

**Η επίδραση της απώλειας βάρους στα ενδομυϊκά λιποειδή
σε διαβητικούς και παχύσαρκους ασθενείς**

Διδακτορική Διατριβή

Κωνσταντίνος Α. Αναστασίου

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αθήνα, 2010

**Η επίδραση της απώλειας βάρους στα ενδομυϊκά λιποειδή
σε διαβητικούς και παχύσαρκους ασθενείς**

Διδακτορική Διατριβή

Κωνσταντίνος Α. Αναστασίου

Εξεταστική Επιτροπή

Σταύρος Κάβουρας, Επίκουρος Καθηγητής

Λάμπρος Συντώσης, Καθηγητής

Νικόλαος Κατσιλάμπρος, Καθηγητής

Ευχαριστίες

Η γνώση και η εμπειρία που αποκομίζει κανείς από μια διδακτορική διατριβή εξαρτώνται όχι μόνο από το βαθμό ατομικής ενεργοποίησης προς την κατεύθυνση αυτή, αλλά και από πρόσωπα και καταστάσεις, οι οποίες είτε διαμορφώνονται, είτε προσφέρονται. Θα ήθελα να ευχαριστήσω κατά πρώτο λόγο τους καθηγητές μου, γιατί με έμαθαν ή και με ανάγκασαν να σκέφτομαι, αλλά και τους γονείς μου, γιατί με άφησαν να σκέφτομαι.

Οι μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν στα πλαίσια της διατριβής αυτής ήταν αποτέλεσμα συνεργασίας του Εργαστηρίου Διατροφής & Κλινικής Διαιτολογίας με το Διαβητολογικό Κέντρο του Τζανείου Νοσοκομείου και την 1^η Καρδιοχειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός. Από το Διαβητολογικό Κέντρο θερμές ευχαριστίες θα πρέπει να αποδοθούν στον κ. Ανδρέα Μελιδώνη, ο οποίος υπήρξε ένθερμος υποστηρικτής των μελετών αυτών, όπως επίσης και στον κ. Γιάννη Λέντζα, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για τη λήψη των μυϊκών βιοψιών, και την κ. Αφροδίτη Γκόβα, η οποία ήταν υπεύθυνη για την κλινική παρακολούθηση των εθελοντών. Από το Νοσοκομείο Ευαγγελισμός ευχαριστίες θα πρέπει να δοθούν στον κ. Χρήστο Χαρίτο και στον κ. Παναγιώτη Δεδεηλία.

Στην εκτέλεση της διατριβής αυτής συνέβαλε και ένα πλήθος προπτυχιακών και μεταπτυχιακών φοιτητών του τμήματος, στους οποίους επίσης αποδίδονται ιδιαίτερες ευχαριστίες και οι οποίοι θα πρέπει να αναφερθούν ονομαστικά:

Γεωργία Γουρναροπούλου

Γιάννα Ράπτη

Μαρία Λυμπέρη

Αθανάσιος Σταματελόπουλος

Πηγή Μαντζουράτου

Κατερίνα Χρέμου

Μαρία Περπερίδη

Όλγα Χρόνη

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή	1
Παθοφυσιολογία της Ινσουλινοαντίστασης	2
Μηχανισμοί Ινσουλινοαντίστασης και η Σχέση τους με τα Ενδομυϊκά Λιποειδή	5
Συναγωνισμός ενεργειακών υποστρωμάτων	5
Οξειδωτική ικανότητα και μιτοχονδριακή λειτουργία	7
Η θεωρία της υπερχειλίσης λιπών στο λιπώδη ιστό	9
Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο	11
Ενδομυϊκά Λιποειδή και Ινσουλινοαντίσταση	13
Τριγλυκερίδια	13
Διγλυκερίδια	17
Κηραμίδια	20
Λιπαροί Εστέρες του Συνενζύμου Α	23
Ο ρόλος της δίαιτας και της άσκησης στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης	25
Στόχοι της παρούσας διατριβής	30
Μελέτες της παρούσας διατριβής	33
1^η Μελέτη	34
Εισαγωγή	34
Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες	35
Αποτελέσματα	39
Σχολισμός - Συμπεράσματα	40
Πίνακες και Γραφήματα	42
2^η Μελέτη	49
Εισαγωγή	49
Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες	50
Αποτελέσματα	55
Σχολιασμός – Συμπεράσματα	57
Πίνακες και Γραφήματα	61
3^η Μελέτη	71
Εισαγωγή	71
Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες	72
Αποτελέσματα	73
Σχολιασμός – Συμπεράσματα	75
Πίνακες και Γραφήματα	78
4^η Μελέτη	87
Εισαγωγή	87
Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες	88
Αποτελέσματα	90
Σχολιασμός – Συμπεράσματα	91
Πίνακες και Γραφήματα	93
Γενικά Συμπεράσματα	100
Παράρτημα 1: Συμφωνητικά Εθελοντικής Συμμετοχής	102

<i>Παράρτημα 2: Δημοσιεύσεις</i>	108
<i>Βιβλιογραφία</i>	119

Εισαγωγή

Η συχνότητα εμφάνισης μεταβολικών διαταραχών έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια, με αποκορύφωμα το γεγονός ότι τόσο ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, όσο και η παχυσαρκία έχουν πλέον πάρει διαστάσεις επιδημικού φαινομένου. Με βάση εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ο συνολικός αριθμός ανθρώπων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II κατά το έτος 2000 ήταν 171 εκατομμύρια, ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να φτάσει στα 366 εκατομμύρια έως το έτος 2030 (1). Παράλληλα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας επίσης αυξάνει με δραματικούς ρυθμούς. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ο επιπολασμός της παχυσαρκίας κατά το χρονικό διάστημα 2007-2008 ήταν 33.8% (2), συγκριτικά με το 30.5% και 22.9% κατά τα χρονικά διαστήματα 1999-2000 και 1988-1994 αντίστοιχα (3).

Η βασική μεταβολική διαταραχή τόσο του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, όσο και της παχυσαρκίας είναι η αντίσταση των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης. Σε πληθυσμούς με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη, η ινσουλινοαντίσταση έχει χαρακτηριστεί ως μια πρόδρομη κατάσταση του σακχαρώδη διαβήτη (4). Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η ινσουλινοαντίσταση που σχετίζεται με την παχυσαρκία δεν εξελίσσεται σε τυπική μορφή σακχαρώδη διαβήτη, ωστόσο η κατάσταση αυτή κάθε αυτή έχει αναγνωριστεί ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας νοσηρότητας, ιδίως για καρδιαγγειακές ασθένειες (5, 6).

Η μείωση του σωματικού βάρους και η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας έχουν αναγνωριστεί ως δύο παράγοντες – κλειδιά για τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Εκτεταμένες κλινικές μελέτες επιδημιολογικού χαρακτήρα, οι οποίες περιλάμβαναν παρεμβάσεις για τη μείωση του σωματικού βάρους, όπως επίσης και έναν εφικτό στόχο για την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, σε άτομα με δυσανοχή στη γλυκόζη έχουν δείξει βελτίωση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, αλλά και μείωση της συχνότητας εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη κατά 46-58% μετά από 3-6 χρόνια, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (7-10).

Με δεδομένη την κλινική σημαντικότητα της μείωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη που παρατηρείται στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και στην παχυσαρκία, ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει αναλωθεί στη διερεύνηση των βιοχημικών και μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την ινσουλινοαντίσταση, όπως επίσης και των μεταβολικών διαταραχών που τη

συνοδεύουν. Μελέτες σε παχύσαρκα άτομα έχουν δείξει ξεκάθαρα ότι η ινσουλινοαντίσταση είναι αποτέλεσμα μιας γενικευμένης διαταραχής στο μεταβολισμό των κύριων ενεργειακών υποστρωμάτων (υδατανθράκων και λιπών) και όχι μόνο των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα, τα παχύσαρκα άτομα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα οξείδωσης γλυκόζης σε σχέση με την οξείδωση των λιπών σε κατάσταση νηστείας, ενώ σε καταστάσεις υπερινσουλιναιμίας τα άτομα αυτά παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα αύξησης της οξείδωσης της γλυκόζης και μείωσης της οξείδωσης των λιπών, κάτι που φυσιολογικά παρατηρείται σε άτομα φυσιολογικού βάρους (11). Οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπών σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης αποτέλεσαν αντικείμενο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος, με έμφαση στη συσσώρευση συγκεκριμένων τάξεων λιποειδών στο μυϊκό ιστό, ο οποίος είναι ο κύριος ιστός που παρουσιάζει ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης.

Στη συνέχεια του κειμένου αυτού παρουσιάζεται συνοπτικά η παθοφυσιολογία της ινσουλινοαντίστασης και περισσότερο εκτεταμένα ο ρόλος συγκεκριμένων τάξεων ενδομυϊκών λιποειδών στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης και οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την συσσώρευση των λιποειδών αυτών στο μυϊκό ιστό. Επίσης ανασκοπούνται οι υπάρχουσες μελέτες οι οποίες έχουν διερευνήσει το ρόλο της μείωσης του σωματικού βάρους και της άσκησης στα ενδομυϊκά λιποειδή σε παχύσαρκα άτομα και άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και ο ρόλος της διαιτητικής πρόσληψης λιπών στη συσσώρευση λιποειδών στο μυϊκό ιστό. Τέλος παρουσιάζονται τα υπάρχοντα ερευνητικά κενά και οι στόχοι της παρούσας διατριβής.

Παθοφυσιολογία της Ινσουλινοαντίστασης

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ινσουλίνη δεσμεύεται στον υποδοχέα της, με αποτέλεσμα την έναρξη μιας σειράς ενδοκυτταρικών δράσεων, που τελικό αποτέλεσμα έχουν την πρόσληψη γλυκόζης από τους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς. Ο μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έχει σε μεγάλο βαθμό αποσαφηνιστεί και ανασκοπηθεί (12, 13). Συνοπτικά, η δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της οδηγεί σε μεταβολή της δομής του υποδοχέα, η οποία με τη σειρά της προκαλεί ταχύτατη αυτο-φωσφορυλίωση του υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης και την ενεργοποίησή του. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στη συσχέτιση με αυτόν διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών (υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης), οι οποίες μόλις φωσφορυλιωθούν προσελκύουν μοριακά σήματα, τα οποία προκαλούν μια σειρά αντιδράσεων, η οποία έχει ως τελική κατάληξη την έκφραση της λειτουργίας της ινσουλίνης, η οποία ανάλογα με τον ιστό-στόχο μπορεί να περιλαμβάνει την

κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης, τη σύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων και γλυκογόνου, τη μίτωση ή και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Η μειωμένη ικανότητα των περιφερικών ιστών να ανταποκρίνονται επαρκώς στην ινσουλίνη συνιστά τη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη ή ινσουλινοαντίσταση. Η ινσουλινοαντίσταση αποτελεί χαρακτηριστικό της μεγαλύτερης πλειοψηφίας των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (14). Μια προοπτική μελέτη σε απόγονους διαβητικών ατόμων, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν στο μέλλον σακχαρώδη διαβήτη, έχει δείξει ότι οι εξεταζόμενοι που ανέπτυξαν σακχαρώδη διαβήτη μετά από 13 χρόνια παρακολούθησης είχαν κατά την έναρξη της παρακολούθησης μικρότερο ρυθμό απομάκρυνσης μιας ποσότητας γλυκόζης η οποία χορηγήθηκε ενδοφλεβίως. Επίσης τα άτομα αυτά παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης, τόσο κατά τη χορήγηση γλυκόζης, όσο και κατά τη νηστεία (15). Κατά συνέπεια, η ινσουλινοαντίσταση προηγείται της κλινικής εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη και μάλιστα για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 10 ετών. Στην προ-διαβητική φάση, καθώς το πάγκρεας παραμένει λειτουργικό, εκκρίνει μεγάλες ποσότητες ινσουλίνης, προκειμένου να μετριαστεί η μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη στους περιφερικούς ιστούς. Με τον τρόπο αυτό, η ανοχή στη γλυκόζη παραμένει φυσιολογική, παρά την παρουσία ινσουλινοαντίστασης. Όταν το πάγκρεας χάσει την ικανότητα να εκκρίνει πλεονάζουσες ποσότητες ινσουλίνης εμφανίζεται διαταραχή στην ανοχή γλυκόζης και σακχαρώδης διαβήτης (16). Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται τόσο από αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, όσο και από μειωμένη ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει επαρκείς ποσότητες ινσουλίνης (14).

Η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται επίσης από την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης. Μια μελέτη σε άντρες της φυλής των Ινδιάνων Pima (οι οποίοι παρουσιάζουν γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση διαβήτη) και σε υγιείς Καυκάσιους έχει δείξει ότι υπάρχει μια σημαντική μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με την αύξηση του ποσοστού σωματικού λίπους μέχρι το 28-30%. Περαιτέρω αύξηση του σωματικού λίπους δεν είχε σημαντικές, περαιτέρω επιδράσεις στην ευαισθησία στην ινσουλίνη (17). Θετική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό παχυσαρκίας και στην ινσουλινοαντίσταση έχει παρατηρηθεί ακόμη και σε διαβητικά άτομα (18), κάτι που υποδηλώνει ότι η παχυσαρκία ενδεχομένως έχει επιπρόσθετες αρνητικές επιδράσεις στην ήδη βεβαρημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη στο σακχαρώδη διαβήτη. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης και η κατανομή του σωματικού λίπους στο σώμα. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών, σε επιδημιολογικό και κλινικό επίπεδο, όπως επίσης και μελέτες παρέμβασης για την

απώλεια βάρους έχουν δείξει ότι στα παχύσαρκα άτομα το σπλαχνικό λίπος αποτελεί έναν ισχυρό προβλεπτικό παράγοντα της ινσουλινοαντίστασης, κάτι που δεν παρατηρείται για το υποδόριο λίπος (19). Είναι γνωστό ότι το υποδόριο λίπος παρουσιάζει χαμηλότερη λιπολυτική δραστηριότητα σε σύγκριση με το σπλαχνικό λίπος, κάτι που οφείλεται στην αυξημένη ενεργότητα των λιπολυτικών β_1 και β_2 αδρενεργικών υποδοχέων και τη μειωμένη ενεργότητα των αντι-λιπολυτικών α_2 αδρενεργικών υποδοχέων και των υποδοχέων ινσουλίνης στο σπλαχνικό λίπος (20). Η αυξημένη λιπολυτική ικανότητα του σπλαχνικού λίπους παρέχει περισσότερα λιπαρά οξέα στην πυλαία κυκλοφορία, αυξάνοντας την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και την έκκριση λιπιδίων στο αίμα με τη μορφή λιποπρωτεϊνών.

Αν και όλες οι περιπτώσεις ινσουλινοαντίστασης που σχετίζονται με την παχυσαρκία δεν εξελίσσονται σε τυπική μορφή διαβήτη, ωστόσο η υπεργλυκαιμία και η υπερινσουλιναιμία αποτελούν από μόνες τους σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Προοπτικές, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι προβλεπτικά της συχνότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (21, 22). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η υπεργλυκαιμία και η υπερινσουλιναιμία επηρεάζουν το καρδιαγγειακό σύστημα είναι πολλοί και η αναλυτική παρουσίασή τους είναι εκτός των στόχων του κειμένου αυτού. Έχει βρεθεί ότι η υπερινσουλιναιμία σχετίζεται με την υπέρταση, μέσω της αύξησης της ενεργότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, η οποία προκαλεί αγγειοσυστολή, αύξηση της καρδιακής παροχής και επαναρρόφηση νατρίου από τα νεφρικά σωληνάκια (5). Επίσης η ικανότητα της ινσουλίνης να προκαλεί αγγειοδιαστολή είναι μειωμένη σε παχύσαρκα άτομα, με ή χωρίς διαβήτη, κάτι που υπονοεί κάποιου βαθμού διαταραχή στη λειτουργία του ενδοθηλίου (6). Σε απομονωμένα ενδοθηλιακά κύτταρα η παρουσία υψηλών ποσοτήτων γλυκόζης μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (23). Η υπερινσουλιναιμία και η υπεργλυκαιμία αυξάνουν επίσης την έκφραση του αναστολέα I του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, ο οποίος συνδέεται με τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την ινωδολυτική ικανότητα του οργανισμού και την απομάκρυνση των θρόμβων (24, 25). Τέλος, η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε απόπτωση των καρδιακών μυϊκών κυττάρων σε διαβητικά πειραματόζωα ή σε απομονωμένα καρδιακά κύτταρα (26), γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η ινσουλινοαντίσταση μπορεί να επηρεάζει και τη λειτουργικότητα των καρδιακών μυϊκών κυττάρων.

Μηχανισμοί Ινσουλिनoαντίστασης και η Σχέση τους με τα Ενδομυϊκά Λιποειδή

Οι βιοχημικοί, μεταβολικοί και μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων εμφανίζεται το φαινόμενο της ινσουλινoαντίστασης, τόσο στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, όσο και στην παχυσαρκία, έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Καθώς οι σκελετικοί μύες είναι ο κύριος ιστός ο οποίος είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση της γλυκόζης του αίματος (27), οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών ινσουλινoαντίστασης στο συγκεκριμένο τύπο ιστού. Στη συνέχεια επισκοπούνται οι υπάρχουσες μελέτες στο θέμα αυτό, με έμφαση στη διαταραχή του μεταβολισμού τόσο των υδατανθράκων, όσο και των λιποειδών, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση ενδομυϊκών λιποειδών, τα οποία έχουν σχετιστεί με την ινσουλινoαντίσταση. Η σχέση συγκεκριμένων τάξεων λιποειδών με την ινσουλινoαντίσταση παρουσιάζεται στην επόμενη ενότητα.

Συναγωνισμός ενεργειακών υποστρωμάτων

Οι πρώτες μελέτες οι οποίες διερεύνησαν το φαινόμενο της ινσουλινoαντίστασης εξήγησαν το φαινόμενο αυτό σαν αποτέλεσμα του συναγωνισμού των ενεργειακών υποστρωμάτων. Το 1963 οι Randle και συνεργάτες παρουσίασαν ένα θεωρητικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο η αυξημένη διαθεσιμότητα λιπαρών οξέων θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της χρησιμοποίησης της εξωγενούς γλυκόζης και κατ' επέκταση να οδηγήσει στην εμφάνιση ινσουλινoαντίστασης (28). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το οποίο στηρίχτηκε σε *in vitro* πειράματα στο διάφραγμα και στο μυοκάρδιο πειραματόζων, η αυξημένη διαθεσιμότητα λιπαρών οξέων οδηγεί σε αύξηση της β-οξειδωσης και επομένως σε αύξηση της μεταφοράς τους στα μιτοχόνδρια και αύξηση στην οξειδωσή τους. Αυτό με τη σειρά του θα οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων ακετυλο-συνενζύμου Α και κιτρικού οξέος. Η αύξηση των επιπέδων ακετυλο-συνενζύμου Α θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, η οποία φωσφορυλιώνει την πυροσταφυλική αφυδρογονάση προς τη λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου. Επιπρόσθετα, το κιτρικό θα προκαλέσει αλλοστερική αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης. Τόσο η αναστολή της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, όσο και της φωσφοφρουκτοκινάσης θα οδηγήσει σε μείωση της γλυκολυτικής πορείας και συσσώρευση της 6-φωσφογλυκόζης, η οποία με τη σειρά της θα οδηγήσει σε αναστολή της εξοκινάσης και άρα μείωση της ροής γλυκόζης από το εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Αν και το παραπάνω μοντέλο, γνωστό ως ο κύκλος γλυκόζης – λιπαρών οξέων, αποτέλεσε ορόσημο για την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών ινσουλινoαντίστασης, ωστόσο παρουσιάζει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, προϋποθέτει ότι το περιοριστικό

σημείο για την είσοδο της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου είναι η φωσφορυλίωσή της και όχι η είσοδός της δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Ωστόσο, πολύ μεταγενέστερες μελέτες, χρησιμοποιώντας την τεχνική της πυρηνικής μαγνητικής αντήχησης, έχουν δείξει ότι το περιοριστικό βήμα στην πρόσληψη γλυκόζης από τα μυϊκά κύτταρα σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας – υπερινσουλιναϊμίας σε διαβητικά άτομα είναι η επαγόμενη από την ινσουλίνη μεταφορά της γλυκόζης δια μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και όχι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξοκινάση (29). Ένας άλλος περιορισμός του κύκλου του Randle είναι ότι προϋποθέτει ότι σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης η ροή των λιπαρών οξέων προς τα μιτοχόνδρια και η συνακόλουθη οξειδωσή τους είναι αυξημένη. Ωστόσο, μελέτες οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνική της αρτηριο-φλεβικής διαφοράς ενεργειακών υποστρωμάτων ή και μεθόδους σταθερών ισοτόπων έχουν καταλήξει σε αντίθετα αποτελέσματα. Σε παχύσαρκα άτομα, η πρόσληψη λιπαρών οξέων από τους σκελετικούς μύες σε κατάσταση νηστείας δεν έχει βρεθεί να είναι διαφορετική σε σχέση με λιπόσαρκα άτομα, ενώ αντίθετα η οξειδωση των προσλαμβανόμενων λιπαρών οξέων ήταν μικρότερη στα παχύσαρκα άτομα, κάτι που υποδηλώνει αποθήκευση μέρους των προσλαμβανόμενων λιπαρών οξέων (11). Σε διαβητικά άτομα έχει βρεθεί ότι τόσο η πρόσληψη, όσο και η οξειδωση των λιπαρών οξέων του πλάσματος είναι χαμηλότερη σε κατάσταση νηστείας (11, 30-32), όσο και κατά τη διάρκεια άσκησης χαμηλής έντασης (31) ή κατά τη διέγερση με αδρενεργικούς αγωνιστές (οι οποίοι προκαλούν αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος) (30). Στη μεταγευματική φάση, αν και η πρόσληψη λιπαρών οξέων είναι υψηλότερη σε διαβητικά άτομα, ωστόσο η οξειδωσή τους είναι χαμηλότερη (32), κάτι που υποδηλώνει ότι υπάρχει αύξηση της βιοσύνθεσης αποθηκευτικών μορφών λιποειδών ενδοκυτταρικά. Σε καταστάσεις υπερινσουλιναϊμίας – ευγλυκαιμίας σε παχύσαρκα άτομα η αδυναμία επαρκούς αύξησης της πρόσληψης και οξειδωσης της εξωγενούς γλυκόζης διατηρεί την οξειδωση των λιπών σε υψηλά επίπεδα, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην πρόσληψη λιπαρών οξέων από τη συστηματική κυκλοφορία, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (11). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν ότι η ινσουλινοαντίσταση δεν θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης οξειδωσης των λιπών, έτσι όπως προέβλεπε ο κύκλος γλυκόζης - λιπαρών οξέων.

Το 1996 οι Sidossis και συνεργάτες πρότειναν μια νέα θεωρία για την εξήγηση της ινσουλινοαντίστασης, η οποία επίσης στηρίζονταν στην ιδέα του συναγωνισμού των ενεργειακών υποστρωμάτων και η οποία ουσιαστικά πρότεινε την αναστροφή του κύκλου γλυκόζης – λιπαρών οξέων (33). Υπό καταστάσεις υπερινσουλιναϊμίας – ευγλυκαιμίας και διατηρώντας τα επίπεδα λιπαρών οξέων του πλάσματος σταθερά με μεταβλητή έγχυση λιπών βρήκαν ότι η αύξηση της οξειδωσης της γλυκόζης οδήγησε σε μείωση της συνολικής οξειδωσης

των λιπών και των λιπαρών οξέων του πλάσματος. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η μείωση της οξείδωσης των λιπών υπό αυτές τις συνθήκες παρατηρείται μόνο για τα λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας, τα οποία απαιτούν το ένζυμο ακυλοτρανσφεράση I της καρνιτίνης για την είσοδο τους στα μιτοχόνδρια, και όχι για τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας, τα οποία δεν απαιτούν τη δράση του ενζύμου αυτού. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των εστέρων της καρνιτίνης με λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας (34). Κατά συνέπεια, η μείωση της οξείδωσης των λιπών σε καταστάσεις υπερινσουλιναϊμίας – υπεργλυκαιμίας θεωρήθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της αδυναμίας των λιπαρών οξέων να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο, όπου επιτελείται η β-οξείδωση. Η θεωρία αυτή είναι σε συμφωνία με τις μελέτες σε παχύσαρκα και διαβητικά άτομα οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω και οι οποίες έχουν δείξει ότι σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης η οξείδωση των λιπών είναι μειωμένη. Επίσης αποτελεί το πρώτο θεωρητικό μοντέλο το οποίο έδωσε μια πιθανή εξήγηση για τη συσσώρευση λιποειδών ενδοκυτταρικά σε καταστάσεις μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Θεωρητικά η αδυναμία εισόδου των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της de novo βιοσύνθεσης διαφόρων τάξεων λιποειδών.

Οξειδωτική ικανότητα και μιτοχονδριακή λειτουργία

Η μείωση της οξειδωτικής ικανότητας του μυϊκού ιστού σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες οι οποίες έχουν μετρήσει την ενεργότητα τόσο οξειδωτικών, όσο και γλυκολυτικών ενζύμων σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Τα παχύσαρκα και τα διαβητικά άτομα παρουσιάζουν μειωμένη ενεργότητα κιτρικής συνθάσης, οξειδάσης του κυτοχρώματος c, αφυδρογονάσης του β-υδροξυακυλο-συνένζυμο A (30, 35), ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (36) και ακυλοτρανσφεράσης I της καρνιτίνης (11, 35), ένζυμα τα οποία αποτελούν δείκτες της οξειδωτικής ικανότητας του μυός. Αντίθετα, η γλυκολυτική ικανότητα των μυών των παχύσαρκων ατόμων είναι αυξημένη, έτσι όπως αυτή αντανάκλαται από την αυξημένη ενεργότητα ενζύμων της γλυκολυτικής πορείας και συγκεκριμένα της φωσφοφρουκτοκινάσης και της αφυδρογονάσης της φωσφο-γλυκεριναλδεϋδης (35, 36). Η μείωση της οξειδωτικής ικανότητας και η παράλληλη αύξηση της γλυκολυτικής ικανότητας έχει φανεί ότι σχετίζεται με την ινσουλινοαντίσταση. Σε παχύσαρκες γυναίκες η ενεργότητα της εξοκινάσης, της κιτρικής συνθάσης και του λόγου της ενεργότητας φωσφοφρουκτοκινάσης προς κιτρική συνθάση παρουσίαζε συσχέτιση με την ευαισθησία στην ινσουλίνη της τάξης του 0.70-0.79 (37).

Αν και οι παραπάνω μελέτες σε ότι αφορά την ενεργότητα ενζύμων του ενεργειακού μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς παρέχουν στοιχεία για τα πιθανά σημεία του μεταβολισμού στα οποία παρατηρούνται διαταραχές οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση της οξειδωτικής ικανότητας, ωστόσο δεν παρέχουν απαντήσεις για τα πρωτογενή αίτια των μεταβολικών διαταραχών σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Κάποιες απαντήσεις στο θέμα αυτό δόθηκαν από δύο πρόσφατες μελέτες, οι οποίες διερεύνησαν την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων του ενεργειακού μεταβολισμού με την τεχνική των μικρο-στηλών DNA (38, 39). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II υπάρχει μια γενικευμένη μείωση της έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού οξειδωτικών γονιδίων τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο του ενεργοποιητή PGC-1 των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων PPAR-γ και NRF-1. Σε μια από τις μελέτες αυτές η μείωση της έκφρασης των γονιδίων αυτών σχετίστηκε με τη συνολική αεροβική ικανότητα του σώματος (39). Η έκφραση του NRF-1 βρέθηκε ότι είναι μειωμένη μόνο στα διαβητικά άτομα, ενώ η έκφραση του PGC-1 βρέθηκε μειωμένη τόσο στα διαβητικά, όσο και στα άτομα με ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη, τα οποία επίσης παρουσιάζουν υπερινσουλιναμία και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης υπό τη διέγερση με ινσουλίνη (38). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ένα νέο μοντέλο για την εξήγηση του φαινομένου της ινσουλινοαντίστασης μπορεί να προκύψει, σύμφωνα με το οποίο η μείωση της έκφρασης του PGC-1 οδηγεί σε μείωση της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων PPAR-γ και NRF-1, η οποία με τη σειρά της προκαλεί μείωση της γονιδιακής έκφρασης οξειδωτικών ενζύμων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση του ρυθμού οξείδωσης των λιπών, η συσσώρευση λιποειδών ενδοκυτταρικά και τελικά η μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Αν και η μείωση της έκφρασης του PGC-1 που παρατηρείται στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II μπορεί να οφείλεται εν μέρει σε γενετικούς παράγοντες, καθώς έχει βρεθεί ότι ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός του γονιδίου παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα διαβητικά άτομα (40), ωστόσο και παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως η αύξηση του σωματικού βάρους και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας μπορούν επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι μειωμένη στα παχύσαρκα άτομα (41), ενώ η άσκηση προκαλεί αύξηση της έκφρασης του PGC-1 (42).

Πέρα από το ρόλο του PGC-1 στη ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων του οξειδωτικού μεταβολισμού, *in vitro* πειράματα σε μυϊκά κύτταρα έχουν δείξει ότι ο PGC-1 είναι και ένας σημαντικός παράγοντας για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (43), όπου επιτελείται κατά βάση ο οξειδωτικός μεταβολισμός. Κατά συνέπεια, η μείωση της έκφρασης του παράγοντα αυτού θα μπορούσε θεωρητικά να οδηγήσει σε μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μέσω της μείωσης του αριθμού των μιτοχονδρίων. Η ιδέα ότι μια πιθανή μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων ή

της λειτουργικότητάς τους μπορεί να αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα της ινσουλινοαντίστασης υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες. Στους απόγονους διαβητικών ατόμων έχει παρατηρηθεί μείωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και μείωση της μιτοχονδριακής πυκνότητας στους σκελετικούς μύες κατά 38% σε σχέση με άτομα χωρίς ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη (44, 45). Η μείωση αυτή συνοδεύονταν από μια παράλληλη αύξηση των ενδομυϊκών λιποειδών κατά 60%. Όμοια, σε διαβητικά και παχύσαρκα άτομα έχει βρεθεί ότι η συνολική μιτοχονδριακή πυκνότητα είναι κατά 35% μικρότερη και ο όγκος των μιτοχονδρίων επίσης μικρότερος σε σύγκριση με λιπόσαρκα άτομα (46). Η σχέση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων με την ευαισθησία στην ινσουλίνη ενισχύεται επίσης από το ότι πολλές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA οδηγούν στην εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων όμοιων με αυτά του σακχαρώδη διαβήτη (47).

Η θεωρία της υπερχείλισης λιπών στο λιπώδη ιστό

Τα τελευταία χρόνια ένα μεγάλο μέρος της έρευνας στον τομέα της ινσουλινοαντίστασης και του σακχαρώδη διαβήτη έχει εστιαστεί στην κατανομή του σωματικού λίπους στο σύνολο του οργανισμού και το κατά πόσο η έκτοπη αποθήκευση λίπους σε ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μειωμένης ικανότητας των λιποκυττάρων να απομακρύνουν από τη συστηματική κυκλοφορία τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων.

Χαρακτηριστική περίπτωση της σπουδαιότητας του λιπώδους ιστού στην ευαισθησία στην ινσουλίνη αποτελεί ένα είδος γενετικά τροποποιημένων ποντικών, τα οποία έχουν πολύ μικρές ποσότητες τόσο λευκού, όσο και φαιού λιπώδους ιστού (48). Τα πειραματόζωα αυτά εμφανίζουν υπερινσουλιναίμία ήδη από την πρώτη εβδομάδα της ζωής τους, όπως επίσης και υπεργλυκαιμία και σακχαρώδη διαβήτη κατά την τέταρτη εβδομάδα της ζωής τους. Η διερεύνηση των μηχανισμών ινσουλινοαντίστασης στα πειραματόζωα αυτά έχει δείξει διαταραχές στο μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης, όπως επίσης και αύξηση των επιπέδων ενδομυϊκών και ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι η μεταμόσχευση λιπώδους ιστού στα πειραματόζωα αυτά οδηγεί σε βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης και σε μείωση των ενδομυϊκών και ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων σε φυσιολογικά επίπεδα (49). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ινσουλινοαντίσταση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα διαταραχών στην κατανομή του λίπους ανάμεσα στο λιπώδη ιστό και στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ.

Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα που ενισχύουν την υπόθεση αυτή στον άνθρωπο. Σε αντιστοιχία με τα λιποδυστροφικά ποντίκια, η λιποδυστροφία στον άνθρωπο έχει

επίσης σχετίζεται με μια σημαντική μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και υπερτριγλυκεριδαιμία (50). Επίσης, μια μελέτη στη φυλή των Ινδιάνων Pima, η οποία αποτελεί έναν πληθυσμό με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη, έχει δείξει ότι σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογική ανοχή γλυκόζης, τα διαβητικά άτομα παρουσίαζαν αυξημένο μέγεθος λιποκυττάρων κατά 19%, ενώ τα άτομα με δυσανοχή στη γλυκόζη κατά 11% (51). Η προοπτική παρακολούθηση του πληθυσμού αυτού στην ίδια μελέτη έδειξε ότι το μέγεθος των λιποκυττάρων και όχι το συνολικό σωματικό λίπος ήταν ένας σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας της εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη. Είναι πιθανό, σε καταστάσεις ινσουλिनoαντίστασης το αυξημένο μέγεθος των λιποκυττάρων να κάνει αδύνατη την περαιτέρω αποθήκευση λιπαρών οξέων, κάτι που ενδεχομένως να οδηγεί σε έκτοπη αποθήκευση στο μυϊκό ιστό και στο ήπαρ.

Αποδείξεις για την ορθότητα αυτής της υπόθεσης παρέχονται από μελέτες οι οποίες έχουν εξετάσει τη δράση των φαρμάκων της τάξης των θειαζολιδινεδιονών. Τα φάρμακα αυτά συνιστούν μια σειρά υπογλυκαιμικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν ως αγωνιστές του πυρηνικού υποδοχέα PPAR- γ (52). Δύο ισόμορφα του υποδοχέα αυτού έχουν αναγνωριστεί (γ_1 και γ_2), εκ των οποίων ο γ_2 εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό και ο κύριος ρόλος του είναι η επαγωγή της λιποκυτταρογένεσης, μέσω της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων (52). Η χορήγηση των ουσιών αυτών σε παχύσαρκα ποντίκια οδήγησε σε βελτίωση της υπερινσουλιναιμίας, της υπεργλυκαιμίας και της υπερτριγλυκεριδαιμίας (53). Σε ιστοχημικό επίπεδο παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους των κυττάρων του λιπώδους ιστού και επίσης μείωση της παρουσίας μεγάλων λιποκυττάρων, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί αύξηση της συνολικής μάζας του λιπώδους ιστού. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση των αποπτωτικών πυρήνων, κάτι που υποδηλώνει ότι η ουσία που χορηγήθηκε οδήγησε στη δημιουργία νέων κυττάρων τα οποία είχαν μεγαλύτερη ικανότητα απομάκρυνσης των λιπιδίων από τη συστηματική κυκλοφορία.

Σε μελέτες στον άνθρωπο, οι παραπάνω παράγοντες έχουν φανεί να οδηγούν σε σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σε διαβητικά άτομα, κάτι που, παραδόξως, συνοδεύεται από μια αύξηση του σωματικού βάρους και επίσης μια αύξηση στο συνολικό ποσοστό σωματικού λίπους (54-56). Επιπρόσθετα, η κατανομή του λίπους επίσης επηρεάζεται, με μείωση του σπλαχνικού λίπους και παράλληλη αύξηση του υποδόριου λίπους. Οι Rassouli και συνεργάτες έχουν επίσης διερευνήσει την επίδραση της χορήγησης των ουσιών αυτών στα ενδομυϊκά λιποειδή σε άτομα με δυσανοχή στη γλυκόζη. Μετά από 10 εβδομάδες θεραπείας, τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών μειώθηκαν κατά 34%, με μια παράλληλη αύξηση της

ευαισθησίας στην ινσουλίνη κατά 65% και επίσης μια αύξηση στο σωματικό βάρος κατά 2.6 kg (57).

Συμπερασματικά, η μειωμένη ικανότητα του λιπώδους ιστού να αποθηκεύει τα λιπίδια που κυκλοφορούν στο αίμα, λόγω αδυναμίας περαιτέρω αύξησης του όγκου των λιποκυττάρων ή λόγω αδυναμίας δημιουργίας νέων λιποκυττάρων μπορεί να αποτελεί έναν αιτιολογικό παράγοντα για τη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, πιθανότατα μέσω αύξησης της αποθήκευσης των λιπιδίων στους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς και ιδιαίτερα στους σκελετικούς μύες.

Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο

Πέρα από τη λειτουργία του λιπώδους ιστού ως σημείο αποθήκευσης της πλεονάζουσας ενέργειας με τη μορφή λιπιδίων, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ιστός αυτός παρουσιάζει και ενδοκρινική δράση. Έχει βρεθεί ότι ο λιπώδης ιστός εκκρίνει έναν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών (λιποκυτταροκίνες), οι οποίες ασκούν θετική ή αρνητική δράση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη στο μυϊκό ιστό και στο ήπαρ (58). Στη συνέχεια επισκοπείται η δράση τριών από τις ουσίες αυτές, της λεπτίνης, της λιπονεκτίνης και της ρεζιστίνης, ως χαρακτηριστικά παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο οι κυτταροκίνες αυτές μπορούν να επηρεάζουν το μεταβολισμό άλλων ιστών, με έμφαση στο μεταβολισμό των λιποειδών στους σκελετικούς ιστούς, ιδιαίτερα σε καταστάσεις ινσουλिनoαντίστασης.

Η λεπτίνη είναι η πλέον μελετημένη από τις κυτταροκίνες που έχουν ως τώρα αναγνωριστεί. Ήδη από το 1994 έγινε γνωστό ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο ob (το οποίο κωδικοποιεί τη λεπτίνη) στα ποντίκια προκαλεί παχυσαρκία και σακχαρώδη διαβήτη, ενώ η εξωγενής χορήγηση του προϊόντος του γονιδίου αυτού μειώνει, μεταξύ άλλων, τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης του πλάσματος (59). Όμοια, σε άτομα που πάσχουν από λιποδυστροφία η χορήγηση λεπτίνης επίσης μειώνει την ινσουλινoαντίσταση που παρατηρείται στην ασθένεια αυτή (50). Πολλές περιφερικές δράσεις της λεπτίνης έχουν αναγνωριστεί, οι οποίες μπορούν να βελτιώσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και οι οποίες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού κινασών οι οποίες αποτελούν μέρους του μηχανισμού δράσης της ινσουλίνης σε κυτταρικό επίπεδο (60). Πέρα από τη δράση αυτή, πειράματα σε απομονωμένα κύτταρα ή μύες έχουν δείξει ότι η λεπτίνη αυξάνει την οξειδωση τόσο των εξωγενώς χορηγούμενων λιπαρών οξέων, όσο και των ενδογενών λιπών, ενώ παράλληλα μειώνει την αποθήκευση των εξωγενών λιπαρών οξέων ως ενδομυϊκά τριγλυκερίδια (61, 62). Η χρόνια χορήγηση λεπτίνης σε

πειραματόζωα έχει βρεθεί ότι αυξάνει την έκφραση και τη φωσφορυλίωση της AMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία απενεργοποιεί (μέσω φωσφορυλίωσης) το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου Α, το οποίο μετατρέπει το ακετυλο-συνένζυμο Α σε μηλονυλο-συνένζυμο Α (63). Το τελευταίο αποτελεί αρνητικό αλλοστερικό τροποποιητή της ακυλοτρανσφεράσης Ι της καρνιτίνης (64). Κατά συνέπεια, η λεπτίνη μπορεί να επηρεάζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη μέσω της αύξησης της οξείδωσης των λιπών, μειώνοντας παράλληλα τα αποθηκευμένα ενδομυϊκά λιποειδή. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα παχύσαρκα άτομα, τα οποία χαρακτηρίζονται από μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης και τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι ιδιαίτερα αυξημένα (65). Ωστόσο, *in vitro* πειράματα σε μυϊκά κύτταρα παχύσαρκων και λιπόσαρκων ατόμων έχουν δείξει ότι τα κύτταρα των παχύσαρκων ατόμων παρουσιάζουν κάποιου είδους αντίσταση στη δράση της λεπτίνης (62), κάτι που ενδεχομένως εξηγεί και την έλλειψη αποτελεσματικότητας χρήσης της λεπτίνης ως θεραπευτικού παράγοντα σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης στον άνθρωπο (66).

Η λιπονεκτίνη είναι μια άλλη κυτταροκίνη η οποία εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό και η οποία επίσης σχετίζεται θετικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Προοπτικές μελέτες στους Ινδιάνους της φυλής Pima (67) και σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό (68) έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα λιπονεκτίνης σχετίζονταν με μειωμένο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη. Επιπρόσθετα, η μείωση του σωματικού βάρους μέσω υποθερμιδικής διαίτας σε παχύσαρκα άτομα (69) και η χορήγηση θειαζολιδινεδιονών σε παχύσαρκα, λιπόσαρκα ή διαβητικά άτομα (70) έχει φανεί να μειώνει τα επίπεδα λιπονεκτίνης, με μια παράλληλη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης. *In vitro* πειράματα σε μύες πειραματόζωων έχουν δείξει ότι η λιπονεκτίνη μειώνει τα επίπεδα μηλονυλο-συνενζύμου Α, με μια παράλληλη μείωση της ενεργότητας της καρβοξυλάσης του ακετυλο-συνενζύμου Α και ενεργοποίηση της AMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (71). Κατά συνέπεια, η λιπονεκτίνη μπορεί να βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη μέσω αύξησης της οξείδωσης των λιπών στο μυϊκό ιστό και παράλληλης μείωσης των ενδομυϊκών λιποειδών, όπως ακριβώς και η λεπτίνη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μια μελέτη των Yamauchi και συνεργατών, στην οποία η χορήγηση λιπονεκτίνης σε λιποατροφικά πειραματόζωα οδήγησε σε μείωση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων του πλάσματος (72).

Σε αντίθεση με τη λεπτίνη και τη λιπονεκτίνη, η ρεζιστίνη είναι μία λιποκυτταροκίνη η οποία έχει σχετιστεί αρνητικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Σε πειραματόζωα, η χορήγηση ρεζιστίνης προκαλεί ινσουλινοαντίσταση και δυσανοχή στη γλυκόζη, ενώ η παχυσαρκία (μέσω

υπερθερμιδικής δίαιτας) προκαλεί αύξηση των επιπέδων ρεζιστίνης, η οποία μπορεί να περιοριστεί με τη χορήγηση αντισωμάτων κατά της ρεζιστίνης (73). Η υπερ-έκφραση της ρεζιστίνης, μέσω γενετικής τροποποίησης, οδηγεί επίσης σε ινσουλινοαντίσταση, με παράλληλη μείωση της ενεργότητας της AMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (74). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η υπερ-έκφραση της ρεζιστίνης οδηγεί σε αύξηση των τριγλυκεριδίων στους σκελετικούς μύες (75). Κατά συνέπεια, η ρεζιστίνη μπορεί να επηρεάζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη με έναν μηχανισμό αντίθετο από το μηχανισμό δράσης της λεπτίνης και της λιπονεκτίνης και ο οποίος επίσης περιλαμβάνει τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών. Στον άνθρωπο, ο ρόλος της ρεζιστίνης στην ινσουλινοαντίσταση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Σε μια μελέτη στην οποία συγκρίθηκαν τα επίπεδα ρεζιστίνης σε παχύσαρκα, λιπόσαρκα και διαβητικά άτομα, δε βρέθηκε καμία διαφορά, ενώ μια ασθενής αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και τα επίπεδα ρεζιστίνης παρατηρήθηκε μόνο στα λιπόσαρκα άτομα (76).

Ενδομυϊκά Λιποειδή και Ινσουλινοαντίσταση

Ανάμεσα στις διάφορες τάξεις λιποειδών, τα τριγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια, τα κηραμίδια και οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου Α έχουν αναγνωριστεί ως μόρια με σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης. Στη συνέχεια ανασκοπείται η υπάρχουσα γνώση για το ρόλο των λιποειδών αυτών στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης και οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα μόρια αυτά μειώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Τριγλυκερίδια

Τα τριγλυκερίδια (τριακυλο-γλυκερόλες) είναι τρι-εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Η βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα ξεκινάει από τη φωσφο-διυδροξυ-ακετόνη, η οποία προέρχεται από την κύρια γλυκολυτική πορεία, και ολοκληρώνεται με τη σταδιακή ενσωμάτωση τριών ριζών λιπαρού οξέος, με ενδιάμεσο σχηματισμό διγλυκεριδίου (77). Τα τριγλυκερίδια αποτελούν αποθηκευτικές μορφές ενέργειας για τα κύτταρα, με τη μορφή κρυσταλλικών σφαιριδίων, οι οποίες μπορούν να κινητοποιηθούν με τη δράση του ενζύμου ορμονοευαίσθητη λιπάση, η οποία εκφράζεται τόσο στα λιποκύτταρα, όσο και στα μυϊκά κύτταρα (78). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια και λιπαρά οξέα, όπως επίσης και τη διάσπαση των διγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα, με την πρώτη αντίδραση να αποτελεί το καθοριστικό βήμα της όλης πορείας (78).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η πρώτη μελέτη στην οποία αναφέρθηκε μια τέτοια αρνητική συσχέτιση στους ανθρώπους πραγματοποιήθηκε σε 38 νέους, μη διαβητικούς άντρες των Ινδιάνων Pima, μιας φυλής με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη (79). Τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια σχετίστηκαν αρνητικά με την ινσουλινοαντίσταση, όπως αυτή εκτιμήθηκε με βάση το ρυθμό απομάκρυνσης γλυκόζης σε συνθήκες υπερινσουλιναϊμίας-ευγλυκαιμίας. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων δεν σχετίζονταν με το συνολικό ποσοστό σωματικού λίπους ή το λόγο περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια των ισχύων, κάτι που υποδεικνύει ότι στον πληθυσμό αυτό τα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων ασκούσαν μια σημαντική επίδραση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, η οποία ήταν ανεξάρτητη από το βαθμό παχυσαρκίας.

Έκτοτε, πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί οι οποίες να επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση ανάμεσα στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια και την ινσουλινοαντίσταση, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές για τη μέτρηση των τριγλυκεριδίων. Μια σχετικά πρόσφατη τεχνική για τη μέτρηση των τριγλυκεριδίων στους ανθρώπινους ιστούς είναι η μέθοδος της πυρηνικής μαγνητικής αντήχησης, η οποία επιτρέπει τη διάκριση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και αυτών που βρίσκονται σε λιποκύτταρα τα οποία βρίσκονται μεταξύ των μυϊκών ινών (80). Χρησιμοποιώντας την τεχνική αυτή, οι Rerseghin και συνεργάτες εξέτασαν τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια στους απογόνους διαβητικών ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II οι οποίοι είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος και σε μια ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων (81). Οι μετρήσεις των τριγλυκεριδίων έγιναν σε δύο μύες με διαφορετική οξειδωτική ικανότητα: τον υποκνημίδιο μυ (με υψηλή περιεκτικότητα οξειδωτικών μυϊκών ινών) και τον πρόσθιο κνημιαίο (με υψηλή περιεκτικότητα γλυκολυτικών ινών IIb). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι απόγονοι των διαβητικών ατόμων παρουσίαζαν αυξημένη συσσώρευση ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων στον υποκνημίδιο μυ, όχι όμως και στον πρόσθιο κνημιαίο, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον υποκνημίδιο σχετίζονταν αρνητικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Αυξημένα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια, αλλά και τριγλυκερίδια που βρίσκονται σε λιποκύτταρα μεταξύ των μυϊκών ινών στον υποκνημίδιο μυ έχουν βρεθεί ακόμη και σε παχύσαρκους εφήβους (82). Στη μελέτη αυτή ωστόσο, μόνο τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια σχετίζονταν με την ινσουλινοαντίσταση και όχι αυτά που βρίσκονταν μεταξύ των μυϊκών ινών.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών κάνουν πιθανό το ενδεχόμενο τα αυξημένα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια που παρατηρούνται σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης να

οφείλονται σε διαφοροποιήσεις της ιστοχημικής μορφολογίας του μυός και συγκεκριμένα της κατανομής του τύπου των μυϊκών ινών μέσα σε έναν συγκεκριμένο μυ. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι κάποιες μελέτες έχουν δείξει αυξημένη αναλογία γλυκολυτικών μυϊκών ινών, και ιδίως μυϊκών ινών τύπου IIb, στους μύες παχύσαρκων ατόμων (83), ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (84) ή σε απόγονους διαβητικών ασθενών (85). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έχουν βρει μια τέτοια διαφοροποίηση στην κατανομή των μυϊκών ινών σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε σύγκριση με υγιή άτομα (32, 86). Ο προσδιορισμός των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων στους διάφορους τύπους μυϊκών ινών μπορεί να γίνει με ιστοχημικές μεθόδους χρώσης των τριγλυκεριδίων. Σε μια τέτοια σχετική μελέτη οι He και συνεργάτες συνέκριναν την κατανομή των μυϊκών ινών και τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια στον τετρακέφαλο μυ παχύσαρκων, διαβητικών και λιπόσαρκων ατόμων (36). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η κατανομή του τύπου των μυϊκών ινών δεν παρουσίαζε καμία διαφοροποίηση ανάμεσα στις τρεις ομάδες και ότι τα μυϊκά τριγλυκερίδια και στις τρεις ομάδες ήταν περισσότερα στις μυϊκές ίνες τύπου I, ακολουθούμενα κατά σειρά από τα τριγλυκερίδια των μυϊκών ινών τύπου IIa και IIb. Και στη μελέτη αυτή τα συνολικά ενδομυϊκά τριγλυκερίδια ήταν περισσότερα στα παχύσαρκα και τα διαβητικά άτομα, σε σύγκριση με τα λιπόσαρκα άτομα.

Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες να εξετάζουν τη σχέση των συνολικών ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, ωστόσο μελέτες οι οποίες να έχουν εξετάσει την πιθανή σχέση ανάμεσα στη σύσταση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων (δηλαδή τη σύσταση των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα μόρια των τριγλυκεριδίων) είναι ουσιαστικά ανύπαρκτες. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες, καθώς θα παρείχαν ενδεχομένως μια άμεση συσχέτιση ανάμεσα στη σύσταση της δίαιτας και την ποιότητα του διαιτητικού λίπους με την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης στο επίπεδο των μυϊκών κυττάρων. Στη μοναδική σχετική μελέτη συγκρίθηκε η ποιοτική σύσταση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων σε μια ομάδα παχύσαρκων ατόμων, σε σύγκριση με μια ομάδα λιπόσαρκων ατόμων (87). Και στη μελέτη αυτή τα συνολικά επίπεδα των τριγλυκεριδίων ήταν αυξημένα στα παχύσαρκα άτομα και σχετίζονταν αρνητικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Ωστόσο τα παχύσαρκα άτομα παρουσίαζαν επιπλέον μια σημαντική τάση μεγαλύτερης συσσώρευσης κορεσμένων, παρά ακόρεστων λιπαρών οξέων. Επιπλέον, ενώ τα επίπεδα παλμιτικού οξέος (κορεσμένο λιπαρό οξύ) σχετίζονταν αρνητικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, παρόμοια συσχέτιση δε βρέθηκε με τα επίπεδα ελαϊκού οξέος (μονο-ακόρεστο λιπαρό οξύ).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μελέτες οι οποίες δεν έχουν δείξει μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Σε μια μελέτη 105 υγιών ατόμων με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια του υποκνημίδιου μυός δεν συσχετίζονταν με την ευαισθησία στην ινσουλίνη (88). Σε μια παρόμοια μελέτη, η οποία περιλάμβανε διαβητικά και μη διαβητικά άτομα, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο υποομάδες με κριτήριο το ποσοστό σωματικού λίπους (μικρότερο ή μεγαλύτερο του 25%), τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια ήταν περίπου διπλάσια στα διαβητικά άτομα και επίσης περισσότερα στα άτομα με αυξημένο σωματικό λίπος (89). Ωστόσο στη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και την ευαισθησία στην ινσουλίνη, τόσο στα υγιή, όσο και στα διαβητικά άτομα. Είναι επομένως πιθανό τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια, αν και ενδεικτικά καταστάσεων ινσουλिनoαντίστασης, να μην είναι αυτά κάθε αυτά υπεύθυνα για την εμφάνιση ινσουλινoαντίστασης. Στην πραγματικότητα δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα κάποιος μοριακός μηχανισμός ο οποίος να συνδέει τα επίπεδα των λιποειδών αυτών με την εμφάνιση ινσουλινoαντίστασης.

Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από παρατηρήσεις σε προπονημένα άτομα, τα οποία είναι γενικά αποδεκτό ότι παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Έχει βρεθεί ότι προπόνηση δύο εβδομάδων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων κατά 42% σε υγιή άτομα, με παράλληλη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (90). Οι Goodpaster και συνεργάτες συνέκριναν την επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε παχύσαρκα άτομα, άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και σε προπονημένα άτομα (91). Αν και η ευαισθησία στην ινσουλίνη ήταν περίπου διπλάσια στα προπονημένα άτομα σε σύγκριση με τα παχύσαρκα άτομα, ενώ στα διαβητικά άτομα ήταν ακόμη χαμηλότερη από τα παχύσαρκα άτομα, ωστόσο τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων ήταν υψηλότερα στα προπονημένα άτομα σε σχέση με τα παχύσαρκα άτομα, και ελαφρώς χαμηλότερα σε σχέση με τα διαβητικά άτομα.

Θα πρέπει τέλος να αναφερθεί ότι αν και τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια παρουσιάζονται αυξημένα σε καταστάσεις ινσουλινoαντίστασης, ωστόσο τα μόρια αυτά δεν αποτελούν στατικές δομές. Σε μια μελέτη στην οποία μελετήθηκε ο μεταβολισμός των ενεργειακών υποστρωμάτων τόσο στη φάση νηστείας, όσο και τη διάρκεια υπομέγιστης άσκησης σε διαβητικά και μη διαβητικά παχύσαρκα άτομα, βρέθηκε ότι τόσο κατά τη νηστεία, όσο και κατά τη διάρκεια της άσκησης τα διαβητικά άτομα παρουσίαζαν αυξημένους ρυθμούς οξείδωσης των μυϊκών

τριγλυκεριδίων, με αντίστοιχη μείωση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων του πλάσματος (31). Και η παρατήρηση αυτή συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι ενδεχομένως κάποια ενδιάμεσα μόρια του μεταβολισμού των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και όχι τα τριγλυκερίδια αυτά κάθε αυτά να είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη στην παχυσαρκία και το σακχαρώδη διαβήτη.

Διγλυκερίδια

Τα διγλυκερίδια είναι δι-εστέρες της γλυκερόλης με δύο μόρια λιπαρού οξέος, τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, μπορούν να αποτελούν ενδιάμεσα μόρια είτε της βιοσύνθεσης των τριγλυκεριδίων, είτε της αποικοδόμησής τους. Η πρώτη μελέτη στην οποία αναφέρθηκε μια πιθανή σχέση ανάμεσα στα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων με την ευαισθησία στην ινσουλίνη πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα από τους Turinski και συνεργάτες (92). Στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε ότι τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια παχύσαρκων ποντικών ήταν κατά 40-136% υψηλότερα (ανάλογα με την οξειδωτική ικανότητα των εξεταζόμενων μυών) σε σύγκριση με λιπόσαρκα πειραματόζωα. Επιπρόσθετα, η απονεύρωση των μυών (ένα μοντέλο τεχνητής ινσουλινοαντίστασης) οδήγησε επίσης σε σημαντική αύξηση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων. Μετά τη μελέτη αυτή, αρκετές μελέτες σε πειραματόζωα, σε καλλιέργειες κυττάρων ή σε συνθήκες τεχνητής πρόκλησης ινσουλινοαντίστασης έχουν δείξει μια ενδεχομένως αιτιολογική σχέση ανάμεσα στην παρουσία των μορίων αυτών και την ευαισθησία στην ινσουλίνη στο μυϊκό ιστό.

Ο μηχανισμός ο οποίος έχει προταθεί και ο οποίος εμπλέκει τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια με την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης περιλαμβάνει την αλλοστερική ενεργοποίηση του ενζύμου πρωτεϊνική κινάση C από τα διγλυκερίδια (93). Η ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού οδηγεί σε μετατόπιση συγκεκριμένων ισόμορφων του από το κυτταρόπλασμα προς την κυτταρική μεμβράνη, όπου ασκεί συγκεκριμένες αρνητικές επιδράσεις στο μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, η έγχυση λιπών σε πειραματόζωα οδήγησε σε αύξηση των διγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό (94). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μείωση της φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης του υποστρώματος 1 του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1) υπό τη χορήγηση ινσουλίνης, όπως επίσης και μείωση της ενεργότητας της κινάσης-3 του φωσφατιδυλοϊνositide, χωρίς ωστόσο κάποια επίδραση στη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης του ίδιου του υποδοχέα. Οι αρνητικές αυτές επιδράσεις έγιναν με παράλληλη αύξηση της ενεργότητας του ισόμορφου θ της πρωτεϊνικής κινάσης C στην κυτταρική μεμβράνη και με ταυτόχρονη μείωση στο κυτταρόπλασμα.

Τα παραπάνω ευρήματα για το ρόλο της πρωτεϊνικής κινάσης C σε σχέση με τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων έχουν επιβεβαιωθεί και σε πειράματα σε ανθρώπους. Οι Itani και συνεργάτες προκάλεσαν τεχνητές συνθήκες ινσουλινοαντίστασης με υπερινσουλιναίμια – ευγλυκαιμία σε υγιή άτομα με ταυτόχρονη έγχυση λιπών (95). Μετά από 6 ώρες υπό τις συνθήκες αυτές τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων είχαν τριπλασιαστεί, με μια παράλληλη αύξηση στην ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μετατόπιση κάποιων ισόμορφων του ενζύμου από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός για τη σχέση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και τη μείωση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη δεν έχει αποδειχτεί άμεσα σε πραγματικές συνθήκες ινσουλινοαντίστασης στον άνθρωπο. Η μόνη σχετική μελέτη έχει πραγματοποιηθεί σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων, προερχόμενα από παχύσαρκα και λιπόσαρκα άτομα. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία ινσουλίνης οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C στην πλασματική μεμβράνη, η οποία ήταν μεγαλύτερη στα μυϊκά κύτταρα των παχύσαρκων ατόμων (96). Ωστόσο στη μελέτη αυτή δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων.

Στην πραγματικότητα, κατά το σχεδιασμό των μελετών της παρούσας διατριβής δεν υπήρχαν μελέτες στις οποίες να είχαν μετρηθεί άμεσα τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Ωστόσο, σχεδόν ταυτόχρονα με τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής δημοσιεύθηκαν δύο τέτοιες μελέτες. Η πρώτη από αυτές τις μελέτες διεξήχθη από τον Goodpaster και συνεργάτες σε 22 παχύσαρκες γυναίκες, οι οποίες με βάση το βαθμό ινσουλινοαντίστασης διακρίθηκαν σε δύο ομάδες, ως άτομα με ινσουλινοαντίσταση και άτομα χωρίς ινσουλινοαντίσταση (97). Στη μελέτη αυτή ενώ τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων ήταν αυξημένα στις μυϊκές ίνες τύπου I και το ίδιο παρατηρήθηκε για τα επίπεδα κηραμιδίων στην ομάδα με μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, ωστόσο τα επίπεδα διγλυκεριδίων ήταν παραπλήσια στις δύο ομάδες. Σε μια άλλη μελέτη, επίσης διαπληθυσμιακού πειραματικού σχεδιασμού και η οποία περιελάμβανε 48 άτομα με μεγάλο εύρος δείκτη μάζας σώματος και γλυκαιμικού ελέγχου, βρέθηκε ότι τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων ήταν αυξημένα στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη και στα παχύσαρκα άτομα, ενώ η τάξη αυτή των λιποειδών ήταν ο κύριος παράγοντας που σχετιζόταν με την ινσουλινοαντίσταση. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων συσχετίστηκαν με το λόγο της ενεργότητας της υδρολάσης διγλυκεριδίου προς την ενεργότητα της υδρολάσης τριγλυκεριδίου, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ένας δείκτης της ατελούς υδρόλυσης των

τριγλυκεριδίων (98). Συνεπώς, οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί ως τώρα στον άνθρωπο και αφορούν τη σχέση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων με την ινσουλινοαντίσταση δεν έχουν ομοιογενή αποτελέσματα.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν κάποιες μελέτες οι οποίες έχουν διερευνήσει τον πιθανό ρόλο διαφόρων λιπών στα επίπεδα των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και οι οποίες έχουν γίνει αποκλειστικά με πειράματα και καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων. Ιδιαίτερα εμπεριστατωμένη είναι η μελέτη των Montell και συνεργατών (99). Στη μελέτη αυτή η καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων απουσία γλυκόζης οδήγησε σε μικρή μόνο αύξηση της ενσωμάτωσης των λιπαρών οξέων του θρεπτικού υποστρώματος στα ενδομυϊκά λιποειδή (τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια) του κυτταροπλάσματος. Η ενσωμάτωση αυτή αυξήθηκε κατά την ταυτόχρονη παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα, πιθανότατα λόγω της διαθεσιμότητας σκελετών γλυκερόλης για το σχηματισμό των ενδοκυτταρικών λιποειδών. Ειδικότερα, στα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα με κορεσμένα λιπαρά οξέα η μέγιστη αύξηση στα επίπεδα ενδομυϊκά λιποειδών παρατηρήθηκε στα διγλυκερίδια, με μικρές μόνο αλλαγές στα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Αντίθετα η επώαση με ελαϊκό ή λινελαϊκό οξύ οδήγησε σε σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων του κυτταροπλάσματος, με μικρή μόνο αύξηση στα επίπεδα των διγλυκεριδίων. Επιπρόσθετα, η παρουσία παλμιτικού οξέος στο θρεπτικό μέσο οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας πρωτεϊνικής κινάσης C στην κυτταρική μεμβράνη, η οποία ωστόσο δεν παρατηρήθηκε όταν στο θρεπτικό μέσο υπήρχε ελαϊκό οξύ. Τα δεδομένα αυτά συνολικά δείχνουν ότι η διαθεσιμότητα διαφορετικών λιπαρών οξέων μπορεί να έχει διαφορετικές επιδράσεις στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, μέσω του μηχανισμού ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C από τα διγλυκερίδια του κυτταροπλάσματος που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στην ίδια μελέτη η προσθήκη ινσουλίνης στο θρεπτικό μέσο κυττάρων που επωάστηκαν με κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν οδήγησε σε καμία αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα, κάτι που υποδεικνύει σοβαρού βαθμού μείωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, κάτι που ωστόσο δεν παρατηρήθηκε όταν η επώαση έγινε σε ελαϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έχουν επιβεβαιωθεί και σε άλλες μελέτες σε καλλιέργειες σε λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής (100, 101).

Συμπερασματικά, ο βαθμός συσσώρευσης ενδομυϊκών διγλυκεριδίων μπορεί να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ευαισθησία στην ινσουλίνη, μέσω της αύξησης στην ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C και τη συνακόλουθη μετατόπισή της στην κυτταρική επιφάνεια, όπου μπορεί να ασκεί αρνητικές δράσεις σε συγκεκριμένα σημεία του μοριακού

μηχανισμού δράσης της ινσουλίνης. Επιπρόσθετα, η ποιότητα του παρεχόμενου διαιτητικού λίπους θα μπορούσε να έχει ποιοτικές επιδράσεις στη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών λιποειδών και συγκεκριμένα στην ενσωμάτωση των λιπιδίων του κυτταρικού περιβάλλοντος στα ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων διγλυκεριδίων, ή αντίθετα. Πρώιμες μελέτες πάνω στην ενεργότητα της ακυλοτρανσφεράσης διγλυκεριδίου, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την εστεροποίηση των διγλυκεριδίων προς τριγλυκερίδια, έχουν δείξει ότι το ένζυμο αυτό παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, με τη διελαΐνη να παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητα, ενώ η διπαλμιτίνη παρουσίαζε ελάχιστη ενεργότητα (102). Είναι επομένως πιθανό η ινσουλινοαντίσταση να εξαρτάται από την ικανότητα των μυϊκών κυττάρων να αποθέσουν τα διαθέσιμα λιπαρά οξέα στα τριγλυκερίδια, με ταυτόχρονη μείωση των διγλυκεριδίων του κυτταροπλάσματος.

Κηραμίδια

Μια άλλη τάξη λιποειδών η οποία έχει ενοχοποιηθεί στη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη είναι τα κηραμίδια. Τα κηραμίδια είναι ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από τη σφινγγοσίνη και ένα μόριο λιπαρού οξέος μακράς αλυσίδας, ενωμένα με αμιδικό δεσμό. Διάφοροι οδοί βιοσύνθεσης των κηραμιδίων έχουν αναγνωρισθεί. Τα μόρια αυτά μπορούν να συντεθούν *de novo* από σερίνη και λιπαρούς εστέρες του συνενζύμου Α, όπως επίσης και από τη σφινγγοσίνη και τη σφινγομυελίνη (103).

Η πρώτη παρατήρηση για την πιθανή σχέση των λιποειδών αυτών με την ευαισθησία στην ινσουλίνη έγινε σε πειραματόζωα, όπου παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα κηραμιδίων ήταν κατά 13-52% υψηλότερα στους μύες παχύσαρκων ποντικών (ανάλογα με την οξειδωτική ικανότητα του εξεταζόμενου μυός) (92). Στην ίδια μελέτη, η απονεύρωση των μυών, η οποία προκαλεί ινσουλινοαντίσταση, οδήγησε επίσης σε αύξηση των επιπέδων των κηραμιδίων. Στον άνθρωπο, κάποια άμεση σχέση ανάμεσα στα επίπεδα ενδομυϊκών κηραμιδίων και την ινσουλινοαντίσταση έχει επίσης αναφερθεί. Οι Adams και συνεργάτες βρήκαν ότι τα επίπεδα των κηραμιδίων είναι περίπου διπλάσια στους μύες παχύσαρκων ατόμων, σε σχέση με τα επίπεδα σε λιπόσαρκα άτομα και ότι η συγκέντρωση των κηραμιδίων σχετίζονταν αρνητικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, έτσι όπως αυτή εκτιμήθηκε με βάση το ρυθμό έγχυσης γλυκόζης σε συνθήκες υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας (104). Μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και τα επίπεδα ενδομυϊκών κηραμιδίων έχει παρατηρηθεί ακόμη και σε άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη και φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (105).

Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα κηραμίδια βλάπτουν τη δράση της ινσουλίνης, τουλάχιστον σε ότι αφορά την πρόσληψη γλυκόζης, έχουν μελετηθεί εκτενώς, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές οι οποίες επώαστηκαν παρουσία κηραμιδίων με λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτά μειώνουν την ικανότητα μετάθεσης των μεταφορών GLUT-4 από το εσωτερικό του κυττάρου στην πλασματική μεμβράνη υπό την παρουσία ινσουλίνης, κάτι που συνοδεύονταν από παράλληλη μείωση της ενεργοποίησης (μέσω φωσφορυλίωσης) της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (106, 107). Στις μελέτες αυτές ωστόσο τα κηραμίδια δεν είχαν καμία αρνητική επίδραση στη φωσφορυλίωση του υποστρώματος I του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1) ή την ενεργότητα της σχετιζόμενης κινάσης-3 του φωσφατιδυλοϊνοσίτη.

Ο ρόλος της πρωτεϊνικής κινάσης Akt (ή πρωτεϊνική κινάση B) στο μηχανισμό πρόσληψης γλυκόζης από τη δράση της ινσουλίνης σε κυτταρικό επίπεδο έχει πρόσφατα ανασκοπηθεί από τους Hajdуч και συνεργάτες (108). Τρία ισόμορφα του ενζύμου έχουν αναγνωριστεί, η Akt 1 (ή α), η οποία εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα, η Akt 2 (ή β), η οποία εκφράζεται κυρίως στα λιποκύτταρα και η Akt 3 (ή γ), η οποία δεν εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό σε κανένα από τα παραπάνω κύτταρα. Το ένζυμο υφίσταται κάποιου είδους τροποποίηση της δομής του από την παρουσία τριφωσφοϊνοσιτιδίων, τα οποία παράγονται από τη δράση της ινσουλίνης, για να ακολουθήσει μετάθεσή του προς την κυτταρική επιφάνεια, όπου ενεργοποιείται από την κινάση PDK 1. Η Akt, όπως προαναφέρθηκε προκαλεί τη μετάθεση των μεταφορών γλυκόζης GLUT-4 από το κυτταρόπλασμα προς την κυτταρική μεμβράνη με άγνωστο μέχρι τώρα μηχανισμό, ενώ επίσης αποτελεί και ρυθμιστή της σύνθεσης του γλυκογόνου, πορεία η οποία επίσης επάγεται από την ινσουλίνη. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η Akt επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου περιλαμβάνει την απενεργοποίηση, μέσω φωσφορυλίωσης, της κινάσης-3 της συνθάσης του γλυκογόνου, η οποία οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας της συνθάσης του γλυκογόνου.

Σημαντικές αποδείξεις για την αρνητική επίδραση των ενδοκυτταρικών κηραμιδίων στο μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης μέσω της Akt παρείχε μια πρόσφατη μελέτη των Chavez και συνεργατών σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων (109). Στη μελέτη αυτή η επώαση με παλμιτικό οξύ οδήγησε σε αύξηση των ενδοκυτταρικών κηραμιδίων και μείωσε την ικανότητα της ινσουλίνης να ενεργοποιεί την Akt. Ωστόσο όταν υπό την παρουσία παλμιτικού η σύνθεση των κηραμιδίων αναστάλθηκε τεχνητά, δεν παρουσιάστηκε μειωμένη ενεργοποίηση της Akt από την ινσουλίνη. Ανάλογα, όταν η αποικοδόμηση των κηραμιδίων παρεμποδίστηκε τεχνητά,

παρουσιάστηκε μείωση της ικανότητας της ινσουλίνης να ενεργοποιεί την Akt, η οποία ήταν του ίδιου βαθμού με αυτή που παρουσιάστηκε κατά την επώαση με παλμιτικό οξύ.

Αν και υπάρχει σημαντικός αριθμός μελετών στον άνθρωπο οι οποίες να έχουν διερευνήσει τον παραπάνω μηχανισμό μέσω του οποίου τα κηραμίδια ασκούν αρνητική δράση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, ωστόσο τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα. Δύο μελέτες σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και σε παχύσαρκα άτομα έχουν δείξει ότι στις καταστάσεις αυτές υπάρχει μειωμένη ενεργοποίηση της Akt υπό την παρουσία ινσουλίνης σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου, όπως επίσης και μειωμένη απόκριση στη μείωση της ενεργότητας της κινάσης-3 της συνθάσης του γλυκογόνου υπό την παρουσία ινσουλίνης (110, 111). Σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες είναι και η μελέτη των Adams και συνεργατών, στην οποία η έκθεση παχύσαρκων ατόμων σε συνθήκες υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας οδήγησε σε μειωμένη φωσφορυλίωση της Akt σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (104). Αντίθετα, σε μια μελέτη με διαβητικά άτομα, οι Kim και συνεργάτες ανέφεραν φυσιολογική ενεργοποίηση της Akt υπό συνθήκες υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας στα άτομα αυτά σε σύγκριση με υγιή άτομα (112). Επίσης σε μια μελέτη με έγχυση λιπών σε συνθήκες υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας φάνηκε πως η έγχυση λιπών, η οποία είναι ένα πειραματικό μοντέλο πρόκλησης ινσουλινοαντίστασης, δεν είχε καμία επίδραση στην φωσφορυλίωση της Akt: του ίδιου βαθμού ενεργοποίηση παρατηρήθηκε με ή χωρίς έγχυση λιπών (113).

Συμπερασματικά, αν και τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών μπορεί εκ πρώτης όψης να φαίνονται διφορούμενα, ωστόσο μπορεί απλά να είναι ενδεικτικά της πολυπαραγοντικής φύσης του φαινομένου της ινσουλινοαντίστασης. Με βάση τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα, τα κηραμίδια μπορούν να θεωρηθούν ως μόρια τα οποία μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε κυτταρικό επίπεδο. Ωστόσο, μπορεί να υποθεθεί ότι τα κηραμίδια, αυτά καθ' αυτά ίσως δεν αποτελούν κυρίαρχα μόρια στην αιτιολόγηση της ινσουλινοαντίστασης. Ενδεικτικό είναι το ότι στη μελέτη των Adams και συνεργατών (104) που προαναφέρθηκε, αν και τα επίπεδα των κηραμιδίων ήταν αυξημένα στα παχύσαρκα άτομα σε βασικές συνθήκες, ωστόσο τα άτομα αυτά παρουσίαζαν μειωμένη ενεργοποίηση της Akt σε συνθήκες υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας, χωρίς παράλληλη αύξηση των επιπέδων των κηραμιδίων. Εν αντιθέσει, τα ενδομυϊκά κηραμίδια παρουσίαζαν μια τάση μείωσης κατά τη διάρκεια των πειραματικών αυτών συνθηκών.

Λιπαροί Εστέρες του Συνενζύμου Α

Οι εστέρες του συνενζύμου Α έχουν επίσης προταθεί ως μόρια τα οποία θα μπορούσαν να έχουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης. Οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου Α αποτελούν ενδιάμεσα μόρια του μεταβολισμού των λιπών. Αποτελούν ενεργοποιημένες μορφές των λιπαρών οξέων οι οποίες είναι απαραίτητες τόσο για την είσοδο των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια και την ακόλουθη οξείδωσή τους, όσο και για τη βιοσύνθεση αποθηκευτικών μορφών λιποειδών. Συγκεκριμένα, η σταδιακή μετατροπή του α-γλυκεροφωσφορικού οξέος προς διγλυκερίδιο και ακολούθως προς τριγλυκερίδιο γίνεται με τη σταδιακή ενσωμάτωση μορίων λιπαρών οξέων υπό τη μορφή εστέρων του με το συνένζυμο Α (77). Πέρα από τη βασική αυτή λειτουργία, μεγάλος αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου Α επιτελούν ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών, οι οποίες περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, την έκκριση κυστιδίων από το σύστημα Golgi, τη ρύθμιση της διαμετακίνησης δια μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (114). Στη συνέχεια επισκοπούνται κάποιες από τις λειτουργίες αυτές οι οποίες θα μπορούσαν να συνδέουν τους λιπαρούς εστέρες του συνενζύμου Α με την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης.

In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι η ηπατική γλυκοκινάση ποντικών αναστέλλεται από την παρουσία εστέρων του συνενζύμου Α με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και ότι η αναστολή αυτή είναι ακαριαία, αντιστρεπτή και ειδική. Αντίθετα, η παρουσία στο θρεπτικό μέσο των αντίστοιχων λιπαρών οξέων, του συνενζύμου Α ή ακετυλο-συνενζύμου Α δεν οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας της γλυκοκινάσης (115). Ανάλογα πειράματα έχουν δείξει ότι η παρουσία παλμιτοϋλο-συνενζύμου Α στο θρεπτικό μέσο οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης που είχε απομονωθεί από λιποκύτταρα ποντικών (116). Οι δύο αυτές αρνητικές δράσεις των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου Α σε δύο βασικά ένζυμα του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι σε συμφωνία με τον κύκλο γλυκόζης/λιπαρών οξέων, έτσι όπως αυτός έχει διατυπωθεί από τους Randle και συνεργάτες (28). Επίσης έχει βρεθεί ότι το παλμιτοϋλο-συνένζυμο Α μειώνει την ενεργότητα της συνθάσης του γλυκογόνου του ήπατος ποντικών (117). Ο μηχανισμός της αναστολής αυτής περιλαμβάνει την αποδιάταξη της ενεργούς τετραμερούς δομής του ενζύμου σε μονομερή τα οποία δεν μπορούν να προσδεθούν στο μόριο θεμελίωσης του γλυκογόνου. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι τα παραπάνω φαινόμενα για το ρόλο των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου Α έχουν παρατηρηθεί in vitro, υπό βέλτιστες συνθήκες για την ενεργότητα των υπό εξέταση ενζύμων. Δεν είναι καθόλου βέβαιο κατά πόσο ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να λειτουργεί και στο κυτταρικό περιβάλλον και πολύ περισσότερο σε έναν οργανισμό.

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου A θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ασκεί αρνητικές επιδράσεις στο μοριακό μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης. Πειράματα σε κυτταροπλασματικά παρασκευάσματα ινοβλαστών ή και σε παρασκευάσματα μερικώς απομονωμένης πρωτεϊνικής κινάσης C έχουν δείξει ότι η ενεργότητα του ενζύμου αυτού μειώνεται από την παρουσία λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A, όχι όμως και από την παρουσία των αντίστοιχων (μη εστεροποιημένων) λιπαρών οξέων (118). Ωστόσο, το κατά πόσο οι επιδράσεις αυτές των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A στην πρωτεϊνική κινάση C είναι άμεσες, μέσω της πρόσδεσής τους στο ένζυμο, ή έμμεσες, μέσω της βιοσύνθεσης διγλυκεριδίων είναι άγνωστο.

Τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον άνθρωπο οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου A έχουν συσχετιστεί με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Δίαιτα πλούσια σε λίπος για τρεις εβδομάδες σε πειραματόζωα οδήγησε σε αύξηση των λιπαρών εστέρων στον κόκκινο γαστροκνήμιο μυ και στο ήπαρ, όχι όμως και στον λευκό γαστροκνήμιο, ενώ στην καρδιά η δίαιτα πλούσια σε λίπος οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A (119). Επιπρόσθετα, η μέτρηση των επιπέδων των μορίων αυτών στους μύες ηλικιωμένων ανθρώπων ανέδειξε μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και τα επίπεδα των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A (119). Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη δεν έδειξε καμία διαφοροποίηση στα ενδομυϊκά επίπεδα των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A ανάμεσα σε διαβητικά άτομα και άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη και παρόμοιου δείκτη μάζας σώματος, τόσο υπό βασικές συνθήκες, όσο και κατά τη διάρκεια υπερινσουλιναιμίας – ευγλυκαιμίας. Αντίθετα, τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων ήταν κατά 150% υψηλότερα στα διαβητικά άτομα (120). Στην ίδια μελέτη, προπονημένα άτομα μικρότερης ηλικίας είχαν επίσης τα ίδια επίπεδα λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A με τα διαβητικά άτομα.

Υπάρχουν κάποια επιπρόσθετα δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου A ενδεχομένως να μην είναι αυτοί κάθε αυτοί υπεύθυνοι για την εμφάνιση ινσουλिनoαντίστασης. Η παρατεταμένη νηστεία, μια κατάσταση στην οποία παρατηρείται μετατόπιση του μεταβολισμού στην οξείδωση των λιπών, χωρίς ωστόσο να βλάπτεται η ευαισθησία στην ινσουλίνη, οδηγεί σε αύξηση των ενδομυϊκών λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A (119). Επιπρόσθετα, παρεμβάσεις οι οποίες βελτίωσαν την ευαισθησία στην ινσουλίνη πειραματόζωων που είχαν υποβληθεί σε δίαιτα πλούσια σε λίπος (άσκηση, γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, νηστεία σε σύγκριση με γεύμα πλούσιο σε λίπος) δεν οδήγησαν σε

μείωση των ενδομυϊκών λιπαρών εστέρων του συνενζύμου Α υπό βασικές συνθήκες, παρά μόνο μετά από δύο ώρες υπερινσουλιναίμιας – ευγλυκαιμίας (121). Στην περίπτωση αυτή, οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου Α και ιδιαίτερα οι μεταβολές τους κατά τη φάση της υπερινσουλιναίμιας – ευγλυκαιμίας θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως δείκτες της ικανότητας του μυός να μετατοπίζει τον ενεργειακό μεταβολισμό προς την οξείδωση των υδατανθράκων, σε βάρος της οξείδωσης των λιπών. Αντίθετα, η αύξηση των ενδομυϊκών λιπαρών οξέων στη φάση της νηστείας μπορεί να υποδηλώνει τη μετατόπιση του μεταβολισμού προς την οξείδωση των λιπών, λόγω της αύξησης της διαθεσιμότητας λιπαρών οξέων από τη συστηματική κυκλοφορία.

Συμπερασματικά, οι λιπαροί εστέρες του συνενζύμου Α αποτελούν ενδιάμεσα μόρια του μεταβολισμού των λιπών, τα οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ιδιαίτερα ευαίσθητοι δείκτες της διαθεσιμότητας λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η ευαισθησία στην ινσουλίνη θα εξαρτηθεί από το κατά πόσο τα λιπαρά αυτά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργειακά υποστρώματα στη β-οξείδωση ή αν θα διοχετευτούν σε πορείες βιοσύνθεσης άλλων μορφών λιποειδών, όπως για παράδειγμα διγλυκεριδίων, τα οποία έχουν περισσότερο άμεση σχέση με την ινσουλινοαντίσταση.

Ο ρόλος της διαίτας και της άσκησης στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης

Η μείωση του σωματικού βάρους, μέσω της μείωσης της ενεργειακής πρόσληψης, σε συνδυασμό με την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας θεωρούνται δύο βασικές παράμετροι για τη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης ή ακόμη και για την πρόληψη του σακχαρώδη διαβήτη σε άτομα με προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου. Οι πιο πειστικές αποδείξεις για την αλήθεια του γεγονότος αυτού προέρχονται από εκτεταμένες κλινικές μελέτες σε άτομα με δυσανοχή στη γλυκόζη και οι οποίες περιελάμβαναν παρεμβάσεις οι οποίες είχαν ως στόχο μια σχετικά μικρή μείωση στο σωματικό βάρος και μια παράλληλη αύξηση στη φυσική δραστηριότητα, η οποία ωστόσο δεν είχε τη μορφή ενός έντονου προγράμματος προπόνησης. Σε διεθνές επίπεδο, 5 τέτοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί: η μελέτη του Μάλμο, στη Σουηδία (7), η μελέτη Da Qing, στην Κίνα (8), το πρόγραμμα πρόληψης του διαβήτη της Φινλανδίας (9), η αντίστοιχη μελέτη των Η.Π.Α. (10) και η πιο πρόσφατη μελέτη του Μάαστριχτ (122). Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει ότι ακόμη και μικρού βαθμού μείωση του σωματικού βάρους (της τάξης του 2.3-3.7%) με μια παράλληλη αύξηση της φυσικής δραστηριότητας της τάξης των 150

λεπτών ανά εβδομάδα μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό τη συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη, με ταυτόχρονη βελτίωση στο γλυκαιμικό έλεγχο και τα επίπεδα ινσουλίνης.

Αν και η άσκηση από μόνη της δεν θεωρείται σε γενικές γραμμές ως ένα ικανοποιητικό μέσο για την απώλεια βάρους, ο συνδυασμός της μείωσης της ενεργειακής πρόσληψης με ταυτόχρονη αύξηση στη φυσική δραστηριότητα φαίνεται ότι είναι πλεονεκτική, σε σχέση με τη δίαιτα μόνο (123). Σε ότι αφορά τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν ότι η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας έχει πρόσθετα οφέλη σε σχέση με τη μείωση της ενεργειακής πρόσληψης μόνο. Οι Dengel και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της υποθερμιδικής δίαιτας, της αεροβικής προπόνησης και του συνδυασμού τους σε παχύσαρκους άντρες μεγάλης ηλικίας (124). Αν και η απώλεια βάρους μετά από 10 μήνες παρέμβασης ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες οι οποίες υποβλήθηκαν σε υποθερμιδική δίαιτα μόνο, ωστόσο η δίαιτα από μόνη της δεν είχε ουσιαστικά καμία επίδραση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ ο συνδυασμός δίαιτας και άσκησης οδήγησε σε σημαντική βελτίωση, η οποία ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στην ομάδα η οποία συμμετείχε στην αεροβική προπόνηση χωρίς απώλεια βάρους. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξε και μια μελέτη στην οποία η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας έγινε μέσω αύξησης της καθημερινής δραστηριότητας σε τουλάχιστον 10.000 βήματα ημερησίως (125). Η μελέτη περιλάμβανε δύο ομάδες παχύσαρκων ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, εκ των οποίων η μία υποβλήθηκε σε υποθερμιδική δίαιτα μόνο, ενώ η παρέμβαση στη δεύτερη ομάδα περιλάμβανε συνδυασμό δίαιτας και αύξηση στη φυσική δραστηριότητα. Η ευαισθησία στην ινσουλίνη παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητη στην ομάδα της δίαιτας μόνο, ενώ σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε με το συνδυασμό δίαιτας και αύξησης της φυσικής δραστηριότητας.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός δίαιτας και άσκησης φαίνεται ότι παρέχει τα βέλτιστα οφέλη, όχι τόσο για τη μείωση του σωματικού βάρους, αλλά για τη βελτίωση της ινσουλिनoαντίστασης. Το σύνολο των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μέσω της δίαιτας και της άσκησης είναι πέραν των στόχων του κειμένου αυτού. Στη συνέχεια επισκοπείται η υπάρχουσα γνώση για το κατά πόσο οι παρεμβάσεις οι οποίες περιλαμβάνουν δίαιτα, άσκηση ή συνδυασμό τους μπορούν να ευνοϊκές επιδράσεις στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών σε καταστάσεις ινσουλινoαντίστασης.

Οι μελέτες οι οποίες έχουν εξετάσει την επίδραση της δίαιτας από μόνη της έχουν βρει μια σημαντική μείωση στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών όταν η παρέμβαση οδήγησε σε

σημαντικού βαθμού μείωση του σωματικού βάρους. Οι Greco και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της απώλειας βάρους μέσω χοληδοχοκυστιδικής παράκαμψης και μέσω υποθερμιδικής διαίτας 1200 Θερμίδων σε θνησιγενώς παχύσαρκα άτομα (Δείκτης Μάζας Σώματος $49.4 \pm 7.8 \text{ kg/m}^2$) (126). Μετά από έξι μήνες παρέμβασης, τα ενδομυϊκά λιποειδή, έτσι όπως αυτά μετρήθηκαν ιστοχημικά, παρουσίασαν μείωση της τάξης του 86% μετά την χολοκυστιδική παράκαμψη, ενώ η ευαισθησία στην ινσουλίνη βελτιώθηκε σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, στην ομάδα η οποία υποβλήθηκε σε υποθερμιδική διαίτα, τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση, ενώ επίσης η ευαισθησία στην ινσουλίνη δε βελτιώθηκε σημαντικά. Η μείωση του σωματικού βάρους στην πρώτη παρέμβαση ήταν 24%, ενώ στη δεύτερη παρέμβαση ήταν της τάξης του 9%. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι η απώλεια βάρους ήταν ιδιαίτερα μεγάλη στην περίπτωση της χολοκυστιδικής παράκαμψης, ωστόσο η παρέμβαση δεν είχε μεγάλη χρονική διάρκεια ώστε να μειωθεί το σωματικό λίπος σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος στο τέλος της εξάμηνης περιόδου στα άτομα αυτά ήταν $39.0 \pm 8.3 \text{ kg/m}^2$ και τα επίπεδα σωματικού λίπους ήταν περίπου διπλάσια από τα αντίστοιχα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο η ευαισθησία στην ινσουλίνη παρουσίασε πλήρη αποκατάσταση και σχετιζόνταν με την εξάντληση των ενδομυϊκών λιποειδών.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και μια μελέτη στην οποία η απώλεια βάρους πραγματοποιήθηκε μέσω γαστρικής παράκαμψης (127). Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν επίσης θνησιγενώς παχύσαρκα άτομα και η επανεξέταση έγινε ένα χρόνο μετά την εγχείρηση. Η παρέμβαση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του σωματικού βάρους κατά 47% και οδήγησε σε σημαντική μείωση των ενδομυϊκών λιποειδών τόσο στις ίνες τύπου I, όσο και στις ίνες τύπου II, χωρίς να παρουσιαστούν διαφοροποιήσεις στην κατανομή των μυϊκών ινών και στην οξειδωτική και γλυκολυτική ικανότητα πριν και μετά την παρέμβαση. Η ευαισθησία στην ινσουλίνη παρουσίασε επίσης σημαντική βελτίωση.

Μια πρόσφατη μελέτη από τους Petersen και συνεργάτες διερεύνησε την επίδραση μιας υποθερμιδικής διαίτας 1200 Θερμίδων στα επίπεδα ενδομυϊκών και ηπατικών λιποειδών σε παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, με την τεχνική της πυρηνικής μαγνητικής αντήχησης (128). Στόχος του προγράμματος ήταν η επίτευξη φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης αίματος, χωρίς σταθερή διάρκεια για όλους τους εθελοντές και η απώλεια βάρους ήταν της τάξης του 9%. Αν και η παρέμβαση οδήγησε σε σημαντικού βαθμού βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, όπως επίσης και σε μείωση των ηπατικών λιποειδών, ωστόσο δεν

παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στη μελέτη αυτή η δίαιτα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιδιαίτερα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπη (3%) και ιδιαίτερα πλούσια σε υδατάνθρακες. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι ενώ η παρέμβαση οδήγησε σε βελτίωση στο γλυκαιμικό προφίλ, ωστόσο δεν είχε θετικές επιδράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών.

Κάποιες μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση της άσκησης από μόνης της στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών σε παχύσαρκα άτομα. Οι Malenfant και συνεργάτες μελέτησαν τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών σε παχύσαρκα άτομα μετά από 15 εβδομάδες μέτριας υποθερμιδικής διαίτας, η οποία ακολουθήθηκε από 20 εβδομάδες αεροβικής προπόνησης, χωρίς υποθερμιδική δίαιτα (129). Η δίαιτα οδήγησε σε μείωση του σωματικού βάρους κατά 10% και είχε μια μικρή επίδραση, μη στατιστικά σημαντική, στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών. Η αεροβική προπόνηση που ακολούθησε μετά τη δίαιτα δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στο σωματικό βάρος. Αντίθετα, τα ενδομυϊκά λιποειδή παρουσίαζαν μια τάση αύξησης, σε σχέση με τα επίπεδά τους στο τέλος της διαίτας.

Σε μια άλλη μελέτη διερευνήθηκαν τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών και των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου Α σε παχύσαρκα άτομα πριν και μετά από 10 εβδομάδες αεροβικής προπόνησης (130). Αν και η προπόνηση οδήγησε σε σημαντική βελτίωση στην αεροβική ικανότητα και στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, ωστόσο δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών, τόσο των τριγλυκεριδίων, όσο και των λιπαρών εστέρων του συνενζύμου Α. Η βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σχετιζόνταν θετικά με τις αλλαγές στην αεροβική ικανότητα και τη μείωση του σπλαχνικού λίπους, όχι όμως και με τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών.

Το κατά πόσο η δίαιτα και η άσκηση έχουν συνεργιστικά αποτελέσματα στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών έχει διερευνηθεί σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Tamura και συνεργάτες σε υπέρβαρα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (131). Η μελέτη αυτή είχε μικρή χρονική διάρκεια (2 εβδομάδες) και περιλάμβανε δύο παρεμβάσεις σε δύο διαφορετικές ομάδες: η πρώτη παρέμβαση περιελάμβανε μια σχετικά ήπια υποθερμιδική δίαιτα, ενώ η δεύτερη παρέμβαση υποθερμιδική δίαιτα μαζί με άσκηση (30 λεπτά περπάτημα, 2-3 φορές ημερησίως, 5 φορές ανά εβδομάδα). Και οι δύο παρεμβάσεις οδήγησαν σε μικρού βαθμού μείωση του Δείκτη Μάζας Σώματος και στο ποσοστό σωματικού λίπους, αλλά ωστόσο μόνο η παρέμβαση η οποία περιλάμβανε το συνδυασμό διαίτας και άσκησης οδήγησε σε σημαντική

βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (57%) και σε μείωση των επιπέδων ενδομυϊκών λιποειδών (19%), όχι όμως και των ηπατικών λιποειδών.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης δεν είναι σε συμφωνία με μια προγενέστερη μελέτη μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας (16 εβδομάδες), η οποία περιελάμβανε υποθερμιδική διαίτα και αεροβική προπόνηση σε παχύσαρκα άτομα (132). Στη μελέτη αυτή η απώλεια βάρους κατά τη διάρκεια της παρέμβασης ήταν 10%, ενώ σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, στη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και στην οξειδωτική ικανότητα του μυός. Τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών δεν μειώθηκαν μετά την παρέμβαση, αλλά ωστόσο μειώθηκε το μέγεθος των σφαιριδίων των ενδομυϊκών λιποειδών. Αν και η φυσιολογική σημασία της αλλαγής αυτής δεν είναι απολύτως γνωστή, ωστόσο οι μεταβολές του μεγέθους των σφαιριδίων των ενδομυϊκών λιποειδών σχετίζονταν με τη βελτίωση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. Οι ερευνητές της μελέτης αυτής υπέθεσαν ότι η μείωση του όγκου των λιποειδικών σφαιριδίων και η παράλληλη αύξηση του αριθμού τους ενδεχομένως αυξάνει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη, κάτι που ενδεχομένως ευνοεί την μεταβολική ενεργότητα των ενδομυϊκών λιποειδών (αύξηση του ρυθμού σύνθεσης και υδρόλυσής τους).

Ουσιαστικά ανύπαρκτες είναι οι μελέτες οι οποίες να έχουν διερευνήσει το ρόλο της μείωσης του σωματικού βάρους στην ποιοτική σύσταση των ενδομυϊκών λιποειδών. Η μόνη σχετική μελέτη έχει διεξαχθεί από τους Houmard και συνεργάτες και περιελάμβανε τη μέτρηση των ενδομυϊκών εστέρων του συνενζύμου A μετά από απώλεια βάρους μέσω γαστρικής παράκαμψης σε παχύσαρκα άτομα (133). Ένα χρόνο μετά την παρέμβαση, αν και τα συνολικά επίπεδα των ενδομυϊκών λιπαρών εστέρων του συνενζύμου A δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση, ωστόσο σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στους εστέρες του παλμιτικού (35%), του στεατικού (17%) και του λινελαϊκού οξέος (30%). Αντίθετα, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των εστέρων του συνενζύμου A με το ελαϊκό και το παλμιτελαϊκό οξύ. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως ποιοτικές και όχι ποσοτικές μεταβολές στα ενδομυϊκά λιποειδή μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη που παρατηρείται με την απώλεια βάρους.

Συμπερασματικά, η διαίτα από μόνη της μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για τη μείωση των ολικών ενδομυϊκών λιποειδών ή των τριγλυκεριδίων, αν η απώλεια βάρους είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από το 10% του σωματικού βάρους. Η άσκηση από μόνη της δε φαίνεται να έχει ευνοϊκές επιδράσεις στη μείωση των επιπέδων των ενδομυϊκών λιποειδών. Αντίθετα, ο

συνδυασμός δίαιτας και άσκησης μπορεί να έχει θετικές επιδράσεις στα ενδομυϊκά λιποειδή. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η μείωση των ενδομυϊκών λιποειδών προϋποθέτει και μια παράλληλη μείωση στην παροχή λιπιδίων από τη συστηματική κυκλοφορία. Είναι χαρακτηριστικό ότι στη μελέτη των Greco και συνεργατών (126), η χολοκυστιδική παράκαμψη, μια παρέμβαση η οποία οδηγεί σε δυσαπορρόφηση των διαιτητικών λιπών, οδήγησε σε σχεδόν πλήρη εξάντληση των ενδομυϊκών λιποειδών, παρά το γεγονός ότι τα εξεταζόμενα άτομα εξακολουθούσαν να είναι παχύσαρκα και κατά το τέλος της παρέμβασης. Επιπρόσθετα, στις βραχυχρόνιες διαιτητικές παρεμβάσεις οι οποίες δεν ανέφεραν βελτίωση στα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών, τα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος παρέμειναν σταθερά (128) ή και αυξήθηκαν (131) κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Είναι επομένως πιθανό η αποτελεσματικότητα μιας παρέμβασης σε ότι αφορά τα ενδομυϊκά λιποειδή να εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της παρέμβασης στο να βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ και κατ' επέκταση την παροχή λιπιδίων στους σκελετικούς μύες.

Στόχοι της παρούσας διατριβής

Παρά την εκτεταμένη έρευνα στο χώρο της ινσουλινοαντίστασης στο σακχαρώδη διαβήτη και στην παχυσαρκία, πολλά ερωτήματα αναμένεται ακόμη να απαντηθούν σε γενετικό, μοριακό και μεταβολικό επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας. Το τελευταίο μάλιστα κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς αποτελεί το ενδιάμεσο στάδιο ανάμεσα στη βασική έρευνα και την πρακτική εφαρμογή της για τη δημιουργία συστάσεων για την πρόληψη ή και τη θεραπεία των καταστάσεων ινσουλινοαντίστασης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η έρευνα η οποία εξετάζει το κατά πόσο τα θετικά αποτελέσματα των εκτεταμένων κλινικών μελετών μπορεί να οφείλονται σε προσαρμογές των ινσουλινο-ευαίσθητων ιστών οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει περισσότερο εντατικοποιημένα πρωτόκολλα παρέμβασης.

Είναι βέβαιο ότι η ινσουλινοαντίσταση που παρατηρείται στο σακχαρώδη διαβήτη και στην παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα της διαταραχής του μεταβολισμού τόσο των υδατανθράκων, όσο και των λιποειδών, με τελικό αποτέλεσμα την έκτοπη αποθήκευση τριγλυκεριδίων στους σκελετικούς μύες. Ωστόσο, τα επίπεδα των ενδιάμεσων μορίων στην πορεία εστεροποίησης των λιπαρών οξέων (και συγκεκριμένα τα διγλυκερίδια) δεν έχουν προσδιοριστεί εκτώς σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης στον άνθρωπο. Τα επίπεδα των ενδιάμεσων αυτών μορίων θα μπορούσαν να αυξηθούν ως αποτέλεσμα της αύξησης του ρυθμού εστεροποίησης των λιπαρών

οξέων που εισέρχονται στο μυϊκό κύτταρο από τη συστηματική κυκλοφορία, της αύξησης του ρυθμού υδρόλυσης των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων, ή και ως αποτέλεσμα της αδυναμίας του μυϊκού κυττάρου να αποθέσει περαιτέρω λιπαρά οξέα στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια, όταν τα τελευταία φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγιστο επίπεδο. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει ο προσδιορισμός της ποιοτικής σύστασης των μορφών αυτών λιποειδών (δηλαδή η ποιοτική σύστασή τους σε λιπαρά οξέα), καθώς θα παρέχει πληροφορίες για την ικανότητα κάθε λιπαρού οξέος, ανάλογα με το βαθμό κορεσμού του και το μήκος της ανθρακικής του αλυσίδας, να προωθείται είτε προς την οξείδωσή του, είτε προς την αποθήκευσή του στη δεξαμενή των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων, είτε να παραμένει σε ενδιάμεση μορφή στη δεξαμενή των διγλυκεριδίων, ή και πιθανώς και σε άλλες μορφές ενδομυϊκών λιποειδών.

Στον άνθρωπο, δεν έχει επίσης διερευνηθεί το κατά πόσο διάφοροι μύες, με διαφορετική λειτουργικότητα και ενδεχομένως και διαφορετική ιστοχημική εικόνα, μπορούν να εμφανίζουν ινσουλινοαντίσταση σε ένα συστηματικό περιβάλλον που θα μπορούσε να ευνοεί την εμφάνισή της. Για παράδειγμα, υπάρχουν μύες οι οποίοι παρουσιάζουν συνεχή λειτουργία, όπως οι εισπνευστικοί μύες, και μύες οι οποίοι ενεργοποιούνται περιστασιακά, ανάλογα με τη βούληση του ανθρώπου. Το μυοκάρδιο αποτελεί έναν ειδικό τύπο μυϊκού ιστού ο οποίος επίσης μπορεί να επηρεαστεί από την ινσουλινοαντίσταση. Ο προσδιορισμός του βαθμού συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιποειδών σε διαφορετικούς μυϊκούς ιστούς, ως μέτρο του σχετικού βαθμού ινσουλινοαντίστασης, είναι κάτι που δεν έχει διερευνηθεί ως τώρα.

Σε ότι αφορά τις παρεμβάσεις οι οποίες έχουν ως στόχο τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, και οι οποίες περιλαμβάνουν συνήθως τη μείωση του σωματικού βάρους μέσω δίαιτας ή το συνδυασμό δίαιτας και άσκησης, δεν είναι γνωστό κατά πόσο οι θετικές επιδράσεις τους στο γλυκαιμικό έλεγχο και στην ευαισθησία στην ινσουλίνη μεσολαβούνται από τη μείωση των διγλυκεριδίων ή και σε ποιοτικές μεταβολές στη σύσταση τόσο των διγλυκεριδίων, όσο και των τριγλυκεριδίων.

Με βάση τα παραπάνω κενά στις γνώσεις μας στο θέμα της ινσουλινοαντίστασης, οι στόχοι της παρούσας διατριβής μπορεί να συνοψιστούν στα ακόλουθα:

1. Να προσδιοριστεί ο βαθμός συσσώρευσης των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε διάφορες καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης, και συγκεκριμένα σε παχύσαρκα άτομα και σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (με ή χωρίς την παρουσία παχυσαρκίας).

2. Να προσδιοριστεί ο βαθμός συσσώρευσης των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων και η ποιοτική τους σύσταση σε μύες με διαφορετική λειτουργικότητα και διαφορετική ιστοχημική εικόνα σε άτομα προχωρημένης ηλικίας, οι οποίοι ως γνωστό θα παρουσιάζουν κάποιου βαθμού μείωση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη.
3. Να αξιολογηθεί το κατά πόσο ένα πρόγραμμα απώλειας βάρους μειώνει τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και μεταβάλλει τη σύσταση τόσο των διγλυκεριδίων, όσο και των τριγλυκεριδίων σε παχύσαρκα - διαβητικά άτομα.

Μελέτες της παρούσας διατριβής

Με βάση τους στόχους οι οποίοι εκτέθηκαν παραπάνω, η παρούσα διατριβή μπορεί να υποδιαιρεθεί στις ακόλουθες αντίστοιχες μελέτες:

1η Μελέτη: Πρωτυποποίηση πειραματικών διαδικασιών για την εύρεση ενός ενιαίου πρωτοκόλλου για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των ενδομυϊκών λιπιδίων (τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια)

2^η Μελέτη: Δια-πληθυσμιακή σύγκριση των επιπέδων και της ποιοτικής σύστασης των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε παχύσαρκα άτομα και διαβητικά άτομα, με ή χωρίς παχυσαρκία

3^η Μελέτη: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε μύες με διαφορετικού βαθμού κινητοποίηση και λειτουργικότητα σε διαβητικά και μη διαβητικά άτομα

4^η Μελέτη: Η επίδραση της απώλειας του 10% του βάρους στα επίπεδα και την ποιοτική σύσταση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II

1^η Μελέτη

Πρωτυποποίηση πειραματικών διαδικασιών για την εύρεση ενός ενιαίου πρωτοκόλλου για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των ενδομυϊκών λιποειδών (τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια)

Εισαγωγή

Ανάμεσα στις διάφορες μεθοδολογίες που υπάρχουν για τον προσδιορισμό των ενδομυϊκών λιποειδών, η βιοχημική εκχύλιση των λιποειδών είναι πλεονεκτική για τους στόχους της παρούσας εργασίας, καθώς επιτρέπει το σαφή διαχωρισμό των διαφόρων τάξεων λιποειδών για την ποσοτικοποίησή τους. Μέθοδοι όπως η πυρηνική μαγνητική αντήχηση ή η ιστοχημεία, εκτός του ότι απαιτούν ειδικό και δαπανηρό εξοπλισμό, έχουν το μειονέκτημα ότι ενδεχομένως δε διαχωρίζουν τις διάφορες τάξεις λιποειδών και ιδιαίτερα τους εστέρες της γλυκερόλης.

Ωστόσο, η βιοχημική εκχύλιση των ενδομυϊκών λιποειδών παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς. Ο κυριότερος από αυτούς είναι η διακύμανση η οποία παρατηρείται στη μέτρηση των ενδομυϊκών λιποειδών. Ο Πίνακας 1.1 παρουσιάζει τις τιμές τριγλυκεριδίων από διάφορες μελέτες σε υγιείς ανθρώπους. Αν και οι διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις διάφορες μελέτες μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία που χρησιμοποιεί κάθε εργαστήριο, ωστόσο, η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται σε κάθε μελέτη χωριστά είναι επίσης πολύ υψηλή. Η διακύμανση αυτή ενδεχομένως οφείλεται στην ετερογένεια των μυϊκών ινών στο σημείο της βιοψίας (με αποτέλεσμα σε κάποιες βιοψίες να λαμβάνεται μεγαλύτερο ποσοστό ινών τύπου I από ότι II και αντίθετα) ή σε πιθανή επιμόλυνση του δείγματος από λιποκύτταρα (144). Με δεδομένο ότι ο μυϊκός ιστός περιέχει τριγλυκερίδια σε ποσοστό περίπου 1%, ενώ τα λιποκύτταρα σχεδόν κατά 100% (136), οποιαδήποτε βαθμού τέτοια επιμόλυνση μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα. Υψηλή διακύμανση έχει παρατηρηθεί στον προσδιορισμό των ενδομυϊκών λιποειδών και κατά τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων από το ίδιο δείγμα μυϊκού ιστού, ενώ ο μικρο-ανατομικός καθαρισμός του δείγματος από το λίπος που βρίσκεται μεταξύ των μυϊκών ινών με τη χρήση στερεοσκοπικού μικροσκοπίου μπορεί να μειώσει τη διακύμανση (συντελεστής μεταβλητότητας) στο 10-20% (144). Η λυοφιλοποίηση (ξήρανση υπό ψύξη) του μυϊκού ιστού αποτελεί έναν εύκολο και πρακτικό τρόπο μικρο-ανατομικού καθαρισμού του δείγματος. Μια μελέτη έχει δείξει ότι με τη χρήση λυοφιλοποίησης και μικροσκοπικού καθαρισμού του μυϊκού ιστού από λιποκύτταρα και συνδετικό ιστό η διακύμανση στη μέτρηση των τριγλυκεριδίων ανάμεσα σε τρεις επαναλαμβανόμενες βιοψίες σε συνθήκες ηρεμίας είναι της τάξης του 19.8% (145). Αυτή η τιμή διακύμανσης είναι από τις

μικρότερες που έχουν αναφερθεί στη μέτρηση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων (Πίνακας 1.1). Ανάλογα δεδομένα για τη μέτρηση άλλων τάξεων λιποειδών στο μυϊκό ιστό δεν υπάρχουν.

Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες

Αν και το κομμάτι αυτό της παρούσας διατριβής δεν μπορεί να χαρακτηριστεί καινοτόμο, με την έννοια ότι τα αποτελέσματά του δεν αποτελούν νέα γνώση, ωστόσο αποτελεί ίσως το σημαντικότερο τμήμα της, καθώς η ανεύρεση ενός ενιαίου πρωτοκόλλου προσδιορισμού των ενδομυϊκών λιποειδών από την αρχή και χωρίς να υπάρχει προηγούμενη εμπειρία στο εργαστήριο υπήρξε ιδιαίτερα κοπιαστική και χρονοβόρα. Είναι σαφές ότι για να γίνει κάτι τέτοιο εφικτό πραγματοποιήθηκαν πολυάριθμες προκαταρκτικές δοκιμές οι οποίες δεν είναι δυνατό να καταγραφούν. Αντί αυτού στη συνέχεια του κεφαλαίου θα περιγραφούν με συντομία τα στάδια του τελικού πρωτοκόλλου το οποίο επιλέχθηκε και οι δοκιμές που έγιναν για την εκτίμηση της συνολικής ευαισθησίας και της επαναληψιμότητάς του.

Λυοφιλοποίηση δειγμάτων μυϊκού ιστού

Τα υπό εξέταση δείγματα διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο από τη στιγμή της λήψης τους μέχρι την έναρξη της επεξεργασίας τους. Περίπου 80 mg ιστού τοποθετήθηκαν αμέσως (και χωρίς να ξεπαγώσουν) σε ξεχωριστά διάτρητα σωληνάκια, τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε λυοφιλοποιητή κενού και χαμηλής θερμοκρασίας (MicroModulyo, Thermo Savant, Holbrook, NY, USA). Η θερμοκρασία της λυοφιλοποίησης ήταν -50°C και η συνολική χρονική διάρκειά της 24 ώρες. Μετά το πέρας του 24ώρου, τα δείγματα θρυμματίστηκαν και εξετάστηκαν κάτω από στερεοσκοπικό μικροσκόπιο (Olympus SZ61, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), υπό μεγέθυνση $\times 10$. Τα μη μυϊκά συστατικά του δείγματος (αίμα, συνδετικός ιστός, λιπώδης ιστός) απομακρύθηκαν από το δείγμα και στη συνέχεια οι καθαρές, πλέον, μυϊκές ίνες ζυγίστηκαν σε εργαστηριακό ζυγό ακρίβειας 5 δεκαδικών ψηφίων του γραμμαρίου (AG 135, Mettler Toledo GmbH, Im Langacher, Switzerland).

Εκχύλιση ολικών λιποειδών

Τα λιποειδή των δειγμάτων εκχυλίστηκαν με χρήση μίγματος χλωροφορμίου – μεθανόλης, έτσι όπως έχει περιγραφεί από τους Folch και συνεργάτες (146). Εν συντομία, τα προζυγισμένα λυοφιλοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ερμητικό καπάκι και στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL μεθανόλης και 2 mL χλωροφορμίου. Προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή οξείδωση των λιποειδών χρησιμοποιήθηκε βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουένιο ως αντιοξειδωτικό, το οποίο διαλύθηκε στη χρησιμοποιούμενη μεθανόλη, σε συγκέντρωση 0.01%

w/v (μάζα/όγκο). Τα δείγματα αφέθηκαν σε συνεχή ανάδευση για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης εκχύλιση των ενδοκυτταρικών λιποειδών. Μόλις τα στάδια αυτά ολοκληρώθηκαν, στο μίγμα προστέθηκε 1 mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου, συγκέντρωσης 0.05 M και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 3000 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία δωματίου. Η άνω (υδατική) φάση απομακρύνθηκε, ενώ η κάτω φάση (χλωροφορμική, η οποία περιείχε σε διάλυση τα λιποειδή) μεταφέρθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα δείγματα στη συνέχεια αποξηράνθηκαν σε φυγόκεντρο κενού (AES 1010 SpeedVac System, Thermo Savant, Holbrook, NY, USA), χωρίς την προσθήκη επιπλέον θερμότητας και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 300 μ L χλωροφορμίου.

Διαχωρισμός των διαφόρων τάξεων λιποειδών

Ο διαχωρισμός των διαφόρων τάξεων λιποειδών έγινε με εκχύλιση στερεής φάσης, έτσι όπως έχει προταθεί από τους Kaluzny και συνεργάτες (147). Το πρωτόκολλο αυτό είναι πλεονεκτικότερο σε σχέση με άλλες βιοχημικές μεθόδους, όπως η χρωματογραφία στήλης, καθώς έχει μεγάλη απόδοση, είναι απλό και επιπλέον δεν απαιτεί ιδιαίτερη κατεργασία του δείγματος για την απομάκρυνση των φωσφολιποειδών. Εν συντομία, η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια, στα οποία εκλούνται αντίστοιχα όλα τα ουδέτερα λιποειδή, τα τριγλυκερίδια και τέλος τα διγλυκερίδια. Αναλυτικά, οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες και τα αντίστοιχα εκλούσματα σε κάθε φάση περιγράφονται στον Πίνακα 1.2. Μεταξύ της πρώτης και δεύτερης φάσης μεσολάβησε αποξήρανση του εκλούσματος και επαναδιαλυτοποίηση σε εξάνιο. Οι στήλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν χωρητικότητας 3 mL και περιείχαν πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) ως στερεή φάση, στο οποίο είχαν προσδεθεί αμινοπροπυλο-ομάδες (Supelclean LC-NH₂ SPE Tubes, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Για τη βελτιστοποίηση της εκλουστικής ικανότητας των στηλών σε όλες τις στήλες εφαρμόστηκε αρχικά μια προπαρασκευαστική πλύση με 2 mL εξανίου εις διπλούν. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή εκχύλισης στερεής φάσης, υπό την εφαρμογή μικρής πίεσης (περίπου 0.01 Atm).

Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων λιποειδών

Η περαιτέρω επεξεργασία των υπό εξέταση λιποειδικών κλασμάτων περιλαμβάνει υδρόλυση των λιπαρών οξέων και μεθυλεστεροποίηση, με αντίδραση τριφθοριούχου βορίου (148). Εν συντομία, τα εκλούσματα της προηγούμενης φάσης τα οποία περιείχαν τα υπό εξέταση λιποειδή (τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια) αποξηράνθηκαν σε φυγόκεντρο κενού (σε θερμοκρασία δωματίου) μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ερμητικά καπάκια. Μετά την πλήρη αποξήρανση

των δειγμάτων προστέθηκε 1 mL του κατάλληλου αντιδραστηρίου και τα δείγματα θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C. Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Για τα τριγλυκερίδια (v/v/v):

25% τριφθοριούχου βορίου σε μεθανόλη (140 g BF₃ ανά L μεθανόλης)

20% βενζόλιο

55% μεθανόλη

Για τα διγλυκερίδια :

τριφθοριούχο βόριο σε μεθανόλη (140 g BF₃ ανά L μεθανόλης)

Ο χρόνος θέρμανσης για τα τριγλυκερίδια ήταν 30 λεπτά, ενώ για τα διγλυκερίδια 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και ψύχθηκαν μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου κάτω από ροή νερού. Ακολούθησε προσθήκη δύο όγκων πεντανίου και ενός όγκου απεσταγμένου νερού, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία δωματίου. Η άνω φάση του μίγματος (πεντάνιο) μεταφέρθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και τα δείγματα αποξηράνθηκαν σε φυγόκεντρο κενού. Τα δείγματα τέλος επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μικρή ποσότητα εξανίου (100 μL) και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια αερίας χρωματογραφίας.

Ποσοτικός προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων μεθυλεστέρων της προηγούμενης φάσης έγινε με αέρια χρωματογραφία (GC System, 6890A Series, G1540A, Agilent Technologies, Wilmington, Denver, USA). Για τον διαχωρισμό των διαφόρων μοριακών βαρών μεθυλεστέρων χρησιμοποιήθηκε μια ιδιαίτερα πολική τριχοειδική στήλη, συνολικού μήκους 50 m και διαμέτρου 0,25 μm, και της οποίας τα τοιχώματα είναι καλυμμένα με (50% κυανοπροπυλο-) πολυδιμεθυλοσιλοξάνια (DB23 GC Column, Agilent Technologies, Wilmington, Denver, USA). Η ανίχνευση των εκλουόμενων μεθυλεστέρων έγινε με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας στους 280°C. Οι συνθήκες της αερίας χρωματογραφίας διαμορφώθηκαν ως εξής:

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 130°C (1 min) στους 170°C με ρυθμό 5°C/min, στους 215°C με ρυθμό 2,75°C/min, διατήρηση για 12 min, στους 230°C με ρυθμό 5°C/min, διατήρηση για 2 min
Φέρων μέσο: ήλιο, υπό σταθερό ρυθμό 23 cm/sec

Εισαγωγέας: 1 μL δείγματος, με λόγο διαχωρισμού 50:1 και 10:1 για τα τριγλυκερίδια και τα διγλυκερίδια αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 230°C.

Η διαχωριστική ικανότητα των συνθηκών αυτών για ένα μίγμα 37 μεθυλεστέρων, μαζί με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης, παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.1.

Η βαθμονόμηση της μεθόδου ποσοτικής μέτρησης των παραγόμενων μεθυλεστέρων έγινε χρησιμοποιώντας ως πρότυπα βαθμονόμησης τρεις αραιώσεις μίγματος μεθυλεστέρων γνωστής σύστασης (γραμμική καμπύλη τριών σημείων). Το μίγμα μεθυλεστέρων το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των προτύπων αυτών είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο το οποίο περιέχει συνολικά 37 μεθυλεστέρες, διαφόρων μοριακών βαρών και διαφόρων επιπέδων κορεσμού (Supelco 37 Component FAME Mix, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Οι συγκεντρώσεις των τριών προτύπων για κάθε τάξη των εξεταζόμενων λιποειδών καθορίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεντρώσεις των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων που υπήρχαν στη βιβλιογραφία κατά τη χρονική στιγμή προτυποποίησης του παρόντος πρωτοκόλλου (Πίνακας 1.1), με ένα εύρος το οποίο θα διασφάλιζε σε υψηλό βαθμό τη γραμμικότητα στις καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε μεθυλεστέρα (συντελεστής συσχέτισης $R^2 > 0,990$).

Ο προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων και των διγλυκεριδίων έγινε διαιρώντας το άθροισμα της μοριακής συγκέντρωσης των ανιχνευθέντων μεθυλεστέρων κάθε λιποειδικής κλάσης δια του τρία και δύο αντίστοιχα (η υδρόλυση ενός τριγλυκεριδίου και ενός διγλυκεριδίου δίνει αντίστοιχα τρεις και δύο μεθυλεστέρες). Οι τελικές συγκεντρώσεις εκφράστηκαν ως προς την ποσότητα του αρχικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε (nmol/mg ξηρού βάρους μυϊκού ιστού).

Ευαισθησία του Πρωτοκόλλου

Η μέτρηση της ευαισθησίας του πρωτοκόλλου στο σύνολό του έγινε με την εφαρμογή του σε τρία μίγματα ουδέτερων λιποειδών γνωστής συγκέντρωσης. Οι εστέρες της γλυκερόλης οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν ο καθένας τα ίδια λιπαρά οξέα, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός τους μέσω της αέριας χρωματογραφίας.

Συγκεκριμένα, για την παρασκευή των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε το τριγλυκερίδιο του μυριστικού οξέος, το διγλυκερίδιο του ελαϊκού οξέος, το μονογλυκερίδιο του λαυρικού οξέος και το λινελαϊκό οξύ. Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατή η εκτίμηση όχι μόνο του βαθμού ανάκτησης των μετρούμενων λιποειδών (τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια), όσο και της πιθανής επιμόλυνσης του τελικού παρασκευάσματος από άλλες τάξεις ουδέτερων λιποειδών. Στα μίγματα αυτά δεν προστέθηκαν πολικά λιποειδή, θεωρώντας ότι έστω και μικρού βαθμού επιμόλυνση των τελικών παρασκευασμάτων από αυτά είναι απίθανη, καθώς η σημαντική διαφορά στην πολικότητά τους, σε σύγκριση με τα ουδέτερα λιποειδή, κάνει την απομάκρυνσή

τους πλήρη. Τα μίγματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις υπερκαθάρων ουσιών, κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι συγκεντρώσεις των τριγλυκεριδίων και των διγλυκεριδίων να είναι κοντά στις τιμές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, στο ένα μίγμα (Μίγμα 1) οι επιθυμητές ποσότητες των τριγλυκεριδίων και των διγλυκεριδίων υπολογίστηκαν έτσι ώστε να είναι ίσες με αυτές που θα περιέχονταν σε 80 mg ανθρώπινου μυϊκού ιστού, βάσει των αντίστοιχων τιμών της βιβλιογραφίας (Πίνακας 1.1). Κάτι τέτοιο έγινε με τη λογική ότι τα 80 mg είναι μια ποσότητα η οποία μπορεί να ληφθεί με σχετική βεβαιότητα κατά τη βιοψία με βελόνα βιοψίας, όπως θα περιγραφεί στις υπόλοιπες μελέτες. Οι επιθυμητές ποσότητες στα Μίγματα 2 και 3 καθορίστηκαν με τρόπο που να εξασφαλίζουν ένα λογικό εύρος τιμών, σε σχέση με τη μέση τιμή των ποσοτήτων του Μίγματος 1. Οι συγκεντρώσεις του μονογλυκεριδίου και του λιπαρού οξέος που προστέθηκαν ήταν ίδιες με αυτές του διγλυκεριδίου. Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις, οι διαδοχικές αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν και οι πραγματικές τελικές συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το χλωροφόρμιο.

Τα μίγματα αυτά αποξηράνθηκαν σε φυγόκεντρο κενού και στη συνέχεια ακολούθησε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω μέχρι τη λήψη παρασκευσμάτων τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων, τα οποία στη συνέχεια μετρήθηκαν με αέρια χρωματογραφία.

Επαναληψιμότητα του Πρωτοκόλλου

Η επαναληψιμότητα του πρωτοκόλλου εκτιμήθηκε με διαδοχικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος και υπολογισμό της διακύμανσης των μετρήσεων. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε μικτός μυϊκός ιστός ποντικών της σειράς Wistar. Συγκεκριμένα, μια σχετική μεγάλη ποσότητα μυϊκού ιστού λυοφιλοποιήθηκε, αναμίχθηκε και στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο σε 5 δείγματα των 20 mg (ξηρού ιστού). Η ποσότητα αυτή επιλέχθηκε θεωρώντας ότι η λυοφιλοποίηση οδηγεί σε μείωση του βάρους του υγρού μυϊκού ιστού κατά 75% και κατά συνέπεια το αρχικό υγρό βάρος του δείγματος ήταν περίπου 80 mg, δηλαδή ίδιο με αυτό που θα ληφθεί στις επόμενες μελέτες.

Αποτελέσματα

Το Σχήμα 1.2 παρουσιάζει τη σχέση ανάμεσα στις πραγματικές ποσότητες και στις μετρούμενες ποσότητες του τριγλυκεριδίου στα Μίγματα 1-3. Η γραμμικότητα της σχέσης αυτής αποδίδεται από την εξίσωση:

$$y = 0.816x + 145.8$$

με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.997$.

Η μέση τιμή του βαθμού ανάνηψης του τριγλυκεριδίου ήταν της τάξης του 101.5%. Μηδενική επιμόλυνση παρατηρήθηκε στο κλάσμα των τριγλυκεριδίων από τα άλλα ουδέτερα λιποειδή που περιέχονταν στα τρία μίγματα.

Η σχέση πραγματικών και μετρούμενων τιμών για το διγλυκερίδιο απεικονίζεται στο Σχήμα 1.3 και περιγράφεται από τη γραμμική εξίσωση:

$$y = 0.794x + 0.428$$

με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.997$.

Και στην περίπτωση του διγλυκεριδίου, η μέση τιμή του βαθμού ανάνηψης ήταν σημαντική, της τάξης του 92.2%. Η επιμόλυνση στο κλάσμα των διγλυκεριδίων από το τριγλυκερίδιο ήταν 0.07%, από το λιπαρό οξύ 13.84%, ενώ δεν παρατηρήθηκε επιμόλυνση από το μονογλυκερίδιο.

Τα Σχήματα 1.4 και 1.5 παρουσιάζουν τη διακύμανση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του ίδιου δείγματος μυϊκού ιστού για τα δύο λιποειδή. Ο συντελεστής διακύμανσης των μετρήσεων ήταν 11.74% για τα τριγλυκερίδια και 12.89% για τα διγλυκερίδια.

Σχολισμός - Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη προτυποποιήθηκε ένα ενιαίο πρωτόκολλο για τη μέτρηση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων. Τα ποσοτικά αποτελέσματα δείχνουν σε γενικές γραμμές ότι το πρωτόκολλο αυτό είναι αξιόπιστο και επαναλήψιμο.

Ο βαθμός ανάνηψης των υπό εξέταση λιποειδών ήταν ουσιαστικά πλήρης, ενώ η επιμόλυνση από άλλες τάξεις λιποειδών ήταν επίσης μικρή, έως μηδενική. Θα πρέπει βέβαια να σημειώσουμε ότι οι μετρήσεις αυτές έγιναν σε πρότυπα δείγματα, τα οποία ήταν ελεύθερα κυτταρικών συστατικών τα οποία θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τα εκχυλιζόμενα λιποειδή και να περιορίσουν την ποσοτική απομόνωσή τους. Ωστόσο, ένα τέτοιο ενδεχόμενο αποτελεί έναν σταθερό συγχυτικό παράγοντα, ο οποίος δεν μπορεί να αποκλειστεί με κάποια μέθοδο και επιπλέον δεν μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό την αξιοπιστία των συγκρίσεων μεταξύ ατόμων στις επόμενες μελέτες.

Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί πως αν και η παρατηρούμενη διακύμανση των μετρήσεων ήταν σχετικά μεγάλη, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές έχουν εξ ορισμού μεγάλη διακύμανση. Στην πραγματικότητα, η διακύμανση που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή στη μέτρηση των τριγλυκεριδίων είναι από τις χαμηλότερες που έχουν αναφερθεί στη σχετική βιβλιογραφία (Πίνακας 1.1).

Πίνακες και Γραφήματα

Πίνακας 1.1: Επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών από βιοψίες σε υγιείς ανθρώπους σε διάφορες μελέτες

Αναφορά	Μέσος	Τ.Α. ¹	Σ.Μ. ²
Τριγλυκερίδια			
Carlson et al, <i>Eur. J. Clin. Invest.</i> , 1971 (134)	10.4	4.6	44
Essen et al, <i>Acta Physiol. Scand.</i> , 1975 (135)	28.1	13.2	47
Guo et al, <i>J. Lipids Res.</i> , 2001 (136)	4.4	0.7	16
Pan et al, <i>Diabetes</i> , 1997 (79)	5.5	/	/
Standl et al, <i>Diabetologia</i> , 1980 (137)	2.7	0.9	33
Froberg, <i>Acta Med. Scand.</i> , 1973 (138)	5.9	0.3	5
Hurley et al, <i>J. Appl. Physiol.</i> , 1986 (139)	11.8	1.5	13
Kiens et al, <i>J. Physiol. (London)</i> , 1993 (140)	4.3	/	/
Hopp et al, <i>Metabolism</i> , 1991 (141)	3.4	0.2	6
Froberg et al, <i>Eur. J. Clin. Invest.</i> , 1978 (142)	4.9	1.7	35
Phillips et al, <i>Metabolism</i> , 1996 (143)	33.9	/	14
<i>Μέση Τιμή Ερευνών</i>	<i>10.48</i>	<i>2.9</i>	<i>23.7</i>
Διγλυκερίδια			
Itani et al, <i>Diabetes</i> , 2002 (95)	0.05	/	/

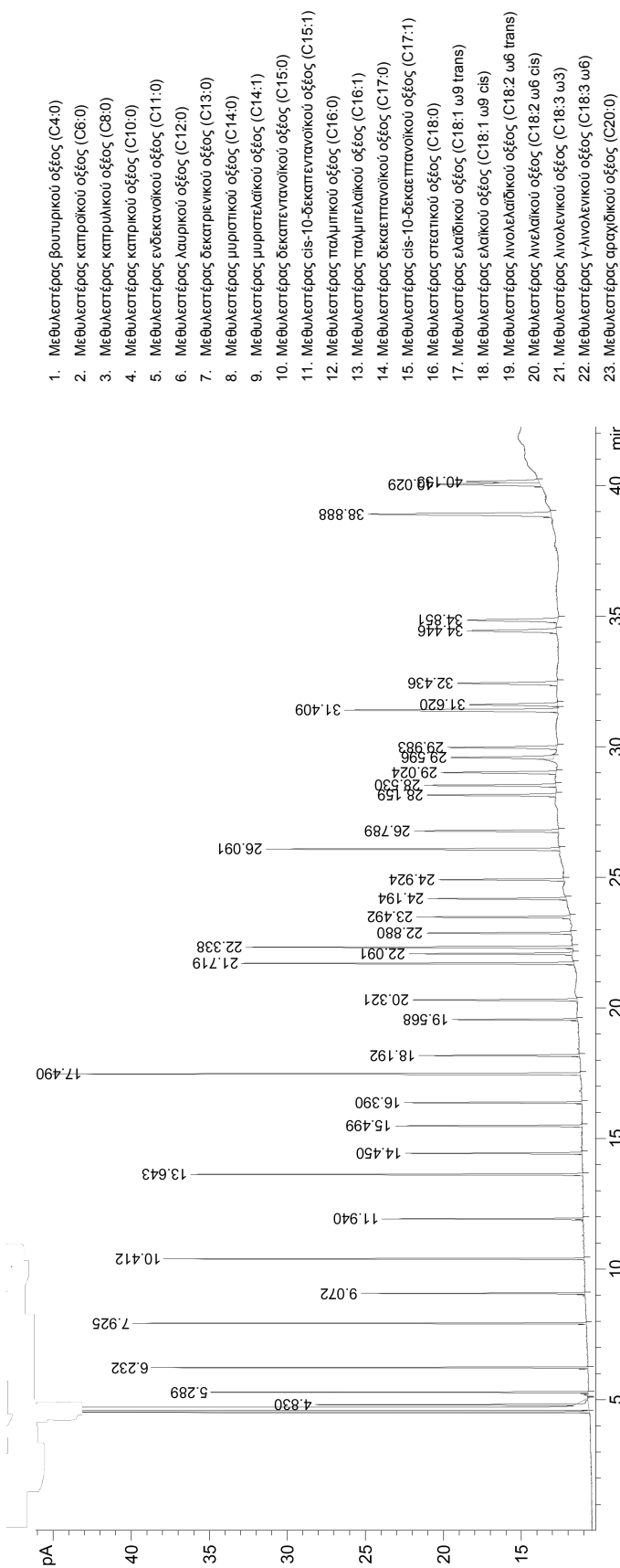
Οι τιμές είναι σε nmol/mg μυϊκού ιστού, 1 Τυπική Απόκλιση, 2 Συντελεστής Μεταβλητότητας (Μέσος/Τυπική Απόκλιση),
προσδιορίζεται

/: δεν

Πίνακας 1.2: Πρωτόκολλο εκχύλισης στερεής φάσης

Διαλύτες – Εκχυλιστές	Ποσότητα	Λιποειδή στο Έκλουσμα
<i>Προπαρασκευή στήλης: 2 mL εξανίου x2</i>		
Φόρτωση δείγματος: ολικά λιποειδή διαλυτοποιημένα σε 300 mL χλωροφορμίου		
χλωροφόρμιο – προπανοδιόλη (2:1 v/v)	4 mL	Έκλουσμα I: ουδέτερα λιποειδή
2% ακετοξικό οξύ σε διαιθυλαιθέρα (v/v)	4 mL	Έκλουσμα II: λιπαρά οξέα
μεθανόλη	4 mL	Έκλουσμα III: φωσφολιποειδή
<i>Νέα στήλη (προπαρασκευασμένη)</i>		
Φόρτωση δείγματος: Έκλουσμα I, επαναδιαλυτοποιημένο σε 200 mL εξανίου		
εξάνιο	4 mL	Έκλουσμα IV: εστέρες χοληστερόλης
<i>Νέα στήλη (προπαρασκευασμένη) κάτω από την υπάρχουσα</i>		
1% διαιθυλαιθέρας, 10% μεθυλενοχλωρίδιο σε εξάνιο (v/v)	6 mL	Έκλουσμα V: τριγλυκερίδια
5% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο (v/v)	12 mL	Έκλουσμα VI: χοληστερόλη
<i>Διαχωρισμός στηλών, συνέχεια σε άνω στήλη</i>		
15% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο (v/v)	4 mL	Έκλουσμα VII: διγλυκερίδια
Χλωροφόρμιο – μεθανόλη (2:1 v/v)	4 mL	Έκλουσμα VIII: μονογλυκερίδια

Πηγή: Kaluzny et al, 1985 (147)



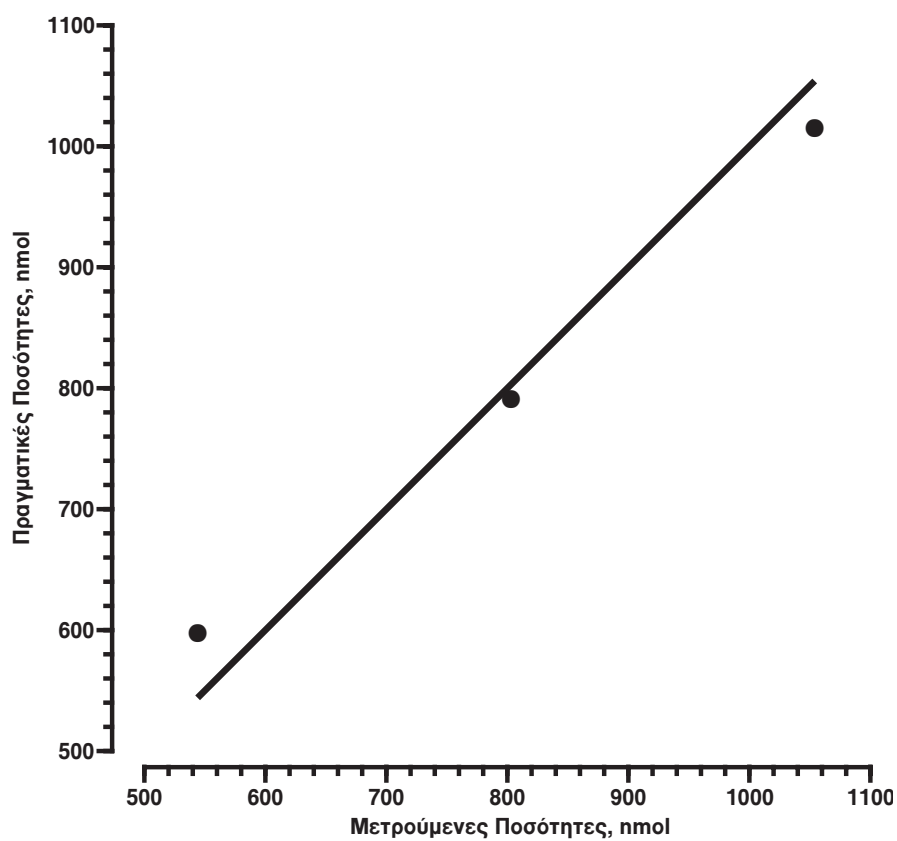
Σχήμα 1.1: Χρωματογράφημα μίγματος 37 μεθυλεστέρων υπό τις συνθήκες του πειράματος.

Οι τιμές σε κάθε κορυφή αντιπροσωπεύουν το χρόνο έκλουσης κάθε μεθυλεστέρα.

Πίνακας 1.3: Παρασκευή πρότυπων δειγμάτων για την εκτίμηση της ευαισθησίας του πρωτοκόλλου

Μιγμα	Επιθυμητή Ποσότητα	Διάλυση Πρωτύπου			Αραίωση		
		M	V ₁	C ₁	V ₂	V ₃	C ₂
Τριγλυκερίδιο (Τριμυριστίνη)							
1	800	0.500	41.0	16863.66	0.5	10.5	803.03
2	560	0.500	41.0	16863.66	0.5	15.5	543.99
3	1040	0.500	41.0	16863.66	0.5	8.0	1053.98
Διγλυκερίδιο (Διελαιΐνη)							
1	4	0.050	50.0	1610.33	0.1	40.1	4.02
2	2	0.050	50.0	1610.33	0.1	80.1	2.01
3	6	0.050	50.0	1610.33	0.1	27.1	5.94
Μονογλυκερίδιο (Μονολαυρίνη)							
1	4	0.100	200.0	1822.16	0.1	40.1	4.54
2	2	0.100	200.0	1822.16	0.1	80.1	2.28
3	6	0.100	200.0	1822.16	0.1	27.1	6.72
Λιπαρό Οξύ (Λινολενικό Οξύ)							
1	4	0.050	100.0	1795.78	0.1	40.1	4.48
2	2	0.050	100.0	1795.78	0.1	80.1	2.24
3	6	0.050	100.0	1795.78	0.1	27.1	6.63

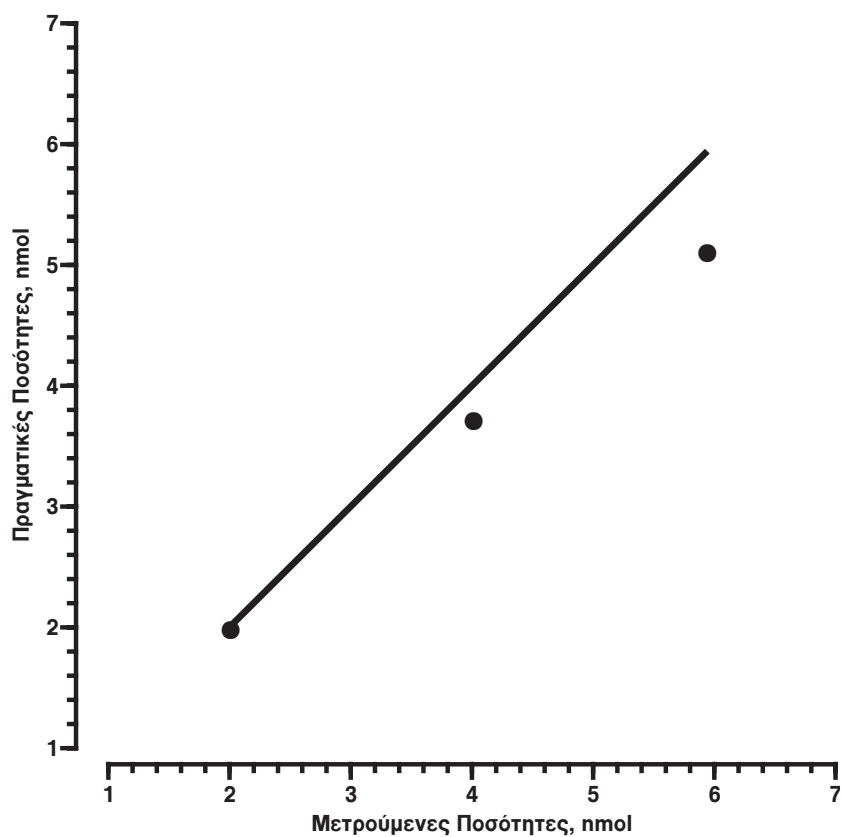
Επιθυμητή Ποσότητα σε nmol, M: μάζα πρότυπης ουσίας που χρησιμοποιήθηκε (σε g), V₁: όγκος διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος (σε mL), V₂: όγκος αρχικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε (σε mL), V₃: όγκος τελικού διαλύματος (σε mL), C₁ και C₂: συγκεντρώσεις αρχικού και τελικού διαλύματος αντίστοιχα (σε nmol/mL)



Σχήμα 1.2. Μετρούμενες ποσότητες σε σχέση με τις πραγματικές ποσότητες του τριγλυκεριδίου των πρότυπων μιγμάτων 1-3.

Η γραμμή αντιπροσωπεύει την πλήρη ταύτιση πραγματικών και μετρούμενων τιμών ($y=x$).

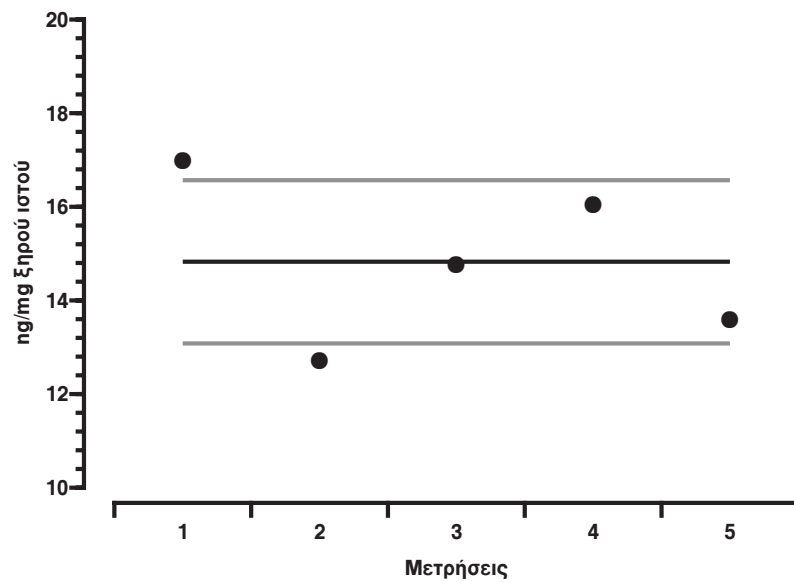
Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όσο δύο μετρήσεων στα μίγματα 1-3.



Σχήμα 1.3. Μετρούμενες ποσότητες σε σχέση με τις πραγματικές ποσότητες του διγλυκεριδίου των πρότυπων μιγμάτων 1-3.

Η γραμμή αντιπροσωπεύει την πλήρη ταύτιση πραγματικών και μετρούμενων τιμών ($y=x$).

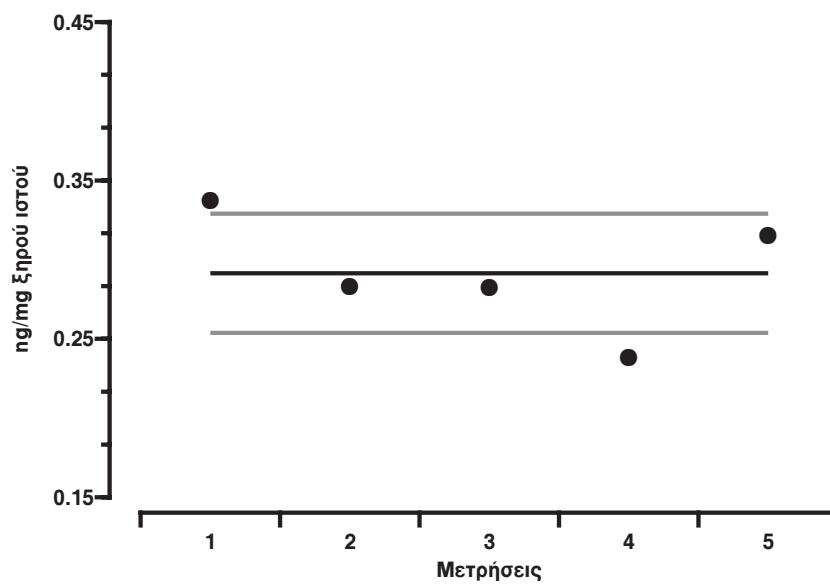
Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όσο δύο μετρήσεων στα μίγματα 1-3.



Σχήμα 1.4. Διακύμανση στη μέτρηση των τριγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό ποντικών.

Η έντονη γραμμή αντιπροσωπεύει την μέση τιμή των μετρήσεων.

Οι γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή συν ή μείον μία τυπική απόκλιση.



Σχήμα 1.5. Διακύμανση στη μέτρηση των διγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό ποντικών.

Η έντονη γραμμή αντιπροσωπεύει την μέση τιμή των μετρήσεων.

Οι γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή συν ή μείον μία τυπική απόκλιση.

2^η Μελέτη

Δια-πληθυσμιακή σύγκριση των επιπέδων και της ποιοτικής σύστασης των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε παχύσαρκα άτομα, και διαβητικά άτομα, με ή χωρίς παχυσαρκία

Εισαγωγή

Η πιθανή σχέση ανάμεσα στα ενδομυϊκά λιποειδή και τη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη έχει περιγραφεί σε πολλές μελέτες οι οποίες αναλύθηκαν λεπτομερώς στο πρώτο κομμάτι της διατριβής αυτής. Αν και υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία να υποδεικνύουν μια πιθανή αιτιολογική σχέση, ωστόσο με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο τα ενδομυϊκά λιποειδή ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη. Για παράδειγμα, ο Van Loon και συνεργάτες, δε βρήκαν κάποια διαφοροποίηση στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια ανάμεσα σε διαβητικά άτομα και μια ομάδα ελέγχου του ίδιου δείκτη μάζας σώματος (149). Αντίθετα, ο Goodpaster και συνεργάτες έχουν αναφέρει διπλάσια επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων σε διαβητικά-παχύσαρκα άτομα, σε σύγκριση με μη διαβητικά-παχύσαρκα άτομα (91). Κάποια δεδομένα δείχνουν ότι τα ενδομυϊκά λιποειδή ενδεχομένως ρυθμίζονται διαφορετικά στο σακχαρώδη διαβήτη, σε σχέση με την παχυσαρκία. Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι η μείωση του σωματικού βάρους μέσω δίαιτας οδήγησε σε σημαντική μείωση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων σε παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, όχι όμως και σε παχύσαρκα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα γλυκαιμικού ελέγχου (150). Από την άλλη μεριά, η σχέση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων τόσο με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, όσο και με το γλυκαιμικό έλεγχο παραμένει σε πολύ μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, καθώς οι υπάρχουσες μελέτες δεν έχουν οδηγήσει σε ομοιογενή αποτελέσματα (97, 98).

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να προσδιοριστούν τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια σε σχέση με την παχυσαρκία και το σακχαρώδη διαβήτη, έτσι ώστε να διευκρινιστεί το κατά πόσο οι δύο αυτές καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης έχουν αθροιστικό ή όχι αποτέλεσμα στη συσσώρευση ενδομυϊκών λιποειδών. Ταυτόχρονα, στόχος της μελέτης αυτής ήταν επίσης να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των υπό εξέταση λιποειδών με τα επίπεδα γλυκαιμικού ελέγχου και την ινσουλινοαντίσταση, τα επίπεδα σωματικού λίπους, δείκτες της οξειδωτικής ικανότητας στο επίπεδο του μυϊκού ιστού αλλά και του οργανισμού στο σύνολό του, το λιπιδαιμικό προφίλ και τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας.

Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες

Συμμετέχοντες

Συνολικά 34 εθελοντές συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη. Οι συμμετέχοντες αυτοί ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την παρουσία ή όχι σακχαρώδη διαβήτη και παχυσαρκίας. Οι ομάδες αυτές ήταν:

- Μη διαβητικά, παχύσαρκα άτομα (nDiab-Ob, n=19)
- Παχύσαρκα άτομα με Διαβήτη Τύπου II (Diab-Ob, n=11)
- Μη παχύσαρκα άτομα με Διαβήτη Τύπου II (Diab-nOb, n=4)

Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στο Πίνακα 2.1. Τα κριτήρια για τη συμμετοχή στη μελέτη περιελάμβαναν τη σταθερότητα σωματικού βάρους για τουλάχιστον ένα χρόνο (όχι αύξηση ή μείωση κατά 3 κιλά) σε όλες τις ομάδες, την μη παρουσία κάποιας νόσου στην ομάδα των παχύσαρκων-μη διαβητικών ατόμων και την απουσία ιατρικώς διαγνωσμένης μακρο- ή μικρο-αγγειοπάθειας στις ομάδες των διαβητικών ατόμων. Αν και όλα τα διαβητικά άτομα ήταν σε θεραπεία με την από το στόματος χορήγηση υπογλυκαιμικών παραγόντων, ωστόσο η χρήση ινσουλίνης ήταν ένα κριτήριο αποκλεισμού από τη μελέτη. Η παρουσία διαβήτη τύπου II καθορίστηκε με βάση τα κριτήρια του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (151) (Πίνακας 2.2). Η παχυσαρκία καθορίστηκε ως δείκτης μάζας σώματος $> 30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ (152).

Η μελέτη διεξήχθη με τα πρότυπα τα οποία καθορίζονται στην τελευταία έκδοση της Διακήρυξης του Ελσίνκι και πήρε έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και την Επιστομική Επιτροπή του Τζανείου Νοσοκομείου. Κάθε εθελοντής ενημερώθηκε λεπτομερώς για τους σκοπούς και πιθανούς κινδύνους που απορρέουν από τη μελέτη και υπγράφηκε ένα συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής (Παράρτημα 1).

Πειραματικός Σχεδιασμός

Οι εξεταζόμενοι επισκέφτηκαν το εργαστήριο ή το Τζάνειο Νοσοκομείο σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, υπό συνθήκες νηστείας (τουλάχιστον 10 ωρών), οι οποίες απείχαν η μία από την άλλη 3-5 ημέρες.

Κατά την πρώτη επίσκεψη στο εργαστήριο λήφθηκε ένα βασικό ιατρικό ιστορικό και κάποια φυσιολογικά χαρακτηριστικά και πραγματοποιήθηκε μια βασική φυσική εξέταση. Το βάρος και το ύψος μετρήθηκαν με ακρίβεια 100 g και 0.5 cm, χωρίς παπούτσια, υπό ελαφρύ ρουχισμό, με χρήση μηχανικού ζυγού ακριβείας και αναστημομέτρου (Seca 711 και Seca 220,

Seca, Hamburg, Germany). Επίσης μετρήθηκε η σύσταση σώματος με απορροφησιμετρία ακτίνων X διπλής ενέργειας (μοντέλο DPX-MD, Lunar Corp., Madison, Wisconsin, USA). Η σάρωση του σώματος έγινε σε μεσαία ταχύτητα και τα αποτελέσματα λήφθηκαν με τη χρήση αντίστοιχου λογισμικού (έκδοση 1.3z, Lunar Corp., Madison, Wisconsin, USA). Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση του βασικού μεταβολισμού με έμμεση θερμιδομετρία ανοιχτού κυκλώματος (Vmax 229D, SensorMedics, Yorba Linda, California, USA) για 30 λεπτά και υπό την προϋπόθεση επίτευξης σταθερής κατάστασης στη μέτρηση των εισπνεόμενων και εκπνεόμενων αερίων. Το αναπνευστικό πηλίκιο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την εκτίμηση της συμμετοχής των ενεργειακών υποστρωμάτων στη συνολική ενεργειακή κατανάλωση, θεωρώντας ότι η συμμετοχή των πρωτεϊνών είναι αμελητέα (153). Τέλος στους εθελοντές δόθηκε ένας βηματομετρητής με στόχο την καταγραφή της φυσικής δραστηριότητας για διάστημα μίας εβδομάδας (Omron Walking Style II, Omron Healthcare Inc, Bannockburn, Illinois, USA). Η χρήση των οργάνων αυτών επιτρέπει τη συνεχή μέτρηση της συνολικής φυσικής δραστηριότητας, καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Ως μέτρο της φυσικής δραστηριότητας θεωρήθηκε ο αριθμός των βημάτων που πραγματοποιούνται σε ημερήσια βάση. Έχει βρεθεί ότι τα βηματόμετρα αυτού του είδους μπορούν να μετρήσουν τα βήματα που πραγματοποιούνται με ικανοποιητική ακρίβεια (154). Τα όργανα αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι επιτρέπουν τη συνεχή καταγραφή της συνολικής ημερήσιας φυσικής δραστηριότητας, και όχι μόνο της δραστηριότητας του ελεύθερου χρόνου.

Κατά τη δεύτερη επίσκεψη των εθελοντών στο εργαστήριο, μετά από ανάπαυση σε καθιστή στάση για 15 λεπτά, ένας φλεβικός καθετήρας τοποθετήθηκε σε φλέβα του χεριού, έγινε λήψη ενός δείγματος αίματος και έπειτα πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. Στη δοκιμασία αυτή ζητήθηκε από τους δοκιμαζόμενους να καταναλώσουν διάλυμα 75 g γλυκόζης (200 mL) μέσα σε δύο λεπτά και στη συνέχεια να παραμείνουν σε καθιστή στάση για τις επόμενες δύο ώρες (151). Κατά τη διάρκεια του χρονικού αυτού διαστήματος γίνονταν λήψεις αίματος κάθε 30 λεπτά. Μετά από κάθε αιμοληψία ακολουθούσε πλύση του καθετήρα με 4 mL αραιού διαλύματος ηπαρίνης ($20 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$), έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία πηγμάτων εσωτερικά του καθετήρα.

Κατά την επίσκεψη των εθελοντών στο Τζάνιο Νοσοκομείο πραγματοποιήθηκε η βιοψία μυϊκού ιστού. Η λήψη των δειγμάτων (περίπου 80-100 mg) έγινε με βελόνα βιοψίας Bergstrom, τύπου trocar, από τον τετρακέφαλο μυ, έτσι όπως έχει περιγραφεί από τον Bergstrom (155), με εφαρμογή αρνητικής πίεσης (156). Η βιοψία έγινε στη μεσαία μοίρα του τετρακέφαλου μυός,

υπό τοπική αναισθησία (0.1% Licocaine) στο δέρμα και το περιμύιο. Μετά τη λήψη του δείγματος ακολούθησε σύντομος καθαρισμός του από ορατό αίμα, λιπώδη ή συνδετικό ιστό και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο μέχρι να επεξεργαστούν περαιτέρω.

Κατά τις ανωτέρω επισκέψεις, στους εξεταζόμενους ζητήθηκε να απέχουν από έντονη φυσική δραστηριότητα και την κατανάλωση αλκοόλ κατά τις δύο προηγούμενες ημέρες και να καταναλώσουν μια δίαιτα χωρίς περιορισμούς και υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες. Η διαβητική θεραπεία δε διακόπηκε κατά τη χρονική περίοδο των πειραμάτων, ωστόσο ζητήθηκε από τους εθελοντές να απέχουν από τη θεραπεία τους μέχρι την ολοκλήρωση των μετρήσεων στις τρεις ημέρες των πειραμάτων.

Ανάλυση Δειγμάτων Αίματος

Τα δείγματα νηστείας χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της γλυκόζης, των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων, της ολικής χοληστερόλης, της HDL- και της LDL-χοληστερόλης στο πλάσμα. Η γλυκόζη μετρήθηκε επίσης και στις χρονικές στιγμές 30, 60, 90 και 120 λεπτά της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης. Τα δείγματα νηστείας χρησιμοποιήθηκαν επίσης και για τη μέτρηση των επιπέδων ινσουλίνης στον ορό.

Όλες οι βιοχημικές εξετάσεις έγιναν σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή (ACE Schiapparelli Biosystems Inc., Fairfield, New Jersey, USA). Οι μετρήσεις αυτές βασίζονται σε φασματοφωτομετρικές τεχνικές, υπό την πραγματοποίηση των κατάλληλων βιοχημικών αντιδράσεων. Η βαθμονόμηση των μετρήσεων αυτών έγινε με καμπύλη δύο σημείων, εκ των οποίων το ένα σημείο είναι το μηδέν (μηδενική συγκέντρωση της υπό μέτρηση ουσίας). Συγκεκριμένα, η αρχή μέτρησης της γλυκόζης στηρίζεται στη μετατροπή της σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, παρουσία οξειδάσης γλυκόζης. Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με φαινόλη και 4-αμινοφαιναζόλη προς σχηματισμό κινιναιμίνης, η οποία έχει κόκκινο-μώβ χρώμα και επομένως μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά. Για τη μέτρηση των τριγλυκεριδίων, αυτά αρχικά υδρολύονται παρουσία μιας λιπάσης, η παραγόμενη γλυκερόλη αντιδρά με ATP (παρουσία γλυκεροκινάσης), παράγοντας 3-φωσφο-γλυκερόλη. Η τελευταία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο (παρουσία οξειδάσης) προς φωσφο-διυδροξυακετόνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με 4-αμινοαντιπυρίνη και 4-χλωροφαινόλη προς σχηματισμό κινιναιμίνης. Η χοληστερόλη, αφού απομακρυνθεί από τους εστέρες της, με αντίδραση εστεράσης, αντιδρά με μοριακό οξυγόνο, παρουσία οξειδάσης, με προϊόν υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται κι αυτό σε κινιναιμίνη. Η μέτρηση της

HDL-χοληστερόλης στηρίζεται στην κατακρήμνιση των LDL και VLDL και στη συνέχεια προσδιορισμό της HDL-χοληστερόλης με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο μετράται και η ολική χοληστερόλη. Η LDL-χοληστερόλη προσδιορίστηκε έμμεσα, με την εξίσωση Friedewald (157). Η μέτρηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στηρίζεται στην ακυλοποίηση του συνενζύμου A, παρουσία συνθετάσης του ακυλο-συνενζύμου A, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται με μια οξειδάση προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το τελευταίο, παρουσία υπεροξειδάσης, προκαλεί συμπύκνωση της 3-μεθυλο-N-αιθυλο-N(β-υδροξυαιθυλο)-ανιλίνης με 4-αμινοαντιπυρίνη προς σχηματισμό κυανού χρώματος. Η ινσουλίνη μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (Enzyme-linked Immunosorbent Essay, ELISA), χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (Dako Insulin, DakoCytomation Ltd, Glostrup, Denmark). Η μέθοδος στηρίζεται στη δέσμευση της ινσουλίνης από μονοκλωνικά αντισώματα στον πυθμένα των καψών και στη συνέχεια την πρόσδεση στην ινσουλίνη ενός άλλου αντιγόνου στο οποίο προσδένεται ένα συζυγές μόριο. Το τελευταίο αντιδρά με το υπόστρωμα (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη), παράγοντας κίτρινο χρώμα, του οποίου η ένταση μετράται φασματοφωτομετρικά. Η μέθοδος έχει σχετικά μεγάλη ακρίβεια, ενώ η διασταυρούμενη δραστηριότητα με διάφορες μορφές προΐνσουλίνης ή με το πεπτίδιο C είναι πρακτικά μηδενική.

Για την εκτίμηση της ινσουλινοαντίστασης χρησιμοποιήθηκε το ομοιοστατικό μοντέλο (158), το οποίο στηρίζεται στα επίπεδα γλυκόζης και νηστείας στο αίμα. Έχει αποδειχτεί ότι το μοντέλο αυτό παρουσιάζει υψηλού βαθμού συσχέτιση με την ευαισθησία στην ινσουλίνη η οποία προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη μέθοδο (159), ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία, το βαθμό παχυσαρκίας και την παρουσία ή όχι σακχαρώδη διαβήτη (160). Με βάση το μοντέλο αυτό, η ινσουλινοαντίσταση (δείκτης HOMA) υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Δείκτης HOMA} = \frac{[\text{Ινσουλίνη}]}{22.5 \times e^{-\ln[\text{Γλυκόζη}]}}$$

όπου [Ινσουλίνη]: η ινσουλίνη νηστείας (mU/L) και [Γλυκόζη]: η γλυκόζη νηστείας (mmol/L).

Ως μέτρα του γλυκαιμικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές γλυκόζης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης, καθώς και το ολικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη γλυκόζης – χρόνου κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας αυτής.

Μέτρηση των ενδομυϊκών λιποειδών

Τα δείγματα μυϊκού ιστού τα οποία συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν με το πρωτόκολλο το οποίο παρουσιάστηκε αναλυτικά στην πρώτη μελέτη της διατριβής αυτής. Τα ολικά

τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια υπολογίστηκαν διαιρώντας τις μοριακές συγκεντρώσεις των μεθυλεστέρων κάθε λιποειδικής τάξης με το τρία και το δύο αντίστοιχα. Τα λιπαρά οξέα τα οποία περιέχονταν σε κάθε λιποειδική τάξη κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας σε λιπαρά οξέα βραχείας, μεσαίας και μακράς αλυσίδας (με ανθρακικές αλυσίδες με <8, 8-14 και >15 άτομα άνθρακα αντίστοιχα). Επίσης έγινε και κατηγοριοποίηση των λιπαρών οξέως κάθε λιποειδούς με βάση το βαθμό κορεσμού σε κορεσμένα, μονο-ακόρεστα και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ τα τελευταία κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση το ω-άτομο άνθρακα σε n-3 και n-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Μέτρηση της ενεργότητας της κιτρικής συνθάσης στο μυϊκό ιστό

Η μέτρηση της ενεργότητας της κιτρικής συνθάσης, ως δείκτη του οξειδωτικού μεταβολισμού, έγινε με φασματοφωτομετρική μέθοδο, έτσι όπως έχει περιγραφεί (161), σε 5-15 mg μυϊκού ιστού. Συνοπτικά, η όλη διαδικασία συνίσταται στα ακόλουθα βήματα:

1. Το δείγμα ομογενοποιήθηκε σε χειροκίνητο γυάλινο ομογενοποιητή με ρυθμιστικό διάλυμα 0.175 M KCl, 2 mM αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος και σε διάλυση 1:20.
2. Το ομογενοποιημένο δείγμα υπέστη δύο κύκλους ψύξης – απόψυξης με χρήση υγρού αζώτου.
3. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 3000 στροφές / λεπτό, έτσι ώστε τα στερεά κυτταρικά συστατικά να καταβυθιστούν και η υπερκείμενη φάση να παραμείνει διαυγής.
4. 30 μ L του ομογενοποιημάτος μεταφέρθηκαν σε σε κυψελίδες φασματο-φωτομέτρου οι οποίες περιείχαν 1 mL αντιδρώντος μίγματος (70% ρυθμιστικού διαλύματος Tris, 10% 1 mM διθειονιτροβενζοϊκού οξέος σε διάλυμα βάσης Tris με pH 8.3, 15% 3 mM ακετυλο-συνενζύμου A, 5% οξαλοξικού οξέος, v/v/v/v) και οι κυψελίδες αναδεύθηκαν ελαφρά.
5. Οι κυψελίδες μεταφέρθηκαν αμέσως σε φασματοφωτόμετρο και παρακολουθήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης στα 412 nm για 5 λεπτά και με συνεχή καταγραφή των τιμών απορρόφησης κάθε 10 δευτερόλεπτα.
6. Η μεταβολή στην απορρόφηση ανά λεπτό παραστήθηκε γραφικά και προσδιορίστηκε η μέγιστη τιμή της, στο σημείο στο οποίο παρατηρήθηκε πλατώ στη μεταβολή απορρόφησης. Η φάση αυτή αντιπροσωπεύει τη μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.
7. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε από τη σχέση:

$$\text{Ενεργότητα } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}) = (\Delta\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}) \times 13.6 \times 30 \times 21$$

Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση του μέσου. Λόγω του μικρού μεγέθους του πληθυσμού στην ομάδα των διαβητικών-μη παχύσαρκων ατόμων, οι συγκρίσεις της ομάδας αυτής με τις δύο άλλες ομάδες έγιναν με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann-Whitney. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων των παχύσαρκων ατόμων (διαβητικά ή μη) έγιναν με t τεστ του Student για τα δεδομένα με κανονική κατανομή και με τον έλεγχο Mann-Whitney για δεδομένα των οποίων η κατανομή δεν ήταν κανονική. Η κανονικότητα των κατανομών ελέγχθηκε με τον έλεγχο Shapiro-Wilk. Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών ελέγχθηκαν με απλή παλινδρόμηση. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών ελέγχθηκαν με το τεστ χ^2 κατά Pearson. Ως αποδεκτό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

Τα βασικά επίπεδα (τιμές νηστείας) γλυκόζης και ινσουλίνης, όπως επίσης και το λιπιδαιμικό προφίλ των συμμετεχόντων στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3. Τα διαβητικά - μη παχύσαρκα άτομα είχαν ενδιάμεσες τιμές γλυκόζης πλάσματος νηστείας, σε σύγκριση με τις δύο άλλες ομάδες και στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη τιμή ινσουλίνης ορού, σε σύγκριση με τα διαβητικά – παχύσαρκα άτομα ($p < 0.005$). Οι τρεις ομάδες δε διέφεραν αναφορικά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων και χοληστερόλης πλάσματος. Τα διαβητικά – μη παχύσαρκα άτομα και τα διαβητικά – παχύσαρκα άτομα παρουσίασαν την ίδια ανταπόκριση κατά τη διάρκεια ανοχής γλυκόζης (Σχήμα 2.1). Τα επίπεδα γλυκόζης στα 120 λεπτά τις δοκιμασίας, όπως επίσης και το ολικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη γλυκόζης – χρόνου και για τις δύο ομάδες ήταν περίπου διπλάσια σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στην ομάδα των μη διαβητικών – παχύσαρκων ατόμων ($p < 0.005$). Ωστόσο, τα διαβητικά – μη παχύσαρκα άτομα είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ινσουλिनoαντίστασης, σε σύγκριση με την ομάδα των διαβητικών – παχύσαρκων εθελοντών, έτσι όπως αυτή εκτιμήθηκε με το ομοιοστατικό μοντέλο ($p < 0.005$). Οι δύο ομάδες με τους παχύσαρκους εθελοντες είχαν επίσης στατιστικά σημαντικά διαφορετικές τιμές ινσουλινoαντίστασης ($p < 0.005$).

Ο Πίνακας 2.4 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της έμμεσης θερμιδομετρίας στις τρεις ομάδες. Οι μετρήσεις δεν παρουσίασαν κάποια αξιολογη διαφοροποίηση ανάμεσα στις τρεις ομάδες.

Το Σχήμα 2.2 παρουσιάζει τα ολικά ενδομυϊκά τριγλυκερίδια στις τρεις ομάδες, όπως επίσης και το περιεχόμενό τους σε λιπαρά οξέα, με βάση το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας, το βαθμό κορεσμού και τη θέση του ωμέγα ατόμου άνθρακα για τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα διαβητικά - παχύσαρκα άτομα είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ολικών ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων, σε σύγκριση με τα μη διαβητικά – παχύσαρκα άτομα ($p < 0.05$). Αν και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση, τα διαβητικά – μη παχύσαρκα άτομα είχαν χαμηλότερες τιμές ολικών τριγλυκεριδίων, σε σύγκριση με τα διαβητικά – παχύσαρκα άτομα και παραπλήσια επίπεδα, σε σύγκριση με την ομάδα των μη διαβητικών – παχύσαρκων ατόμων. Τα περισσότερο συχνά λιπαρά οξέα και στις τρεις ομάδες ήταν τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τα μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα n-6 λιπαρά οξέα. Χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας και για τα n-3 λιπαρά οξέα, ενώ μηδενικές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας.

Τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.3. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις τρεις εξεταζόμενες ομάδες, τόσο για το ολικά ενδομυϊκά διγλυκερίδια, όσο και για τα περιέχόμενα σε αυτά λιπαρά οξέα. Τα περισσότερο συχνά παρατηρούμενα λιπαρά οξέα στο κλάσμα των διγλυκεριδίων ήταν τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Η ενεργότητα της κιτρικής συνθάσης στο μυϊκό ιστό των εθελοντών παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4. Οι διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις τρεις ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας των τριών ομάδων, έτσι όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια βηματομετρητών επίσης δεν παρουσίαζαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση (Σχήμα 2.5).

Οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στα στα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων με σωματομετρικούς παράγοντες και δείκτες της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, του γλυκαιμικού ελέγχου, του λιπιδαιμικού προφίλ και της οξειδωτικής ικανότητας διερευνήθηκαν με απλή παλινδρόμηση. Τα αποτελέσματα αυτά για τα τριγλυκερίδια παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5. Οι μόνες μεταβλητές οι οποίες συσχετίστηκαν με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ήταν τα επίπεδα γλυκόζης στο τέλος της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ υπήρχε μια τάση για συσχέτιση με το εμβαδό κάτω από την καμπύλη γλυκόζης-χρόνου. Περαιτέρω, εξετάστηκε η συσχέτιση του γλυκαιμικού ελέγχου (ως εμβαδό κάτω από την καμπύλη) με τα λιπαρά οξέα τα οποία περιέχονταν στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια. Η ανάλυση αυτή έδειξε μια συσχέτιση στα όρια της σημαντικότητας για τα λιπαρά οξέα μακράς

αλυσίδας ($\beta=0.155\pm0.077$, $R^2=0.119$, $p=0.053$) και μια σημαντική συσχέτιση για τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ($\beta=0.093\pm0.041$, $R^2=0.147$, $p=0.031$).

Η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των παραπάνω μεταβλητών με τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.6. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που βρέθηκε ήταν αυτή ανάμεσα στα ενδομυϊκά διγλυκερίδια και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στο πλάσμα.

Τέλος διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στις δύο υπό εξέταση τάξεις ενδομυϊκών λιποειδών. Η συσχέτιση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($\beta=17.136\pm5.293$, $R^2=0.247$, $p=0.003$), υποδηλώνοντας μια παράλληλη αύξηση στα ενδομυϊκά διγλυκερίδια, όσο αυξάνονται τα τριγλυκερίδια ή και αντίστροφα.

Προκειμένου να διερευνηθεί ή πιθανή επίδραση της ηλικίας και του φύλου στις συγκρίσεις της μελέτης, εξετάστηκε η συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία και στις κύριες μεταβλητές (τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια και τα διγλυκερίδια). Η ανάλυση δεν έδειξε κάποια σημαντική επίδραση της ηλικίας τόσο για τα τριγλυκερίδια ($\beta=1.205\pm0.731$, $R^2=0.078$, $p=0.109$), όσο και για τα διγλυκερίδια ($\beta=-0.013\pm0.022$, $R^2=0.011$, $p=0.554$). Η τιμή p για τον έλεγχο ανεξαρτησίας χ^2 κατά Pearson μεταξύ φύλου και ομάδας ήταν ίσο με 0.101, υποδηλώνοντας πως δεν υπάρχει κάποια σημαντική αλληλεπίδραση.

Σχολιασμός – Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την επίδραση της παρουσίας σκαχαρώδη διαβήτη τύπου II στην ενδομυϊκή συσσώρευση δύο κύριων λιποειδικών τάξεων, οι οποίες έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση του φαινομένου της ινσουλινοαντίστασης: των τριγλυκεριδίων και των διγλυκεριδίων. Το κύριο εύρημα της μελέτης είναι ότι τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια δεν διέφεραν σημαντικά στα παχύσαρκα διαβητικά άτομα, σε σύγκριση με τα παχύσαρκα, μη διαβητικά άτομα. Επιπλέον, η παρουσία της παχυσαρκίας στα διαβητικά άτομα δε φάνηκε να επηρεάζει τη συσσώρευση ενδομυϊκών διγλυκεριδίων, αφού τα παχύσαρκα διαβητικά άτομα είχαν τα ίδια επίπεδα διγλυκεριδίων με τα μη παχύσαρκα, διαβητικά άτομα. Από την άλλη μεριά, η παρουσία του σκαχαρώδη διαβήτη επηρέασε θετικά τη συσσώρευση ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων στα παχύσαρκα άτομα της μελέτης, ενώ η απουσία παχυσαρκίας στα διαβητικά άτομα φάνηκε να

παρέχει κάποιου βαθμού προστασία από μια τέτοια επίδραση (αυξημένη συσσώρευση τριγλυκεριδίων).

Τα διγλυκερίδια είναι ενδιάμεσα μόρια της βιοσύνθεσης και/ή της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων και δυνητικά μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ευαισθησία στην ινσουλίνη, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (93). Τα δεδομένα της μελέτης αυτής δεν επιβεβαιώνουν έναν βασικό ρόλο των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων σε κατάσταση νηστείας στην παθο-φυσιολογία του σακχαρώδη διαβήτη, καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα παχύσαρκα διαβητικά άτομα και τα παχύσαρκα μη διαβητικά άτομα. Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και της ινσουλिनoαντίστασης ή των δεικτών γλυκαιμικού ελέγχου που μετρήθηκαν.

Σε πειραματόζωα, η έγχυση λίπους έχει φανεί να ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση - θ και - δ, δύο ισομορφές οι οποίες εξαρτώνται από τα επίπεδα διγλυκεριδίων (94, 162). Στον άνθρωπο, η έγχυση λίπους κατά τη διάρκεια συνθηκών υπερινουλιναϊμίας - ευγλυκαιμίας αύξησε τη συνολική ενεργότητα του ενζύμου, τόσο σε κυτταροπλασματικά παρασκευάσματα, όσο και σε παρασκευάσματα της πλασματικής μεμβράνης, με μια παράλληλη αύξηση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων, συγκριτικά με την έγχυση λίπους μόνο (95). Ωστόσο, οι παρατηρήσεις αυτές δεν αποδεικνύουν μια σχέση αιτίου και αιτιατού ανάμεσα στα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικής κινάσης C. Επιπρόσθετα, *in vitro* μελέτες σε μυϊκά κύτταρα της σειράς L6 έχουν δείξει ότι η ζ ισομορφή του ενζύμου σχετίζεται θετικά με την επαγόμενη από την ινσουλίνη κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης, ενώ η αναστολή των ισομορφών που εξεργτώνται από τα διγλυκερίδια δεν είχε κάποια επίδραση (163). Τα δεδομένα αυτά παρέχουν κάποιες ενδείξεις για το ότι η ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C και τα επίπεδα διγλυκεριδίων ενδεχομένως να μη σχετίζονται αιτιολογικά.

Στην παρούσα μελέτη, τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια ήταν υψηλότερα στα διαβητικά παχύσαρκα άτομα, σε σύγκριση με τα μη διαβητικά παχύσαρκα άτομα, αλλά όχι σημαντικά διαφορετικά σε σύγκριση με με τα διαβητικά, μη παχύσαρκα άτομα. Η αύξηση των επιπέδων ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων στα παχύσαρκα άτομα, σε σύγκριση με τα λιπόσαρκα άτομα έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές μελέτες (36, 164). Ωστόσο, οι μελέτες στις οποίες έχουν συγκριθεί διαβητικά, παχύσαρκα άτομα με μη διαβητικά, παχύσαρκα άτομα έχουν δώσει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, δείχνοντας είτε αυξημένα επίπεδα στα διαβητικά άτομα (91), είτε μη σημαντική διαφοροποίηση (36, 164), είτε μια ενδιάμεση τιμή για τα παχύσαρκα άτομα ανάμεσα στις τιμές

των παχύσαρκων, διαβητικών ατόμων και τα άτομα φυσιολογικού βάρους (150). Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης έχουν αθροιστικό αποτέλεσμα στη συσσώρευση ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και ότι η απουσία της παχυσαρκίας στο σακχαρώδη διαβήτη σχετίζεται με μικρότερου βαθμού απόθηκευση ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα μη παχύσαρκα άτομα της μελέτης αυτής είχαν Δείκτη Μάζας Σώματος περίπου $27 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, κάτι που δείχνει ότι ήταν τουλάχιστον υπέρβαρα. Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις αυτές, έχει αποδειχτεί ότι ακόμη και μικρού βαθμού μείωση του σωματικού βάρους σε παχύσαρκα, διαβητικά άτομα οδηγεί σε μια ιδιαίτερα σημαντική μείωση των ενδομυϊκών λιποειδών, παρά το γεγονός ότι τα εξεταζόμενα άτομα εξακολουθούν να έχουν σωματικό βάρος στο εύρος της παχυσαρκίας (131).

Αν και δεν έχει διευκρινιστεί μια σχέση ανάμεσα στη σύσταση των ενδομυϊκών λιποειδών και τη διαιτητική πρόσληψη στον άνθρωπο, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν το κύριο συστατικό των τριγλυκεριδίων, κάτι που ενδεχομένως αντανακλά την υψηλή συγκέντρωση ελαιολάδου. Αντίθετα, τα μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα δεν ήταν το κύριο συστατικό των διγλυκεριδίων. In vitro μελέτες σε ανθρώπινα μυϊκά κύτταρα έχουν δείξει ότι η επώαση με ελαϊκό οξύ (μονο-ακόρεστο λιπαρό οξύ) ή με λινελαϊκό οξύ (πολυ-ακόρεστο λιπαρό οξύ) οδηγεί σε σχεδόν πλήρη ενσωμάτωση των λιπαρών αυτών οξέων στα ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια. Αντίθετα, η επώαση με παλμιτικό ή στεατικό οξύ (κορεσμένα λιπαρά οξέα) οδήγησε στην εναπόθεση των λιπαρών αυτών οξέων στα διγλυκερίδια (99). Στην ίδια μελέτη, η επαγόμενη από την ινσουλίνη κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης επηρεάστηκε αρνητικά όταν στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων είχαν προστεθεί κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου στην περίπτωση επώασης με ελαϊκό ή λινελαϊκό οξύ. Στα πειραματόζωα, δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λίπη οδήγησε σε αύξηση κυρίως των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων, ενώ αντίθετα μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε σε πολυ-ακόρεστα λίπη οδήγησε σε εναπόθεση των πλεοναζόντων λιπών στα αποθέματα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων (165). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών υποδηλώνουν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παρουσιάζουν ενδεχομένως μια μειωμένη ικανότητα ενσωμάτωσης στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια, προκαλώντας αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων στα διγλυκερίδια, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Αντίθετα, τα μονο-ακόρεστα και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ενσωματώνονται εύκολα στα ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια. Υπό τη θεωρηση αυτή, μπορεί να υποθεθεί ότι η μεσογειακή δίαιτα των συμμετεχόντων στη μελέτη ενδεχομένως απέτρεψε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και επομένως κάποια πιθανή επίδραση των μορίων αυτών στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και στο γλυκαιμικό έλεγχο δε θα μπορούσε να προσδιοριστεί.

Ωστόσο, από τη στιγμή που η διαιτητική πρόσληψη δεν ελέγχθηκε ένα τέτοιο συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί με απόλυτη ασφάλεια.

Η παρούσα μελέτη έχει αρκετά ισχύρά σημεία. Κατ' αρχάς είναι από τις πρώτες μελέτες στην οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων σε διάφορες καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Δεύτερον, η παράλληλη μέτρηση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και της σύστασης και των δύο τάξεων λιποειδών σε λιπαρά οξέα επέτρεψε να γίνουν κάποιες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Ο αριθμός των συμμετεχόντων στην ομάδα των μη παχύσαρκων, διαβητικών ατόμων αποτελεί έναν βασικό περιορισμό της μελέτης, ωστόσο στάθηκε αδύνατη η ανεύρεση μη παχύσαρκων, διαβητικών ατόμων οι οποίοι να βρίσκονταν σε σταθερό σωματικό βάρος για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα διαβητικά άτομα (συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου I, τύπου II και του διαβήτη της κύησης) αντιπροσωπεύουν μόλις το 5.5% του μη παχύσαρκου πληθυσμού, ενώ το ποσοστό αυτό στον παχύσαρκο πληθυσμό είναι της τάξης του 16%. Λαμβάνοντας υπόψη το μικρό μέγεθος του δείγματος της ομάδας αυτής, δε μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των ατόμων αυτών. Συνολικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη είναι μια διαπληθυσμιακή μελέτη, η οποία δεν μπορεί να παρέχει σαφή συμπεράσματα, αλλά μόνο υποθέσεις ή και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα. Η ηλικία των εθελοντών ήταν διαφορετική στις τρεις ομάδες και παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε καποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία και τις εξεταζόμενες μεταβλητές, κάποια επίδρασή της δεν μπορεί να αποκλειστεί. Πολλές άλλες παράμετροι οι οποίες δεν ελέγχθηκαν θα μπορούσαν επίσης να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματά μας.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη δε βρέθηκε κάποια διαφοροποίηση στα ενδομυϊκά διγλυκερίδια σε διάφορες καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης. Αντίθετα, η παχυσαρκία και ο διαβήτης φάνηκε να έχουν αθροιστικά αποτελέσματα στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια. Με βάση τα αποτελέσματά μας, τα αποθηκευμένα ενδομυϊκά διγλυκερίδια είναι μάλλον απίθανο να έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην παθο-φυσιολογία της ινσουλινοαντίστασης, τουλάχιστον υπό συνθήκες νηστείας. Πιθανότητα η αυξημένη ροή των λιπαρών οξέων της συστηματικής κυκλοφορίας προς την εστεροποίησή και αποθήκευσή τους στο μυϊκό ιστό είναι αυτή που ευθύνεται κατά κύριο λόγο για την ινσουλινοαντίσταση και όχι ενδιάμεσα μόρια της πορείας αυτής, όπως τα διγλυκερίδια.

Πίνακες και Γραφήματα

Πίνακας 2.1: Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών.

	nDiab-Ob	Diab-nOb	Diab-Ob
<i>n</i>	19	4	11
Φύλο, άντρες/γυναίκες	9/10	3/1	2/9
Σωματικό Βάρος, kg	111.6±4.5	86.1±4.8	114.0±7.9
Ηλικία, χρόνια	40±3	60±2 [*]	47±3 [†]
Δείκτης Μάζας Σώματος, kg·m ⁻²	39.7±1.5	27.2±0.5 [*]	40.7±1.8 [†]
Ισχνή Μάζα Σώματος, kg	57.0±2.7	57.9±4.5	52.4±3.9 [†]
Σωματικό Λίπος, %	42.3±2.5	28.7±2.8 [*]	45.8±1.5 [†]
Σωματικό Λίπος Κορμού, kg	22.8±1.6	13.7±0.9 [*]	23.9±1.4 [†]

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

^{*}

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-nOb, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, p<0.05

[†]

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση την ομάδα Diab-Ob, σε σύγκριση με την Diab-nOb, p<0.05

Πίνακας 2.2: Διαγνωστικά κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και άλλες μορφές δυσγλυκαιμίας με βάση τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (151).

Κατάσταση δυσγλυκαιμίας	Γλυκόζη Πλάσματος [mmol/L (mg/dL)]		
	<i>Νηστεία</i>		<i>120 min</i>
Διαταραγμένη γλυκαιμία νηστείας	6.1 - 6.9 (110 - 125)		
Διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης	≤ 7.0 (126)	και	7.8 -11.0 (140 - 199)
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	≥ 7.0 (126)	ή	≥ 11.1 (200)

Πίνακας 2.3: Επίπεδα νηστείας γλυκόζης, ινσουλίνης και λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών.

	nDiab-Ob	Diab-nOb	Diab-Ob
Γλυκόζη, mmol·L ⁻¹	5.81±0.14	6.89±0.39 [*]	7.56±0.40 [‡]
Ινσουλίνη, μIU·L ⁻¹	13.21±1.35	4.88±0.87 [*]	18.67±2.59 ^{†‡}
Τριγλυκερίδια, mmol·L ⁻¹	1.37±0.15	1.42±0.27	1.61±0.21
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα, mmol·L ⁻¹	0.72±0.05	0.78±0.07	0.98±0.11 [‡]
Ολική Χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	5.49±0.21	5.25±0.31	5.41±0.33
HDL-χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	1.03±0.05	0.87±0.06	1.08±0.08
LDL-χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	3.83±0.16	3.72±0.20	3.60±0.28

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

*

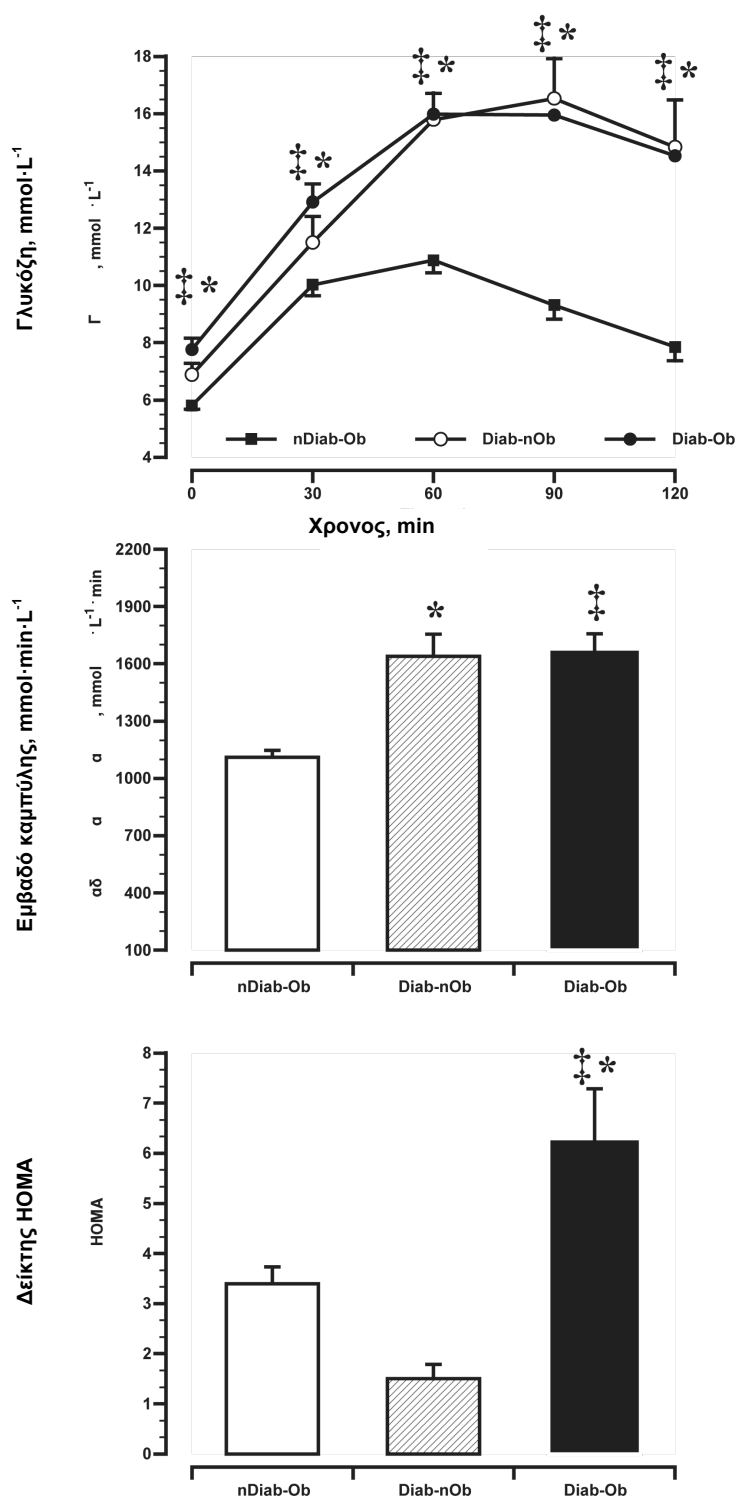
Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-nOb, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, p<0.05

‡

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-Ob, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, p<0.05

†

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση την ομάδα Diab-Ob, σε σύγκριση με την Diab-nOb, p<0.05



Σχήμα 2.1 Γλυκαιμική απάντηση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης και ινσουλινοααντίσταση των εθελοντών

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

*

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-nOb, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, $p < 0.05$

†

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-Ob, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, $p < 0.05$

Πίνακας 2.4: Μεταβολικές μετρήσεις των εθελοντών.

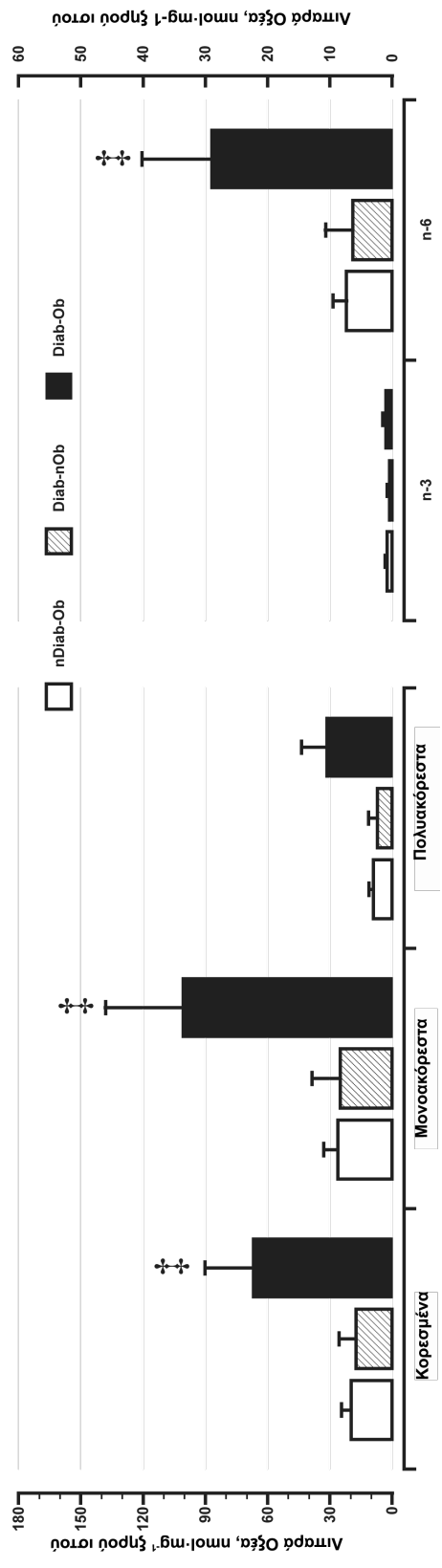
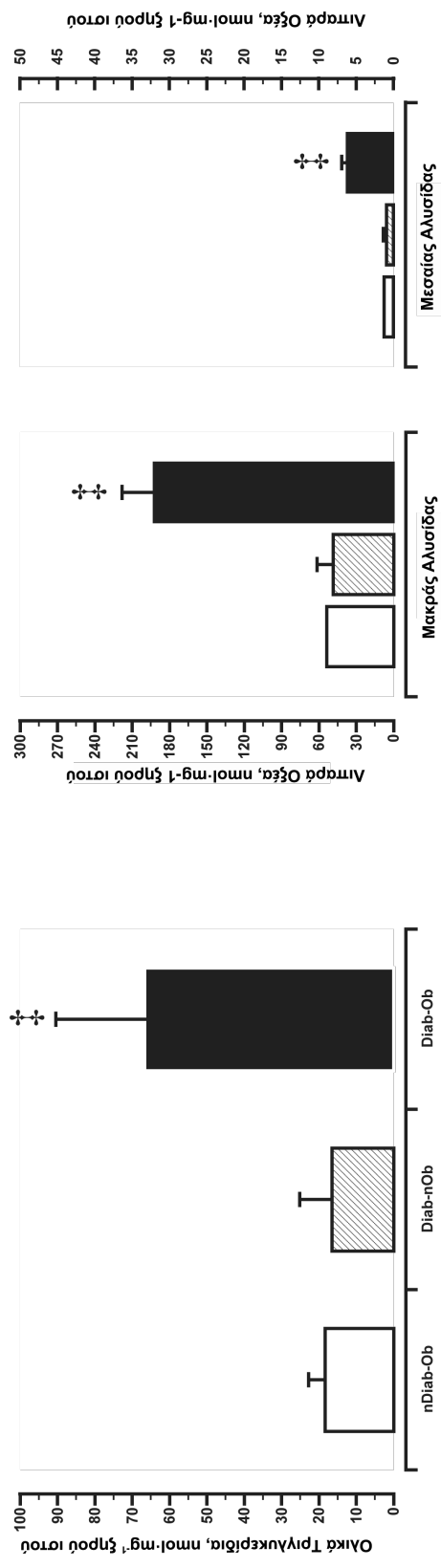
	nDiab-Ob	Diab-nOb	Diab-Ob
Κατανάλωση Οξυγόνου, $L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1} \cdot 10^{-3}$	2.3±0.8	2.4±0.8	2.2±0.7
Αναπνευστικό Πηλίκο	0.82±0.01	0.82±0.02	0.81±0.02
Μεταβολικός Ρυθμός Ηρεμίας, $kJ \cdot kg^{-1}$	66.97±2.26	69.47±2.22	65.02±2.04
Κατανάλωση Υδατανθράκων, %	40.1±4.7	41.3±6.5	36.2±5.6
Κατανάλωση Λιπών, %	59.9±4.7	58.7±6.5	63.8±5.6

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

*

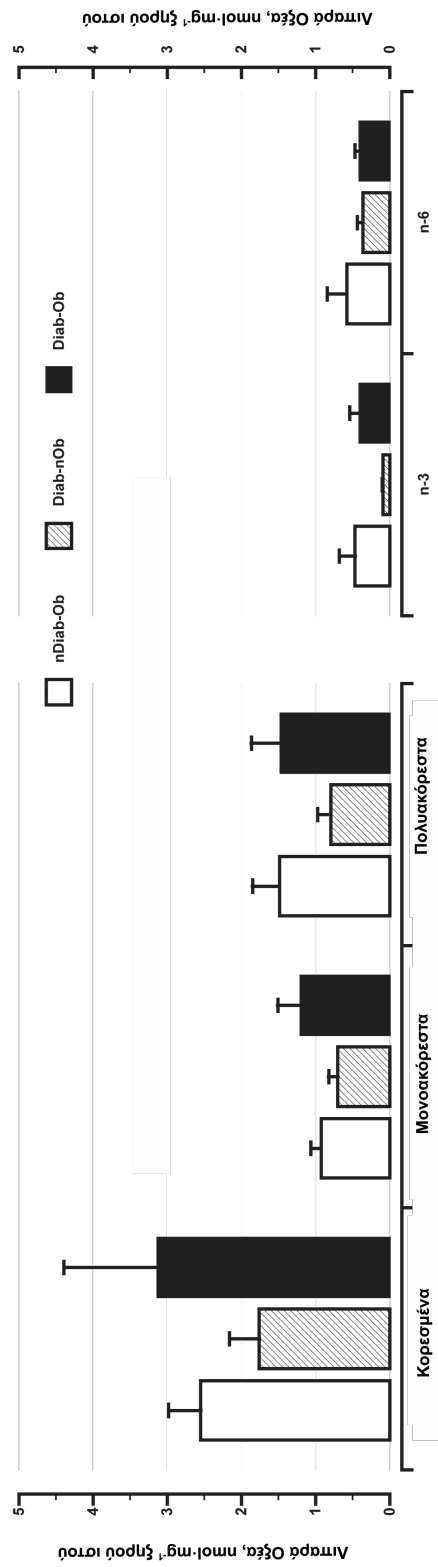
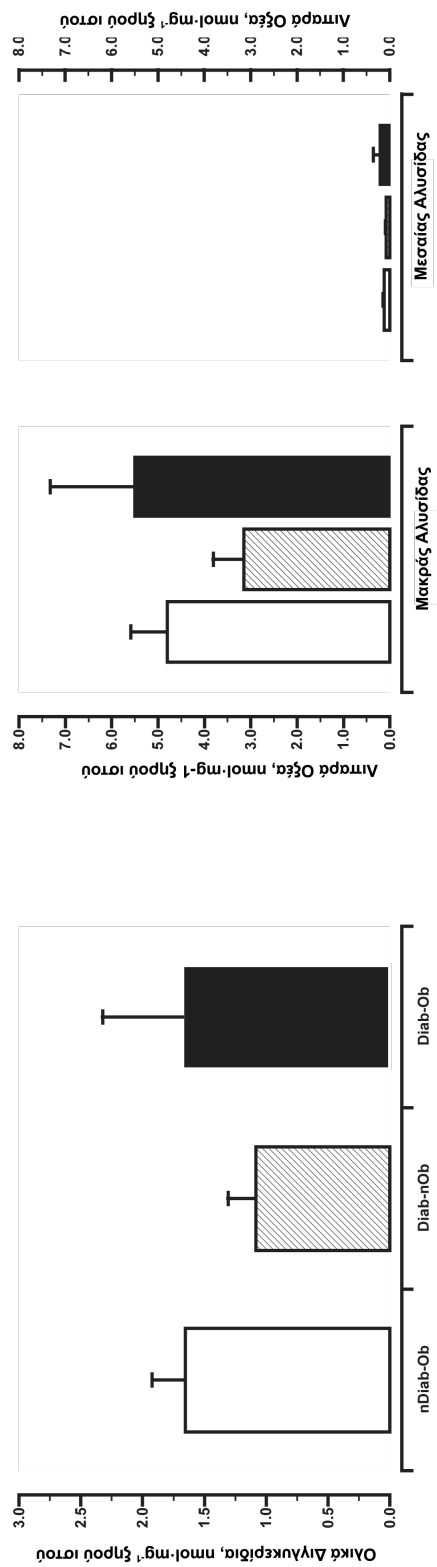
Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ομάδα Diab-nOb, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, $p < 0.05$



Σχήμα 2.2: Ενδομυϊκά ολικά τριγλυκερίδια και περιεχόμενα σε ωνά λιπαρά οξέα

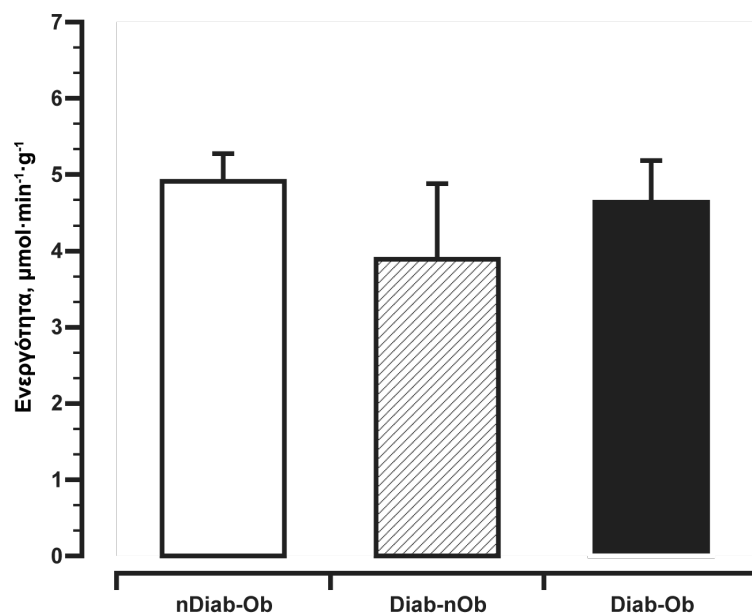
Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα. nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

*** Υποδηλώνει στατιστική διαφορά για την ομάδα Diab-Ob, σε σύγκριση με την nDiab-Ob, p<0.05



Σχήμα 2.3: Ενδομυϊκά ολικά διγλυκερίδια και περιεχόμενα σε αυτά λιπαρά οξέα

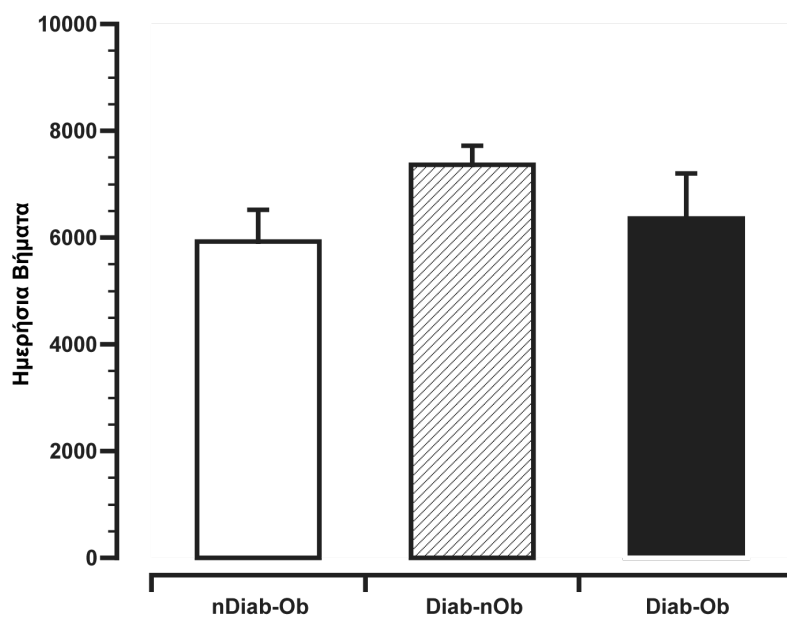
Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα. nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, παχύσαρκοι



Σχήμα 2.4 Ενεργότιhta κντρνκής συνθάσης στο μνϊκό ιστό των εθελοντών

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι



Σχήμα 2.5 Φυσική δραστηριότητα των εθελοντών

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα

nDiab-Ob: μη διαβητικοί, παχύσαρκοι, Diab-nOb: διαβητικοί, μη παχύσαρκοι, Diab-Ob: διαβητικοί, παχύσαρκοι

Πίνακας 2.5: Γραμμικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων με σωματομετρικούς και συστηματικούς παράγοντες και δείκτες της οξειδωτικής ικανότητας

	$\beta \pm SE$	R^2	p
Γλυκόζη νηστείας, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.504 ± 7.318	0.060	0.161
Γλυκόζη 120 min, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.551 ± 1.995	0.148	0.030
AUC Γλυκόζης, $\text{mmol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	0.054 ± 0.027	0.118	0.055
Ινσουλίνη νηστείας, $\mu\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$	-1.197 ± 1.161	0.032	0.311
Δείκτης HOMA	-2.455 ± 3.360	0.016	0.472
Δείκτης Μάζας Σώματος, $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$	-0.784 ± 1.241	0.012	0.532
Σωματικό Λίπος, %	0.852 ± 1.110	0.022	0.450
Σωματικό Λίπος Κορμού, kg	0.000 ± 0.002	0.005	0.730
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	76.384 ± 26.975	0.200	0.008
Τριγλυκερίδια, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	24.285 ± 13.654	0.090	0.085
Κιτρική Συνθάση, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	5.198 ± 5.537	0.027	0.355
Κατανάλωση Υδατανθράκων, %	-0.249 ± 0.481	0.008	0.609
Αναπνευστικό Πηλίκο	-85.289 ± 165.444	0.008	0.610
Ημερήσια Βήματα	0.003 ± 0.006	0.013	0.619

AUC: Περιοχή κάτω από την καμπύλη γλυκόζης – χρόνου κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης

β : κλίσης καμπύλης, SE: τυπικό σφάλμα, R^2 : συντελεστής συσχέτισης

Πίνακας 2.6: Γραμμικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων με σωματομετρικούς και συστηματικούς παράγοντες και δείκτες της οξειδωτικής ικανότητας

	$\beta \pm SE$	R^2	p
Γλυκόζη νηστείας, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-0.332 ± 0.211	0.072	0.125
Γλυκόζη 120 min, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-0.041 ± 0.062	0.014	0.515
AUC Γλυκόζης, $\text{mmol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	0.000 ± 0.001	0.010	0.584
Ινσουλίνη νηστείας, $\mu\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$	-0.006 ± 0.034	0.001	0.864
Δείκτης HOMA	-0.049 ± 0.098	0.008	0.618
Δείκτης Μάζας Σώματος, $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$	0.018 ± 0.036	0.007	0.630
Σωματικό Λίπος, %	0.003 ± 0.030	0.000	0.917
Σωματικό Λίπος Κορμού, kg	0.000 ± 0.000	0.001	0.849
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.868 ± 0.810	0.143	0.028
Τριγλυκερίδια, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.235 ± 0.413	0.010	0.574
Κιτρική Συνθάση, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	-0.065 ± 0.162	0.005	0.693
Κατανάλωση Υδατανθράκων, %	-0.012 ± 0.014	0.025	0.374
Αναπνευστικό Πηλίκο	-4.194 ± 4.758	0.024	0.385
Ημερήσια Βήματα	0.000 ± 0.000	0.001	0.881

AUC: Περιοχή κάτω από την καμπύλη γλυκόζης – χρόνου κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης

β : κλίσης καμπύλης, SE: τυπικό σφάλμα, R^2 : συντελεστής συσχέτισης

3^η Μελέτη

Ποιοτική και ποσοτική σύσταση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε μύες με διαφορετικού βαθμού κινητοποίηση και λειτουργικότητα σε διαβητικά και μη διαβητικά άτομα

Εισαγωγή

Η σχέση ανάμεσα στην ενδοκυτταρική συσσώρευση ουδέτερων λιποειδών στο γραμμωτό μυϊκό ιστό και την ινσουλινοαντίσταση αναλύθηκε διεξοδικά στην εισαγωγή και εξετάστηκε στη 2^η μελέτη της διατριβής αυτής. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό το κατά πόσο η συσσώρευση ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων είναι ίδια ή διαφορετική σε μύες με διαφορετικού βαθμού ενεργοποίηση ή και λειτουργικότητα σε άτομα με φυσιολογικό ή διαταραγμένο γλυκαιμικό προφίλ.

Η ερευνητική αυτή υπόθεση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο μυοκάρδιο, με δεδομένο ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία θνησιμότητας σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων μπορούν να αποδοθούν σε διαταραχές του ενδοθηλίου των αγγείων και τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, ωστόσο έχει πρόσφατα προταθεί ότι κάποιες μεταβολικές διαταραχές στο μυοκάρδιο των διαβητικών ατόμων μπορούν επίσης να προκαλέσουν λειτουργικές και μορφολογικές διαταραχές, όπως μειωμένη διαστολική λειτουργία και υπερτροφία του αριστερού κόλπου της καρδιάς, χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία αθηροσκλήρωσης ή υπέρτασης, μια κατάσταση η οποία έχει χαρακτηριστεί ως διαβητική καρδιομυοπάθεια (166). Ωστόσο, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά της καρδιομυοπάθειας αυτής δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Σε πειραματόζωα με ινσουλινοαντίσταση έχει παρατηρηθεί διαταραγμένη πρόσληψη και οξείδωση γλυκόζης στο μυοκάρδιο υπό συνθήκες υπερινσουλιναϊμίας, με μια παράλληλη αύξηση στην οξείδωση των λιπαρών οξέων (166). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι και το μυοκάρδιο παρουσιάζει ινσουλινοαντίσταση, όπως ακριβώς και οι σκελετικοί μύες. Στον άνθρωπο, με χρήση τομογραφίας εκπομπής ποσιτρονίων, κάποιες (167, 168) αλλά όχι όλες (169) από τις διαθέσιμες μελέτες δείχνουν μια διαταραγμένη πρόσληψη γλυκόζης στο διαβητικό μυοκάρδιο υπό συνθήκες υπερινσουλιναϊμίας.

Όπως και στο σκελετικό μύ, έτσι και στο μυοκάρδιο έχει παρατηρηθεί αυξημένη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιποειδών σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης, όπως ο διαβήτης τύπου II ή η διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης (170, 171). Όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά

προηγούμενως, μελέτες σε σκελετικό μυ ποντικών έχουν δείξει ότι τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια, και όχι τα ολικά λιποειδή, ενδεχομένως ενέχονται στην πρόκληση ινσουλινοαντίστασης, μέσω ενεργοποίησης των ισομορφών θ και δ της πρωτεϊνικής κινάσης C, με επακόλουθη διαταραχή της αλληλουχίας αντιδράσεων σηματοδότησης που επάγει η ινσουλίνη (94, 162). Ωστόσο, στο μυοκάρδιο τα ενδοκυτταρικά διγλυκερίδια αποτελούν ένα δεύτερο σήμα, το οποίο οποίο εμπλέκεται σε σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Για παράδειγμα, μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι τα διγλυκερίδια σχετίζονται με βελτίωση της δυσλειτουργίας του μυοκαρδίου σε διαβήτη ο οποίος προκλήθηκε με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (172), ή με μείωση του μεγέθους των νεκρώσεων κατά τη διάρκεια βλάβης που προκλήθηκε με συνδυασμό ισχαιμίας και επανοξυγόνωσης του μυοκαρδίου (173, 174).

Καμία μελέτη δεν έχει προς το παρόν διερευνήσει το βαθμό συσσώρευσης ενδοκυτταρικών διγλυκεριδίων στο ανθρώπινο μυοκάρδιο διαβητικών ατόμων. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της παρουσίας σακχαρώδη διαβήτη τύπου II στα ενδοκυτταρικά διγλυκερίδια, όπως επίσης και στα τριγλυκερίδια, του μυοκαρδίου, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα σκελετικών μυών. Ένας δεύτερος στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών τάξεων λιποειδών στο μυοκάρδιο με δείκτες του γλυκαιμικού ελέγχου.

Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες

Συμμετέχοντες

Στη μελέτη συμμετείχαν 12 ηλικιωμένα άτομα (61-80 χρονών), τα οποία επρόκειτο να υποβληθούν σε προγραμματισμένη επέμβαση στεφανιαίας παράκαμψης. Έξι από τους εθελοντές της μελέτης είχαν ιστορικό ιατρικώς διαγνωσμένου διαβήτη για περισσότερα από πέντε χρόνια. Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Οι δύο ομάδες (διαβητικά και μη διαβητικά άτομα) είχαν συγκρίσιμη ηλικία και δείκτη μάζας σώματος. Κάθε εθελοντής ενημερώθηκε για το σκοπό και πιθανούς κινδύνους που απορρέουν από τη συμμετοχή στη μελέτη στη συνέχεια υπογράφηκε ένα συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής (Παράρτημα 1). Η μελέτη διεξήχθη με τα πρότυπα τα οποία καθορίζονται στην τελευταία έκδοση της Διακήρυξης του Ελσίνκι και πήρε έγκριση από την Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου “Ευαγγελισμός”.

Πειραματικός Σχεδιασμός

Δείγματα αίματος λήφθηκαν κατά τη διάρκεια του γενικού ελέγχου πριν την επέμβαση (μία ή δύο ημέρες πριν) για τη μέτρηση της γλυκόζης του πλάσματος και του ποσοστού γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης. Οι βιοψίες λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της επέμβασης, όπου περίπου 80 mg λήφθηκαν από φαινομενικά υγιή ιστό από το τοίχωμα του αριστερού κόλπου με τη βοήθεια αιμοστατικής λαβίδας. Επιπλέον δείγματα λήφθηκαν από το μείζονα θωρακικό μυ και από τους μυοσπλεύριους μύες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Η λήψη των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά την τοποθέτηση των ασθενών στην εξωσωματική κυκλοφορία και πριν τη χορήγηση στην καρδιά καρδιοπληγίας. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο.

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε έτσι όπως περιγράφεται λεπτομέρως στην πρώτη μελέτη της παρούσας διατριβής. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ολικά τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια και ως περιεχόμενα σε αυτά λιπαρά οξέα, όπως και στην τρίτη μελέτη.

Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι $\pm$ 1 τυπικό σφάλμου του μέσου. Λόγω της υψηλής διακύμανσης και της μη κανονικότητας των κατανομών σε ότι αφορά τα εξεταζόμενα λιποειδή, οι συγκρίσεις μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων (διαβητικοί και μη διαβητικοί συμμετέχοντες) και μεταξύ των εξεταζόμενων μυών έγιναν με μη παραμετρικούς ελέγχους (έλεγχος του Wilcoxon και Mann-Whitney αντίστοιχα). Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών ελέγχθηκαν με απλή παλινδρόμηση, μετά από λογαρίθμιση των μεταβλητών. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών ελέγχθηκαν με το τεστ χ^2 κατά Pearson. Ως αποδεκτό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

Τα Σχήματα 3.1 και 3.2 παρουσιάζουν αντίστοιχα τα ολικά ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια στους εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος της μελέτης και στις δύο ομάδες ξεχωριστά. Σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων παρατηρήθηκαν στο μυοκάρδιο, σε σύγκριση με το μείζονα θωρακικό ή το μεσοπλεύριο μυ στο σύνολο του δείγματος. Η διαφοροποίηση αυτή ήταν σαφής στους διαβητικούς ασθενείς, αν και τα επίπεδα

διαφοροποίησης μεταξύ μεσοπλεύριου και μυοκαρδίου δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, στους μη διαβητικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στους τρεις εξεταζόμενους μύες. Η σύγκριση των δύο ομάδων δεν ανέδειξε μια σημαντική επίδραση του θετικού ιστορικού διαβήτη. Ωστόσο, τα επίπεδα τριγλυιδίων ήταν περίπου τριπλάσια στα μη διαβητικά άτομα, σε σύγκριση με τα διαβητικά άτομα.

Μη στατικά σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στα επίπεδα ενδοκυτταρικών διγλυκεριδίων στο σύνολο του δείγματος στους εξεταζόμενους μύες και στις συγκρίσεις στις δύο ομάδες (Σχήμα 3.2). Τα διγλυκερίδια στο μυοκάρδιο έτειναν να είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με το θωρακικό μύ ($p=0.075$) ενώ ο μεσοπλεύριος μύς παρουσίασε ενδιάμεσες τιμές διγλυκεριδίων. Τα επίπεδα διγλυκεριδίων στους τρεις μύες ήταν συγκρίσιμα στους διαβητικούς ασθενείς, ενώ αντίθετα στους μη διαβητικούς ασθενείς τα επίπεδα στο μυοκάρδιο ήταν σημαντικά υψηλότερα, σε σύγκριση με το μείζοντα θωρακικό μυ.

Τα Σχήματα 3.3 και 3.4 παρουσιάζουν τα περιεχόμενα λιπαρά οξέα στα τριγλυκερίδια και στα διγλυκερίδια των εξεταζόμενων μυών ως προς το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας. Τόσο τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, όσο και μεσαίας αλυσίδας στο σύνολο του δείγματος έτειναν να είναι χαμηλότερα στο μυοκάρδιο, ωστόσο οι διαφοροποιήσεις ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στα μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα. Οι διαφοροποιήσεις αυτές ήταν σαφείς μόνο στα διαβητικά άτομα. Τα επίπεδα διγλυκεριδίων παρουσίασαν ένα διαφορετικό πρότυπο: στο σύνολο του δείγματος τα λιπαρά οξέα μεσαίας και μακράς αλυσίδας έτειναν να είναι υψηλότερα στο μυοκάρδιο ($p=0.050$ και $p=0.075$ σε σύγκριση με το θωρακικό μυ αντίστοιχα). Οι διαφοροποιήσεις αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στην ομάδα των μη διαβητικών εθελοντών. Πρακτικά μηδενικές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας και για το λόγο αυτό τα λιπαρά αυτά οξέα δεν παρουσιάζονται.

Τα Σχήματα 3.5 και 3.6 παρουσιάζουν τα λιπαρά οξέα των τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων αντίστοιχα, με βάση το βαθμό κορεσμού τους. Παρόμοιες τάσεις παρουσιάστηκαν με αυτές για τα ολικά τριγλυκερίδια και διγλυκερίδια, με τη συσσώρευση για τα λιπαρά οξέα των τριγλυκεριδίων να είναι μικρότερη στο μυοκάρδιο, και αντίθετες τάσεις για τα διγλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα με το μεγαλύτερο βαθμό συσσώρευσης ήταν τα μονο-ακόρεστα για τα τριγλυκερίδια και τα κορεσμένα για τα διγλυκερίδια.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση της παρουσίας σακχαρώδη διαβήτη και

του συνολικού γλυκαιμικού ελέγχου, ελέγχθηκε η γραμμική συσχέτιση του ποσοστού γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης με τα επίπεδα ενδοκυτταρικών λιποειδών στους εξεταζόμενους μύες. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση ήταν αυτή μεταξύ της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και των επιπέδων διγλυκεριδίων στο μυοκάρδιο. Η συσχέτιση αυτή παριστάνεται γραφικά στο Σχήμα 3.7.

Τέλος, ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 μεταξύ φύλου και εξεταζόμενων ομάδων με βάση το ιστορικό διαβήτη δεν έδειξε κάποια σημαντική αλληλεπίδραση ($p=0.221$), κάτι που υποδεικνύει ότι το φύλο δεν επηρέασε σε σημαντικό βαθμό τις συγκρίσεις μας.

Σχολιασμός – Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η συσσώρευση των ενδοκυτταρικών λιποειδών στο μυοκάρδιο, σε σύγκριση με δύο μύες με χαρακτηριστικά σκελετικών μυών (μείζωνας θωρακικός και μεσοπλεύριος). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα ενδοκυτταρικά διγλυκερίδια είναι υψηλότερα στο ανθρώπινο μυοκάρδιο, ενώ τα επίπεδα τριγλυκεριδίων είναι χαμηλότερα. Επιπρόσθετα, η παρουσία σακχαρώδη διαβήτη έτεινε να μειώνει τα επίπεδα των των δύο λιποειδών στο μυοκάρδιο.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η οξείδωση των λιπαρών οξέων παρέχει το μεγαλύτερο ποσοστό του ATP που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της συσταλτικής δραστηριότητας του μυοκαρδίου (175). Μελέτες σε απομονωμένο μυοκάρδιο έχουν δείξει ότι τα ενδοκυτταρικά τριγλυκερίδια δεν αποτελούν μια στατική δομή, αλλά ότι αποτελούν μια σημαντική πηγή λιπαρών οξέων για τον οξειδωτικό μεταβολισμό (176). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματά μας, τα οποία δείχνουν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο μυοκάρδιο, υποδηλώνουν ότι η συνεχής ανακύκλωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων ενδεχομένως αποτρέπει μια σημαντική αύξηση των συνολικών αποθεμάτων, σε σύγκριση με τους σκελετικούς μύες. Από την άλλη μεριά, τα αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης των σκελετικών μυών, μέσω προπόνησης, έχουν συσχετιστεί με μια αύξηση των αποθεμάτων ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων (91). Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε χαμηλότερο βαθμό συσσώρευσης των τριγλυκεριδίων σε έναν μυ με συνεχή ενεργοποίηση (μυοκάρδιο), σε σύγκριση με έναν σκελετικό μυ ο οποίος δεν ενεργοποιείται συνεχώς, ενώ ο μεσοπλεύριος μυς (με χαρακτηριστικά γραμμωτού μυός και συνεχή ενεργοποίηση) παρουσίαζε μια ενδιάμεση τιμή. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η αποθήκευση

ενδοκυτταρικών λιποειδών στο μυοκάρδιο παρουσιάζει ενδεχομένως διαφορετική ρύθμιση σε σχέση με τους σκελετικούς μύες.

Σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης ή διαβήτη, ο οξειδωτικός μεταβολισμός των λιπαρών οξέων ευνοείται ακόμη περισσότερο στο μυοκάρδιο και μπορεί να συνεισφέρει μέχρι και το 100% της παραγωγής ενέργειας (177). Μελέτες σε ανθρώπους, με τη χρησιμοποίηση πυρηνικής μαγνητικής αντίληξης έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα στα λιποειδή του μυοκαρδίου σε διαβητικά άτομα (171). Η ιστολογική ανάλυση σε ανθρώπους με καρδιακή ανεπάρκεια δεν έχει δείξει κάποια σημαντική διαφοροποίηση στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια ανάμεσα σε διαβητικά και μη διαβητικά άτομα με τον ίδιο βαθμό παχυσαρκίας (170). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα οποία δείχνουν μια μείωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στο μυοκάρδιο στα διαβητικά άτομα. Θα πρέπει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις προαναφερθέντες μελέτες ενδεχομένως δεν επιτρέπουν τη διάκριση των διαφόρων τάξεων λιποειδών οι οποίες θα μπορούσαν να είναι παρούσες στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι σε ποντίκια τα οποία εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τη μεταφορική πρωτεΐνη 1 των λιπαρών οξέων στο μυοκάρδιο, δεν παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων, ενώ τα επίπεδα ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων ήταν διπλάσια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (178). Είναι πιθανό, η αύξηση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων που παρατηρείται σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης να αυξάνει και την κινητοποίηση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων, αποτρέποντας έτσι μια σημαντική αύξηση της συσσώρευσης αυτής της τάξης λιποειδών στο μυοκάρδιο. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η λιποτοξικότητα στο ανεπαρκές μυοκάρδιο συνοδεύεται από αντικατάσταση του καρδιακού μύος από λιποκύτταρα, ενώ τα κύτταρα του μυοκαρδίου που παραμένουν είναι φυσιολογικά (179). Θα μπορούσε επομένως να υποθεθεί ότι οι απεικονιστικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση των λιποειδών του μυοκαρδίου ενδεχομένως δεν είναι αρκετά ευαίσθητες για να διακρίνουν τα λιποειδή ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά.

Τα διγλυκερίδια αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα στην εστεροποίηση και/ή την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, αλλά αποτελούν επίσης και ένα σημαντικό δεύτερο μήνυμα για το μυοκάρδιο. Μελέτες στο σκελετικό μυ έχουν προσφέρει κάποιες ενδείξεις για το πιθανό ρόλο των επιπέδων ενδοκυτταρικών διγλυκεριδίων στην παθοφυσιολογία της ινσουλινοαντίστασης, μέσω της ενεργοποίησης μη τυπικών μορφών της πρωτεϊνικής κινάσης (94, 162). Από την άλλη μεριά, ωστόσο, τα διγλυκερίδια του μυοκαρδίου ενδεχομένως μεσολαβούν σε συγκεκριμένες

καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Έχει βρεθεί ότι το διγλυκερίδιο του οκτανοϊκού οξέος έχει μια θετική ινότροπη επίδραση στα κύτταρα του μυοκαρδίου, η οποία μεσολαβείται από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C-α και -ε (180). Το διγλυκερίδιο αυτό έχει τον ίδιο προστατευτικό ρόλο με την εφαρμογή ισχαιμίας (ischemic preconditioning) στη μείωση του μεγέθους των νεκρώσεων κατά τη διάρκεια βλάβης που προκλήθηκε με συνδυασμό ισχαιμίας και επανοξυγόνωσης του μυοκαρδίου (173) και στην δυσλειτουργία του αριστερού κόλπου της καρδιάς (174). Επιπρόσθετα, τα διγλυκερίδια ενδεχομένως παίζουν κάποιο ρόλο στον καρδιοπροστατευτικό ρόλο του υπογλυκαιμικού παράγοντα etomoxir (172). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν μπορεί να υποστηριχτεί μια αιτιολογική σχέση ανάμεσα στα επίπεδα των διγλυκεριδίων και στην ινσουλινοαντίσταση στο μυοκάρδιο. Αντίθετα, η αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα διγλυκερίδια του μυοκαρδίου και στο γλυκαιμικό έλεγχο, όπως επίσης και η τάση μειωμένων επιπέδων στα διαβητικά άτομα ενδεχομένως υποδηλώνουν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με διαταραγμένη σηματοδότηση των διγλυκεριδίων, η οποία τελικά μπορεί να προκαλεί διαταρχή στην ομαλή λειτουργία του μυοκαρδίου.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα ενδοκυτταρικά αποθέματα λιποειδών (με τη μορφή των τριγλυκεριδίων) στο ανθρώπινο μυοκάρδιο είναι μικρότερου βαθμού, σε σύγκριση με τους σκελετικούς μύες. Τα επίπεδα διγλυκεριδίων στο μυοκάρδιο ήταν παρόμοια με αυτά των σκελετικών μυών που εξετάστηκαν και σχετίζονταν αρνητικά με τα επίπεδα γλυκαιμικού ελέγχου. Η αρνητική αυτή συσχέτιση δείχνει ενδεχομένως μια πιθανή διαταραχή της σηματοδότησης των διγλυκεριδίων, η οποία μπορεί με τη σειρά της να συμβάλει στην εκδήλωση της καρδιομυοπάθειας.

Πίνακες και Γραφήματα

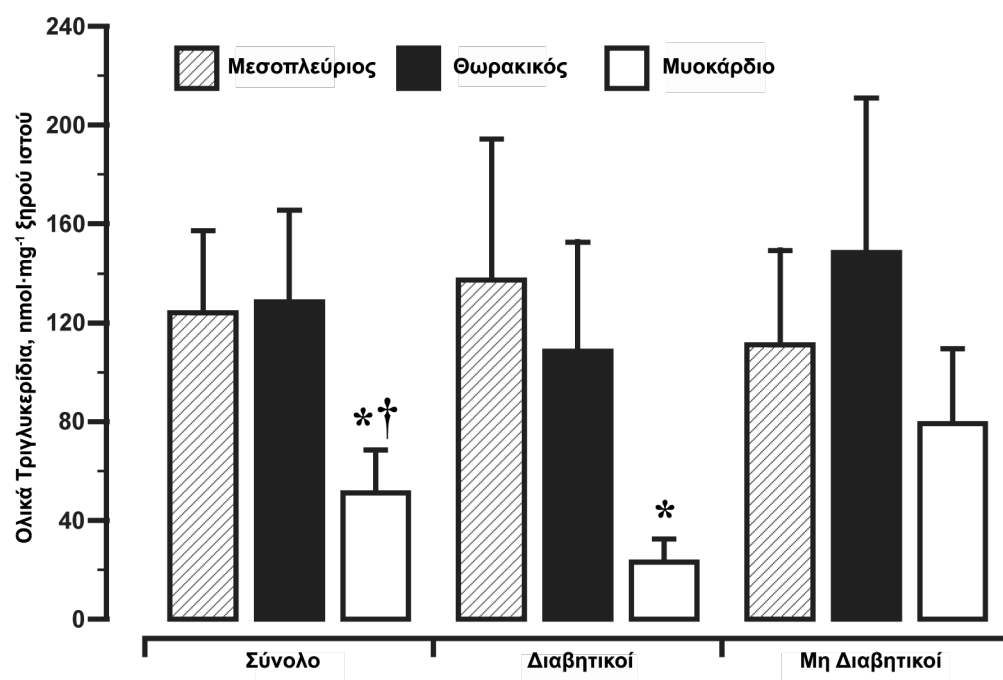
Πίνακας 3.1: Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών.

	Μη Διαβητικοί	Διαβητικοί
Φύλο, άντρες/γυναίκες	3/3	5/1
Ηλικία, χρόνια	70.7±3.3	68.5±2.2
Σωματικό Βάρος, kg	79.3±6.4	82.2±4.7
Δείκτης Μάζας Σώματος, kg·m ⁻²	26.8±0.9	28.1±1.1
Γλυκόζη Πλάσματος Νηστείας, mmol·L ⁻¹	4.9±0.2	7.2±0.8 [*]
Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαίρινη, %	5.9±0.2	7.1±0.4 [*]

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

^{*}

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την τιμή πριν την παρέμβαση, p<0.05



Σχήμα 3.1 Ολικά τριγλυκερίδια στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

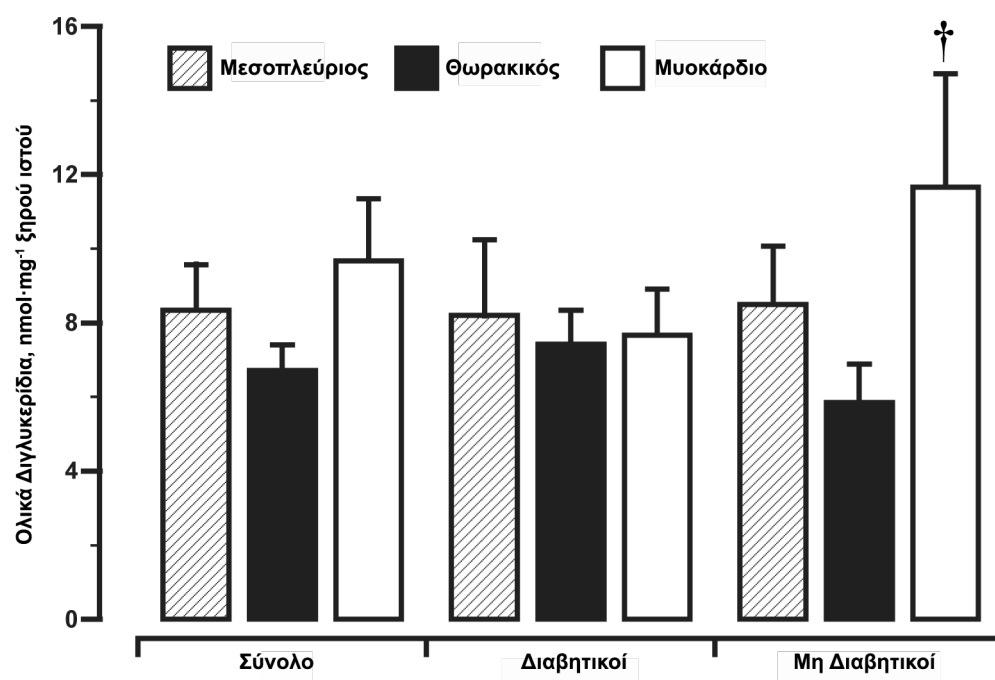
Οι τιμές είναι μέσοι $\pm$ 1 τυπική απόκλιση

*

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μεσοπλευρίο μυ, $p < 0.05$

†

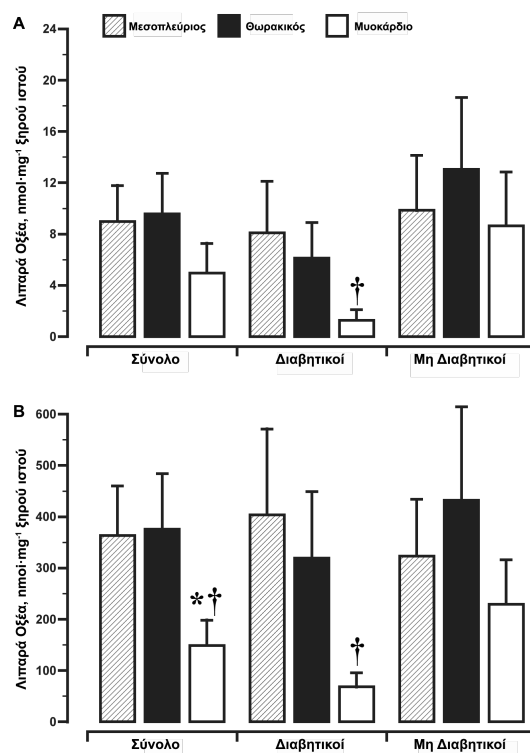
Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μυ, $p < 0.05$



Σχήμα 3.2 Ολικά διγλυκερίδια στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

Οι τιμές είναι μέσοι $\pm$ 1 τυπική απόκλιση

† Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μυ, $p < 0.05$



Σχήμα 3.3 Περιεχόμενα λιπαρά οξέα στα τριγλυκερίδια με βάση το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας (A: μεσαίας και B: μακράς αλυσίδας) στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

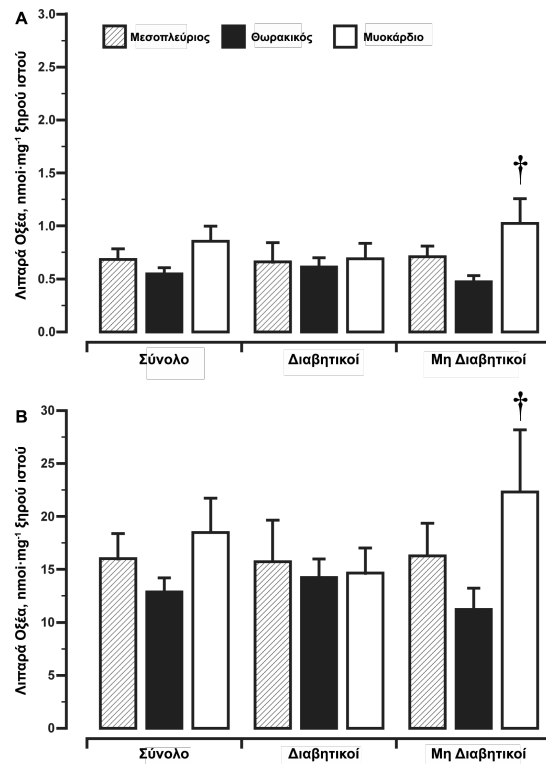
Οι τιμές είναι μέσοι $\pm$ 1 τυπική απόκλιση

*

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μεσοπλευρίο μυ, $p < 0.05$

†

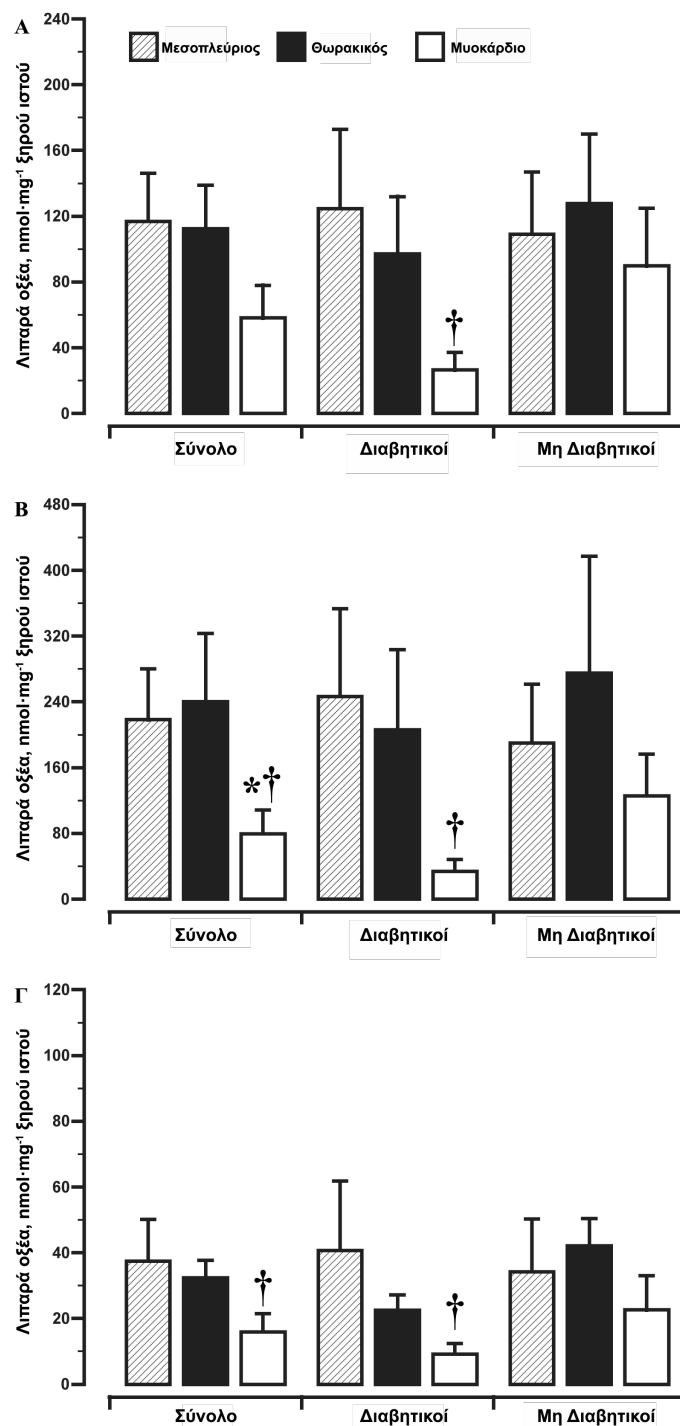
Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μυ, $p < 0.05$



Σχήμα 3.4 Περιεχόμενα λιπαρά οξέα στα διγλυκερίδια με βάση το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας (Α: μεσαίας και Β: μακράς αλυσίδας) στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

Οι τιμές είναι μέσοι $\pm$ 1 τυπική απόκλιση

[†] Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μυ, $p < 0.05$

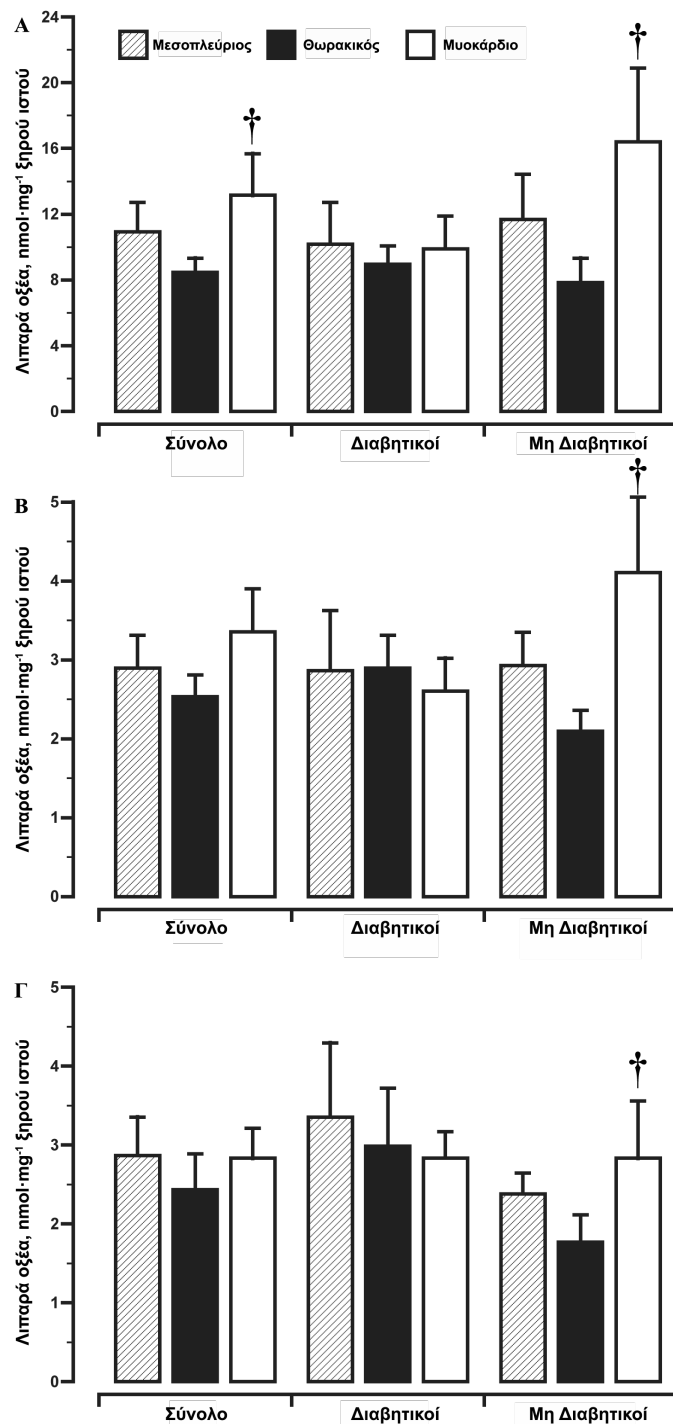


Σχήμα 3.5 Περιεχόμενα λιπαρά οξέα στα τριγλυκερίδια με βάση το βαθμό κορεσμού (Α: κορεσμένα, Β: μονο-ακόρεστα, Γ: πολυακόρεστα) στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

* Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μεσοπλευρίο μν, $p < 0.05$

† Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μν, $p < 0.05$



Σχήμα 3.6 Περιεχόμενα λιπαρά οξέα στα διγλυκερίδια με βάση το βαθμό κορεσμού (Α: κορεσμένα, Β: μονο-ακόρεστα, Γ: πολυακόρεστα) στους τρεις εξεταζόμενους μύες στο σύνολο του δείγματος και στις δύο υπο-ομάδες (διαβητικοί και μη διαβητικοί εθελοντές).

Οι τιμές είναι μέσοι $\pm$ 1 τυπική απόκλιση

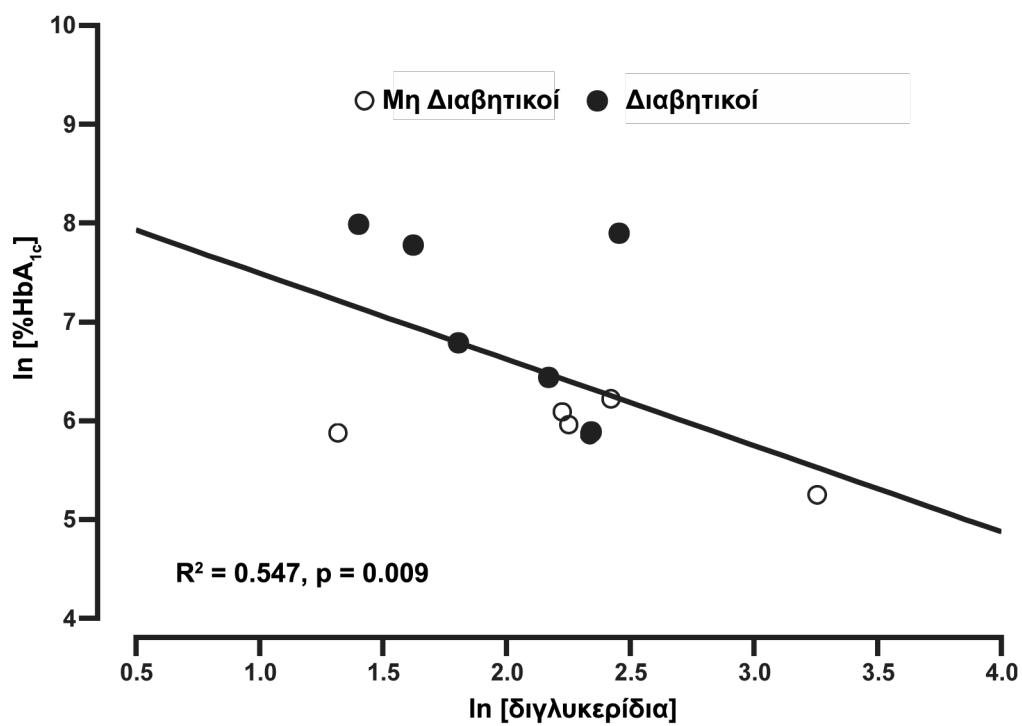
† Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το μείζονα θωρακικό μυ, $p < 0.05$

Πίνακας 3.2: Γραμμικές συσχετίσεις ανάμεσα στο ποσοστό γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και στα επίπεδα των ενδοκυτταρικών λιποειδών στους εξεταζόμενους μύες.

	$\beta \pm SE$	R^2	p
Τριγλυκερίδια			
Μεσοπλεύριος Μυς	0.010±0.040	0.007	0.812
Μείζων Θωρακικός Μυς	0.023±0.051	0.022	0.667
Μυοκάρδιο	-0.024±0.038	0.040	0.554
Διγλυκερίδια			
Μεσοπλεύριος Μυς	-0.138±0.071	0.296	0.084
Μείζων Θωρακικός Μυς	0.041±0.110	0.015	0.716
Μυοκάρδιο	-0.211±0.064	0.547	0.009

Οι συσχετίσεις έγιναν μετά από λογαρίθμιση των δεδομένων με βάση τη σταθερά e .

β : κλίσης καμπύλης, SE: τυπικό σφάλμα, R^2 : συντελεστής συσχέτισης



Σχήμα 3.7 Γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης και τα επίπεδα διγλυκεριδίων στο μυοκάρδιο.

4^η Μελέτη

Η επίδραση της απώλειας του 10% του βάρους στα επίπεδα και την ποιοτική σύσταση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων σε παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II

Εισαγωγή

Η μείωση του σωματικού βάρους μέσω δίαιτας αποτελεί ένα σημαντικό μέσο για τη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης σε παχύσαρκα άτομα, με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη. Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η μείωση του σωματικού βάρους βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι. Καθώς τα ενδομυϊκά λιποειδή έχουν συσχετιστεί με την ινσουλινοαντίσταση, κάτι το οποίο αναλύθηκε διεξοδικά στο πρώτο κομμάτι της διατριβής αυτής, ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η δίαιτα βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η επίδρασή της στα ενδομυϊκά λιποειδή.

Οι υπάρχουσες μελέτες οι οποίες έχουν εξετάσει την υπόθεση αυτή σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη έχουν καταλήξει σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, δείχνοντας είτε μείωση (150), είτε καμία επίδραση στα ενδομυϊκά λιποειδή στο τέλος της παρέμβασης (131). Επί του παρόντος δεν υπάρχουν μελέτες οι οποίες να έχουν διερευνήσει τα κατά πόσο η απώλεια βάρους μπορεί να επηρεάσει τα ενδομυϊκά διγλυκερίδια.

Ένας σημαντικός μεθοδολογικός περιορισμός σε παρεμβάσεις οι οποίες περιλαμβάνουν απώλεια βάρους είναι η διάρκεια του προγράμματος παρέμβασης. Είναι γενικά γνωστό ότι η ανταπόκριση σε μια υποθερμιδική δίαιτα παρουσιάζει πολύ μεγάλη διακύμανση σε ότι αφορά την απώλεια βάρους (126). Κατά συνέπεια, η εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος παρέμβασης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μπορεί να παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα, καθώς η διακύμανση στην απώλεια βάρους μπορεί να επηρεάζει επίσης και τις μετρήσεις των υπό εξέταση μεταβλητών. Μια άλλη προσέγγιση είναι η διατήρηση του προγράμματος για τόσο χρονικό διάστημα, όσο απαιτηθεί για την απώλεια ενός συγκεκριμένου ποσοστού του αρχικού σωματικού βάρους. Όλες οι εκτεταμένες κλινικές μελέτες οι οποίες έχουν διερευνήσει το ρόλο παραγόντων του τρόπου ζωής στο γλυκαιμικό έλεγχο και στην επίπτωση του σακχαρώδη διαβήτη είχαν θέσει ως στόχο μια απώλεια βάρους η οποία να είναι μικρότερη από το 10% του αρχικού βάρους (7-10, 122). Ο στόχος αυτός αντιπροσωπεύει τα ανώτερα όρια του εύρους του 5-10% που έχει προταθεί από τον Αμερικανικό Σύνδεσμο Διαβήτη για την πρόληψη ή τη

καθυστέρηση της εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη (181). Μια τέτοιου βαθμού μείωση στο σωματικό βάρος έχει φανεί ότι μπορεί να προκαλέσει σημαντικές διαφοροποιήσεις στα ενδομυϊκά λιποειδή σε παχύσαρκα άτομα (132).

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσο ένα ήπιο πρόγραμμα υποθερμιδικής διαίτας, με μικρού βαθμού μείωση στο σωματικό βάρος μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

Μέθοδοι και Αναλυτικές Διαδικασίες

Συμμετέχοντες

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά πέντε μετεμμηνοπαυσιακές παχύσαρκες γυναίκες με χρόνιο ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν 51.6 ± 3.0 χρόνια και ο Δείκτης Μάζας Σώματος $37.5 \pm 1.9 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$. Όλοι οι εθελοντές της μελέτης ήταν σε θεραπεία με την από το στόματος χορήγηση υπογλυκαιμικών παραγόντων. Η χρήση ινσουλίνης και η παρουσία ιατρικώς διαγνωσμένης μακρο- ή μικρο-αγγειοπάθειας αποτελούσαν κριτήρια αποκλεισμού από τη συμμετοχή στη μελέτη.

Πειραματικός Σχεδιασμός

Η παρέμβαση είχε ήπια μορφή, με ενεργειακό έλλειμμα της τάξης των 500-1000 θερμίδων ημερησίως (182), ανάλογα με την ανταπόκριση του κάθε εθελοντή και το βαθμό συμμόρφωσής του στην παρέμβαση. Οι εθελοντες παρακολουθούνταν σε εβδομαδιαία βάση από διαιτολόγο. Στόχος της παρέμβασης ήταν η απώλεια του 10% του αρχικού σωματικού βάρους. Η σύσταση της διαίτας στηρίχτηκε στις τρέχουσες συστάσεις για διαβητικά άτομα (ποσοστό διαιτητικού λίπους <30% της ενεργειακής πρόσληψης και πρωτεϊνών 15-20%), οι οποίες είναι αντίστοιχες με τη μέση διαίτα και τις συστάσεις για το γενικό πληθυσμό (182). Οι ημερήσιες ενεργειακές ανάγκες προσδιορίστηκαν ως πολλαπλάσιο του βασικού μεταβολικού ρυθμού με τον κατάλληλο συντελεστή φυσικής δραστηριότητας (183).

Οι εξεταζόμενοι επισκέφτηκαν αρχικά το εργαστήριο ή το Τζάνειο Νοσοκομείο σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, υπό συνθήκες νηστείας (τουλάχιστον 10 ωρών), οι οποίες απήχαν η μία από την άλλη 3-5 ημέρες. Κατά τις επισκέψεις αυτές αρχικά λήφθηκε ένα ιατρικό και

διαιτητικό ιστορικό, έγινε μέτρηση της σύστασης σώματος και του βασικού μεταβολισμού και επίσης δοκιμασία ανοχής γλυκόζης και βιοψία μυϊκού ιστού, έτσι όπως περιγράφηκε αναλυτικά στη δεύτερη μελέτη. Μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων δόθηκε στους εθελοντές διαιτολόγιο και το σωματικό βάρος παρακολουθούνταν σε εβδομαδιαία βάση. Μόλις η μείωση του σωματικού βάρους έφτασε στα επίπεδα του 10% οι παραπάνω μετρήσεις επαναλήφθηκαν μέσα σε χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας και ενώ οι εθελοντές εξακολουθούσαν να βρίσκονται στην υποθερμιακή διαίτα.

Η συμμετοχή των εθελοντών στη μελέτη έγινε μετά από αναλυτική παρουσίαση των στόχων της μελέτης, των υποχρεώσεών τους και των πιθανών κινδύνων που απορρέουν από τη συμμετοχή τους. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής (Παράρτημα) πριν τη συμμετοχή στη μελέτη. Η μελέτη διεξήχθη με τα πρότυπα τα οποία καθορίζονται στην τελευταία έκδοση της Διακήρυξης του Ελσίνκι και πήρε έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και την Επιστομική Επιτροπή του Τζανείου Νοσοκομείου. Υπεύθυνοι για την κλινική παρακολούθηση των εθελοντών ήταν γιατροί από το Διαβητολογικό Κέντρο του Τζανείου νοσοκομείου.

Εξεταζόμενες Παράμετροι

Οι βασικές μεταβλητές οι οποίες εξετάστηκαν ήταν τα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια και τα διγλυκερίδια πριν και μετά την παρέμβαση. Δευτερεύουσες μετρήσεις περιελάμβαναν τη σύσταση σώματος, την ευαισθησία στην ινουλίνη (με βάση το ομοιοστατικό μοντέλο) και το γλυκαιμικό έλεγχο (με βάση τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης), το λιπιδαιμικό προφίλ (τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη στο πλάσμα), την οξειδωτική ικανότητα του μυϊκού ιστού (ως ενεργότητα κυττρικής συνθάσης) και κάποιες βασικές μεταβολικές μετρήσεις (με βάση την έμμεση θερμιδομετρία). Οι αναλυτικές τεχνικές με τις οποίες αξιολογήθηκαν τα παραπάνω περιγράφονται λεπτομερώς στη μεθοδολογία της 1^η και 2^{ης} μελέτης.

Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι $\pm$ 1 τυπικό σφάλμου του μέσου. Λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος, οι συγκρίσεις πριν και μετά την παρέμβαση έγιναν με τον κατά ζεύγη μη παραμετρικό έλεγχο του Wilcoxon. Ως αποδεκτό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

Οι μεταβολές στα βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και στη σύσταση σώματος των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Η μέση απώλεια σωματικού βάρους ήταν 9.8 ± 1.1 kg κατά απόλυτη τιμή, αντιπροσωπεύοντας το $9.5 \pm 0.6\%$ του αρχικού βάρους ($p < 0.05$). Η απώλεια αυτή συνοδεύονταν από μια σημαντική μείωση του σωματικού λίπους και του δείκτη μάζας σώματος ($p < 0.05$). Ωστόσο και οι δύο αυτές μεταβλητές παρέμειναν σε τιμές αρκετά υψηλές, ώστε οι εθελοντές να μπορούν να θεωρηθούν παχύσαρκοι και μετά το τέλος της παρέμβασης.

Το Σχήμα 4.1 παρουσιάζει την επίδραση της παρέμβασης στο γλυκαιμικό έλεγχο και στην ινσουλινοαντίσταση. Η μείωση του βάρους οδήγησε σε σημαντικά διαφοροποιημένες αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης και στο συνολικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη γλυκόζης – χρόνου. Αν και η διαφοροποίηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική, η μείωση της ινσουλινοαντίστασης (δείκτης HOMA) ήταν αρκετά μεγάλη, της τάξης του 47%.

Ο Πίνακας 4.2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα νηστείας των βιοχημικών εξετάσεων στο αίμα πριν και μετά την παρέμβαση. Τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας παρουσίαζαν μια σαφή τάση μείωσης μετά την παρέμβαση, ωστόσο η διαφοροποίηση δεν έφτασε σε επίπεδο σημαντικότητας ($p = 0.08$). Με εξαίρεση την HDL-χοληστερόλη, η οποία παρουσίασε μια σημαντική μείωση, το λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών παρουσίαζε μικρές, μη στατιστικά σημαντικές βελτιώσεις στο τέλος της παρέμβασης.

Τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων πριν και στο τέλος της παρέμβασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2. Η μείωση του σωματικού βάρους οδήγησε σε μια αξιοσημείωτη μείωση, σε επίπεδα εξάντλησης, των τριγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό, η τάξη της οποίας ήταν κατά μέσο όρο της τάξης του $77.7 \pm 13.1\%$. Σε ότι αφορά τα περιεχόμενα στα τριγλυκερίδια λιπαρά οξέα, όλες οι κατηγορίες λιπαρών οξέων παρουσίασαν σαφείς τάσεις μείωσης στο τέλος της παρέμβασης, αλλά ωστόσο ήταν στατιστικά σημαντικές για τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τα κορεσμένα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ($p < 0.05$), ενώ στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ήταν και η διαφοροποίηση για τα ωμέγα-6 λιπαρά οξέα ($p = 0.08$).

Το Σχήμα 4.3 παρουσιάζει τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων. Οι μεταβολές πριν και μετά την παρέμβαση στα ολικά διγλυκερίδια δεν παρουσίασαν μια μονόπλευρη κατεύθυνση, με τρία αρνητικά και δύο θετικά περιστατικά, ενώ η μέση διαφοροποίηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0.686$). Αντίστοιχες τάσεις παρουσιάστηκαν και στα επίπεδα των περιεχόμενων

στα διγλυκερίδια λιπαρών οξέων.

Τα αποτελέσματα της έμμεσης θερμιδομετρίας των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Η μείωση του βάρους δεν οδήγησε σε κάποια αλλαγή του μεταβολικού ρυθμού ηρεμίας και επίσης δεν επηρέασε τη συνολική οξειδωτική (ή γλυκολυτική) ικανότητα του οργανισμού στο σύνολό του, όπως φαίνεται από τη συμμετοχή υδατανθράκων και λιπών στην παραγωγή ενέργειας. Αντίστοιχα, η ενεργότητα της κιτρικής συνθάσης στο μυϊκό ιστό μετά την παρέμβαση δεν παρουσίασε κάποια αξιόλογη μεταβολή (Σχήμα 4.4).

Σχολιασμός – Συμπεράσματα

Η μείωση του σωματικού βάρους αποτελεί βασικό συστατικό στην κλινική αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, καθώς επηρεάζει θετικά και σε σημαντικό βαθμό την ευαισθησία στην ινσουλίνη και το γλυκαιμικό έλεγχο. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το κατά πόσο μια σχετικά μικρού βαθμού μείωση του σωματικού βάρους σε διαβητικά άτομα θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα ενδομυϊκών λιποειδών. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μια τέτοια παρέμβαση οδηγεί πρακτικά στην εξάντληση των αποθεμάτων ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων, χωρίς ωστόσο να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η μείωση των ενδομυϊκών αποθεμάτων λιποειδών (ως τριγλυκερίδια) δε συνοδεύτηκε από μια σημαντική μεταβολή στην οξειδωτική ικανότητα του μυϊκού ιστού, όπως προκύπτει από τη μέτρηση της ενεργότητας της κιτρικής συνθάσης. Συνεπώς, η μείωση των τριγλυκεριδίων θα μπορούσε να αποδοθεί σε μείωση της ροής των λιπαρών οξέων από τη συστηματική κυκλοφορία προς την εστεροποίησή τους σε τριγλυκερίδια και όχι σε αύξηση της υδρόλυσης και στη συνέχεια οξείδωσής τους. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η μείωση του σωματικού βάρους οδηγεί σε περιορισμό της διαθεσιμότητας λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος και κατ' επέκταση σε μείωση της αποθήκευσής τους στο μυϊκό ιστό. Η υπόθεση αυτή είναι σε συμφωνία με τη θεωρία της υπερχειλίσης στο λιπώδη ιστό (η οποία αναλύθηκε διεξοδικά στην πρώτη ενότητα της διατριβής αυτής). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή και αναφορικά με τη μείωση του σωματικού βάρους μπορεί να θεωρηθεί ότι η μείωση του σωματικού λίπους (μέσω της δίαιτας) οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας του λιπώδη ιστού για αποθήκευση της περίσσειας του λίπους της διατροφής και επομένως μείωση της εκτροπής του προς αποθήκευση σε άλλους ιστούς, όπως ο μυϊκός ιστός.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της δεύτερης μελέτης της διατριβής αυτής δε συνηγορούν υπέρ μιας αιτιολογικής σχέσης μεταξύ των επιπέδων ενδομυϊκών διγλυκεριδίων και της ινσουλινοαντίστασης, αφού η παρέμβαση οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης και του γλυκαιμικού ελέγχου, χωρίς μια σαφή μείωση των ενδομυϊκών διγλυκεριδίων. Θα μπορούσε να υποθεί ότι η βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης μέσω ενός μικρού βαθμού απώλειας βάρους με υποθερμιδική δίαιτα δε συνδέεται με μεταβολές στα ενδομυϊκά διγλυκερίδια, αλλά ενδεχομένως συνδέεται με μεταβολές στη συνολικό ρυθμό εστεροποίησης των λιπαρών οξέων προς λιποειδικά αποθέματα.

Πίνακες και Γραφήματα

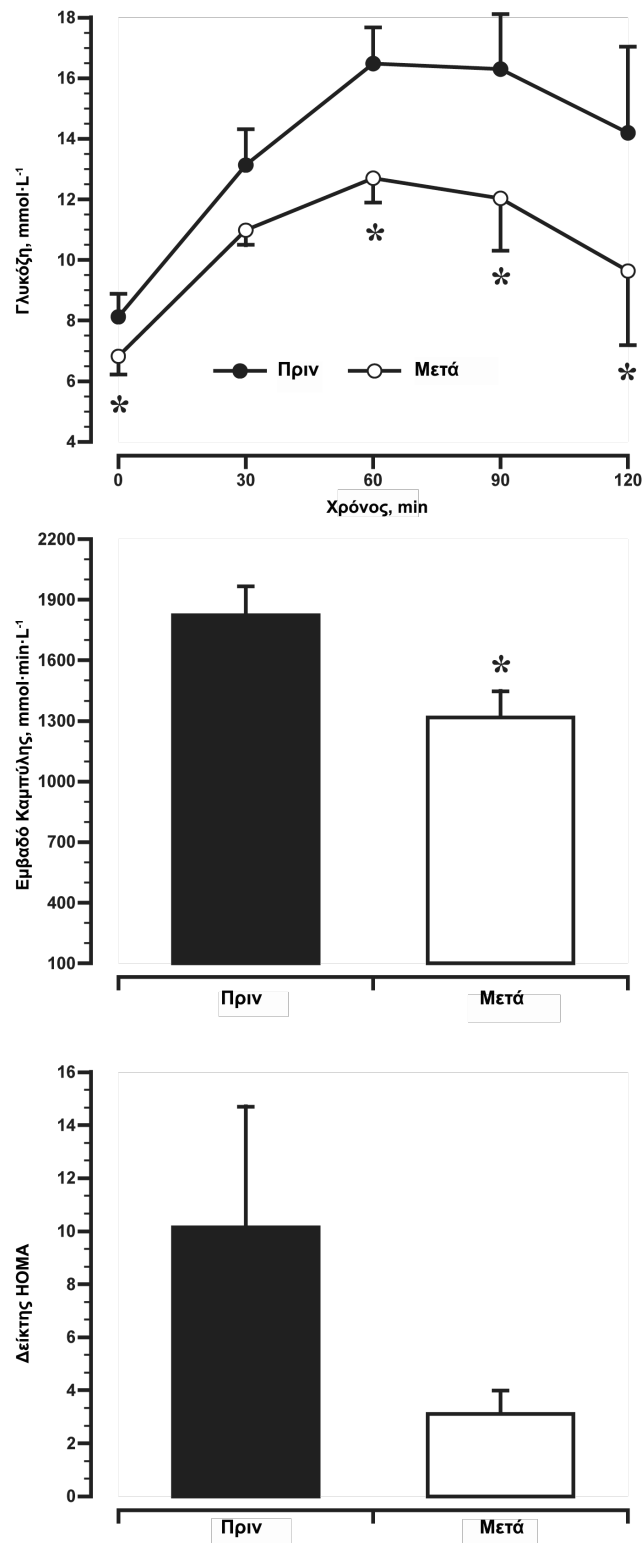
Πίνακας 4.1: Φυσιολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση.

	Πριν	Μετά
Σωματικό Βάρος, kg	101.8±5.8	92.0±4.9 [*]
Δείκτης Μάζας Σώματος, kg·m ⁻²	37.5±1.9	33.9±1.7 [*]
Ισχνή Μάζα Σώματος, kg	49.1±1.8	48.7±1.5
Σωματικό Λίπος, %	46.9±2.1	42.4±2.5 [*]
Σωματικό Λίπος Κορμού, kg	22.4±2.0	18.2±1.3 [*]

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

*

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την τιμή πριν την παρέμβαση, p<0.05



Σχήμα 4.1 Γλυκαιμική απάντηση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης και ινσουλινοααντίσταση των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση.

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

* Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την τιμή πριν την παρέμβαση, $p < 0.05$

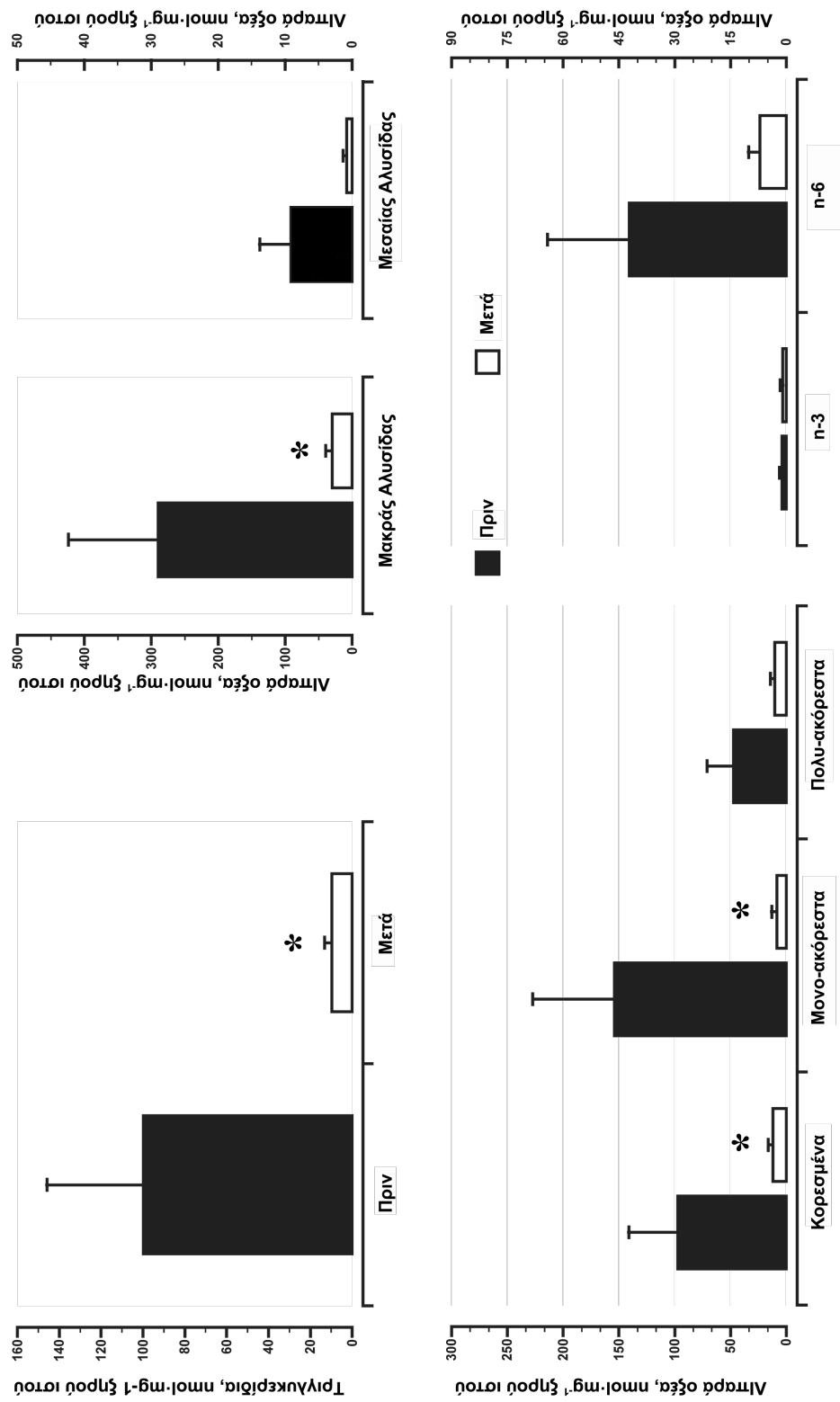
Πίνακας 4.2: Επίπεδα νηστείας γλυκόζης, ινσουλίνης και λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση.

	Πριν	Μετά
Γλυκόζη, mmol·L ⁻¹	8.12±0.76	6.89±0.39 [*]
Ινσουλίνη, μIU·L ⁻¹	15.56±3.00	10.16±2.43
Τριγλυκερίδια, mmol·L ⁻¹	1.45±0.16	1.23±0.15
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα, mmol·L ⁻¹	0.98±0.19	0.77±0.11
Ολική Χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	5.75±0.52	5.09±0.46
HDL-χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	1.10±0.06	1.01±0.07 [*]
LDL-χοληστερόλη, μmol·L ⁻¹	3.99±0.44	3.52±0.40

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

*

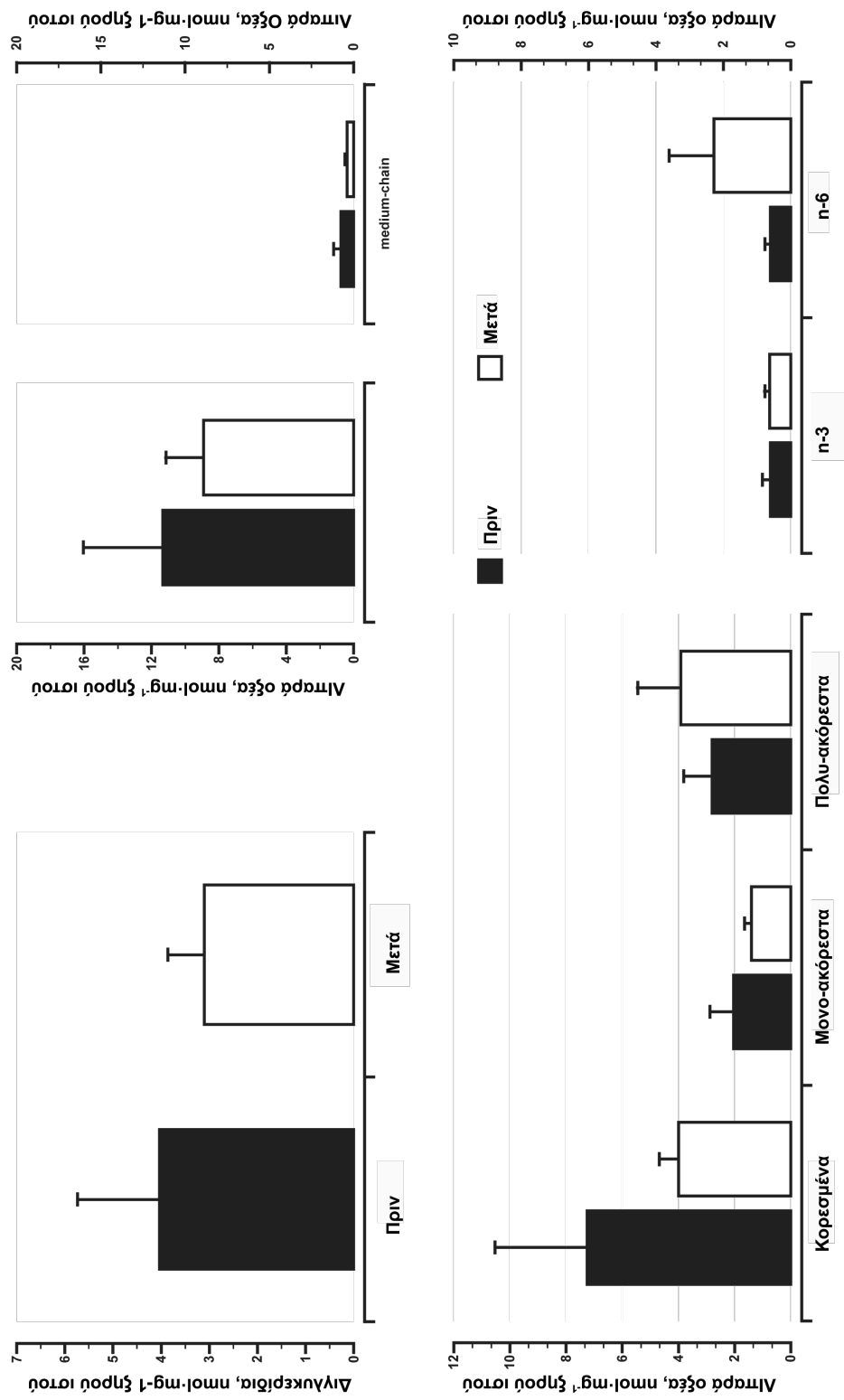
Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την τιμή πριν την παρέμβαση, p<0.05



Σχήμα 4.2: Ενδομυϊκά ολικά τριγλυκερίδια και περιεχόμενα σε ωνά λιπαρά οξέα

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα.

* Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τις τιμές πριν την παρέμβαση, $p < 0.05$



Σχήμα 4.3: Ενδομυϊκά ολικά διγλυκερίδια και περιεχόμενα σε αυτά λιπαρά οξέα

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπικό σφάλμα.

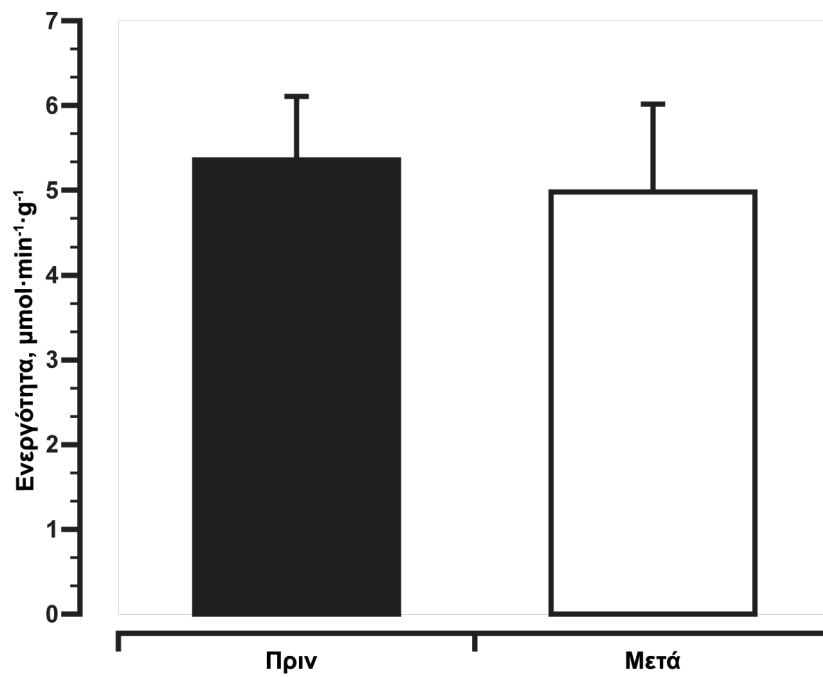
Πίνακας 4.3: Μεταβολικές μετρήσεις των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση.

	Πριν	Μετά
Κατανάλωση Οξυγόνου, $L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1} \cdot 10^{-3}$	2.30±0.12	2.40±0.11
Αναπνευστικό Πηλίκιο	0.80±0.03	0.82±0.03
Μεταβολικός Ρυθμός Ηρεμίας, $kJ \cdot kg^{-1}$	65.57±3.12	68.91±3.01
Κατανάλωση Υδατανθράκων, %	35.6±10.1	41.8±10.6
Κατανάλωση Λιπών, %	64.4±10.1	58.2±10.6

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

*

Υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με την τιμή πριν την παρέμβαση, $p < 0.05$



Σχήμα 4.4 Ενεργότητα κυτταρικής συνθάσης στο μυϊκό ιστό των εθελοντών πριν και μετά την παρέμβαση.

Οι τιμές είναι μέσοι ± 1 τυπική απόκλιση

Γενικά Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή εξετάσθηκαν τα επίπεδα ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό σε διάφορες καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης, όπως επίσης μελετήθηκε και η επίδραση της απώλειας βάρους στα επίπεδα των λιποειδών αυτών στο μυϊκό ιστό. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι τα παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα αποθέματα ενδομυϊκών λιποειδών (ως τριγλυκερίδια) σε σύγκριση με παχύσαρκα άτομα χωρίς διαβήτη, ενώ τα διαβητικά άτομα με μικρότερο βαθμό παχυσαρκίας προστατεύονται σε κάποιο βαθμό από τη σημαντική αύξηση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων. Αντίθετα, τα επίπεδα ενδομυϊκών διγλυκεριδίων δε φάνηκε να επηρεάζονται από το βαθμό ινσουλινοαντίστασης ή και να σχετίζονται με αυτή, τουλάχιστον στις καταστάσεις οι οποίες εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, η βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης μέσω της μείωσης του σωματικού βάρους συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων, χωρίς ωστόσο να επηρεάσει τα επίπεδα διγλυκεριδίων. Στο σύνολό τους, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι ενδεχομένως η συνολική αύξηση της ροής των λιπαρών οξέων προς εστεροποίηση και τη δημιουργία αποθηκευτικών μορφών είναι αυτή που συνδέεται με την ινσουλινοαντίσταση και όχι ενδιάμεσα μόρια της πορείας αυτής, όπως τα διγλυκερίδια.

Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής, αν και θέτουν σε αμφισβήτηση το ρόλο των ολικών επιπέδων ενδομυϊκών διγλυκεριδίων σε κατάσταση νηστείας στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης, ωστόσο δεν αμφισβητούν τη σχέση των διγλυκεριδίων με τη μείωση της σηματοδότησης της ινσουλίνης, μέσω της τροποποίησης της ενεργότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ο μηχανισμός αυτός έχει αποδειχτεί επαρκώς σε *in vitro* μελέτες και είναι απίθανο να μην είναι υπαρκτός και *in vivo*. Ωστόσο, κάποιοι παράγοντες στο κυτταρικό περιβάλλον ενδεχομένως δρουν ανασταλτικά στο μηχανισμό αυτό. Για παράδειγμα, η μορφολογία των ενδομυϊκών λιποειδών, τα οποία αποθηκεύονται με τη μορφή σφαιριδίων, ενδεχομένως αποτρέπει την παρουσία επαρκών ποσοτήτων διγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα, τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν ως τροποποιητές του ενζύμου. Από φυσιολογικής πλευράς, και με μια τελεολογική προσέγγιση, ένας μηχανισμός που θα απέτρεπε την παρουσία σημαντικών ποσοτήτων διγλυκεριδίων στο κυτταροπλασματικό περιβάλλον είναι απολύτως πιθανή, αν λάβουμε υπόψη ότι τα μόρια αυτά επιτελούν, ως δεύτερα μηνύματα, ένα πλήθος σημαντικών βιολογικών δράσεων. Είναι επίσης πιθανό η ποιότητα των διαθέσιμων λιπαρών οξέων προς εστεροποίηση να απέτρεψε την αύξηση της συσσώρευσης διγλυκεριδίων στους εξεταζόμενους της μελέτης αυτής. Σε όλους τους μύες που εξετάστηκαν το κύριο λιπαρό οξύ των τριγλυκεριδίων ήταν το ελαϊκό οξύ, το οποίο αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ της μεσογειακής

διατροφής. Όπως αναφέρθηκε σε αρκετά σημεία του κειμένου, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσιάζουν ταχύτατη ενσωμάτωση στα ενδομυϊκά τριγλυκερίδια, χωρίς να επιτρέπουν σημαντική αύξηση των διγλυκεριδίων ενδομυϊκά.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, μελλοντικές κατευθύνσεις για την περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής σχέσης των διγλυκεριδίων με την ινσουλινοαντίσταση θα μπορούσαν να εστιαστούν στο κατά πόσο κάποιες καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία, σχετίζονται με διαταραγμένη απομάκρυνση των διγλυκεριδίων σε περιπτώσεις αυξημένου ρυθμού εστεροποίησης των λιπαρών οξέων ή αυξημένου ρυθμού υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Θα ήταν για παράδειγμα ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν στα διαβητικά ή στα παχύσαρκα άτομα τα διγλυκερίδια απομακρύνονται προς σχηματισμό τριγλυκεριδίων με την ίδια ταχύτητα στο μεταγευματικό στάδιο με άτομα φυσιολογικής ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Στην αντίθετη πλευρά, θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να διερευνηθεί το κατά πόσο σε καταστάσεις αυξημένου ρυθμού υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων, όπως σε παρατεταμένη νηστεία ή κατά τη διάρκεια άσκησης, τα άτομα με ινσουλινοαντίσταση παρουσιάζουν την ίδια ταχύτητα απομάκρυνσης των διγλυκεριδίων με ινσουλινοευαίσθητα άτομα. Η σχέση της ποιότητας των εξωγενών λιπαρών οξέων με τα επίπεδα διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων αποτελεί επίσης μια επίσης ενδιαφέρουσα υπόθεση που θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω στον άνθρωπο. Θα ήταν για παράδειγμα ενδιαφέρον να εξεταστεί η ταχύτητα πλήρους εστεροποίησης προς τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων διαφόρων βαθμών κορεσμού και μήκους της ανθρακικής αλυσίδας, μέσω της χορήγησής τους είτε ως ένα απλό γεύμα, είτε σε περισσότερο μακροπρόθεσμη βάση ως μια δίαιτα εμπλουτισμένη σε συγκεκριμένα λιπαρά οξέα.

Παράρτημα 1: Συμφωνητικά Εθελοντικής Συμμετοχής

Στη συνέχεια παραθέτονται τα συμφωνητικά εθελοντικής συμμετοχής, ένα για τις μελέτες 2 και 4, και ένα για τη μελέτη 3.

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΕΓΩ,

Ο /Η

ΚΑΤΟΙΚΟΣ

ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΩ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΩ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω την εθελοντική συμμετοχή μου στην ερευνητική μελέτη με τίτλο «Ενδομυϊκά Λιποειδή στο Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II και Ινσουλινοαντίσταση. Επίδραση της Διατροφής και της Άσκησης», η οποία θα διεξαχθεί από το Διαβητολογικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου και το Χαρακόπειο Πανεπιστήμιο, Εργαστήριο Διατροφής & Κλινικής Διαιτολογίας. Η απόφασή μου να συμμετάσχω στη μελέτη πάρθηκε μετά από προφορική επεξήγηση του σκοπού της μελέτης και των υποχρεώσεών μου.

ΔΗΛΩΝΩ ΟΤΙ ΚΑΤΑΝΟΩ ΚΑΙ ΑΠΟΔΕΧΟΜΑΙ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

1. Στόχος της μελέτης είναι η διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στα επίπεδα διαφόρων τάξεων λιποειδών στο μυϊκό ιστό και στην ινσουλινοαντίσταση, η οποία είναι απόρροια της κλινικής μου κατάστασης (παρουσία Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II ή παχυσαρκίας). Για το σκοπό αυτό δέχομαι να συμμετέχω σε ένα πρόγραμμα παρέμβασης, το οποίο θα περιλαμβάνει είτε διαιτητική παρέμβαση από μόνη της, είτε διαιτητική παρέμβαση σε συνδυασμό με ένα πρόγραμμα τακτικής άσκησης.
2. Η συμμετοχή μου στη μελέτη προϋποθέτει τη διεξαγωγή των ακόλουθων εξετάσεων πριν και μετά το πρόγραμμα παρέμβασης στο οποίο θα συμμετάσχω:
 - ❖ Λήψη μυϊκής βιοψίας από τον τετρακέφαλο μυ του ποδιού (90-150 mg) με βελόνα βιοψίας.
 - ❖ Τεστ ανοχής γλυκόζης: στη δοκιμασία αυτή αρχικά θα γίνει μια λήψη μικρής ποσότητας αίματος από φλέβα του χεριού, στη συνέχεια θα καταναλώσω ένα διάλυμα 75 g γλυκόζης και θα ακολουθήσουν τέσσερις (4) αιμοληψίες, οι οποίες θα απέχουν χρονικά μεταξύ τους κατά μισή (1/2) ώρα.

Σελίδα 1 από 3

- ❖ Μέτρηση της σύστασης σώματος με τη μέθοδο απορροφησιομετρίας ακτίνων Χ διπλής ενέργειας: κατά τη μέθοδο αυτή από όλη την έκταση του σώματός μου θα διέλθει ακτινοβολία πολύ χαμηλής ενέργειας, με στόχο την απεικόνιση της μυϊκής και της λιπώδους μάζας μου, όπως επίσης και των οστών μου.
- ❖ Μέτρηση του βασικού μου μεταβολισμού με έμμεση θερμιδομετρία, η οποία συνίσταται στη μέτρηση των αερίων που εισπνέω και εκπνέω σε συνθήκες ανάπαυσης.

3. Αναγνωρίζω ότι:

- ❖ Η λήψη μυϊκής βιοψίας είναι σε γενικές γραμμές μια ασφαλής διαδικασία και ενέχει ελάχιστους κινδύνους, όπως μικρής έκτασης αιμορραγία και τοπική φλεγμονή στο σημείο της βιοψίας.
- ❖ Οι αιμοληψίες ενέχουν μη σημαντικούς κινδύνους για την υγεία μου, όπως μελάνιασμα στο σημείο της αιμοληψίας και τοπική φλεγμονή.
- ❖ Η μέθοδος της απορροφησιομετρίας ακτίνων Χ διπλής ενέργειας εκλύει πολύ μικρή ποσότητα ακτινοβολίας, η οποία είναι ίση με το 1/100 μιας κοινής ακτινογραφίας θώρακα.

4. Επιδιώξω του προγράμματος πέρα από οποιαδήποτε ερευνητικά οφέλη θα είναι και η βελτίωση της κλινικής μου κατάστασης. Για το σκοπό αυτό θα παρακολουθούμαι τακτικά από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό του νοσοκομείου και από διαιτολόγους. Για την ελαχιστοποίηση οποιωνδήποτε πιθανών κινδύνων οι οποίοι απορρέουν από τις εξετάσεις στις οποίες θα υποβληθώ, όλες οι σχετικές διαδικασίες θα γίνουν από εξειδικευμένο προσωπικό, υπό πρότυπες συνθήκες.
5. Οποιαδήποτε πληροφορία που αφορά εμένα και αποτελέσματα εξετάσεών μου, τα οποία θα προκύψουν από τη μελέτη, θα παραμείνουν **απόρρητα** και δε θα δημοσιευθούν ονομαστικά σε οποιαδήποτε δημοσίευση προκύψει από τη συγκεκριμένη μελέτη.

Εγώ, ο υπογραφόμενος κατανοώ τις παραπάνω εξηγήσεις και δίνω τη συναίνεσή μου για την εθελοντική συμμετοχή μου στην προαναφερθείσα μελέτη.

Η ηλικία μου είναι

Η ημερομηνία γέννησής μου είναι:/..../.....

Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση.

Η σημερινή ημερομηνία είναι:/..../20....

Το παρόν υπογράφηκε από εμένα, υπό την παρουσία των ακολούθων:

Ο εθελοντής

(όνομα και υπογραφή)

Ο μάρτυρας

(όνομα και υπογραφή)

Ο ερευνητής

(όνομα και υπογραφή)

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΕΓΩ,

Ο /Η

ΚΑΤΟΙΚΟΣ

ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΩ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΩ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω την εθελοντική συμμετοχή μου στην ερευνητική μελέτη με τίτλο Ενδομυϊκά Λιποειδή στο Μυϊκό Ιστό, η οποία θα διεξαχθεί από το Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, 2^η Καρδιοχειρουργική Κλινική και το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής. Η απόφασή μου να συμμετάσχω στη μελέτη πάρθηκε μετά από προφορική επεξήγηση του σκοπού της μελέτης και των υποχρεώσεών μου.

ΔΗΛΩΝΩ ΟΤΙ ΚΑΤΑΝΟΩ ΚΑΙ ΑΠΟΔΕΧΟΜΑΙ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

1. Κατά την επέμβαση ανοιχτής καρδιάς στην οποία θα υποβληθώ, θα γίνει από τον αρμόδιο χειρουργό λήψη μιας μικρής ποσότητας από τον μείζονα θωρακικό, το μυοκάρδιο και από μεσοπλεύριους μύες. Η ποσότητα που θα ληφθεί από κάθε μυ δε θα ξεπερνάει το μισό (1/2) γραμμάριο. Επίσης στο άμεσο χρονικό διάστημα πριν την επέμβαση και κατά την παραμονή μου στο νοσοκομείο θα γίνει λήψη μιας μικρής ποσότητας αίματος (περίπου 6 mL).
2. Αναγνωρίζω ότι η λήψη των βιοψιών δε συνοδεύεται από πρόσθετους κινδύνους για την υγεία μου ή για την ομαλή έκβαση της χειρουργικής επέμβασης, πέραν αυτών που απορρέουν από την επέμβαση αυτή κάθε αυτή, τους οποίους έχω αποδεχτεί και τους θεωρώ ανεξάρτητους από τη συμμετοχή μου στη μελέτη.
3. Οποιαδήποτε πληροφορία που αφορά εμένα και αποτελέσματα εξετάσεών μου, τα οποία θα προκύψουν από τη μελέτη, θα παραμείνουν **απόρρητα** και δε θα δημοσιευθούν ονομαστικά σε οποιαδήποτε δημοσίευση προκύψει από τη συγκεκριμένη μελέτη.

Εγώ, ο υπογραφόμενος κατανοώ τις παραπάνω εξηγήσεις και δίνω τη συναίνεσή μου για την εθελοντική συμμετοχή μου στην προαναφερθείσα μελέτη.

Η ηλικία μου είναι

Η ημερομηνία γέννησής μου είναι:/..../.....

Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση.

Η σημερινή ημερομηνία είναι:/..../20...

Το παρόν υπογράφηκε από εμένα, υπό την παρουσία των ακολούθων:

Ο εθελοντής

(όνομα και υπογραφή)

Ο μάρτυρας

(όνομα και υπογραφή)

Ο ερευνητής

(όνομα και υπογραφή)

Παράρτημα 2: Δημοσιεύσεις

Στη συνέχεια παραθέτονται οι δημοσιεύσεις που έχουν προκύψει μέχρι τώρα από τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής. Η πρώτη δημοσίευση αποτελεί μέρος των αποτελεσμάτων της 2^η μελέτης της διατριβής αυτής, ενώ η δεύτερη δημοσίευση στηρίζεται στα αποτελέσματα της 4^η μελέτης. Τα αποτελέσματα της 3^η μελέτης βρίσκονται υπό κρίση προς δημοσίευση.

Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans

Costas A. Anastasiou^a, Stavros A. Kavouras^{a,*}, Yannis Lentzas^b,
Afrodite Gova^b, Labros S. Sidossis^a, Adreas Melidonis^b

^aDepartment of Dietetics and Nutrition, Laboratory of Nutrition and Clinical Dietetics, Harokopio University, 17671 Athens, Greece

^bDiabetes Center, Tzanio General Hospital of Piraeus, 18536 Piraeus, Greece

Received 10 March 2009; accepted 20 May 2009

Abstract

It has been suggested that intramyocellular diglycerides may be associated with insulin resistance and thus may be linked to the pathophysiology of diabetes. We aimed to investigate intramyocellular diglyceride as well as triglyceride levels in diabetic subjects and to explore a possible association with glycemic control. The participants of the study were 30 obese subjects stratified according to the presence of diabetes into nondiabetic obese ($n = 19$) and diabetic obese ($n = 11$). Intramyocellular triglycerides and diglycerides were determined in biopsies from the vastus lateralis muscle under fasting conditions. Glycemic control and insulin resistance were assessed by an oral glucose tolerance test and the homeostatic model, respectively. Higher levels of intramyocellular triglycerides were observed in the diabetic obese group compared with the nondiabetic obese group (66.67 ± 23.75 vs 18.35 ± 4.42 nmol·mg⁻¹ dry tissue, respectively; $P < .05$). Diglyceride levels were not significantly different between the study groups (1.65 ± 0.27 vs 1.94 ± 0.65 nmol·mg⁻¹ dry tissue, respectively). Monounsaturated fatty acids represented the major constituent of intramyocellular triglycerides in both groups, whereas diglycerides contained mainly saturated fatty acids. A significant correlation was found between intramyocellular levels of triglycerides, but not diglycerides, and glycemic control, expressed as the area under the glucose curve ($r = 0.417$, $P < .05$). No correlations were found between intramyocellular levels of both lipid classes and insulin resistance. Our data support a relationship between glycemic control and intramyocellular triglycerides, but not diglycerides. The total flux of fatty acids toward esterification may be a much more important factor in the pathophysiology of diabetes.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The etiology of insulin resistance and diabetes mellitus has been a subject of extensive research since the early 1960s. In 1963, Randle et al [1] were the first to link insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes with alterations in glucose and lipid kinetics at the cellular level of muscle. In vivo studies performed in the late 1990s demonstrated that insulin resistance is associated with an increased rate of intramyocellular lipid storage [2] and that insulin sensitivity is negatively correlated with intramyocellular lipid content [3].

Since then, many studies have investigated the association of intramyocellular lipid stores (ie, triglycerides) with insulin resistance, showing either a positive correlation [4] or no correlation at all [5]. In fact, no direct link has been established between insulin sensitivity and intramyocellular triglycerides. The available studies on the intramyocellular triglyceride accumulation under different insulin-resistance states (ie, obesity and diabetes) have produced controversial results. Van Loon et al [6] have found no difference in intramyocellular triglycerides between diabetic subjects and body mass index (BMI)-matched controls. On the contrary, Goodpaster et al [7] have reported almost 2-fold higher levels of intramyocellular triglycerides in diabetic obese subjects compared with nondiabetic obese subjects. There are some data indicating that intramyocellular lipids may be differentially regulated in diabetes and obesity. For example, diet-induced weight loss has resulted in a significant

The study was approved by the Harokopio University Review Board.

* Corresponding author. Tel.: +30 210 954 173; fax: +30 210 954 9141.

E-mail address: skav@hua.gr (S.A. Kavouras).

decrease in intramyocellular triglycerides in diabetic obese subjects, but not in obese normoglycemic subjects [8]. Consequently, the role of intramyocellular triglycerides in the pathophysiology of diabetes remains unclear.

On the other hand, many studies at the molecular level have shown that some intermediate molecules (diglycerides) or some derivatives (ceramides) of lipid metabolism may be directly linked to insulin resistance by inhibiting essential steps of insulin signaling. In particular, diglycerides have been found to activate some isoforms of protein kinase C (new and conventional forms), which block insulin receptor substrate I and phosphatidylinositol-3-kinase, whereas atypical forms of the enzyme have been associated with the activation of the insulin-stimulated glucose transport pathway [9]. Ceramides inhibit protein kinase B/Akt, a more downstream step of insulin signaling [10]. Regarding the relationship of intramyocellular ceramides with insulin resistance in humans, available studies have not provided consistent results, showing either increased levels in insulin-resistance states [11,12] or no differences compared with healthy controls, or states of increased insulin sensitivity, such as in endurance-trained athletes [13].

The available research in intramyocellular diglycerides in relation to insulin resistance is scarce. Intramyocellular diglycerides in obese rats have been found to be 40% to 136% higher, depending on the oxidative capacity of the muscle examined, compared with those in lean controls, while denervation also increased intramyocellular diglyceride accumulation [14]. In healthy nonobese humans, it has been shown that insulin resistance caused by lipid infusion during euglycemic-hyperinsulinemic clamping causes accumulation of diglycerides in the skeletal muscle [15]. However, to our best knowledge, no studies in humans have investigated intramyocellular diglyceride levels in various levels of insulin resistance, especially diabetes mellitus.

In vitro studies in myocytes have provided evidence that the channeling of fatty acid substrates into triglyceride or diglyceride pools may be a more essential factor in the development of insulin resistance. Liu et al [16] have shown that overexpression of diacylglycerol acyltransferase (the enzyme that catalyzes the conversion of diglycerides to triglycerides) protects from fat-induced insulin resistance, with a parallel increase in the triglyceride pool and a decrease in the diglyceride pool. However, not all fatty acids are incorporated with the same efficiency into triglyceride pool. Saturated fatty acids, for example, are purely incorporated into intracellular triglycerides, causing an increase in diglyceride levels, whereas the opposite effect has been observed for monounsaturated fatty acids [17]. Thus, the quality of fatty acids contained in both lipid pools may be linked to insulin resistance.

The aim of the present study was to compare intramyocellular diglyceride and triglyceride levels in human obesity and diabetes mellitus. We hypothesized that diabetic subjects would illustrate more profound levels of intramyocellular lipids that would account for differences in glycemic control

and insulin sensitivity. Comparisons and potential associations were tested not only for the total amounts of both lipid classes, but also for the quality of fatty acids contained on them.

2. Methods

2.1. Subjects

A total of 30 subjects participated in the study. Participants were stratified according to the presence of type 2 diabetes mellitus and obesity status into nondiabetic obese (nDiab-Ob, $n = 19$) and diabetic obese (Diab-Ob, $n = 11$) subjects. The physiologic characteristics of the study participants are presented in Table 1. All diabetic subjects were treated with oral hypoglycemic medications. Eligibility criteria included the presence of obesity and weight stability for a minimum of 1 year (no more or less than 3 kg, based on self-reports), the absence of any disease and use of medication in the nDiab-Ob group, and the absence of medically diagnosed macro- or microvascular disease in the Diab-Ob group. From the diabetic subjects, 9 were on metformin therapy, 5 subjects were taking sulfonylureas, 2 subjects were taking a combination of both, 2 subjects were prescribed rosiglitazone, and 1 subject was on a combination of metformin and rosiglitazone. Three subjects in the Diab-Ob group were also taking hypertensive medication. Insulin therapy was an exclusion criterion for the diabetic group. *Diabetes* was defined according to the criteria of World Health Organization [18]. *Obesity* was defined as BMI greater than $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ [19]. Subjects were given detailed information about the study procedures and potential hazards, and a written consent was obtained. The study was conducted according to the standards set by the latest version of the Declaration of Helsinki and was approved by the University Review Board.

2.2. Testings

Subjects were asked to visit the laboratory on 2 separate occasions after an overnight fast (at least 10 hours), separated by 3 to 5 days. On day 1, a medical history and basic demographic characteristics were obtained; and a medical examination was performed, including measurements of blood pressure and pulse rate and auscultation of the heart and lungs. Body composition was also assessed by dual-

Table 1
Physiologic characteristics of the study participants

	nDiab-Ob	Diab-Ob
Sex, male/female	9/10	2/9
Weight, kg	111.6 ± 4.5	114.0 ± 7.9
Age, y	40 ± 3	47 ± 3
BMI, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$	39.7 ± 1.5	40.7 ± 1.8
Lean body mass, kg	57.0 ± 2.7	52.4 ± 3.9
Body fat, %	42.3 ± 2.5	45.8 ± 1.5

Values are means $\pm$ SE.

energy-x-ray absorptiometry (model DPX-MD; Lunar, Madison, WI). Afterward, a venous catheter was placed into a forearm vein; and a 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. On day 2, a muscle biopsy was obtained (~80 mg) from the middle portion of the vastus lateralis muscle by percutaneous needle biopsy with suction [20], under local anaesthesia (0.1% lidocaine on the skin and fascia). Nonmuscle tissue (blood or visible fat) was discarded, and specimens were frozen immediately in liquid nitrogen until analysis. Subjects were instructed to abstain from any vigorous physical activity and alcohol consumption the 2 days before each testing day and to consume an unrestricted, high-carbohydrate diet. Diabetic medication was not discontinued the previous days of the experimental procedure in the diabetic subjects; however, subjects were asked to refrain from any medication until the completion of all examinations on the days of the testings.

2.3. Blood analysis and insulin sensitivity assessment

Aliquots of plasma from fasting samples were used for the measurement of glucose, triglycerides, free fatty acids, as well as total, high-density lipoprotein, and low-density lipoprotein cholesterol. Glucose was also measured in samples taken during the OGTT (30, 60, 90, and 120 minutes). Aliquots of serum from fasting samples were used for the measurement of baseline insulin levels. Biochemical analyses were performed in duplicate in an automated analyzer using standard reagents (ACE Schiapparelli Biosystems, Fairfield, NJ). Insulin was measured in triplicate by an enzyme-linked immunoassay (Insulin; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The area under the glucose curve during the OGTT was calculated by the trapezoidal rule and was used as an index of glycemic control. Insulin resistance was assessed by the homeostasis model assessment (HOMA) [21].

2.4. Muscle biopsies analysis

To reduce the possibility of contamination of muscle tissue with other tissues, samples were freeze-dried (–50°C for 24 hours) and visualized in a stereoscope; and nonmuscle material (connective or fat tissue) was discarded. Net dry muscle tissue was weighted, and total lipids were extracted according to the method of Folch et al [22] for 12 hours at room temperature under shaking. Butylated hydroxytoluene was added as an antioxidant. The chloroform phase containing total lipids was dried in a Speed Vac Model AES 1010, SpeedVac Systems, Thermosavant, Holbrook, NY at room temperature, and lipids were redissolved in a small volume of chloroform. Lipid classes were separated with solid phase extraction by the use of aminopropyl-bounded silica gel cartridges [23]. Eluates containing triglycerides and diglycerides were dried, and fatty acids of each lipid class were transmethyated in an appropriate mixture of boron trifluoride in methanol at boiling temperature [24]. Methyl esters were extracted in pentane, dried, redissolved in a small volume of hexane, and quantified by gas-liquid chromatography

equipped with a flame ionization detector. A 60-m capillary column was used (DB-23; Agilent Technologies, Wilmington, DE), calibrated against a standard containing 37 fatty acids methyl esters, ranging in chain length from 4 to 24 carbon atoms (Supelco 37 Component Fame Mix; Supelco, Bellefonte, PA). Total triglycerides and diglycerides were calculated by dividing the sum of the molar concentrations of methyl esters by 3 and 2, respectively. Fatty acids contained in each lipid class were further categorized on the basis of the degree of saturation (saturated, monounsaturated, and polyunsaturated) and the omega carbon atom in polyunsaturated fatty acids (n-3 and n-6).

2.5. Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ 1 standard error of the mean. Comparisons between groups were performed by Student unpaired *t* tests for normally distributed variables and by the nonparametric Mann-Whitney test for skewed variables. Comparisons within groups were performed by analysis of variance for repeated measures (for normally distributed data) and the Wilcoxon or the Friedman test (for nonnormally distributed data). The Shapiro-Wilk test was applied to assess normality. Potential associations between the continuous variables were tested with single regression analysis. Interactions between categorical variables were evaluated with the Pearson χ^2 test. Significance was set at $P < .05$.

3. Results

Baseline glucose, insulin, and lipid profiles of the study participants are presented in Table 2. The 2 groups did not differ in regard to plasma triglycerides, free fatty acids, and cholesterol levels. The Diab-Ob subjects had higher levels of baseline glucose and insulin levels, although the difference in insulin levels was not statistically significant. Plasma glucose levels at 120 minutes during the OGTT (Fig. 1) as well as the total area under the curve in the Diab-Ob group were approximately 2 times the values of the nDiab-Ob group ($P < .005$). The 2 obese groups had also significantly different values of the HOMA index ($P < .005$).

Table 2
Fasting blood glucose, insulin, and lipid profile of the study participants

	nDiab-Ob	Diab-Ob
Glucose, mmol·L ⁻¹	5.81 $\pm$ 0.14	7.56 $\pm$ 0.40*
Insulin, μ U·L ⁻¹	13.21 $\pm$ 1.35	18.67 $\pm$ 2.59
Triglycerides, mmol·L ⁻¹	1.37 $\pm$ 0.15	1.61 $\pm$ 0.21
Free fatty acids, mmol·L ⁻¹	0.72 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.11
Total cholesterol, μ mol·L ⁻¹	5.49 $\pm$ 0.21	5.41 $\pm$ 0.33
HDL cholesterol, μ mol·L ⁻¹	1.03 $\pm$ 0.05	1.08 $\pm$ 0.08
LDL cholesterol, μ mol·L ⁻¹	3.83 $\pm$ 0.16	3.60 $\pm$ 0.28

Values are means $\pm$ SE. HDL indicates high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

* Statistically significant difference; $P < .05$.

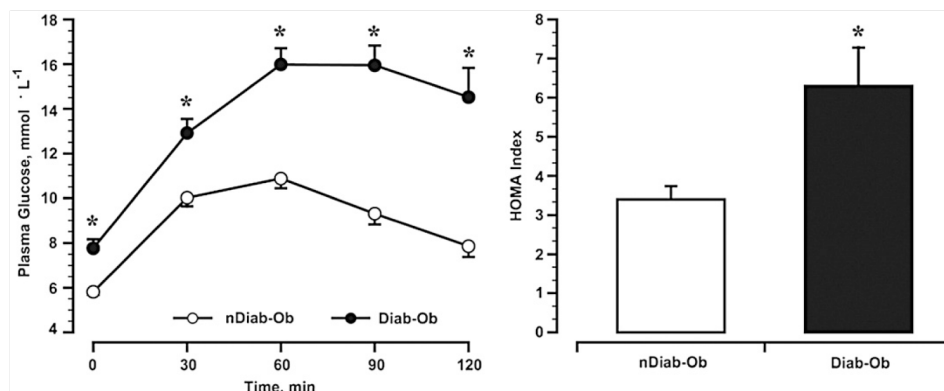


Fig. 1. Plasma glucose during the OGTT and HOMA index in the 2 study groups: nDiab-Ob ($n = 19$) and Diab-Ob ($n = 11$). Values are means $\pm$ SE. *Statistically significant difference for Diab-Ob compared with nDiab-Ob; $P < .05$.

Fig. 2 presents total intramyocellular triglycerides in the 2 study groups as well as their fatty acid content according to the degree of saturation and the omega carbon atom in the unsaturated fatty acids. The Diab-Ob subjects had significantly higher total triglycerides compared with the nDiab-Ob group ($P < .05$). Similar patterns with total triglycerides were observed for the categories of fatty acids examined. The most abundant fatty acids within the categories examined were the monounsaturated (overall effect for the degree of saturation, $P < .001$) and the n-6 fatty acids ($P < .001$ vs n-3 fatty acids). Little abundance was observed for n-3 fatty acids.

Intramyocellular diglycerides levels and their fatty acid content are depicted in Fig. 3. No significant differences between the study groups were observed for total diglycerides or the categories of their fatty acid content. The most abundant fatty acids in the diglyceride fraction were the saturated fatty acids (overall effect for the degree of saturation, $P < .001$).

Regression analysis between intramyocellular lipids and the area under the glucose curve during the OGTT, as an index of glycemic control, revealed a significant correlation between total triglycerides ($F = 5.461$, $b = 2.498$, $r = 0.417$, $P = .027$). Insulin resistance assessed by the HOMA index was not significantly correlated with triglycerides or their fatty acid content. Similarly, no significant associations were observed between intramyocellular diglycerides and insulin resistance or glycemic control.

To investigate a possible impact of gender on our comparisons, we examined the association between study groups and sex (male/female). The P value for Pearson χ^2 correlation coefficient for the interaction between sex and study group was equal to 0.101, indicating no significant interaction.

4. Discussion

In the present study, we examined the effect of type 2 diabetes mellitus on intramyocellular accumulation of 2

major classes of lipid metabolism—triglycerides and diglycerides—that have been linked to insulin resistance. Our novel finding is that intramyocellular diglycerides did not differ in diabetic subjects compared with obese nondiabetic controls. On the other hand, the presence of diabetes was associated with increased intramyocellular triglyceride accumulation.

Diglycerides are intermediate products of triglyceride biosynthesis and/or degradation that may alter insulin signaling through activation of protein kinase C [9]. Our results do not support a major role of fasting intramyocellular diglyceride levels on diabetes pathophysiology because no difference was observed between the 2 study groups. Furthermore, no correlation was found between diglycerides and insulin sensitivity or glycemic control indices. To our best knowledge, we are not aware of any studies in humans exploring directly this relationship in insulin-resistance states. In rodents, lipid infusion has been found to activate protein kinase- θ and - δ , 2 diglyceride-sensitive isoforms [25,26]. In humans, lipid infusion during hyperinsulinemia-euglycemia increased total activity of the enzyme in both cytosolic and plasma membrane fractions, in parallel with an increase in intramyocellular diglycerides, compared with lipid infusion alone [15]. However, these observations do not establish a cause and effect relationship between intramyocellular diglyceride levels and protein kinase C activation. In addition, in vitro studies in L6 myotubes have shown that the ζ isoform of the enzyme is involved in insulin stimulated glucose uptake, whereas blocking the diglyceride-sensitive isoforms had no effect, providing evidence that muscle protein kinase C activity and diglyceride levels may be dissociated [17].

In the present study, intramyocellular triglycerides levels were higher in obese diabetic subjects compared with nondiabetic obese subjects. An increase in intramyocellular triglyceride in obese compared with lean subjects is well documented [27,28]. However, studies comparing diabetic obese subjects with obese nondiabetic subjects have produced mixed results, showing increased levels in the

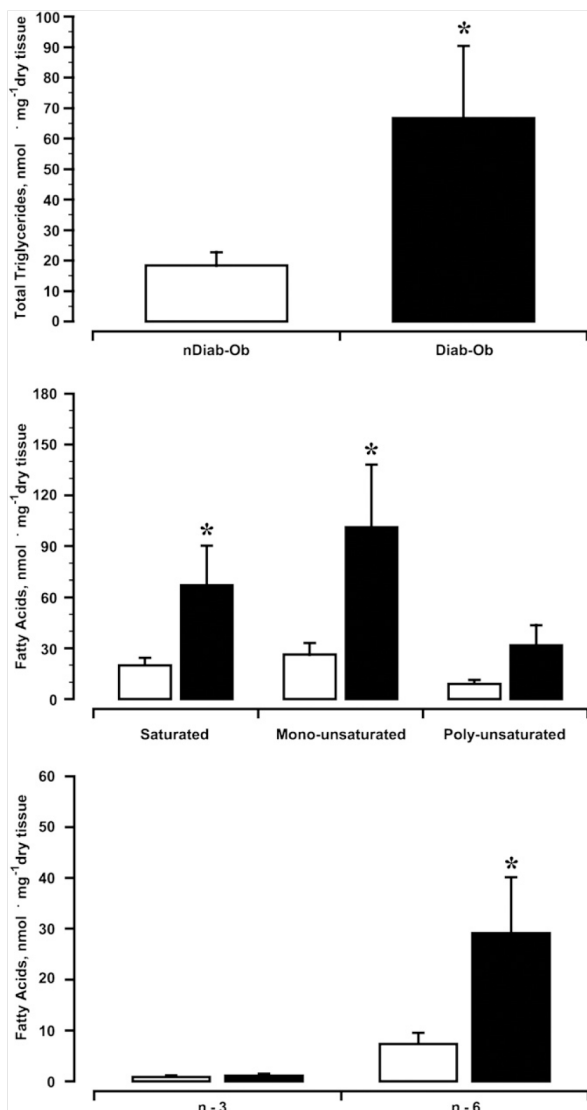


Fig. 2. Intramyocellular total triglycerides and their fatty acid content in the 2 study groups: nDiab-Ob ($n = 19$) and Diab-Ob ($n = 11$). Values are means $\pm$ SE. Scaling in the y-axis may be different in each graph. *Statistically significant difference for Diab-Ob compared with nDiab-Ob; $P < .05$.

diabetic population [7], no difference [27,28], or an intermediate value for obese subjects between diabetic obese and nondiabetic lean counterparts [8]. Our results suggest that diabetes mellitus combined with obesity results in a higher accumulation of intramyocellular triglycerides compared with obesity alone.

Although a direct relationship between intramyocellular lipid storage composition and nutritional intake has not been firmly established in humans, we observed a higher accumulation of monounsaturated fatty acids in the triglyceride fraction, reflecting possibly the high consumption of olive oil in our Greek subjects. However, monounsaturated

fatty acids were not the primary component of diglycerides. Instead, saturated fatty acids were the major component of diglycerides. In vitro studies in human muscle cells have shown that incubation of cells with oleic acid (monounsaturated fatty acid) or linoleic acid (polyunsaturated fatty acid) results in an almost full incorporation of these fatty acids into the intracellular triglyceride pool, whereas incubation with palmitic or stearic acid (saturated fatty acids) resulted in the accumulation of these fatty acids into diglycerides [29]. In the same study, insulin-stimulated glucose uptake was impaired in cells incubated with saturated fatty acids, while being unaltered in cells incubated with oleic or linoleic acid. In rodents, high saturated fat–diet

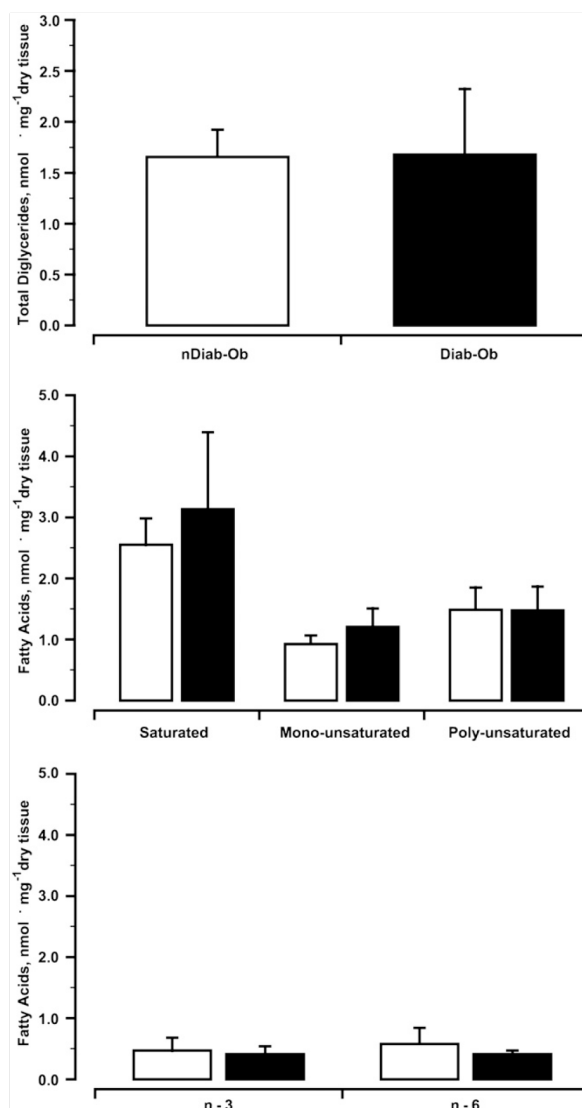


Fig. 3. Intramyocellular total diglycerides and their fatty acid content in the 2 study groups: nDiab-Ob ($n = 19$) and Diab-Ob ($n = 11$). Values are means $\pm$ SE. Scaling in the y-axis may be different in each graph.

increased mainly the intramyocellular diglycerides pool, whereas high polyunsaturated fat directed the excess fatty acids in triglyceride storage [30]. The results of the above-mentioned studies suggest an inability of saturated fatty acids to incorporate into the intramyocellular triglyceride pool, causing an increase of saturated fatty acids in the diglycerides, as observed in the present study. On the contrary, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids are easily incorporated into triglycerides. In this regard, it could be speculated that the Mediterranean diet of our study participants may have protected them from a substantial expansion of diglyceride levels; and thus, a main effect of these lipids on insulin sensitivity and glycemic control could not be detected. However, because dietary intake was not controlled, such a conclusion cannot be drawn.

Our study has many strengths. It is the first study reporting intramyocellular diglyceride levels in diabetes and obesity, 2 insulin-resistance states that may not necessarily be regulated by common mechanisms. Second, the parallel measurement of intramyocellular triglycerides and the fatty acid composition of both lipid classes allowed interesting observations to be made. Overall, it should be noted that this is a cross-sectional study that cannot provide definite conclusions, but only state hypothesis for future research.

In conclusion, in the present study, we did not find differences in intramyocellular diglyceride accumulation between 2 different states of insulin resistance: diabetic obese and nondiabetic obese subjects. On the contrary, the presence of diabetes exacerbated intramyocellular triglyceride accumulation. According to our results, intramyocellular diglyceride pool is unlikely to play a significant role in the pathophysiology of diabetes, at least under baseline conditions. It is probably the overall flux of the fatty acids of the peripheral circulation toward esterification and storage in muscle that may account for glycemic control and insulin resistance and not intermediary molecules of this process, such as diglycerides.

Acknowledgment

The study was supported by the University Graduate Research Program.

References

- [1] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-9.
- [2] Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 1999;277:E1130-41.
- [3] Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997;46:983-8.
- [4] Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 1999;48:1600-6.
- [5] Thamer C, Machann J, Bachmann O, et al. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1785-91.
- [6] van Loon LJ, Koopman R, Manders R, et al. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E558-65.
- [7] Goodpaster BH, He J, Watkins S, et al. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5755-61.
- [8] Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, et al. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 2000;49:467-72.
- [9] Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995;9:484-96.
- [10] Gorski J, Dobrzyn A, Zendzian-Piotrowska M. The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:236-48.
- [11] Straczkowski M, Kowalska I, Baranowski M, et al. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:2366-73.
- [12] Adams II JM, Pratipanawatr T, Berria R, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004;53:25-31.
- [13] Skovbro M, Baranowski M, Skov-Jensen C, et al. Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity. *Diabetologia* 2008;51:1253-60.
- [14] Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 1990;265:16880-5.
- [15] Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 2002;51:2005-11.
- [16] Liu L, Zhang Y, Chen N, et al. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:1679-89.
- [17] Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, et al. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- ζ and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 1997;138:4721-31.
- [18] Reinauer H, Home PD, Kanagasabapathy AS, et al. Laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2002.
- [19] WHO. Obesity: preventing the global epidemic. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1997.
- [20] Evans WJ, Phinney SD, Young VR. Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. *Med Sci Sports Exerc* 1982;14:101-2.
- [21] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
- [22] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
- [23] Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, et al. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res* 1985;26:135-40.
- [24] Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964;5:600-6008.
- [25] Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;48:1270-4.

- [26] Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277:50230-6.
- [27] Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, et al. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis: thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 2006; 55:2277-85.
- [28] He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 2001;50:817-23.
- [29] Montell E, Turini M, Marotta M, et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E229-37.
- [30] Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, et al. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* 2006;100:1467-74.

SHORT COMMUNICATION

Moderate weight loss depletes intramyocellular triglycerides but has no effect on diglycerides in type II diabetes

CA Anastasiou¹, SA Kavouras¹, Y Lentzas², A Gova², LS Sidossis¹ and A Melidonis²

¹Laboratory of Nutrition and Clinical Dietetics, Department of Dietetics and Nutrition, Harokopio University, Athens, Greece and

²Diabetes Center, Tzanio General Hospital of Piraeus, Tzani and Afedouli 1, Piraeus, Greece

Intramyocellular diglycerides have been implicated in the development of insulin resistance. We aimed to evaluate the effect of weight loss, a well-known means for the improvement of insulin resistance, on intramyocellular diglycerides and triglycerides in type II diabetes. Participants were five obese women with type II diabetes (body mass index $37.5 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$), who participated in a weight loss program. The aim of the program was a reduction in body weight by 10%. Muscle biopsies were obtained before and after weight loss. The intervention induced a marked reduction in intramyocellular triglycerides by $77.7 \pm 13.1\%$, whereas no significant differences were observed for diglycerides before and after weight loss. Our results indicate that weight loss due to negative energy balance depletes intramyocellular lipid storage without affecting intermediate molecules of lipid metabolism, such as intramyocellular diglycerides.

European Journal of Clinical Nutrition (2010) **64**, 328–330; doi:10.1038/ejcn.2009.157; published online 20 January 2010

Keywords: diglycerides; insulin resistance; intramyocellular lipids; obesity; skeletal muscle; triglycerides

Introduction

Weight loss has been established as a fundamental approach in the prevention and treatment of diabetes mellitus; however, the underlying mechanisms of increased insulin sensitivity and improved glycemic control after weight loss remain unclear. As intramyocellular lipid content has been directly linked to insulin resistance in diabetes-prone individuals (Perseghin *et al.*, 1999), a potential candidate of enhanced insulin action after weight loss could be a reduction in the lipid content of skeletal muscle. Nevertheless, studies examining the effect of moderate weight loss on intramyocellular lipids in subjects with type II diabetes have produced controversial results, showing either a reduction (Goodpaster *et al.*, 2000) or no change at all (Tamura *et al.*, 2005). Advanced molecular studies have implicated intramyocellular lipid partitioning, rather than

total lipids, in the pathophysiology of diabetes. In particular, it has been proposed that some intermediate molecules of lipid metabolism (that is, diglycerides), and not total lipid storage, may be implicated in insulin resistance through their impact on insulin signaling (Nishizuka, 1995).

The aim of the present study was to explore changes in intramyocellular lipid pools (triglycerides and diglycerides) in response to moderate weight loss in type II diabetes mellitus.

Subjects and methods

Five post-menopausal, sedentary female obese subjects with type II diabetes (age: 51.6 ± 3.0 years, body mass index $37.5 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$) participated in the study. Subjects were prescribed a hypocaloric diet (deficit of 500–700 kcal per day of estimated energy needs for weight maintenance, 50–55% of total energy as carbohydrates, 15–20% as dietary protein and 30% as fat) and were followed up on weekly sessions until the end of the intervention. The goal of the program was a weight reduction of 10% of initial body weight, irrespective of the time needed from each participant to achieve this goal. Energy needs were calculated as the basal metabolic rate multiplied by a suitable physical activity level

Correspondence: Dr SA Kavouras, Laboratory of Nutrition & Clinical Dietetics, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, 70, El. Venizelou Avenue, Athens 176 71, Greece.
E-mail: skav@hua.gr

Received 28 June 2009; revised 24 October 2009; accepted 9 December 2009; published online 20 January 2010

(Shetty *et al.*, 1996). Basal metabolic rate was measured by open circuit indirect calorimetry. The study was conducted according to the standards set by the latest version of the Declaration of Helsinki and was approved by the University Review Board. A written informed consent was obtained from each participant. Diabetic medication (sulfonylureas or metformin) was not altered and remained unchanged throughout the intervention.

A standard oral glucose tolerance test was performed and a needle muscle biopsy from the vastus lateralis muscle was obtained before and after weight loss. Post intervention measurements were performed at the time the weight loss goal was achieved for each participant, when they were still on the prescribed diet. The total area under the glucose curve and the homeostatic model (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) (Matthews *et al.*, 1985) were used for the assessment of glycemic control and insulin resistance, respectively. Baseline blood lipid profile before and after weight loss was also assessed. Intramyocellular lipids were measured as recently described (Anastasiou *et al.*, 2009). In brief, triglycerides and diglycerides were separated by solid-phase extraction, their fatty acids were *trans*-methylated and fatty acid methyl esters were quantified by gas-liquid chromatography. Fatty acids contained in each lipid class were categorized on the basis of the degree of saturation. Total triglycerides and diglycerides were calculated by dividing the sum of the molar concentrations of methyl esters by three and two, respectively. To avoid contamination from fat tissue, muscle specimens were freeze-dried and connective or fat tissue was removed after careful examination under magnification on a stereoscope. Blood biochemical analyses were performed in duplicate in an automated analyzer using standard reagents (ACE Schiapparelli Biosystems, Fairfield, NJ, USA). Insulin was measured in triplicate by an enzyme-linked immunoassay (Insulin; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The total area under the glucose curve was calculated by the trapezoid rule and HOMA-IR by the equation:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = [\text{Insulin}] / \left\{ 22.5 \times e - \ln^{[\text{Glucose}]} \right\}$$

where [Insulin] and [Glucose] are fasting values of insulin and glucose in mU/l and mmol/l, respectively.

Data are presented as means $\pm$ 1 standard error of the mean. Comparisons before and after weight loss were performed by the two-tailed Wilcoxon non-parametric test.

Results and discussion

The intervention resulted in a $-9.5 \pm 0.6\%$ weight loss (101.8 ± 5.8 vs 92.0 ± 4.9 kg before and after weight loss, respectively, $P < 0.05$) and had a duration range from 17 to 32 weeks. A significant improvement in glucose control indices was observed after weight loss, accompanied by

Table 1 Blood biochemistry parameters of the study participants, before and after weight loss

	Before weight loss	After weight loss
Fasting glucose (mmol/l)	8.12 ± 0.77	6.82 ± 0.60^a
Glucose at 120 min (mmol/l)	14.19 ± 2.85	9.63 ± 2.44^a
Glucose total AUC (mmol · min/l)	$1,822 \pm 144$	$1,318 \pm 129^a$
Fasting insulin (pmol/l)	108.1 ± 20.8	70.6 ± 16.9
HOMA-IR	10.1 ± 4.6	3.1 ± 0.9
Fasting triglycerides (mmol/l)	1.45 ± 0.16	1.23 ± 0.15
Fasting free fatty acids (mmol/l)	0.98 ± 0.19	0.77 ± 0.11
Fasting total cholesterol (μ mol/l)	5.75 ± 0.52	5.09 ± 0.46
Fasting HDL cholesterol (μ mol/l)	1.10 ± 0.06	1.00 ± 0.07^a
Fasting LDL cholesterol (μ mol/l)	3.98 ± 0.44	3.52 ± 0.40

Abbreviations: AUC, area under the curve during a standard oral glucose tolerance test; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

^aIndicates statistically significant difference compared with values before weight loss.

Values are means $\pm$ s.e.

a non-statistically significant, but noteworthy reduction in HOMA-IR ($P = 0.08$) (Table 1). The intervention had a small positive impact in blood lipid profile, except a significant decrease in high-density lipoprotein. Figure 1 presents intramyocellular lipids and their fatty acid residues before and after weight loss. A remarkable decrease by $77.7 \pm 13.1\%$ in intramyocellular triglyceride content was observed ($P < 0.05$). Similar decreases were observed in all triglyceride fatty acid residues (that is, saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids). Changes in intramyocellular diglycerides before and after weight loss did not show a uniform pattern with three negative and two positive ranks. Mean values before and after weight loss were 8.25 ± 1.71 vs 5.91 ± 0.76 nmol/mg dry tissue (change in range, -6.24 to 2.41) and changes were not significantly different ($P = 0.686$).

Our results reveal that moderate weight loss depletes intramyocellular lipid storage, without significantly affecting diglyceride levels in diabetes mellitus. The marked decrease in intramyocellular triglycerides may be attributed to the fact that subjects at the end of the protocol were still on a hypocaloric diet. To this perspective, it is not clear whether the observed reduction may be attributed to the weight loss *per se* or it was the effect of negative energy balance. However, even under these conditions, no such clear effect was observed for intramyocellular diglycerides. A reduction of the overall flux to lipid uptake and esterification at fasting that has been observed after weight loss (Kelley *et al.*, 1999), along with a modest reduction in the availability of substrates from the systemic circulation, may explain at least in part the depletion of intramyocellular lipid storage, without affecting intermediate molecules of lipid metabolism, such as diglycerides. In this perspective, the well-known effects of weight loss on insulin sensitivity and glucose homeostasis may not be mediated by changes in these intermediate molecules.

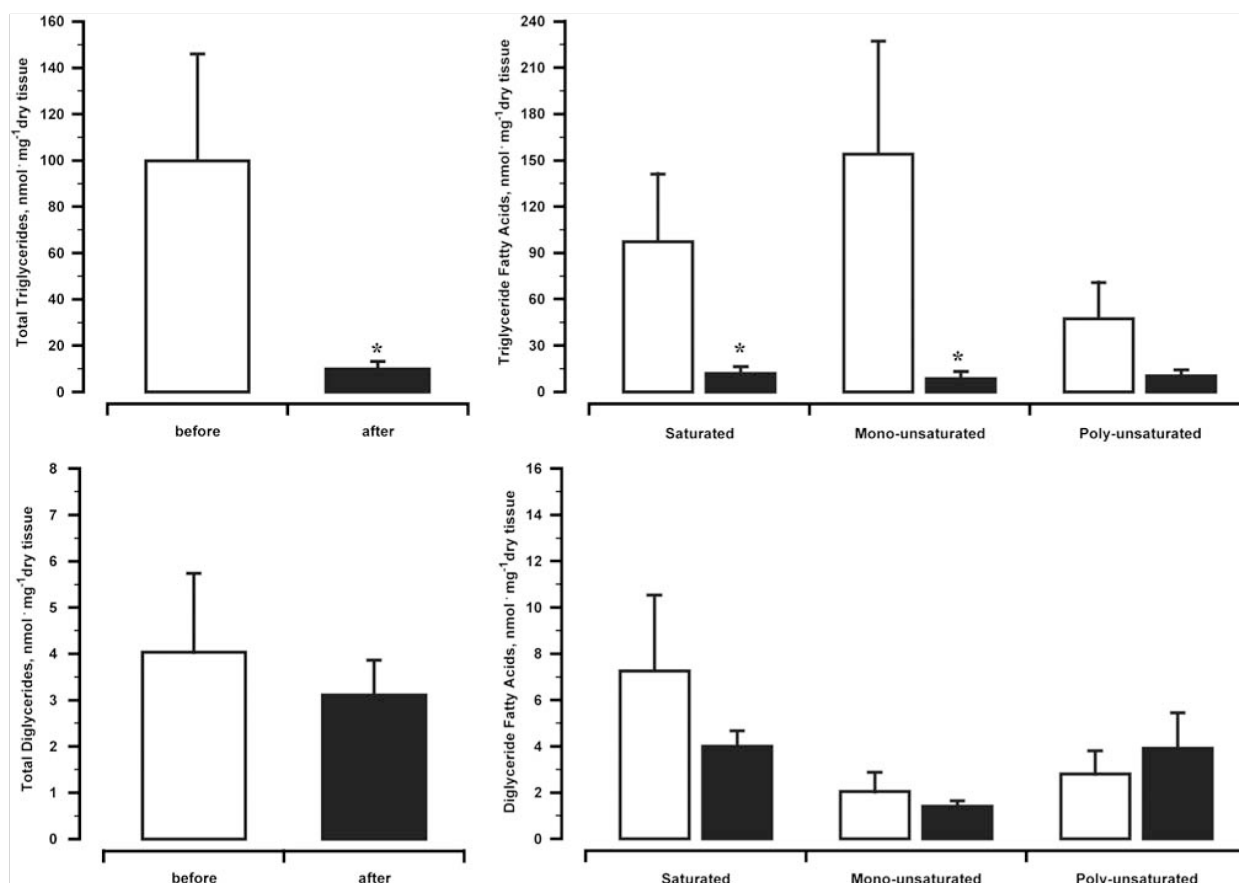


Figure 1 Intramyocellular triglycerides and diglycerides before and after weight loss. Values are means $\pm$ s.e. * Indicates statistically significant difference compared with values before weight loss.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by the University Graduate Research Program.

References

- Anastasiou CA, Kavouras SA, Lentzas Y, Gova A, Sidossis LS, Melidonis A (2009). Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans. *Metabolism* **58**, 1636–1642.
- Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE (2000). Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* **49**, 467–472.
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* **277**, E1130–E1141.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DE, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.
- Nishizuka Y (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**, 484–496.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C *et al.* (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of *in vivo* insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* **48**, 1600–1606.
- Shetty PS, Henry CJ, Black AE, Prentice AM (1996). Energy requirements of adults: an update on basal metabolic rates (BMRs) and physical activity levels (PALs). *Eur J Clin Nutr* **50** (Suppl 1), S11–S23.
- Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M *et al.* (2005). Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 3191–3196.

Βιβλιογραφία

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
2. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *Jama* 2010;303:235-41.
3. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *Jama* 2002;288:1723-7.
4. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 1993;329:1988-92.
5. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996;334:374-81.
6. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97:2601-10.
7. Eriksson KF, Lindgarde F. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia* 1991;34:891-8.
8. Pan XR, Li GW, Hu YH, et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997;20:537-44.
9. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343-50.
10. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393-403.
11. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 1999;277:E1130-41.
12. Bjornholm M, Zierath JR. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans* 2005;33:354-7.
13. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;40 Suppl 2:S2-17.

14. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
15. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 1990;113:909-15.
16. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992;15:318-68.
17. Bogardus C, Lillioja S, Mott DM, Hollenbeck C, Reaven G. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. *Am J Physiol* 1985;248:E286-91.
18. Campbell PJ, Carlson MG. Impact of obesity on insulin action in NIDDM. *Diabetes* 1993;42:405-10.
19. Bonora E. Relationship between regional fat distribution and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24 Suppl 2:S32-5.
20. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 1995;27:435-8.
21. Gerstein HC, Yusuf S. Dysglycaemia and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 1996;347:949-50.
22. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj* 2000;321:405-12.
23. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 2002;51:159-67.
24. Scott CL. Diagnosis, prevention, and intervention for the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2003;92:35i-42i.
25. McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:713-8.
26. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002;51:1938-48.
27. Baron AD, Brechtel G, Wallace P, Edelman SV. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol* 1988;255:E769-74.

28. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-9.
29. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 1999;341:240-6.
30. Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, et al. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E146-54.
31. Blaak EE, van Aggel-Leijssen DP, Wagenmakers AJ, Saris WH, van Baak MA. Impaired oxidation of plasma-derived fatty acids in type 2 diabetic subjects during moderate-intensity exercise. *Diabetes* 2000;49:2102-7.
32. Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994;94:2349-56.
33. Sidossis LS, Wolfe RR. Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed. *Am J Physiol* 1996;270:E733-8.
34. Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J Clin Invest* 1996;98:2244-50.
35. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *Faseb J* 1999;13:2051-60.
36. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 2001;50:817-23.
37. Simoneau JA, Colberg SR, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *Faseb J* 1995;9:273-8.
38. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8466-71.
39. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003;34:267-73.

40. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, et al. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:2220-6.
41. Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, Laville M, Langin D. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1327-32.
42. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003;546:851-8.
43. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999;98:115-24.
44. Morino K, Petersen KF, Dufour S, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 2005;115:3587-93.
45. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:664-71.
46. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2944-50.
47. Maassen JA, Janssen GM, t Hart LM. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). *Ann Med* 2005;37:213-21.
48. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998;12:3168-81.
49. Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 2000;275:8456-60.
50. Petersen KF, Oral EA, Dufour S, et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 2002;109:1345-50.
51. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000;43:1498-506.
52. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
53. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 1998;101:1354-61.

54. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2784-91.
55. Mori Y, Murakawa Y, Okada K, et al. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999;22:908-12.
56. Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:288-93.
57. Rasouli N, Raue U, Miles LM, et al. Pioglitazone improves insulin sensitivity through reduction in muscle lipid and redistribution of lipid into adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E930-4.
58. Dyck DJ, Heigenhauser GJ, Bruce CR. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;186:5-16.
59. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269:540-3.
60. Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:653-66.
61. Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 1997;46:1360-3.
62. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E187-92.
63. Steinberg GR, Rush JW, Dyck DJ. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E648-54.
64. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 1977;60:265-70.
65. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995;1:950-3.
66. Mantzoros CS, Flier JS. Editorial: leptin as a therapeutic agent--trials and tribulations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4000-2.
67. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002;360:57-8.
68. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-8.

69. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E527-33.
70. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002;51:2968-74.
71. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16309-13.
72. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
73. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
74. Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 2004;114:224-31.
75. Pravenec M, Kazdova L, Landa V, et al. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 2003;278:45209-15.
76. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1844-8.
77. Nelson D, Cox M. Lipid biosynthesis. In: Nelson D, Cox M, eds. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: WH Freeman and Company, 2005:787-832.
78. Langfort J, Donsmark M, Ploug T, Holm C, Galbo H. Hormone-sensitive lipase in skeletal muscle: regulatory mechanisms. *Acta Physiol Scand* 2003;178:397-403.
79. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997;46:983-8.
80. Boesch C, Slotboom J, Hoppeler H, Kreis R. In vivo determination of intra-myocellular lipids in human muscle by means of localized ¹H-MR-spectroscopy. *Magn Reson Med* 1997;37:484-93.
81. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 1999;48:1600-6.

82. Sinha R, Dufour S, Petersen KF, et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes* 2002;51:1022-7.
83. Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, et al. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol* 1995;268:E453-7.
84. Marin P, Andersson B, Krotkiewski M, Bjorntorp P. Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* 1994;17:382-6.
85. Nyholm B, Qu Z, Kaal A, et al. Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes* 1997;46:1822-8.
86. Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard Wahlstrom E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996;39:1180-9.
87. Manco M, Mingrone G, Greco AV, et al. Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism* 2000;49:220-4.
88. Thamer C, Machann J, Bachmann O, et al. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1785-91.
89. Misra A, Sinha S, Kumar M, Jagannathan NR, Pandey RM. Proton magnetic resonance spectroscopy study of soleus muscle in non-obese healthy and Type 2 diabetic Asian Northern Indian males: high intramyocellular lipid content correlates with excess body fat and abdominal obesity. *Diabet Med* 2003;20:361-7.
90. Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P, Hesselink MK, et al. The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1610-6.
91. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5755-61.
92. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 1990;265:16880-5.
93. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* 1995;9:484-96.

94. Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002;277:50230-6.
95. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 2002;51:2005-11.
96. Itani SI, Zhou Q, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 2000;49:1353-8.
97. Coen PM, Dube JJ, Amati F, et al. Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes*;59:80-8.
98. Moro C, Galgani JE, Luu L, et al. Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3440-7.
99. Montell E, Turini M, Marotta M, et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E229-37.
100. Lu X, Yang XY, Howard RL, Walsh JP. Fatty acids modulate protein kinase C activation in porcine vascular smooth muscle cells independently of their effect on de novo diacylglycerol synthesis. *Diabetologia* 2000;43:1136-44.
101. Yu HY, Inoguchi T, Kakimoto M, et al. Saturated non-esterified fatty acids stimulate de novo diacylglycerol synthesis and protein kinase c activity in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetologia* 2001;44:614-20.
102. Coleman R, Bell RM. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J Biol Chem* 1976;251:4537-43.
103. Gorski J, Dobrzyn A, Zendzian-Piotrowska M. The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:236-48.
104. Adams JM, 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 2004;53:25-31.
105. Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, et al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* 2004;53:1215-21.

106. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 1998;18:5457-64.
107. Wang CN, O'Brien L, Brindley DN. Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998;47:24-31.
108. Hajdуч E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001;492:199-203.
109. Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003;278:10297-303.
110. Brozinick JT, Jr., Roberts BR, Dohm GL. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes* 2003;52:935-41.
111. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 1998;47:1281-6.
112. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1999;104:733-41.
113. Kruszynska YT, Worrall DS, Ofrecio J, Frias JP, Macaraeg G, Olefsky JM. Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:226-34.
114. Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 1997;323 (Pt 1):1-12.
115. Tippet PS, Neet KE. Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *J Biol Chem* 1982;257:12839-45.
116. Moore KH, Dandurand DM, Kiechle FL. Fasting induced alterations in mitochondrial palmitoyl-CoA metabolism may inhibit adipocyte pyruvate dehydrogenase activity. *Int J Biochem* 1992;24:809-14.
117. Wititsuwannakul D, Kim KH. Mechanism of palmityl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. *J Biol Chem* 1977;252:7812-7.
118. Nesher M, Boneh A. Effect of fatty acids and their acyl-CoA esters on protein kinase C activity in fibroblasts: possible implications in fatty acid oxidation defects. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:66-72.

119. Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, et al. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E554-60.
120. Bruce CR, Anderson MJ, Carey AL, et al. Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5444-51.
121. Oakes ND, Bell KS, Furler SM, et al. Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* 1997;46:2022-8.
122. Mensink M, Blaak EE, Corpeleijn E, Saris WH, de Bruin TW, Feskens EJ. Lifestyle intervention according to general recommendations improves glucose tolerance. *Obes Res* 2003;11:1588-96.
123. Grundy SM, Blackburn G, Higgins M, Lauer R, Perri MG, Ryan D. Physical activity in the prevention and treatment of obesity and its comorbidities: evidence report of independent panel to assess the role of physical activity in the treatment of obesity and its comorbidities. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:1493-500.
124. Dengel DR, Pratley RE, Hagberg JM, Rogus EM, Goldberg AP. Distinct effects of aerobic exercise training and weight loss on glucose homeostasis in obese sedentary men. *J Appl Physiol* 1996;81:318-25.
125. Yamanouchi K, Shinozaki T, Chikada K, et al. Daily walking combined with diet therapy is a useful means for obese NIDDM patients not only to reduce body weight but also to improve insulin sensitivity. *Diabetes Care* 1995;18:775-8.
126. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, et al. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002;51:144-51.
127. Gray RE, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald KG, Houmard JA. Effect of weight loss on muscle lipid content in morbidly obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E726-32.
128. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:603-8.
129. Malenfant P, Tremblay A, Doucet E, Imbeault P, Simoneau JA, Joanisse DR. Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E632-9.
130. Gan SK, Kriketos AD, Ellis BA, Thompson CH, Kraegen EW, Chisholm DJ. Changes in Aerobic Capacity and Visceral Fat but not Myocyte Lipid Levels Predict Increased

- Insulin Action After Exercise in Overweight and Obese Men. *Diabetes Care* 2003;26:1706-13.
131. Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, et al. Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3191-6.
 132. He J, Goodpaster BH, Kelley DE. Effects of weight loss and physical activity on muscle lipid content and droplet size. *Obes Res* 2004;12:761-9.
 133. Houmard JA, Tanner CJ, Yu C, et al. Effect of weight loss on insulin sensitivity and intramuscular long-chain fatty acyl-CoAs in morbidly obese subjects. *Diabetes* 2002;51:2959-63.
 134. Carlson LA, Ekelund LG, Froberg SO. Concentration of triglycerides, phospholipids and glycogen in skeletal muscle and of free fatty acids and beta-hydroxybutyric acid in blood in man in response to exercise. *Eur J Clin Invest* 1971;1:248-54.
 135. Essen B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, Saltin B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1975;95:153-65.
 136. Guo Z, Mishra P, Macura S. Sampling the intramyocellular triglycerides from skeletal muscle. *J Lipid Res* 2001;42:1041-8.
 137. Standl E, Lotz N, Dixel T, Janka HU, Kolb HJ. Muscle triglycerides in diabetic subjects. Effect of insulin deficiency and exercise. *Diabetologia* 1980;18:463-9.
 138. Froberg SO. Concentration of cholesterol and triglycerides in skeletal muscle of healthy men and myocardial infarction patients. *Acta Med Scand* 1973;194:553-8.
 139. Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH, 3rd, Hagberg JM, Dalsky GP, Holloszy JO. Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol* 1986;60:562-7.
 140. Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ, Saltin B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol* 1993;469:459-78.
 141. Hopp JF, Palmer WK. Effect of glucose and insulin on triacylglycerol metabolism in isolated normal and diabetic skeletal muscle. *Metabolism* 1991;40:223-5.
 142. Froberg SO, Rossner S, Ericsson M. Relation between triglycerides in human skeletal muscle and serum and the fractional elimination rate of exogenous plasma triglycerides. *Eur J Clin Invest* 1978;8:93-7.
 143. Phillips DI, Caddy S, Ilic V, et al. Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 1996;45:947-50.

144. Guo Z. Triglyceride content in skeletal muscle: variability and the source. *Anal Biochem* 2001;296:1-8.
145. Wendling PS, Peters SJ, Heigenhauser GJ, Spriet LL. Variability of triacylglycerol content in human skeletal muscle biopsy samples. *J Appl Physiol* 1996;81:1150-5.
146. Folch J, Lees M, G.H.S. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
147. Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res* 1985;26:135-40.
148. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride/methanol. *J Lipid Res* 1964;5:600-6008.
149. van Loon LJ, Koopman R, Manders R, van der Weegen W, van Kranenburg GP, Keizer HA. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E558-65.
150. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 2000;49:467-72.
151. Reinauer H, Home PD, Kanagasabapathy AS, Heuck C-C. Laboratory Diagnosis and Monitoring of Diabetes Mellitus. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2002.
152. WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva, 2000.
153. Peronnet F, Massicotte D. Table of nonprotein respiratory quotient: an update. *Can J Sport Sci* 1991;16:23-9.
154. Crouter SE, Schneider PL, Karabulut M, Bassett DR, Jr. Validity of 10 electronic pedometers for measuring steps, distance, and energy cost. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1455-60.
155. Bergstrom J. Muscle electrolytes in man. *Scan J Clin Lab Med* 1962;14:511-513.
156. Evans WJ, Phinney SD, Young VR. Suction applied to a muscle biopsy maximizes sample size. *Med Sci Sports Exerc* 1982;14:101-2.
157. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
158. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.

159. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214-23.
160. Bonora E, Targher G, Alberiche M, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
161. Passonneau J, Lowry O. A Collection of Enzyme Essays. In: Passonneau J, Lowry O, eds. *Enzymatic Analysis, A Practical Guide*. Totowa, New Jersey: The Humana Press Inc, 1993:229-305.
162. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;48:1270-4.
163. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- ζ and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 1997;138:4721-31.
164. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 2006;55:2277-85.
165. Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, et al. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* 2006;100:1467-74.
166. An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1489-506.
167. Voipio-Pulkki LM, Nuutila P, Knuuti MJ, et al. Heart and skeletal muscle glucose disposal in type 2 diabetic patients as determined by positron emission tomography. *J Nucl Med* 1993;34:2064-7.
168. Yokoyama I, Yonekura K, Ohtake T, et al. Role of insulin resistance in heart and skeletal muscle F-18 fluorodeoxyglucose uptake in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nucl Cardiol* 2000;7:242-8.
169. Utriainen T, Takala T, Luotolahti M, et al. Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia* 1998;41:555-9.
170. Sharma S, Adrogué JV, Golfman L, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004;18:1692-700.

171. McGavock JM, Lingvay I, Zib I, et al. Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a ¹H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* 2007;116:1170-5.
172. Hayashi K, Okumura K, Matsui H, et al. Involvement of 1,2-diacylglycerol in improvement of heart function by etomoxir in diabetic rats. *Life Sci* 2001;68:1515-26.
173. Baxter GF, Mocanu MM, Yellon DM. Attenuation of myocardial ischaemic injury 24 h after diacylglycerol treatment in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1967-75.
174. Galinanes M, Goss MW, McGill CJ, Hearse DJ, Brooks G. Diacylglycerol-induced protection against injury during ischemia and reperfusion in the rat heart: comparative studies with ischemic preconditioning. *Int J Cardiol* 1998;65:129-38.
175. Stanley WC, Chandler MP. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 2002;7:115-30.
176. Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J Biol Chem* 1991;266:8162-70.
177. Oliver MF, Opie LH. Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. *Lancet* 1994;343:155-8.
178. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, et al. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2005;96:225-33.
179. Krishnamani R, Nawgiri RS, Konstam MA, Warner KG, Salomon RN, DeNofrio D. Fatty infiltration of right ventricle (adipositas cordis): an unrecognized cause of early graft failure after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1143-5.
180. Pi Y, Walker JW. Diacylglycerol and fatty acids synergistically increase cardiomyocyte contraction via activation of PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H26-34.
181. Sherwin RS, Anderson RM, Buse JB, et al. Prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S47-54.
182. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, et al. Nutrition principles and recommendations in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S36-46.
183. Shetty PS, Henry CJ, Black AE, Prentice AM. Energy requirements of adults: an update on basal metabolic rates (BMRs) and physical activity levels (PALs). *Eur J Clin Nutr* 1996;50 Suppl 1:S11-23.

