγματος RNA. Η απομόνωση του RNA με αυτό το πρωτόκολλο αναμένεται να δώσει λόγο A₂₆₀/A₂₈₀=1.8-2.2.

Κατεργασία RNA με DNάση

30μg ολικό RNA επωάζονται στους 37°C για 1h με 5μL διαλύματος DNάση, 1μL Turbo DNάση και κατάλληλη ποσότητα H₂O-ελεύθερο από RNάσες ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50μL. Στη συνέχεια προστίθενται 5.5μL υδατικού διαλύματος CH₃COONa 3M, 5.5μL υδατικού διαλύματος EDTA 10mM, 110μL απόλυτης αιθανόλης και το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 20min. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 14.000xg για 15min στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο με προσοχή να μη διαταραχτεί το ίζημα το οποίο εκπλένεται με 1mL απόλυτης αιθανόλης. Η αιθανόλη απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στα 7.500xg για 5min στους 4°C και, αν δεν έχει απομακρυνθεί όλη η ποσότητα, πραγματοποιείται μια γρήγορη φυγοκέντρηση και η αιθανόλη απομακρύνεται πλήρως με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας. Το ίζημα αφήνεται για 3-5min να στεγνώσει στον αέρα αλλά όχι πλήρως γιατί θα μειωθεί η διαλυτότητα. Το RNA διαλυτοποιείται σε H₂O-ελεύθερο από RNάσες με συνεχείς εισροφές

και εκροφήσεις με την πιπέτα, φωτομετρείται ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητα του και φυλάσσεται στους -80°C .

6.8. Αντίστροφη μεταγραφική (RT)

- ~ Random hexamers 100μM, 0.2μg/μL (Fermentas)
- ~ dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM το καθένα (Promega)
- ~ M-MuLV αντίστροφη μεταγραφάση 200U/μL (NEB)
- ~ 10x Buffer αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης (1x Buffer: 75mM KCl, 50mM Tris-HCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiotreitol, pH 8.3) (NEB)
- ~ H₂O-ελεύθερο από RNάσες

Αρχή μεθόδου

Με την επίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης στο RNA, παρουσία εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων και τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών, παράγεται cDNA.

Πορεία μεθόδου

0.5-1μg ολικό RNA επωάζονται στους 70°C για 5min με 0.2μg εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων και κατάλληλη ποσότητα H₂O-ελεύθερο από RNάσες ώστε ο τελικός όγκος να είναι 15.8μL. Στη συνέχεια προστίθενται 2μL 10x buffer, 2μL mix dNTP (10mM το καθένα) και 0.2μL M-MuLV και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1h. Ο τελικός όγκος του μίγματος είναι 20μL. Τα cDNA που παράγονται φυλάσσονται στους -20°C .

6.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

- ~ GoTaq DNA πολυμεράση, 5u/μL (Promega)
- ~ 5x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega)
- ~ Διάλυμα MgCl₂, 25mM (Promega)
- ~ dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100mM το καθένα (Promega)
- ~ H₂O-ελεύθερο από RNάσες
- ~ cDNA
- ~ Jump Start REDTaq ReadyMix (Sigma)
- ~ Πρόσθιος εκκινητής, 10μM
- ~ Ανάστροφος εκκινητής, 10μM

• Σωλήνες eppendorf 0.2mL (Alfa)

• Κυκλοποιητής

Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συνίσταται στην επαναλαμβανόμενη διπλής κατεύθυνσης αντιγραφή του DNA μέσω επέκτασης των εκκινητών μίας περιοχής του νουκλεϊνικού οξέος. Τρία διακριτά βήματα λαμβάνουν χώρα σε έναν κύκλο PCR. Το πρώτο βήμα είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA που συμβαίνει με θέρμανση στους 92-96°C. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει τον υβριδισμό του εκκινητή με το συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία ποικίλει μεταξύ 37-65°C και εξαρτάται από την ομολογία των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο καθώς και από την σύνθεση του κάθε εκκινητή. Η συγκέντρωση των εκκινητών είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του DNA-στόχου και το μήκος τους πολύ μικρότερο με αποτέλεσμα να συνδέονται με το συμπληρωματικό τους DNA με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό από ότι συνδέονται οι δύο κλώνοι του DNA μεταξύ τους. Το τελικό βήμα είναι η επέκταση του εκκινητή από την πολυμεράση. Η θερμοκρασία αυτής της διαδικασίας είναι συνήθως 72°C και ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Πορεία μεθόδου

Για την παρασκευή του μίγματος αντίδρασης αναμιγνύονται οι παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε δείγμα πολλαπλασιασμένες επί των αριθμό των δειγμάτων συν 1:

0.2μL GoTaq DNA πολυμεράση (1u ανά δείγμα)

5μL 5x Green GoTaq Flexi Buffer

1.5μL MgCl₂ 25mM (1.5mM τελική συγκέντρωση)

1μL μίγματος dNTPs (10mM το καθένα, 0.4mM τελική συγκέντρωση)

2-2.5μL ανοδικό εκκινητή 10μM (0.8-1μM τελική συγκέντρωση)

2-2.5μL καθοδικό εκκινητή 10μM (0.8-1μM τελική συγκέντρωση)

H₂O-ελεύθερο από RNάσες μέχρι τελικού όγκου 22.5-23μL

Το μίγμα μοιράζεται σε σωλήνες τύπου eppendorf (22.5-23μL για κάθε δείγμα) και προστίθενται 2-2.5μL cDNA. Τα δείγματα μεταφέρονται στον κυκλοποιητή όπου για κάθε ζεύγος εκκινητών ρυθμίζονται οι παράμετροι θερμοκρασίας και χρόνου.

Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Jump Start REDTaq ReadyMix, που περιέχει:

20 mM Tris-HCl, pH 8.3,

4 MgCl₂ 25mM (1.5mM τελική συγκέντρωση)

0.4 mM από καθένα dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP)

0.06 unit/ μ L Taq DNA Polymerase

Χρησιμοποιούνται 10 μ L από το Jump Start REDTaq ReadyMix αντιδραστήριο, για κάθε δείγμα, και προστίθενται 2-2.5 μ L ανοδικού και καθοδικού εκκινητή 10 μ M (0.8-1 μ M τελική συγκέντρωση) και H₂O-ελεύθερο από RNάσες μέχρι τελικού όγκου 20 μ L.

Τα δείγματα μεταφέρονται στον κυκλοποιητή όπου για κάθε ζεύγος εκκινητών ρυθμίζονται οι παράμετροι θερμοκρασίας και χρόνου, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Προγράμματα του κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό περιοχών του cDNA των PPAR γ 2 και αδιπονεκτίνης.

	PPAR γ 2	Αδιπονεκτίνη
	Πρόγραμμα κυκλοποιητή	
Αρχική αποδιάταξη	94°C, 2min	95°C, 5min
Αποδιάταξη	94°C, 45sec	95°C, 45sec
Υβριδισμός	56°C, 45sec	52°C, 45sec
Επέκταση	72°C, 1min	72°C, 45sec
Τελική επέκταση	72°C, 5min	72°C, 10min
Αριθμός κύκλων	35	30

Η επιλογή των θερμοκρασιών και των χρόνων υβριδισμού γίνεται με βάση τα T_m του κάθε ζεύγους εκκινητών, ενώ οι υπόλοιπες θερμοκρασίες και χρόνοι είναι οι συνήθεις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα πρωτόκολλα PCR.

6.10. Ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης ενός γονιδίου με χρήση εσωτερικού προτύπου 18S

- QuantumRNA™ 18S Classic Internal Standards Kit (μέγεθος προϊόντος PCR: 488bp)
- QuantumRNA™ 18S Classic II Internal Standards Kit (μέγεθος προϊόντος PCR: 324bp)
- QuantumRNA™ 18S Universal Internal Standards Kit (μέγεθος προϊόντος PCR: 315bp)
- GoTaq DNA πολυμεράση, 5u/ μ L (Promega)
- 5x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega)
- Διάλυμα MgCl₂, 25mM (Promega)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100mM το καθένα (Promega)
- H₂O-ελεύθερο από RNάσες
- cDNA
- Πρόσθιος εκκινητής, 10 μ M

- Ανάστροφος εκκινητής, 10μM
- Σωλήνες τύπου eppendorf 0.2mL (Alfa)
- Κυκλοποιητής

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της έκφρασης ενός γονιδίου με τη μέθοδο της RT-PCR στηρίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός γονιδίου με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Η ποσότητα του προϊόντος είναι ανάλογη της αφθονίας του RNA εκμαγείου στο δείγμα και συνήθως εκφράζεται ως % διαφορά των επιπέδων του συγκεκριμένου RNA ως προς το ολικό RNA του δείγματος. Στην πράξη, ωστόσο, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται ποικίλει. Για την εξάλειψη των σφαλμάτων που προκύπτουν από τη διαφορά στην ποιότητα και ποσότητα του RNA μεταξύ δειγμάτων διεξάγεται η “σύνθετη” RT-PCR. Αυτό σημαίνει ότι σε μία PCR αντίδραση προστίθενται δύο ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος για να πολλαπλασιάσει το υπό εξέταση cDNA και το δεύτερο για να πολλαπλασιάσει ένα ενδογενές πρότυπο του οποίου η ποσότητα δεν μεταβάλλεται. Τα επίπεδα του προϊόντος του υπό εξέταση γονιδίου κανονικοποιούνται ως προς το προϊόν του προτύπου.

Θεωρητικά, ένα ιδανικό ενδογενές πρότυπο θα έπρεπε να είναι αυτό του οποίου η έκφραση δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου, μεταξύ κυτταρικών τύπων ή σε απόκριση στο μέσο διέγερσης. Το πλεονέκτημα της χρήσης του ριβοσωμικού RNA (rRNA) ως προτύπου αναφοράς συνίσταται στο γεγονός ότι το ολικό RNA στην πλειονότητα του αποτελείται από rRNA. Έτσι, με το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού RNA, καθίσταται δυνατή η εισαγωγή ίδιας και σταθερής ποσότητας rRNA σε κάθε δείγμα της αντίδρασης της RT-PCR.

Το πρόβλημα στη χρήση του rRNA είναι η αφθονία του, καθώς ένα ενδογενές εσωτερικό πρότυπο θα έπρεπε να βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με το υπό εξέταση RNA και επιπλέον το κάθε RNA έχει το δικό του επίπεδο έκφρασης. Η τεχνολογία των competimersTM αναπτύχθηκε για να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό του έτσι ώστε να μην επηρεαστεί η απόδοση των άλλων στόχων σε μία “σύνθετη” PCR. Οι 18S Competimers είναι εκκινητές τροποποιημένοι στο 3' ώστε να μπλοκάρουν τη δράση της πολυμεράσης. Αναμιγνύοντας τους εκκινητές του 18S με αυξανόμενα ποσά των τροποποιημένων εκκινητών επιτυγχάνεται μειωμένη απόδοση του πολλαπλασιασμού του 18S cDNA.

Πορεία μεθόδου

Παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης της PCR αναμιγνύοντας τα αντιδραστήρια όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.18 και επιπλέον προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα μίγματος 18S Primers: 18S Competimers, σε αναλογία καθορισμένη για κάθε υπό εξέταση γονίδιο. Ο όγκος του H₂O-ελεύθερο από RNάσες αναπροσαρμόζεται στον τελικό επιθυμητό όγκο και ακολουθείται η διαδικασία της PCR (παράγραφος 6.18).

6.11. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

- ~ Αγαρόζη
- ~ TAE
- ~ Tris
- ~ EDTA·2H₂O δινάτριο άλας
- ~ Οξικό οξύ
- ~ Βρωμιούχο αιθίδιο, 10mg/mL (Roth)
- ~ Μίγμα μορίων DNA γνωστού μεγέθους (GeneRuler 100bp DNA Ladder) 0.1mg/mL σε TE pH 7.6 (FERMENTAS)
- ~ Διάλυμα χρωστικής, 6x, 10mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.03% xylene cyanol FF, 60% γλυκερόλη και 60mM EDTA (FERMENTAS)
- ~ Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- ~ Τράπεζα UV 256nm

Παρασκευή αντιδραστηρίων

Τρις-Οξικό οξύ-EDTA (TAE) 50x: Ζυγίζονται 242g Tris base και 37.2g EDTA και διαλύονται σε δις απεσταγμένο H₂O. Προστίθενται 57.1mL οξικό οξύ και συμπληρώνεται ο όγκος με δις απεσταγμένο H₂O μέχρι 1L. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι ~8.2. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα δείκτη DNA: Αναμιγνύονται μίγμα μορίων DNA, διάλυμα χρωστικής και H₂O-ελεύθερο από RNάσες με αναλογία 1:1:4. Φυλάσσεται στους -20°C.

Πορεία μεθόδου

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5-2%. Η πηκτή παρασκευάζεται με διάλυση αγαρόζης σε κατάλληλη ποσότητα TAE 1x και βρασμό. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και όταν φτάσει στους 60°C, περίπου, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 1μg/mL πηκτώματος και το διάλυμα αφήνεται να πήξει στη συσκευή

ηλεκτροφόρησης. Στα φρεάτια που σχηματίζονται στην πηκτή τοποθετούνται 10-15μL από το προϊόν της PCR. Παράλληλα, τοποθετούνται σε ένα φρεάτιο 5μL από το διάλυμα δείκτη DNA. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος PCR και από το αν έχει προστεθεί εσωτερικό πρότυπο. Πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 80-120V. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA εμφανίζονται με την τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα UV.

6.12. Ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR

Η μεταβολή στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων που εξετάζονται μπορεί να υπολογιστεί ημιποσοτικά. Γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης και η εικόνα της πηκτής γίνεται εμφανής με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Καταγράφεται η εικόνα της πηκτής σε αρχείο υπολογιστή και οι ταινίες υπόκεινται σε πυκνομετρική σάρωση με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Image 1.37. Από την τιμή της έντασης κάθε ταινίας αφαιρείται η τιμή της έντασης του υποβάθρου της πηκτής. Η τιμή της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάται συγκρίνεται με την τιμή της έντασης των ταινιών ενός γονιδίου βασικής λειτουργίας, όπως της β-ακτίνης, ή των ταινιών του 18S rRNA. Η έκφραση των γονιδίων βασικής λειτουργίας παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα και συνεπώς αυτά χρησιμοποιούνται για να κανονικοποιηθούν οι τιμές της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάται, εξαλείφοντας έτσι σφάλματα στους υπολογισμούς λόγω διαφορετικής απόδοσης σε cDNA κατά την αντίδραση της RT από δείγμα σε δείγμα. Τελικά, γίνεται σύγκριση του λόγου της τιμής της έντασης της ταινίας του γονιδίου που μελετάται προς την τιμή της έντασης της ταινίας της β-ακτίνης ή του 18S rRNA.

7 Αποτελέσματα

7.1.Μελέτη της επίδρασης DHA και ALA στην πορεία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αρουραίου

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μελετών στον άνθρωπο έχει αναδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των PUFA στις διαταραχές που σχετίζονται με τα λιπίδια. Παρά την πληθώρα των βιβλιογραφικών *in vivo* μελετών για την ευεργετική δράση των ω3 λιπαρών οξέων, 18:3ω3 (ALA) και 22:6ω3 (DHA), στη μείωση της υπερπλασίας και της υπερτροφίας του λιπώδους ιστού καθώς και των κλινικών συμπτωμάτων παθολογικών καταστάσεων όπως της φλεγμονής, της υπέρτασης και του σακχαρώδους διαβήτη τύπου-2,^{147,163-165} ελάχιστες είναι οι μελέτες που αναφέρονται στην επίδραση αυτών των οξέων στη διαφοροποίηση πρωτογενών προλιποκυττάρων.¹⁶⁶ Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για μια σειρά πειραμάτων στα οποία εξετάστηκε αφ' ενός η επίδραση του ALA και του DHA στη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων αρουραίου και αφ' ετέρου ο πιθανός μεταβολισμός του ALA ή του DHA στα κύτταρα αυτά. Ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης έγινε αφ' ενός με τη χρήση της χρωστικής Oil Red O (Μέθοδοι & Υλικά, 6.3), η οποία χρωματίζει εκλεκτικά τα τριγλυκερίδια και αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, αφετέρου δε με κυτταρομετρία ροής (Μέθοδοι & Υλικά, 6.4).

Κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα παρατηρούνται σημαντικές μορφολογικές μεταβολές (το σχήμα των προλιποκυττάρων είναι ίδιο με αυτό των ινοβλαστών, ενώ τα λιποκύτταρα είναι στρογγυλά). Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των προλιποκυττάρων, τα οποία έχουν αρχίσει να διαφοροποιούνται, είναι η συσσώρευση TG. Τα TG δημιουργούν χαρακτηριστικές λιποσταγόνες στο εσωτερικό των κυττάρων, των οποίων το μέγεθος αυξάνει με την πρόοδο της διαφοροποίησης. Οι λιποσταγόνες αυτές είναι ευδιάκριτες κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Με τη χρώση των κυττάρων με την ειδική χρωστική Oil Red O, η οποία δεσμεύεται ειδικά στο λίπος αφήνοντας τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου ανέπαφα, οι χρωματισμένες λιποσταγόνες γίνονται ιδιαίτερα ευδιάκριτες στο μικροσκόπιο.

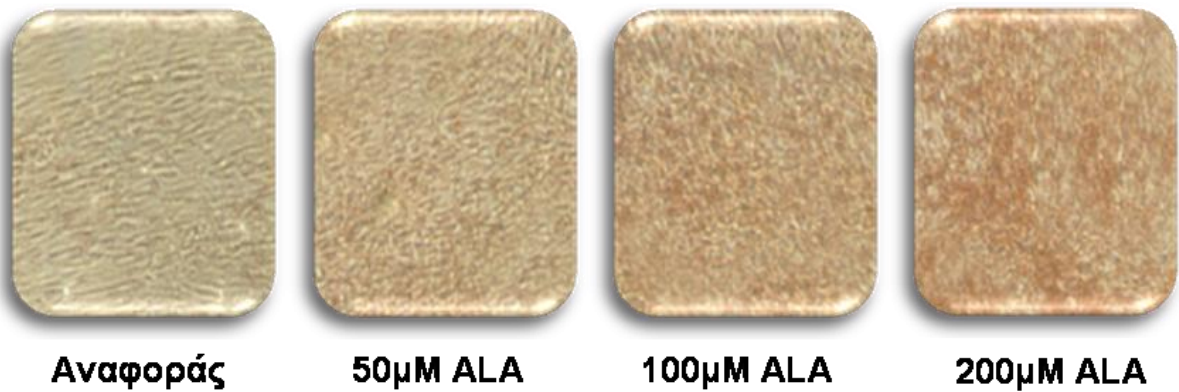
Η κυτταρομετρία ροής βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη της διαφοροποίησης κυττάρων, κυρίως όμως μέσω της χρήσης αντισωμάτων. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, σχετικά πρόσφατα στη βιβλιογραφία έχει προταθεί ένας επιπλέον τρόπος μελέτης της διαφοροποίησης προλιποκυττάρων κυτταρικής σειράς 3T3-L1 με κυτταρομετρία ροής, στον οποίο συσχετίζεται η μεταβολή της εσωτερικής πολυπλοκότητας των κυττάρων (κάθετος σκεδασμός, SS) και η αύξηση του μεγέθους (οριζόντιος σκεδασμός) με την συσσώρευση TG στο εσωτερικό τους και την δημιουργία λιποσταγόνων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση

αδιαφοροποιήτων και διαφοροποιημένων προλιποκυττάρων, με βάση την μεταβολή στο μέγεθος και στην πολυπλοκότητά τους. Ήταν λοιπόν ιδιαίτερα ελκυστική προοπτική η δυνατότητα χρησιμοποίησης της κυτταρομετρίας ροής για την μελέτη της διαφοροποίησης προλιποκυττάρων αρουραίου χωρίς την χρήση αντισωμάτων. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα αναπτύχθηκε από το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και το Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητα, Γ.Ν.Α. «Ευαγγελισμός», μέθοδος μελέτης της πορείας της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αρουραίου με κυτταρομετρία ροής.¹⁷⁵ Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη, ακριβής και χαμηλού κόστους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη της πορείας της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Σε όλα τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν προλιποκύτταρα γενιάς P₂ απομονωμένα από τον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό αρουραίων τύπου Wistar μικρής ηλικίας.⁸⁶

7.1.1. Μελέτη της επίδρασης του ALA στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση

Τα προλιποκύτταρα, αφού έφτασαν σε κατάσταση συμβολής, αφέθηκαν με το ίδιο μέσο καλλιέργειας προλιποκυττάρων για ακόμη δυο ημέρες και την τρίτη ημέρα (χρόνος 0) απομακρύνθηκε το μέσο καλλιέργειας και προστέθηκε το μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων, παρουσία υδατικού διαλύματος ή ALA/BSA, σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1.¹⁶⁸ Ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες προλιποκυττάρων στις οποίες προστέθηκε ποσότητα BSA. Η BSA, που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελεύθερη από λιπαρά οξέα. Παράλληλα γινόταν μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων, για την παρακολούθηση μεταβολών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Το μέσο διαφοροποίησης ανανεωνόταν κάθε 2^η μέρα και μετά από 7 ημέρες ακολούθησε χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Oil Red O (Μέθοδοι & Υλικά, 6.3), μικροσκοπική παρατήρηση των επιμέρους καλλιεργείων και λήψη φωτογραφιών, για την ποιοτική εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης (σχήμα 12).

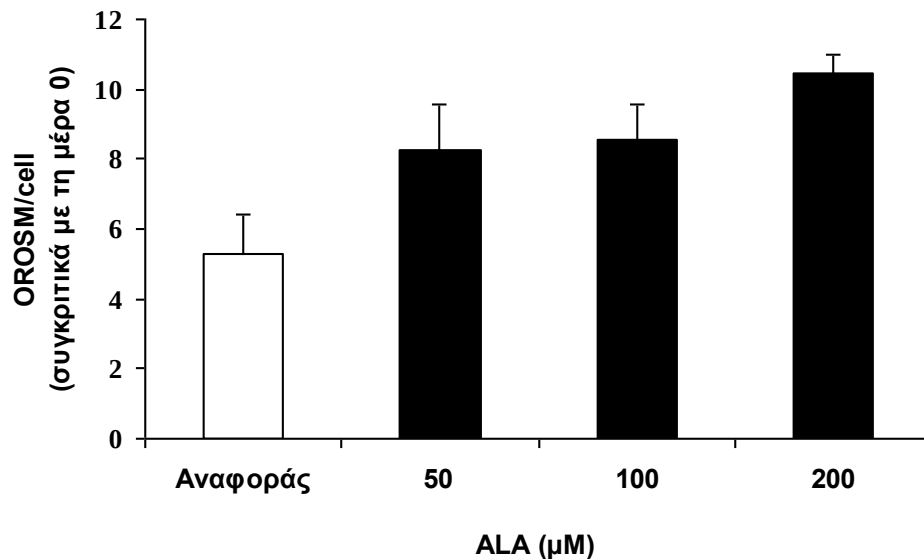


Σχήμα 12: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες κυττάρων, χρωματισμένων με τη χρωστική Oil Red O, παρουσία 50μM, 100μM, 200μM ALA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Κλίμακα=20μM.

Στις φωτογραφίες φαίνεται ότι το δείγμα αναφοράς έχει δεσμεύσει σε πολύ περιορισμένο βαθμό τη χρωστική, ενώ οι καλλιέργειες που επώαστηκαν με ALA είναι έντονα χρωματισμένες και μάλιστα η χρώση γίνεται πιο έντονη από το δείγμα που επώαστηκε με συγκέντρωση 50μM ALA προς το δείγμα που επώαστηκε με συγκέντρωση 200μM ALA.

Δεδομένου ότι η δέσμευση της χρωστικής Oil Red O πραγματοποιείται από το λιπιδικό περιεχόμενο των διαφοροποιημένων κυττάρων, είναι εύκολο σε αυτή την περίπτωση να εκτιμηθεί ότι η επίδραση του ALA στην πορεία διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του στο μέσο διαφοροποίησης.

Μετά τη χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Oil Red O εκχυλίστηκε η χρωστική από το εσωτερικό των κυττάρων με ισοπροπανόλη, ακολούθησε φωτομέτρηση και έγινε προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης (σχήμα 13).



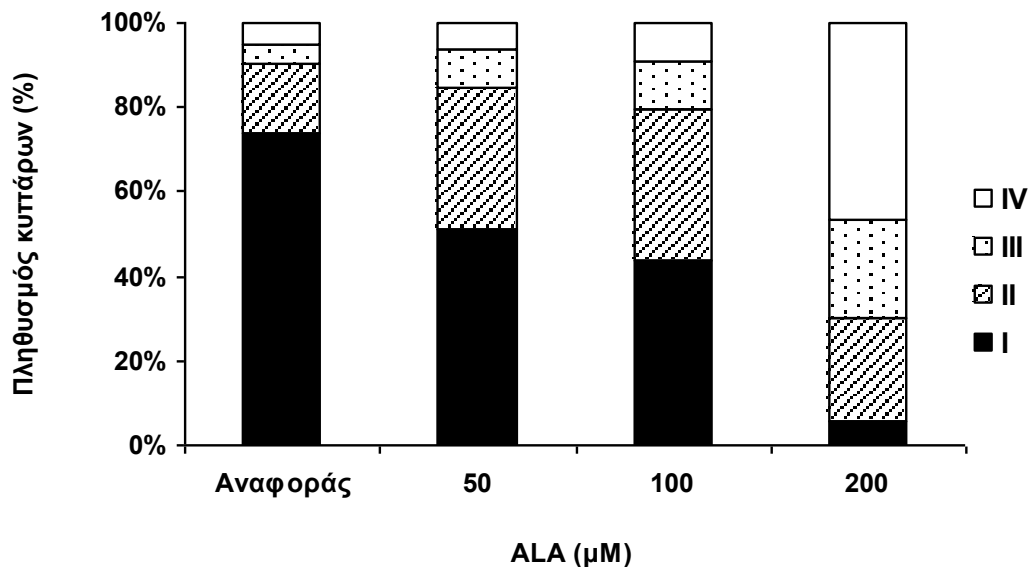
Σχήμα 13: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του ALA στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επώαστηκαν με 50μM, 100μM, 200μM ALA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης έγινε με τη χρωστική Oil Red O. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος $\pm$ SEM 3 πειραμάτων. Οι τιμές των απορροφήσεων, που λαμβάνονται για κάθε φιάλη, αντιπροσωπεύουν το ποσό των TG τα οποία έχουν χρωσθεί με τη χρωστική Oil Red O (Oil Red O stained materials, OROSM). Οι OROSM εκφράζονται ανά αριθμό κυττάρων (OROSM/cell), που περιέχεται σε κάθε φιάλη καλλιέργειας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές χρωματισμένων προλιποκυττάρων σε κατάσταση συμβολής.

Κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων λαμβάνει χώρα η συσσώρευση λίπους στο εσωτερικό τους και η δημιουργία λιποσταγόνων. Η χρωστική Oil Red O δεσμεύεται στο εσωτερικό των κυττάρων λόγω του λιπιδικού περιεχομένου τους και μάλιστα η ποσότητα της χρωστικής που δεσμεύεται από τα κύτταρα είναι ανάλογη του βαθμού διαφοροποίησης αυτών.

Επώαση προλιποκυττάρων με 50, 100 και 200μM ALA στο μέσο διαφοροποίησης, για 7 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών OROSM/cell κατά 1.5, 1.6 και 2.0 φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς. Η συγκέντρωση των TG αυξήθηκε αναλογικά με τη συγκέντρωση του ALA στο μέσο διαφοροποίησης, αποτέλεσμα που επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Μέθοδοι & Υλικά, 6.4). Εν συντομία, τα διαφοροποιημένα κύτταρα αποκολλώνται από την φιάλη καλλιέργειας και ακολουθεί φυγοκέντρωση, έκπλυση και ανάλυση τους στον κυτταρομετρητή.

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι ο οριζόντιος σκεδασμός του κυτταρομετρητή, που παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου, και ο κάθετος, που σχετίζεται με την δομή του κυττάρου και την εσωτερική πολυπλοκότητα του. Οι μεταβολές των δυο παραπάνω παραμέτρων συσχετίζονται με τη συσσώρευση λίπους στο εσωτερικό του κυττάρου και τη

δημιουργία λιποσταγόνων. Ο αριθμός των κυττάρων που μετράται κάθε φορά είναι σταθερός, 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα (σχήμα 14).



Σχήμα 14: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του ALA στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 50μM, 100μM, 200μM ALA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Τα ραβδογράμματα δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων με τον αντίστοιχο βαθμό διαφοροποίησης. Η περιοχή I περιλαμβάνει κύτταρα παρόμοιας πολυπλοκότητας με εκείνα που βρίσκονται σε συμβολή ενώ τα επόμενα τρία κλάσματα (με τη σειρά που φαίνονται στο διάγραμμα) περιλαμβάνουν κύτταρα με αυξανόμενη πολυπλοκότητα.

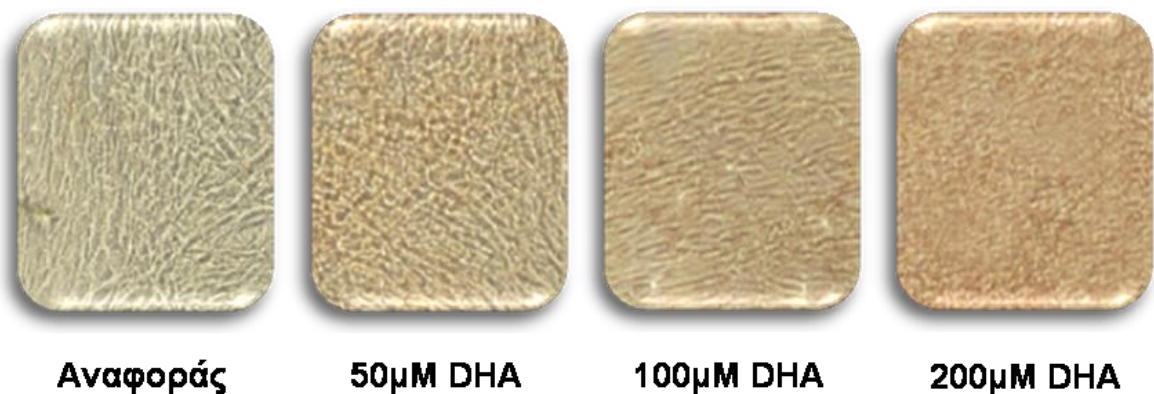
Κατά τη διαφοροποίηση τα κύτταρα αυξάνουν την εσωτερική πολυπλοκότητά τους αλλά και το μέγεθός τους (συσσώρευση λίπους). Επομένως η περιοχή I περιλαμβάνει κύτταρα παρόμοιας εσωτερικής πολυπλοκότητας και μεγέθους με εκείνα που βρίσκονται σε κατάσταση συμβολής, ενώ οι ακόλουθες τρεις περιοχές του κάθε ραβδογράμματος (II, III και IV) περιλαμβάνουν κύτταρα με βαθμιαία αυξανόμενη εσωτερική πολυπλοκότητα και αυξανόμενο μέγεθος. Το δείγμα αναφοράς περιλαμβάνει κύτταρα που επωάστηκαν με μέσο διαφοροποίησης απουσία λιπαρού οξέος. Από το πείραμα αυτό φαίνεται ότι το ALA επάγει τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ειδικότερα φάνηκε ότι η παρουσία του ALA (200Μμ) στο μέσο διαφοροποίησης κυρίως αυξάνει το ποσοστό των πιο διαφοροποιημένων κυττάρων (κατά 9 φορές, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, κλάσμα IV, σχήμα 14) και μειώνει τον αριθμό των πιο αδιαφοροποίητων κυττάρων (κατά 12 φορές, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, κλάσμα I, σχήμα 14).

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις του ALA (50, 100 και 200μM) με τις οποίες επωάστηκαν τα προλιποκύτταρα δεν είχαν καμία τοξική επίδραση.

7.1.2. Μελέτη της επίδρασης του DHA στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση

Παράλληλα με την επίδραση του ALA σε πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων μελετήθηκε και η επίδραση του DHA. Τα προλιποκύτταρα, αφού έφτασαν σε κατάσταση συμβολής, αφέθηκαν με το ίδιο μέσο καλλιέργειας προλιποκυττάρων για ακόμη δυο ημέρες και την τρίτη ημέρα (χρόνος 0) απομακρύνθηκε το μέσο καλλιέργειας και προστέθηκε το μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων, παρουσία υδατικού διαλύματος DHA/BSA, σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1.¹⁶⁸ Η BSA, που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελεύθερη από λιπαρά οξέα. Παράλληλα γινόταν μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων, για την παρακολούθηση μεταβολών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

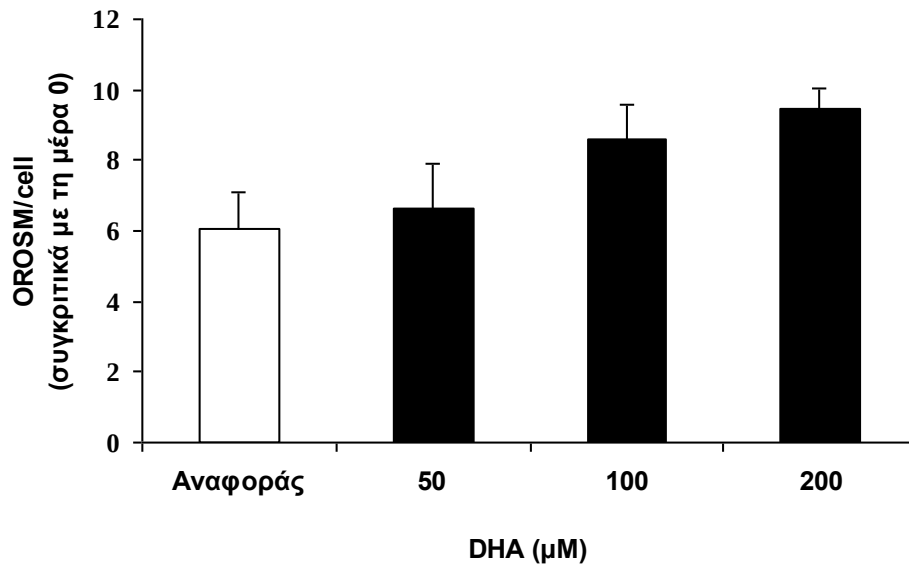
Το μέσο διαφοροποίησης ανανεωνόταν κάθε 2^η μέρα και μετά από 7 ημέρες ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των επιμέρους καλλιέργειών και λήψη φωτογραφιών, για την ποιοτική εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης (σχήμα 15).



Σχήμα 15: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες κυττάρων, χρωματισμένων με τη χρωστική Oil Red O, παρουσία 50μM, 100μM, 200μM DHA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Κλίμακα=20μM.

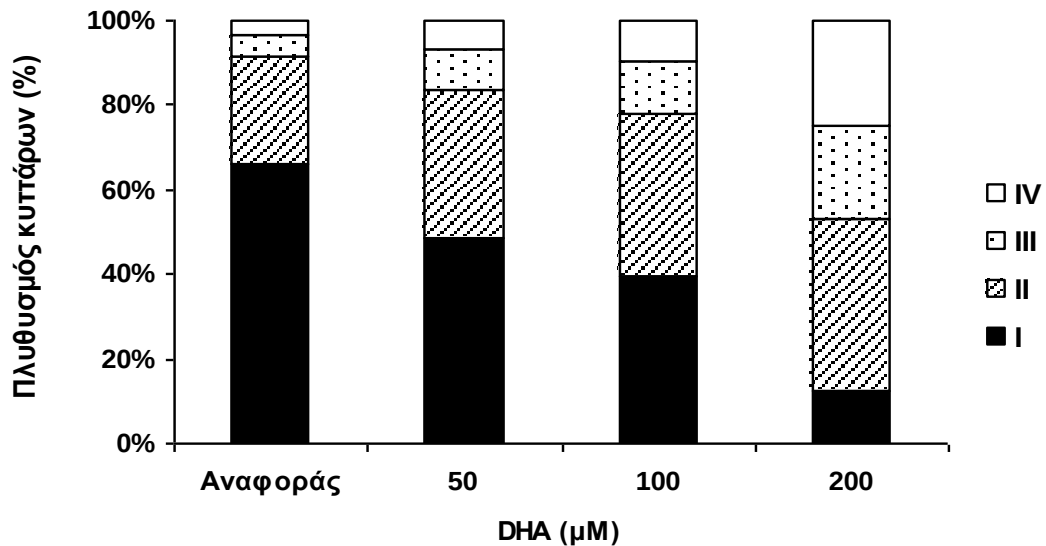
Στις φωτογραφίες φαίνεται ότι το δείγμα αναφοράς έχει δεσμεύσει σε πολύ περιορισμένο βαθμό τη χρωστική, ενώ οι καλλιέργειες που επώστηκαν με DHA είναι έντονα χρωματισμένες και μάλιστα η χρώση γίνεται πιο έντονη από το δείγμα που επώστηκε με συγκέντρωση 50μM DHA προς το δείγμα που επώστηκε με συγκέντρωση 200μM DHA. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η επίδραση του DHA στην πορεία διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του στο μέσο διαφοροποίησης.

Μετά τη χρώση των κυττάρων με τη χρωστική Oil Red O εκχυλίστηκε η χρωστική από το εσωτερικό των κυττάρων και έγινε προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης (σχήμα 16).



Σχήμα 16: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του DHA στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επώαστηκαν με 50μM, 100μM, 200μM DHA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης έγινε με τη χρωστική Oil Red O. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος $\pm$ SEM 3 πειραμάτων. Οι τιμές των απορροφήσεων, που λαμβάνονται για κάθε φιάλη, αντιπροσωπεύουν το ποσό των TG τα οποία έχουν βαφτεί με τη χρωστική Oil Red O (Oil Red O stained materials, OROSM). Οι OROSM εκφράζονται ανά αριθμό κυττάρων (OROSM/cell), που περιέχεται σε κάθε φιάλη καλλιέργειας, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές χρωματισμένων προλιποκυττάρων σε κατάσταση συμβολής.

Επώαση προλιποκυττάρων με 50, 100 ή 200μM DHA στο μέσο διαφοροποίησης, για 7 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών OROSM/cell κατά 1.1, 1.4 και 1.6 φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς. Η συγκέντρωση των TG αυξήθηκε αναλογικά με τη συγκέντρωση του DHA στο μέσο διαφοροποίησης. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με πειράματα κυτταρομετρίας ροής, τα οποία επίσης έδειξαν ότι η παρουσία του DHA (200μM) στο μέσο διαφοροποίησης κυρίως αυξάνει το ποσοστό των πιο διαφοροποιημένων κυττάρων (κατά 8 φορές, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, κλάσμα IV, σχήμα 17) και μειώνει τον αριθμό των πιο αδιαφοροποίητων κυττάρων (κατά 5 φορές, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς, κλάσμα I, σχήμα 17).



Σχήμα 17: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του DHA στη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 50μM, 100μM, 200μM DHA ή με BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Τα ραβδογράμματα δείχνουν το ποσοστό των κυττάρων με τον αντίστοιχο βαθμό διαφοροποίησης. Η περιοχή I περιλαμβάνει κύτταρα παρόμοιας πολυπλοκότητας με εκείνα που βρίσκονται σε συμβολή ενώ τα επόμενα τρία κλάσματα (με τη σειρά που φαίνονται στο διάγραμμα) περιλαμβάνουν κύτταρα με αυξανόμενη πολυπλοκότητα.

Από τα σχήματα 12-17 είναι φανερό ότι και στις δύο περιπτώσεις τα λιπαρά οξέα επάγουν την πορεία διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων αναλογικά με τη συγκέντρωσή τους στο μέσο διαφοροποίησης. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η επίδραση του ALA στην πορεία διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα είναι ισχυρότερη, συγκρινόμενη με την επίδραση του DHA.

7.1.3. Προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των ALA και DHA στην πορεία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων αρουραίου

Ο PPARγ επάγεται κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη δέσμευση, την πρόσληψη και την αποθήκευση λιπαρών οξέων. Η σημασία του PPARγ στη λιπογένεση έχει αναδειχθεί με διάφορους τρόπους.^{85,113} Ιδιαίτερα, έχει αναδειχθεί ο ρόλος του PPARγ2, αφού η εκτοπική έκφραση του PPARγ2, και όχι του PPARγ1, αποδείχθηκε ικανή να διεγείρει ξανά τη λιπογένεση. Από τα παραπάνω στοιχεία γίνεται φανερό πως ο PPARγ2 κατέχει ένα μοναδικό ρόλο στην πορεία της διαφοροποίησης και αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή αυτής της πορείας.¹¹⁵

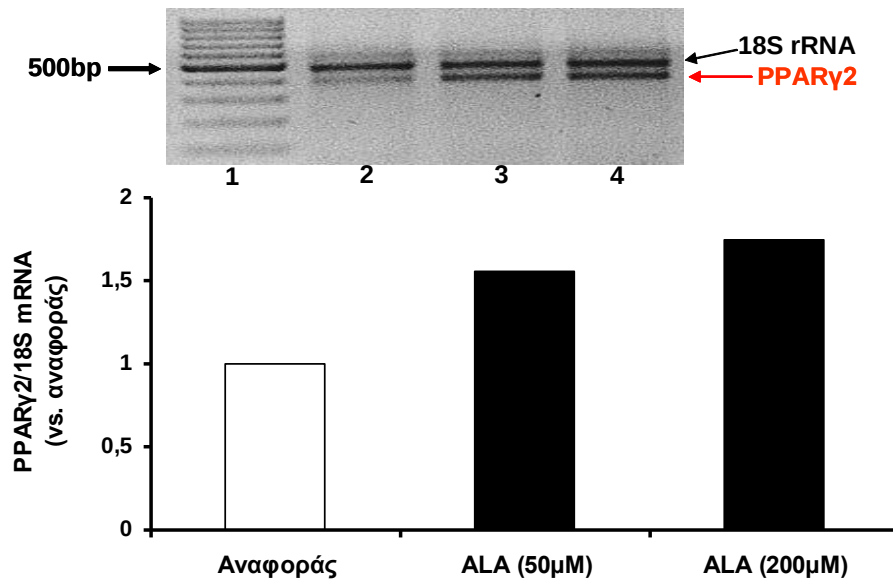
Τα PUFA μπορούν να επάγουν την *in vitro* διαφοροποίηση σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα SFA και η επίδραση τους αυτή έχει συνδυαστεί με την ικανότητα τους να δρουν τα ίδια ή τα παράγωγά τους ως αγωνιστές του PPAR γ και συγκεκριμένα ενεργοποιώντας τον PPAR γ 2.¹⁶⁰

Με σκοπό τη προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των ALA και DHA στην πορεία διαφοροποίησης και την πιθανή εμπλοκή του PPAR γ μελετήθηκε η επίδραση των οξέων αυτών στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ 2, σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους. Για το σκοπό αυτό αναζητήθηκαν και βρέθηκαν στο διαδίκτυο κατατεθειμένες αλληλουχίες για το mRNA του PPAR γ 2. Σχεδιάστηκαν εκκινητές με τη βοήθεια του προγράμματος primer select του lasergene 6 και ελέγχθηκαν μέσω του εργαλείου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) της ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης PubMed για την καταλληλότητά τους. Η αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR, φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο του PPAR γ 2 αρουραίου.

Αλληλουχία εκκινητών PPAR γ 2	πρόσθιος 5'-GGT GAA ACT CTG GGA GAT CC-3'
	ανάστροφος 5'-TGA GGG AGT TTG AAG ACT CTT C-3'
Μέγεθος προϊόντος	400bp

Για τη σειρά των πειραμάτων αυτών τα κύτταρα, αφού έφτασαν σε κατάσταση συμβολής, αφέθηκαν με το ίδιο μέσο καλλιέργειας για ακόμη δυο ημέρες και την τρίτη ημέρα (χρόνος 0) απομακρύνθηκε το μέσο καλλιέργειας και προστέθηκε το μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων, παρουσία υδατικού διαλύματος ALA/BSA, σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1.¹⁶⁸ Μετά από 7 ημέρες, απομονώθηκε ολικό RNA (Μέθοδοι & Υλικά, 6.7) από τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα και μετατράπηκε σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Μέθοδοι & Υλικά, 6.8). Ακολούθησε PCR με δύο ζεύγη εκκινητών σε κάθε σειρά δειγμάτων (Μέθοδοι & Υλικά, 6.9). Ένα ζεύγος για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου του PPAR γ 2 και ένα ζεύγος για το 18S rRNA (με αναλογία Primers:Competimers 2:8/1.5μL). Το 18S rRNA αποτελεί εσωτερικό πρότυπο αφού η έκφραση του παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα και χρησιμοποιείται για να κανονικοποιηθούν οι τιμές της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάται (Μέθοδοι & Υλικά, 6.10). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1.5% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE που περιέχει 5μg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Στο σχήμα 18 φαίνεται η πηκτή αгарόζης (ένθετο) και το ιστόγραμμα απεικονίζει την επίδραση 50 και 200μM ALA στην έκφραση του γονιδίου του PPAR γ 2, μετά από 7 ημέρες, που προέκυψε μετά από κατάλληλη επεξεργασία (Μέθοδοι & Υλικά, 6.12).

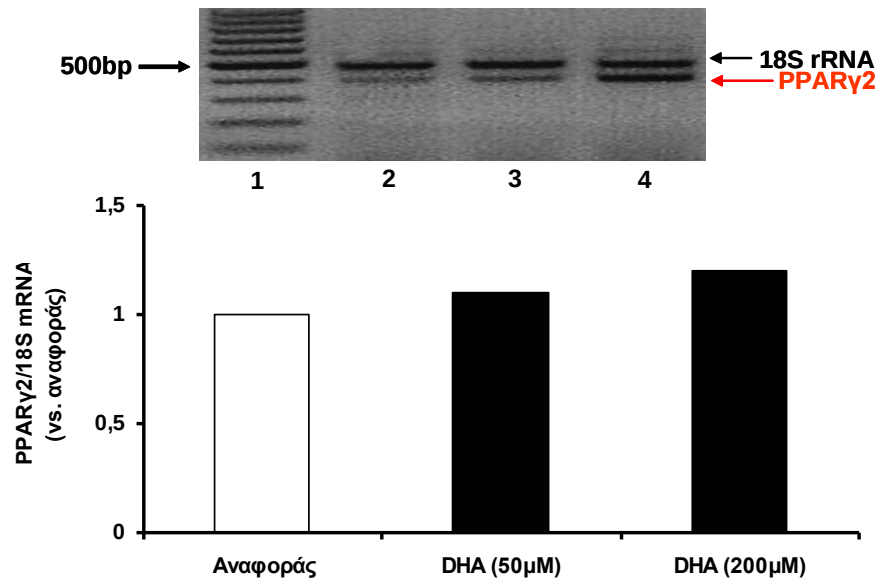


Σχήμα 18: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του ALA στην έκφραση του γονιδίου του PPARγ2 κατά τη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 50μM, 200μM ALA/BSA (σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1) ή BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Η γονιδιακή έκφραση του PPARγ2 μετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου 18S rRNA (αναλογία Primers:Competimers 2:8/1.5μL). Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα στη μονάδα ως προς το δείγμα αναφοράς και αποτελούν το μέσο όρο 2 πειραμάτων. *Ένθετο.* Φωτογραφία του πηκτώματος αγαρόζης από την οποία προέκυψε το ιστόγραμμα με κατάλληλη επεξεργασία. Lane 1: δείκτης μεγεθών DNA, lane 2: δείγμα αναφοράς, lane 3: 50μM ALA, lane 4: 200μM ALA.

Από το σχήμα 18 φαίνεται ότι η παρουσία 50μM και 200μM ALA στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες αυξάνει την έκφραση του PPARγ2 κατά 1.6 και 1.8 φορές, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς.

Στη συνέχεια, ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία μελετήθηκε η δοσοεξαρτώμενη επίδραση του DHA στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ2. Στα προλιποκύτταρα προστέθηκε μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων, παρουσία υδατικού διαλύματος DHA/BSA, σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1¹⁶⁸ ενώ ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες προλιποκυττάρων στις οποίες προστέθηκε ποσότητα BSA.

Μετά από 7 ημέρες πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα και μετατράπηκε σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Ακολούθησε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE που περιέχει 5μg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Στο σχήμα 19 φαίνεται η πηκτή αγαρόζης (ένθετο) και το ιστόγραμμα απεικονίζει την επίδραση 50 και 200μM DHA στην έκφραση του γονιδίου του PPARγ2, μετά από 7 ημέρες, που προέκυψε μετά από κατάλληλη επεξεργασία.



Σχήμα 19: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του DHA στην έκφραση του γονιδίου του PPARγ2 κατά τη διαφοροποίηση λιποκυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 50μM, 200μM DHA/BSA (σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1) ή BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Η γονιδιακή έκφραση του PPARγ2 μετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου 18S rRNA (αναλογία Primers:Competitors 2:8/1.5μL). Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα στη μονάδα ως προς το δείγμα αναφοράς και αποτελούν το μέσο όρο 2 πειραμάτων. *Ενθετο.* Φωτογραφία του πηκτώματος αгарόζης από την οποία προέκυψε το ιστόγραμμα με κατάλληλη επεξεργασία. Lane 1: δείκτης μεγεθών DNA, lane 2: δείγμα αναφοράς, lane 3: 50μM DHA, lane 4: 200μM DHA.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η επίδραση του DHA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του PPARγ2 και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως και του ALA, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στην πορεία της διαφοροποίησης παρουσία αυτών των λιπαρών οξέων.

Στη συνέχεια έγινε συγκριτική μελέτη της επίδρασης των λιπαρών οξέων ALA και DHA στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ2. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση των δυο αυτών λιπαρών οξέων στην έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης. Η αδιπονεκτίνη εκκρίνεται σχεδόν αποκλειστικά, από τα λιποκύτταρα⁵² και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση της γλυκόζης και των λιπιδίων. Μειώνει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ, αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης στους μυς και ενεργοποιεί την οξείδωση των λιπαρών οξέων και στους δύο ιστούς. Αντίθετα με σχεδόν όλες τις λιποκίνες, η έκφραση και η συγκέντρωση της στον ορό μειώνεται στα παχύσαρκα άτομα και σε καταστάσεις που εμφανίζεται αντίσταση στην ινσουλίνη.⁶⁹

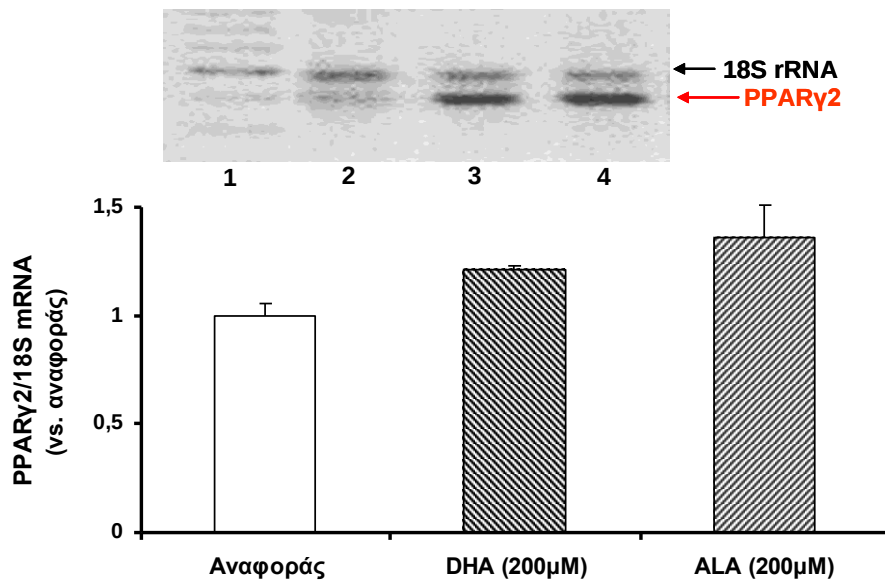
Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα, αφού έφτασαν σε κατάσταση συμβολής, αφέθηκαν με το ίδιο μέσο καλλιέργειας για ακόμη δυο ημέρες και την τρίτη ημέρα (χρόνος 0) απομακρύνθηκε το

μέσο καλλιέργειας και προστέθηκε το μέσο διαφοροποίησης προλιποκυττάρων, παρουσία υδατικού διαλύματος 200μM ALA/BSA ή 200μM DHA/BSA, σε αναλογία λιπαρού οξέος:BSA, 4:1.¹⁶⁸ Μετά από 7 ημέρες, απομονώθηκε ολικό RNA, μετατράπηκε σε cDNA και ακολούθησε PCR με δύο ζεύγη εκκινητών σε κάθε σειρά δειγμάτων. Ένα ζεύγος εκκινητών για το υπό εξέταση γονίδιο (πίνακες 3 και 4) και ένα ζεύγος για το 18S με την κατάλληλη αναλογία Primers:Competimers (αναλογίες Primers:Competimers 2:8/1.5μL για το γονίδιο του PPARγ2 και Primers:Competimers 1:9/1.5μL για το γονίδιο της αδιπονεκτίνης).

Πίνακας 4: Αλληλουχία των εκκινητών καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR για το γονίδιο της αδιπονεκτίνης αρουραίου.

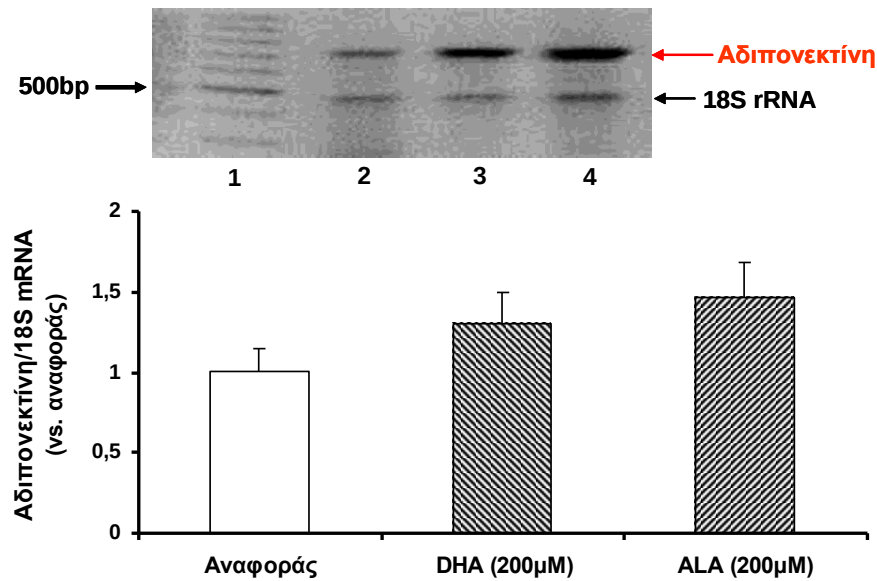
Αλληλουχία εκκινητών αδιπονεκτίνης αρουραίου	πρόσθιος 5'- AGG ATC CAT GCT ACT GTT GCA AGC GCT C -3',
	ανάστροφος 5'- GAA GCT TGT TGG TAT CAT GGT AGA GAA GG -3'
Μέγεθος προϊόντος	750bp

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% και στα σχήματα 20 και 21 φαίνονται τα πηκτώματα αγαρόζης (ένθετα) καθώς και τα ιστόγραμμα, που απεικονίζουν την επίδραση 200μM DHA ή 200μM ALA στην έκφραση του γονιδίου του PPARγ2 (σχήμα 20) και της αδιπονεκτίνης (σχήμα 21), μετά από 7 ημέρες.



Σχήμα 20: Επίδραση του DHA ή ALA στην έκφραση του γονιδίου του PPARγ2. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 200μM DHA ή 200μM ALA ή BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Η γονιδιακή έκφραση του PPARγ2 μετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου 18S rRNA. (αναλογίες Primers:Competimers 2:8/1.5μL). Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα στη μονάδα ως προς το δείγμα αναφοράς και αποτελούν το μέσο όρο $\pm$ SEM 3 πειραμάτων. Ένθετο. Φωτογραφία του

πηκτώματος αгарόζης από την οποία προέκυψε το ιστόγραμμα με κατάλληλη επεξεργασία. Lane 1: δείκτης μεγεθών DNA, lane 2: δείγμα αναφοράς, lane 3: 200μM DHA, lane 4: 200μM ALA.



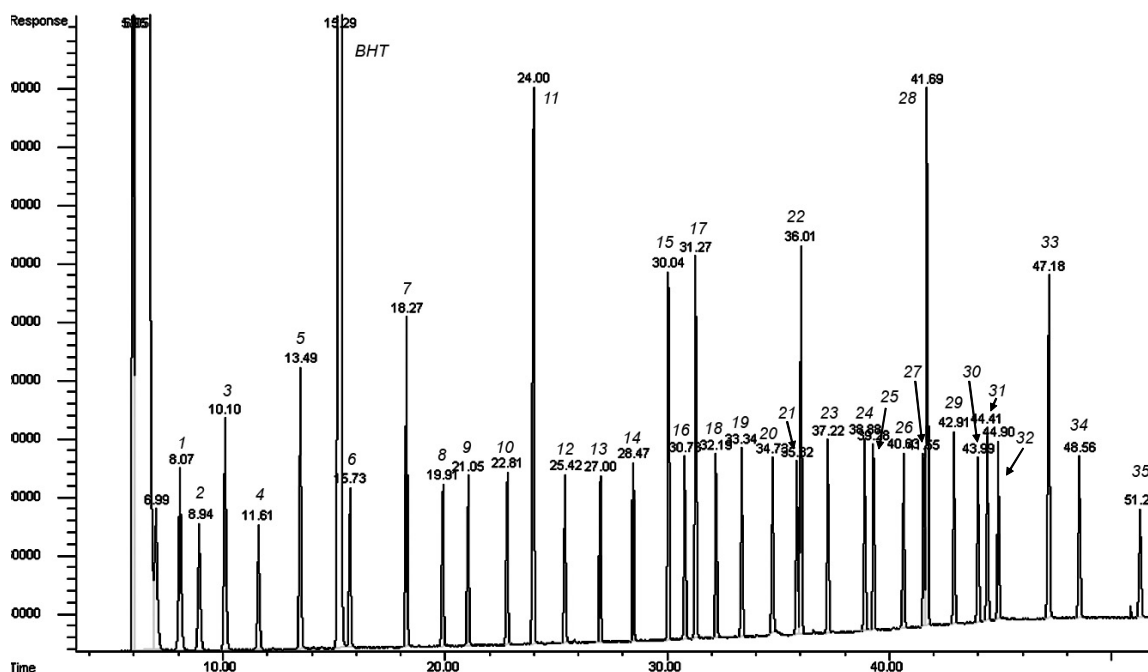
Σχήμα 21: Επίδραση του DHA ή ALA στην έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 200μM DHA ή 200μM ALA ή BSA (δείγμα αναφοράς) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Η γονιδιακή έκφραση της αδιπονεκτίνης μετρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου 18S rRNA. (αναλογίες Primers:Competimers 1:9/1.5μL). Τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα στη μονάδα ως προς το δείγμα αναφοράς και αποτελούν το μέσο όρο $\pm$ SEM 3 πειραμάτων. Ένθετο. Φωτογραφία του πηκτώματος αгарόζης από την οποία προέκυψε το ιστόγραμμα με κατάλληλη επεξεργασία. Lane 1: δείκτης μεγεθών DNA, lane 2: δείγμα αναφοράς, lane 3: 200μM DHA, lane 4: 200μM ALA.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 20, η έκφραση του γονιδίου του PPAR γ 2 είναι μεγαλύτερη παρουσία του ALA στο μέσο διαφοροποίησης, συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται παρουσία του DHA. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το ALA αποτελεί καλύτερο αγωνιστή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα και επάγει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων αρουραίου σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι το DHA. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για την έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης (σχήμα 21), προτείνοντας επίσης την μεγαλύτερη επαγωγική ικανότητα του ALA στη διαφοροποίηση.

7.2.Μελέτη του μεταβολισμού των DHA και ALA σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου

Στη συνέχεια έγινε μελέτη του προφίλ των λιπαρών οξέων καθώς και των ω 3 λιπαρών οξέων στα λιπίδια των διαφοροποιημένων κυττάρων, μετά από επίδραση ALA και DHA, με αέρια χρωματογραφία (Μέθοδοι & Υλικά, 6.6). Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες

προλιποκυττάρων γενιάς P₂ και ακολουθήθηκε η πορεία που αναφέρεται παραπάνω. Το μέσο διαφοροποίησης ανανεωνόταν κάθε 2^η μέρα ενώ μετά από 7 ημέρες απομακρύνθηκε το μέσο διαφοροποίησης, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και έγινε απομόνωση των ολικών λιπιδίων των κυττάρων με τη μέθοδο Folch (Μέθοδοι & Υλικά, 6.5). Στη συνέχεια, τα δείγματα των ολικών λιπιδίων μετεστεροποιήθηκαν με μεθανόλη παρουσία BF₃, οπότε προέκυψαν οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που ενέθηκαν στον αέριο χρωματογράφο. Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων και με σκοπό την ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων, ενιέται στον αέριο χρωματογράφο μίγμα πρότυπων μεθυλεστέρων. Ένα τυπικό χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων μεθυλεστέρων φαίνεται στο σχήμα 22, ενώ τα αποτελέσματα της μελέτης της κατανομής των λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων αρουραίου παρουσιάζονται στον πίνακα 5.



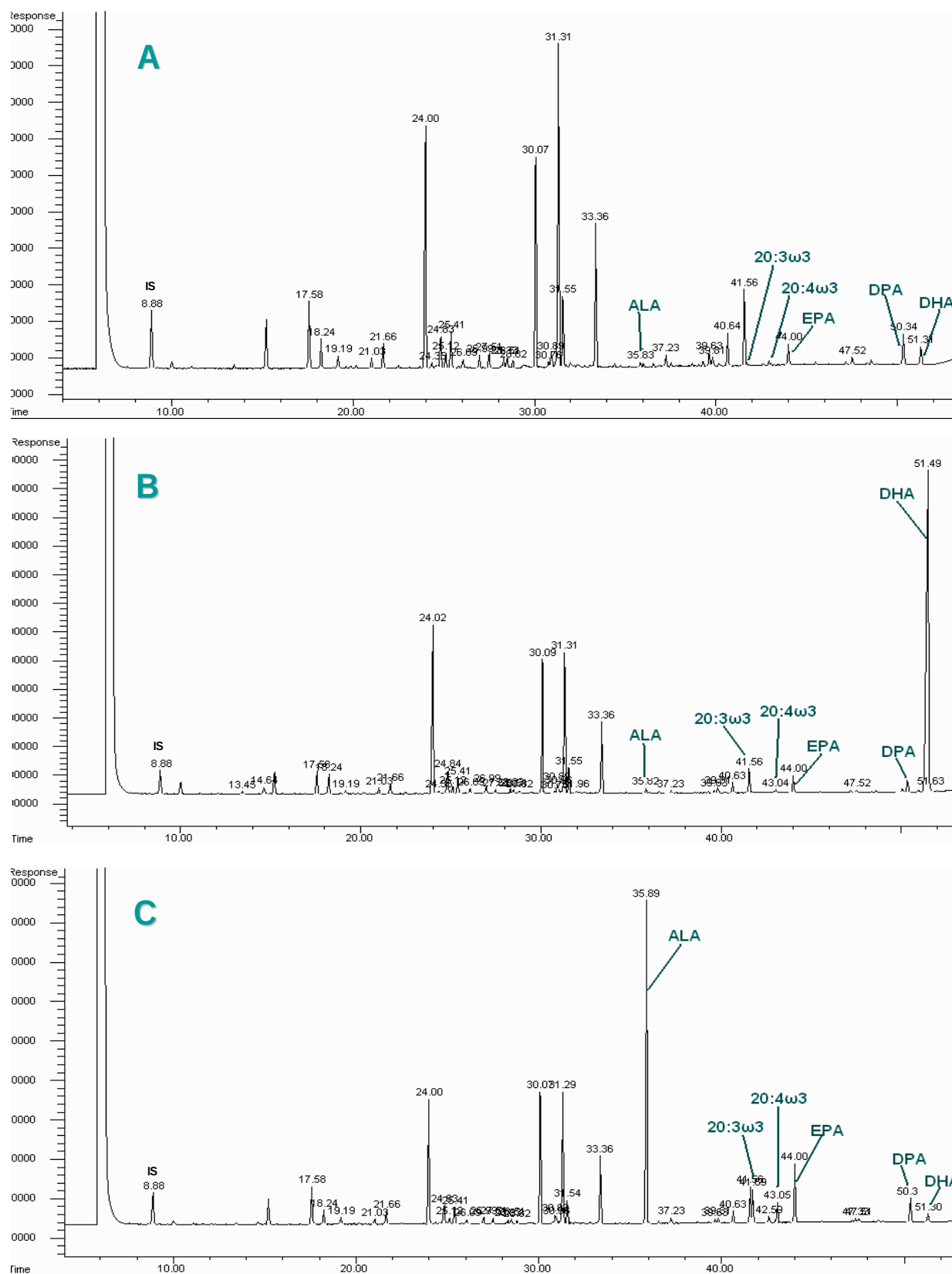
Σχήμα 22: Χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων μεθυλεστέρων. Η ανάλυση έγινε σε αέριο χρωματογράφο Hewlett Packard 6890 με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Στο χρωματογράφημα φαίνονται οι χρόνοι ανάσχεσης καθώς και οι μεθυλεστέρες των 1: 6:0, 2: 8:0, 3: 10:0, 4: 11:0, 5: 12:0, 6: 13:0, 7: 14:0, 8: 14:1, 9: 15:0, 10: 15:1, 11: 16:0, 12: 16:1ω7, 13: 17:0, 14: 17:1, 15: 18:0, 16: 18:1 trans, 17: 18:1ω9 cis, 18: 18:2 cis-trans, 19: 18:2 cis-cis, 20: 18:3ω6, 21: 18:3ω3, 22: 20:0, 23: 20:1ω9, 24: 21:0, 25: 20:2ω6, 26: 20:3ω6, 27: 20:4ω6, 28: 20:3ω3& 22:0, 29: 22:1ω9, 30: 20:5ω3, 31: 23:0, 32: 22:2ω6, 33: 24:0, 34: 24:1ω9, 35: 22:6ω3, λιπαρών οξέων. Έχει προστεθεί BHT ως αντιοξειδωτικό.

Πίνακας 5: Κατανομή λιπαρών οξέων ολικών λιπιδίων διαφοροποιημένων λιποκυττάρων για 7 ημέρες.

Λιπαρό οξύ	% ολικών λιπαρών οξέων
	Διαφοροποιημένα λιποκύτταρα
14:0	2.11±0.30
15:0	0.73±0.10
16:0	16.17±0.86
16:1ω9t	3.92±1.65
16:1ω7	2.95±0.17
17:0	0.94±0.08
17:1	1.43±0.20
18:0	13.73±0.06
18:1t	2.00±0.04
18:1ω9c	23.48±0.46
18:1ω7	4.41±0.11
18:2ω6cc	8.74±0.64
18:3ω3 (ALA)	0.43±0.11
20:3ω6	2.05±0.33
20:4ω6 (AA)	4.58±1.13
20:3ω3	0.37±0.04
20:4ω3	0.22±0.11
20:5ω3 (EPA)	1.34±0.30
22:5ω3 (DPA)	2.99±0.49
22:6ω3 (DHA)	1.86±0.27
SFA	34.73±1.52
MUFA	33.76±0.39
PUFA	23.36±3.63
ω3 PUFA	6.83±1.27
ω6 PUFA	16.56±2.20
ω6/ω3	2.50±0.44
trans	6.10±1.71

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5, τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα διαθέτουν όλα τα αναμενόμενα λιπαρά οξέα, κορεσμένα και ακόρεστα καθώς και *trans* λιπαρά οξέα. Παρατηρούνται επίσης αυξημένα επίπεδα παλμιτικού οξέος (16:0), στεατικού οξέος (18:0) και ελαϊκού οξέος (18:1ω9) ενώ οι ποσότητες των ω3 λιπαρών οξέων βρίσκονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα.

Στο σχήμα 23 και στον πίνακα 6 φαίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης της κατανομής των ω3 λιπαρών οξέων στα λιπίδια των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων αρουραίου παρουσία ALA/BSA, DHA/BSA ή BSA (δείγμα αναφοράς).

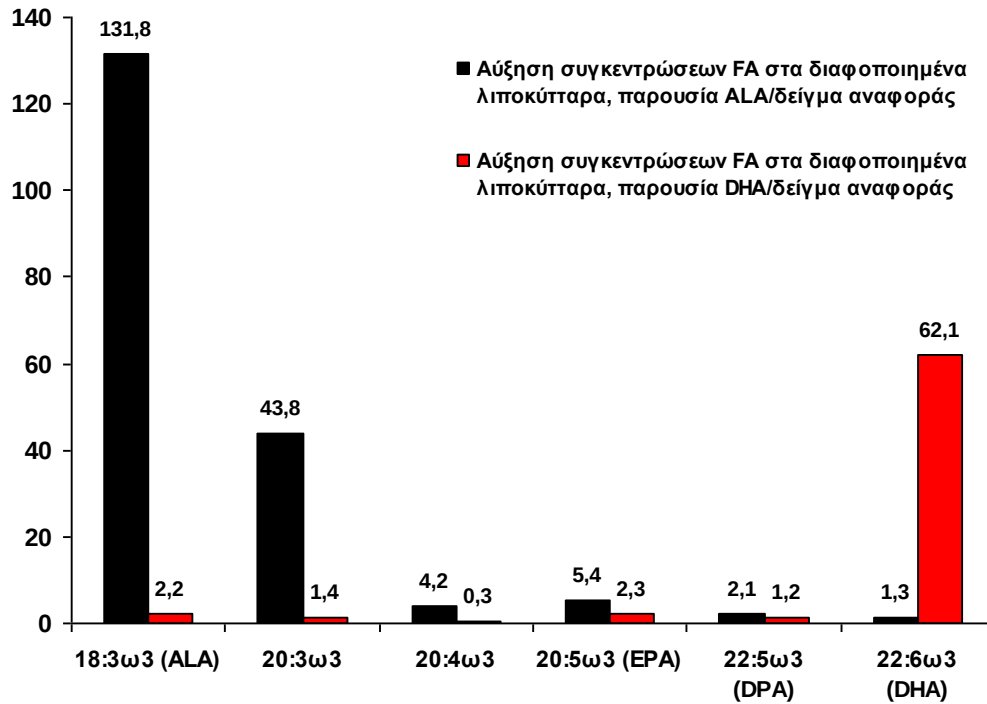


Σχήμα 23: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων κυττάρων αρουραίου. Πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων αρουραίου επωάστηκαν με 200μM DHA (B) ή 200μM ALA (C) ή BSA (δείγμα αναφοράς) (A) στο μέσο διαφοροποίησης για 7 ημέρες. Τα ολικά λιπίδια των κυττάρων απομονώθηκαν με τη μέθοδο Folch και ακολούθησε μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων. IS: εσωτερικό πρότυπο.

Πίνακας 6: Συγκέντρωση λιπαρών οξέων ($\mu\text{mol/g}$ λιπιδίων) σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου παρουσία 200 μM DHA, 200 μM ALA ή BSA (δείγμα αναφοράς) 7 ημέρες.

Δείγματα	18:3 ω 3 (ALA)	20:3 ω 3	20:4 ω 3	20:5 ω 3 (EPA)	22:5 ω 3	22:6 ω 3 (DHA)
Διαφοροποιημένα λιποκύτταρα (δείγμα αναφοράς)	1.19 $\pm$ 0.40	0.42 $\pm$ 0.30	0.85 $\pm$ 0.40	4.31 $\pm$ 1.77	9.03 $\pm$ 3.50	5.47 $\pm$ 1.88
Διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, παρουσία DHA	2.66 $\pm$ 0.47	0.59 $\pm$ 0.18	0.28 $\pm$ 0.18	10.0 $\pm$ 1.68	10.5 $\pm$ 2.94	339.8 $\pm$ 42.0
Διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, παρουσία ALA	156.8 $\pm$ 1.7	18.4$\pm$6.58	3.56$\pm$1.18	23.3 $\pm$ 0.23	19.0$\pm$6.39	7.27$\pm$2.68

Με βάση τον πίνακα 6, η παρουσία του ALA ή του DHA για 7 ημέρες, στο μέσο διαφοροποίησης, είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της κατανομής των ω 3 λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση κατά 43.8 φορές για το 20:3 ω 3, 4.2 φορές για το 20:4 ω 3, 5.4 φορές για το 20:5 ω 3, 2.1 φορές για το 22:5 ω 3 και 1.3 φορές για το 22:6 ω 3 παρουσία του ALA στο μέσο διαφοροποίησης, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Αντίστοιχα, η παρουσία του DHA, στο μέσο διαφοροποίησης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του 20:5 ω 3 κατά 2.3 φορές και του 22:5 ω 3 κατά 1.2 φορές, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς (σχήμα 24).



Σχήμα 24: Αύξηση των συγκεντρώσεων ($\mu\text{mol/g}$ λιπιδίων) των $\omega 3$ λιπαρών οξέων στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα για 7 ημέρες, ■ παρουσία ALA ($200\mu\text{M}$), ως προς το δείγμα αναφοράς ή ■ παρουσία DHA ($200\mu\text{M}$), ως προς το δείγμα αναφοράς.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι η παρουσία του ALA και του DHA, στο μέσο διαφοροποίησης έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της κατανομής των $\omega 3$ λιπαρών οξέων στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα παρέχοντας ενδείξεις για το μεταβολισμό του ALA σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας και μεγαλύτερης ακορεστότητας (σχήμα 8, §4.4.1, σελ.48). Βρέθηκαν επίσης ενδείξεις για τη μετατροπή του DHA σε EPA.

8 Συζήτηση

Είναι γνωστό πως η επίδραση των λιπαρών ουσιών της διατροφής στην υγεία του ανθρώπου εξαρτάται από τις πηγές και τη φύση των λιπαρών οξέων. Τα λίπη που σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο της δυσλιπιδαιμίας καθώς και των καρδιαγγειακών παθήσεων είναι κυρίως η χοληστερόλη, τα κορεσμένα και τα *trans* λιπαρά οξέα. Γενικά τα κορεσμένα λίπη που προέρχονται από τις ζωικές τροφές φαίνεται να είναι περισσότερο επιβλαβή στην υγεία του ανθρώπου σε σχέση με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα από φυτά και ψάρια.¹⁴⁷

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ερευνών στον άνθρωπο έχει αναδείξει τις ευεργετικές επιδράσεις των ω3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFA) στις διαταραχές που σχετίζονται με τα λιπίδια και θεωρούνται απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού.¹⁵⁴ Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των ω3 λιπαρών οξέων στην πορεία της διαφοροποίησης καθώς και η διερεύνηση των μεταβολών της σύστασης του λιπώδους ιστού σε ω3 λιπαρά οξέα, κατά την πορεία αυτή.

Επειδή, ανάλογες μελέτες της επίδρασης των ω3 λιπαρών οξέων δεν είχαν πραγματοποιηθεί σε πρωτογενή προλιποκύτταρα αρουραίου, επιλέχθηκε να μελετηθεί η δοσοεξαρτώμενη επίδραση του πρόδρομου ω3 λιπαρού οξέος, α-λινολενικού (ALA), καθώς και του σημαντικού παραγώγου του, εικοσιδυεξαενοϊκού οξέος (DHA), στην πορεία της διαφοροποίησης. Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν, που είναι σχετικά υψηλές έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες.¹⁶⁸ Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ακόμα και σε συγκεντρώσεις 200μM, τα ALA και DHA δεν ήταν τοξικά για τα προλιποκύτταρα, όπως φάνηκε από τη μικροσκοπική παρακολούθηση. Η ποσοτικοποίηση του βαθμού της διαφοροποίησης έγινε με προσδιορισμό των συσσωρευμένων TG, με τη μέθοδο Oil Red O¹⁷⁴ αλλά και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής,¹⁷² που τροποποιήθηκε από την ομάδα μας για τις ανάγκες των πειραμάτων μας. Και οι δύο μέθοδοι έδειξαν ότι τα ALA και DHA επάγουν τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, με το ALA να παρουσιάζει πιο έντονη επίδραση στην πορεία αυτή (σχήματα 12-17).

Στο πλαίσιο της διερεύνησης του μηχανισμού δράσης των ALA και DHA στην πορεία της διαφοροποίησης, μελετήθηκε η επίδρασή τους στην έκφραση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ2. Η έκφραση του PPARγ επάγεται κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης και αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή αυτής της πορείας. Είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση της έκφρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την δέσμευση, την πρόσληψη και την αποθήκευση λιπαρών οξέων. Υφίσταται σε τρεις ισομορφές, PPARγ1, PPARγ2 και PPARγ3, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικές εναρκτήριες μεταγραφικές περιοχές και

εναλλακτικό μάτισμα.¹⁰⁹ Ο PPAR γ 2 έχει μια περιοχή 30 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο, που δεν εμφανίζεται στον PPAR γ 1 και στον PPAR γ 3, και αποτελεί την ειδική ισομορφή των λιποκυττάρων.¹¹² Επίσης, η εκτοπική έκφραση του PPAR γ 2, και όχι του PPAR γ 1, αποδείχθηκε ικανή να διεγείρει τη λιπογένεση, αναδεικνύοντας τον ιδιαίτερο ρόλο του PPAR γ 2 στο πρόγραμμα της διαφοροποίησης.¹¹⁵

Βρέθηκε ότι τα ALA ή DHA αυξάνουν την γονιδιακή έκφραση του PPAR γ 2 πρωτογενών προλιποκυττάρων αρουραίου, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (σχήματα 18, 19). Η επίδραση τους αυτή σχετίζεται με την ικανότητα τους να δρουν τα ίδια ή τα παράγωγα τους ως αγωνιστές του PPAR γ και συγκεκριμένα ενεργοποιώντας το PPAR γ 2.¹⁶⁰ Από μελέτες δέσμευσης έχει βρεθεί ότι τα PUFA είναι καλύτεροι αγωνιστές του PPAR γ από τα MUFA και τα SFA. Επίσης, η έκφραση του PPAR γ 2 είναι πιο αυξημένη στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου, παρουσία του ALA, συγκριτικά με εκείνη των κυττάρων που διαφοροποιήθηκαν παρουσία του DHA, υποδεικνύοντας ότι το ALA επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό την πορεία της διαφοροποίησης (σχήμα 20). Και τα δυο αυτά οξέα έχουν χαρακτηριστεί ως αγωνιστές των PPAR γ σε 3T3-L1 προλιποκύτταρα^{147,176} με τα λιπαρά οξέα με 16-20 άτομα άνθρακα να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης και ενεργοποίησης των PPAR.¹⁷⁷ Επίσης, έχει βρεθεί ότι η επίδραση DHA σε προλιποκύτταρα σολομού είχε ως αποτέλεσμα την μικρότερη συσσώρευση TG κατά την πορεία της διαφοροποίησης, συγκριτικά με το ελαϊκό οξύ.¹⁷⁸

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αδιπονεκτίνη εκκρίνεται, σχεδόν αποκλειστικά, από τα λιποκύτταρα⁵² και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης και των λιπιδίων.⁶⁹ Από τα αποτελέσματά μας φάνηκε ότι η παρουσία του DHA και ακόμη περισσότερο του ALA στο μέσο διαφοροποίησης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της αδιπονεκτίνης, συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς (σχήμα 21). Δίαιτα σε αρουραίους εμπλουτισμένη με ALA, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης του πλάσματος¹⁷⁹ ενώ επώαση μυοβλαστών με DHA είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του PPAR γ και της αδιπονεκτίνης.¹⁶²

Στη συνέχεια μελετήσαμε την κατανομή των λιπαρών οξέων στα λιπίδια διαφοροποιημένων λιποκυττάρων. Από τα αποτελέσματά μας φάνηκε ότι τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα διαθέτουν όλα τα αναμενόμενα λιπαρά οξέα, κορεσμένα και ακόρεστα. Παρατηρήθηκαν επίσης αυξημένα επίπεδα παλμιτικού οξέος (16:0), στεατικού οξέος (18:0) και ελαϊκού οξέος (18:1 ω 9) ενώ οι ποσότητες των ω 3 λιπαρών οξέων βρίσκονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα. Ειδικότερα, για τα ω 3 λιπαρά οξέα παρατηρήθηκε ότι σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται το DPA, ακολουθεί το DHA, το EPA και τέλος το ALA (πίνακας 5), γεγονός που επιβεβαιώνεται από μελέτες που αναφέρουν ότι τα λιπαρά οξέα DPA και DHA κυριαρχούν στο λιπώδη ιστό ενώ η συγκέντρωση του EPA είναι μικρότερη πιθανότατα γιατί μετατρέπεται σε

DPA πριν την αποθήκευσή του.¹⁵⁶ Η μικρή ποσότητα του ALA που βρέθηκε στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου (πίνακας 5) ενισχύει την άποψη ότι ο βασικός ρόλος αυτού του $\omega 3$ λιπαρού οξέος είναι να λειτουργεί ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση ανώτερων $\omega 3$ λιπαρών οξέων¹⁶¹.

Η παρουσία του ALA ή του DHA, στο μέσο διαφοροποίησης έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της κατανομής των $\omega 3$ λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων παρέχοντας ενδείξεις για το μεταβολισμό του ALA σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας και μεγαλύτερης ακορεστότητας. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για τη μετατροπή του DHA σε EPA (σχήματα 23,24 και πίνακας 6). Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι το DHA και το EPA μπορούν να συντεθούν από το ALA στο ήπαρ,¹⁸⁰ στον εγκέφαλο και στους νεφρούς αρουραίου^{181,182} ενώ σε απομονωμένους δερματικούς ινοβλάστες¹⁸³ και σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου¹⁸³ έχει αναφερθεί η μετατροπή του DHA σε EPA.

Τα πειράματά μας ενισχύουν τη γνώση από τη βιβλιογραφία, άποψη ότι τα ALA ή/και DHA μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα λιπαρά οξέα (όταν τροποποιείται υπέρ αυτών η μεταξύ τους αναλογία) επηρεάζει το βαθμό της διαφοροποίησης ενώ ο μεταβολισμός του ALA σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας και ακορεστότητας καθώς και η πιθανή μετατροπή του DHA σε EPA καθιστά το λιπώδη ιστό ως ενεργό ιστό και όχι ως μια παθητική αποθήκη ενέργειας. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την αναγκαιότητα να βρεθεί η βέλτιστη ποσοτική και ποιοτική σύνθεση σε λιπαρά οξέα της τροφής ώστε να διεγείρει ή να αναστέλλει την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στην επιθυμητή ρύθμιση του βάρους του σώματος και στην αναστολή της υπερπλαστικής παχυσαρκίας.

9 Περίληψη

Σεβαστή Καραλιώτα

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ω 3 ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα της μακροχρόνιας διατήρησης του οργανισμού σε κατάσταση θετικού ενεργειακού ισοζυγίου και κατατάσσεται σε δυο κύριες κατηγορίες, την υπερτροφική και την υπερπλαστική παχυσαρκία. Η υπερτροφική παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από την αύξηση του όγκου των λιποκυττάρων ενώ η υπερπλαστική από την αύξηση του αριθμού τους. Ο αριθμός των λιποκυττάρων αυξάνει κυρίως μέσω της αύξησης της ταχύτητας της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Τα προλιποκύτταρα είναι εξειδικευμένοι ινοβλάστες ενώ τα λιποκύτταρα έχουν στρογγυλό σχήμα και το εσωτερικό τους καταλαμβάνεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από μια λιποσταγόνα συσσωρευμένων TG.

Στα πλαίσια ενός γενικότερου προβληματισμού για την επίδραση γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων στην πορεία της διαφοροποίησης προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα, η παρούσα εργασία μελετά την επίδραση λιπαρών οξέων που προέρχονται από τη τροφή. Εστιάσαμε τη προσοχή μας αφ' ενός μεν στο, πρόδρομο ω 3 λιπαρό οξύ, α -λινολενικό οξύ (α - Linolenic Acid, ALA) και αφ' ετέρου στο σημαντικό παράγωγό του, εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (Docosahexaenoic acid, DHA). Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τα PUFA ως ρυθμιστές της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό τους. Τη δράση τους αυτή, ασκούν κυρίως μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors).

Για την μελέτη της επίδρασης των ALA και DHA στην πορεία διαφοροποίησης προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα επιλέχτηκε ως πειραματικό υλικό προλιποκύτταρα που απομονώθηκαν από τον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό αρουραίου τύπου Wistar. Ως πρώτος στόχος τέθηκε η διαμόρφωση μεθόδου μελέτης της πορείας της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων μέσω της κυτταρομετρίας ροής και την χρήση της για την μελέτη της επίδρασης των οξέων αυτών στην πορεία της διαφοροποίησης• δεύτερον, η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των οξέων αυτών με τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων του RNA του μεταγραφικού

παράγοντα PPAR γ 2 και της αδιπονεκτίνης και τέλος η μελέτη του μεταβολισμού των ALA και DHA στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα αρουραίου.

Από τα αποτελέσματά μας έγινε φανερή η δοσοεξαρτώμενη επαγωγή της διαφοροποίησης παρουσία του ALA και του DHA, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής. Η αξιοπιστία της μεθόδου ελέγχθηκε και με τη κλασσική μέθοδο μελέτης της διαφοροποίησης, με χρήση της χρωστικής Oil Red O, και αποδείχτηκε ταχύτερη και πιο οικονομική. Ως προς το δεύτερο στόχο της εργασίας αυτής μελετήσαμε την επίδραση των ALA και DHA στην επαγωγή της έκφρασης του PPAR γ 2 και της αδιπονεκτίνης. Παρατηρήθηκε μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων RNA και των δυο γονιδίων. Ειδικότερα, η αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα ενισχύει την υπόθεση ότι τα ω 3 λιπαρά οξέα είναι αγωνιστές του PPAR γ σε λιποκύτταρα αρουραίου και ότι η επίδραση των οξέων αυτών στη διαφοροποίηση γίνεται, εν μέρει, μέσω της σύνδεσής τους με τον PPAR γ 2 και την ενεργοποίηση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα.

Στη τρίτη και τελευταία ενότητα της παρούσας μελετήθηκε η επίδραση του ALA ή του DHA στην κατανομή των ω 3 λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων. Από τα αποτελέσματά μας φάνηκε ότι η παρουσία του ALA ή του DHA, στο μέσο διαφοροποίησης έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της κατανομής των ω 3 λιπαρών οξέων των διαφοροποιημένων λιποκυττάρων παρέχοντας ενδείξεις για το μεταβολισμό του ALA σε λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας και μεγαλύτερης ακορεστότητας. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για τη μετατροπή του DHA σε EPA.

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilding, J. Science, medicine, and the future. Obesity treatment. *Bmj* **1997**, 315, 997-1000.
2. Haslam, D. W.; James, W. P. Obesity. *Lancet* **2005**, 366, 1197-1209.
3. Wang, Y.; Beydoun, M. A.; Liang, L.; Caballero, B.; Kumanyika, S. K. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* **2008**, 16, 2323-2330.
4. Allison, D. B.; Fontaine, K. R.; Manson, J. E.; Stevens, J.; VanItallie, T. B. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama* **1999**, 282, 1530-1538.
5. Friedman, J. M. A war on obesity, not the obese. *Science* **2003**, 299, 856-858.
6. Conway, B.; Rene, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obes Rev* **2004**, 5, 145-151.
7. Han, T. S.; Sattar, N.; Lean, M. ABC of obesity. Assessment of obesity and its clinical implications. *Bmj* **2006**, 333, 695-698.
8. Pi-Sunyer, X. A clinical view of the obesity problem. *Science* **2003**, 299, 859-860.
9. Tchkonja, T.; Giorgadze, N.; Pirtskhalava, T.; Thomou, T.; DePonte, M.; Koo, A.; Forse, R. A.; Chinnappan, D.; Martin-Ruiz, C.; von Zglinicki, T.; Kirkland, J. L. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* **2006**, 55, 2571-2578.
10. Argiles, J. M.; Busquets, S.; Lopez-Soriano, F. J. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 293, 1145-1152.
11. Marx, J. Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* **2003**, 299, 846-849.
12. Kalra, S. P.; Bagnasco, M.; Otukonyong, E. E.; Dube, M. G.; Kalra, P. S. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept* **2003**, 111, 1-11.
13. Bray, G. A. Risks of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2003**, 32, 787-804, viii.
14. Racette, S. B.; Deusinger, S. S.; Deusinger, R. H. Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Phys Ther* **2003**, 83, 276-288.
15. Ruan, H.; Lodish, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev* **2003**, 14, 447-455.
16. Aguirre, V.; Uchida, T.; Yenush, L.; Davis, R.; White, M. F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* **2000**, 275, 9047-9054.
17. Avenell, A.; Broom, J.; Brown, T. J.; Poobalan, A.; Aucott, L.; Stearns, S. C.; Smith, W. C.; Jung, R. T.; Campbell, M. K.; Grant, A. M. Systematic review of the long-term effects and economic consequences of treatments for obesity and implications for health improvement. *Health Technol Assess* **2004**, 8, iii-iv, 1-182.
18. Key, T. J.; Allen, N. E.; Spencer, E. A.; Travis, R. C. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* **2002**, 360, 861-868.
19. Borgman, M.; McErlean, E. What is the metabolic syndrome? Prediabetes and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Nurs* **2006**, 21, 285-290.
20. Γκουμπούλου, Α., Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2008.
21. Canello, R.; Clement, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *Bjog* **2006**, 113, 1141-1147.
22. Canello, R.; Henegar, C.; Viguerie, N.; Taleb, S.; Poitou, C.; Rouault, C.; Coupaye, M.; Pelloux, V.; Hugol, D.; Bouillot, J. L.; Bouloumie, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S.; Svensson, P. A.; Barsh, G. S.; Zucker, J. D.; Basdevant, A.; Langin, D.; Clement, K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* **2005**, 54, 2277-2286.
23. Rolfes, E. N. W. a. S. R. *Understanding nutrition*, 9th ed.; Thomson learning: Wadsworth, 2002.

24. Gura, T. Obesity drug pipeline not so fat. *Science* **2003**, 299, 849-852.
25. Isoldi, K. K.; Aronne, L. J. The challenge of treating obesity: the endocannabinoid system as a potential target. *J Am Diet Assoc* **2008**, 108, 823-831.
26. , 2008.
27. Siiteri, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* **1987**, 45, 277-282.
28. Flier, J. S.; Cook, K. S.; Usher, P.; Spiegelman, B. M. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science* **1987**, 237, 405-408.
29. Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **1994**, 372, 425-432.
30. Kershaw, E. E.; Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, 89, 2548-2556.
31. Hausman, D. B.; DiGirolamo, M.; Bartness, T. J.; Hausman, G. J.; Martin, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* **2001**, 2, 239-254.
32. Rokelley, L. C. J. a. J. C. *Βασική Ιστολογία*, 6th ed.; Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2000.
33. Pond, C. M. Functional interpretation of the organization of mammalian adipose tissue: its relationship to the immune system. *Biochem Soc Trans* **1996**, 24, 393-400.
34. Cinti, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* **2001**, 60, 319-328.
35. Αϊβαλιώτης, Μ. Α. Υποδόριος λιπώδης ιστός: Ανατομία-Μεταβολισμός-Άσκηση-Δίαιτα. *Ελληνική Δερματοχειρουργική* **2006**, 3, 84-87.
36. Perrini, S.; Laviola, L.; Cignarelli, A.; Melchiorre, M.; De Stefano, F.; Caccioppoli, C.; Natalicchio, A.; Orlando, M. R.; Garruti, G.; De Fazio, M.; Catalano, G.; Memeo, V.; Giorgino, R.; Giorgino, F. Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia* **2008**, 51, 155-164.
37. Cases, J. A.; Barzilai, N. The regulation of body fat distribution and the modulation of insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2000**, 24 Suppl 4, S63-66.
38. Einstein, F. H.; Atzmon, G.; Yang, X. M.; Ma, X. H.; Rincon, M.; Rudin, E.; Muzumdar, R.; Barzilai, N. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes* **2005**, 54, 672-678.
39. Gesta, S.; Tseng, Y. H.; Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **2007**, 131, 242-256.
40. Richard, S. *Κλινική ανατομική*; Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1992.
41. Bjorntorp, P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **1990**, 10, 493-496.
42. Lafontan, M.; Berlan, M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* **2003**, 24, 276-283.
43. Nicholls, D. G. The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1757, 459-466.
44. Trayhurn, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* **2005**, 184, 285-293.
45. Berg, J. M. *Βιοχημεία*, 5η ed.; Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2004.
46. Vance D. E., V. J. E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*; Elsevier Science B. V, 1996.
47. Slavin, B. G.; Ong, J. M.; Kern, P. A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* **1994**, 35, 1535-1541.
48. Coppack, S. W.; Jensen, M. D.; Miles, J. M. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* **1994**, 35, 177-193.
49. Greenberg, A. S.; Egan, J. J.; Wek, S. A.; Moos, M. C., Jr.; Londos, C.; Kimmel, A. R. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 12035-12039.

50. Okuda, H.; Morimoto, C.; Tsujita, T. Role of endogenous lipid droplets in lipolysis in rat adipocytes. *J Lipid Res* **1994**, 35, 36-44.
51. Bornstein, S. R.; Abu-Asab, M.; Glasow, A.; Path, G.; Hauner, H.; Tsokos, M.; Chrousos, G. P.; Scherbaum, W. A. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* **2000**, 49, 532-538.
52. Ronti, T.; Lupattelli, G.; Mannarino, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2006**, 64, 355-365.
53. Ahima, R. S.; Saper, C. B.; Flier, J. S.; Elmquist, J. K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* **2000**, 21, 263-307.
54. Flier, J. S. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, 83, 1407-1413.
55. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **2005**, 115, 911-919; quiz 920.
56. Ailhaud, G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* **2006**, 329, 570-577; discussion 653-575.
57. Margetic, S.; Gazzola, C.; Pegg, G. G.; Hill, R. A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2002**, 26, 1407-1433.
58. Cock, T. A.; Auwerx, J. Leptin: cutting the fat off the bone. *Lancet* **2003**, 362, 1572-1574.
59. Minokoshi, Y.; Kim, Y. B.; Peroni, O. D.; Fryer, L. G.; Muller, C.; Carling, D.; Kahn, B. B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **2002**, 415, 339-343.
60. Hube, F.; Lietz, U.; Igel, M.; Jensen, P. B.; Tornqvist, H.; Joost, H. G.; Hauner, H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* **1996**, 28, 690-693.
61. Machinal-Quelin, F.; Dieudonne, M. N.; Leneveu, M. C.; Pecquery, R.; Giudicelli, Y. Preadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **2002**, 282, C853-863.
62. Fruhbeck, G. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1998**, 250, 99-102.
63. Fruhbeck, G.; Aguado, M.; Martinez, J. A. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, 240, 590-594.
64. Perez, C.; Fernandez-Galaz, C.; Fernandez-Agullo, T.; Arribas, C.; Andres, A.; Ros, M.; Carrascosa, J. M. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* **2004**, 53, 347-353.
65. Ceddia, R. B.; William, W. N., Jr.; Lima, F. B.; Curi, R. Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol* **1998**, 158, R7-9.
66. Ramsay, T. G. Porcine leptin inhibits lipogenesis in porcine adipocytes. *J Anim Sci* **2003**, 81, 3008-3017.
67. Ramsay, T. G. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes in vitro. *J.Anim Sci.* **2001**, 79, 653-657.
68. Gimeno, R. E.; Klamann, L. D. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr Opin Pharmacol* **2005**, 5, 122-128.
69. Hutley, L. Fat as endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* **2005**, 330, 280-289.
70. Koshiishi, C.; Park, H. M.; Uchiyama, H.; Tanaka, Y. Regulation of expression of the mouse adiponectin gene by the C/EBP family via a novel enhancer region. *Gene* **2008**, 424, 141-146.

71. Drolet, R.; Belanger, C.; Fortier, M.; Huot, C.; Mailloux, J.; Legare, D.; Tchernof, A. Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring)* **2009**, 17, 424-430.
72. Gabrielsson, B. G.; Johansson, J. M.; Lonn, M.; Jernas, M.; Olbers, T.; Peltonen, M.; Larsson, I.; Lonn, L.; Sjostrom, L.; Carlsson, B.; Carlsson, L. M. High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. *Obes Res* **2003**, 11, 699-708.
73. Cianflone, K.; Xia, Z.; Chen, L. Y. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* **2003**, 1609, 127-143.
74. Fukuhara, A.; Matsuda, M.; Nishizawa, M.; Segawa, K.; Tanaka, M.; Kishimoto, K.; Matsuki, Y.; Murakami, M.; Ichisaka, T.; Murakami, H.; Watanabe, E.; Takagi, T.; Akiyoshi, M.; Ohtsubo, T.; Kihara, S.; Yamashita, S.; Makishima, M.; Funahashi, T.; Yamanaka, S.; Hiramatsu, R.; Matsuzawa, Y.; Shimomura, I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **2005**, 307, 426-430.
75. Hida, K.; Wada, J.; Eguchi, J.; Zhang, H.; Baba, M.; Seida, A.; Hashimoto, I.; Okada, T.; Yasuhara, A.; Nakatsuka, A.; Shikata, K.; Hourai, S.; Futami, J.; Watanabe, E.; Matsuki, Y.; Hiramatsu, R.; Akagi, S.; Makino, H.; Kanwar, Y. S. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 10610-10615.
76. Beltowski, J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* **2006**, 12, RA112-119.
77. Steppan, C. M.; Lazar, M. A. The current biology of resistin. *J Intern Med* **2004**, 255, 439-447.
78. Patel, L. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 300, 472-476.
79. Juge-Aubry, C. E.; Henrichot, E.; Meier, C. A. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2005**, 19, 547-566.
80. MacDougald, O. A.; Mandrup, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* **2002**, 13, 5-11.
81. Fernandez-Real, J. M.; Ricart, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* **2003**, 24, 278-301.
82. Guo, X.; Liao, K. Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* **2000**, 251, 45-53.
83. Gregoire, F. M.; Smas, C. M.; Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **1998**, 78, 783-809.
84. Feve, B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2005**, 19, 483-499.
85. Ntambi, J. M.; Young-Cheul, K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **2000**, 130, 3122S-3126S.
86. Karagiannides, I.; Tchkonina, T.; Dobson, D. E.; Steppan, C. M.; Cummins, P.; Chan, G.; Salvatori, K.; Hadzopoulou-Cladaras, M.; Kirkland, J. L. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2001**, 280, R1772-1780.
87. Otto, T. C.; Lane, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2005**, 40, 229-242.
88. Rangwala, S. M.; Lazar, M. A. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* **2000**, 20, 535-559.
89. Caserta, F.; Tchkonina, T.; Civelek, V. N.; Prentki, M.; Brown, N. F.; McGarry, J. D.; Forse, R. A.; Corkey, B. E.; Hamilton, J. A.; Kirkland, J. L. Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2001**, 280, E238-247.
90. Pilgrim, C. DNA synthesis and differentiation in developing white adipose tissue. *Developmental Biol* **1971**, 26, 6976.

91. Gregoire, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* **2001**, 226, 997-1002.
92. Kim, J. B.; Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **1996**, 10, 1096-1107.
93. Kim, J. B.; Spotts, G. D.; Halvorsen, Y. D.; Shih, H. M.; Ellenberger, T.; Towle, H. C.; Spiegelman, B. M. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* **1995**, 15, 2582-2588.
94. Aratani, Y.; Kitagawa, Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem* **1988**, 263, 16163-16169.
95. Grimaldi, P.; Negrel, R.; Ailhaud, G. Induction of the triglyceride pathway enzymes and of lipolytic enzymes during differentiation in a 'preadipocyte' cell line. *Eur J Biochem* **1978**, 84, 369-376.
96. Tong, Q.; Hotamisligil, G. S. Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *Rev Endocr Metab Disord* **2001**, 2, 349-355.
97. Tanaka, T. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* **1997**, 16, 7432-7443.
98. Fox, K. E.; Fankell, D. M.; Erickson, P. F.; Majka, S. M.; Crossno, J. T., Jr.; Klemm, D. J. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem* **2006**, 281, 40341-40353.
99. Zhang, J. W.; Tang, Q. Q.; Vinson, C.; Lane, M. D. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 43-47.
100. Patel, Y. M. a. M. D. L. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J Biol Chem* **2000**, 275, 17653-17660.
101. Tang, Q. Q., et al. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 9766-9771.
102. Rosen, E. D.; Spiegelman, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2000**, 16, 145-171.
103. Rosen, E. D. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2005**, 73, 31-34.
104. Johnson, P. F. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* **2005**, 118, 2545-2555.
105. Ross, S. E.; Erickson, R. L.; Hemati, N.; MacDougald, O. A. Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol* **1999**, 19, 8433-8441.
106. Tang, Q. Q.; Lane, M. D. Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97, 12446-12450.
107. Lazar, M. A. PPAR gamma, 10 years later. *Biochimie* **2005**, 87, 9-13.
108. Willson, T. M.; Lambert, M. H.; Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* **2001**, 70, 341-367.
109. Belury, M. A. Symposium: Steroid Hormone Receptor and Nutrient Interactions: Implications for Cancer Prevention. Introduction. *J Nutr* **1999**, 129, 569S-570S.
110. Kliewer, S. A.; Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Willson, T. M. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* **2001**, 56, 239-263.
111. Fruchart, J. C.; Staels, B.; Duriez, P. PPARS, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* **2001**, 44, 345-352.
112. Gurnell, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2005**, 19, 501-523.

113. Camp, H. S.; Ren, D.; Leff, T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med* **2002**, 8, 442-447.
114. Sewter, C.; Blows, F.; Considine, R.; Vidal-Puig, A.; O'Rahilly, S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87, 4203-4207.
115. Ren, D.; Collingwood, T. N.; Rebar, E. J.; Wolffe, A. P.; Camp, H. S. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* **2002**, 16, 27-32.
116. Saladin, R.; Fajas, L.; Dana, S.; Halvorsen, Y. D.; Auwerx, J.; Briggs, M. Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ* **1999**, 10, 43-48.
117. Mueller, E.; Drori, S.; Aiyer, A.; Yie, J.; Sarraf, P.; Chen, H.; Hauser, S.; Rosen, E. D.; Ge, K.; Roeder, R. G.; Spiegelman, B. M. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* **2002**, 277, 41925-41930.
118. Rockwell, C. E.; Snider, N. T.; Thompson, J. T.; Vanden Heuvel, J. P.; Kaminski, N. E. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol* **2006**, 70, 101-111.
119. Gasperi, V.; Fezza, F.; Pasquariello, N.; Bari, M.; Oddi, S.; Agro, A. F.; Maccarrone, M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci* **2007**, 64, 219-229.
120. Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **1995**, 83, 803-812.
121. Lehmann, J. M.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Wilkison, W. O.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **1995**, 270, 12953-12956.
122. Kim, J. B.; Wright, H. M.; Wright, M.; Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, 4333-4337.
123. Shao, D.; Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **1997**, 272, 21473-21478.
124. Rosen, E. D.; Hsu, C. H.; Wang, X.; Sakai, S.; Freeman, M. W.; Gonzalez, F. J.; Spiegelman, B. M. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* **2002**, 16, 22-26.
125. Elberg, G.; Gimble, J. M.; Tsai, S. Y. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* **2000**, 275, 27815-27822.
126. Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **2002**, 109, 1125-1131.
127. Shimano, H.; Shimomura, I.; Hammer, R. E.; Herz, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Horton, J. D. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* **1997**, 100, 2115-2124.
128. Fajas, L.; Schoonjans, K.; Gelman, L.; Kim, J. B.; Najib, J.; Martin, G.; Fruchart, J. C.; Briggs, M.; Spiegelman, B. M.; Auwerx, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* **1999**, 19, 5495-5503.

129. Edvardsson, U.; Ljungberg, A.; Oscarsson, J. Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 340, 111-117.
130. Petersen, R. K.; Madsen, L.; Pedersen, L. M.; Hallenborg, P.; Hagland, H.; Viste, K.; Dskeland, S. O.; Kristiansen, K. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* **2008**, 28, 3804-3816.
131. Sliker, L. J.; Sloop, K. W.; Surface, P. L.; Kriauciunas, A.; LaQuier, F.; Manetta, J.; Bue-Valleskey, J.; Stephens, T. W. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* **1996**, 271, 5301-5304.
132. Xu, H.; Sethi, J. K.; Hotamisligil, G. S. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem* **1999**, 274, 26287-26295.
133. Hu, E.; Kim, J. B.; Sarraf, P.; Spiegelman, B. M. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* **1996**, 274, 2100-2103.
134. Isakson, P.; Hammarstedt, A.; Gustafson, B.; Smith, U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity -- role of Wnt, TNF{alpha} and inflammation. *Diabetes* **2009**.
135. Jensen, B.; Farach-Carson, M. C.; Kenaley, E.; Akanbi, K. A. High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res* **2004**, 301, 280-292.
136. Ntambi, J. M.; Takova, T. Role of Ca²⁺ in the early stages of murine adipocyte differentiation as evidenced by calcium mobilizing agents. *Differentiation* **1996**, 60, 151-158.
137. Klip, A.; Ramlal, T. Cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Effect of insulin and relation to glucose transport. *J Biol Chem* **1987**, 262, 9141-9146.
138. Shi, H.; Halvorsen, Y. D.; Ellis, P. N.; Wilkison, W. O.; Zemel, M. B. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics* **2000**, 3, 75-82.
139. Jeremy Berg, J. T., Lubet Stryer *Biochemistry*, 5th ed.: New york, 2003.
140. Simopoulos, A. P.; Leaf, A.; Salem, N., Jr. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab* **1999**, 43, 127-130.
141. Berk, P. D.; Stump, D. D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* **1999**, 192, 17-31.
142. Berk, P. D.; Zhou, S. L.; Kiang, C. L.; Stump, D.; Bradbury, M.; Isola, L. M. Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Biol Chem* **1997**, 272, 8830-8835.
143. McArthur, M. J.; Atshaves, B. P.; Frolov, A.; Foxworth, W. D.; Kier, A. B.; Schroeder, F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* **1999**, 40, 1371-1383.
144. Ailhaud, G. P.; Abumrad, N.; Amri, E. Z.; Grimaldi, P. A. A new look at fatty acids as signal-transducing molecules. *World Rev Nutr Diet* **1994**, 75, 35-45.
145. Hsu, K. T.; Storch, J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* **1996**, 271, 13317-13323.
146. Amri, E. Z.; Teboul, L.; Vannier, C.; Grimaldi, P. A.; Ailhaud, G. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* **1996**, 314 (Pt 2), 541-546.
147. Madsen, L.; Petersen, R. K.; Kristiansen, K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1740, 266-286.
148. Serhan, C. N.; Hong, S.; Gronert, K.; Colgan, S. P.; Devchand, P. R.; Mirick, G.; Moussignac, R. L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* **2002**, 196, 1025-1037.
149. Vanden Heuvel, J. P. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr* **1999**, 129, 575S-580S.

150. Guo, W.; Choi, J. K.; Kirkland, J. L.; Corkey, B. E.; Hamilton, J. A. Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochem J* **2000**, 349, 463-471.
151. Jensen, M. D. Diet effect on fatty acid metabolism in lean and obese humans. *Am Clin Nutr* **1998**, 67, 531-534.
152. Simopoulos, A. P., Artemis, A Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **2002**, 11, S163-173.
153. Panagiotakos, D. B., Kalogeropoulos N. Omega-3 consumption may benefit heart rhythm: a review. *AgroFOOD industry hi-tech* **2008**, 19.
154. Holman, R. T. The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr* **1998**, 128, 427S-433S.
155. Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* **2002**, 56, 365-379.
156. Marckmann, P. Footprint of fish: docosahexaenoic acid (DHA) in adipose tissue. *Nutrition* **1999**, 15, 407-408.
157. Madsen, L.; Pedersen, L. M.; Liaset, B.; Ma, T.; Petersen, R. K.; van den Berg, S.; Pan, J.; Muller-Decker, K.; Dulsner, E. D.; Kleemann, R.; Kooistra, T.; Doskeland, S. O.; Kristiansen, K. cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **2008**, 283, 7196-7205.
158. Den Ruijter, H. M.; Berecki, G.; Opthof, T.; Verkerk, A. O.; Zock, P. L.; Coronel, R. Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. *Cardiovasc Res* **2007**, 73, 316-325.
159. Krauss, R. M.; Eckel, R. H. AHA Dietary Guidelines Revision 2000: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association *Circulation* **2000**, 102, 2284-2299.
160. Spurlock, M. E.; Houseknecht, K. L.; Portocarrero, C. P.; Cornelius, S. G.; Willis, G. M.; Bidwell, C. A. Regulation of PPARgamma but not obese gene expression by dietary fat supplementation. *J Nutr Biochem* **2000**, 11, 260-266.
161. Burdge, G. C.; Calder, P. C. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* **2005**, 45, 581-597.
162. Li, J. J.; Huang, C. J.; Xie, D. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* **2008**, 52, 631-645.
163. Oudart, H.; Groscolas, R.; Calgari, C.; Nibbelink, M.; Leray, C.; Le Maho, Y.; Malan, A. Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1997**, 21, 955-962.
164. Raclot, T.; Groscolas, R.; Langin, D.; Ferre, P. Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res* **1997**, 38, 1963-1972.
165. Vos, P. D. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Clin. Invest* **1996**, 98, 1004-1009.
166. Liu, B. H.; Kuo, C. F.; Wang, Y. C.; Ding, S. T. Effect of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on the expression of adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 in differentiating porcine adipocytes. *J Anim Sci* **2005**, 83, 1516-1525.
167. Tanabe, Y.; Matsunaga, Y.; Saito, M.; Nakayama, K. Involvement of cyclooxygenase-2 in synergistic effect of cyclic stretching and eicosapentaenoic acid on adipocyte differentiation. *J Pharmacol Sci* **2008**, 106, 478-484.
168. Kim, H. K.; Della-Fera, M.; Lin, J.; Baile, C. A. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* **2006**, 136, 2965-2969.
169. Yahagi, N.; Shimano, H.; Hasty, A. H.; Amemiya-Kudo, M.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Shionoiri, F.; Ohashi, K.; Osuga, J.; Harada, K.; Gotoda, T.; Nagai, R.; Ishibashi, S.; Yamada, N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **1999**, 274, 35840-35844.

170. Froyland, L.; Madsen, L.; Vaagenes, H.; Totland, G. K.; Auwerx, J.; Kryvi, H.; Staels, B.; Berge, R. K. Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J Lipid Res* **1997**, 38, 1851-1858.
171. Totland, G. K.; Madsen, L.; Klementsens, B.; Vaagenes, H.; Kryvi, H.; Froyland, L.; Hexeberg, S.; Berge, R. K. Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. *Biol Cell* **2000**, 92, 317-329.
172. Lee, Y. H.; Chen, S. Y.; Wiesner, R. J.; Huang, Y. F. Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res* **2004**, 45, 1162-1167.
173. Mamalakis, G.; Kafatos, A.; Kalogeropoulos, N.; Andrikopoulos, N.; Daskalopoulos, G.; Kranidis, A. Prostate cancer vs hyperplasia: relationships with prostatic and adipose tissue fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, 66, 467-477.
174. McNeel, R. L.; Smith, E. O.; Mersmann, H. J. Isomers of conjugated linoleic acid modulate human preadipocyte differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2003**, 39, 375-382.
175. Karaliota, S.; Siafaka-Kapadai, A.; Gontinou, C.; Psarra, K.; Mavri-Vavayanni, M. Anandamide increases the differentiation of rat adipocytes and causes PPARgamma and CB1 receptor upregulation. *Obesity (Silver Spring)* **2009**, 17, 1830-1838.
176. Takahara, Y.; Kobayashi, T.; Takemoto, K.; Adachi, T.; Osaki, K.; Kawahara, K.; Tsujimoto, G. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: development of an informatics system for analysis of DNA microarray data with a focus on lipid metabolism. *J Pharmacol Sci* **2008**, 107, 1-7.
177. Forman, B. M.; Chen, J.; Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, 4312-4317.
178. Todorovic, M.; Vegusdal, A.; Gjoen, T.; Sundvold, H.; Torstensen, B. E.; Kjaer, M. A.; Ruyter, B. Changes in fatty acids metabolism during differentiation of Atlantic salmon preadipocytes; effects of n-3 and n-9 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1781, 326-335.
179. Sekine, S.; Sasanuki, S.; Murano, Y.; Aoyama, T.; Takeuchi, H. Alpha-linolenic acid-rich flaxseed oil ingestion increases plasma adiponectin level in rats. *Int J Vitam Nutr Res* **2008**, 78, 223-229.
180. Sprecher, H. The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, 67, 79-83.
181. Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Yoshikawa, T.; Hasty, A. H.; Tamura, Y.; Osuga, J.; Okazaki, H.; Iizuka, Y.; Takahashi, A.; Sone, H.; Gotoda, T.; Ishibashi, S.; Yamada, N. Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res* **2002**, 43, 107-114.
182. Wang, Y.; Botolin, D.; Christian, B.; Busik, J.; Xu, J.; Jump, D. B. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* **2005**, 46, 706-715.
183. Gronn, M.; Christensen, E.; Hagve, T. A.; Christophersen, B. O. Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1991**, 1081, 85-91.