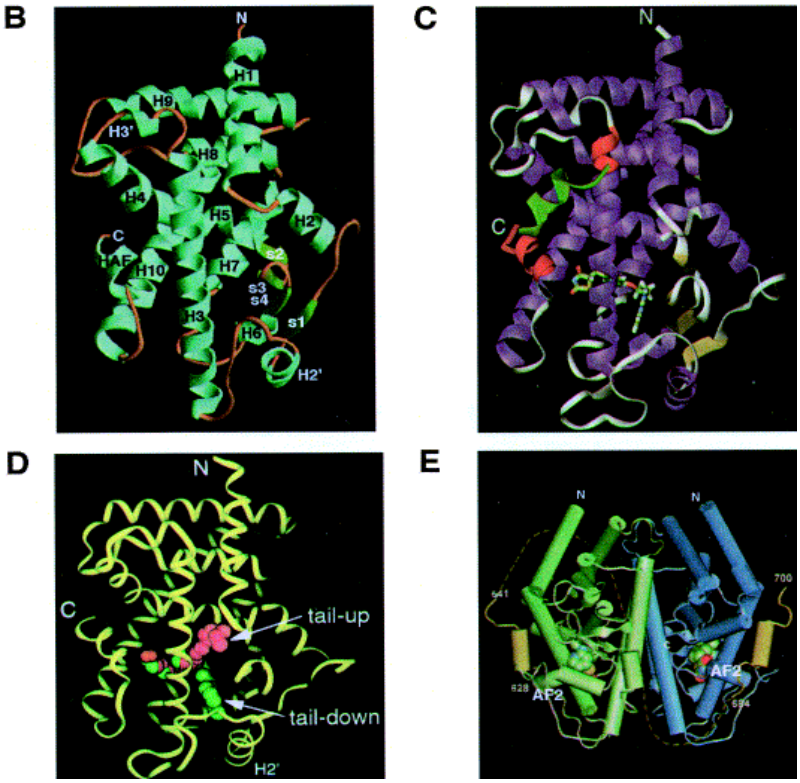
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

(ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ PRO12ALA ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ PPARγ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ)



Υπεύθυνη μελέτης: Κοκορέλη Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Δεδούσης
Τριμελής επιτροπή: κ. Δεδούσης
κ. Μανιός
κ. Πολυχρονόπουλος

Αθήνα, 2004

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συμπαράσταση των καθηγητών μου στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δεδούση για τις συμβουλές του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μανιό που ήταν πάντα διαθέσιμος και πρόθυμος να βοηθήσει. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Πολυχρονόπουλο για τις σωστές υποδείξεις του για την τελειοποίηση της εργασίας. Για τη βοήθεια επί των στατιστικών θεμάτων θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιωτάκο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη συνάδελφο κ. Θεοδωράκη Ειρήνη, η οποία με την έμπρακτη συμπαράστασή της, συνέβαλε στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξη κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Περίληψη

Η παιδική παχυσαρκία και η εμφάνιση συναφών μεταβολικών νοσημάτων στα παιδιά παρουσιάζει ανοδική πορεία τα τελευταία χρόνια. Έχει αποδειχθεί ότι οι παράγοντες προδιάθεσης εκτός από περιβαλλοντικής είναι και γενετικής φύσεως. Αρκετά γονίδια έχουν βρεθεί που συμβάλλουν στην εμφάνιση της παχυσαρκίας. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο του ενεργοποιημένου υποδοχέα πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων γ2 ή αλλιώς PPARγ2. Το PPARγ2 είναι μεταγραφικός παράγοντας και συμμετέχει στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων. Αρκετές μελέτες σε ενήλικες έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ2 με την εμφάνιση παχυσαρκίας και το λιπιδαιμικό προφίλ.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ με την παχυσαρκία και με άλλα σχετιζόμενα μεταβολικά νοσήματα σε παιδιά του δημοτικού. Μελετήθηκαν 96 αγόρια και 86 κορίτσια. Από αυτά το 14,1% των κοριτσιών και το 14,8 των αγοριών είχαν γονότυπο PRO/Ala και όλα τα υπόλοιπα ήταν ομόζυγα ως προς το Pro γονίδιο.

Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της παχυσαρκίας. Παρατηρήθηκε όμως επίδραση του πολυμορφισμού στο λιπιδαιμικό προφίλ, το είδος της οποίας διέφερε μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, τα Pro/Ala αγόρια εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές για την HDLχοληστερόλη (43 ± 9 mg/dl vs. 47 ± 8 mg/dl, p = 0,001) και υψηλότερες τιμές για τον λόγο ολικής/ HDL χοληστερόλης (4,45 ± 0,61 vs. 4,04 ± 0,59, p = 0,031) συγκρινόμενα με τα αγόρια Pro/Pro. Αντίθετα στα κορίτσια, τα άτομα Pro/Ala εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης (180 ± 28 mg/dl vs. 194 ± 32 mg/dl, p = 0,06) και τριγλυκεριδίων (77 ± 11 mg/dl vs. 94 ± 31 mg/dl, p = 0,045) σε σύγκριση με τα Pro/Pro άτομα. Η αλληλεπίδραση γονιδίου – φύλου ήταν σημαντική (p < 0,001). Η σχέση του λόγου ολικής/ HDL χοληστερόλης και του πολυμορφισμού στα αγόρια διατηρήθηκε ύστερα από έλεγχο συγχυτικών παραγόντων, λαμβάνοντας υπόψη το BMI, την συνολική ενεργειακή πρόσληψη, την πρόσληψη ολικού και κορεσμένου λίπους. Στα κορίτσια δεν βρέθηκε συσχέτιση του λόγου ολικής/ HDL χοληστερόλης και του Ala αλληλίου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν επιβεβαίωσαν τη σχέση του πολυμορφισμού Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ και της παχυσαρκίας στα παιδιά. Διαπιστώθηκε όμως για πρώτη φορά σε αγόρια η σχέση του πολυμορφισμού και του λόγου ολικής/ HDL χοληστερόλης, που είναι πολύ καλός προγνωστικός δείκτης για τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και άλλες μελέτες προκειμένου να διαλευκανθεί η επίδραση του πολυμορφισμού στην παχυσαρκία και σε άλλες παραμέτρους του μεταβολισμού σε παιδιά όπου η επίδραση του περιβάλλοντος είναι μικρότερη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελίδα

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1. Παχυσαρκία 1

2. Παιδική παχυσαρκία 1

2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία 1

2.2. Συνέπειες στην υγεία και την ψυχολογία 2

3. Η αθηρωμάτωση στην παιδική ηλικία 4

4. Παράγοντες προδιάθεσης παιδικής παχυσαρκίας 5

4.1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες 6

4.1.1. Αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και αυξημένη πρόσληψη λίπους 6

4.1.2. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα 7

4.1.3. Μητρικός θηλασμός 8

4.1.4. Περιβάλλον 8

4.2. Γενετικοί παράγοντες 9

4.2.2. Μονογονιδιακές μορφές παχυσαρκίας 9

4.2.3. Κοινές ή πολυγονιδιακές μορφές παχυσαρκίας 11

5. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων (PPARS) – PPARγ 13

5.1. Γενικά 13

5.2. Δομή και μόρια-σύνδεσμοι των PPARs 13

5.3. Ιστική έκφραση και λειτουργία των PPARs 14

5.4. PPARγ: το γονίδιο, το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και η πρωτεΐνη 15

5.5. Ιστική έκφραση και παράγοντες έκφρασης του PPARγ 18

5.6. Μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ 19

5.7. Φυσιολογικές λειτουργίες του PPARγ 20

5.7.1. Λιπογένεση – έλεγχος της διαφοροποίησης του λιπώδους ιστού 20

5.7.2. PPARγ και έλεγχος του λιπιδαιμικού προφίλ 23

5.7.3. PPARγ:Ρύθμιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, πιθανοί μηχανισμοί 24

5.7.4. Η συμμετοχή του PPARγ στην αθηρωμάτωση 27

5.8. Ο πολυμορφισμός Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ2 30

5.8.1. Συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala σε διάφορους πληθυσμούς 31

5.8.2. Η επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στον δείκτη μάζας σώματος (BMI) και στην εμφάνιση παχυσαρκίας 32
5.8.3. Η επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στους βιοχημικούς δείκτες, στο λιπιδαιμικό προφίλ και στην εμφάνιση καρδιοπάθειας 34
Β. Σκοπός της παρούσας μελέτης 37
Γ. Μεθοδολογία 38
1. Δείγμα 38
2. Συλλογή στοιχείων 38
3. Μετρήσεις ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών 38
4. Εκτίμηση βιοχημικών παραμέτρων 39
5. Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης 39
6. Ανάλυση DNA 40
6.1. Απομόνωση DNA 40
6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. 41
6.3. Έλεγχος επιτυχίας PCR 44
6.3.1. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 1% 45
6.3.2. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση 45
6.3.3. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος 46
6.4. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση 46
6.5. Έλεγχος του προϊόντος της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 3% 48
6.6. Διαλύματα 48
7. Στατιστική επεξεργασία 51
Δ. Αποτελέσματα 52
Ε. Συζήτηση 56
ΣΤ. Βιβλιογραφία 63

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η παχυσαρκία είναι ένα σημαντικό δημοσιο-υγειονομικό και οικονομικό πρόβλημα που μαστίζει όλη την υφήλιο. Ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από παχυσαρκία αυξάνεται χρόνο με το χρόνο, σε όλες τις περιοχές παγκοσμίως και περιλαμβάνει άτομα όλων των ηλικιών και των δύο φύλων (1).

Ως παχυσαρκία ορίζεται η κατάσταση του μη φυσιολογικού ή υπερβάλλοντος λίπους, συγκεντρωμένου στον λιπώδη ιστό σε επίπεδο που επηρεάζει αρνητικά την υγεία (2).

2. ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Το 1998 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτήρισε την παιδική παχυσαρκία ως μια παγκόσμια επιδημία (WHO, 1998). Σύμφωνα με στοιχεία του CDC το 2002 από την έρευνα NHANES IV (1999-2000), που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά, έφηβους και ενήλικες στις ΗΠΑ, τα παιδιά ηλικίας 2-5 χρόνων ήταν υπέρβαρα σε ποσοστό 10,4%. Ανάλογα, υπέρβαρα ήταν το 15,3% των παιδιών 6-11 χρονών και το 15,5% των παιδιών 12-19 χρονών. Συγκριτικά με τα στοιχεία από τη μελέτη NHANES III (1988-1994) υπήρξε μια αύξηση των ποσοστών κατά 3,2%, 4% και 5% αντίστοιχα (3, 4).

Τα στοιχεία για τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, σύμφωνα με τη μελέτη των Lobstein et al., δείχνουν επίσης μια αύξηση στα ποσοστά των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών. Μάλιστα τα υψηλότερα ποσοστά αφορούν τις ανεπτυγμένες χώρες με δυτικό τρόπο ζωής. Έτσι οι χώρες της ανατολικής Ευρώπης που διάγουν περίοδο οικονομικής κρίσης έχουν χαμηλά ποσοστά υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών. Για παράδειγμα, στην Πολωνία σε περίοδο οικονομικής κρίσης, βρέθηκε ποσοστό υπέρβαρων παιδιών μόνο 8% και στην Τσεχία, από 10% το 1991 με την οικονομική ανάκαμψη το 1999 προσέγγισε το 12,5%. Μια άλλη τάση που παρατηρήθηκε είναι μια αύξηση της επίπτωσης στις νότιες χώρες της Ευρώπης και

ιδιαίτερα στις Μεσογειακές. Τα ποσοστά των υπέρβαρων παιδιών στις χώρες αυτές κυμαίνονταν μεταξύ 20-40% ενώ στις πιο βόρειες χώρες το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 10-20%.

Στη Μεγάλη Βρετανία το ποσοστό των υπέρβαρων παιδιών ηλικίας 7-11 ετών αυξήθηκε από 8% σε 20% μέσα στην περίοδο 1984-1998. Η αντίστοιχη αύξηση στην Ισπανία για παιδιά ηλικίας 6-7 ετών ήταν από 23% σε 35% για την περίοδο 1985-1995. Στη Γαλλία, έρευνες δείχνουν μια αύξηση από 10% σε 16% το χρονικό διάστημα 1992-2000. Στην Ελλάδα, στη Θεσσαλονίκη, ο δείκτης μάζας σώματος προσαρμοσμένος για την ηλικία και το φύλο παιδιών ηλικίας 6-12 ετών αυξήθηκε περίπου 7% τη χρονική περίοδο 1984-2000 (5).

2.2. Συνέπειες στην υγεία και την ψυχολογία

Η παχυσαρκία ή το υπερβάλλον βάρος στα παιδιά προκαλεί πολλά ψυχικά-κοινωνικά προβλήματα και σοβαρά άμεσα και έμμεσα προβλήματα υγείας. Αποτελεί ξεχωριστό παράγοντα κινδύνου για μια σειρά από χρόνιες ασθένειες στην ενήλικη ζωή, αλλά προκαλεί προβλήματα ήδη από την παιδική ηλικία:

Υπερλιπιδαιμία

Το λιπιδαιμικό προφίλ των παχύσαρκων παιδιών φανερώνει ότι η υπερλιπιδαιμία είναι αρκετά συχνή σε αυτόν τον πληθυσμό. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και LDL χοληστερόλης και μειωμένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (6).

Ινσουλινοαντίσταση και σακχαρώδης διαβήτης

Σύμφωνα με στοιχεία του ADA, το 8% - 45% του πρωτοεμφανιζόμενου διαβήτη στα παιδιά και στους εφήβους αφορά διαβήτη τύπου 2 (7). Αυτή η αύξηση στο νεανικό σακχαρώδη διαβήτη αποδίδεται ολοκληρωτικά στην παιδική παχυσαρκία, αν και η κληρονομικότητα και ο τρόπος ζωής επηρεάζουν τον ατομικό κίνδυνο (8). Η εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2 στα παιδιά είναι αρκετά ανησυχητική, καθώς εμπλέκεται με την εμφάνιση άλλων χρόνιων νοσημάτων όπως, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η νεφρική ανεπάρκεια, η σταδιακή απώλεια της όρασης (9). Η ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής και ΣΔ 2 στα παχύσαρκα παιδιά φαίνεται να εμπλέκει τους ίδιους μηχανισμούς με των παχύσαρκων ενηλίκων. Το σπλαχνικό λίπος βρέθηκε να σχετίζεται άμεσα με την έκκριση της ινσουλίνης και την ινσουλινοαντίσταση (6).

Υπέρταση

Η πρωτοπαθής υπέρταση έχει αυξημένη, σε σχέση με παλαιότερα, επίπτωση στα παιδιά και αυτό συνδυάζεται με το αυξημένο ποσοστό των παχύσαρκων παιδιών, σε συνδυασμό με ένα οικογενειακό ιστορικό υπέρτασης (10).

Μεταβολικό σύνδρομο

Η σύγχρονη εμφάνιση της υπέρτασης, της υπερλιπιδαιμίας, της αντίστασης στην ινσουλίνη, του σακχαρώδους διαβήτη και του αυξημένου σωματικού βάρους αποτελούν το μεταβολικό σύνδρομο. Στην έρευνα των Weiss et al., βρέθηκε ότι η επίπτωση του μεταβολικού συνδρόμου είναι υψηλή μεταξύ των παχύσαρκων παιδιών και εφήβων και ότι αυξάνει με την αύξηση της επίπτωσης της παχυσαρκίας (11).

Αναπνευστικά προβλήματα.

Έχει αποδειχθεί ότι η παιδική παχυσαρκία συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αναπνευστικών προβλημάτων της παιδικής ηλικίας, όπως ο διαταραγμένος ύπνος (άπνοια ύπνου), η δυσκολία κατά την άσκηση και το άσθμα (9). Επιπλέον οι δυσκολίες της αναπνοής εντείνουν το πρόβλημα, αποτρέποντας το παιδί να ασκηθεί και να χάσει έτσι το υπερβάλλον βάρος του (12).

Μη φυσιολογική επιτάχυνση της ανάπτυξης.

Η παχυσαρκία είναι ο βασικότερος λόγος της μη φυσιολογικής γρήγορης ανάπτυξης των παιδιών. Η εφηβεία και η έμμηνος ρήση έρχεται νωρίτερα για τα σημερινά κορίτσια από ό,τι παλαιότερα και αυτό συνδέεται με την αύξηση του βάρους τους σε επίπεδο πληθυσμού (13).

Επιπτώσεις στην κοινωνικοποίηση και την ψυχολογία.

Τα παιδιά που έχουν αυξημένο βάρος για την ηλικία τους συχνά αντιμετωπίζουν προβλήματα ψυχολογικής και κοινωνικής φύσεως. Καθώς είναι πιο μεγαλόσωμα από τα συνομήλικά τους αντιμετωπίζονται από το κοινωνικό τους περιβάλλον ως πιο μεγάλα ηλικιακά με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλή αυτοπεποίθηση όταν δεν μπορούν να αντεπεξέρθουν στις προσδοκίες των άλλων. Ακόμα αναπτύσσουν χαμηλή αυτοεκτίμηση καθώς πέφτουν θύματα περιθωριοποίησης και χλευασμού από τους συνομηλίκους τους (6). Εξάλλου, έχει αποδειχθεί ότι έχουν αυξημένες πιθανότητες να

εμφανίσουν διαταραχή λήψης τροφής αργότερα στη ζωή τους ως έφηβοι ή ως ενήλικες(14).

Αυξημένη πιθανότητα για παχυσαρκία στην ενήλικη ζωή.

Διάφορες μελέτες, όπως των Gordon-Larsen et al. (15), έχουν καταγράψει τη διατήρηση της παχυσαρκίας από την παιδική ηλικία στην εφηβεία και μετά στην ενήλικη ζωή. Η πιθανότητα ένα υπέρβαρο παιδί να γίνει παχύσαρκος ενήλικας υπολογίζεται στο 50%, ενώ η πιθανότητα ένας παχύσαρκος έφηβος να γίνει παχύσαρκος ενήλικας υπολογίζεται μεταξύ 70-80% (16).

3. Η αθηρωμάτωση στην παιδική ηλικία

Η παχυσαρκία διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολικό σύνδρομο, που περιλαμβάνει την υπέρταση, την υπερλιπιδαιμία, την υπερινσουλιναιμία, τον σακχαρώδη διαβήτη και μια αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου. Η αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος είναι κυρίαρχος παράγοντας θανάτου για τους ενήλικες των δυτικών κοινωνιών (17).

Η αθηροσκλήρωση είναι νόσος των μεγάλων και μέτριου μεγέθους αρτηριών. Αρχικά σχηματίζονται πλάκες λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα, οι οποίες σε προχωρημένη ηλικία μπορούν να διαταράξουν τη ροή του αίματος στα αγγεία, οδηγώντας σε ισχαιμικά σύνδρομα, που περιλαμβάνουν παθήσεις της σταφανιαίας αρτηρίας, των εγκεφαλικών και των περιφερικών αγγείων. Την έναρξη της διαδικασίας την σηματοδοτεί βλάβη του ενδοθηλίου. Ακολουθεί, συσσώρευση μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα, μετάλλαξή τους σε μακροφάγα κύτταρα που ενδοκυτταρώνουν μεγάλες ποσότητες οξειδωμένης LDL και μετατροπής τους σε αφρώδη κύτταρα. Τα τελευταία συνιστούν τις πρώτες λιπαρές ραβδώσεις στην επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος. Συγχρόνως, λεία μυϊκά κύτταρα μετακομίζουν προς το τοίχωμα του αγγείου, περισσότερο λίπος συσσωρεύεται και αυξάνει το μέγεθος και η έκταση των λιπαρών γραμμώσεων. Καθώς προχωράει η διαδιακασία, με τη συμβολή του συνδετικού ιστού, δημιουργείται η αθηρωματική πλάκα, η οποία είναι ευαίσθητη να υποστεί ρήξη, αυξάνοντας τον κίνδυνο για θρόμβωση (18, 19).

Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, ξεκινάει νωρίς κατά την παιδική ηλικία για να δώσει τα πρώτα κλινικά συμπτώματα αργά στην ενήλική ζωή, μετά από μια μακρά ασυμπτωματική περίοδο. Τα αφρώδη κύτταρα και οι λιπαρές ραβδώσεις δύναται να δημιουργηθούν κατά τις πρώτες δεκαετίες της ζωής, η έναρξη

δημιουργίας της πλάκας κατά την τρίτη δεκαετία και η ινώδης αθηρωματική πλάκα κατά τη διάρκεια της τέταρτης δεκαετίας. Σύμφωνα με το άρθρο του Fremont-Smith, το 1908, διάφοροι επιστήμονες είχαν ανακαλύψει την ύπαρξη της ασθένειας σε έφηβους και νεαρούς ενήλικες μετά από αυτοψίες ατόμων που είχαν αιφνίδιο θάνατο. Μελέτη των Holman et al., σε 526 άτομα ηλικιών 1-40 ετών, έδειξε ότι η δημιουργία των λιπαρών γραμμώσεων ξεκινά από την ηλικία του ενός έτους, συνεχίζει αργά ως την ηλικία των 8 ετών και εξελίσσεται μετά ραγδαία. Η Διεθνής Μελέτη Αθηροσκλήρωσης που μελέτησε τη γεωγραφική κατανομή της ασθένειας, περιλαμβάνοντας άτομα ηλικίας 10-39 ετών από 14 χώρες, κατέληξε ότι η αορτή είναι η πρώτη δομή που εμφάνιζε λιπαρές γραμμώσεις στα παιδιά. Επίσης, μελέτη του WHO, βρήκε σχηματισμένες λιπαρές ραβδώσεις και αθηρωματικές πλάκες σε παιδιά 10-14 ετών και στένωση της στεφανιαίας σε άντρες από την ηλικία των 20 ετών (19). Ο Yet Stary, ανέφερε την ύπαρξη λιποφάγων σε σημεία βλάβης του τοιχώματος της στεφανιαίας αρτηρίας στο 45% νεογνών ηλικίας ως 8 μηνών (20). Τέλος, η Bogalusa Heart Study, σημαντική επιδημιολογική μελέτη που διεκπεραιώθηκε σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες, ανέλυσε τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου σε παιδιά από τη γέννηση ως την ηλικία των 26 ετών. Η έκταση των λιπαρών γραμμώσεων φάνηκε να συσχετίζεται ισχυρά με τα υψηλά επίπεδα ολικής και **LDL** χοληστερόλης και τα χαμηλά επίπεδα της **HDL** χοληστερόλης (21). Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η **παχυσαρκία**, η υπέρταση, η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο σακχαρώδης διαβήτης (17).

4. Παράγοντες προδιάθεσης παιδικής παχυσαρκίας

Πώς όμως τα παιδιά γίνονται παχύσαρκα; Η παχυσαρκία προκαλείται από μία ανισορροπία μεταξύ της ενεργειακής κατανάλωσης και της ενεργειακής πρόσληψης, που καταλήγει σε ένα φυσιολογικό θετικό ενεργειακό ισοζύγιο και συνεπώς σε μια αύξηση του σωματικού βάρους (22). Δηλαδή, κάθε άνθρωπος αυξάνει το σωματικό του βάρος όταν λαμβάνει περισσότερες θερμίδες από όσες καταναλώνει. Σύμφωνα με την κοινή λογική, η παχυσαρκία θα μπορούσε να αποφευχθεί ή να ιανθεί με τη μείωση της ποσότητας προσλαμβανόμενης τροφής και την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας. Όμως έχει αποδειχθεί ότι αυτός ο τρόπος αντιμετώπισης ή πρόληψης της παχυσαρκίας δεν είναι πανάκεια. Η παχυσαρκία είναι μια κοινή πολυπαραγοντική ασθένεια, στην οποία περιβαλλοντικοί και κληρονομικοί παράγοντες

αλληλεπιδρούν καθορίζοντας τον τελικό φαινότυπο. Ο συντονισμός του ενεργειακού ισοζυγίου εμπλέκει μια σύνθετη ρύθμιση της ενεργειακής πρόσληψης και κατανάλωσης ως απόκριση σε βραχύχρονα (ομοιοστατικά) σήματα (όπως της ινσουλίνης και των κατεχολαμινών), τα οποία εκδηλώνονται διαφορετικά από άτομο σε άτομο, αλλά και σε άλλα μακρόχρονα σήματα. Τα τελευταία φανερώνουν τις ενεργειακές ανάγκες που οφείλονται σε αλλαγές στη φυσική κατάσταση (π.χ. στην εγκυμοσύνη), στην κατάσταση θρέψης (π.χ. στη νηστεία), ή στην απόκριση σε μια ασθένεια (23).

Η ρύθμιση του σωματικού βάρους, της όρεξης και της ενεργειακής κατανάλωσης στα παιδιά διαφέρει από των ενηλίκων, εξαιτίας των ενεργειακών απαιτήσεων κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να χωριστούν σε περιβαλλοντικούς και κληρονομικούς.

4.1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου σε έναν οργανισμό, δηλαδή στην ισορροπία μεταξύ της ενεργειακής πρόσληψης και της ενεργειακής κατανάλωσης. Είναι αυτοί που καθορίζουν τις εκούσιες ενεργειακές ανταλλαγές του οργανισμού με το περιβάλλον. Για παράδειγμα, ένα θετικό ενεργειακό ισοζύγιο των 120 kcal ανά ημέρα, μπορεί να προκαλέσει μια αύξηση των 50 kg ύστερα από την πάροδο 10 ετών. Επομένως, όποιος περιβαλλοντικός παράγοντας προσθέτει ή αφαιρεί ένα μικρό ποσό ενέργειας θα μπορούσε να επιφέρει μακρόχρονα σημαντικές αλλαγές στο σωματικό βάρος (24).

4.1.1. Αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και αυξημένη πρόσληψη λίπους

Σύμφωνα με την κοινή λογική, η διατροφή είναι ο βασικός συντελεστής για τον καθορισμό του BMI, εφόσον αντιπροσωπεύει την ενεργειακή πρόσληψη. Όπως έχει ήδη επισημανθεί, όταν η ενεργειακή πρόσληψη υπερέχει της ενεργειακής κατανάλωσης, το άτομο γίνεται υπέρβαρο ή παχύσαρκο. Στις μέρες μας, αυτό δύναται να εξηγήσει το υψηλό ποσοστό των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών. Η διατροφή μπορεί να επηρεάσει το σωματικό βάρος του παιδιού με πολλούς τρόπους περιλαμβάνοντας: τις οικογενειακές διατροφικές συνήθειες και τις διατροφικές επιλογές, τον έλεγχο των μερίδων φαγητού, την κατανάλωση λίπους και τη

διαθεσιμότητα των διαφόρων τροφίμων στο σχολείο και το σπίτι. Στη σύγχρονη βιομηχανοποιημένη κοινωνία τα παιδιά τρώνε εκτός σπιτιού, προτιμούν το τυποποιημένα φαγητό, το οποίο είναι νόστιμο, οικονομικό και πλούσιο σε ενέργεια, λίπος και ζάχαρη. Η μερίδα που καταναλώνουν τα παιδιά είναι συνήθως διπλάσια της προτεινόμενης. Συνεπώς, τα παιδιά καταλήγουν να καταναλώνουν επιπλέον ενέργεια της απαιτούμενης για την ομαλή τους ανάπτυξη και έχουν μη θεμιτό θετικό ισοζύγιο ενέργειας. Δεν είναι τυχαίο που διάφορες περιγραφικές μελέτες έχουν φανερώσει θετική συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους και της πρόσληψης ενέργειας – λίπους (25).

Επιπρόσθετα, η αυξημένη κατανάλωση λίπους, επηρεάζει την ενεργειακή πρόσληψη όχι μόνο μέσω της υψηλής ενεργειακής πυκνότητας του λίπους, αλλά και της επίδρασής του στον έλεγχο της όρεξης. Έχει αποδειχθεί ότι το διαιτητικό λίπος είναι παράγοντας κινδύνου για υπερκατανάλωση ενέργειας, διότι καθυστερεί το αίσθημα του κορεσμού (26). Δηλαδή τα παιδιά που επιλέγουν τρόφιμα πλούσια σε λίπος έχουν αυξημένη πιθανότητα να οδηγηθούν σε θετικό ενεργειακό ισοζύγιο.

4.1.2. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα.

Η φυσική άσκηση σε συνδυασμό με τη διαιτητική πρόσληψη, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου. Το γεγονός ότι η παχυσαρκία τείνει να προσβάλει ολοένα και μεγαλύτερο αριθμό παιδιών αποδίδεται εν μέρει στη μειωμένη φυσική δραστηριότητα των σύγχρονων παιδιών.

Η τακτική φυσική άσκηση έχει θετικές επιδράσεις στο σύνολο των οργάνων του σώματος και εκτός της δαπανούμενης ενέργειας, συντελεί στην αύξηση γενικότερα του μεταβολικού ρυθμού. Για να αποκομίσει κάποιος τις θετικές επιδράσεις της φυσικής άσκησης, συστήνεται να κάνει οποιαδήποτε μορφή άσκησης για 30 λεπτά ημερησίως (27).

Δυστυχώς, η σύγχρονη τάση είναι τα παιδιά να απέχουν από κάθε μορφή άσκησης περισσότερο από το 75% του χρόνου που δεν κοιμούνται. Τα παιδιά στις πόλεις μην έχοντας ζωτικό χώρο να κινηθούν και να παίξουν, αφιερώνουν πολλές ώρες σε δραστηριότητες που δεν περιέχουν κάποια μορφή άσκησης, όπως είναι η τηλεόραση, τα παιχνίδια στον υπολογιστή και το διάβασμα (26). Μια παρεμβατική μελέτη έδειξε ότι μειώνοντας το χρόνο αφιέρωσης σε καθιστικές δραστηριότητες σε παιδιά δημοτικού, αυτά με την πάροδο 6 μηνών ελάττωσαν το σωματικό τους βάρος και την περίμετρο μέσης (28). Μια δεύτερη μελέτη έδειξε ότι η παρακολούθηση

τηλεόρασης συνεισφέρει στην αύξηση του σωματικού λίπους και ότι η μείωση του χρόνου παρακολούθησης θα είναι σημαντικό βήμα στην καταπολέμηση της παιδικής παχυσαρκίας (29).

4.1.3. Μητρικός θηλασμός

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο μητρικός θηλασμός μειώνει τον κίνδυνο για παιδική παχυσαρκία. Στην επισκόπηση διαφόρων ερευνών των Grummer-Strawn et al., διαπιστώθηκε ότι ο παρατεταμένος μητρικός θηλασμός σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για υπερβάλλον σωματικό βάρος σε παιδιά της λευκής φυλής. Μάλιστα, αν η διάρκεια του θηλασμού είναι μεγαλύτερη των 6 μηνών, προσφέρει στα παιδιά μεγαλύτερα πλεονεκτήματα στο μέλλον (30).

4.1.4. Περιβάλλον

Το περιβάλλον ενός παιδιού είναι φυσικό να καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη συμπεριφορά του και να διαμορφώνει τη σχέση του με το φαγητό και την φυσική δραστηριότητα που είναι και οι δύο ισχυροί εξωγενείς παράγοντες για την παχυσαρκία. Για το λόγο αυτό, η οικογένεια αποτελεί έναν ισχυρό περιβαλλοντικό παράγοντα που συμβάλλει στην εμφάνιση ή όχι της παχυσαρκίας. Έχει δειχθεί ότι ο πιο σημαντικός παράγοντας διαμόρφωσης διατροφικών προτιμήσεων στα παιδιά, είναι η οικογένεια (31). Επίσης, οι γονείς δύνανται πολλές φορές να διαστρεβλώσουν τη σχέση των παιδιών τους με το φαγητό, όταν τα επιβραβεύουν με αυτό (31). Διάφορες περιγραφικές έρευνες έχουν δείξει ότι τα παιδιά οικογενειών με χαμηλό εισόδημα έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να γίνουν παχύσαρκα. Αυτό ίσως να συμβαίνει διότι σε αυτές τις οικογένειες τα γεύματα συνήθως είναι ακανόνιστα, πρόχειρα και η μητέρα τείνει να υπερσιτίζει το παιδί (32). Επιπλέον, διάφορες σουηδικές έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στην παραμέληση του παιδιού από τους γονείς και την εμφάνιση της παχυσαρκίας σε αυτό. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι μεγάλο ποσοστό παιδιών που έχουν υψηλούς ρυθμούς αύξησης βάρους, έχουν μαθησιακές δυσκολίες και προβλήματα συμπεριφοράς. Αυτό ενδέχεται να αντανακλά συσχέτιση παιδικής παχυσαρκίας και χαμηλού οικογενειακού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου (6).

4.2. Γενετικοί παράγοντες

Παρά το γεγονός ότι η αύξηση της επίπτωσης της παχυσαρκίας σε πολλές χώρες υποστηρίζει την κυρίαρχη επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων (κυρίως της υπερφαγίας και της έλλειψη φυσικής άσκησης), ευρήματα πολλών σχετικά πρόσφατων μελετών εκτιμούν τη συνεισφορά των γενετικών παραγόντων. Ανάλυση κάποιων μελετών, όπως των Bouchard et al. που πραγματοποιήθηκαν σε δίδυμα και σε συγγενείς, έδειξε ότι το 50 – 70 % της διακύμανσης του δείκτη μάζας σώματος μπορεί να αποδοθεί στη γενετική ποικιλομορφία (33). Μάλιστα, αν και οι δύο γονείς έχουν φυσιολογικό BMI, η πιθανότητα ένα παιδί να γίνει παχύσαρκο είναι μόλις 9%, ενώ όταν και οι δύο γονείς είναι παχύσαρκοι, η αντίστοιχη πιθανότητα, είναι 60-80% (34). Ύστερα από επεξεργασία στοιχείων από περισσότερα από 25,000 ζεύγη διδύμων και 50,000 βιολογικά και υιοθετημένα μέλη οικογενειών, οι συσχετίσεις-αφού λήφθηκαν υπόψη και άλλοι παράγοντες- είναι 0,74 για τα μονοζυγωτικά δίδυμα, 0,32 για τα διζυγωτικά δίδυμα, 0,25 για τα ετεροθαλή αδέλφια, 0,19 για τα ζεύγη γονέων – απογόνων, 0,06 για τους θετούς συγενείς και 0,12 για τους συζύγους (35). Η μελέτη των Agras et al., η οποία μελέτησε τους παράγοντες κινδύνου για την υπέρμετρη αύξηση βάρους σε παιδιά ηλικίας 9,5 ετών, κατέληξε ότι ο πιο ισχυρός παράγοντας κινδύνου ήταν το σωματικό βάρος των γονέων (36).

Η μονογονιδιακή γενετική επίδραση που έχει περιγραφεί σε μερικές οικογένειες δεν αποτελεί το μοντέλο επίδρασης των γενετικών παραγόντων στις κοινές μορφές παχυσαρκίας. Φαίνεται ότι ένα κυρίαρχο γονίδιο σε συνδυασμό με άλλα δευτερεύοντα γονίδια αποτελούν τους γενετικούς παράγοντες πίσω από την υπερβολική συσσώρευση λίπους στα περισσότερα παχύσαρκα άτομα (33).

4.2.2. Μονογονιδιακές μορφές παχυσαρκίας

Κατ᾽αρχήν, για τα περισσότερα σύνδρομα παχυσαρκίας, όπως το Prader-willi, Cohen, Alstrom, και το Bardet-Biedl, αν και έχει γίνει γονιδιακή χαρτογράφηση, τα υπεύθυνα γονίδια δεν έχουν ακόμα απομονωθεί. Αντίθετα, τα αποτελέσματα ερευνών για τις μη συνδρομικές μορφές μονογονιδιακής παχυσαρκίας είναι πιο επιτυχή. Μελέτες μεγάλων δειγμάτων ανθρώπινου πληθυσμού, οδήγησαν στην ταυτοποίηση πέντε ανθρώπινων γονιδίων παχυσαρκίας: της λεπτίνης, του υποδοχέα της λεπτίνης,

της προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC), του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R) και της προκονβερτάσης (PC1). Είναι σημαντικό ότι όλες οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα πέντε γονίδια αποτελούν μέρος του ίδιου μηχανισμού ελέγχου της πρόσληψης τροφής (37).

Η **λεπτίνη**, μια 16-k-Da πρωτεΐνη, είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τον λευκό λιπώδη ιστό και ενέχεται στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής, στην ενεργειακή κατανάλωση και στο ενεργειακό ισοζύγιο όλου του σώματος σε τρωκτικά και σε ανθρώπους. Μετά την έκκρισή της από τον λιπώδη ιστό, μεταφέρεται και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό προσδεδεμένη στον μικρού μήκους υποδοχέα της, τον ObRa. Όταν φτάσει στην περιοχή του υποθαλάμου, προσδένεται στον μεγάλου μήκους υποδοχέα της, τον ObRb. Ακολουθεί μια σειρά αντιδράσεων μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η παραγωγή των διαφόρων ορεξιογόνων νευροπεπτιδίων και να ευοδώνεται η παραγωγή των ανορεξιογόνων. Τα ορεξιογόνα των οποίων η έκκριση υπόκειται στην αρνητική ανατροφοδότηση του μορίου της λεπτίνης είναι το νευροπεπτίδιο Y, η ορμόνη MCH, οι ορεξίνες A και B και τα οποιοειδή (26). Έχουν βρεθεί ελάχιστες περιπτώσεις μονογονιδιακής παχυσαρκίας σε ανθρώπους που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης ή του υποδοχέα αυτής. Για παράδειγμα μια μετάλλαξη που οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητας της λεπτίνης βρέθηκε μόνο σε δύο συγγενικά άτομα. Ο φαινότυπος της σοβαρής αυτής μορφής παχυσαρκίας περιλάμβανε αυξημένη όρεξη, υπερφαγία και υπογοναδισμό (38). Παρομοίως, μία μόνο οικογένεια βρέθηκε με μεταλλάξεις στον υποδοχέα της λεπτίνης, που είχαν ως απόρροια την απώλεια του σήματος της λεπτίνης και σοβαρή παχυσαρκία (39). Αν και οι μεταλλάξεις αυτές είναι σπάνιες, υπογραμμίζουν τον κεντρικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει η λεπτίνη στην ενεργειακή ομοιόσταση (40).

Στενά συνδεδεμένα με τη λειτουργία της λεπτίνης στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής, είναι και τα πρωτεϊνικά μόρια της προ-οπιομελανοκορτίνης (**POMC**), του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (**MC4R**) και της προκονβερτάσης (**PC1**). Μία από τις λειτουργίες της λεπτίνης είναι η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της POMC. Ακολούθως, το ένζυμο PC1 διασπά την POMC στα μόρια ACTH και α-MSH Το τελευταίο μόριο, η α-διεγερτική ορμόνη του μελανοκυττάρου, αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R), προκαλεί μείωση της όρεξης και της πρόσληψης τροφής. Ο ρόλος κλειδί του συστήματος της μελανοκορτίνης στον έλεγχο του σωματικού βάρους στον άνθρωπο έχει διαπιστευτεί μετά την ανακάλυψη μεταλλάξεων στα γονίδια των POMC και MC4R που προκαλούν παχυσαρκία (40, 41).

Επιπλέον, έχουν βρεθεί άτομα με πολυάριθμες μεταλλάξεις στο γονίδιο της MC4R. Μέχρι τώρα, το γονίδιο αυτό θεωρείται ότι είναι κυρίαρχο στο χώρο της μονογονιδιακής παχυσαρκίας, καθώς είναι υπεύθυνο για το 1% - 4% της πολύ σοβαρής μορφής παχυσαρκίας (40).

4.2.3. Κοινές ή πολυγονιδιακές μορφές παχυσαρκίας

Η ανακάλυψη των γονιδίων που εμπλέκονται σε μονογονικές μορφές παχυσαρκίας, δεν έδωσε την απάντηση για τις κοινές μορφές παχυσαρκίας. Για την ανακάλυψη των γονιδίων που ευθύνονται για τις συχνές μορφές παχυσαρκίας, η επιστημονική κοινότητα κατέφυγε σε δύο μεθόδους. Η πρώτη προσέγγιση εστίασε στη μελέτη «υποψηφίων γονιδίων», δηλαδή γονιδίων που επιλέχθηκαν ως πιθανά γονίδια παχυσαρκίας, επειδή έχουν κάποιο βιολογικό ρόλο στην ενεργειακή ομοιόσταση. Μάλιστα, οι προσπάθειες εστιάστηκαν στον λιπώδη ιστό. Τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών προτείνουν ότι ένα κύριο γονίδιο ελέγχει τον λιπώδη ιστό. Η δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποίησε μεθόδους ευρείας γονιδιακής χαρτογράφησης με σκοπό να εντοπίσει χρωμοσωμικές περιοχές που να φανερώνουν κάποια συσχέτιση με την παχυσαρκία σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι στα χρωμοσώματα 2,10,11 και 20 περιέχονται ένα ή περισσότερα γονίδια που συχετίζονται με την παχυσαρκία (33).

Αν και οι δύο αυτοί τρόποι προσέγγισης έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα, πιστεύεται ότι διάφορα γονίδια (σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες) εμπλέκονται στην εμφάνιση των κοινών μορφών παχυσαρκίας. Ίσως ένα γονίδιο να είναι το κύριο και τα υπόλοιπα να ασκούν δευτερεύουσα δράση (33). Αυτό φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα σχηματικά:

Πρόσφατα, πολυμορφισμοί σε διαφορετικά γονίδια έχουν συνδεθεί με την παχυσαρκία και είναι άξιο προσοχής ότι όλα αφορούν τον έλεγχο λειτουργιών στον λιπώδη ιστό. Ένα τέτοιο είναι το γονίδιο του **β3-αδρενεργικού υποδοχέα**, μια μετάλλαξη του οποίου συνδέθηκε με την παχυσαρκία και άλλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου. Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται και ασκεί τη δράση του στον λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. Στον φαιό λιπώδη ιστό συμμετέχει στη θερμογένεση και στον λευκό επάγει τη λιπόλυση. Παρόμοια είναι η δράση του **β2-αδρενεργικού υποδοχέα**, ο οποίος συμμετέχει στην ενεργειακή ομοιόσταση με διάφορους τρόπους. Μεταλλάξεις του γονιδίου του έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση παχυσαρκίας. Άλλη πρωτείνη σημαντική για τη διαδικασία της λιπόλυσης είναι η **ορμονοευαίσθητη λιπάση**. Είναι υπεύθυνη για το τελικό βήμα του καταβολισμού των τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα. Δύο μελέτες έχουν δείξει μια πιθανή σχέση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου αυτού και της παχυσαρκίας. Ακόμα, πολυμορφισμοί των **πρωτεϊνών αποδέσμευσης (UCP)**, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν την παραγωγή του ATP κατά την μιτοχονδριακή αναπνοή, είναι πιθανό να συμβάλουν στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Πολυμορφισμοί του παράγοντα νέκρωσης όγκων **TNF-α** και του **υποδοχέα της LDL λιποπρωτεΐνης** έχουν επίσης σχετισθεί με την παχυσαρκία. Τέλος, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων ή αλλιώς **PPARs**, είναι παράγοντες ελέγχου της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και του μεταβολισμού του λίπους. Συγκεκριμένα, για το γονίδιο του PPARγ2 έχουν βρεθεί δύο μεταλλάξεις, η Pro115Gln και η Pro12Ala, οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν το σωματικό βάρος (33, 40).

Από τα παραπάνω φαίνεται πως διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του λίπους έχουν σχετισθεί με τον καθορισμό του σωματικού βάρους. Στην πλειοψηφία όμως των μεταλλάξεων στα γονίδια αυτών, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα, υπογραμμίζοντας την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης του θέματος (33, 40).

5. ΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΣΩΜΑΤΩΝ (PPARS) -PPARγ

5.1. Γενικά

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων ή αλλιώς PPARs είναι μεταγραφικοί παράγοντες / πυρηνικοί υποδοχείς και ανήκουν στη μεγάλη υπεροικογένεια των εξαρτημένων από λιπόφιλα μόρια-συνδέσμους πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NR). Στην ίδια υπεροικογένεια ανήκουν οι υποδοχείς στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών, οι υποδοχείς της ρετινοειδικής ορμόνης κ.α. Οι υποδοχείς αυτοί ασκούν τη δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες αφού συνδεθούν με το κατάλληλο λιπόφιλο μόριο-σύνδεσμο, όπως είναι διάφορα στεροειδή, ρετινοειδή, χολικά άλατα και λιπαρά οξέα (42). Ακολούθως, ενεργοποιούν το κατάλληλο γονίδιο-στόχο αφού συνδεθούν ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με ειδική αλληλουχία DNA, που καλείται στοιχείο απόκρισης (**RE**) και το οποίο βρίσκεται στον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου (43). Η ομαδοποίησή τους έχει βασιστεί σε ένα κοινό δομικό μοτίβο που αποτελείται από μια κεντρική περιοχή σύνδεσης του DNA, η οποία περιέχει δύο δάχτυλα ψευδαργύρου και μια μεγάλη περιοχή σύνδεσης στο καρβύξυ τελικό άκρο που προσδένει το μόριο-σύνδεσμο (42). Υπάρχουν **τρεις ισομορφές PPAR**, που καλούνται PPARα, PPARβ και PPARγ.

Οι τρεις ισομορφές των ενεργοποιημένων υποδοχέων πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων PPARα, PPARβ και PPARγ κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια που βρίσκονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 22, 6 και 3 αντίστοιχα (43).

5.2. Δομη και μόρια-σύνδεσμοι των PPARs

Τα πρωτεϊνικά μόρια PPAR έχουν κοινή δομή και αποτελούνται από τις εξής περιοχές: Στο Ν-τελικό άκρο βρίσκεται η **περιοχή Α/Β**, της οποίας η ακολουθία αμινοξέων και το μήκος ποικίλουν και έχει μεταγραφική ιδιότητα , ανεξάρτητη της πρόσδεσης μορίων-συνδέσμων, η οποία καλείται λειτουργία ενεργοποίησης 1 (**AF-1**). Ακολουθεί η υψηλά διατηρημένη **C περιοχή**, που σχηματίζει την περιοχή σύνδεσης του μορίου PPAR με το αντίστοιχο τμήμα DNA, μήκους 70 περίπου αμινοξέων, και καλείται περιοχή **DBD**. Τρίτη είναι η **D περιοχή**, που συνδέει την περιοχή DBD με την περιοχή LBD. Τέλος, στο C-τελικό άκρο του μορίου PPAR βρίσκεται η περιοχή

LBD, που περιέχει την περιοχή σύνδεσης του μορίου-συνδέσμου, η οποία έχει μεταγραφική ιδιότητα και καλείται λεοτουργία ενεργοποίησης 2 (**AF-2**) (43).

Τα LBDs των τριών τύπων των PPARs έχουν τελείως διαφορετική δομή με αποτέλεσμα να εμφανίζουν εξειδίκευση όσον αφορά τα μόρια-συνδέσμους τους (43). Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των PPARs είναι ότι οι περιοχές σύνδεσης των μορίων-συνδέσμων είναι ευρύχωρες, ώστε να μπορούν να συνδεθούν με μια μεγάλη ποικιλία αυτών (42). Τα **μόρια-σύνδεσμοι** μπορούν να χωριστούν σε **α) συνθετικά** μόρια-σύνδεσμοι, όπως είναι οι πολλαπλασιαστές των υπεροξειδιοσωμάτων και μόρια με ιδιότητες υπολιπιδαιμικές, αντιφλεγμονώδεις και επαγωγής της ινσουλινοευαισθησίας και σε **β) φυσικά** μόρια-συνδέσμους, όπως είναι τα μέσου και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα και τα εικοσανοειδή (43).

5.3. Ιστική έκφραση και λειτουργία των PPARs

Η έκφραση των PPARs στους διάφορους ιστούς έχει υπάρξει αντικείμενο μελέτης στο *Xenopus*, στα τρωκτικά και στον άνθρωπο (43). Επιπλέον, η μελέτη διαφόρων ανερμηνεύσιμων μεταλλάξεων και η χρήση υψηλής συγγένειας μορίων-συνδέσμων των PPARs έχει συνεισφέρει στην πιστοποίηση γονιδίων που ελέγχονται από αυτούς τους υποδοχείς και στη συσχέτιση των μοριακών σχέσεων με ευρύτερες φυσιολογικές λειτουργίες (44). Οι τρεις ισομορφές των PPARs εκτός από διαφορετικές λειτουργίες, εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς.

Συγκεκριμένα, το **PPARα** εκφράζεται κυρίως σε όργανα με υψηλό ρυθμό *καταβολισμού λιπαρών οξέων* (42), όπως ο φαιός λιπώδης ιστός, το ήπαρ, ο σκελετικός ιστός, το έντερο, τα νεφρά και η καρδιά (43). Συμμετέχει στην ανάπτυξη του ήπατος και των υπεροξειδιοσωμάτων ως απόκριση στην έκθεση σε ξενοβιοτικά. Ο φυσιολογικός ρόλος του PPARα φαίνεται να είναι ο έλεγχος της οξείας φάσης απόκρισης και η μεταβολική *προσαρμογή στη φάση νηστείας*. Έχει σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο του ενδιάμεσου μεταβολισμού, εφόσον ελέγχει την έκφραση πολλών μεταβολικών ενζύμων. Με τον τρόπο αυτόν, διεγείρει την πρόσληψη, τη σύνδεση, την ενεργοποίηση και τελικά την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, επάγει τη σύνθεση των κετονικών σωμάτων, επηρεάζει τη σύνθεση των απολιποπρωτεϊνών, όπως της apoAI και της apoAII και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων κατά τη γλυκονεογένεση. Καθώς, είναι πιθανός ενεργοποιητής της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ, έχει την ιδιότητα να αποτρέπει τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και

τη δημιουργία λιπώδους ήπατος. Σε συνάρτηση με την αποτροπή συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ, το PPARα φαίνεται να ελαχιστοποιεί την αποθήκευση λίπους σε κεντρικά όργανα. Επιπλέον, η λεπτίνη αυξάνει την έκφραση του PPARα με αποτέλεσμα την αύξηση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, εμποδίζοντας το σχηματισμό τους σε τριγλυκερίδια (42).

Το **PPARβ** φαίνεται να είναι *πανταχού παρόν*, ενώ σχετικά μεγάλα ποσά συναντούνται στον εγκέφαλο. Λόγω της σχετικά πρόσφατης διαθεσιμότητας ειδικών για το PPARβ μορίων-συνδέσμων, η λειτουργία του δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί. Έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών διαδικασιών, όπως στην εμφύτευση εμβρύου, στην επούλωση πληγών, στην φλεγμονή, στον καρκίνο και στην οστεοπόρωση. Επίσης, υπάρχει απόδειξη ότι το PPARβ συμβάλλει στην συσσώρευση λίπους σε αποικίες ανθρώπινων μακροφάγων. Φαίνεται ότι το PPARβ συντονίζει ένα περίπλοκο μοντέλο γονιδιακής έκφρασης, ελέγχοντας με τον τρόπο αυτόν την πρόσληψη, τη μεταφορά, την αποθήκευση και το μεταβολισμό των λιπιδίων (45).

Τέλος, το **PPARγ** είναι το πιο μελετημένο από τα PPARs και είναι το μόνο που έχει τρεις ισομορφές: το PPARγ1, το PPARγ2 και το PPARγ3. Οι κυριότεροι ιστοί στους οποίους εκφράζεται το PPARγ είναι ο λιπώδης ιστός, το παχύ έντερο και τα αιμοποιητικά όργανα. Με τη βοήθεια διαφόρων συνθετικών μορίων-συνδέσμων έχει ανακαλυφθεί ότι το PPARγ συμμετέχει στη ρύθμιση των μεταβολικών λειτουργιών του οργανισμού προάγοντας τη λιπογένεση, καθορίζοντας το λιπιδαιμικό προφίλ και αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επιπλέον, συμμετέχει στις διαδικασίες της αθηρωμάτωσης και του κύκλου ζωής του κυττάρου (46).

5.4. PPARγ: το γονίδιο, το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και η πρωτεΐνη

Το ανθρώπινο PPARγ γονίδιο, το οποίο έχει εννέα εξόνια και έχει έκταση μεγαλύτερη από 100 kb του γενωμικού DNA βρίσκεται σε μια περιοχή του χρωμοσώματος 3p25 γειτονική στην περιοχή του γονιδίου RARβ και του TRβ. Εναλλακτική χρήση υποκινητή και διαφορετικό μάτισμα δημιουργεί τρία διαφορετικά αντίγραφα του γονιδίου του PPARγ: το PPARγ1, το PPARγ2 και το PPARγ3. Όλα τα PPARγ mRNAs μοιράζονται τα έξι 3′ εξόνια, αλλά διαφέρουν στο 5′ τελικό άκρο τους. Το PPARγ1 περιέχει επιπρόσθετα τα εξόνια A1 και A2, το PPARγ2 το B εξόνιο, ενώ το PPARγ3 μόνο το A2 εξόνιο. Τελικά, τα mRNA των PPARγ1 και PPARγ3 κωδικοποιούν

το ίδιο πρωτεϊνικό προϊόν, ενώ το PPARγ2 mRNA περιλαμβάνει επιπλέον 28 αμινοξέα στο N-τελικό άκρο (47).

Η δομή της πρωτείνης του PPARγ δε διαφέρει από την αντίστοιχη των πυρηνικών υποδοχέων. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, αποτελείται από τις εξής περιοχές:

1. Περιοχή A/B: Η περιοχή A/B παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των τριών τύπων PPARs. Έχει ικανότητα ενεργοποίησης ή αναστολής της μεταγραφικής λειτουργίας του PPARγ (**AF-1**), ανεξάρτητα από τη σύνδεση μορίων-συνδέσμων. Μεταβάλλει τις πυρηνικές μεταφορές, την ικανότητα πρόσδεσης των μορίων-συνδέσμων και την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA μέσω *αλλαγών στη διαμόρφωση του μορίου*. Ειδικότερα, φωσφορυλίωση της σερίνης 12 και της σερίνης 21 της A/B περιοχής από τη MAP κινάση αυξάνει τη συγγένεια του υποδοχέα με το μόριο-σύνδεσμο (43, 46). Οι παραπάνω λειτουργίες επιτυγχάνονται μέσω της επικοινωνίας της περιοχής A/B και της θέσης πρόσδεσης των μορίων-συνδέσμων στην περιοχή LBD. Το πρόσθετο N-τελικό άκρο του PPARγ2 επίσης συμμετέχει στον έλεγχο της λειτουργίας του υποδοχέα χωρίς να είναι αναγκαία η πρόσδεση κάποιου μορίου. Αυτό επιβεβαιώνεται στον άνθρωπο που μια μετάλλαξη, η Pro12Ala στο N-τελικό άκρο του PPARγ2 σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (43).

2. Περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD): Η περιοχή αυτή είναι η πιο καλά διατηρημένη και περιέχει δύο δάχτυλα ψευδαργύρου με μοτίβα πρόσδεσης στο DNA α-έλικας, όπως συναντούμε στους περισσότερους μεταγραφικούς παράγοντες. Μεταλλάξεις σε αυτήν την περιοχή μπορεί να μηδενίσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα. Το **PPARγ προσδένεται στο DNA ως ετεροδιμερές** με τον 9-cis υποδοχέα του ρετινοικού οξέος (**RXR**). Σημειώνεται ακόμα, ότι τα λειτουργικά σημεία απόκρισης του PPARγ (**PPRE**) στο μόριο του DNA αποτελούνται από δύο αντίγραφα ενός κεντρικού μοτίβου. Είναι οργανωμένα ως δύο συνεχή αντίγραφα και διαχωρίζονται από ένα νουκλεοτίδιο (43).

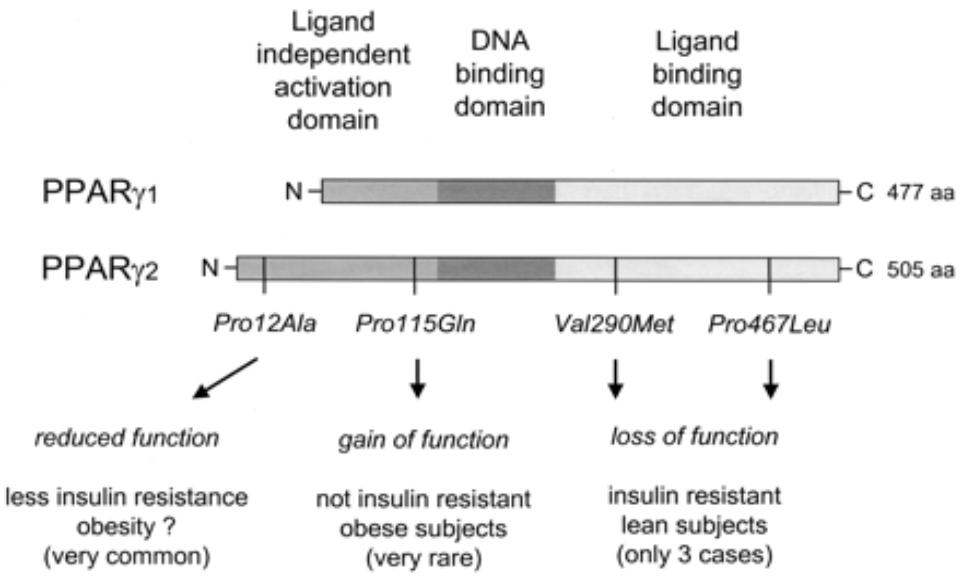
3. Περιοχή D: Συνδέει την περιοχή DBD με την περιοχή LBD και περιέχει μόνο 3 αμινοξέα.

4. Περιοχή πρόσδεσης του μορίου-συνδέσμου (LBD): Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από μεταγραφική δραστηριότητα που εξαρτάται από την πρόσδεση μορίων-συνδέσμων και καλείται λειτουργία ενεργοποίηση 2 (**AF-2**). Η κρυσταλλική δομή της περιοχής LBD του ανθρώπινου μορίου του PPARβ και PPARγ βρέθηκε με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας με την παρουσία ή χωρίς κάποιου μορίου-συνδέσμου. Σχηματίζεται από ομάδες των 13 α-ελίκων που διαχωρίζονται από ένα μικρό τμήμα β-δομής. Το πιθανό τμήμα όπου προσδένεται το μόριο-σύνδεσμος του PPARγ

αποτελείται από το αμινοξύ D243 που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της πρώτης β-πτύχωσης και τα αμινοξέα R288, E291, E295, που εντοπίζονται στην τρίτη α-έλικα. Η πρόσδεση του μορίου-συνδέσμου προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του LBD, που αφορούν κυρίως το C-τελικό άκρο της AF-2 (43).

Ο τρόπος που η πρόσδεση των μορίων-συνδέσμων στην περιοχή LBD επάγει τη λειτουργία ενεργοποίησης 2 (AF-2), αλλά και η λειτουργία ενεργοποίησης 1 (AF-1) στην περιοχή A/B αποσαφηνίστηκαν με την ανακάλυψη του ρόλου των συμπαραγόντων. Είναι γνωστό πλέον, πως προκειμένου να μεταγραφεί ένα τμήμα DNA είναι απαραίτητη η ακετυλίωση των ιστονών της χρωματίνης. Όταν το PPARγ είναι ανενεργό, είναι προσδεμένο σε αυτό κάποιος **συμπαράγοντας-αναστολέας** που αποτρέπει την ακετυλίωση των ιστονών. Η ενεργοποίηση όμως του PPARγ, δηλαδή η αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου μέσω των AF-1 και AF-2 επάγει την απομάκρυνση των συμπαραγόντων-αναστολέων και τη πρόσδεση των συμπαραγόντων-ενεργοποιητών. Ένα παράδειγμα των τελευταίων είναι οι ακετυλάσες των ιστονών **CBP/p300** και **SRC** (46).

Διάφορες έρευνες έχουν φέρει στο φως έναν αριθμό **πολυμορφισμών** του γονιδίου του PPARγ. Σε αυτούς περιλαμβάνονται μεταλλάξεις που αυξάνουν τη λειτουργικότητα του μορίου, όπως η πολύ σπάνια μετάλλαξη **Pro115Gln** που σχετίζεται με την παχυσαρκία αλλά όχι με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ενώ, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις που μειώνουν τη λειτουργικότητα του PPARγ, όπως ο πολύ συχνός πολυμορφισμός **Pro12Ala** του PPARγ2 και δύο μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε τρία άτομα με ινσουλινοαντίσταση και που οδηγούν σε απώλεια λειτουργικότητας (**Val290Met** και **Pro467Leu**). Τέλος παράδειγμα σιωπηλής μετάλλαξης είναι η **CAC478CAT** (48). Η δομή του μορίου του PPARγ και οι διάφορες μεταλλάξεις παρουσιάζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Δομή του γονιδίου του PPARγ1 και του PPARγ2 και διάφοροι πολυμορφισμοι τους

5.5. Ιστική έκφραση και παράγοντες έκφρασης του PPARγ

Η ιστική έκφραση του PPARγ στα θηλαστικά δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Στα ενήλικα ζώα η έκφραση του PPARγ εμφανίζεται περιορισμένη. Τα όργανα όπου συναντούνται τα μεγαλύτερα ποσά του αγγελιοφόρου RNA και πρωτεΐνης του PPARγ είναι **ο λιπώδης ιστός, το παχύ έντερο και τα αιμοποιητικά κύτταρα**. Μέτρια συγκέντρωση συναντούμε στα νεφρά, στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο, ενώ υπάρχουν ίχνη στους μύες. Το PPARγ1 είναι η πιο διαδεδομένη ισομορφή και εκφράζεται σχεδόν σε όλους του προαναφερόμενους ιστούς. Η έκφραση του PPARγ2 είναι περιορισμένη και ο μόνος ιστός που βρίσκεται σε σχετικά μεγαλύτερη ποσότητα είναι ο λιπώδης ιστός. Τέλος, η έκφραση του PPARγ3 περιορίζεται στα μακροφάγα και στο παχύ έντερο (46).

Η έκφραση του mRNA ή της πρωτεΐνης του PPARγ ή και των δύο στον λιπώδη ιστό μεταβάλλεται υπό την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, παραγόντων του μεταβολισμού και διαφόρων ορμονών. Στον άνθρωπο, οι βραχύχρονες αλλαγές στη **διατροφή** δεν επηρεάζουν την έκφραση του PPARγ ενώ οι μακρόχρονες υποθερμιδικές δίαιτες μετριάζουν την έκφρασή του. Στα τρωκτικά, η έκφραση του PPARγ μειώνεται ύστερα από νηστεία, αλλά αυξάνεται μετά από δίαιτα πλούσια σε λίπος. Επίσης έχει δειχθεί ότι η **ινσουλίνη** προκαλεί γρήγορη έκφραση του PPARγ σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων. Αντίστοιχα, ο παράγοντας **TNFα** φάνηκε ότι μειώνει την έκφραση του μορίου και ότι τα **γλυκοκορτικοειδή** ευοδώνουν την

έκφραση του μορίου στον λιπώδη ιστό. Αν και η έκφραση του PPARγ στους μύες είναι περιορισμένη, πραγματοποιούνται έρευνες στον τομέα αυτόν, λόγω του κεντρικού ρόλου του μορίου στη διάθεση της γλυκόζης (46).

5.6. Μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ

Η διαλεύκανση της λειτουργίας του PPARγ έχει βοηθηθεί από την ανακάλυψη των συνθετικών και ενδογενών μορίων-συνδέσμων του. Συνθετικές ενώσεις με υπολιπιδαιμική δράση της τάξης των φιμπρατών, όπως η Wy 14,643 και η κλοφιμπράτη ήταν τα πρωτοαναφερόμενα μόρια-σύνδεσμοι κυρίως για το PPARα και δευτερευόντως για το PPARγ. Με διάφορες έρευνες ανακαλύφθηκαν και άλλα λιπόφιλα μόρια που συνδέονταν στα μόρια PPAR (43). Ακολούθως, ανακαλύφθηκε μια τάξη συνθετικών ενώσεων, οι θειαζολιντινεντιόνες (**TZD**), τα οποία έδειχναν μια υψηλή συγγένεια με το PPARγ και χρησιμοποιούνταν κλινικά για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη. Επίσης, θεραπεία με τα TZD οδήγησε σε αύξηση του λιπώδους ιστού και σε βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, τα οποία οφείλονταν σε μεσολάβηση του PPARγ. Αυτές οι ενώσεις είχαν δημιουργηθεί για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους. Η συγγένεια που εμφάνισαν τα TZD με το PPARγ ήταν αρκετά υψηλή, ενώ η ικανότητά τους να ανατρέπουν την υπερτριγλυκεριδαιμία ήταν ανάλογη του βαθμού σύνδεσής τους με το PPARγ (49, 50).

Η αναγνώριση των ενδογενών μορίων-συνδέσμων του PPARγ πραγματοποιήθηκε μετά την ανακάλυψη των συνθετικών μορίων-συνδέσμων. Παρά τη χρησιμότητα των συνθετικών μορίων TZD ως ερευνητικά και θεραπευτικά μέσα, όσον αφορά τα ενδογενή μόρια-συνδέσμους, δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για τη φυσιολογική τους λειτουργία. Πάντως, έρευνες αναγνώρισαν κάποιες φυσικές ενώσεις που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο μόριο του PPARγ, όπως για παράδειγμα η 15 δεόξυ-$\Delta^{12,14}$ προσταγλανδίνη J_2. Αυτό το εικοσανοειδές είναι ικανό να προσδένεται, να ενεργοποιεί το PPARγ και να προάγει τη λιπογένεση όταν προστίθεται σε καλλιέργεια ινοβλαστών (49).

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι διάφορα λιπαρά οξέα που κυριαρχούν in vivo και περιλαμβάνουν το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό οξύ, λινολενικό οξύ και αραχιδονικό οξύ δύναται να δράσουν ως μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ σε συγκεντρώσεις παρόμοιες αυτών του ανθρώπινου ορού (51). Τέλος,

σημαντικό είναι το εύρημα ότι *οξειδωμένοι μεταβολίτες του λινελαϊκού οξέος που βρίσκονται σε οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, όπως το 9-HODE και το 13-HODE έχουν αναγνωριστεί ως ενδογενή μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ* (43).

5.7. Φυσιολογικές λειτουργίες του PPARγ

5.7.1. Λιπογένεση – έλεγχος της διαφοροποίησης του λιπώδους ιστού

Η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από αυξημένο λιπώδη ιστό, που είναι αποτέλεσμα του αυξημένου αριθμού καθώς και του αυξημένου μεγέθους των λιποκυττάρων. Ο αριθμός των λιποκυττάρων καθορίζεται από παράγοντες που ελέγχουν τη διαδικασία διαφοροποίησης αυτών, δηλαδή την ωρίμανση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα (52). Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει ένας αριθμός ορμονών και μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο επιβάλλει την έκφραση του λιπώδους φαινοτύπου, δηλαδή της συσσώρευσης λιπιδίων και της έκφρασης των ειδικών για το λιποκύτταρο γονιδίων, όπως της πρωτεΐνης σύνδεσης των λιπαρών οξέων (aP2), της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και της αντιψίνης (42).

Πιστεύεται ότι η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων είναι απόρροια της συνεργασίας μεταξύ τριών μεταγραφικών παραγόντων: του ετεροδιμερούς **PPARγ/RXR**, των πρωτεϊνών δέσμευσης στο «κουτί» CCAAT (CCAAT enhancer binding proteins-**C/EBP**) και του παράγοντα-1 διαφοροποίησης και καθορισμού των λιποκυττάρων/ πρωτεΐνη δέσμευσης ρυθμιστικού στοιχείου στερολών-1 (adipocyte differentiation and determination factor 1/ sterol regulatory element binding protein 1 **ADD-1/SREBP-1**). Αν και κάθε ένας από τους προαναφερθέντες μεταγραφικούς παράγοντες δύναται να επάγει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων in vitro, είναι απαραίτητη η συνεργασία όλων in vivo. Στις αρχικές φάσεις της διαφοροποίησης, ως απόκριση σε διάφορα ορμονικά λιπογόνα σήματα, επάγεται αύξηση της έκφρασης των πρωτεινών **C/EBP-β και –δ**. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε τρωκτικά έδειξαν ότι έλλειψη αυτών οδήγησε σε μείωση του λιπώδους ιστού και ότι για την ομαλή λειτουργία τους είναι απαραίτητη η συνεργασία τους. Η αύξηση των επιπέδων C/EBP-β και –δ ακολουθείται από μια αύξηση της έκφρασης των **PPARγ2** και **C/EBPα**. Ακολούθως, το PPARγ2 επάγει την έκφραση του **PPARγ1**. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το PPARγ2 επάγει την έκφραση του C/EBPα και αντίστροφα (105).

Σε μια έρευνα των Ren et al., φάνηκε ότι η παρουσία του PPARγ2 - το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στον λιπώδη ιστό- κι όχι του PPARγ1 σχετίζεται με τα επίπεδα συγκέντρωσης του λίπους, το οποίο υποστηρίζεται και από μια πλειάδα άλλων ερευνών. Αυτό ενδέχεται να προκύπτει από τη διαφορά των δύο ισομορφών στο Ν-τελικό τους άκρο, με το *PPARγ2 να χαρακτηρίζεται από πιο δυνατή μεταγραφική λειτουργικότητα στην ανεξάρτητη της πρόσδεσης μορίων-συνδέσμων περιοχή*. Έχουν υποστηριχθεί διάφορες θεωρίες για το ρόλο του PPARγ1 στη λιπογένεση, όπως το ότι λειτουργεί ως παράγοντας υποκινητή για την έκφραση του PPARγ2 ή ότι εμπλέκεται στην παραγωγή των απαραίτητων μορίων-συνδέσμων για το PPARγ.

Η αύξηση της έκφρασης του PPARγ προάγει τη σύνδεσή του με το RXR δημιουργώντας το **ετεροδιμερές PPARγ/RXR** το οποίο ασκεί έπειτα τη μεταγραφική του δράση. Μια άλλη πρωτείνη της οποίας η έκφραση επάγεται στην αρχή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων είναι η **ADD-1/SREBP-1**. Ο μεταγραφικός αυτό παράγοντας φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπιδίων. Κάτω από συνθήκες που ευνοούν τη λιπογένεση, ο παράγοντας ADD-1/SREBP-1 δύναται να αυξήσει το ποσοστό των ινοβλαστών που υπόκεινται διαφοροποίηση από 2-3% σε 15-20% (54, 42, 49). Ο λόγος για τη συνδρομή του στη λιπογένεση οφείλεται πιθανόν κατά ένα μέρος στην επίδρασή του στη μεταγραφική δραστηριότητα του PPARγ, με τη δημιουργία λιπαρών οξέων που δρουν ως μόρια-σύνδεσμοι για το PPARγ. Εξάλλου, επάγει την έκφραση δύο σημαντικών για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων γονιδίων, της συνθετάσης των λιπαρών οξέων και της λιποπρωτεινικής λιπάσης. Ακόμα, εκτός από τη δημιουργία μορίων-συνδέσμων για το PPARγ, μέσω στοιχείων απόκρισης στις περιοχές του υποκινητή των PPARγ1 και PPARγ3 προάγει την έκφραση του ίδιου του PPARγ (46).

Το PPARγ συντελεί μαζί με τους προαναφερθέντες μεταγραφικούς παράγοντες την **διαφοροποίηση των λιποκυττάρων**, δηλαδή την **αύξηση του αριθμού και του μεγέθους τους** μέσω της επαγωγής της έκφρασης ειδικών για το λιποκύτταρο γονιδίων. Λειτουργικά στοιχεία απόκρισης για το PPARγ έχουν βρεθεί σε πολλά γονίδια που καθορίζουν το μεταβολισμό και την αποθήκευση του λίπους στο λιποκύτταρο. Παραδείγματα πρωτεινών που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια είναι η **aP2**, η φωσφοενολο-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση (**PEPCK**), η ακέτυλο συνένζυμο Α συνθετάση (**ACS**), η πρωτεΐνη μεταφορέας λιπαρών οξέων 1 (**FATP-1**) και η λιποπρωτεϊνική λιπάση (**LPL**).

Οι παραπάνω πρωτεΐνες συμμετέχουν στην ομοιόσταση των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων σε επίπεδο οργανισμού. Η **LPL** εκφράζεται σε αφθονία σε ιστούς όπου υπάρχει μεγάλη ζήτηση για λιπαρά οξέα, περιλαμβάνοντας τον λιπώδη ιστό, στο μυϊκό και κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα. Μετά την έκκριση, προσδεδεμένη στην επιφάνεια των τριχοειδών αγγείων, υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και των VLDL. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είτε οξειδώνονται για παραγωγή ενέργειας στους μύες είτε αποθηκεύονται ως τριγλυκερίδια στα λιποκύτταρα. Ή δραστηριότητα της LPL είναι αυξημένη μεταγευματικά στον λιπώδη ιστό και μειωμένη στον μυϊκό, υπό την επίδραση αναβολικών μηνυμάτων και του PPARγ, κατευθύνοντας τη ροή των λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα για αποθήκευση. Στην επιφάνεια των λιποκυττάρων η πρωτεΐνη μεταφορέας των λιπαρών οξέων **FATP** διευκολύνει την μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ η πρωτεΐνη **ACS** αποτρέπει την έξοδό τους από το κύτταρο μετατρέποντάς τα σε παράγωγα του ακέτυλο-συνενζύμου Α. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες σύνδεσης των λιπαρών οξέων (**FABPs**) όπως η ειδική για τον λιπώδη ιστό **aP2** λειτουργούν σαν αποθηκευτικό μέσο για αυτά. Με λίγα λόγια η αυξημένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών , μέσω PPARγ προωθεί την πρόσληψη και αποθήκευση των λιπιδίων στον λιπώδη ιστό, δηλαδή την λιπογένεση (55).

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 5.6. διάφορα λιπαρά οξέα που συναντούνται στον ανθρώπινο οργανισμό δρουν και ως μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ. Η επαγωγή των παραπάνω πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη πρόσληψη λιπιδίων στο εσωτερικό του λιποκυττάρου από το PPARγ, δείχνει ότι αυτό *επηρεάζει τη δημιουργία των ίδιων των μορίων-συνδέσμων και των συμπαραγόντων του* (46).

Σε συνάρτηση με τα γονίδια που αναφέρθηκαν ήδη και που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στον καθορισμό του φαινότυπου των λιποκυττάρων, δύο κυτταροκίνες, η **λεπτίνη** και ο παράγοντας **TNFα**, που παράγονται από τα λιποκύτταρα, διαδραματίζουν ρόλο στην ανακύκλωση των λιπιδίων και ελέγχονται από το PPARγ. Η λεπτίνη, η οποία εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό, ελέγχει το σωματικό βάρος και αυξάνει την ενεργειακή κατανάλωση, υπόκειται σε αντίθετο έλεγχο από τα μόρια PPARγ και C/EBPα. Το PPARγ μειώνει, ενώ το C/EBPα προάγει την έκφρασή της λεπτίνης. Η μείωση της έκφρασης της λεπτίνης μέσω του PPARγ σχετίζεται με μια αύξηση της πρόσληψης τροφής, παρέχοντας ενεργειακά μόρια για αποθήκευση στον λιπώδη ιστό. Ο παράγοντας TNFα είναι πιθανόν αναστολέας της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, καθώς έκθεση των 3T3-L1 λιποκυττάρων στον TNFα οδηγεί σε ανατροπή της ανάπτυξής τους. Εν μέρει, ο παράγοντας αυτός ασκεί

τη δράση του, αναστέλοντας την έκφραση των λιπογενετικών μεταγραφικών παραγόντων PPARγ και C/EBPα. Μάλιστα, σε άτομα με αυξημένα επίπεδα λιπώδους ιστού, έχουν βρεθεί και αυξημένα επίπεδα TNFα. Επίσης, ο TNFα σε παχύσαρκα άτομα φαίνεται να συμβάλλει στην αντίσταση στην αναβολική δράση της ινσουλίνης. Οι αντίθετες δράσεις του PPARγ και του TNFα έχουν αποδειχθεί ύστερα από *χορήγηση σε παχύσαρκα άτομα αγωνιστών του PPARγ που οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του TNFα και σε αύξηση του σωματικού βάρους*. Επιπλέον, το PPARγ μπλόκαρε την επαγόμενη από τον TNFα ινσουλινοαντίσταση και απελευθέρωση γλυκερόλης και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Συνεπώς, το PPARγ εκτός της λιπογενετικής δράσης του μέσω της μεταγραφής κάποιων γονιδίων, διατηρεί την πορεία της αύξησης του λιπώδους ιστού με τον έλεγχο των συγκεντρώσεων δύο σημαντικών μηνυματοφόρων μορίων του λιπώδους ιστού, του TNFα και της λεπτίνης (46).

5.7.2. PPARγ και έλεγχος του λιπιδαιμικού προφίλ

Το PPARγ σε συνάρτηση με τον ρόλο του στην πρόσληψη και αποθήκευση λίπους στον λιπώδη ιστό, συμμετέχει και στον έλεγχο του εξωκυττάριου μεταβολισμού των λιπιδίων και κυρίως των λιποπρωτεϊνών. Μάλιστα, συνεργάζεται με το PPARα στον καθορισμό του λιπιδαιμικού προφίλ.

Η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων καθορίζεται από το ρυθμό εκκαθάρισής τους μέσω της LPL και από το ρυθμό παραγωγής τους στο ήπαρ και στο έντερο, που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων. Όπως προαναφέρθηκε, το PPARγ ελέγχει την έκφραση πολλών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα επάγει την έκφραση της LPL, συμμετέχοντας στη διαδικασία της εκκαθάρισης. Επιπρόσθετα, μειώνει τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων για παραγωγή λιποπρωτεϊνών στο ήπαρ, συσσωρεύοντάς τα στα λιποκύτταρα (46). Με άλλα λόγια, προάγει το έργο της ινσουλίνης. Εξάλλου, η αποτυχία της ινσουλίνης να περιορίσει τη λιπόλυση, οδηγεί σε παροχή λιπαρών οξέων στο ήπαρ, αύξηση των VLDL και των τριγλυκεριδίων του ορού (56). Επιπλέον, το PPARγ φαίνεται να επάγει την αύξηση της ανακύκλωσης της HDL (46).

Σε διάφορες μελέτες, όπως σε αυτή των Kastle CK. et al (57), έχει φανεί ότι αύξηση της έκφρασης του PPARγ με χορήγηση PPARγ αγωνιστών, έχει ως συνέπεια

την αύξηση της LDL χοληστερόλης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη αύξηση της λιπόλυσης των VLDL στα λιποκύτταρα μέσω της δράσης της LPL και έτσι την αύξηση του ρυθμού παραγωγής των LDL (46).

5.7.3. PPARγ: Ρύθμιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη – πιθανοί μηχανισμοί

Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από μια αντίσταση στους περιφερικούς ιστούς, που περιλαμβάνουν τον σκελετικό ιστό, το ήπαρ, τους μύες και τον λιπώδη ιστό, στη δράση της ινσουλίνης. Η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης είναι το πρώτο στάδιο ανάπτυξης του διαβήτη τύπου 2. Στις αρχές του 1980 διαπιστώθηκε ότι κάποια μόρια, που ανήκουν στην τάξη των θειαζολιδινεδιόνων, οι γλιταζόνες (**TZDs**) , είχαν την ικανότητα να αυξάνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη, χωρίς όμως να αυξάνουν την έκκρισή της από το πάγκρεας και να μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων. Το 1995 οι Lehmann et al. Ανακάλυψαν ότι το PPARγ ήταν υποδοχέας των γλιταζονών. Ύστερα οι Willson et al. έδειξαν ότι η ικανότητα των γλιταζονών να προσδένονται στο μόριο του PPARγ και να το ενεργοποιούν in vitro συσχετιζόταν στενά με την ιδιότητα τους να μειώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης in vivo (58).

Λαμβάνοντας υπόψη τη συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας και της λιποδυστροφίας με την αντίσταση στην ινσουλίνη, δεν θα ήταν παράλογο το PPARγ που συνδέεται με τον καθορισμό της λιπώδους μάζας, να εμπλέκεται και με τον έλεγχο της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (56). Βέβαια, η ιδιότητα των TZDs να προάγουν τη λιπογένεση in vitro και να βελτιώνουν την ινσουλινοευαισθησία in vivo φαίνεται αντιφατική, εφόσον η αυξημένη λιπογένεση συνδέεται περισσότερο με την παχυσαρκία και αυτή με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Αυτή η αμφιβολία δύναται να εξανεμιστεί εάν κανείς συλλογιστεί ότι η ίδια η τάση για αύξηση του λιπώδους ιστού είναι προϊόν μιας αυξημένης απόκρισης σε σήματα αναβολισμού, όπως αυτά της ινσουλίνης. Αυτό μεταφράζεται σε μεγαλύτερη έκφραση γονιδίων όπως αυτών του υποδοχέα της ινσουλίνης, του IRS-1, GLUT-4 και άλλων που σχετίζονται με τη μεταβολική απόκριση στην ινσουλίνη (50).

Η κλινική σημασία των παραπάνω ευρημάτων είναι μεγάλη καθώς, η μείωση της ινσουλινοαντίστασης μέσω των αγωνιστών του PPARγ δεν είναι πιθανό να οφείλεται σε απευθείας έλεγχο της μεταγραφής από το PPARγ στα μυϊκά κύτταρα - εφόσον αυτό εκφράζεται ελάχιστα στον μυϊκό στο – αλλά στα λιποκύτταρα. Η πρώτη σκέψη

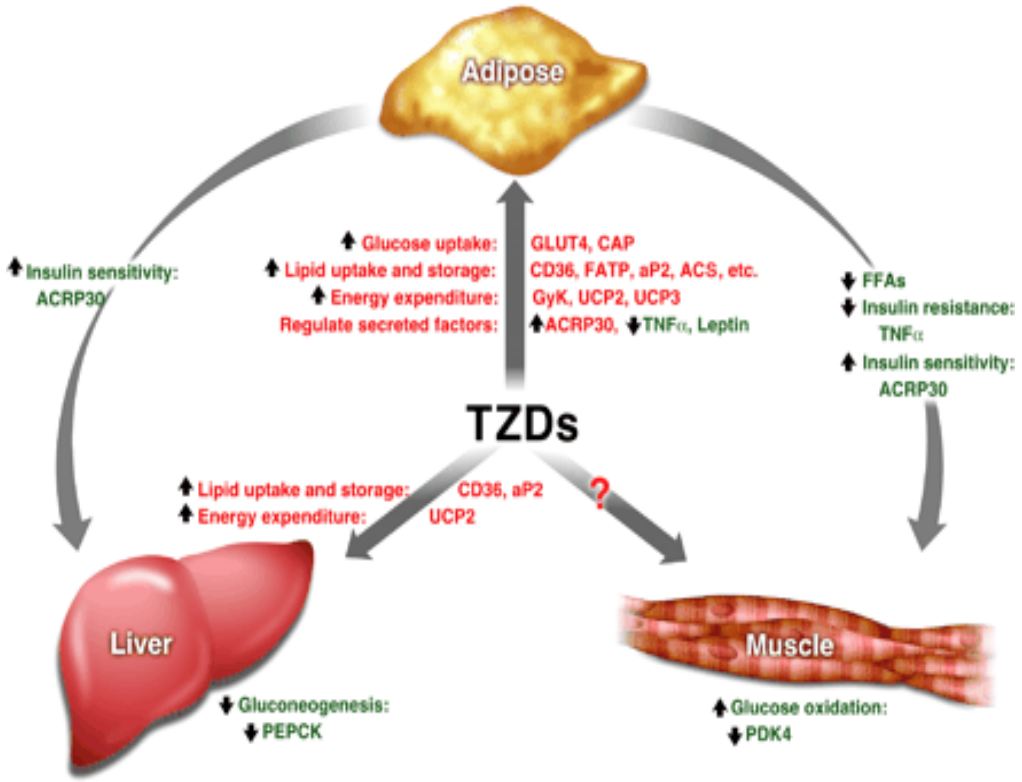
είναι πως ο λιπώδης ιστός επηρεάζει άλλους ιστούς όπως ο μυϊκός και ο ηπατικός με την έκκριση διαφόρων μηνυματοφόρων μορίων (55). Όντως, τα λιποκύτταρα είναι μια σημαντική πηγή ορμονών, που συνολικά καλούνται αντιποκυττοκίνες, όπως η λεπτίνη, η αντιπονεκτίνη, το TNFα, και η ρεσιστίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές έχει φανεί ότι μεσολαβούν στην ινσουλινοεπαγόμενη κατανάλωση γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα (56). Αυξημένη παραγωγή του παράγοντα **TNFα** έχει δειχθεί ότι προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη, διότι εμπλέκεται στην οδό μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης. Όμως, επαγωγή της έκφρασης του PPARγ μέσω των TZDs συμβάλλει στην αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μέσω μείωσης της παραγωγής του TNFα. Όσον αφορά τη **λεπτίνη**, ισχύουν τα ίδια με τον παράγοντα TNFα (46). Η **αντιπονεκτίνη**, που παράγεται μόνο σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, έχει αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας σε παχύσαρκα και μειωμένα σε αδύνατα άτομα. Η θετική επίδρασή της στα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα πιθανώς αντικατοπτρίζουν μειωμένη ηπατική εξαγωγή γλυκόζης και αυξημένη χρήση από τους μύες. Χορήγηση των PPARγ αγωνιστών, των TZDs, προάγει την έκφραση του γονιδίου της αντιπονεκτίνης (59). Τέλος, η **ρεσιστίνη**, η οποία ονομάστηκε έτσι λόγω της αντίστασής της στη δράση της ινσουλίνης, βρέθηκε να έχει αυξημένα επίπεδα σε παχύσαρκα άτομα, τα οποία μειώθηκαν ύστερα από θεραπεία με TZDs. Αυτό υποδεικνύει έναν επιπλέον σύνδεσμο μεταξύ της ενεργοποίησης του PPARγ και της βελτίωσης της ινσουλινοευαισθησίας (46).

Μια δεύτερη ομάδα από σημαντικά διαμεσολαβητικά μόρια που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία των μυών στη δράση στην ινσουλίνη είναι τα **ελεύθερα λιπαρά οξέα**. Αυτά ελευθερώνονται από τα λιποκύτταρα με τη βοήθεια της **ορμονοευαίσθητης πρωτεϊνικής λιπάσης** και επιπλέον δημιουργούνται κατά τη λιπόλυση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (**LPL**). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μπορούν είτε να οξειδωθούν και να παράγουν ενέργεια στους μύες είτε να επανεστεροποιηθούν και να αποθηκευτούν στα λιποκύτταρα, το οποίο καθορίζεται από την έκφραση ή μη των απαραίτητων ενζύμων στους ιστούς αυτούς (55). Μελέτες όπου έγινε χρήση αγωνιστών του PPARγ έδειξαν ότι τα λιποκύτταρα μέσω της έκφρασης του PPARγ προάγουν τη σύνθεση ενζύμων, όπως τα LPL, FATP-1, ACS, CD36, aP2, GyK και συνθάση του ακέτυλο-συνένζυμου Α που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών (44). Η παγίδευση των λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα οδηγεί στη μειωμένη πρόσληψή τους από τα μυϊκά κύτταρα βελτιώνοντας την ευαισθησία αυτών στη δράση της

ινσουλίνης. Είναι γνωστό ότι η γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου είναι ανταγωνιστικά υποστρώματα σε ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς. Η χρήση των λιπιδίων για παραγωγή ενέργειας στους μύες παρεμβαίνει στην αντίστοιχη χρήση της γλυκόζης με διάφορους μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση της μεταφοράς, της φωσφορυλίωσης και της οξείδωσης της γλυκόζης (46, 55). Συνεπώς, το PPARγ με την επαγωγή της σύνθεσης των ενζύμων που συσσωρεύουν τα λιπαρά οξέα στο εσωτερικό των λιποκυττάρων προωθεί τη χρήση της γλυκόζης στα μυοκύτταρα και μειώνει την αντίσταση αυτών στην ινσουλίνη.

Τέλος, εκτός της έμμεσης δράσης του PPARγ στην αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, έχει βρεθεί ότι αυτό προάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Αυτά περιλαμβάνουν γονίδια που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη γλυκόζης (**CAP**), τη μεταφορά γλυκόζης (**GLUT4**) και την ενεργειακή κατανάλωση (**GyK**, **UCP1** και **UCP2**) (44, 47). Η αύξηση της έκφρασης των GLUT4 και CAP δύναται να συμβάλει στην μείωση της υπεργλυκαιμίας. Όμως επειδή το PPARγ εκφράζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό όπου καταναλώνεται ένα πολύ μικρό ποσό γλυκόζης, αυτή η θεωρία δεν μπορεί να εξηγήσει από μόνη της την δράση των TZDs στη μείωση της ινσουλινοαντίστασης (44, 47).

Η συμμετοχή του PPARγ στις μεταβολικές διεργασίες σε ιστικό επίπεδο, που έχουν ως αποτέλεσμα την λιπογένεση, την μείωση των επιπέδων λιπιδίων στο αίμα και την επαγωγή της ευαισθησίας στη ινσουλίνη, παρουσιάζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Επιδράσεις των TZDs σε τρεις πρωταρχικούς ιστούς-στόχους της ινσουλίνης. Οι μεταβολές που παρουσιάζονται στο κόκκινο χρώμα, μεσολαβούνται από το PPARγ. Ο υποδοχέας εκφράζεται άπλετα στον λιπώδη ιστό, όπου φαίνεται και η μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα. άμεσα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στο ήπαρ, ενώ είναι αβέβαιο αν το PPARγ ενεργοποιείται στους μύες. Οι αλλαγές στη φυσιολογία του λιποκυττάρου, όπως και ο έλεγχος των αντιποκινών έχουν δευτερογενή αποτελέσματα σε άλλους ιστούς και παρουσιάζονται με το πράσινο χρώμα. Αυτά περιλαμβάνουν μειωμένη γλυκονεογένεση στο ήπαρ, μέσω μείωσης του PEPCK και αυξημένη οξείδωση γλυκόζης στους μύες, εν μέρει λόγω μείωσης των PDK4, ACS και της συνθετάσης του ακέτυλο-συνενζύμου Α.

5.7.4. Η συμμετοχή του PPARγ στην αθηρωμάτωση

Η αθηροσκλήρωση είναι μια σύνθετη, χρόνια ασθένεια που συνήθως αναπτύσσεται από μια συστοιχία παθολογικών διαδικασιών, που περιλαμβάνουν την παχυσαρκία, την υπερλιπιδαιμία, την υπέρταση και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας περιλαμβάνει τη μετανάστευση, πολλαπλασιασμό των μακροφάγων και λείων μυικών κυττάρων και τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Διάφορα μηνυματοφόρα μόρια συντονίζουν όλη την διαδικασία. Οι PPARγ αγωνιστές όπως είναι τα TZDs έχουν δείξει σε διάφορα θηλαστικά ότι ελέγχουν την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης. Ο ρόλος τους είναι διττός, καθώς μεταβάλλουν τις μεταβολικές συνθήκες στο σώμα, για παράδειγμα μειώνουν την ινσουλινοαντίσταση, αλλά και ασκούν άμεση δράση στις διαδικασίες αθηρωμάτωσης (60).

Η διαπίστωση ότι το PPARγ κατά κάποιον τρόπο συμμετέχει στην αθηρωμάτωση και το ότι οι PPARγ αγωνιστές, τα TZDs, χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς λόγους ώθησε την επιστημονική κοινότητα να ερευνήσει αν η επίδρασή τους έχει προστατευτική δράση κατά της αθηρωμάτωσης ή αν την προάγει. Σε πρώτο στάδιο, ο **ανταγωνισμός μεταξύ του PPARγ και της κυττοκίνης TNFα**, η οποία προάγει την αθηροσκλήρωση είναι δείγμα μιας προστατευτικής δράσης του PPARγ. Μάλιστα, *χορήγηση μονοκυττάρων με αγωνιστές του PPARγ μείωσε την παραγωγή των TNFα, IL-1β και IL-6, παραγόντων της φλεγμονώδους αντίδρασης*. Ακόμα, μειώθηκε η παραγωγή της συνθάσης του νιτρικού οξέος, της ζελατινάσης Β και του «καθαριστή» υποδοχέα Α (SR-A) στα μακροφάγα (61, 46). Αυτές οι διαδικασίες που φανερώνουν μια προστατευτική δράση του PPARγ φαίνεται να είναι απόρροια μεταγραφικών διαδικασιών, όπου συμμετέχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο (NF)-kB και ο (AP)-1 (46).

Ακολούθως, φάνηκε ότι το PPARγ ελέγχει την έκφραση γονιδίων στα μακροφάγα κύτταρα που έχουν κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Έρευνες έχουν δείξει ότι το PPARγ εκφράζεται σε μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα και ότι ενδογενή και συνθετικά μόρια-σύνδεσμοι αποτρέπουν την παραγωγή μεσολαβητών της φλεγμονής από αυτά. Μάλιστα, σε μια μελέτη των Ricote et al., βρέθηκε ότι το PPARγ εκφράζεται σε αφρώδη κύτταρα στις αθηρωματικές πλάκες, ενώ πολύ μικρές ποσότητες βρέθηκαν σε πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Αυτό είναι ένδειξη της συσχέτισης του PPARγ με την πορεία της αθηρογένεσης που περιλαμβάνει τα μακροφάγα. Διάφοροι παράγοντες βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση του PPARγ στα μακροφάγα, περιλαμβάνοντας την οξειδωμένη LDL (ox-LDL), τους διεγερτικούς παράγοντες αποικιών M-CSF και GM-CSF (61).

Τα μακροφάγα κύτταρα, λόγω της ικανότητάς τους να προάγουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες, όταν εκπίπτουν της φυσιολογικής τους λειτουργίας συμβάλουν σε διάφορες παθολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, όπου μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Οι λιπαρές ραβδώσεις, που είναι τα πιο πρώτα σημάδια της αθηροσκλήρωσης, περιέχουν μεγάλες ποσότητες μακροφάγων κυττάρων, τα οποία προήλθαν από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας. Τα τελευταία αφού προσκολλήσουν στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο με τη βοήθεια διάφορων μορίων προσκόλλησης, διεισδύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα αυτά ακολούθως εκφράζουν στην επιφάνειά τους διάφορους «καθαριστές» υποδοχείς, όπως ο CD36 και ο SR-A, οι οποίοι ευθύνονται για την ενδοκυττάρωση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών LDL που βρίσκονται στην περιοχή. Διάφορες μελέτες (62) έχουν δείξει ότι το **PPARγ επάγει την έκφραση του υποδοχέα των ox-LDL CD36**, προωθώντας τη συσσώρευση των ox-LDL στο εσωτερικό των μακροφάγων κυττάρων. Αυτά με τη σειρά τους καταβολίζονται ενδοκυτταρικά παράγοντας μόρια-σύνδεσμους για το PPARγ, όπως το 9-υδροξυοκταδεκαδιενοικό οξύ (9-HODE) και το 13-HODE, τα οποία με τη σειρά τους ευοδώνουν τη μεταγραφική λειτουργία του. Υπενθυμίζεται ότι οι **ox-LDL είναι παράγοντες έκφρασης του μορίου του PPARγ**. Συνεπώς, με τη συνδρομή του PPARγ, μεγάλες ποσότητες LDL συσσωρεύονται στο εσωτερικό των μακροφάγων μετατρέποντάς τα σε αφρώδη κύτταρα (46, 47, 61).

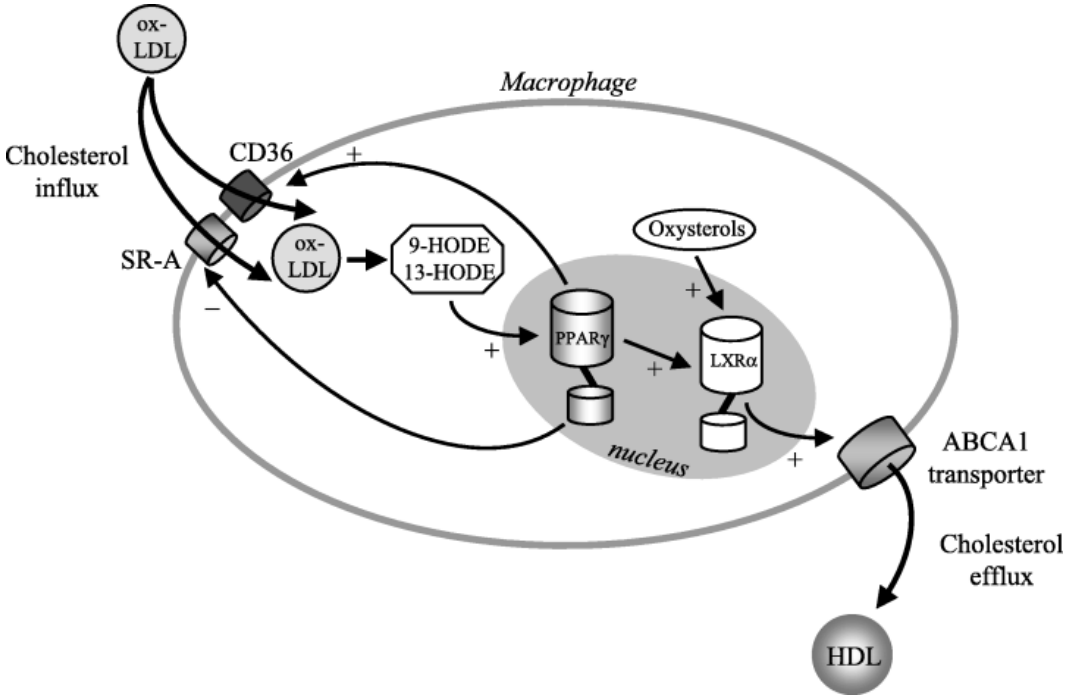
Την αθηρογόνο αυτή δράση του PPARγ ήρθε να τη μετριάσει η ανακάλυψη από τους Moore et al. ότι οι **αγωνιστές του PPARγ μειώνουν την έκφραση ενός άλλου «καθαριστή» υποδοχέα, του SR-A** (47).

Την προστατευτική δράση του PPARγ ενισχύει επίσης το ότι ο πυρηνικός υποδοχέας LXRα, ο οποίος αυξάνει την έκφραση του **μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1**, έχει βρεθεί να αποτελεί **γονίδιο στόχο του PPARγ**. Με τον τρόπο αυτόν, το PPARγ *βοηθά την εκκροή της χοληστερόλης έξω από το μακροφάγο*, προωθεί τη δράση της HDL χοληστερόλης και αποτρέπει τη συσσώρευση λίπους σε αυτό (47).
Τα αφρώδη κύτταρα επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης με διάφορους μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την περαιτέρω οξείδωση των LDL, την έκκριση κυττοκινών και άλλων παραγόντων με παρακρινή και αυτοκρινή δράση στο αρτηριακό τοίχωμα (61). Σημαντικό είναι ότι τα αφρώδη κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα εκκρίνουν μια τάξη λυσσοσωματικών ενζύμων, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι οποίες ευθύνονται πιθανόν για τη διάσπαση των εξωκυττάριων δομικών πρωτεϊνών, όπως το κολλαγόνο που παράγεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα της πλάκας. Το γεγονός αυτό καθιστά το αρτηριακό τοίχωμα εύθραυστο και ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι μεγαλύτερος (61). Έχει αποδειχθεί ότι το **PPARγ αποτρέπει την παραγωγή της μεταλλοπρωτεάσης 9** και ότι **μειώνει τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων** που προκαλείται από τον παράγοντα PDGF (46).

Μια άλλη σύνδεση μεταξύ του PPARγ και των διαδικασιών της φλεγμονής είναι ότι φυσικά μόρια-σύνδεσμοι του PPARγ, όπως το 15-δεόξυ-PGJ2 είναι προϊόντα του μονοπατιού της κυκλοοξυγενάσης, στην αποτροπή του οποίου στοχεύει η θεραπεία της φλεγμονής με τα NSAIDs. Υπάρχει η υπόθεση ότι κάποιες από τις ευεργετικές δράσεις των NSAIDs οφείλονται στην ενεργοποίηση του PPARγ και συγκεκριμένα στην ικανότητά του για καταστολή της σύνθεσης κυττοκινών (46).

Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η εμπλοκή του PPARγ στις διεργασίες της αθηρογένεσης εξαρτάται από το **φύλο**. Οι Li et al. Έδειξαν ότι η πιθανή αντιαθηρογόνος δράση των αγωνιστών του PPARγ σε ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα των LDL σε δίαιτα υψηλή σε λίπος ισχύει μόνο για τα αρσενικά άτομα. Αυτό μπορεί να είναι προϊόν της παρουσίας οιστρογόνων στα θηλυκά άτομα (63).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, είναι δυνατό να κατασκευαστεί ένα μοντέλο επίδρασης του PPARγ στο μακροφάγο κύτταρο (εικόνα 3). Συνολικά, φαίνεται ότι το PPARγ δρα προστατευτικά έναντι της αθηροσκλήρυνσης, χωρίς αυτό όμως να είναι βέβαιο, καθώς πολλές λειτουργίες του δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί.



Εικόνα 3. Σχηματική παρουσίαση της παγίδευσης της χοληστερόλης στα μακροφάγα. Η πρόσληψη της οξειδωμένης LDL (ox-LDL) από τον καθαριστή υποδοχέαCD36 και ο εσωκυτταρικός καταβολισμός της, οδηγούν στην δημιουργία ενδογενών μορίων-συνδέσμων του PPARγ (π.χ. 9-HODE και 13-HODE), τα οποία θα ενεργοποιήσουν περαιτέρω τον υποδοχέα, αυξάνοντας την πρόσληψη της ox-LDL. Η επίδραση αυτή ισοσταθμίζεται από την αναχαίτιση της έκφρασης του καθαριστή υποδοχέα SR-A και την αυξημένη εκροή χοληστερόλης από το κύτταρο, μέσω αύξησης του μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1.

5.8. Ο πολυμορφισμός Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ2

Ο πολυμορφισμός Pro12Ala είναι ο πιο συχνός από όσους άλλους έχουν ανακαλυφθεί ως σήμερα. Η ταυτοποίησή του έλαβε χώρα το 1997 από τους Yen et al., όταν σε 6 από τα 26 άτομα της μελέτης τους, η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA αποκάλυψε ανταλλαγή μιας βάσης C σε G στο νουκλεοτίδιο 34 του γονιδίου του PPARγ2. Το αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ αλανίνη στη θέση 12 του N-τελικού άκρου της πρωτείνης του PPARγ2 (64).

Η αντικατάσταση αυτή δύναται να προκαλέσει **σημαντική μεταβολή στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και μάλιστα στο N-τελικό άκρο της, καθιστώντας το PPARγ2 λιγότερο ενεργό**. Το άκρο αυτό διαφέρει μεταξύ των ισομορφών του PPARγ και όπως έχει αναφερθεί σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μορίου ανεξάρτητα από την πρόσδεση μορίου-συνδέσμου (AF-1) (42, 64). Δύο μελέτες έχουν εξετάσει τη μεταγραφική δραστηριότητα του PPARγ με το Ala αλλήλιο

σε σύγκριση με το Pro αλλήλιο. Διαπιστώθηκε μειωμένη συνδετική ικανότητα του Ala PPARγ2 στα PPRE στο DNA σε σχέση με το Pro ομόλογό του. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων (της LPL και της οξειδάσης του ακέτυλο-συνενζύμου Α). Τα ανωτέρω αποδεικνύουν τη μειωμένη λειτουργικότητα του Ala PPARγ2. Επειδή το PPARγ2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον λιπώδη ιστό, περιμένουμε οι επιδράσεις του πολυμορφισμού να προέρχονται από αλλαγές στον ιστό αυτόν (48).

5.8.1. Συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala σε διάφορους πληθυσμούς

Στην έρευνα των Yen et al. το 1997 όπου έγινε η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού, η συχνότητα του Ala αλληλίου ήταν 12% για τους Καυκάσιους Αμερικανούς (δείγμα: 26 άτομα), 10% για τους Μεξικανούς Αμερικανούς (δείγμα: 36 άτομα), 8% για τους Σαμάνους (δείγμα: 12 άτομα), 3% για τους Αφροαμερικανούς (δείγμα: 53 άτομα) και 1% για τους Κινέζους (δείγμα: 50 άτομα) (64).

Στη μελέτη KANWU που πραγματοποιήθηκε από τους Lindi et al, σε τυχαία επιλεγμένο δείγμα 150 ατόμων της **Καυκάσιας φυλής** από πέντε διαφορετικές χώρες (**Φινλανδία, Δανία, Ιταλία, Αυστραλία και Σουηδία**) βρέθηκε συχνότητα πολυμορφισμού **13,7%** (65). Επιπλέον, σε έρευνα των Beamer et al. σε δείγμα 686 ατόμων της **Καυκάσιας φυλής**, βρέθηκε συχνότητα του πολυμορφισμού **11%** (66).

Στους **Γερμανούς**, σε δείγμα 194 ανδρών που είχαν υποβληθεί σε στεφανιογράφημα βρέθηκε ότι η συχνότητα του Ala αλληλίου ήταν 10,3% και σε δείγμα 100 διαβητικών ατόμων, βρέθηκε ότι η συχνότητα ήταν 7,5% (67). Στην έρευνα των Valve et al. που πραγματοποιήθηκε σε **Φιλανδούς**, σε δείγμα 170 παχύσαρκων ατόμων η συχνότητα του πολυμορφισμού ήταν 14% ενώ στην ομάδα ελέγχου 107 υγιών ατόμων η συχνότητα ήταν 13% (68). Στην **Ιταλία** σε ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα 438 ατόμων βρέθηκε ότι η συχνότητα του πολυμορφισμού ήταν 16,7% (69).

Η έρευνα για την αθηροσκλήρωση στην **Ευρώπη** των Poirier et al., μελέτησε δείγμα 675 φοιτητών από 11 Ευρωπαικές χώρες. Έδειξε ότι η συχνότητα του Ala αλληλίου παρουσιάζει **πτωτική τάση από τις βόρειες στις νότιες χώρες** και κυμαίνεται μεταξύ **21%** στις βαλτικές χώρες και **7%** στις Μεσογειακές χώρες (70).

Στους **Αμερικανούς**, σε έρευνα των Nickhlas et al, βρέθηκε συχνότητα **11%** (71). Επίσης σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Αμερική, από τους Li et al, βρέθηκε ότι οι λευκοί είχαν συχνότητα ίση με **10,4%,** ενώ στους μαύρους ήταν **1,7%** (72). Επίσης, στους **Καναδούς** στην έρευνα των Robitaille et al. η συχνότητα ήταν **9,2%** (73)

Σε έρευνες που έχουν γίνει στην Άπω Ανατολή, η συχνότητα του αλληλίου εμφανίζεται πολύ μικρή. Υπενθυμίζεται ότι στην έρευνα των Yen et al., η συχνότητα για τους Κινέζους ήταν μόλις **1%**. Στην έρευνα των Young Oh et al. στους Κορεάτες σε δείγμα 229 διαβητικών και παχύσαρκων ατόμων, η συχνότητα του αλληλίου βρέθηκε **4,1%** (74), ενώ οι στους Γιαπωνέζους **4%** (75).

Στην έρευνα των Lei et al. που έγινε στους **Ταϊβανέζους** συγκρίθηκε η συχνότητα του Ala αλληλίου μεταξύ 280 ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη και 310 υγιών ατόμων. Η συχνότητα στους διαβητικούς βρέθηκε 3% και στους μη διαβητικούς 4% (76).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, μπορεί να παρατηρηθεί ότι **η συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala έχει μεγαλύτερη συχνότητα στην Καυκάσια φυλή από ότι στην κίτρινη και τη μαύρη**. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στην Ευρώπη υπάρχει μια πτωτική τάση όσον αφορά τη συχνότητα του πολυμορφισμού από τις βόρειες χώρες προς τις νότιες.

5.8.2. Η επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στον δείκτη μάζας σώματος (BMI) και στην εμφάνιση παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία είναι μια κατάσταση που συσχετίζεται με αυξημένο αριθμό (υπερπλασία) και μέγεθος (υπερτροφία) λιποκυττάρων. Η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκτίμησης της παχυσαρκίας είναι ο Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI). Όπως έχει προαναφερθεί, το PPARγ εμπλέκεται στην λιπογένεση και επομένως αναμένεται ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala να έχει επίδραση στην ποσότητα του σωματικού λίπους και άρα στην παχυσαρκία.

Πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει τη συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Pro12Ala και της εμφάνισης παχυσαρκίας και κατέληξαν ότι υπάρχει **θετική συσχέτιση**. Η μελέτη των Beamer et al. πραγματοποιήθηκε μεταξύ δύο διαφορετικών πληθυσμών μη διαβητικών Καυκάσιων ενηλίκων, όπου ο ένας αποτελούταν από 517 άτομα με διάφορες τιμές BMI και ο άλλος από 169 σοβαρά

παχύσαρκων ατόμων. Το πόρισμα ήταν ότι άτομα με τουλάχιστον ένα αλλήλιο Ala είχαν **σημαντικά αυξημένο BMI σώματος** εν συγκρίσει με άτομα ομόζυγα ως προς το Pro αλλήλιο (66).

Επίσης, σε έρευνα των Li et al. σε δύο ομάδες γυναικών της Καυκάσιας φυλής, μία παχύσαρκων των 165 ατόμων και μία φυσιολογικού βάρους των 49 ατόμων έδειξε ότι η **συχνότητα του πολυμορφισμού ήταν αυξημένη στην ομάδα των παχύσαρκων** (18,18% vs 8,16%) (77).

Ανάλογα αποτελέσματα είχαν οι έρευνες των Lei et al. (76), των Robitaille et al. (73), των Rosmond et al. (78), των Sanchez et al. (79) και των Meirhaeghe et al. (80). Στην έρευνα των Valve et al., που χρησιμοποιήθηκε σε 170 ενήλικες που συμμετείχαν σε πρόγραμμα μείωσης του βάρους, βρέθηκε ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με τη σοβαρή παχυσαρκία και την αυξημένη ποσότητα σωματικού λίπους στις γυναίκες (68). Η θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού με το BMI ενδέχεται να οφείλεται στην αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν τα άτομα που φέρουν το Ala αλλήλιο (48).

Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένο BMI θα ήταν προφανής λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω έρευνες εάν δεν υπήρχαν έρευνες που να υποστηρίζουν το αντίθετο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η έρευνα των Doney et al. που πραγματοποιήθηκε στην Σκωτία σε έναν μεγάλο πληθυσμό διαβητικών τύπου ΙΙ (n=1107), δύο πληθυσμούς μη διαβητικών (n=440) και μια ομάδα υγιών ατόμων που αθλούνταν (n=148). Το αποτέλεσμα ήταν ότι τα **άτομα που έφεραν τον πολυμορφισμό είχαν χαμηλότερο BMI** (81). Παρόμοια, οι Deeb et al. έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με χαμηλότερο BMI. Η πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με μειωμένη μεταγραφική ικανότητα και άρα μειωμένη λιπογενετική δράση. Επομένως, είναι δυνατό τα άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό να έχουν μειωμένη λιπώδη μάζα και άρα μειωμένο σωματικό βάρος (82).

Τέλος, υπήρξαν **έρευνες που δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση** μεταξύ του πολυμορφισμού και της παχυσαρκίας. Τέτοιες είναι οι μελέτες των Swabrick et al. (83), των Iwata et al. (75),των Poirier et al. (70) και των Young Oh et al. (74).

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι **η επίδραση του πολυμορφισμού στην εμφάνιση της παχυσαρκίας δεν είναι εμφανής**. Ο λόγος για τα αντίθετα αποτελέσματα των ερευνών ενδέχεται να είναι η

αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού με άλλους παράγοντες. Έρευνα των Witchel et al. που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά ηλικίας 4,5-10 ετών που είχαν πρώιμη εμφάνιση εφηβείας και κορίτσια ηλικίας 10,5-19 ετών με συμπτώματα υπερανδρογονισμού, μελέτησε την επίδραση του πολυμορφισμού στο BMI σε βάθος χρόνου. Το αποτέλεσμα ήταν ότι τρία στα τέσσερα φυσιολογικού BMI παιδιά φορείς του Ala αλληλίου διατήρησαν το βάρος τους, ενώ τα παχύσαρκα άτομα-φορείς του πολυμορφισμού εμφάνισαν σημαντικά αυξημένο BMI και ρυθμό αύξησης αυτού ανά χρόνο σε σχέση με τα Pro/Pro παιδιά (84).

Παρόμοια, η προοπτική μελέτη των Ek et al., που χρησιμοποίησε μια ομάδα 752 παχύσαρκων Δανών και μια ομάδα ελέγχου 869 ατόμων φυσιολογικού BMI, έδειξε ότι η **επίδραση του Pro12Ala πολυμορφισμού στο BMI ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ ατόμων με υγιές BMI και παχύσαρκων ατόμων**. Συγκεκριμένα, οι παχύσαρκοι ομόζυγοι φορείς του Ala αλληλίου εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση του BMI σε σύγκριση με τους παχύσαρκους ομόζυγους ως προς το Pro αλλήλιο. Αντίθετα, οι ομόζυγοι φυσιολογικού BMI που έφεραν τον πολυμορφισμό είχαν μικρότερο ρυθμό αύξησης του βάρους τους σε σχέση με τους υγιούς BMI που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό Pro12Ala (85).

Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τα αντιφατικά πορίσματα των ερευνών, είναι ότι ο φαινότυπος είναι απόρροια της αλληλεπίδρασης του γενετικού υπόβαθρου και περιβαλλοντικών παραγόντων. Μελέτη των Luan et al. έχει δείξει ότι υπάρχει **αλληλεπίδραση μεταξύ της δίαιτας και του φαινοτύπου του πολυμορφισμού**. Συγκεκριμένα, όταν η αναλογία των πολυακόρεστων προς τα κορεσμένα λίπη είναι μικρή, ο πολυμορφισμός συνδέεται με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος. Αντίθετα, όταν η αναλογία αυτή είναι χαμηλή, τα άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό είναι πιο αδύνατα από αυτά που δεν τον φέρουν (86).

5.8.3. Η επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στους βιοχημικούς δείκτες, στο λιπιδαιμικό προφίλ και στην εμφάνιση καρδιοπάθειας

Η εμπλοκή του PPARγ και ιδιαίτερα του PPARγ2 στο μεταβολισμό των λιπιδίων, οδήγησε στην διερεύνηση κάποιας συσχέτισης του πολυμορφισμού Pro12Ala και δυσλιπιδαιμίας.

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση έχει σημαίνοντα ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων υδρολύοντας τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεινών. Χαμηλή λειτουργικότητά της έχει

συσχετισθεί με στεφανιαία νόσο, χαμηλή HDL χοληστερόλη και υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων. Οι Schneider et al. Χρησιμοποιώντας ένα δείγμα 194 αντρών με στεφανιαία νόσο, έδειξαν ότι **ο πολυμορφισμός Pro12Ala σχετίζεται με χαμηλότερη λειτουργικότητα του υποκινητή της LPL**. Μάλιστα, η επίδραση του Ala αλληλίου στην LPL ήταν υψηλότερη από αυτήν των συχνών πολυμορφισμών στο ίδιο το γονίδιο της LPL. μετά από επανάληψη της μελέτης σε δείγμα 100 διαβητικών ασθενών, κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα (67).

Στην έρευνα των Swabrick et al., χρησιμοποιήθηκαν μία ομάδα παχύσαρκων και μια ομάδα ενηλίκων υγιούς σωματικού βάρους της Καυκάσιας φυλής. Οι **παχύσαρκοι φορείς του πολυμορφισμού είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων** συγκρινόμενοι με τους παχύσαρκους Pro/Pro. Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές για την ομάδα των ατόμων φυσιολογικού BMI. Δηλαδή ο πολυμορφισμός είχε αρνητική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ μόνο στα παχύσαρκα άτομα (83). Ακόμα, στην έρευνα των Meirhaeghe et al., σε δείγμα 1195 τυχαία επιλεγμένων ενηλίκων, η **παρουσία του Ala αλληλίου σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης** (80).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω έρευνες, στην έρευνα των Rosmond et al., σε 284 τυχαία επιλεγμένα ενήλικα άτομα, ο γονότυπος Ala/Ala σχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα ολικής, HDL και LDL χοληστερόλης (78). Επίσης, στη μελέτη των Douglas et al., ο πολυμορφισμός ήταν συνδεδεμένος με χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε διαβητικά άτομα (87). Στην έρευνα των Sanchez et al., **οι φορείς του Ala αλληλίου είχαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων** (79). Στην έρευνα των Robitaille et al., ,ύστερα από χορήγηση λίπους ολικού και κορεσμένου σε 720 ενήλικες, η πρόσληψη λίπους συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και θετικά με τον λόγο ολικής/HDL χοληστερόλης στα άτομα Pro/Pro, αλλά όχι στους φορείς του πολυμορφισμού (73).

Τέλος, οι Lindi et al. στην έρευνα KANWU, έδειξαν ότι οι φορείς του πολυμορφισμού ύστερα από χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων είχαν μεγαλύτερη μείωση χοληστερόλης ορού από τα ομόζυγα άτομα ως προς το Pro αλλήλιο. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με μειωμένη απόκριση στη χορήγηση των PPARγ αγωνιστών TZD και ότι τα τελευταία έχουν αντιλιπιδαιμική δράση, το πόρισμα της έρευνας μοιάζει αντιφατικό. Μια εξήγηση είναι η διαφορετική λειτουργικότητα του Ala PPARγ2 όσον αφορά τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων ύστερα από ενεργοποίηση από συνθετικά μόρια-συνδέσμους, όπως τα TZDs και από φυσικά, όπως τα ω-3 λιπαρά οξέα (65).

Υπήρξαν έρευνες που **δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και των λιπιδίων πλάσματος**. Στην Ιταλία στην μελέτη των Vaccaro et al., που είχε σκοπό να μελετήσει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με τις συγκεντρώσεις πλάσματος των ελεύθερων λιπαρών οξέων και άλλων βιοχημικών παραμέτρων, χρησιμοποιήθηκε τυχαίο δείγμα 438 ατόμων. Όσον αφορά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης, των ελεύθερων λιπαρών οξέων, της HDL χοληστερόλης και της πίεσης αίματος, **δεν βρέθηκαν διαφορές** μεταξύ των ατόμων που έφεραν τον πολυμορφισμό και αυτών που όχι. Τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν ύστερα από μελέτη τους ανάλογα με το βάρος σώματος (69). Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι έρευνες των Poirier et al. (70) και των Young Oh et al. (74). Στη μελέτη των Iwata et al, που χρησιμοποιήθηκε δείγμα 106 ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη, αρχικά δεν βρέθηκε συσχέτιση του γονότυπου με τα λιπίδια ορού. Ύστερα όμως από διαχωρισμό των ατόμων σύμφωνα με το BMI τους, στα **άτομα με το υψηλότερο BMI, το Ala αλλήλιο συσχετίστηκε με χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικής, LDL και μη-HDL χοληστερόλης** (75).

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Έχει αποδειχθεί ότι η έναρξη των συμπτωμάτων του μεταβολικού συνδρόμου (π.χ. παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία) έχει τις ρίζες της στην παιδική ηλικία. Θα ήταν επομένως σκόπιμο να διερευνηθεί αν ο πολυμορφισμός Pro12Ala του PPARγ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση παχυσαρκίας, υπερλιπιδαιμίας και αντίστασης στην ινσουλίνη σε παιδιά.

Από την επισκόπηση των ερευνών που προηγήθηκε, είναι φανερό ότι υπάρχει έλλειψη γνώσης για την επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala σε παιδιά όσον αφορά στον δείκτη μάζας σώματος και σε άλλες βιοχημικές παραμέτρους που συνθέτουν το μεταβολικό σύνδρομο, όπως είναι το λιπιδαιμικό προφίλ. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την συχνότητα του Ala αλληλίου στην Ελλάδα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού Pro12Ala με την εμφάνιση της παχυσαρκίας και άλλες παραμέτρους του μεταβολικού συνδρόμου σε παιδιά δημοτικού ηλικίας 11-12 στον πληθυσμό του Βόλου.

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Δείγμα

Το υπό μελέτη δείγμα αποτελείται από 182 παιδιά (96 κορίτσια και 86 αγόρια) ηλικίας 11 – 12 ετών, που φοιτούν στην έκτη τάξη του δημοτικού από 14 τυχαία επιλεγμένα δημοτικά σχολεία στην περιοχή του Βόλου. Η επιλογή των ατόμων για την μελέτη έγινε εθελοντικά. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η πλήρης ενημέρωση των γονέων ή κηδεμόνων σχετικά με το αντικείμενο και τις μεθόδους της έρευνας, την οποία ακολούθησε η έγγραφη συναίνεση για τη συμμετοχή του παιδιού.

2. Συλλογή στοιχείων

Η βασική φάση της μελέτης πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο του 2001. Τα βασικά στοιχεία συγκεντρώθηκαν από όλους τους μαθητές κατά τη διάρκεια των επισκέψεων στα σχολεία ομάδων ειδικά εκπαιδευμένου προσωπικού. Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν από τα παιδιά περιλαμβάνουν ανθρωπομετρικές μετρήσεις, διατροφική συμπεριφορά και βιοχημικές μετρήσεις. Τα παραπάνω παρουσιάζονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

3. Μετρήσεις ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών

Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με μια ψηφιακή ζυγαριά (Seca) με μια ακρίβεια των ±100 g. Τα υποκείμενα μετρήθηκαν χωρίς παπούτσια, με όσο το δυνατόν λιγότερα ρούχα, για παράδειγμα μόνο με τα εσώρουχα. Το ύψος τους μετρήθηκε στα όρθια στα πλησιέστερα 0,5 cm με τη χρήση ενός αναστημόμετρου εμπορίου, με τους ώμους σε χαλαρή στάση και τα χέρια να πέφτουν ελεύθερα (88). Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) υπολογίστηκε διαιρώντας το βάρος (kg) με το τετράγωνο του ύψους (m^2), και χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των παιδιών σύμφωνα με πρόσφατα προτεινόμενα όρια (89). Επίσης μετρήθηκαν δερματοπτυχές αριστερού τρικεφάλου, δικεφάλου και υπερλαγόνιου με ένα Lange δερματοπτυχόμετρο, με την προϋπόθεση ότι το εξεταζόμενο άτομο στεκόταν με χαλαρωμένα τα άνω άκρα στις δύο μεριές του σώματος (90). Οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις περιλαμβάνουν το πηλίκο (περίμετρος μέσης) / (περίμετρος γοφών) (WHR). Η περίμετρος μέσης των ατόμων μετρήθηκε με μια μεζούρα μεταξύ της κατώτερης πλευράς και της κορυφής του λαγόνιου οστού. Η περίμετρος των γοφών μετρήθηκε στο πιο φαρδύ σημείο της περιοχής των γλουτών.

4. Εκτίμηση βιοχημικών παραμέτρων

Νωρίς το πρωί και ύστερα από 12ωρη νηστεία, δείγματα αίματος πάρθηκαν από το κάθε παιδί για τον βιοχημικό έλεγχο. Η ολική χοληστερόλη ορού μετρήθηκε μέσω αντίδρασης των εστεράση της χοληστερόλης, οξειδάση της χοληστερόλης και της υπεροξειδάσης (91). Η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) εκτιμήθηκε ύστερα από καθίζηση με πολυαιθυλενική γλυκερόλη_σε θερμοκρασία δωματίου (92). Η συγκέντρωση των ολικών τριγλυκεριδίων ορού μετρήθηκε μέσα από την αντίδραση της οξειδάσης και της υπεροξειδάσης της φωσφορικής γλυκερόλης (93).

5. Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης

Για τη συλλογή στοιχείων όσον αφορά στη διατροφική πρόσληψη των παιδιών, έγιναν δύο 24ωρες ανακλήσεις που είχαν μεταξύ τους απόσταση δύο εβδομάδων. Όλοι αυτοί που πήραν συνέντευξη είχαν εκπαιδευτεί αυστηρά, ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο το σφάλμα του παρατηρητή (94). Οι συμμετέχοντες στη έρευνα ερωτήθηκαν να περιγράψουν τον τύπο και την ποσότητα του φαγητού, καθώς και όλων των ποτών που κατανάλωσαν την προηγούμενη μέρα, αρκεί η μέρα αυτή να ήταν συνηθισμένη, σύμφωνα με την αντίληψη του ατόμου. Τα στοιχεία για την πρόσληψη τροφής αναλύθηκαν στο πρόγραμμα Nutritionist's V diet analysis (First Databank Inc, San Bruno, California, U.S.A.), ειδικά διαμορφωμένο ώστε να περιλαμβάνει ελληνικές συνταγές, όπως περιγράφονται στους πίνακες σύνθεσης τροφίμων (95). Η βάση δεδομένων εμπλουτίστηκε με πληροφορίες διατροφικής ανάλυσης πάνω σε χημικά αναλυμένα τρόφιμα, προερχόμενες είτε από ανεξάρτητες πηγές είτε από βιομηχανίες και αλυσίδες fast food, που αποτελούν την πηγή του 95% του λίπους της δίαιτας των σύγχρονων ελλήνων.

6.1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (5-6ml) με τη μέθοδο NaCl. Τα βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

ΗΜΕΡΑ 1η

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντριση (10min, 3000rpm).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωλήνα Falcon 50ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά τη διάρκεια των 20min).
5. Φυγοκέντριση (10min, 2000rpm).
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 25ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
8. Φυγοκέντριση (10min, 2500rpm).
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
10. Προσθήκη 3ml διαλύματος LysisII και ισχυρή ανακίνηση.
11. Προσθήκη 50μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
12. Προσθήκη 150μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο.

ΗΜΕΡΑ 2η

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα Falcon 15ml.
2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
3. Φυγοκέντριση (10min, 3000rpm). Με την φυγοκέντριση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντριση (10min, 3000rpm).
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml.
6. Προσθήκη 2,5 φορές του όγκου σε αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.

8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
9. Μεταφορά του DNA σε σωλήνα eppendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
11. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (4°C).

6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR (96), η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3΄άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3΄άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο Thermus aquaticus και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. **Αποδιάταξη** (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).

2. **Σύνδεση εκκινητών** (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
3. **Επιμήκυνση** (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5΄-3΄κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο
   διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.
4. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.\

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5΄άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR στο εξόνιο 10 του γονιδίου GNβ3 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια (96):

- **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την αλληλουχία 5΄-CA-AG-CCC-AGT-CCT-TTC-TGT-G-3΄ και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 543 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 54 pmol/μl. (stock solution)

Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία 5΄-AGT-GAA-GGA-ATC-GCT-TTC-CG-3΄ και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 605 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 60 pmol/μl. (stock solution)

Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραίωση 1:8 (working solutions: 25 μl stock + 175 μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία –20°C.

- **Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ**

Χρησιμοποιήθηκε η Bioron Taq πολυμεράση και είχε συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία –20°C.

- **PCR BUFFER**

Η συγκέντρωσή του ήταν 10X και περιείχε: 200 mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία –20°C.

- **ΔΙΑΛΥΜΑ $MgCL_2$**

Η συγκέντρωσή του ήταν 100 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία –20°C.

- **ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (dNTP's)**

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία –20°C.

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της PCR έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ PCR.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 1. Μίγμα για PCR στο εξόνιο Β του γονιδίου PPARγ2

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΟΓΚΟΣ**
Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	0,15 μl
PCR BUFFER	1,2 μl
$MgCI_2$	0,6 μl
dNTP's	0,1 μl
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,2 μl
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,2 μl
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	4,55 μl

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένες πλάκες των 96 θέσεων. Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 7 μl από το μίγμα με πιπέτα πολλαπλών εξόδων. Η πλάκα με το μίγμα διατηρείται στον πάγο.

3. Σε κάθε θέση της πλάκας προστίθενται 5 μl DNA από δείγματα αραιωμένα 1:10. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 12 μl.

4. Η πλάκα μεταφέρεται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα (97):

ΒΗΜΑ 1^{ο}: 94°C για 3 min

ΒΗΜΑ 2^{ο}: 94°C για 30 seconds

ΒΗΜΑ 3^{ο}: 53°C για 30seconds

ΒΗΜΑ 4^{ο}: 72°C για 1 min

ΒΗΜΑ 5^{ο}: (Βήμα 2^{ο}, Βήμα 3^{ο} και Βήμα 4^{ο}) x 40

ΒΗΜΑ 6^{ο}: 72°C για 9 min

ΒΗΜΑ 7^{ο}: 4°C αποθήκευση

6.3. Έλεγχος επιτυχίας PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος, ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα

διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 1% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

6.3.1. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 1%

- Ζυγίζονται 1gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 100 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid).
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 9μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα.

  Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με

  αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο.
- Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό ''χτένες'' ώστε να δημιουργηθούν ''πηγάδια'' καθώς πήζει το πήκτωμα της αγαρόζης.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (~10 min).
- Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι ''χτένες'' από αυτό και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

6.3.2. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

- Σε μη αποστειρωμένα eppendorf των 0,5 ml μεταφέρονται 3 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και σε ένα eppendorf τοποθετείται 0,5 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4 ^{o}C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20 ^{o}C.
- Σε όλα τα eppendorf προστίθενται 2 μl χρωστικής κυανούν της ξυλόλης και φυγοκεντρούνται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.

- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα ''πηγάδια'' του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο ''μάρτυρας''.

6.3.3. Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V για περίπου 20 λεπτά.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχεται σε σύγκριση με τον ''μάρτυρα'', οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

6.4. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστικότητά τους περιορίζεται σε ''ξένο'' DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες (''διαβάζονται'' το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA). Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα .

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά

διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαράγοντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+}. Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT κ.ά.) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστικότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους –20°C μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (98).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την πέψη το ένζυμο **Hpa II** (97). Αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση απομονώνεται από το στέλεχος *Haemophilus Parainfluenzia.*

Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου φαίνεται στην εικόνα 4.

Εικόνα 4.*:* Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου PPARγ2. Τα βέλη δείχνουν τα σημεία κοπής.

Για την πέψη του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- **ΕΝΖΥΜΟ**

Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 2.500 U/ml και διατηρείται σε θερμοκρασία –20°C.

- **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER 2)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) ήταν σε συγκέντρωση 1X και περιείχε: 33mM tris-acetate, 10mM magnesium acetate, 66mM potassium acetate, 0,1mg/ml BSA. Διατηρείται στους –20° C.

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 2. Μίγμα αντιδραστηρίων για την πέψη.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΟΓΚΟΣ**
ΕΝΖΥΜΟ HpaII	0,2 μl
BUFFER 2	1,4 μl
ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	2,4 μl

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μια αποστειρωμένη «οχτάδα». Σε κάθε θέση της «οχτάδας» μεταφέρονται 4μlX12 από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Οι «οχτάδες» με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.

3. Στη συνέχεια, με πιπέτα πολλαπλών εξόδων, το μίγμα μοιράζεται στις θέσεις της πλάκας, όπου ήδη υπάρχουν τα προϊόντα της PCR. Ο τελικός όγκος για την πέψη είναι 13μl.

4. Η πλάκα τοποθετείται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37°C για ένα βράδυ.

6.5. Έλεγχος του προϊόντος της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 3%

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 3% με τον ίδιο τρόπο όπως έγινε ο έλεγχος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

6.6. Διαλύματα

- **Lysis I (20x)**
  - 82,9gr NH_4CL (3,1M).
  - 10,01gr $KHCO_3$ (200mM).

- 20ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- Αποστείρωση.

➢ **Lysis I (1x)**

- 25ml Lysis I 20x.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Ανάδευση.

➢ **Lysis II**

- 0,61gr TrisHCL (10mM).
- 11,69gr NaCL (400mM).
- 2ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.
- Αποστείρωση.

➢ **Πρωτεϊνάση Κ** (20mg/ml)

- 100mg πρωτεϊνάση Κ.
- 5ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
- Αποθήκευση στους -20 ^{o}C.

➢ **Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)**

- 54gr Tris Base.
- 27,5gr Boric Acid.
- 20ml EDTA 0,5M.
- Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.
- Ανάδευση.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

- **Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)**
  - 200ml TBE 5x.
  - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
  - Ανάδευση.

- **EDTA 0,5M**
  - 186,1gr EDTA2H_2O.
  - Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
  - Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
  - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

- **SDS 20%**
  - 20gr SDS.
  - 60ml απεσταγμένο νερό.
  - Ανάδευση.

- **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**
  - 10mg EtBr.
  - 1ml αποστειρωμένο νερό.
  - Ανάδευση σε Vortex.
  - Φύλαξη στους 4^oC.

- **Tris-EDTA (TE)**
  - 0,61gr Tris Base 10Mm.
  - 1ml EDTA 0,05M.
  - Προσθήκη ≈ 400ml απεσταγμένο νερό.
  - Ανάδευση.
  - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
  - Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
  - Αποστείρωση.

7. Στατιστική επεξεργασία

Με βάση υπολογισμούς για τη στατιστική ισχύ, βρέθηκε ότι ο αριθμός των εξετασθέντων παιδιών είναι επαρκής για την εκτίμηση της τυποποιημένης διαφοράς > 0,5 μεταξύ των γονότυπων. Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε στατιστική ισχύς > 0,08 σε επίπεδο σημαντικότητας < 0,05.

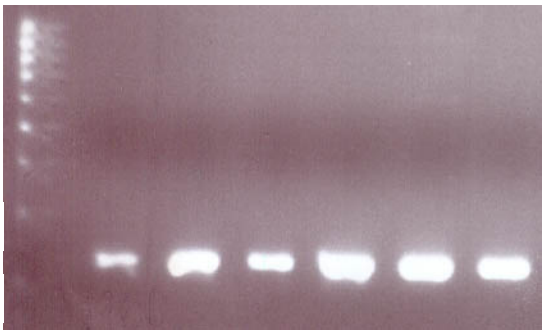
Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται σαν απόλυτες και σχετικές συχνότητες. Οι συχνότητες των αλληλίων υπολογίστηκαν με αρίθμηση των γονιδίων. Για τη σύγκριση των παρατηρούμενων αριθμών του κάθε γονότυπου με τους αναμενόμενους για έναν πληθυσμό σύμφωνα με την ισορροπία Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος του X^2. Οι διαφορές μεταξύ των γονότυπων, ύστερα από διαστρωμάτωση ανάλογα με το φύλο, υπολογίστηκαν με τον έλεγχο Ανάλυσης Διασποράς. Οι μεταβλητές της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων δεν είχαν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό, οι τιμές μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά. Έγιναν έλεγχοι κανονικότητας με χρήση του κριτηρίου Kolmogorov – Smirnov. Οι συσχετίσεις μεταξύ των λιπιδίων αίματος (εξαρτημένη μεταβλητή) και των γονότυπων (ανεξάρτητη μεταβλητή) ελέγχθηκαν επίσης μέσω ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης, μετά από έλεγχο για διάφορους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα της παλινδρόμησης παρουσιάζονται ως β-συντελεστές.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αναμενόταν να δώσει προϊόν μεγέθους 245bp. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της PCR έφερε ζώνες ανά 100 bp. Κατά συνέπεια αναμενόταν το προϊόν της PCR να εμφανίζεται μεταξύ των ζωνών 200 και 300bp. Στην εικόνα 5 φαίνεται ο έλεγχος της PCR που πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

300bp

200bp



Εικόνα 5. Στη διπλανή εικόνα φαίνεται **ο έλεγχος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης**. Το προϊόν από τη διαδικασία αυτή, αναμένεται να έχει μέγεθος 245bp, οπότε κι εμφανίζεται ανάμεσα στις ζώνες 200-300bp του μάρτυρα

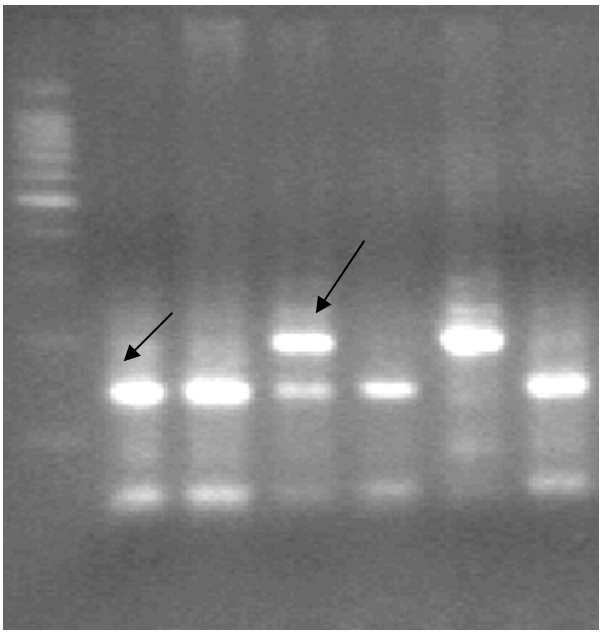
Ο έλεγχος της διαδικασίας πέψης με περιοριστικά ένζυμα έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Το περιοριστικό ένζυμο, διακόπτει την αλληλουχία του DNA στην περίπτωση που το άτομο δεν φέρει τον πολυμορφισμό, οπότε και διακρίνονται δυο ζώνες που αντιστοιχούν σε 202 και 43bp.

Αναμένουμε δύο ζώνες στα ομόζυγα άτομα για το pro αλλήλιο (202bp και 43bp), τρεις ζώνες στην περίπτωση των ετερόζυγων για τον πολυμορφισμό ατόμων (202bp, 43bp και 245 bp) και μια ζώνη στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλλήλιο Ala ατόμων (245bp). Ο έλεγχος της πέψης φαίνεται στην εικόνα 6.

245bp

202bp

43bp



Εικόνα 6: Στην εικόνα αυτή φαίνεται ο έλεγχος της διαδικασίας πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο έλεγχος έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Το περιοριστικό ένζυμο, διακόπτει την αλληλουχία του DNA στην περίπτωση που το άτομο δεν φέρει τον πολυμορφισμό. Αναμένουμε τρεις ζώνες στην περίπτωση των ετερόζυγων για τον πολυμορφισμό ατόμων (202bp, 43bp και 245 bp).
Δύο ζώνες εμφανίζονται στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλλήλιο Pro ατόμων (202 και 43bp), και μια ζώνη στην περίπτωση των ομόζυγων για το αλλήλιο Ala ατόμων (245bp). Το πρώτο από πάνω βέλος δείχνει άτομο ομόζυγο ως προς το Pro αλλήλιο. Το δεύτερο, άτομο ετερόζυγο ως προς τον πολυμορφισμό.

Από τη διάγνωση της πέψης με περιοριστικά ένζυμα προέκυψε ότι η συχνότητα του Pro αλληλίου στον πληθυσμό είναι **93,1%** και η συχνότητα του Ala αλληλίου είναι **6,9%**. Η συχνότητα των ατόμων αρσενικού γένους με γονότυπο Pro/Pro είναι **85,2%**, η συχνότητα με Pro/Ala είναι **14,8%** και η συχνότητα των Ala/Ala ατόμων είναι **0,0%**. Αντίστοιχα, η συχνότητα των ατόμων θηλυκού γένους βρέθηκε **85,9%** για τον γονότυπο Pro/Pro, **14,1%** για τον γονότυπο Pro/Ala και **0,0%** για τον γονότυπο Ala/Ala. Στο δείγμα που μελετήθηκε δεν βρέθηκαν καθόλου άτομα ομόζυγα ως προς το αλλήλιο Ala.(Πίνακας 3)

Άρρεν			**Θήλυ**		
Pro/Pro	**Pro/Ala**	**Ala/Ala**	**Pro/Pro**	**Pro/Ala**	**Ala/Ala**
85,2%	**14,8%**	**0,0%**	**85,9%**	**14,1%**	**0,0%**

Πίνακας 3. Αποτελέσματα για την κατανομή γονότυπων.

Με τη βοήθεια της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων των βιοχημικών εξετάσεων, του δείκτη μάζας σώματος και των δεδομένων για τη συχνότητα του πολυμορφισμού Pro12Ala στον πληθυσμό, ανιχνεύτηκε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτών. Ο **πίνακας 4** παρουσιάζει διάφορες ανθρωπομετρικές και μεταβολικές παραμέτρους που μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης ξεχωριστά ανάμεσα στα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της ολικής χοληστερόλης ήταν χαμηλότερα στα θηλυκά άτομα που φέρουν το αλλήλιο Ala (p=0,045 και p=0,062 αντίστοιχα). Όσον αφορά στα αρσενικά άτομα του δείγματος, οι φορείς του αλληλίου Ala είχαν χαμηλότερες τιμές της HDL χοληστερόλης (p=0,037) και υψηλότερες τιμές του πηλίκου (ολική χοληστερόλη)/ (HDL) (p=0,031). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στον **πίνακα 5** φαίνονται τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής μελέτης παλινδρόμησης, τα οποία επιβεβαιώνουν τις διαφορές του πηλίκου (ολική χοληστερόλη)/ (HDL) μεταξύ των δύο γονότυπων Pro/Pro και Pro/Ala στα αγόρια, ύστερα από προσαρμογή για το BMI, την ολική ενέργεια και την πρόσληψη κορεσμένου λίπους. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια **αλληλεπίδραση μεταξύ του γονότυπου και του φύλου** (p=0,001). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα άλλα λιπίδια μεταξύ των γονότυπων και στα δύο φύλα.

Πίνακας 4. Μέσες τιμές των ανθρωπομετρικών και μεταβολικών παραμέτρων μεταξύ των γονότυπων

Παράμετρος	**Θήλυ**			**Άρρεν**		
	Pro/Pro	**Pro/Ala**	**P**	**Pro/Pro**	**Pro/Ala**	**P**
Pro12Ala γενότυπος (n)	79	13	-	69	12	-
BMI (kg/m^2)	21±4	19±3	0,252	20±3	20±4	0,989
WHR	0,8±0,06	0,8±0,1	1,000	0,8±0,08	0,8±0,07	0,813
Σύνολο δερματοπτυχών (mm)	63±32	56±26	0,694	60±33	51±31	0,318
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	94±31	77±11	**0,045**	77±24	76±17	0,760
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	194±32	180±28	**0,062**	188±28	188±23	0,884
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	130±27	121±26	0,136	124±24	130±16	0,300
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	46±10	45±4	0,732	47±8	43±9	**0,037**
Λόγος Ολικής/HDL χοληστερόλης	4,0±0,8	4,0±0,5	0,173	4±0,6	4,5±0,6	**0,031**
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	92±10	94±7	0,321	93±10	91±9	0,436

Πίνακας 5 Αποτελέσματα από την ανάλυση παλινδρόμησης για την αξιολόγηση της επίδρασης του πολυμορφισμού στο λόγο ολικής/HDL χοληστερόλης (εξαρτημένη μεταβλητή) σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, μετά από έλεγχο για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες		
Άρρεν	**b-coefficient ± SE**	**P**
Pro12Ala γονότυπος (Pro/Pro vs. Pro/Ala)	-0,4±0,2	**0,047**
BMI (kg/m^2)	0,09±0,02	0,000
Ενεργειακή πρόσληψη (kcal/day)	-7*10^5±0,00	0,706
Συνολική πρόσληψη λίπους (gr/day)	-0,001±0,004	0,764
Πρόσληψη κορεσμένου λίπους (gr/day)	0,005±0,008	0,508
Θήλυ		
Pro12Ala γονότυπος (Pro/Pro vs. Pro/Ala)	0,1±0,25	0,608
BMI (kg/m^2)	0,05±0,025	0,063
Ενεργειακή πρόσληψη (kcal/day)	9*10^5±0,00	0.793
Συνολική πρόσληψη λίπους (gr/day)	-0,003±0,007	0,685
Πρόσληψη κορεσμένου λίπους (gr/day)	0,002±0,015	0,881

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παιδική παχυσαρκία έχει λάβει διαστάσεις επιδημίας και αποτελεί ξεχωριστό παράγοντα κινδύνου για πολλά νοσήματα κατά την παιδική ηλικία και κατά την ενηλικίωση, όπως οι καρδιοπάθειες, ενώ συχνά συνοδεύεται και επηρεάζεται από άλλες μεταβολικές παθήσεις, όπως η υπερλιπιδαιμία και ο διαβήτης τύπου ΙΙ. Η σύγχρονη εμφάνιση της παχυσαρκίας, της υπερλιπιδαιμίας, της υπέρτασης και του διαβήτη τύπου ΙΙ αποτελούν το μεταβολικό σύνδρομο (99). Η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου στην παιδική ηλικία προωθεί την πρόωρη έναρξη αθηρωμάτωσης και αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για καρδιοπάθειες στην ενήλικη ζωή (100).

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της παιδικής παχυσαρκίας είναι περιβαλλοντικοί, όπως η διατροφή πλούσια σε λίπος και γενετικοί, όπως τα διάφορα μονογονιδιακά σύνδρομα. Στους γενετικούς παράγοντες συγκαταλέγονται διάφορα γονίδια των οποίων πολυμορφισμοί προδιαθέτουν για αυξημένο Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI). Ο πολυμορφισμός Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ2 έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση παχυσαρκίας και άλλους παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου.

Το PPARγ2 είναι συντομογραφία του ενεργοποιημένου υποδοχέα πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων γ-2 και ανήκει στη μεγάλη υπεροικογένεια των εξαρτημένων από λιπόφιλα μόρια-συνδέσμους πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Εκφράζεται κύρια στον λιπώδη ιστό και είναι παράγοντας μεταγραφής πολλών μορίων που συμμετέχουν κυρίως στη λιπογένεση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στην αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.

Έχει αποδειχθεί ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala σχετίζεται με μειωμένη λειτουργικότητα του μορίου (82), υποδεικνύοντας την ανάγκη μελέτης αν σχετίζεται με την παχυσαρκία και άλλα μεταβολικά νοσήματα. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες για το λόγο αυτό, οι οποίες όμως έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Επιπλέον, υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την επίδραση του πολυμορφισμού σε παιδιά.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αναζήτηση κάποιας συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού Pro12Ala στο γονίδιο του PPARγ2 και της εμφάνισης παχυσαρκίας και άλλων συναφών συμπτωμάτων του μεταβολικού συνδρόμου σε παιδιά δημοτικού σχολείου στην Ελλάδα. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα 182 παιδιών ηλικίας 11-12 ετών και βρέθηκε ότι η συχνότητα του Ala αλληλίου ήταν **6,9%** στο

σύνολο των παιδιών. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες. Υπενθυμίζεται ότι η έρευνα για την αθηροσκλήρωση στην **Ευρώπη** των Poirier et al., που μελέτησε δείγμα 675 φοιτητών από 11 Ευρωπαικές χώρες, έδειξε ότι η συχνότητα του Ala αλληλίου παρουσιάζει **πτωτική τάση από τις βόρειες στις νότιες χώρες** και κυμαίνεται μεταξύ **21%** στις βαλτικές χώρες και **7%** στις Μεσογειακές χώρες (70). Συγκριτικά, η συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό είναι μεγαλύτερη εκείνης στους πληθυσμούς της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης και στους λευκούς Αμερικανούς (65, 67, 68, 73), ενώ είναι μικρότερη της συχνότητας στους Κινέζους (64) και στους Ιάπωνες (75).

Στην παρούσα μελέτη **δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Pro12Ala στο PPARγ2 και του BMI στα παιδιά**. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών, που επίσης δεν διαπίστωσαν κάποια σχέση μεταξύ του Ala αλληλίου και της εμφάνισης παχυσαρκίας. Συγκεκριμένα, αναφέρεται η μελέτη των Poirier et al.(2000), που χρησιμοποίησε δείγμα 675 νέων ανδρών ηλικίας 18-28 ετών με οικογενειακό ιστορικό εμφράγματος από 11 Ευρωπαϊκές χώρες και δεν βρήκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του BMI (70). Επίσης, στην έρευνα των Swarbrick et al.(2001), όπου χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα 292 παχύσαρκων ατόμων και μια ομάδα 371 ατόμων με φυσιολογικό BMI δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με την παχυσαρκία (83). Οι μελέτες των Iwata et al.(2001) σε δείγμα 106 διαβητικών ενηλίκων (75) και των Young Oh et al.(2000) σε δείγμα 229 ενηλίκων (74) κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών έρχονται σε αντίθεση με αυτά άλλων που διαπίστωσαν θετική ή αρνητική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση παχυσαρκίας. .Για παράδειγμα, η μελέτη των Beamer et al.,που πραγματοποιήθηκε μεταξύ δύο διαφορετικών ομάδων, όπου η μία αποτελούταν από 517 άτομα με διάφορες τιμές BMI και η άλλη από 169 σοβαρά παχύσαρκων ατόμων, έδειξε ότι άτομα με τουλάχιστον ένα αλλήλιο Ala είχαν **σημαντικά αυξημένο BMI σώματος** (66). Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν οι έρευνες των Li et al (77), των Lei et al. (76), των Robitaille et al. (73), των Rosmond et al. (78) και των Meirhaeghe et al. (80). Αντίθετα, οι έρευνες των Doney et al. σε δείγμα 1695 ατόμων (81) και των Deeb et al. (82) υποστήριξαν ότι τα άτομα που έφεραν τον πολυμορφισμό είχαν **χαμηλότερο δείκτη BMI**.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα των ερευνών, δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την επίδραση του πολυμορφισμού στο BMI και στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Μια πιθανή εξήγηση δύναται να δοθεί μέσα από την κριτική

θεώρηση άλλων ερευνών, οι οποίες κατέδειξαν την αλληλεπίδραση του φαινοτύπου και άλλων παραγόντων, όπως οι περιβαλλοντικοί. Αναλυτικότερα, στην προοπτική μελέτη των Witchel et al. που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά ηλικίας 4,5-19 ετών, τρία στα τέσσερα παιδιά με φυσιολογικό BMI φορείς του Ala αλληλίου διατήρησαν το βάρος τους, ενώ τα παχύσαρκα άτομα-φορείς του πολυμορφισμού εμφάνισαν σημαντικά αυξημένο BMI και ρυθμό αύξησης αυτού ανά χρόνο σε σχέση με τα άτομα Pro/Pro (84). Ανάλογο αποτέλεσμα είχε η έρευνα των Ek et al., που έδειξε ότι οι παχύσαρκοι ομόζυγοι φορείς του Ala αλληλίου εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση του BMI σε σύγκριση με τους παχύσαρκους ομόζυγους ως προς το Pro αλλήλιο. Αντίθετα, οι ομόζυγοι με φυσιολογικό BMI που έφεραν τον πολυμορφισμό είχαν μικρότερο ρυθμό αύξησης του βάρους τους σε σχέση με τους φυσιολογικού BMI μη φορείς του πολυμορφισμού Pro12Ala (101). **Άρα, η επίδραση του Pro12Ala πολυμορφισμού στο BMI ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ ατόμων με φυσιολογικό BMI και παχύσαρκων ατόμων.**

Τέλος, μελέτη των Luan et al. έχει δείξει ότι υπάρχει **αλληλεπίδραση μεταξύ της δίαιτας και του φαινοτύπου του πολυμορφισμού**. Συγκεκριμένα, όταν η αναλογία των πολυακόρεστων προς τα κορεσμένα λίπη είναι μικρή, ο πολυμορφισμός συνδέεται με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος. Αντίθετα, όταν η αναλογία αυτή είναι υψηλή, τα άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό είναι πιο αδύνατα από αυτά που δεν τον φέρουν (86).

Όσον αφορά στη διερεύνηση της επίδρασης του πολυμορφισμού Pro12Ala σε άλλες μεταβολικές παραμέτρους, η παρούσα μελέτη έχει την αποκλειστικότητα του ευρήματος ότι η **παρουσία του Ala αλληλίου στα αγόρια ηλικίας 11-12 ετών σχετίζεται με αυξημένες τιμές του λόγου ολικής/HDL χοληστερόλης**. Ο λόγος ολικής/HDL χοληστερόλης θεωρείται ένας από τους καλύτερους προγνωστικούς δείκτες των παθήσεων της καρδιάς, με εμβέλεια αντίστοιχη της LDL και της HDL χοληστερόλης (102). Σε πρώτο στάδιο είχε επιπλέον βρεθεί συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και μειωμένων επιπέδων της HDL χοληστερόλης στα αγόρια, η οποία δεν διατηρήθηκε ύστερα από έλεγχο επίδρασης άλλων παραγόντων, όπως το BMI. Σε αντίθεση με τα αγόρια, στα κορίτσια ο πολυμορφισμός φάνηκε να συνδέεται με μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και HDL χοληστερόλης. Παρατηρείται επομένως μια **διαφορά στην επίδραση του πολυμορφισμού στα λιπίδια πλάσματος ανάμεσα στα δύο φύλα**.

Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με αυξημένες τιμές του λόγου ολικής/HDL χοληστερόλης στα αγόρια είναι αρκετά σημαντική εφόσον η τελευταία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα και σύμπτωμα του μεταβολικού συνδρόμου. Το εύρημα αυτό στηρίζεται από ανάλογα πορίσματα άλλων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικες. Στην έρευνα των Swabrick et al., χρησιμοποιήθηκαν μία ομάδα παχύσαρκων και μια ομάδα ενηλίκων με φυσιολογικό BMI της Καυκάσιας φυλής. Οι παχύσαρκοι φορείς του πολυμορφισμού είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων συγκρινόμενοι με τους παχύσαρκους Pro/Pro. Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές για την ομάδα των αδύνατων ατόμων, το οποίο υπογραμμίζει ότι **η επίδραση του πολυμορφισμού στο λιπιδαιμικό προφίλ εξαρτάται από το BMI των ατόμων** (83). Ακόμα, στην έρευνα των Meirhaeghe et al., σε δείγμα 1195 τυχαία επιλεγμένων ενηλίκων, η παρουσία του Ala αλληλίου σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης (80). Οι Schneider et al. σε δείγμα 194 αντρών με στεφανιαία νόσο, έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala σχετίζεται με χαμηλότερη λειτουργικότητα του υποκινητή της LPL, το οποίο συνδέεται με την εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας (67). Επίσης, οι έρευνες των Mori et al. (2003) (103) και των Zietz et al. (2002) (104) είχαν ως πόρισμα τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης.

Έχει δειχθεί ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala συνδέεται με μειωμένη λειτουργικότητα του μορίου (82). Η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα ενδέχεται να απορρέει από τη μειωμένη μεταγραφή μέσω του PPARγ2 μορίων, όπως το CD36, που ευθύνονται για τη συσσώρευση των λιπιδίων στο εσωτερικό των λιποκυττάρων και έτσι τη μείωση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα.

Η επίδραση γενετικών παραγόντων στο λιπιδαιμικό προφίλ των παιδιών έχει διαπιστωθεί και από μελέτες για άλλα γονίδια. Οι Tai DY et al. ανέφεραν μια μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL, η οποία προκαλεί οικογενή υπερχοληστερολαιμία (104). Επίσης σε έρευνα των Ye SQ et al., που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά διαπιστώθηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων της LDL χοληστερόλης και του APOA1*A αλληλίου στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης A-I. ακόμα, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των apo A-IV, apo B, apo C-III, apo E, λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, τρανσφεράσης του εστέρα της χοληστερόλης συνδέονται με την μεταβολή των λιποπρωτεϊνών πλάσματος μετά από διαιτητική παρέμβαση (106).

Αντίθετα με τις έρευνες που συμφωνούν με τα ευρήματα αυτής της μελέτης, **υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala στο PPARγ2 δρα προστατευτικά στο λιπιδαιμικό προφίλ**. Τέτοιες είναι οι έρευνες των Rosmond et al (78), των Douglas et al., (87) των Sanchez et al (79), των Iwata et al (75) και των Robitaille et al. (73). Επίσης, υπήρξαν **έρευνες που δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση**, όπως των Poirier et al. (70) των Young Oh et al. (74) και των Vaccaro et al (69).

Το γεγονός πως ο πολυμορφισμός συνδέθηκε με αυξημένο λόγο ολικής/HDL χοληστερόλης μόνο στα παιδιά αρσενικού φύλου, υποδηλώνει μια πιθανή **αλληλεπίδραση μεταξύ της φαινοτυπικής εκδήλωσης του Ala αλληλίου για το λιπιδαιμικό προφίλ και του φύλου**. Παρόμοια, στην έρευνα των Sanchez et al., βρέθηκε ότι μόνο οι άντρες φορείς του Ala αλληλίου είχαν υψηλότερο BMI και μικρότερη διάμετρο μέσης από τους Pro ομοζυγώτες, ενώ οι γυναίκες όχι (79). Από την άλλη πλευρά, στην έρευνα των Beamer et al., τα αποτελέσματα συσχέτισης του πολυμορφισμού με υψηλότερο BMI στους παχύσαρκους, ήταν πιο εμφανή στις γυναίκες φορείς παρά στους άντρες (76). Ακόμα, στη μελέτη των Thamer et al, φάνηκε ότι μόνο οι άντρες φορείς του πολυμορφισμού είχαν αυξημένη ικανότητα σε σύγκριση με τους μη-φορείς να μεταβάλουν το αναπνευστικό τους πηλίκο ως απόκριση στη δράση τη ινσουλίνης (107). Οι παραπάνω ενδείξεις του ρόλου του φύλου στο φαινότυπο δεν έχουν εξηγηθεί ακόμα.

Από την αναφορά στις έρευνες που έχουν προηγηθεί για την επίδραση του Pro12Ala πολυμορφισμού στην παχυσαρκία και σε άλλα μεταβολικά νοσήματα, έχει καταφανεί ότι **οι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φαινοτυπική εκδήλωση**. Υπενθυμίζονται οι έρευνες των Witchel et al (84), των Ek et al.(101) και των Swarbrick et al. (83) όπου η **επίδραση του πολυμορφισμού στο BMI και στη χοληστερόλη φαίνεται να διαφέρει μεταξύ ατόμων με φυσιολογικό BMI και παχύσαρκων ατόμων**. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να συνδέεται με το ότι η έκφραση του PPARγ2 είναι αυξημένη στο λιπώδη ιστό των παχύσαρκων ατόμων και μειωμένη ύστερα από μια υποθερμιδική δίαιτα (68).

Επιπρόσθετα, οι έρευνες των Luan et al. (86) και των Robitaille et al. (73) υπογραμμίζουν τη **σχέση μεταξύ του φαινοτύπου και της διατροφής**. Για παράδειγμα, οι Lindi et al. στην έρευνα KANWU, έδειξαν ότι οι φορείς του

πολυμορφισμού μόνο ύστερα από χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων είχαν μεγαλύτερη μείωση χοληστερόλης ορού από τα ομόζυγα άτομα ως προς το Pro αλλήλιο (65).

Οι Eriksson et al. έδειξαν ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ολικής, LDL και μη-HDL χοληστερόλης σε άτομα μεγάλης ηλικίας που είχαν βάρος κατά τη γέννηση λιγότερο των 3000 gr (108). Συνεπώς, φαίνεται πως το **βάρος κατά τη γέννηση** αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που διαμορφώνει την τελική επίδραση του πολυμορφισμού.

Ένας άλλος εξωγενής παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει το φαινότυπο είναι η **φυσική άσκηση**. Στην έρευνα των Kahara et al., φάνηκε ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με βελτίωση της απόκρισης στην ινσουλίνη μόνο μετά από φυσική άσκηση (109).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα, είναι φανερό πως η σχέση του Pro12Ala με το BMI και το λιπιδαιμικό προφίλ δεν είναι εξακριβωμένη και τα αποτελέσματα έρχονται σε σύγκρουση μεταξύ τους. Η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως αναλύθηκε προηγούμενα, ίσως να είναι η απάντηση στη διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων. Οι έρευνες αυτές δεν χρησιμοποίησαν δείγματα με κοινά χαρακτηριστικά, αλλά με διαφορές ως προς την ύπαρξη ή όχι νοσημάτων, όπως παχυσαρκίας, διαβήτη και ιστορικό στεφανιαίας νόσου. Τα **υποκείμενα νοσήματα** φαίνεται ότι επηρεάζουν τη φαινοτυπική εκδήλωση του πολυμορφισμού. Για παράδειγμα, υπάρχουν έρευνες όπου μόνο οι διαβητικοί φορείς του Ala αλληλίου φαίνονται να έχουν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα (57, 87).

Η παχυσαρκία και τα υπόλοιπα μεταβολικά νοσήματα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι πολυγονιδιακά ή πολυπαραγοντικά νοσήματα. Αυτό σημαίνει ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες σε συνδυασμό με το γονότυπο ευθύνονται για τον φαινότυπο. Για το λόγο αυτό το είδος της επίδρασης του πολυμορφισμού του γονιδίου του PPARγ στο BMI και στους υπόλοιπους συντελεστές του μεταβολικού συνδρόμου εξαρτάται από το περιβάλλον, όπως είναι, η φυσική άσκηση, η ενεργειακή πρόσληψη και η πρόσληψη λίπους, από το σωματικό βάρος του ατόμου και από το φύλο.

Λόγω της επιρροής του περιβάλλοντος στη φαινοτυπική εκδήλωση του πολυμορφισμού, ο έλεγχος της επίδρασης αυτού στο BMI και σε άλλους μεταβολικούς δείκτες, θα πρέπει να εστιαστεί στην παιδική ηλικία, όπου η επίδραση εξωγενών παραγόντων είναι η μικρότερη δυνατή. Επίσης, η συχνότητα σοβαρών

νοσημάτων του μεταβολισμού που ενδέχεται να επηρεάσουν το φαινότυπο, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, είναι μικρότερη στα παιδιά και αυτό θα διευκόλυνε την εύρεση πιθανών συσχετίσεων.

Επίσης, θα πρέπει να αυξηθεί το μέγεθος του δείγματος, ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού και να αυξηθεί η πιθανότητα να βρεθεί κάποια συσχέτιση. Εξάλλου, έρευνες που βρήκαν συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του BMI χρησιμοποίησαν μεγαλύτερο δείγμα ατόμων. Ένας ακόμα λόγος για την ανάγκη αύξησης του δείγματος είναι η μελέτη της επίδρασης του Ala αλληλίου χωριστά στα δύο φύλα, καθώς έχει φανεί η εξάρτηση του φαινότυπου από το φύλο.

Ακόμα, για τη διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία και άλλα μεταβολικά νοσήματα θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όλοι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην εκδήλωση του φαινοτύπου. Εκτός του BMI, της ενεργειακής πρόσληψης και της πρόσληψης ολικού και κορεσμένου λίπους, είναι απαραίτητο να συνυπολογιστούν η φυσική δραστηριότητα, το βάρος γεννήσεως και η ποιότητα του λίπους που προσλαμβάνεται με τη διατροφή.

Τέλος, εξαιτίας της ανάγκης θεώρησης της παχυσαρκίας και των άλλων μεταβολικών νοσημάτων ως πολυπαραγοντικά και πολυγονιδιακά νοσήματα, προτείνεται η πραγματοποίηση μελέτης που να συνυπολογίζει την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών και κληρονομικών παραγόντων. Δεδομένης της κεντρικής θέσης του PPARγ στο μεταβολισμό του λίπους, θα ήταν πληρέστερη η μελέτη του πολυμορφισμού Pro12Ala να γίνει παράλληλα με μελέτη άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στα ίδια μεταβολικά μονοπάτια. Δηλαδή, θα ήταν προτιμότερο η μελέτη του πολυμορφισμού Pro12Ala στο PPARγ ως παράγοντας προδιάθεσης για την παιδική παχυσαρκία να λαμβάνει υπόψη πολυμορφισμούς σε άλλους γενετικούς τόπους, η δράση των οποίων θα είναι συνεργιστική στην εκδήλωση του φαινοτύπου.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1) Rosenbaum M., Leibel R., Hirsch J. Obesity. *The New England Journal of Medicine* (1997) Aug. 7, pp.:396-407.

2) Tainz LS. *Textbook of Paedriatic Nutrition*, 3e. Edinburgh: Churchill Livingstone, (1991) p. 485.

3) Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* (2002) 288:1723-1727.

4) Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA* (2002) 288:1728-1732.

5) Lobstein T, Frlut M.-L. Prevalence of overweight among children in Europe. *The International Association for the Study of Obesity. Obesity reviews* 4. (2003) 195-200.

6) Dietz W. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult disease. *Pediatrics* (1998) suppl March. Vol. 101 No. 3: 518-525.

7) American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* (2000) 23:381-389.

8) Ludwig DS, Ebbeling CB. Type 2 diabetes mellitus in children: primary care and public health considerations. *JAMA* (2001) 286: 1427-1430.

9) Ebbeling CB, Pawlac DB, Ludwig DC. Childhood obesity:public health crisis, common sense cure. *Lancet* (2002) 360:473-482.

10) Sorof J., Daniels S. Obesity hypertension in children : A problem of epidemic proportions. *Hypertension* (2002) 40:441.

11) Weiss R, Dziura J, Burgeet TS. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med.* (2004) Jun 3;350(23):2362-74.

12) Gennusob J., Epstein L., Paluch R., Cerny F. The relationship between asthma and obesity in urban minority children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* (1998) 152:1197-1200.

13)) Slyper A. Childhood obesity, adipose tissue distribution, and the pediatric practitioner. *Pediatrics* (1998) 102:e4.

14) Attie I., Brooks-Gunn J. Development of eating problems in adolescent girls: a longitudinal study. *Dev Psychol*. (1989) 25 :70-79.

15) Gordon-Larsen P., Adair L., Nelson M., Popkin B. Five-year obesity incidence in the transition period between adolescence and adulthood: the National

Longitudinal Study of adolescent Health. *The American journal of Clinical Nutrition* (2004) vol. 80 no. 3:569-575.

16) Sendula, Ivery D., Coates RJ., et al. Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med* (1993) 22:167-177.

17) Steinberger J., Daniels S. Obesity, Insulin resistance, diabetes and Cardiovascular risk in children. AHA scientific statement. *Circulation* (2003) 107:1448-1453.

18) Olson R. The role of dietary and plasma lipids in childhood atherogenesis. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine* (2002) 21: 137-152.

19) Francoso L.A., Coates V. Anatomicopathological evidence of the beginning of atherosclerosis in infancy and adolescence. *Arq Bras Cardiol* (2002) Vol. 78, no 1 : 132-42.

20) Stehbens W., Dphil MD. Relevance of hypercholesterolemia to fetal and pediatric atherosclerosis. *Pediatric pathology and molecular Medicine*. (2002), 21:259-278.

21) Newman III WP, Freedman DS, Voors AW, et al. Relation of serum lipoprotein levels and systolic blood pressure to early atherosclerosis: The Bogalusa Heart study. *N Engl J Med* (1986) 314:138-144.

22) Mahan K., Escott-Stump S. Krause's Food Nutrition and Diet Therapy. (2000) 10th, Saunders.

23) Houseknecht K.L., Portocarrero C.P. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology* (1998) 15 (6):457-475.

24) Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* (2003) 299(5608):853-855.

25) Gillis LJ., Kennedy LC., et al. Relationship between juvenile obesity, dietary energy and fat intake and physical activity. *Int J Obes Metab disord* (2002) 26:458-463.

26) Bjorntorp, P. *International textbook of obesity*. (2001) Wiley

27) Nader PR. Frequency and intensity of activity of third-grade children in physical education. *Arch pediatr adolesc Med* (2003) 157:185-190.

28) Robinson TN. Reducing children's television viewing to prevent obesity: a randomized controlled trial. *JAMA* (1999) 282:1561-1567.

29) Robinson TN. Television viewing and childhood obesity. *Pediatr Clin North Am* (2001) 48:1017-25.

30) Grummer-Strawn L., Mei Z. Does breast-feeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the centers for disease control and prevention pediatric nutrition surveillance system. *Pediatrics* (2004) Feb. Vol. 113 No. 2: e81-e85.

31) Campbell K., Crawford D. Family food environments as determinants of preschool-aged children's eating behaviors: implications for obesity prevention policy. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics* (2001) 58: 19-26.

32) Baughcum A., Powers S., Johnson S., Chamberlin L. et al. Maternal feeding practices and beliefs and their relationships to overweight in early childhood. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* (2001) 22(1): 391-409.

33) Arner P. Obesity – a genetic disease of adipose tissue? *British Journal of Nutrition*. (2000), 83, Suppl. 1, S9-S16.

34) Garn SM, Clark DC. Trends in fatness and the origins of obesity. *Pediatrics* (1976) 57:443-456.

35) Maes H., Neale M., Eaves L. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior Genetics* (1997) Vol. 27, No. 4:325-351.

36) Agras S., Hammer L., McNicholas F., Kraemer E. Risk factors for chldhood overewight: a prospective study from birth to 9,5 years. The journal of Pediatrics (2004) July, 20-25.

37) Boutin P., Froguel P. Genetics of human obesity. *Best practice and research Clinical Endocrinology and Metabolism* (2001) Vol. 15,No. 3: 391-404.

38) Montague C., Farooqi J., Whitehead M., et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature (1997) 387:903-908.

39) Clement K., Vaisse C. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* (1998) Vol. 392, 26 March: 398-401.

40) Froguel P., Boutin P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. *Exp Biol Med*. (2001), vol. 226(11):991-996.

41) Krude H., Biebermann H., et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nature America (1998) vol. 19, june, pp.:155-157.

42) Kersten Sander. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *European Journal of Pharmacology* 440 (2002) 223-234.

43) Escer P., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research.* (2000) 448: 121-138.

44) Lee C., Olson P., Evans R. Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* (2003) 144(6):2201-2207.

45) Vosper H., Patel L., et al. The Peroxisome proliferator-activated receptor δ promotes lipid accumulation in human macrophages. The Journal of Biological Chemistry (2001) vol. 276, no. 47, pp. 44258-44265.

46) Auwerx J. PPARγ, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*. (1999) 42: 1033-1049.

47) Gurnell M. PPARγ and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clinical Endocrinology* (2003) 59: 267-277.

48) Stumvoll M., Haring H. The peroxisome proliferator-activated-receptor γ2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*, Vol. 51, August 2002: 2341-2347.

49) Rosen E., Walkey C., Puigserver P., Spiegelman B. Transcriptional reulation of adipogenesis. *Genes and development* (2000) 14:1293-1307.

50) Spiegelman B, Flier J. Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell* (1996) vol. 87, 377-389.

51) Kliewer S., Sundseth S., Jones S. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) Vol. 94, pp. 4318-4323.

52) Camp H., Ren D., Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* (2002) Vol. 8 No. 9: 442-446.

53) Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR. the relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart study. *Pediatrics*. (1999) 103(6 pt 1):1175-1182.

54) Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. EMBO reports (2001) vol. 2, no. 4, pp. 282-286.

55) Martin G., Schoonjans K., Staels B., Auwerx J. PPARγ activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis.*. (1998) 137 Suppl S75-S80.

56) Gurnell M., Savage D., Krishna V., Chatterjee, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and its therapeutic modulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2003) 88(6):2412-2421.

57) Castle CK., Colca JR., et al. Lipoprotein profile characterization of the KKAy mouse, a rodent model of type II diabetes, before and after treatment with the insulin-sensitizing agent pioglitazone. Arterioscler Thromb (1993) 13:302-309

58) Kliewer S., Xu H.E>, Lambert M., Willson T. Peroxisome proliferator-activated receptors: From genes to Physiology. *The Endocrine Society*. (2001).

59) Yamauchi T., Kamon J., Waki H. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with body lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* (2001) Vol. 7 No. 8: 941-946.

60) Puddu P., Puddu G., Muscari A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progresson? *International Journal of Cardiology* 90 (2003), 113-140.

61) Ricote M., Huang J., Fajas L. et al. Expression of the Peroxisome Proliferator-activated receptor -γ (PPARγ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), June, vol. 95, pp. 7614-7619.

62) Nicholson A. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis. The role of lipid regulation of PPARγ signaling. *TCM* (2004) Vol. 14, No. 1: 8-12.

63) Li AC, Brown KK., et al. Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma ligants inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* (2000) 106:523-31.

64) Yen, Beamer, Negri, Silver, Brown, Yarnall, Burns, Roth, Shuldiner. Molecular scanning of the human Peroxisome Proliferator-activated receptor γ Gene in Diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala missense mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (1997), 241; 270-274.

65) Lindi, Scwab, Louheranta, Laakso. Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPARγ2 gene on serum triaglycerol in response to n-3 fatty acid supplementation. *Molecular Genetics and Metabolism*, (2003) 79; 52-60.

66) Beamer A., Chung-Jen Y, Andersen A. Association of the Pro12Ala Variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ2 Gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* (1998) vol. 47: 1806-1808.

67) Schneider J, Kreuzr J, Hamann A, Nawroth P, Dugi K. The Proline 12 Alanine substitution in the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ2 Gene is associated with lower lioprotein activity in vivo. *Diabetes* (2002) Vol. 51: 867-870.

68) Valve R., Sivenius K., Miettinen R. Two polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ Gene are associated with severe overweight among

obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. (1999), vol. 84, No. 10.:3708-3712.

69) Vaccaro, Mancini, Ruffa, Sabatino, Colantuoni, Riccardi. Fasting plasma free fatty acids concentrations and Pro12Ala polymorphism of the Peroxisome Proliferator-activated receptor (PPAR) γ2 gene in healthy individuals. *Clinical Endocrinology* (2002), 57; 481-486.

70) Poirier O., Nicaud V., Tiret L. ThePro12Ala polymorphism in the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ2 gene is not associated with postprandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy individuals: The European Atherosclerosis Study. *J Mol Med*. (2000), 78; 346-351.

71) Nicklas, Rossum, Berman, Ryan, Dennis, Shuldiner. Genetic Variation in the Peroxisome Proliferator-activated receptor-γ2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain. *Diabetes* (2001), vol.50:2172-2176.

72) Li S, Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS; The Bogalusa Heart Study. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene polymorphism (Pro12Ala) beneficially influences insulin resistance and its tracking from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. Diabetes. (2003) May;52(5):1265-9.

73) Robitaille J, Despres J-P, Perusse L, Vohl M-C. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study.. *Clinical Genetics* (2003), 63 ;109-116.

74) Young, Min, Chung. Significance of the Pro12Ala mutation in Peroxisome Proliferator-activated receptor γ2 in Korean diabetic and obese subjects. *The Journal of Clinical endocrinology and Metabolism.* (2000) vol. 85, no. 5.

75) Iwata E, Matsuda H. Mutations of the Peroxisome Proliferator-activated receptor γ gene in a Japanese population: the Pro12Ala mutation in PPARγ2 gene is associated with lower concentrations of serum total and non-HDL cholesterol. *Diabetologia* (2001), 44; 1354-1356.

76) Lei, Chen, Yang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma 2 Pro12Ala Gene Variant is strongly associated with larger Body Mass in the Taiwanese. *Metabolism* (2000) vol 49, no 10(October): pp 1267-1270.

77) Li, Lee, Price. The Peroxisome Proliferator-activated receptor γ2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Molecular Genetics and Metabolism*. (2000) 70, 159-161.

78) Rosmond, Chagnon, Bouchard. The Pro12Ala PPARγ2 gene missense mutation is associated with obesity and insulin resistance in Swedish middle-aged men. *Diabetes Metab Res Rev* (2003), 19; 159-163.

79) Sanchez G, Rios M, Perez F. effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *European Journal of Endocrinology* (2002) 147 495-501.

80) Meirhaeghe, Fajas, Helbecque, Cottel, Auwerx, Deeb, Amouyel. Impact of the Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12alapolymorphismon adiposity, lipids and NIDDM. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. (2000), 24; 195-9.

81) Doney A, Fischer B, Frew D. Haplotype analysis of th Pro12Ala and C143IT variants reveals opposing associations with body weight. BMG Genetics (2002), 3:21.

82) Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. (1998) Nov;20(3):284-7.

83) Swarbick, Chapman, Brendan, McQuillan, Hung. A Pro12Ala polymorphismin the human Peroxisome Proliferator-activated receptor-γ2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European Journal of Clinical Endocrinology* (2001), 144; 277-282.

84) Witchel S, White Carlie, Siegel M. Inconsistent effects of the proline12 alanine variant of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ2 gene on body mass index in children and adolescent girls. *Fertility and sterility* (2001) October Vol. 76, no. 4:741-747.

85) Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O.: Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia.* (1999) Jul;42(7):892-5.

86) Luan J, Browne P, Harding A. evidence for Gene-Nutrient Interaction at the PPARγ Locus. *Diabetes* (2001) Vol. 50: 686-689.

87) Douglas J., Erdos M., Watanabe et al. Peroxisome Proliferator-activated receptor-γ2 Pro12Ala variant. *Diabetes* (2001) Vol. 50: 886-890.

88) Lohman T.G., Roche A.F., Mastorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: human kinetics Publishers. 1991.

89) Cole T.J., Bellizzi M.C., Flegal K.M., Dietz W.H. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* (2000) 320: 1-6.

90) Manios Y., Moschandreas J., Hatzis C., Kafatos A. Evaluation of a health and nutrition intervention in primary school children of Crete over a three-year period. *Prev Med* (1999) 2:149-59.

91) siedel J., Haegele E.O., Ziegehhorn J., Wahlefeld A. W. Reagent of the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipopytic efficiency. *Clin Chem* (1983) 29:1075-80.

92) Kostner G.M., Molinari E., Pichler P. evaluation of a new HDL2HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin chem. Acta* (1985) 148:139-47.

93) Wahlefeld A.W. Lipoproteins. In: Bergmeyer HU, ed. Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd ed., vol II. Weinheim: Verlag Chemie (1974) 187-188.

94) Farris R.P., Nicklas T.A. characterizing children's eating behaviour. In: Suskind R.M., suskind L.L., eds. Textbook of pediatric nutrition. 2nd ed. New York: Raven Press, 1993.

95) Trichopoulou A. Food composition tables and composition of Greek cooked food and dishes. Athens, Greece: School of public Health, 1992.

96) Αρχές Ιατρικής Γενετικής. Gelehrter, Collins. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 1999.

97) Ek, Urhammer, Sorensen, Andersen, Auwerx, Pedersen. Homozygosity of the Pri12Ala variant of the Peroxisome Proliferator-activated receptor -γ2 (PPARγ2): divergent modulating effects on BMI in obese and lean Caucasian. *Diabetologia* (1999) 42; 892-895.

98) Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία. Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ. .ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ –Τμήμα Βιολογίας.1998.

99) Isomala B., Almgren P., et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the Metabolic Syndrome. *Diabetes C*are (2001) vol. 24, no. 4, pp.: 683-689.

100) Kohen-Avramoglu R, Theriault A, Adeli K. Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipidemia. *Clin Biochem.* (2003) Sep;36(6):413-20.

101) Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated

receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia*. (1999), Jul;42(7): 892-5.

102) Goldbourt U., Medalie J.H. High-density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease. The Israeli ischemic heart study. *Am J Epidemiol*. (1979) 109:296-08.

103) Mori Y., Kim-Motoyama H., Katakura T., Yasuda K., Kadowaki H. Efect of the pro12Aa variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene on adiposity, fat distribution and sensitivity in Japanese men. *J Med Genet*. (2003), 40:773-80.

104) Zietz B., Barth N., Spiegel D., Schmidz G., Scholmerich J. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor 2 (PPAR2) is associated with higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol in male Caucasian type 2 diabetes patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2002),110:60-6.

105) Tai DY, Chen GJ, Tso A, Chang HY, Shei SM. E207K mutation of low-density lipoprotein receptor in familial hypercholesterolemia. *J Formos Med Assoc*. (2004) Mar;103(3):225-9.

106) Ye SQ, Kwiterovich PO Jr. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *Am J Clin Nutr*. (2000) Nov;72(5 Suppl):1275S-1284S.

107) Thamer C., Haap M., Volk A. et al. Evidence for greater oxidative substrate flexibility in male carriers of the pro12Ala polymorphism in PPARγ2. Horm Metab Res (2002), 34: 132-136.

108) Eriksson J., Lindi V., Uusitupa M., Forsen T., Laakso M. The effects of the Pro12Ala polymorphism of the PPARg-2 gene on lipid metabolism interact with body size at birth. *Clin Genet* (2003); 64:366–70.

109) Kahara T., Takamura T., et al. PPARγ Gene Polymorphism is associated with exercise-mediated changes of insulin resistance in healthy men. *Metabolism* (2003) vol. 52, no. 2, pp. 209-212.