



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Πρόσληψη Κορεσμένων Λιπαρών και Κιρκάδιοι Ρυθμοί

Μεταπτυχιακή εργασία

Μπεκιαρίδου Πασχαλία

Αθήνα, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES AND EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

POSTGRADUATE PROGRAMME
APPLIED NUTRITION AND DIETETICS

COURSE: CLINICAL NUTRITION

Saturated Fat Intake and Circadian Rhythms

Master Thesis

Bekiaridou Paschalia

Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Τσίγκος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων καθηγητής)
Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Αναστασίου Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Μανιός Ιωάννης
Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Η Μπεκιαρίδου Πασχαλία, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι η κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.
- 3)** Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

Αφιέρωση

Σε όλους τους συναδέλφους που παλεύουν ακούραστα στην πρώτη γραμμή στη διάρκεια της πανδημίας και στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα ευχαριστώ:

-τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Τσίγκο Κωνσταντίνο, για την καθοδήγησή του και για την ανάθεση θέματος διατριβής που ανήκει στα επιστημονικά μου ενδιαφέροντα

-την καθηγήτρια κ. Πέππα Μελπομένη, υπεύθυνη της Ενδοκρινολογικής Μονάδος της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής ΠΓΝ "Αττικόν", όπου εργάζομαι

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....σελ. 8
Abstract.....σελ.9
Κατάλογος Πινάκων.....σελ. 10
Κατάλογος Σχημάτων.....σελ. 11
Συντομογραφίες.....σελ. 12
Εισαγωγή.....σελ. 16
Σκοπός.....σελ. 18
Βασικές Έννοιες.....σελ. 19
Μεθοδολογία ανασκόπησης.....σελ. 20
Αποτελέσματα.....σελ. 22
Κεφάλαιο 1: Άρθρα Συστηματικών Ανασκοπήσεων.....σελ. 24
Κεφάλαιο 2: Άρθρα Ανασκοπήσεωνσελ. 28
Κεφάλαιο 3: Άρθρα Κλινικών Δοκιμώνσελ. 34
Κεφάλαιο 4: Μελέτη κοόρτης.....σελ. 40
Κεφάλαιο 5: Πρωτότυπες Ερευνητικές Εργασίες.....σελ. 41
5.1 Ηπατοκύτταρα.....σελ. 42
5.2 Λιπώδης ιστός.....σελ. 46
5.3 Μυοκύτταρα.....σελ. 48
5.4 Μυοκάρδιο.....σελ. 51
5.5 Ποδοκύτταρα νεφρού.....σελ. 52
5.6 Παγκρεατικά νησίδια.....σελ. 53
5.7 Εντεροενδοκρινή κύτταρα (GLP-1).....σελ. 54
5.8 Κεντρικό ρολόι- υποθάλαμος.....σελ. 58
5.8.1 Διαταραχές νευροπεπτιδίωνσελ. 58
5.8.2 Περιβάλλον νευροφλεγμονής.....σελ. 61
Συμπεράσματα.....σελ. 65
Βιβλιογραφία.....σελ. 69
Παράρτημα.....σελ. 76

Περίληψη

Πολλές εσωτερικές βιολογικές διεργασίες του ανθρώπου διέπονται από νυχθημερινή διακύμανση εντός του εικοσιτετραώρου η οποία ονομάζεται κιρκάδιος ρυθμός και είναι απαραίτητη για την επιβίωση. Η προσαρμογή στα φωτεινά ερεθίσματα του περιβάλλοντος διαμορφώνει τον κύκλο φωτός-σκότους και χαρακτηρίζει το κεντρικό ρολόι του εγκεφάλου στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου. Τα περιφερικά ρολόγια λειτουργούν στο ήπαρ, το λιπώδη ιστό, τους μύες και άλλους ιστούς και προσαρμόζονται στα εξωγενή ερεθίσματα, με κυριότερο από αυτά την πρόσληψη τροφής. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η φυσιολογική νυχθημερινή έκφραση των γονιδίων ρολογιού (κεντρικών και περιφερικών) διαταράσσεται σε καταστάσεις όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης. Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί την στοχευμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας των τελευταίων δέκα ετών σχετικά με τις επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών στον κιρκάδιο ρυθμό.

Προέκυψαν 527 σχετικά αποτελέσματα μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων του National Institutes of Health (Pubmed) με συγκεκριμένους όρους. Μετά την εφαρμογή των κριτηρίων αποκλεισμού, έγινε κατηγοριοποίηση με βάση το είδος των μελετών. Από συστηματικές ανασκοπήσεις προέκυψε μία μελέτη της επίδρασης κορεσμένων, μονο- και πολυακόρεστων λιπαρών επί των γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού CLOCK και BMAL1, του μεταβολισμού λιπιδίων και της φλεγμονής. Τα κορεσμένα λιπαρά σχετίστηκαν με την επαγωγή γονιδίων φλεγμονής. Έπειτα αναλύονται οι συσχετίσεις από 17 άρθρα ανασκοπήσεων, όπου διευκρινίζεται αν χορηγήθηκε παλμιτικό ή δίαιτα γενικότερα υψηλής περιεκτικότητας λίπους. Σημειώνονται οι διαταραχές γονιδίων ρολογιών και ρυθμικότητας του εντερικού μικροβιώματος. Στην κατηγορία κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους, 3 μελέτες εξετάζουν τη μείωση έκφρασης γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού σε υπέρβαρους και νορμοβαρείς και την επίδραση υπερθερμιδικής διαίτας στη νυχθημερινή διακύμανση μεταβολικών παραμέτρων σε υπέρβαρους. Τα δεδομένα συγκρίνονται με τα ευρήματα 2 μελετών επίδρασης της απώλειας βάρους στον κιρκάδιο ρυθμό. Μία μελέτη κοόρτης εντόπισε συσχέτιση μεταξύ χαμηλότερης κατανάλωσης κορεσμένων και μεγαλύτερης διάρκειας νυχτερινού ύπνου στην ηλικιακή ομάδα 20-64 ετών. Τέλος, παρουσιάζονται οι ερευνητικές εργασίες με δεδομένα από ανθρώπους και τρωκτικά εργαστηρίου που εξέτασαν τη διαταραχή έκφρασης γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού στο κεντρικό ρολόι και στα περιφερικά μετά τη χορήγηση παλμιτικού. Η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών σχετίστηκε με μηχανισμούς αναπροσαρμογής της μεταγραφής γονιδίων ρολογιού και επιδρά στα νευροπεπτίδια του υποθαλάμου, την ορμονική έκκριση (GLP-1) και τις διεργασίες φλεγμονής.

Συμπερασματικά, τα κορεσμένα λίπη σχετίζονται με διαταραχές της νυχθημερινής έκφρασης γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού σε πολλούς ιστούς, με κύριο εκπρόσωπο τη μεταγραφή του CLOCK-BMAL1. Επίσης διαταράσσουν γονίδια του μεταβολισμού λίπους και τη νυχθημερινή διακύμανση γλυκόζης και λιπιδίων. Τα περισσότερα ευρήματα προήλθαν από μελέτες με χορήγηση παλμιτικού.

Λέξεις κλειδιά: κορεσμένο λίπος, κιρκάδιος ρυθμός, παλμιτικό

Abstract

In the human body, most of the internal biological processes are subject to diurnal oscillations within twenty four hours, the circadian rhythm, which is essential for survival. The light/dark cycle is formed by adaptation to sources of light from the external surroundings and is controlled by the central clock in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. Peripheral clocks are operating in the liver, adipose tissue, muscles and other tissues, adapting to external stimuli such as food intake, which is a major contributor. According to recent studies, the normal diurnal expression of clock genes (central and peripheral) is disturbed in conditions of insulin resistance, obesity and diabetes. The aim of the current study is the targeted review of the literature during the last ten years about the effects on circadian rhythms caused specifically by saturated fat intake.

A search in the National Institutes of Health (Pubmed) database resulted in 527 relevant articles. The exclusion criteria were applied and the remaining studies were categorised in groups based on their type. In systematic reviews, one examined the effects of saturated, mono- and polyunsaturated fat on the expression of CLOCK and BMAL1 genes, lipid metabolism and inflammation. Saturated fat intake was correlated with induction of genes of inflammation. Then, 17 review articles are presented; the specific use of palmitate or a high fat diet in general is clarified. Effects on the expression of clock genes and microbiome rhythmicity were noted. In the group of clinical trials, the abolishment of normal clock gene expression was investigated in obese and normal weight volunteers and the effects of a hypercaloric diet on the diurnal oscillation of metabolic parameters. Data were compared to the findings of 2 studies on the effects of weight loss. A correlation between lower saturated fat intake and longer sleep duration in the age group of 20-64 years was proven by a cohort study. Finally, the original research works on either laboratory animals or human volunteers are analysed, where the expression of clock genes of central and peripheral clocks is tested after the administration of palmitate. Saturated fat intake was related with adapting mechanisms in clock gene transcription, effects on hypothalamic neuropeptides, hormone secretion (GLP-1) and inflammation.

In conclusion, saturated fat intake influences the diurnal expression of clock genes such as CLOCK-BMAL1 in a variety of tissues. Oscillations of genes in lipid metabolism and serum levels of metabolic parameters are also affected. Most findings result from studies with the administration of palmitate.

Key words: saturated fat, circadian rhythm, palmitate

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Άρθρα ανασκοπήσεων.....	σ.28
Πίν.2: Άρθρα κλινικών δοκιμών.....	σ.35
Πίν.3: Αποτελέσματα πρωτότυπων ερευνητικών εργασιών.....	σ.41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Επεξήγηση βασικών εννοιών κινκάρδιου ρυθμού.....	σελ. 18
Σχήμα 2: Αλγόριθμος μεθοδολογίας της ανασκόπησης	σελ. 22
Σχήμα 3: Αποτελέσματα αναζήτησης ανά κατηγορία.....	σελ. 23

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACC	Acetyl Co-A Carboxylase	Ένζυμο καρβοξυλάσης ακετυλο-συνενζύμου A
AgRP	Agouti-Related Peptide	Πεπτίδιο Agouti-Related
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β -d-ribofuranoside	Ενζυμικός ενεργοποιητής, ανάλογο του AMP, 5-αμινοιμιδαζολο-4-καρβοξαμιδιο-1-β-d ριβοφουρανοσίδη
AMIC	Adult Mouse Ileal Crypt	Κρύπτη ειλεού ενήλικου ποντικού
AML-12	Alpha Mouse Liver 12	Κυτταρική σειρά 12 ήπατος ποντικού
AMPK	AMP-activated Protein Kinase	Ένζυμο κινάσης που ενεργοποιείται από το AMP
ARNTL	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like	Γονίδιο ARNTL (κωδικοποιεί το BMAL1)
ATPase B2	ATPase H ⁺ Transporting V1 Subunit B2	Υπομονάδα B2 ATPάσης
BMAL1	Brain and Muscle Arnt-Like protein-1	Πρωτεΐνη BMAL1 (γονιδίου ARNTL)
BMI	Body Mass Index	Δείκτης μάζας σώματος
CAT	Catalase	Ένζυμο καταλάσης
CCK	Cholecystokinin	Χολοκυστοκινίνη
CTGF	ConnectiveTissue Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha	Πρωτεΐνη A που δεσμεύεται σε ενισχυτή της αλληλουχίας DNA C-C-A-A-T
CHARGE	Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology	Κοόρτη επιδημιολογικών μελετών καρδιαγγειακής υγείας και γενωμικής
CIART	Circadian Associated Repressor of Transcription	Γονίδιο αναστολέα μεταγραφής με κερκάδιο ρυθμό
CID	Clinical Investigation Day	Ημέρα προσδιορισμού κλινικών παραμέτρων

CK1E	Casein Kinase 1 Epsilon	Ένζυμο κινάσης καζεΐνης 1E
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput	Γονίδιο CLOCK
COX5B	Cytochrome C Oxidase Subunit 5B	Ένζυμο οξειδάση κυτοχρώματος υπομονάδα 5B
CPT1A	Carnitine Palmitoyltransferase 1A	Ένζυμο παλμιτοϋλοτρανσφεράσης 1A
CREB	cAMP Response Element Binding Protein	Πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ανταποκρινόμενη σε σήματα του cAMP περιοχή του DNA
CREBBP	CREB Binding Protein	Πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο CREB
CRY	Cryptochrome	Γονίδιο Κρυπτόχρωμα
DAG	Diacylglycerol	Διακυλογλυκερόλη
DBP	Albumin D Box-Binding Protein	Πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο D-Box αλβουμίνης
DHA	Docosahexanoid Acid	Δοκοσαεξανοϊκό οξύ
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	Ένζυμο κινάσης εξωκυττάρων σημάτων
FABP4	Fatty Acid Binding Protein 4	Πρωτεΐνη δεσμεύουσα τα λιπαρά οξέα
FASN	Fatty Acid Synthase	Συνθάση λιπαρών οξέων
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Peptide	Ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη
GDAP1	Ganglioside-induced differentiation- associated Protein 1	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τη διαφοροποίηση των γαγγλιοσιδίων
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1	Γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο 1
GPX1	Glutathione Peroxidase 1	Υπεροξειδάση γλουταθειόνης
GSH	Glutathione Synthetase	Συνθετάση γλουταθειόνης
HCLF	High Carbohydrate, Low Fat Diet	Δίαιτα υψηλών υδατανθράκων, χαμηλών λιπαρών
HDAC	Histone Deacetylase	Ένζυμο αποακετυλάση ιστονών

HDL	High Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη
HFD	High-Fat Diet	Δίαιτα υψηλού λίπους
IDH3A	Isocitrate Dehydrogenase (NAD(+)) 3 Catalytic Subunit Alpha	Ένζυμο ισοκιτρικής αφυδρογονάσης -3, καταλυτική υπομονάδα άλφα
IMG	Immortalized Mouse Microglial Cell Line	Κυτταρική σειρά μονιμοποιημένης μικρογλοίας ποντικών
KO	knock-out	Απαλοιφή γονιδίου
LCHF	Low Carbohydrate, High Fat Diet	Δίαιτα χαμηλών υδατανθράκων, υψηλού λίπους
LDL	Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη
LPL	Lipoprotein Lipase	Ένζυμο λιποπρωτεϊνικής λιπάσης
LPS	Lipopolysaccharides	Λιποπολυσακχαρίτες
mHypoE-37	Embryonic Mouse Hypothalamus Cell Line 37	Εμβρυονική κυτταρική σειρά υποθαλάμου ποντικών 37
mHypoE-N44	Embryonic Mouse Hypothalamus Cell Line N44	Εμβρυονική κυτταρική σειρά υποθαλάμου ποντικών N44
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	Ένζυμο κινάσης ενεργοποιούμενης από τα μιτογόνα
MTT	Meal Tolerance Test	Δοκιμασία ανοχής σε ανάμεικτο γεύμα
MUFAs	Mono-Unsaturated Fatty Acids	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NAMPT	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase	Ένζυμο φωσφοριβοζυλο-τρανσφεράσης της νικοτιναμίδης
ND5	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5	Υπομονάδα αφυδρογονάσης του NADH

NDUFA	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1	Υπομονάδα αφυδρογονάσης του NADH
NF-κB	Nuclear Factor κB	Πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας κB
NPAS2	Neuronal PAS Domain Protein 2	Πρωτεΐνη 2 περιοχής PAS νευρώνων
NPY	Neuropeptide-Y	Νευροπεπτίδιο-Y
NR1D	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D	Γονίδια μεταγραφικών παραγόντων REV-ERB
PE	Phosphatidylethanolamine	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PER	PERIOD	Γονίδιο 'Περίοδος'
PNPLA2	patatin-like phospholipase domain containing 2	Ένζυμο σύνθεσης λιπαρών οξέων, με κικκάδια έκφραση
PUFAs	Poly-Unsaturated Fatty Acids	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
REV-ERBα	REVerse to ERBα	Μεταγραφικός παράγοντας REV-ERBα
ROR	RAR Related Orphan Receptor	“Ορφανός” πυρηνικός υποδοχέας
SFA	Saturated Fatty Acids	Κορεσμένα λιπαρά
SIRT1	Sirtuin-1, Silent Information Regulator	Ένζυμο αποακετυλάσης εξαρτώμενης από το NAD
SCN	Suprachiasmatic Nucleus	Υπερχιασματικός πυρήνας υποθαλάμου
SOD1	Superoxide Dismutase 1	Ένζυμο υπεροξειδικής δισμουτάσης
TBF	Total Body Fat	Ολικό λίπος σώματος
TEF	Thyrotroph Embronic Factor	Μεταγραφικός παράγοντας εμβρυικής διαμόρφωσης θυρεοτρόφων κυττάρων
TNFα	Tumor Necrosis Factor α	Προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, παράγοντας νέκρωσης όγκων
TLR4	Toll-Like Receptor 4	Υποδοχέας Toll-like 4
WHR	Waist-to-Hip Ratio	Λόγος της περιμέτρου μέσης προς την περιμετρο ισχίων

Πρόσληψη Κορεσμένων Λιπαρών και Κικκάδιοι Ρυθμοί/ Μπεκιαρίδου Πασχαλία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με τη σύνδεση του μεταβολισμού με τον κirkάδιο ρυθμό. Οι πληροφορίες προέρχονται από μελέτες σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους (κυρίως εργαζόμενους σε νυχτερινές βάρδιες, με ωράριο κυκλικό ή εναλλασσόμενο). Ο κirkάδιος ρυθμός (*circa diem*) ορίζεται ως το σύνολο των εσωτερικών βιολογικών λειτουργιών του σώματος που εμφανίζουν περιοδικότητα 24ώρου. Το κεντρικό ρολόι του ανθρώπινου οργανισμού εντοπίζεται στον υπερχιασματικό πυρήνα (superchiasmatic nucleus- SCN) του πρόσθιου τμήματος του υποθαλάμου. Ο υπερχιασματικός πυρήνας ευθύνεται για τον ενδογενή κirkάδιο ρυθμό, που συγχρονίζει την κεντρική θερμοκρασία του σώματος, την αρτηριακή πίεση και την παραγωγή ορμονών (όπως η μελατονίνη, η κορτιζόλη, η προλακτίνη και η αυξητική ορμόνη) με τον κύκλο φωτός και σκότους, μέσω των εξωτερικών φωτεινών σημάτων που καταφτάνουν στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού. Τα φωτεινά αυτά σήματα διαμορφώνουν τον κύκλο φωτός και σκότους και αποτελούν το κυριότερο εξωγενές ερέθισμα. Εκτός από το φως, υπάρχουν και άλλα εξωγενή ερεθίσματα (Zeitgeber) που επηρεάζουν το κεντρικό ρολόι, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ο κύκλος σίτισης και νηστείας και η δραστηριότητα. Με αυτόν τον τρόπο οι φυσιολογικές διεργασίες του σώματος συγχρονίζονται με τα εξωτερικά ερεθίσματα, διαμορφώνοντας τον κύκλο ύπνου-εγρήγορησης, απαραίτητο για την επιβίωση. Τα κυριότερα γονίδια που σχηματίζουν τον ενδογενή κirkάδιο ρυθμό κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) και BMAL-1 (brain and muscle ARNT-like 1). Αυτοί σχηματίζουν δομή τύπου έλικα-βρόχος- έλικα. Προσδένονται στη ρυθμιστική περιοχή (5'-CACGTG-3') του εκκινητή δυο γονιδίων CRY (Cryptochrome 1 και 2), και τριών γονιδίων PER (Period 1, 2 και 3). Οι πρωτεΐνες PER και CRY σχηματίζουν διμερή, μεταναστεύουν στον πυρήνα και αναστέλλουν το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1. Η πρωτεΐνη SIRT1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα του συμπλόκου αυτού, μέσω αποακετυλίωσης και αναστολής της μεταγραφής του BMAL1. Σε μοριακό επίπεδο, ο κirkάδιος ρυθμός ευθύνεται για την ομοιοστάση της έκφρασης των γονιδίων, ώστε οι πρωτεΐνες που παράγονται από αυτή να κορυφώνονται τη στιγμή του 24ώρου που είναι περισσότερο απαραίτητες. Τα ετεροδιμερή CLOCK-BMAL1 ενεργοποιούν την έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων REV-ERB-α και -β (Reverse Erythroblastosis Virus), οι οποίοι με τη σειρά τους αναστέλλουν την έκφραση του

γονιδίου BMAL1. Οι παράγοντες ROR -α, -β και -γ (Retinoid Orphan Receptor), PPARα (Peroxisome Proliferator- Activated Receptor) και PGC1α (PPARγ CoActivator), επίσης ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 και ενεργοποιούν περαιτέρω την έκφραση του BMAL1. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υφίστανται περαιτέρω μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις **(19)**.

Τα περιφερικά ρολόγια εντοπίζονται στον εγκέφαλο (σε δομές εκτός του υπερχιασματικού πυρήνα, όπως στον οσφρητικό βολβό και τον έσω βασικό πυρήνα του υποθαλάμου) και στα περιφερικά όργανα, όπως στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό, στους μύες και στο μυοκάρδιο. Αφορούν γονίδια του μεταβολισμού με έκφραση που παρουσιάζει 24ωρη περιοδικότητα και ρυθμίζεται από το κεντρικό ρολόι μέσω ορμονών και μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Το κυριότερο εξωγενές ερέθισμα που επηρεάζει τα περιφερικά ρολόγια είναι η πρόσληψη τροφής. Τα μεταβολικά σήματα των περιφερικών ρολογιών φτάνουν στον υποθάλαμο μέσω νευραξόνων του πυρήνα της μονήρους δεσμίδας και συνδέουν τον ενεργειακό μεταβολισμό με τον κirkάδιο ρυθμό. Με αυτόν τον τρόπο, ερεθίσματα που σχετίζονται με τη διατροφή μπορούν να επιδράσουν στα περιφερικά ρολόγια και να τροποποιήσουν τα προσαγωγά σήματα προς το κεντρικό ρολόι του υποθαλάμου.

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στο ρόλο εξωγενών επιδράσεων τόσο στο κεντρικό ρολόι του υποθαλάμου, όσο και στα περιφερικά ρολόγια. Παραδείγματα αποτελούν η ελεύθερη πρόσβαση σε δίαιτα υψηλών θερμίδων σε όλη τη διάρκεια του 24ώρου, η μετακίνηση μεταξύ διαφορετικών ζωνών ώρας (φαινόμενο jet lag), ο τεχνητός φωτισμός τις νυχτερινές ώρες και η απασχόληση σε κυλιόμενο ωράριο με βάρδιες, που διαταράσσουν τον κirkάδιο ρυθμό. Φαίνεται πως η απώλεια συγχρονισμού μεταξύ κεντρικών και περιφερικών ρολογιών αυξάνει τον κίνδυνο για μεταβολικά νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία. Ακόμα, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα, καθώς και με ορισμένες μορφές καρκίνου. Η διατροφή κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο μεταξύ των εξωγενών ερεθισμάτων που ασκούν σημαντικές επιδράσεις στους κirkάδιους ρυθμούς. Συγκεκριμένα, σε μελέτες χρονοδιατροφής (chrononutrition) διερευνώνται οι διαιτητικές συμπεριφορές (ο χρόνος πρόσληψης των γευμάτων, η σίτιση εντός ορισμένου χρονικού πλαισίου της ημέρας, η

παραμονή του σώματος σε κατάσταση νηστείας). Ακόμα, διερευνάται ο ρόλος της ποιότητας της διατροφής στην παθοφυσιολογία ορισμένων παθήσεων (θερμιδικό περιεχόμενο, σύσταση των γευμάτων- περιεκτικότητα σε σάκχαρα, λίπος, αλάτι, πρόσληψη καφεΐνης). Στις μελέτες σίτισης εντός ορισμένου χρονικού παραθύρου (time-restricted feeding) εξετάζονται οι επιπτώσεις του χρόνου πρόσληψης των γευμάτων και της διάρκειας της περιόδου νηστείας. Φαίνεται πως όταν η συνολική πρόσληψη θερμίδων περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο εντός της ημέρας, βελτιώνονται ο μεταβολισμός της γλυκόζης στο ήπαρ, η παραγωγή χολικών αλάτων, οι δείκτες φλεγμονής και διαπιστώνεται προστασία από την υπέρμετρη πρόσληψη βάρους και την ηπατική στεάτωση. Η ευαισθησία στην ινσουλίνη παρουσιάζει κirkάδια διακύμανση που ακολουθεί τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στη διάρκεια της ενεργής περιόδου της ημέρας. Ως προς τη σύσταση των γευμάτων και την επίδραση των επιμέρους συστατικών στον κirkάδιο ρυθμό, οι πρώτες μελέτες κατέδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ του θερμιδικού περιεχομένου και των κirkάδιων διαταραχών. Η πλειονότητα των μελετών μέχρι στιγμής εστιάζει στις επιδράσεις της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων σε μηχανισμούς έκφρασης γονιδίων clock, έκκρισης ορμονών και ορεξιόγόνων νευροπεπτιδίων και στους δείκτες φλεγμονής. Υπάρχει πληθώρα δημοσιευμένων μελετών πάνω στη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (high fat diet), που δημιουργεί παχυσαρκία και λιπώδη διήθηση του ήπατος. Ωστόσο, διαπιστώνεται ερευνητικό κενό, καθώς το μέχρι σήμερα επίπεδο γνώσεων δεν έχει επεκταθεί στο ρόλο των επιμέρους συστατικών της δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος, όπως για παράδειγμα στα κορεσμένα λιπαρά και την στοχευμένη επίδρασή τους στους μηχανισμούς του κirkάδιου ρυθμού.

Σκοπός

Τα κορεσμένα λίπη υπερέχουν στη δυτικού τύπου δίαιτα και έχουν συσχετιστεί με καρδιαγγειακό κίνδυνο. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα ως προς τις επιδράσεις της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών στις λειτουργίες του κirkάδιου ρυθμού. Η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση στοχεύει στην εντόπιση και στην παρουσίαση των μέχρι στιγμής διαθέσιμων δεδομένων από μελέτες που διερευνούν τη σύνδεση μεταξύ της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών και των επιδράσεων στον κirkάδιο ρυθμό.

Βασικές έννοιες

Οι παρακάτω έννοιες χρησιμοποιούνται στη μελέτη φυσιολογίας παραμέτρων του κινκάρδιου ρυθμού που εμφανίζουν περιοδικότητα και νυχθημερινή διακύμανση, όπως τα επίπεδα mRNA κατά την έκφραση γονιδίων clock.

Amplitude: πλάτος έκφρασης, η απόσταση της μέσης από τη μέγιστη τιμή

Zeitgeber: ερέθισμα που επιδρά στον κινκάρδιο ρυθμό

Mesor: η μέση τιμή της παραμέτρου στη διάρκεια της περιόδου μελέτης

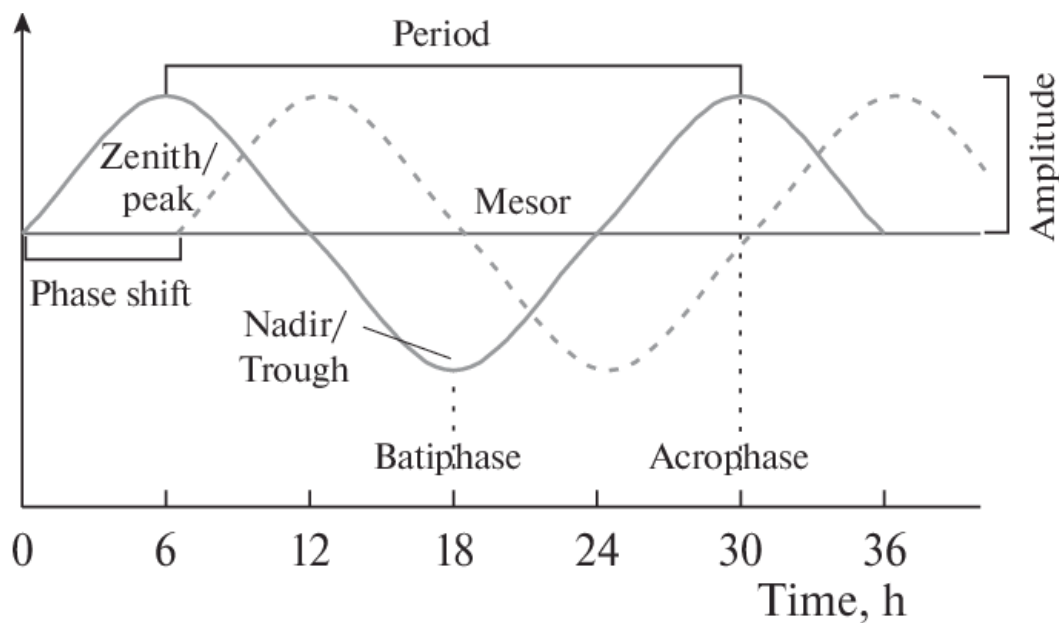
Nadir/trough: η ελάχιστη τιμή της παραμέτρου

Zenith/peak: η μέγιστη τιμή της παραμέτρου

Acrophase: ακρόφαση, το χρονικό σημείο όπου επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή

Period: περίοδος, ο χρόνος για να ολοκληρωθεί μία ταλάντωση

Phase shift/ delay: η μετατόπιση της φάσης της ταλάντωσης σε επόμενο χρονικό σημείο



Σχήμα 1: Επεξήγηση βασικών εννοιών κινκάρδιου ρυθμού (Hizhkin et al, 2018)

Μεθοδολογία ανασκόπησης

Κατά τη συγγραφή της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες PRISMA για τη συγγραφή συστηματικών ανασκοπήσεων. Ο κατάλογος PRISMA είναι διαθέσιμος στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.prisma-statement.org/> (1). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω όροι (terms): 'high fat diet', 'saturated fat', 'palmitate', circadian rhythm', 'clock genes'. Έγινε χρήση Boolean τελεστών στον αλγόριθμο ως εξής:

((saturated fatty acid) OR (palmitate)) AND ((circadian) OR (clock genes)).

Στοχευμένα έγινε χρήση του όρου 'palmitate', καθώς το παλμιτικό οξύ (palmitic acid) κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο μεταξύ των κορεσμένων λιπαρών που προσλαμβάνονται μέσω της δίαιτας δυτικού τύπου. Πολυάριθμες παρατηρήσεις για τον κirkάδιο ρυθμό προέκυψαν από τη χορήγηση του παλμιτικού στα πειραματόζωα. Στο τελικό βήμα της αναζήτησης, ο όρος 'palmitate' αντικαταστάθηκε από τα υπόλοιπα παραδείγματα κορεσμένων λιπαρών οξέων που απαντώνται στη δίαιτα, όπως το μυριστικό (myristic acid) και το στεατικό (stearic acid). Υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από τη χρήση δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (High-fat diet): εμπεριέχει σε σημαντικό ποσοστό κορεσμένα λιπαρά (saturated fat), ακόρεστα αλλά και trans. Η διερεύνηση της σύνδεσης μεταξύ του κirkάδιου ρυθμού και του μεταβολισμού του λίπους στηρίζεται σε πολυάριθμες μελέτες με τη χρήση της συγκεκριμένης δίαιτας. Ωστόσο, κρίθηκε σκόπιμη η αποφυγή της χρήσης του γενικότερου όρου 'high-fat diet' από τον αλγόριθμο της αναζήτησης, καθώς η παρούσα ανασκόπηση στοχεύει στην εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν συγκεκριμένα στα κορεσμένα. Στα σημεία όπου κρίνεται απαραίτητο, αναφέρονται ξεχωριστά οι μελέτες- σταθμοί για τον κirkάδιο ρυθμό με τη χρήση αυτής της δίαιτας, καθώς και η εξαγωγή συμπερασμάτων από συστηματικές ανασκοπήσεις.

Ενεργοποιήθηκαν εξειδικευμένα φίλτρα αναζήτησης με σκοπό την κατηγοριοποίηση των δημοσιευμένων μελετών με βάση:

- τον τύπο μελέτης (ανασκόπηση και συστηματική ανασκόπηση, κλινική δοκιμή, επιδημιολογική μελέτη- κοόρτης, πρωτότυπη ερευνητική εργασία)
- το είδος στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις (πειραματόζωα ή άνθρωποι).

Τα αποτελέσματα που συγκεντρώθηκαν είτε αποκλείστηκαν από την ανασκόπηση είτε εντάχθηκαν με τη χρήση προκαθορισμένων κριτηρίων και κατηγοριοποιήθηκαν σε ενότητες όπως εξηγείται παρακάτω.

Κριτήρια ένταξης

Τα καταληκτικά σημεία και τα πρωτότυπα ερευνητικά ευρήματα των μελετών που εντάχθηκαν στην ανασκόπηση αφορούν σε μεταβολές παραμέτρων του κικκάδιου ρυθμού μετά από έκθεση σε κορεσμένο λιπαρό οξύ μέσω της τροφής. Οι παράμετροι αυτές απαντώνται σε πολλαπλά επίπεδα: στην έκφραση γονιδίων, στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, αλλά και σε παρατηρήσεις από επίπεδο ιστών, όπως το ήπαρ, το λιπώδη ιστό, τους μύες, το μυοκάρδιο και την έκκριση ορμονών, αλλά και νευροπεπτιδίων του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Κριτήρια αποκλεισμού

Ως κριτήρια αποκλεισμού από την τελική ένταξη στην ανασκόπηση ορίστηκαν τα εξής:

- διεξαγωγή μελέτης σε φυτά, ψάρια, μύκητες και άλλα είδη πλην του ανθρώπου και των τρωκτικών εργαστηρίου
- απουσία χορήγησης κορεσμένων λιπαρών
- απουσία παρατηρήσεων ως προς τον κικκάδιο ρυθμό
- μεμονωμένη χρήση ακόρεστων λιπαρών οξέων ή τροποποιημένων φυτικών ελαίων
- σε περίπτωση δίαιτας υψηλής σε λίπος γενικότερα, η απουσία επιμέρους προσδιορισμού του ποσοστού λίπους επί της συνολικής ημερήσιας θερμιδικής πρόσληψης
- απουσία προσδιορισμού του ποσοστού κορεσμένων λιπαρών επί του προσλαμβανόμενου διαιτολογίου
- διερεύνηση μεταβολικών επιδράσεων απαλοιφής γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού (knockout) χωρίς να εξετάζονται επιδράσεις των διαιτητικών λιπαρών
- μελέτη κικκάδιου ρυθμού σε πάθηση, χωρίς τη χορήγηση λιπαρών οξέων

- μελέτη κινκάρδιου ρυθμού όπου διερευνώνται οι επιδράσεις του χρόνου πρόσληψης των γευμάτων, χωρίς προσδιορισμό της σύστασής τους (πχ. μελέτες σίτισης εντός ορισμένου χρονικού παραθύρου χωρίς πρόσληψη λίπους)
- μελέτη κινκάρδιου ρυθμού με χρήση φαρμακευτικού παράγοντα ή βοτάνου.

Κατηγοριοποίηση σε ενότητες

Αρχικά παρουσιάζονται οι ήδη δημοσιευμένες ανασκοπήσεις με καίρια ευρήματα για το ρόλο των διαιτητικών κορεσμένων λιπαρών οξέων στα διάφορα στάδια ρύθμισης του κινκάρδιου ρυθμού. Έπειτα, παρουσιάζονται οι κλινικές δοκιμές και οι πρωτότυπες ερευνητικές εργασίες, που κατηγοριοποιήθηκαν σε ενότητες. Κάθε ενότητα αντιστοιχεί στο επίπεδο του οργανισμού όπου εμφανίζονται τα κυριότερα αποτελέσματα της εκάστοτε μελέτης. Ο συγκεκριμένος τρόπος επελέγη ώστε η τελική μορφή της συγκεντρωτικής παρουσίασης των δεδομένων να είναι σαφής και κατανοητή. Ωστόσο, στις περιπτώσεις δημοσιεύσεων με διαπιστωμένες επιδράσεις σε περισσότερες κατηγορίες από μία, αποφασίστηκε η ένταξη στην κατηγορία με την εξέχουσα κλινική σημασία.

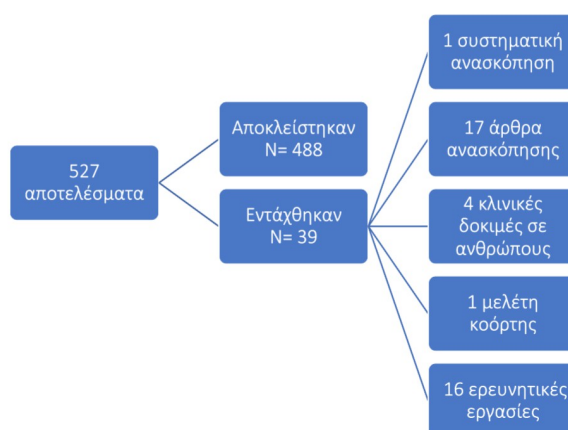


Σχήμα 2: Αλγόριθμος μεθοδολογίας ανασκόπησης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος ((saturated fatty acid) OR (palmitate)) AND ((circadian) OR (clock genes)) στην αναζήτηση δημοσιεύσεων προς ένταξη στη βιβλιογραφική ανασκόπηση. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος ανέδειξε 1837 αποτελέσματα (από τα οποία τα 527 δημοσιεύτηκαν κατά την τελευταία δεκαετία, στη διάρκεια της οποίας αυξήθηκε το ενδιαφέρον σχετικά με τη σύνδεση μεταξύ κινκάρδιου ρυθμού και μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, με έμφαση στην εμφάνιση παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου). Κατόπιν εφαρμογής των κριτηρίων αποκλεισμού, απομακρύνθηκαν:

- μελέτες σε φυτά, ψάρια, μύκητες και άλλα είδη πλην του ανθρώπου και των τρωκτικών εργαστηρίου (n=39)
- μελέτες σε πάθηση, χρήση φαρμάκου (n=108)
- απουσία χορήγησης κορεσμένου λίπους (n=199)
- διαιτητικές παρεμβάσεις όπου δεν αναφέρεται η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά (n=44)
- απουσία μελέτης παραμέτρων του κινκάρδιου ρυθμού (n=52)
- μελέτες κινκάρδιου ρυθμού χωρίς διατροφική παρέμβαση (n=11) και χωρίς συσχετίσεις με το μεταβολισμό (n=35)



Σχήμα 3: Αποτελέσματα αναζήτησης ανά κατηγορία

Κεφάλαιο 1: Άρθρα συστηματικών ανασκοπήσεων

Από την ηλεκτρονική αναζήτηση εντοπίστηκαν 6 άρθρα συστηματικών ανασκοπήσεων. Κατόπιν εφαρμογής των κριτηρίων αποκλεισμού, αφαιρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

- 4 άρθρα μελετών κινκάρδιου ρυθμού σε παθήσεις, χωρίς τη χορήγηση λιπαρών οξέων
- 1 άρθρο μελετών ακόρεστων λιπαρών της διατροφής σε ψάρια.

Η μοναδική λοιπόν συστηματική ανασκόπηση με συμπεράσματα σχετικά με τον κινκάρδιο ρυθμό και την κατανάλωση συγκεκριμένων λιπαρών δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Nutrients* το 2017 από τη συγγραφική ομάδα των Herrera-Marcos και συνεργατών (2). Σε αυτήν εξετάστηκε μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων από μονοπάτια του μεταβολισμού, της φλεγμονής και του κινκάρδιου ρυθμού, κατόπιν διαιτητικής παρέμβασης με λιπαρά οξέα διαφορετικών τύπων (π.χ. αντικατάσταση των κορεσμένων [Saturated Fatty Acids- SFA] από μονοακόρεστα [Mono-Unsaturated Fatty Acids- MUFA], κατανάλωση κορεσμένων έναντι πολυακόρεστων [Poly-Unsaturated Fatty Acids- PUFA], σύγκριση μεταξύ της κατανάλωσης έξτρα παρθένου ελαιόλαδου [Extra-Virgin Olive Oil- EVOO] και της κατανάλωσης άλλων ελαίων κ.ο.κ). Συγκέντρωσε 34 αναλύσεις μεταγραφώματος από δεδομένα 37 μελετών (19 σε ανθρώπους και 18 σε ζώα). Τα κυριότερα ευρήματα ως προς την κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών ήταν τα εξής:

- Συγκριτικά με την κατανάλωση SFA, η κατανάλωση MUFA και η Μεσογειακή Δίαιτα για 8 εβδομάδες συσχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού- CCN2 και της απολιποπρωτεΐνης Β σε μονοπύρνα περιφερικού αίματος υπέρβαρων συμμετεχόντων.
- Η αντικατάσταση SFA από MUFA οδήγησε σε χαμηλότερη έκφραση γονιδίων φλεγμονής σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων: στα κύτταρα λιπώδους ιστού συμμετεχόντων με κοιλιακή παχυσαρκία, στις λείες μυϊκές ίνες στεφανιαίων αρτηριών και σε νεοπλασματικά κύτταρα του προστάτη.
- Ως προς τον κινκάρδιο ρυθμό, σε αρουραίους F344 και σε ποντίκια με απαλοιφή (knockout) του γονιδίου της ApoE (όχι όμως της ApoA1) διαπιστώθηκε επαγωγή της

έκφρασης των γονιδίων CLOCK-BMAL1 στο ήπαρ από το ελαϊνολικό οξύ (oleanoic acid). Με τη χρήση αυτού του συστατικού του παρθένου ελαιόλαδου παρατηρήθηκαν σημαντικές επιδράσεις στην ενεργοποίηση των βασικών γονιδίων του κινκάρδιου ρυθμού, η οποία είναι ανεξάρτητη από τα υπόλοιπα συστατικά της δίαιτας και εξαρτώμενη από την απολιποπρωτεΐνη ApoA1-HDL. Συνεπώς, οι κυριότερες δράσεις των κορεσμένων λιπαρών συνδέθηκαν με την έκφραση γονιδίων της φλεγμονής, ενώ στα CLOCK-BMAL1 ασκήθηκαν επιδράσεις από το ελαϊνολικό οξύ.

Η πρόσληψη του κορεσμένου λίπους μεμονωμένα και οι συνδέσεις της με τον κινκάρδιο ρυθμό δεν έχουν εξεταστεί μέχρι στιγμής σε άλλη συστηματική ανασκόπηση. Ωστόσο, το 2020 δημοσιεύτηκε στο Nutrition Research από την ομάδα των Paula και συνεργατών μία συστηματική ανασκόπηση που εξέτασε τις επιδράσεις της δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος στην έκφραση γονιδίων του κινκάρδιου ρυθμού σε ποντίκια (3). Έγινε αρχική ένταξη 291 μελετών και κατέληξαν σε 13 μελέτες της τελικής επιλογής. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την κατανάλωση δίαιτας υψηλής σε λίπος (HFD- high-fat diet) από ποντίκια σε σχέση με τον κινκάρδιο ρυθμό ήταν τα εξής:

Σε ποντίκια άθικτα γονιδιακά:

- Τα ποντίκια που ελάμβαναν HFD παρουσίασαν μεταβολή στην περίοδο δραστηριότητας και στην έκφραση γονιδίων clock στον υποθάλαμο, το λιπώδη ιστό και το ήπαρ.
- Σίτιση με HFD σε διαφορετική φάση φωτός του 24ώρου: στα νυκτόβια ποντίκια, η σίτιση με HFD στη διάρκεια της σκοτεινής φάσης (dark phase) οδήγησε σε μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους από ότι η σίτιση κατά τη φωτεινή φάση (light phase).
- Σίτιση σε δοκιμασία τύπου 'jet lag' και προσαρμογή στις νέες συνθήκες φωτός: στα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία τύπου 'jet lag' με αύξηση της διάρκειας του κύκλου φωτός κατά 6 ώρες, η κατανάλωση HFD σχετίστηκε με μειωμένη ικανότητα προσαρμογής της κινητικής τους δραστηριότητας και της θερμοκρασίας του σώματός τους στις νέες συνθήκες φωτεινών ερεθισμάτων. Στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, η κατανάλωση HFD σχετίστηκε με διαταραχή ρυθμιστικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (μείωση έκφρασης του c-FOS και μείωση φωσφορυλίωσης της ERK).

- Παράλειψη του πρωινού γεύματος σε ποντίκια υπό HFD οδήγησε σε καθυστέρηση του peak (μέγιστα επίπεδα έκφρασης) των γονιδίων Clock στο ήπαρ κατά 2-4 ώρες και σε διαταραχές μεταβολισμού λιπιδίων (αυξημένα επίπεδα μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων στο πλάσμα και αυξημένα επίπεδα χολικών αλάτων).

Σε ποντίκια με γενετικές τροποποιήσεις γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού:

- Απαλοιφή του Bmal-1 (Bmal1^{-/-}): η σίτιση με HFD σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα, αυξημένη έκτοπη εναπόθεση λίπους, πρόωρη γήρανση και εκδήλωση μεταβολικού συνδρόμου.
- Απαλοιφή του Clock (Clock^{-/-}): σχετίστηκε με αυξημένη πρόσληψη τροφής και στη φωτεινή και στη νυχτερινή φάση του 24ώρου. Σε ποντίκια που ελάμβαναν κανονική δίαιτα, σχετίστηκε με μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους σε σύγκριση με τα ποντίκια άθικτα γενετικά (wild type). Στα ποντίκια που ελάμβαναν HFD, σχετίστηκε με μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους και μεγαλύτερο ποσοστό λιπώδους μάζας σε σύγκριση με τα ποντίκια άθικτα γενετικά. Επίσης, σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, γλυκόζης και με διαταραχή στην έκκριση ινσουλίνης. Η λήψη HFD οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα λεπτίνης κατά τη φωτεινή φάση σε σύγκριση με τα wild type ποντίκια.
- Μεταλλάξεις του CLOCK: τα επίπεδα mRNA της γκρελίνης και της ορεξίνης στον υποθάλαμο ήταν χαμηλότερα. Στο ήπαρ διαπιστώθηκαν διαταραχές στην έκφραση γονιδίων ενζύμων της γλυκολυτικής οδού, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του μεταβολισμού λιπιδίων.
- Γενετική απαλοιφή του CRY1 σε ποντίκια που κατανάλωναν HFD σχετίστηκε με μικρότερη πρόσληψη βάρους, πιθανόν στα πλαίσια ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και του φαιού λιπώδους ιστού.
- Μεταλλάξεις των γονιδίων PER1 και PER2 σε ποντίκια που κατανάλωναν HFD σχετίστηκαν με μικρότερη πρόσληψη βάρους, καθώς και χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό, σε σύγκριση με τα wild type ποντίκια.

Συμπερασματικά στα δεδομένα συστηματικών ανασκοπήσεων από μελέτες του κικκάδιου ρυθμού ο ρόλος των κορεσμένων λιπαρών της δίαιτας σχετίζεται άμεσα με τις διαδικασίες φλεγμονής. Στις περιπτώσεις μεταλλάξεων γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού, δεν έχει πραγματοποιηθεί συστηματική ανασκόπηση για τον επιμέρους ρόλο των κορεσμένων λιπαρών, ωστόσο, φαίνεται πως όταν καταναλώνεται δίαιτα γενικότερα υψηλή σε λίπος, η απαλοιφή των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού CLOCK και BMAL1 συνοδεύεται από σημαντικότερες διαταραχές του μεταβολισμού λιπιδίων σε σχέση με την περίπτωση άθικτων γονιδίων, ενώ οι μεταλλάξεις των PER και CRY (του αρνητικού σκέλους μεταγραφής του συμπλόκου CLOCK και BMAL1) προκαλούν διαφορετικές μεταβολές.

Κεφάλαιο 2: Άρθρα ανασκοπήσεων

Από την ηλεκτρονική αναζήτηση προέκυψαν 189 αποτελέσματα άρθρων ανασκόπησης. Μετά την εφαρμογή των κριτηρίων αποκλεισμού, απομακρύνθηκαν:

- 92 ανασκοπήσεις μελετών κιρκάδιου ρυθμού σε παθήσεις ή φάρμακα
- 35 ανασκοπήσεις μελετών κιρκάδιου ρυθμού χωρίς διερεύνηση του μεταβολισμού λιπιδίων
- 21 ανασκοπήσεις μεταβολισμού λιπιδίων ή σχετικών θεμάτων του μεταβολισμού, χωρίς διερεύνηση του κιρκάδιου ρυθμού
- 18 ανασκοπήσεις κιρκάδιου ρυθμού σε φυτά και έντομα
- 3 ανασκοπήσεις κιρκάδιου ρυθμού χωρίς τη χορήγηση δίαιτας και
- 3 ανασκοπήσεις κιρκάδιου ρυθμού σχετικά με διαιτητική παρέμβαση χωρίς συμμετοχή κορεσμένου λίπους.

Επομένως, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά 17 άρθρα ανασκόπησης σχετικά με την επίδραση του διαιτητικού λίπους στη σύνδεση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και του κιρκάδιου ρυθμού (**Πίνακας 1**). Σε ξεχωριστές στήλες σημειώνονται τα συμπεράσματα για τα κορεσμένα λιπαρά και σε ποιο επίπεδο ρύθμισης του κιρκάδιου ρυθμού έγιναν οι παρατηρήσεις.

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ ΕΤΟΣ	ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ	ΛΙΠΟΣ ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΥΘΜΟ
McCommis KS, Butler AA 2021 (4)	Η επαγωγή γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού στο ήπαρ από ορισμένους διαιτητικούς παράγοντες. Οι διαταραχές του κιρκάδιου ρυθμού που οδηγούν σε παχυσαρκία και λιπώδη διήθηση.	Κορεσμένο λίπος και υψηλή σουκρόζη	Κυριότερο ερέθισμα: κύκλος σίτισης και νηστείας Στα ποντίκια: επέκταση χρονικού παραθύρου σίτισης προκαλεί παχυσαρκία
Lieu et al, 2021 (5)	Οι μεταβολές στα επίπεδα νευροπεπτιδίων από την έκθεση νευρώνων υποθαλάμου στο παλμτικό. Πιθανοί ρόλοι των microRNAs	Παλμτικό	Νευρώνες mHypocE-44, mHypocE-37: αύξηση έκφρασης Bmal1, μείωση έκφρασης Per2 Νευρώνες mHypocE-44: αύξηση πλάτους έκφρασης Npy
Straat et al, 2021 (6)	Οι μηχανισμοί κιρκάδιας ρύθμισης του φαιού λιπώδους ιστού: Συσχέτιση με απαλοιφή γονιδίων κιρκάδιου ρυθμού. Προσαρμογές κατά το γήρας, τη σίτιση εντός παραθύρου και την έκθεση στο ψύχος	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους Χωρίς θερμιδικό περιορισμό	Στα ποντίκια: σίτιση στη διάρκεια της σκοτεινής φάσης οδηγεί σε μικρότερη πρόσληψη βάρους συγκριτικά με ελεύθερη πρόσβαση στην τροφή όλο το 24ωρο

Romani-Perez et al, 2021 (7)	Επιδράσεις των διαιτητικών προτύπων στη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος (δυτικό, χορτοφαγικό, μεσογειακό και συγκεκριμένων αναλογιών σε μακροθρεπτικά συστατικά). Ο ρόλος του άξονα εγκεφάλου- εντέρου.	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους Ενίσχυση διαίτας με κορεσμένο λίπος	Στα ποντίκια: μειωμένη έκκριση των GLP-1, CCK Σε παχύσαρκους ανθρώπους: διαταραχή μεταγευματικής έκκρισης GLP-1, CCK Νευρώνες NPY στα ποντίκια: ελαττωμένη ικανότητα ανίχνευσης του φορτίου γλυκόζης εντός του εντερικού σωλήνα (μηχανισμός μέσω GLP-1)
Martchenko A, Brubaker PL 2021 (8)	Εντερικά και β παγκρεατικά κύτταρα: Διαταραχές κινκάρδιας δραστηριότητας από την πρόσληψη κορεσμένου λίπους	Ενίσχυση διαίτας με κορεσμένο λίπος (κυρίως παλμιτικό) Παλμιτικό	Στα ποντίκια: αύξηση <i>Bilophila wadsworthia</i> , διαταραχή παραγωγής χολικών αλάτων Μελέτες σε κύτταρα ποντικών Εντέρου: stress Ενδοπλασματικού Δικτύου, παραγωγή ελεύθερων ριζών, διαταραχή έκκρισης GLP-1 β παγκρέατος: stress Ενδοπλασματικού Δικτύου, παραγωγή ελεύθερων ριζών, διαταραχή λειτουργίας μιτοχονδρίων και έκκρισης ινσουλίνης
Schmalle V, Lorentz A. 2020 (9)	Οι επιδράσεις του εντερικού μικροβιώματος μέσω υποδοχέων ανοσιακής απόκρισης στην έκφραση γονιδίων του κινκάρδιου ρυθμού του ξενιστή	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Στα ποντίκια: αύξηση Firmicutes, μείωση Bacteroidetes Έκφραση <i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Per2</i> , <i>Cry1</i> : επάγεται στον υποθάλαμο, αναστέλλεται στο ήπαρ Άμβλυση προσαρμογής στον κύκλο φωτός/σκότους
Butler TD, Gibbs JE 2020 (10)	Επιδράσεις του κινκάρδιου ρυθμού του εντερικού μικροβιώματος στην ανοσιακή απόκριση	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Στα ποντίκια: κατάργηση προτύπων σίτισης σε νυχθημερινό κύκλο Πρόσληψη τροφής σε όλο το 24ωρο Κατάργηση νυχθημερινής έκφρασης γονιδίων του μικροβιώματος Εμμένουσα εντερική δυσβίωση
Frazier K, Chang EB 2020 (11)	Σχέση εντερικού μικροβιώματος και κινκάρδιου ρυθμού: Ρόλος των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) και των χολικών οξέων	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Στα ποντίκια: διαταραχή έκφρασης γονιδίων <i>Clock</i> στον υποθάλαμο και το ήπαρ, περιορισμός της εντερικής χλωρίδας σχετιζόμενης με το λεπτό φαινότυπο Κατάργηση κινκάρδιου ρυθμού παραγωγής SCFAs στο έντερο
Oh et al, 2020 (12)	Η ρύθμιση των PPARs στο ήπαρ, τους μύες και το έντερο από την εντερική χλωρίδα	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Στο ήπαρ ποντικών: Επαγωγή του γονιδίου PPARα : οξείδωση λιπαρών οξέων Ενεργοποίηση της AMPK και του PPARγ από SCFAs Προσδέτης για τους υποδοχείς PPARβ και PPARγ
Bohan et al, 2019 (13)	Οι επιδράσεις του εντερικού μικροβιώματος στο μεταβολισμό μέσω SCFAs και LPS	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	SCFAs επάγουν τη μεταγευματική έκκριση GLP1 και PYY σε παχύσαρκους ασθενείς, περιορίζουν τη φλεγμονή στο λιπώδη ιστό Παρουσία LPS: μείωση έκφρασης REV-ERBa στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου
Tse et al, 2018 (14)	Οι επιδράσεις της χορήγησης παλμιτικού σε επίπεδο υποθαλάμου	Παλμιτικό	Σε καλλιέργειες νευρώνων: Διαταραχές επιπέδων ορεξιόγόνου πεπτιδίου NPY στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου Αύξηση επιπέδων mRNA του Npy (μέσω TLR υποδοχέα) Αύξηση έκφρασης γονιδίου <i>Bmal1</i> στους NPY νευρώνες Αύξηση έκφρασης γονιδίου <i>Pomc</i> στους POMC νευρώνες (μηχανισμός ανεξάρτητος από τη φλεγμονή)

			Αύξηση της περιόδου έκφρασης του γονιδίου Nrg Σε ποντίκια: Συσσωρευση παλμιτικού στον υποθάλαμο και αύξηση IL-1β, IL-6, TNF-α, στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά
Engin A 2017 (15)	Οι κirkάδιοι ρυθμοί στην παχυσαρκία Επιδράσεις διαιτητικών συμπεριφορών (θερμιδικός περιορισμός, διαλειμματική νηστεία)	Παλμιτικό	Μετά τις παρεμβάσεις διαπιστώθηκαν: Αύξηση μεταγραφής γονιδίων CLOCK, BMAL1 Μείωση μεταγραφής REV-ERBa, PER2, μέσω AMPK
Young ME 2017 (16)	Επίδραση εξωγενών παραγόντων στους κirkάδιους ρυθμούς των κυττάρων του μυοκαρδίου	Παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία	Αύξηση σύνθεσης τριγλυκεριδίων στο τέλος της ενεργής περιόδου Κυρίως τα μυοκαρδιακά κύτταρα παρουσιάζουν κirkάδιο ρυθμό στο μεταβολισμό γλυκόζης, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κύτταρα στην καρδιά.
Broussard JL, Devkota S 2016 (17)	Αναδρομή μεταβολών στα διαιτητικά πρότυπα και επιρροές στο ανθρώπινο μικροβίωμα	Δίαιτα δυτικού τύπου	Παχυσαρκία: διαταραχή κirkαδιανής ρυθμικότητας εντερικού μικροβιώματος Προκλητό jet lag: εντερική δυσβίωση και διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη στον άνθρωπο και στα ποντίκια
Gooley JJ 2016 (18)	Μηχανισμοί ρύθμισης του μεταβολισμού λιπαρών οξέων που υπόκεινται σε κirkάδια ρύθμιση	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Νυχτόβια ποντίκια: μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους όταν σιτίζονται την ημέρα αντί της νύχτας Ποντίκια υπό HFD: τροποποίηση πλάτους και φάσης έκφρασης ηπατικών ενζύμων, επαγωγή έκφρασης γονιδίων εξαρτώμενων από τους PPARγ
Oosterman JE et al, 2015 (19)	Επιδράσεις της ζάχαρης και του λίπους στους κirkάδιους ρυθμούς	Παλμιτικό Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους	Νευρώνες mHgr-Ε37: αύξηση έκφρασης Bmal1, μετατόπιση φάσης Bmal1, REV-ERBa Στα ποντίκια: δυσχεραίνει την επαναπροσαρμογή στον κύκλο φωτός-σκότους. Μείωση πρωτεϊνών CREB στο ήπαρ (περιφερική και όχι κεντρική δράση) Κατάργηση κirkάδιας διακύμανσης επιπέδων NAD+, διαταραχή λειτουργικότητας SIRT1, διαταραχή μεταγραφικών παραγόντων μεταβολισμού
Bray MS, Young ME 2012 (20)	Εμπλοκή των κirkάδιων ρυθμών στο μεταβολισμό λιπιδίων στους ιστούς	Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους Στην αρχή ή στο τέλος της περιόδου δραστηριότητας	Κirkάδιος ρυθμός μικροσωμιακής πρωτεΐνης μεταφοράς τριγλυκεριδίων (MTP) LPL λιπώδους ιστού: ακολουθεί αντίθετη φάση κirkάδιας δραστηριότητας από την LPL μυών Σίτιση με HFD προς το τέλος της περιόδου δραστηριότητας: δυσλειτουργία β- οξειδωσης και μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους, διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη, περισσότερη υπερλιπιδαιμία, υπερλεπτιναιμία σε σύγκριση με τη σίτιση στην αρχή της περιόδου δραστηριότητας

Πίνακας 1: Άρθρα ανασκοπήσεων

Οι παρατηρήσεις των περισσότερων ανασκοπήσεων βασίζονται σε μελέτες όπου χορηγήθηκε είτε παλμιτικό είτε γενικότερα δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους σε ποντίκια και έπειτα διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού αλλά και σε επίπεδα μεταβολιτών της ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Τα σημαντικότερα ευρήματα που προκύπτουν από τις ανασκοπήσεις για τους πολλαπλούς ρόλους των λιπαρών οξέων σε κάθε επίπεδο ρύθμισης του κερκάδιου ρυθμού έχουν ως εξής:

- Χαρακτηριστικές μεταβολικές διαταραχές σημειώθηκαν όταν το λιπαρό γεύμα δόθηκε στη διάρκεια, προς το τέλος, αλλά και εκτός της περιόδου δραστηριότητας των πειραματόζωνων. Για παράδειγμα, τα πλούσια σε λίπος γεύματα που λαμβάνονται προς το τέλος της περιόδου δραστηριότητας οδηγούν πολύ σύντομα σε μεταβολικές διαταραχές, όπως αύξηση της ινσουλίνης και της λεπτίνης, δυσλειτουργία της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων και αύξηση βάρους. Η σίτιση με λιπαρό γεύμα σε διαφορετική φάση από την περίοδο δραστηριότητας (όπως συνέβη στη σίτιση στη διάρκεια της ημέρας σε νυχτόβια ποντίκια) οδήγησε σε μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους. Επιπλέον, η ελεύθερη πρόσβαση στη λιπαρή τροφή σε όλη τη διάρκεια του 24ώρου προκάλεσε μεγαλύτερη πρόσληψη βάρους από τη σίτιση εντός ορισμένου χρονικού παραθύρου **(4,6, 10, 18, 20)**.
- Η προσαρμογή στο κύκλο φωτός και σκότους διαταράσσεται από τη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους **(9,10,19)**.
- Η μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στους κερκάδιους ρυθμούς διαφορετικών τύπων κυττάρων επηρεάζεται από την πρόσληψη του κορεσμένου λιπαρού οξέος παλμιτικού: στους υποθαλαμικούς νευρώνες mHypocE-44 διαπιστώθηκε αύξηση έκφρασης του Bmal1, μείωση έκφρασης του Per2 και αύξηση του πλάτους έκφρασης του NPY. Στους νευρώνες mHypocE-37 διαπιστώθηκε αύξηση έκφρασης του Bmal1 και μετατόπιση της φάσης των Bmal1 και REV-ERBa. **(5, 19)**. Στους νευρώνες NPY διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης του Bmal1 **(14)**.
- Επίσης, το παλμιτικό φαίνεται να επηρεάζει και την έκφραση γονιδίων των πεπτιδίων που δρουν στον υποθάλαμο, όπως η αύξηση του mRNA και της περιόδου του NPY στον τοξοειδή πυρήνα και η μικρότερου βαθμού αύξηση έκφρασης του POMC στους ομώνυμους νευρώνες **(14)**.

- Στα β-κύτταρα του παγκρέατος το παλμιτικό σχετίζεται με διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης και stress του ενδοπλασματικού δικτύου, παραγωγής ελεύθερων ριζών και διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων. **(8)**.
- Η κirkάδια έκκριση των εντεροενδοκρινικών κυττάρων διαταράσσεται στα ποντίκια που προσλαμβάνουν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος, αλλά και όταν η δίαιτά τους ενισχύεται με κορεσμένο λίπος, όπως φαίνεται στις διαταραχές της έκκρισης GLP-1 και CCK **(7,8)**.
- Κατά την αυξημένη κατανάλωση λίπους από τη δίαιτα παρατηρούνται μεταβολές στο εντερικό μικροβίωμα υπέρ ορισμένων μικροοργανισμών όπως της *Bilophila Wardsworthia* και των *Firmicutes* **(7,9)**, κατάργηση των προτύπων σίτισης σε χρονικά καθορισμένα γεύματα και εμμένουσα εντερική δυσβίωση **(10)**, κατάργηση του κirkάδιου ρυθμού παραγωγής SCFAs και μείωση της ευεργετικής χλωρίδας σχετιζόμενης με λεπτόσωμο φαινότυπο**(11)**. Ως προς τη ρύθμιση γονιδίων του κirkάδιου ρυθμού η παρουσία LPS σχετίστηκε με μειωμένη έκφραση του γονιδίου REV-ERBa στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου **(13)**. Στην περίπτωση παχυσαρκίας κατόπιν κατανάλωσης δίαιτας δυτικού τύπου παρουσιάζεται διαταραχή στην κirkάδια ρυθμικότητα γονιδίων του εντερικού μικροβιώματος **(17)**.
- Η ενεργοποίηση των PPARs θα μπορούσε να αποτελεί σημείο σύνδεσης με τον κirkάδιο ρυθμό: οι PPAR β και γ ενεργοποιούνται από το παλμιτικό και η έκφραση των PPAR γ επάγεται στο ήπαρ στην περίπτωση κατανάλωσης δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας λίπους **(12)**.
- Δράσεις μέσω μονοπατιών φλεγμονής: κατά τη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένο λίπος παρουσιάζονται διαταραχές συμβατές με κατάσταση νευροφλεγμονής στον υποθάλαμο. Προκαλείται αύξηση της διάρκειας περιόδου έκφρασης του γονιδίου για το NPY πεπτίδιο και αύξηση των επιπέδων του mRNA του NPY με μηχανισμό μέσω του toll-like receptor (TLR). Η συσσώρευση παλμιτικού στον υποθάλαμο σχετίζεται με αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6 και TNF-α στα ποντίκια **(14)**.

Συμπερασματικά, η μεταγραφή γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού σε κύτταρα τόσο του κεντρικού ρολογιού (υποθάλαμος) όσο και των περιφερικών ρολογιών (ήπαρ, πάγκρεας, μυοκάρδιο, εντεροενδοκρινή κύτταρα), υπόκειται σε επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επίσης, τα κορεσμένα λιπαρά επηρεάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά του εντερικού μικροβιώματος, όπως την ποικιλότητα των ειδών μικροχλωρίδας και την παραγωγή SCFAs, ενώ στην περίπτωση της παχυσρκίας με εντερική δυσβίωση διαταράσσεται η κικκάδια ρυθμικότητα έκφρασης γονιδίων του μικροβιώματος. Οι διεργασίες νευροφλεγμονής του υποθαλάμου κατέχουν κεντρική θέση στη συμμετοχή των κορεσμένων λιπαρών οξέων στις διαταραχές του κικκάδιου ρυθμού και θα παρουσιαστούν και σε επόμενο κεφάλαιο.

Κεφάλαιο 3: Άρθρα κλινικών δοκιμών

Από την αναζήτηση κλινικών δοκιμών για επιδράσεις της χορήγησης λιπαρών οξέων στον κερκάδιο ρυθμό, διαπιστώθηκαν 252 αποτελέσματα, από τα οποία:

- 16 κλινικές δοκιμές όπου προσδιορίστηκαν μεταβολές δεικτών του κερκάδιου ρυθμού μετά από χορήγηση κάποιου θρεπτικού συστατικού, όπως:
 - γεύμα υψηλό σε κορεσμένα λιπαρά σε 1 κλινική δοκιμή (**Πίνακας 2**) και
 - γεύμα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος σε 3 δοκιμές (**Πίνακας 2**)
 - ακόρεστα λιπαρά σε 4 κλινικές δοκιμές
 - γλυκόζη σε 6 κλινικές δοκιμές
 - φυτικές ίνες σε 1 κλινική δοκιμή
 - καφές και τσάι σε 2 κλινικές δοκιμές
- 2 κλινικές δοκιμές σύγκρισης της επίδρασης των λιπαρών γευμάτων στον κερκάδιο ρυθμό διαβητικών και μη διαβητικών πληθυσμών
- 2 μελέτες σύγκρισης κορεσμένων λιπαρών και υδρογονωμένων φυτικών ελαίων, χωρίς εξέταση δεικτών κερκάδιου ρυθμού
- 31 κλινικές δοκιμές όπου εξεταζόταν ο μεταβολισμός λιπαρών οξέων, χωρίς σύνδεση με τον κερκάδιο ρυθμό
- 183 κλινικές δοκιμές που εξέτασαν επιδράσεις παθήσεων ή χορήγησης φαρμάκων στον κερκάδιο ρυθμό, χωρίς τη χορήγηση λιπαρού γεύματος
- 8 μελέτες σε ασθενείς με ανεπάρκεια μίας ή περισσότερων ορμονών, χωρίς να εξετάζεται η επίδραση λιπιδίων της διατροφής
- 2 μελέτες αντίστασης στην ινσουλίνη και κύκλου ύπνου/εγρήγορσης, χωρίς να εξετάζεται η επίδραση λιπιδίων της διατροφής
- 7 μελέτες σε ζώα και φυτά.

ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ ΕΤΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΕΥΜΑΤΩΝ	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΡΥΘΜΟ
Kessler et al, 2020 (21)	Διασταυρούμενος σχεδιασμός 29 άνδρες (14+15) BMI 27.1, χωρίς διαβήτη, χωρίς βραδινή εργασία	πρωινό HC και απογευματινό HF ή πρωινό HF και απογευματινό HC Κορεσμένα: 14% ΣΗΠ 4 εβδομάδες σε κάθε παρέμβαση	Μεταγευματική αύξηση TGL, DAG, PE: υψηλότερη το πρωί, κυρίως μετά το HF FFAs: χωρίς νυχθημερινή διακύμανση Απογευματινή έκφραση γονιδίων clock στο λιπώδη ιστό: BMAL1 αυξανόταν, PER1, NR1D1 μειωνόταν Επίπεδα ενζύμων σύνθεσης λιπιδίων– FASN χωρίς νυχθημερινή διακύμανση
Lemay et al, 2019 (22)	Διασταυρούμενος σχεδιασμός 62 υγιείς εθελοντές 20 επιπλέον για την RT-PCR	Γεύμα υψηλό σε κορεσμένα λίπη ή Blueberry smoothie και ηλιέλαιο ή Placebo και ηλιέλαιο ή Placebo και DHA (Παρόμοια σύσταση σε κορεσμένα λίπη επί των προσλαμβανόμενων θερμίδων)	Συστάδα 20 γονιδίων κirkάδιου ρυθμού: Υψηλότερα επίπεδα στη νηστεία Ομοιόμορφη μείωση επιπέδων mRNA στις 3 και 6 ώρες μετά το λιπαρό γεύμα
Pivovarova et al, 2015 (23)	29 υγιείς μη παχύσαρκοι εθελοντές φυσιολογική καμπύλη σακχάρου	HCLF 6 εβδομάδων, μετάβαση σε ισοθερμικό LCHF 6 εβδομάδων	Καθυστέρηση νυχτερινού ναδύρ κορτιζόλης σιέλου LCHF σημαντικές επιδράσεις στα PER 1,2,3
Magkos et al, 2014 (24)	8 υγιείς άντρες, χωρίς ΣΔ, BMI 34 Γλυκόζη, ινσουλίνη, ΕΛΟ ανά ώρα Μετά από μία ημέρα ισο- ή υπερθερμιδικής σίτισης	55% υδατάνθρακας, 30% λίπος, 15% πρωτεΐνη 3 κύρια γεύματα= 70% 2 ενδιάμεσα σνακ= 30% στην ισοθερμιδική και επιπλέον 30% στην υπερθερμιδική Καμία διαφοροποίηση ως προς τα κορεσμένα	Μετά την υπερθερμιδική σίτιση: Γλυκόζη και ινσουλίνη στατιστικά υψηλότερες κατά τις νυχτερινές ώρες ΕΛΟ μειωμένα τις νυχτερινές ώρες σε σύγκριση με την ισοθερμιδική

Πίνακας 2 : Άρθρα κλινικών δοκιμών

Στη μελέτη των Kessler και συνεργατών που δημοσιεύτηκε στο Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism το 2020 (21), εφαρμόστηκε λιπιδομική ανάλυση (high throughput shotgun lipidomic analysis). Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των μεταβολικών επιδράσεων από την πρόσληψη υδατανθράκων και λίπους σε διαφορετική ώρα της ημέρας. Συμμετείχαν 29 άνδρες μέσης ηλικίας 45.9 ± 2.5 ετών χωρίς διαβήτη και χωρίς νυχτερινή εργασία, που χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: 14 άτομα κατανάλωναν κατά την πρωινή ζώνη γεύμα υψηλών υδατανθράκων- high carbohydrate (HC) και κατά την απογευματινή ζώνη γεύμα υψηλού λίπους- high fat (HF) για 4 εβδομάδες (HC/HF) , ενώ τα υπόλοιπα 15 άτομα κατανάλωναν τα ίδια γεύματα με την αντίστροφη σειρά (HF/HC) για το ίδιο διάστημα. Μετά από ένα διάστημα ανάπαυλας 4 εβδομάδων (washout) έγινε διασταυρούμενη μελέτη των ομάδων (crossover) όπου η κάθε ομάδα κατανάλωνε τα ίδια γεύματα με αντίστροφη σειρά.

Σημειώνεται η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών: 59.5% επί του λίπους των γευμάτων HC και 63.3% επί του λίπους των γευμάτων HF. Σχετικά με την νυχθημερινή διακύμανση λιπιδίων στον ορό, διαπιστώθηκε πως η μεταγευματική αύξηση των τριγλυκεριδίων (ιδίως οι τριακυλογλυκερόλες με βραχύτερες αλυσίδες και περισσότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα), των διακυλογλυκερολών και των φωσφατιδυλοαιθανολαμινών μετά την κατανάλωση των γευμάτων (κυρίως του HF) ήταν υψηλότερη το πρωί από ότι το απόγευμα, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) δεν παρουσίασαν νυχθημερινή διακύμανση. Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού στον υποδόριο λιπώδη ιστό, διαπιστώθηκε πως η έκφραση του BMAL1 αυξανόταν τις απογευματινές ώρες, ενώ η έκφραση των PER1 και NR1D1 μειωνόταν τις απογευματινές ώρες. Τα επίπεδα ενζύμων σύνθεσης λιπιδίων (όπως της συνθάσης λιπαρών οξέων – FASN) παρουσίαζαν μεγαλύτερη αύξηση μετά από τη δοκιμασία υδατανθράκων σε σύγκριση με τη δοκιμασία λίπους, ωστόσο δε διαπιστώθηκε μοτίβο νυχθημερινής διακύμανσης σε καμία από τις 2 παρεμβάσεις. Διαπιστώθηκαν μεταβολές νυχθημερινών επιπέδων σε αρκετά λιπίδια και αρνητική συσχέτισή τους με την ινσουλινοευαισθησία. Στη συγκεκριμένη μελέτη σημειώνεται η υψηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους και πως η διαφορετική κατανομή υδατανθράκων και λίπους στην πρωινή και την απογευματινή ζώνη ώρας προκάλεσε σημαντικές επιδράσεις σε γονίδια σύνθεσης λιπιδίων, χωρίς νυχθημερινή διακύμανση ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Μετά από ένα μεμονωμένο λιπαρό γεύμα, διαπιστώθηκε ομοιόμορφη μείωση στα επίπεδα mRNA της συστάδας 20 γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού από την ομάδα των Lemay και συνεργατών σε δημοσίευσή τους στο Journal of Nutritional Biochemistry το 2019 (22). Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση μεταβολών μετά την κατανάλωση ορισμένου γεύματος στη μεταγραφή γονιδίων της ανοσιακής απόκρισης, της οξειδωσης και σύνθεσης λιπαρών οξέων, της λειτουργίας μεμβρανών, μιτοχονδρίων, αλλά και των βιολογικών ρυθμών όπως του κικκάδιου ρυθμού. Αξιοποιήθηκε το μεταγράψωμα ολικού αίματος στα επίπεδα νηστείας, στις 3 και στις 6 ώρες μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος σε 62 υγιείς εθελοντές (εναλλάξ: γεύμα υψηλό σε κορεσμένα λιπαρά, ή ηλιέλαιο με Blueberry smoothie, ή placebo με Blueberry smoothie ή placebo με δοκοσαεξανοϊκό οξύ- DHA). Η συγκέντρωση κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν 14.9, 15.4, 15.4 και 14.9 γραμμάρια αντίστοιχα, κυρίως παλμιτικό και στεαρικό.

Στη μελέτη αυτή δεν προσδιορίζονται οι μεταβολές για κάθε γονίδιο της συστάδας του κερκάδιου ρυθμού ξεχωριστά. Επειδή μετρήθηκαν επίπεδα mRNA στο ολικό αίμα, δεν αντικατοπτρίζεται η ενεργοποίηση των clock γονιδίων στους επιμέρους περιφερικούς ιστούς.

Η μελέτη που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism το 2015 από τους Ρίνοναγονα και συνεργάτες **(23)**, διεξήχθη σε 29 υγιείς, μη παχύσαρκους συμμετέχοντες με απουσία διαταραχής μεταβολισμού της γλυκόζης (φυσιολογική καμπύλη σακχάρου). Σκοπός ήταν η εξέταση των μεταβολικών επιδράσεων που φέρει η μετάβαση από ένα διαιτολόγιο υψηλής περιεκτικότητας υδατανθράκων και χαμηλής περιεκτικότητας λίπους (HCLF) διάρκειας έξι εβδομάδων σε ένα ισότιμης θερμιδικής αξίας διαιτολόγιο υψηλής περιεκτικότητας λίπους και χαμηλής περιεκτικότητας υδατανθράκων (LCHF), διάρκειας έξι εβδομάδων. Προσδιορίστηκαν ανθρωπομετρικοί δείκτες και βιοχημικές παραμέτροι των μεταβολικών μονοπατιών φλεγμονής και του μεταβολισμού λιπιδίων. Ως προς τις επιδράσεις στον κερκάδιο ρυθμό, μετρήθηκαν η κορτιζόλη σιέλου και τα επίπεδα έκφρασης δέκα γονιδίων περιφερειακών ρολογιών σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Δημιουργήθηκε μοντέλο πρόβλεψης των τιμών εντός του 24ώρου από τιμές που πάρθηκαν σε τρία καίρια χρονικά σημεία: στις 8 πμ, 11.15 πμ, 3.45 μμ. Μία εβδομάδα μετά τη μετάβαση στο διαιτολόγιο LCHF διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των πρωινών επιπέδων κορτιζόλης σιέλου και καθυστέρηση της έλευσης του νυχτερινού ναδύρ, κατά 1 ώρα και 30 λεπτά την 1η, 1 ώρα και 17 λεπτά την 6η εβδομάδα του διαιτολογίου. Επιπλέον σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές σε γονίδια του κερκάδιου ρυθμού αλλά και σε γονίδια μεταβολισμού λιπιδίων:

-σε γονίδια του κερκάδιου ρυθμού: στο αρχικό διαιτολόγιο και σε όλα πλην του CLOCK διαπιστώθηκαν σημαντικές νυχθημερινές διακυμάνσεις έκφρασης. Τα επίπεδα PER1-3, DBP, TEF, NR1D ήταν υψηλότερα τις πρωινές ώρες, το BMAL1 έδειξε αυξημένη έκφραση στη διάρκεια της ημέρας, ενώ το PER1 παρουσίασε το μεγαλύτερο πλάτος έκφρασης. Κατόπιν μετάβασης στο διαιτολόγιο LCHF διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης αλλά και του πλάτους στις πρωινές και απογευματινές μετρήσεις των PER1, PER2, PER3, TEF και αύξηση του πλάτους και του mesor, χωρίς μεταβολές στην ακρόφαση των PER1,2 και 3.

-σε γονίδια μεταβολισμού λιπιδίων: στο αρχικό διαιτολόγιο, στη διάρκεια της ημέρας, διαπιστώθηκε αύξηση έκφρασης του FASN, των CD180 και IL-10 και μείωση του CPT1A και των

γονιδίων CD14, NFKB1A που σχετίζονται με την απόκριση στους λιποπολυσακχαρίτες- LPS. Κατόπιν μετάβασης σε διαιτολόγιο LCHF, διαπιστώθηκε μείωση του mesor για τις CD14, NFKB1A και αύξηση για τις CD180, και IL1B, χωρίς να αλλάξει η κορύφωση της έκφρασής τους. Καθυστέρηση φάσης διαπιστώθηκε μόνο για την IL-1B στις 6 εβδομάδες HFD. Τα NAMPT, CD14, CD180, IL1B, NFKB1A, CPT1A και FASN στα μονοκύτταρα φάνηκε να ακολουθούν κινκάρδιο ρυθμό.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι ερευνητές προχώρησαν στην αναζήτηση περαιτέρω συσχετίσεων και διαπιστώθηκαν οι εξής σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ έκφρασης γονιδίων κινκάρδιου ρυθμού και μεταβολισμού λιπιδίων: CRY2 και TEF με τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, CRY2, PER1, PER3 με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, CRY2, DBP, PER1, TEF με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων, CLOCK, CRY1, DBP, PER1 με τα επίπεδα TNF στον ορό, CLOCK, CRY1/2, DBP, NR1D1, PER3, TEF με κυτταροκίνες και γονίδια οξειδωσης λίπους (IDH3A, CPT1A). Επίσης διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση επιπέδων κορτιζόλης με την έκφραση των IDH3A και LPL. Στη συγκεκριμένη μελέτη απουσίαζε η διευκρίνιση του είδους και της ποιότητας των προσλαμβανόμενων λιπαρών οξέων, όπως και ο διαχωρισμός κορεσμένων και trans λιπαρών. Επίσης, οι παρατηρήσεις βασίστηκαν στις επιπτώσεις της μετάβασης από ορισμένο διαιτολόγιο σε άλλο. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η εξαγωγή συμπερασμάτων από τη μακροχρόνια τήρηση διαιτολογίου υψηλού σε κορεσμένα λιπαρά, που προσομοιάζει στη δυτικού τύπου διαίτα. Η συγκεκριμένη είναι η πρώτη μελέτη που ασχολείται με τις μεταβολές τόσο σε κεντρικά όσο και περιφερικά ρολόγια μετά την εισαγωγή διαιτολογίου με υψηλή περιεκτικότητα λίπους σε ανθρώπους. Διαπιστώθηκε πως η συγκεκριμένη διαιτητική τροποποίηση οδήγησε σε μεταβολές του mesor και του πλάτους έκφρασης γονιδίων clock, χωρίς αντίστοιχες μεταβολές της κορύφωσης της έκφρασής τους. Ενδεχομένως να ευθύνεται για αποσυγχρονισμό του κεντρικού ρολογιού του υπερχιασματικού πυρήνα του υποθαλάμου από τα περιφερειακά ρολόγια, όπως στηρίζουν δεδομένα από μελέτες σε σίτιση εντός ορισμένου χρονικού παραθύρου (25).

Στη μελέτη των Magkos και συνεργατών, που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Obesity το 2014 διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο πλάσμα υπέρβαρων αντρών

κατά τις νυχτερινές ώρες, χωρίς αντίστοιχη αύξηση των ημερήσιων τιμών, μετά από μία ημέρα υπερθερμιδικής πρόσληψης τροφής **(24)**. Στη μελέτη συμμετείχαν 8 υπέρβαροι και παχύσαρκοι άντρες μέσης ηλικίας 38 ετών και BMI 34 ± 2 kg/m² που δεν έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη και απείχαν από συστηματική άσκηση. Οι μετρήσεις έγιναν μετά από μία ημέρα ισοθερμιδικής και μετά από μία ημέρα υπερθερμιδικής (αυξημένης κατά 30%) πρόσληψης γευμάτων, με τελευταίο γεύμα στις 6-7 μμ. Τα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και ελεύθερων λιπαρών οξέων προσδιορίζονταν ανά ώρα στη διάρκεια του 24ώρου, συμπεριλαμβανομένης της νυχτερινής κατάκλισης. Διαπιστώθηκε πως τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τις νυχτερινές ώρες μετά από μία ημέρα υπερθερμιδικής σίτισης, χωρίς αντίστοιχη αύξηση των τιμών στη διάρκεια της ημέρας. Τα νυχτερινά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων μετά την ημέρα υπερθερμιδικής σίτισης ήταν μειωμένα σε σύγκριση με τα επίπεδα μετά την ημέρα ισοθερμιδικής σίτισης. Με αυτόν τον τρόπο η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε πως η αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη που παρατηρείται οξέως μετά από μία μόνο ημέρα υπερθερμιδικής πρόσληψης τροφής δε σχετίζεται με τα νυχτερινά επίπεδα λιπαρών οξέων πλάσματος και πως η γλυκόζη και η ινσουλίνη παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τις νυχτερινές ώρες, αναθεωρώντας τα ευρήματα από προηγούμενες κλινικές μελέτες που βασίζονται σε μετρήσεις πρωινών ωρών σε κατάσταση νηστείας (όπως συμβαίνει με τον υπολογισμό του δείκτη HOMA-IR).

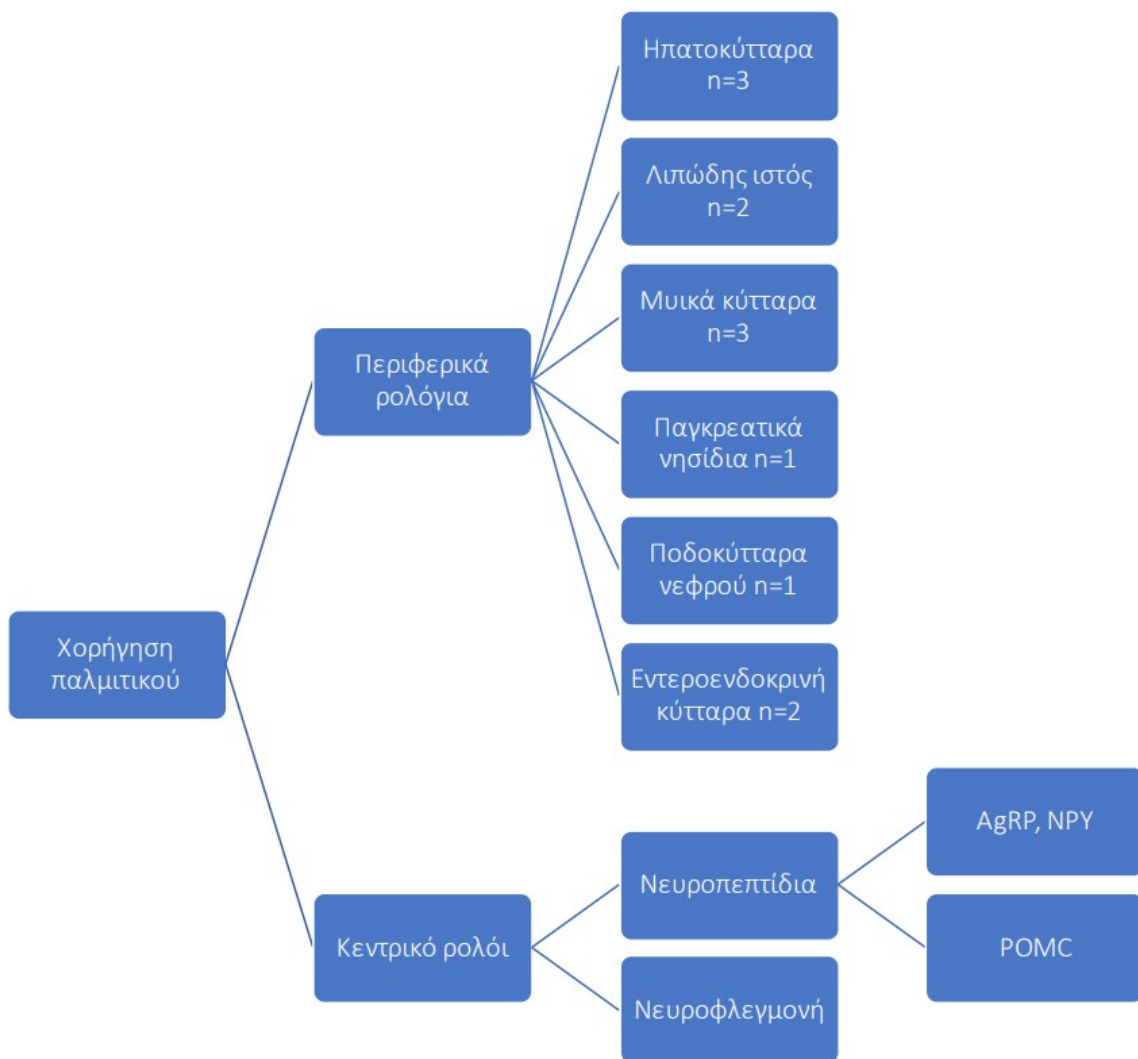
Εκτός από τις προηγούμενες μελέτες, αξίζει να αναφερθεί μία κλινική δοκιμή σε ανθρώπους που διαπίστωσε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ υψηλής περιεκτικότητας λίπους στο διαιτολόγιο (χωρίς αμιγή χορήγηση κορεσμένων) και έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Δημοσιεύτηκε το 2012 στο *Chronobiology International* από τους Milagro και συνεργάτες **(26)**. Διαπιστώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της απώλειας βάρους και της κατάστασης της μεθυλίωσης στα γονίδια CLOCK, BMAL1, PER2 σε 60 νορμοβαρείς, υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες που ακολούθησαν πρόγραμμα απώλειας βάρους διάρκειας 16 εβδομάδων. Διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης των θέσεων CpG 1 και 8 του γονιδίου CLOCK και της πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Μάλιστα, η μεθυλίωση των CLOCK και PER2 προτάθηκε από τους ερευνητές ως προγνωστικός δείκτης επιτυχούς απώλειας βάρους. Ωστόσο, δεν αναδείχτηκε κάποια συσχέτιση των μεταβολών αυτών με την πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών.

Κεφάλαιο 4: Μελέτη κούρτης

Στη μελέτη των Dashti και συνεργατών **(27)** διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας του ύπνου και της χαμηλότερης πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων στην ηλικιακή ομάδα 20-64 ετών. Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν τα δεδομένα από 9 μεγάλες επιδημιολογικές καρδιομεταβολικές μελέτες κούρτης- Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium ως προς τη διάρκεια του ύπνου και τις διατροφικές συνήθειες 14.906 συμμετεχόντων Ευρωπαϊκής καταγωγής. Σε υποανάλυση διαστρωμάτωσης κατά ηλικιακή ομάδα και φύλο, διαπιστώθηκε πως η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν χαμηλότερη κατά 0.11% στους άντρες 20-64 ετών ($P = 0.03$) και χαμηλότερη κατά 0.10% στις γυναίκες 20-64 ετών ($P = 0.04$) για κάθε επιπλέον ώρα ύπνου. Στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, η μεγαλύτερη διάρκεια ύπνου συσχετίστηκε με μικρότερη πρόσληψη υδατανθράκων και μεγαλύτερη πρόσληψη λιπαρών οξέων κυρίως από πηγές πολυακόρεστων (PUFAs). Στη συγκεκριμένη μελέτη διαπιστώνεται συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών από τη δίαιτα και της διάρκειας του ύπνου, ωστόσο μένει να διευκρινιστεί η αιτιολογική σχέση, δηλαδή αν η έκθεση σε κορεσμένα λιπαρά επηρεάζει τη διάρκεια του ύπνου ή αν η μικρότερη διάρκεια ύπνου αυξάνει την προτίμηση για φαγητά με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λίπη.

Κεφάλαιο 5: Πρωτότυπες ερευνητικές εργασίες

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάζονται τα ευρήματα ερευνητικών μελετών σε πειραματόζωα ή σε κύτταρα που απομονώθηκαν από ανθρώπους. Χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο λίπος στη σίτιση των πειραματόζωων για τη μελέτη επιδράσεων στον κερκάδιο ρυθμό (in vivo). Στις in vitro παρατηρήσεις, έγινε επώαση των κυττάρων συγκεκριμένης σειράς από κυτταροκαλλιέργειες νευρώνων υποθαλάμου ή περιφερειακού ιστού με παρατηρήσεις επακόλουθων μεταβολών σε πολλαπλά επίπεδα του κερκάδιου ρυθμού. Τα ευρήματα ταξινομούνται ανά ιστό, όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα.



Πίνακας 3: Αποτελέσματα πρωτότυπων ερευνητικών εργασιών

5.1 Ηπατοκύτταρα

Το ήπαρ αποτελεί κομβικό σημείο του μεταβολισμού των λιπών και η διαταραχή της έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού παρατηρείται σε μεταβολικές παθήσεις όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η λιπώδης διήθηση του ήπατος. Πολυάριθμες μελέτες σε τρωκτικά ανέδειξαν τη διαταραχή των γονιδίων κικκάδιου ρυθμού των ηπατοκυττάρων μετά την κατανάλωση δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας λίπους (high fat diet). Στη μελέτη των Hsieh και συνεργατών **(28)** η δίαιτα αυτή χορηγήθηκε για έντεκα μήνες και οδήγησε σε διαταραχή έκφρασης γονιδίων clock στο ήπαρ και το νεφρό αρσενικών οντικών C57BL/6. Στη μελέτη των Kohsaka και συνεργατών στην ίδια κυτταρική σειρά φάνηκε διαταραχή των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού στο ήπαρ αλλά και σε άλλους ιστούς μετά τη χρήση της συγκεκριμένης δίαιτας για μόλις έξι εβδομάδες **(29)**. Όταν όμως εξετάστηκαν θηλυκά ποντίκια της ίδιας σειράς, δε σημειώθηκαν οι αναμενόμενες μεταβολές, όπως έδειξε η μελέτη των Yanagihara και συνεργατών **(30)**. Οι μηχανισμοί προσαρμογής των ηπατοκυττάρων στη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους διερευνήθηκαν στη μελέτη των Eckel-Mahan και συνεργατών **(31)**. Η μετανάστευση του συμπλόκου CLOCK- BMAL1 δεν επηρεάστηκε, ωστόσο περιορίστηκε η στρατολόγηση της χρωματίνης για ορισμένα γονίδια που φυσιολογικά παρουσιάζουν κικκάδιο ρυθμό, προκαλώντας κατάργηση της νυχθημερινής διακύμανσης στην έκφρασή τους. Αντίθετα, η φυσιολογικά μη κικκάδια έκφραση άλλων παραγόντων, όπως του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ , φάνηκε να προσαρμόζεται σε μοτίβα κικκάδιου ρυθμού, μάλιστα σε μόλις τρεις ημέρες από την έναρξη της κατανάλωσης δίαιτας υψηλού λίπους. Η συγκεκριμένη δίαιτα προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη και παχυσαρκία. Συνεπώς, έμενε να αποσαφηνιστεί αν οι διαταραχές του κικκάδιου ρυθμού οφείλονται στην κατανάλωση του λίπους (και συγκεκριμένα από ποιο συστατικό) ή αν αποτελούν επιπλοκή της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη. Ακολούθησαν ερευνητικές εργασίες με τη χρήση του παλμιτικού, το οποίο αποτελεί κύριο συστατικό του κορεσμένου λίπους. Χορηγήθηκε σε χαμηλές δόσεις ώστε να διευκρινιστούν οι καθαρές δράσεις του στον κικκάδιο ρυθμό, χωρίς να προκαλείται παχυσαρκία στα πειραματόζωα.

Στη μελέτη των Tong και συνεργατών που δημοσιεύτηκε στο PloS One το 2015 χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια C57BL/6 ηλικίας 10 εβδομάδων για τις παρατηρήσεις *in vivo* και Hepa1c1c-7 (Hepa1) mouse hepatoma cells για τις παρατηρήσεις σε κυτταροκαλλιέργειες **(32)**. Σε αυτά δοκιμάστηκαν διαφορετικές δόσεις παλμιτικού: καθώς οι υψηλότερες δόσεις οδηγούσαν σε τοξικότητα και απόπτωση των κυττάρων, ελέγχθηκαν και οι χαμηλότερες προκειμένου να διευκρινιστούν οι επιδράσεις του στα ηπατοκύτταρα. Η χαμηλή δόση των 50-100 μM στις κυτταροκαλλιέργειες Hepa1 οδηγούσε σε αναστολή δραστηριότητας λουσιφεράσης Per2 (Per2-luc) και μείωση της διακύμανσης στην έκφραση των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού DBP, NR1D1 και PER2. Η διακύμανση έκφρασης του BMAL1 έδειξε να περιορίζεται από το παλμιτικό, όπως και η μεταγραφή του συμπλόκου CLOCK-BMAL1, ωστόσο η μετανάστευσή του στον πυρήνα δεν επηρεάστηκε. Εκτός από τις πολύτιμες πληροφορίες για τα γονίδια που επηρεάζονται από τη χορήγηση παλμιτικού στα ηπατοκύτταρα, η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε την πρωτεΐνη SIRT1 ως κύριο ενδιάμεσο στόχο στον έλεγχο της δραστηριότητας του συμπλόκου CLOCK-BMAL1. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση ειδικών ενεργοποιητών της SIRT1 (CAY 10591 και ρεσβερατρόλη) ανέστρεψε την κατασταλτική δράση του παλμιτικού στα γονίδια του κικκάδιου ρυθμού. Αντίθετα, η χρήση αναστολέων της SIRT1 μέσω EX527 ή FK866 οδήγησε σε αποσύνδεση του συμπλόκου CLOCK-BMAL1 και αναστολή της δραστηριότητας Per2-λουσιφεράσης (Per2-luc). Επομένως, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη έρευνα, οι χαμηλές δόσεις παλμιτικού είναι ικανές να επιδράσουν τη δραστηριότητα του ετεροδιμερούς CLOCK-BMAL1 και να περιορίσουν τη μεταγραφή ρυθμιστικών γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού στα ηπατοκύτταρα μέσω επιδράσεων στη SIRT1 .

Το 2019 δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Cellular and molecular life sciences η εργασία των Tai και συνεργατών **(33)**. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια C57BL/6 που αρχικά εκτέθηκαν σε συνθήκες 12ωρου φωτός και 12ώρου σκότους με ελεύθερη πρόσληψη τροφής για 2 εβδομάδες. Έπειτα για τρεις εβδομάδες τρέφονταν με φοινικέλαιο ή με ελαιόλαδο ή με σογιέλαιο (ομάδα ελέγχου). Τα επίπεδα της AMPK, της καρβοξυλάσης ακετυλο-συνενζύμου A (ACC), της κινάσης P70S6K και της SIRT1, καθώς και τα επίπεδα mRNA των γονιδίων CLOCK, BMAL1, PER1 και CRY1 των ηπατοκυττάρων προσδιορίστηκαν σε 6 χρονικά σημεία του 24ώρου (παρατηρήσεις *in vivo*). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές δόσεις παλμιτικού και ελαϊκού

(50 μ M), τα κυριότερα συστατικά του φοινικέλαιου και του ελαιόλαδου αντίστοιχα, σε κυτταρική σειρά ήπατος ποντικού AML-12, προκειμένου να ελεγχθεί αν οι επιδράσεις οφείλονται σε αυτά τα συστατικά ή στα έλαια γενικότερα (παρατηρήσεις από κυτταροκαλλιέργειες). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι χαμηλές δόσεις παλμιτικού δεν προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου και την έκφραση της πρωτεΐνης BMAL1 in vivo. Στις κυτταροκαλλιέργειες, οι μικρές δόσεις ελαϊκού ήταν ικανές να οδηγήσουν σε ώθηση της φάσης έκφρασης και των 4 γονιδίων, ενώ το παλμιτικό (50 μ M) οδήγησε σε καθυστέρηση φάσης έκφρασης των BMAL1, PER1 και CRY1. Σε απουσία έκθεσης σε λιπαρά οξέα, η υπερέκφραση του BMAL1 τροποποίησε τη συσσώρευση λιπαρών οξέων και σχετίστηκε με αύξηση κατά 5.4% στο ελαϊκό (χωρίς όμως να μεταβληθεί το συνολικό περιεχόμενο σε πολυακόρεστα λιπαρά) και κατά 3.3% μείωση στο περιεχόμενο σε κορεσμένα λιπαρά, ενώ αυξήθηκε η έκφραση γονιδίων οξειδωσης λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια, γεγονός που καταργήθηκε όταν τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν στο παλμιτικό. Η ακετυλίωση που απαιτείται για την ενεργοποίηση του BMAL1 περιορίστηκε σημαντικά από το παλμιτικό, όχι από το ελαϊκό, μέσω μείωσης της έκφρασης SIRT1. Επιπλέον, το παλμιτικό περιόρισε την ενεργοποίηση του BMAL1 μέσω μείωσης της έκφρασης του PER2 (που το ενεργοποιεί) και αύξηση της έκφρασης του REV-ERB α (που το αναστέλλει). Τα κυριότερα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης τονίζουν πως η απουσία έκθεσης σε λιπαρά οξέα ευνοεί την υπερέκφραση του BMAL1 και μειώνει τη συσσώρευση λιπιδίων, επιδράσεις που όμως καταργούνται όταν τα ηπατοκύτταρα εκτεθούν στο παλμιτικό και μάλιστα σε επίπεδα χαμηλών δόσεων που δε σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την παχυσαρκία, ενώ στην περίπτωση χορήγησης ελαϊκού η σχέση CLOCK-BMAL1 ευνοεί την οξείδωση λιπαρών οξέων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η προσθήκη παλμιτικού σε κυτταροκαλλιέργειες ήπατος ποντικών οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των γονιδίων CLOCK και BMAL1. Η διαταραχή αυτή δύναται να αναστραφεί με τη χορήγηση άλλων συστατικών, όμως διαπιστώθηκε από ορισμένες εργασίες. Το κιχορικό οξύ **(34)**, η ρεσβερατρόλη **(35)** και η νομπιλετίνη των εσπεριδοειδών **(36)** άσκησαν ευεργετικές επιδράσεις στη λειτουργία του BMAL1 σε ηπατικά κύτταρα ποντικών που είχαν υποστεί διαταραχή του κερκάδιου ρυθμού τους κατόπιν έκθεσης στο παλμιτικό. Αντίστοιχα, ποντίκια που εκτέθηκαν σε δίαιτα υψηλή σε κορεσμένο λίπος και

κυτταροκαλλιέργειες ηπατοκυττάρων ποντικών HepG2 που εκτέθηκαν σε παλμιτικό (300 μμοΙ/L), έδειξαν βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη, της ηπατικής στεάτωσης και των δεικτών stress ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) μετά τη χορήγηση μελατονίνης, που είναι γνωστή για τη ρύθμιση του κύκλου ύπνου-εγρήγορσης (37). Αν και το παλμιτικό χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την πρόκληση αντίστασης στην ινσουλίνη και παχυσαρκίας, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μονο-και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα παρατηρούνται διαφορετικές αποκρίσεις στο ήπαρ από τα υπόλοιπα όργανα, όπως π.χ. στο έντερο. Την απάντηση των περιφερικών ρολογιών του ήπατος και του εντέρου ποντικών C57BL/6 στην κετογονική δίαιτα μελέτησε η εργασία των Tognini και συνεργατών (38). Η δίαιτα περιείχε 24% κορεσμένα λιπαρά, 37% μονοακόρεστα και 39% πολυακόρεστα λιπαρά, επαρκή πρόσληψη πρωτεΐνης και καθόλου πρόσληψη υδατανθράκων για 4 εβδομάδες. Η φάση και το πλάτος έκφρασης των γονιδίων BMAL1, PER2, CRY1 και REV-ERB παρέμεινε ίδια και στους δυο ιστούς. Στο ήπαρ σημειώθηκε αύξηση του πλάτους των γονιδίων DBP, NAMPT και PNPLA2, μέσω ενεργοποίησης της χρωματίνης του BMAL1 και της πρόσδεσής της στα E-box των προαναφερθέντων γονιδίων. Οι μεταβολές αυτές δεν παρατηρήθηκαν στο έντερο, αλλά ούτε και στο ήπαρ των ποντικών με έλλειψη γονιδίων Clock που έλαβαν κετογονική δίαιτα, άρα η παρουσία ακέραιων γενετικών μηχανισμών ρολογιού στο ήπαρ είναι απαραίτητη για να ασκηθούν οι παραπάνω επιδράσεις της κετογονικής δίαιτας. Στο έντερο ενισχύθηκε η νυχθημερινή διακύμανση έκφρασης του PPARα και των γονιδίων στόχων του: ακολούθησε τη νυχθημερινή διακύμανση των επιπέδων του β-υδροξυβουτυρικού στον ορό και δεν παρατηρήθηκε στο ήπαρ. Επιπλέον, στον ορό του εντέρου φάνηκε σημαντική επίδραση διακύμανσης επιπέδων του β-υδροξυβουτυρικού στη λειτουργία αποακετυλάσης των ιστονών. Την τελευταία εβδομάδα του προγράμματος προστέθηκε είτε σουκρόζη είτε φρουκτόζη στη δίαιτα ορισμένων ποντικών. Φάνηκε άμεση και σημαντική αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων στο έντερο, ενώ το ήπαρ δεν έδειξε αντίστοιχη μεταβολή. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η απόκριση των επιμέρους περιφερικών ρολογιών στο ίδιο διαιτολόγιο μπορεί να είναι μοναδική για τον κάθε ιστό και να εκδηλώνεται σε διαφορετικό χρόνο.

Συμπερασματικά, από τις παραπάνω μελέτες σε κύτταρα ήπατος ποντικών που εκτέθηκαν στο παλμιτικό φαίνεται πως ακόμα και σε χαμηλές δόσεις του κορεσμένου αυτού λιπαρού οξέος

προκαλείται μείωση της δραστηριότητας του συμπλέγματος CLOCK-BMAL1 και μείωση της μεταγραφής του BMAL1 με επακόλουθη διαταραχή της κirkάδιας έκκρισης γονιδίων του ηπατικού μεταβολισμού, η οποία όμως μπορεί να αναστραφεί με χρήση κάποιων ενώσεων (π.χ. ρεσβερατρόλη). Μένει να διευκρινιστεί πώς οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί μπορούν να αξιοποιηθούν για την αντιμετώπιση μεταβολικής νόσου στον άνθρωπο.

5.2 Λιπώδης ιστός

Σε αντιστοιχία με τη μελέτη επιδράσεων χαμηλών δόσεων παλμιτικού στο περιφερικό ρολόι του ήπατος (33), η ερευνητική ομάδα των Tai και συνεργατών δημοσίευσε το 2019 στο περιοδικό *Adipocyte* τη μελέτη τους για τις επιδράσεις μίας χαμηλής δόσης παλμιτικού (50μM) στα λιποκύτταρα των ποντικών και σε καλλιέργειες προ-λιποκυττάρων (39). Χρησιμοποίησαν αρσενικά ποντίκια C57BL/6 που αρχικά εκτέθηκαν σε συνθήκες 12ωρου φωτός και 12ώρου σκότους με ελεύθερη πρόσληψη τροφής. Έπειτα για τρεις εβδομάδες τρέφονταν με φοινικέλαιο ή με ελαιόλαδο ή με σογιέλαιο (ομάδα ελέγχου) για τις *in vivo* παρατηρήσεις. Παράλληλα χρησιμοποίησαν και προ-λιποκύτταρα της σειράς 3L-T1 για τις *in vitro* παρατηρήσεις. Μετά τη χορήγηση παλμιτικού δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση λίπους ούτε στα κύτταρα λευκού λιπώδους ιστού των ποντικών, ούτε στα προ-λιποκύτταρα των καλλιεργειών. Εντούτοις, μετά τη χορήγηση παλμιτικού αυξήθηκε το πλάτος έκφρασης των γονιδίων CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1, PER2 και RORα, ενώ δεν παρουσιάστηκε μεταβολή μετά τη χορήγηση ελαϊκού, ούτε και στην ομάδα ελέγχου. Τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA μετά από 24ώρες από την έκθεση στο παλμιτικό ήταν αυξημένα για το BMAL1 και μειωμένα για όλα τα υπόλοιπα γονίδια, αντανακλώντας τη διαταραχή του κirkάδιου ρυθμού. Στην ίδια μελέτη η χορήγηση παλμιτικού σχετίστηκε με αύξηση της λιπογένεσης (όπως έδειξε η αύξηση παραγωγής PPARγ, CEBPA και μείωση παραγωγής FABP4) και με μείωση της δραστηριότητας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο και της παραγωγής ATP (όπως έδειξε η μείωση της παραγωγής των αντίστοιχων μιτοχονδριακών γονιδίων COX5B, ATPase B2, NDUFA2 και ND5). Επίσης, σχετίστηκε με ενεργοποίηση της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA (ACC), βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και επακόλουθη φωσφορυλίωση του BMAL1, με την έκφραση γονιδίων clock με υψηλότερο πλάτος και καταργημένη νυχθημερινή διακύμανση. Στον αντίποδα, η χορήγηση ελαϊκού οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής ATP και ενεργοποίηση της

AMPK. Το σπουδαιότερο σημείο της μελέτης ήταν πως οι χαμηλές δόσεις παλμιτικού μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχή της έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού στο λιπώδη ιστό, αλλά και στην ενεργοποίηση βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων.

Στην εργασία που δημοσίευσαν το 2016 στο *EbioMedicine*, οι Kim και συνεργάτες χρησιμοποίησαν το παλμιτικό (ως προφλεγμονώδες) και το δοκοσαεξανοϊκό (DHA- ως αντιφλεγμονώδες) σε ινοβλάστες και σε λιποκύτταρα διαφοροποιημένα από ινοβλάστες προκειμένου να εξετάσουν τις επιδράσεις τους στον κικκάδιο ρυθμό των περιφερικών ρολογιών και το αν οι επιδράσεις αυτές αναστρέφονται από την αναστολή μονοπατιών της φλεγμονής (40). Μετά τη χορήγηση παλμιτικού διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές της φάσης έκφρασης του BMAL1, το ζενίθ της οποίας εμφανίστηκε τη 12η ώρα στους ινοβλάστες και την 6η ώρα στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. Δε σημειώθηκαν αντίστοιχες μεταβολές μετά τη χορήγηση DHA. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι διαταραχές του κικκάδιου ρυθμού που προκαλεί το παλμιτικό είναι μοναδικές για κάθε τύπο κυττάρου. Όταν τα ίδια κύτταρα παράλληλα με το παλμιτικό εκτέθηκαν σε AICAR (ενεργοποιητής της AMPK) ή σε καρδαμονίνη (αναστολέας του NF-κΒ, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες), διαπιστώθηκε απουσία των μεταβολών φάσης και του ζενίθ της 12ης ώρας. Άρα, η παρουσία αντιφλεγμονωδών ουσιών δύναται να αναστρέψει τις διαταραχές που προκαλεί το παλμιτικό στην έκφραση του BMAL1. Ο ρόλος της φλεγμονής ως μεσολαβητή σε αυτή τη δράση του παλμιτικού επιβεβαιώθηκε όταν οι ερευνητές διαπίστωσαν προόδους στις φάσεις έκφρασης του BMAL1 με τη χορήγηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNFα και IL-6. Οι μεταβολές αυτές περιορίστηκαν σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι του TNFα και της IL-6. Αξίζει να σημειωθεί πως οι συγκεντρώσεις παλμιτικού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν 150 μM για την επώαση και 250 μM για τις άμεσες παρατηρήσεις μετά τη χορήγηση του, μεγαλύτερες από ότι στις προαναφερθείσες μελέτες. Επιπλέον, δε χρησιμοποιήθηκαν ώριμα λιποκύτταρα, αλλά έγινε προκλητή διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε λιποκύτταρα, με την παραδοχή ότι εμφανίζουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες με τα ώριμα λιποκύτταρα.

Τέλος, ο κικκάδιος ρυθμός του λιπώδους ιστού επηρεάζεται σημαντικά και από την απώλεια βάρους, όπως φάνηκε από τη μελέτη των Ρίνοναγονα και συνεργατών **(41)**. Συμμετείχαν 50 υπέρβαροι εθελοντές που τήρησαν υποθερμιδική δίαιτα 800kcal για 8 εβδομάδες, με μέση απώλεια βάρους περίπου στο 8% του αρχικού. Δέκα γονίδια του κικκάδιου ρυθμού προσδιορίστηκαν σε δείγματα υποδόριου λίπους. Μετά την απώλεια βάρους αυξήθηκε η έκφραση των PER2 και NR1D1. Επιπλέον, διαπιστώθηκαν σημαντικές επιμέρους συσχετίσεις της έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού με γονίδια αδιποκινών, του μεταβολισμού λιπιδίων και της φλεγμονής. Από τα παραπάνω φαίνεται πως στο λιπώδη ιστό οι μικρές δόσεις παλμιτικού είναι ικανές να διαταράξουν την έκφραση γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού και να οδηγήσουν σε βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και η διαδικασία αυτή ευνοείται από τη φλεγμονή και αναστέλλεται από ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση.

5.3 Μυικά κύτταρα

Η μελέτη των Parsanathan και Jain που δημοσιεύτηκε το 2019 εξέτασε την έκφραση γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού και δείκτες οξειδωτικού stress σε μυικά κύτταρα ποντικών **(42)**. Για τις in vivo παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια C57BL/6J, αρσενικά, ηλικίας 5 εβδομάδων, που τρέφονταν είτε με δίαιτα υψηλού λίπους (42% θερμιδικής πρόσληψης) είτε με κανονική δίαιτα (ποσοστό λίπους: 5.2% θερμιδικής πρόσληψης) για 16 εβδομάδες. Τα δείγματα μυός λαμβάνονταν από το γαστροκνήμιο. Στις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν μυοβλάστες ποντικού C2C που διαφοροποιήθηκαν σε μυικά κύτταρα και έπειτα εκτέθηκαν είτε σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης είτε σε παλμιτικό (600μM). Μετά τις 16 εβδομάδες δίαιτας υψηλού λίπους, η έκφραση γονιδίων κικκάδιου ρυθμού CLOCK, BMAL1, PER2, CRY2, RORα και των PPARγ και PGC-1α περιορίστηκε σημαντικά, όπως επιβεβαιώθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες. Ταυτόχρονα, μειώθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης. Έγινε έγχυση TNF, σε συνθήκες παρόμοιες με τη χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού στο μεταβολικό σύνδρομο. Εκεί διαπιστώθηκαν μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και αυξημένα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού stress, με αύξηση της έκφρασης του REV-ERBα. Επίσης, τα επίπεδα mRNA των CLOCK, BMAL1, PPARγ και PGC-1α, μειώθηκαν στην περίπτωση απαλοιφής του γονιδίου γλουταθειόνης, αποδεικνύοντας συνδέσεις μεταξύ του συστήματος της γλουταθειόνης, της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των

μυικών κυττάρων και της έκφρασης γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού. Ως προς τη χορήγηση παλμιτικού, οι μεταβολές που προκάλεσε στα γονίδια clock των μυικών κυττάρων διαπιστώθηκαν σε συνθήκες παχυσαρκίας και φλεγμονής στη συγκεκριμένη μελέτη, οπότε μένει να διευκρινιστεί αν οι διαταραχές αυτές μπορούν να προκληθούν από χαμηλότερες δόσεις παλμιτικού.

Για τις διαταραχές που προκαλούνται στην έκφραση γονιδίων κικκάδιου ρυθμού των μυικών κυττάρων από το παλμιτικό, υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα και από ερευνητικές εργασίες σε ανθρώπους. Στη μελέτη των Budai και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2019 στο *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, εξετάστηκαν τα μυικά κύτταρα από 10 παχύσαρκους άντρες με διαπιστωμένη αντίσταση στην ινσουλίνη (43). Οι συμμετέχοντες διαχωρίστηκαν σε ομάδες με βάση το είδος λίπους που κατανάλωσαν στο γεύμα (κορεσμένα, μονο ή πολυακόρεστα) με διασταυρούμενο σχεδιασμό. Προέκυψαν 56 δείγματα βιοψιών μυός τα οποία απομονώθηκαν 4 ώρες μετά την κατανάλωση του λιπαρού αυτού γεύματος. Έπειτα αναλύθηκαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (protein-protein interaction) και το μεταγράφημα σε 13 γονίδια κικκάδιου ρυθμού, μεταξύ cluster γονιδίων φλεγμονής και μεταβολισμού. Η έκφραση των PER1, PER3, REV-ERBa και β στα μυικά κύτταρα μειώθηκε στις τέσσερις ώρες μετά το λιπαρό γεύμα και των BMAL1 και CLOCK αυξήθηκε, ανεξάρτητα από το είδος των χορηγούμενων λιπαρών. Στην περίπτωση χορήγησης κορεσμένων οι διαταραχές παρατηρούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη χορήγηση μονο- ή πολυακόρεστων λιπών. Οι ερευνητές προχώρησαν σε συσχετίσεις: μεταξύ του βαθμού κορεσμού των δεσμών στις ανθρακικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων και των διαταραχών των γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού, αλλά και έκτασης της φλεγμονής και του οξειδωτικού stress.

Στη μελέτη των Sardon Puig και συνεργατών που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* το 2019 χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από βιοψία μυός πριν και έξι μήνες μετά από χειρουργική επέμβαση γαστρικής παράκαμψης (Roux-en-Y gastric bypass) 18 παχύσαρκων αντρών και 5 γυναικών (έναντι αντίστοιχα 8 και 6 νορμοβαρών ίδιου φύλου). Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ανθρώπινων μυοβλαστών που

επώαστηκαν είτε σε παλμιτικό είτε σε ελαϊκό **(44)**. Διαπιστώθηκε πως στις παχύσαρκες γυναίκες τα επίπεδα mRNA του CRY1 ήταν υψηλότερα και του DBP χαμηλότερα σε σχέση με τις νορμοβαρείς γυναίκες, όμως αποκαταστάθηκαν στους έξι μήνες μετά το χειρουργείο και την απώλεια βάρους. Στους παχύσαρκους άντρες, τα επίπεδα mRNA των CLOCK, CRY1, CRY2 και DBP ήταν χαμηλότερα. Οι ερευνητές προχώρησαν και σε συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού και μεταβολικών παραμέτρων (BMI, επίπεδα λιπιδίων και γλυκόζης ορού κλπ). Ωστόσο, είχε ληφθεί ένα δείγμα βιοψίας μυός για κάθε χρονική στιγμή ελέγχου προ- και μετεγχειρητικά και όχι την ίδια ώρα της ημέρας, καθιστώντας επισφαλή την ερμηνεία των συσχετίσεων αυτών. Από την επώαση ανθρώπινων μυοβλαστών στο παλμιτικό (400μM) διαπιστώθηκαν διαταραχές στα επίπεδα mRNA των γονιδίων BMAL1, CIART, CRY2, DBP, PER1, PER3, που εξετάζονταν ανά 6 ώρες για συνολικά 54 ώρες μετά τον κυτταρικό συγχρονισμό. Μετά την επώαση στο ελαϊκό αυξήθηκε η έκφραση του NR1D2. Επομένως, αναδείχτηκαν διαταραχές των γονιδίων κερκάδιου ρυθμού που απαντώνται στην παχυσαρκία και αποκαθίστανται με απώλεια βάρους. Επίσης, φάνηκαν οι επιδράσεις δυο διαφορετικών λιπαρών οξέων στην έκφραση γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού μυικών κυττάρων.

Κλείνοντας, αξίζει η αναφορά ακόμη μιας μελέτης για τον κερκάδιο ρυθμό στα μυοκύτταρα που δημοσιεύτηκε το 2018 στο *Molecular Metabolism* από την ομάδα των Lassiter και συνεργατών **(45)**. Δε χορηγήθηκε παλμιτικό στη διατροφή, ούτε για την επώαση των κυτταροκαλλιεργειών. Δεν αξιολόγησε την έκφραση γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού μετά την έκθεση σε παλμιτικό, αλλά μετά την ενεργοποίηση της AMPK. Χρησιμοποιήθηκαν μυικά κύτταρα ποντικών και ανθρώπων. Τα μυικά κύτταρα επώαστηκαν σε ραδιοσημασμένο παλμιτικό για να προσδιοριστεί η οξειδωσή του μετά την απαλοιφή της πρωτεΐνης GDAP1 (μέχρι πρόσφατα γνωστή για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και των υπεροξυσωμάτων στους νευρώνες) και μετά τη χρήση ενεργοποιητών της AMPK (AICAR και φαινφορμίνη). Η έκφραση της GDAP1 μειώθηκε μετά την ενεργοποίηση της AMPK. Η έκφραση του γονιδίου της GDAP1 δεν παρουσίασε κερκάδια διακύμανση, ωστόσο στην περίπτωση απουσίας της (silencing γονιδίου) διαπιστώθηκαν μεταβολές στην κερκάδια έκφραση: αύξηση του NPAS2 και μείωση του DBP. Τα δυο αυτά γονίδια φυσιολογικά παρουσιάζουν αντίθετη φάση έκφρασης και η μεταβολή αναμενόταν. Η παρουσία ενεργοποιητών της AMPK δεν προκάλεσε μεταβολές σε

αυτά. Η έκφραση των γονιδίων NR1D2 και PER2 επηρεάστηκε από την παρουσία ενεργοποιητών της AMPK, αλλά όχι από την απαλοιφή του γονιδίου GDAP1. Επομένως, η AMPK και η απενεργοποίηση της GDAP1 πρωτεΐνης μπορούν να επηρεάσουν την κirkάδια έκφραση γονιδίων στο σκελετικό μυ όπως διαπιστώθηκε σε μυικές ίνες ανθρώπων και καλλιέργειες μυικών κυττάρων ποντικών. Η συγκεκριμένη μελέτη αναδεικνύει το ρόλο της AMPK και των ενεργοποιητών της στην έκφραση γονιδίων του κirkάδιου ρυθμού στα μυικά κύτταρα. Ο ρόλος της AMPK στη σύνδεση μεταξύ κορεσμένων λιπαρών οξέων και κirkάδιου ρυθμού αναλύεται και στο επόμενο κεφάλαιο. Τέλος, για το ρόλο των περιφερικών ρολογιών του μυικού ιστού δημοσιεύτηκε ανασκόπηση το 2020 στο Obesity από τους Gutierrez-Monreal και συνεργάτες **(46)**, όπου αναφέρονται και τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών. Εφόσον στον υγιή οργανισμό τα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων φυσιολογικά αυξάνονται στη νηστεία κατά διάρκεια της νύχτας, ενώ στο σακχαρώδη διαβήτη είναι διαρκώς αυξημένα, η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών συμβάλλει στον αποσυγχρονισμό των περιφερικών ρολογιών των μυών.

5.4 Μυοκάρδιο

Δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής ερευνητικές εργασίες με χρήση κορεσμένου λίπους στα ρολόγια του μυοκαρδίου. Ο κirkάδιος ρυθμός έχει ιδιαίτερη σημασία για το μυοκάρδιο, αφού είναι γνωστό πως τα καρδιαγγειακά συμβάματα παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα στους εργαζόμενους με νυχτερινές βάρδιες και πως η σοβαρότητά τους παρουσιάζει νυχθημερινή διακύμανση. Όσα έμφρακτα συμβαίνουν τις πρώτες πρωινές ώρες τείνουν να είναι μεγαλύτερα. Πολυάριθμες μελέτες σε ανθρώπους συνδέουν την κατανάλωση λίπους με συνέπειες για την καρδιαγγειακή λειτουργία και στα πειραματόζωα διερευνώνται οι επιπτώσεις της απαλοιφής γονιδίων του κirkάδιου ρυθμού στην καρδιά. Στη μελέτη των Pelicari- Garcia και συνεργατών, που δημοσιεύτηκε το 2016, σκοπός ήταν η διερεύνηση προσαρμογής του κirkάδιου ρυθμού του μυοκαρδίου σε χρόνια αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων ορού (9 εβδομάδες) **(47)**. Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου CLOCK και φυσιολογικά ποντίκια. Η λιπιδαιμία προκλήθηκε είτε μέσω τεχνητής πρόκλησης σακχαρώδους διαβήτη (έγχυση στρεπτοζοτοσίνης) είτε μέσω κατανάλωσης δίαιτας υψηλής σε λιπαρά (με χορήγηση γεύματος στην αρχή είτε ή στο τέλος της περιόδου δραστηριότητας). Και

στους δυο γονότυπους, τα ποντίκια που κατανάλωναν το λιπαρό γεύμα στην αρχή της περιόδου δραστηριότητας είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων ορού στο τέλος της ενεργής περιόδου. Οι δείκτες μυοκαρδιακής λειτουργίας έδειξαν τάση να είναι καλύτεροι στα ποντίκια που κατανάλωναν το λιπαρό γεύμα στην αρχή παρά στο τέλος της περιόδου δραστηριότητας, όμως επί απαλοιφής του CLOCK δε σημειώθηκε αυτή η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων. Επί απαλοιφής του CLOCK, τα υψηλότερα επίπεδα μυοκαρδιακού γλυκογόνου διαπιστώθηκαν στα ποντίκια που ελάμβαναν λιπαρό γεύμα στο τέλος της ενεργής περιόδου. Αντίθετα, σε φυσιολογικά ποντίκια τα υψηλότερα επίπεδα γλυκογόνου είχαν όσα κατανάλωσαν το λιπαρό γεύμα στην αρχή της ενεργής περιόδου. Έτσι, το γονίδιο CLOCK φάνηκε να εμπλέκεται στη διαχείριση των αποθεμάτων ενέργειας του μυοκαρδιακού κυττάρου. Οι περαιτέρω αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από τους ερευνητές δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη δίνει τις πρώτες ενδείξεις για τη διαφορετική διαχείριση των ενεργειακών υποστρωμάτων στα μυοκαρδιακά κύτταρα ποντικών αναλόγως με το χρόνο λήψης λιπαρού γεύματος και την άμβλυση των μηχανισμών προσαρμογής επί απαλοιφής του γονιδίου CLOCK. Ξεχωριστή ανάλυση για τα κορεσμένα λίπη και τον κικκάδιο ρυθμό του μυοκαρδίου θα είχε ιδιαίτερη σημασία.

5.5 Νεφρός

Ο κικκάδιος ρυθμός στο νεφρό αποτυπώνεται στη φυσιολογική νυχθημερινή διακύμανση της αρτηριακής πίεσης, της παραγωγής ορμονών και της σπειραματικής διήθησης. Η φυσιολογική λειτουργία του διαταράσσεται σε μεταβολική δυσλειτουργία και σε παχυσαρκία. Η έκφραση γονιδίων του κικκάδιου ρυθμού στον νεφρό βλάπτεται από τη δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους, όπως διαπιστώθηκε στη μελέτη ποντικών όπου εκτός από το νεφρό μελετήθηκαν οι επιπλοκές στα ηπατοκύτταρα **(28)**. Μάλιστα, διαπιστώθηκε διαφορετική ανταπόκριση μεταξύ των δυο φύλων στα μωρά ποντικών που κατανάλωναν τη δίαιτα αυτή: διαπιστώθηκε επαγωγή των BMAL1, PER2, CRY1 στα θηλυκά, ενώ τα αρσενικά εμφάνισαν μεγαλύτερη προδιάθεση για εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης και οξείας νεφρικής βλάβης. Η χορήγηση της ίδιας δίαιτας στα νεογνά ποντίκια μετά τον αποθηλασμό τους οδήγησε σε μείωση έκφρασης των BMAL1, CRY1, PER1 και CK1E στα θηλυκά. Δεν εξετάστηκαν επιδράσεις σε άλλα όργανα που πλήττονται

από την παχυσαρκία, δεν υπάρχουν δεδομένα από τη χορήγηση της συγκεκριμένης δίαιτας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και δε γίνεται ξεχωριστή αναφορά για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα **(55)**.

Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης ακολουθεί κινκάρδιο ρυθμό και φαίνεται πως το περιφερικό ρολόι του νεφρού λειτουργεί στα ποδοκύτταρα **(56)**. Το 2021 δημοσιεύτηκε η εργασία των Peng και συνεργατών, όπου χορηγήθηκε δίαιτα υψηλού λίπους για 16 εβδομάδες σε ποντίκια C57BL/6J και στη συνέχεια τα ποδοκύτταρα των νεφρών τους εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις παλμιτικού (0, 50, 150, 300 $\mu\text{mol/L}$) για 48 ώρες, προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου PER3 σε ξεχωριστά χρονικά σημεία **(57)**. Στα ποντίκια με παχυσαρκία η μείωση της έκφρασης του PER3 ήταν στατιστικά σημαντική (σε σχέση με τα νορμοβαρή ποντίκια). Η μείωση της έκφρασης του ίδιου γονιδίου στη χρονική στιγμή των 48 ωρών έκθεσης σε 150 $\mu\text{mol/L}$ παλμιτικού ήταν στατιστικά σημαντική (σε σχέση με τις 0, 24 και 36 ώρες). Όταν στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε παλμιτικό (PA) προστέθηκε αδενοϊός με PER (Ad-PER-PA), διαπιστώθηκε σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια και μείωση δεικτών οξειδωτικού stress (CAT, GPX1, GSH, SOD1) και φλεγμονής (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα πως η παρουσία του γονιδίου PER3 περιορίζει το οξειδωτικό stress και τη φλεγμονή που προκαλεί το παλμιτικό στα ποδοκύτταρα νεφρού ποντικών.

5.6 Παγκρεατικά νησίδια

Η ινσουλίνη εκκρίνεται από το β κύτταρο με δυο τρόπους: με το βασικό ρυθμό και ως ανταπόκριση στη μεταγευματική άνοδο της γλυκόζης ορού (γλυκοζοεξαρτώμενη έκκριση). Η τελευταία επηρεάζεται δυσμενώς από την υπερλιπιδαιμία: η δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λίπους εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2**(48)**. Ο κινκάρδιος ρυθμός συνδέεται επίσης με τη δυσλειτουργία των παγκρεατικών νησιδίων: μεταλλάξεις του υποδοχέα της μελατονίνης (MTNR1B) έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 **(49)**, αυξημένη γλυκόζη νηστείας **(50, 51)**, ενώ διαταραχές στην έκφραση των PER2, 3 και CRY2 απαντώνται σε πειραματικές συνθήκες όμοιες με της υπεργλυκαιμίας **(52)**, σύμφωνα

με δεδομένα από μελέτες γονιδιώματος. Από μελέτες σε πειραματόζωα φαίνεται ότι τα παγκρεατικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς περιφερικού ρολογιού απαραίτητους για την ομαλή έκκριση ινσουλίνης (53).

Την έκφραση των CLOCK, BMAL1, PER1, 2, 3 και CRY 1,2 και στην έκκριση ινσουλίνης των παγκρεατικών νησιδίων μελέτησαν οι Stamenkovic και συνεργάτες σε άρθρο τους δημοσιευμένο στο περιοδικό Metabolism το 2011 (54). Μελετήθηκαν κύτταρα παγκρεατικών νησιδίων από πτωματικούς δότες με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των PER2, 3 και CRY2 ήταν σημαντικά μειωμένη στα κύτταρα δοτών με ΣΔ2. Η ελάττωση της έκφρασης των PER3 και CRY2 ήταν ανάλογη της ανόδου της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c- δείκτης πτωχής ρύθμισης της νόσου). Τα επίπεδα mRNA της ινσουλίνης συσχετίστηκαν θετικά με την έκφραση των CLOCK, PER2, 3 και CRY 2, το ίδιο και τα επίπεδα του τελικού πολυπεπτιδίου της (με εξαίρεση το CLOCK). Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν σε γλυκολιποτοξικές συνθήκες με τη χρήση παλμιτικού (συγκέντρωση 1mmol/L) και μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων ρολογιού: του PER1 αυξήθηκε, του PER3 μειώθηκε και των υπόλοιπων γονιδίων έμεινε αμετάβλητη. Η συγκεκριμένη μελέτη αναδεικνύει τη σημασία των γονιδίων κικκάδιου ρυθμού στην παθοφυσιολογία του διαβήτη, στην οποία εμπλέκεται και η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών (γλυκολιποτοξικότητα). Όμως, οι επιδράσεις του παλμιτικού εξετάστηκαν μέσω επώασης των κυτταροκαλλιιεργειών εργαστηρίου και όχι μέσω της διαιτητικής πρόσληψης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απουσία των αξιοσημείωτων διαταραχών της έκφρασης του BMAL1, σε αντίθεση με τα ηπατοκύτταρα όταν εκτέθηκαν σε παρόμοιες συνθήκες γλυκολιποτοξικότητας.

5.7 Εντεροενδοκρινή κύτταρα: κικκάδια έκκριση GLP-1

Η ινκρετίνη GLP-1 εκκρίνεται από τα εντεροενδοκρινή κύτταρα L του λεπτού εντέρου, ως ανταπόκριση στην παρουσία τροφής εντός του γαστρεντερικού σωλήνα. Ασκεί αντιδιαβητικές δράσεις, καθώς καθυστερεί τη γαστρική κένωση, βοηθά στην επίτευξη αισθήματος κορεσμού, ευνοεί τη βιοσύνθεση και την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, μειώνει

την απόπτωση των β-κυττάρων και αναστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα. Μέσω των επιδράσεών της στο κεντρικό νευρικό σύστημα αναστέλλει την όρεξη, γεγονός που την καθιστά ελκυστικό φαρμακευτικό στόχο αντιμετώπισης του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 και της παχυσαρκίας **(58)**. Εκτός από την έκκριση που εξαρτάται από την παρουσία τροφής, το συγκεκριμένο πεπτίδιο παρουσιάζει και ενδογενή νυχθημερινό ρυθμό έκκρισης. Μάλιστα, το μέγιστο έκκρισης του GLP-1 και της δραστηριότητας των L κυττάρων εντός του 24ώρου (peak) συμπίπτει με την αρχή της 'περιόδου δραστηριότητας' (active period) και την έναρξη σίτισης, όπως προκύπτει από μελέτες σε τρωκτικά **(59)**.

Υπάρχουν δυο μελέτες που εξετάζουν τις επιπτώσεις της χορήγησης του παλμιτικού στην κirkάδια έκκριση του GLP-1: In vivo σε αρουραίους Wistar από την ομάδα των Gil-Lozano και συνεργατών **(60)**: έγινε διαχωρισμός σε ομάδα σταθερής λήψης κορτικοστερόνης βραδείας αποδέσμευσης (προκειμένου να καταργηθεί ο κirkάδιος ρυθμός κορτικοστερόνης και να επιτευχθούν σταθερά επίπεδα σε όλο το 24ωρο) και σε ομάδα εικονικού φαρμάκου- placebo. Έγινε καμπύλη σακχάρου σε ορισμένα χρονικά σημεία εντός του 24ώρου τις ημέρες 13 και 19 (κατόπιν 4ωρης νηστείας) προκειμένου να οριστούν τα σημεία μέγιστης και ελάχιστης έκκρισης GLP-1 και της ινσουλίνης. Ακολούθησε η δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε σουκρόζη και σε λίπος (45% ημερήσιας πρόσληψης με 30% περιεκτικότητα σε παλμιτικό) με καταγραφή των ωρών σίτισης. Έπειτα, διενεργήθηκε νέα καμπύλη σακχάρου τις ημέρες 28 και 35, όπου μετρήθηκαν η κirkάδια έκκριση του GLP-1 και η έκκριση ινσουλίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως, μετά τη φόρτιση γλυκόζης, ο κirkάδιος ρυθμός ενδογενούς έκκρισης του GLP-1 δε διαταράσσεται από τη σταθερή χορήγηση κορτικοστερόνης. Όμως, η δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και σουκρόζη είχε αρκετές επιδράσεις στο μεταβολισμό των τρωκτικών: οδήγησε σε αύξηση της θερμιδικής πρόσληψης κατά 8% στην περίοδο έκθεσης στο φως, σημαντικά υψηλότερες τιμές γλυκόζης το βράδυ, σημαντικά υψηλότερες τιμές HOMA-IR το πρωί, διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη και κατάργηση της κirkάδιας έκκρισης του GLP-1 και της ινσουλίνης. Στο ίδιο πρωτόκολλο έγινε in vitro μελέτη σε κύτταρα GLUTag από τρωκτικά, με προσδιορισμό των επιπέδων GLP-1 κατόπιν επώασης σε διάλυμα παλμιτικού σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1 mM, 0.5 mM, 2.5 mM): τα κύτταρα GLUTag απομονώνονται από τρωκτικά και προσομοιάζουν τα εντεροενδοκρινή κύτταρα L. Αντίστοιχα με τα ευρήματα

της *in vivo* μελέτης, η *in vitro* μελέτη έδειξε πως μετά από κατεργασία των GLUTag κυττάρων με παλμιτικό, παρατηρούνται οι εξής στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα mRNAs γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού: μείωση του πλάτους έκφρασης του BMAL1, ελάττωση της περιόδου και του πλάτους έκφρασης του PER2 και αύξηση των επιπέδων mRNAs για το γονίδιο της προγλυκαγόνης. Τα επίπεδα GLP-1 μετά την κατεργασία με παλμιτικό παρουσίασαν ελάττωση. Πιθανόν η κατεργασία με παλμιτικό να εμπλέκεται στη μείωση της βιοσύνθεσης του GLP-1 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, καθώς παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα του πεπτιδίου ενώ τα επίπεδα mRNA πρόδρομου μορίου έδειξαν αύξηση.

Η επόμενη μελέτη έγινε σε κύτταρα mGLUTag από ποντίκια, από τους Martchenko και συνεργάτες (61): μελετήθηκε η επίδραση του παλμιτικού 0.5 mM στα mRNA των γονιδίων BMAL1 και PER2, που παρουσιάζουν το μέγιστο και το ελάχιστο έκφρασης σε αντίθετες φάσεις του κερκάδιου ρυθμού. Έγινε προεργασία με έκθεση σε παλμιτικό 0.5 mM και μετά από συγχρονισμό των κυττάρων τα επίπεδα mRNA για το BMAL1 έδειξαν σημαντική μείωση στο χρονικό σημείο 8 ωρών. Επίσης, μετρήθηκε η έκκριση του GLP-1 μετά από διέγερση της έκκρισής του με το πεπτίδιο GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide) στις 8 και 20 ώρες μετά από τον κυτταρικό συγχρονισμό. Στις 8 ώρες διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της έκκρισης του GLP-1, που όμως μετριάστηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση παλμιτικού και χωρίς να συνοδεύεται από μεταβολές στην έκφραση γονιδίου της προγλυκαγόνης. Στις μετρήσεις των ίδιων παραμέτρων στο χρονικό σημείο των 20 ωρών, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Οι ερευνητές ανέπτυξαν κυτταροκαλλιέργειες από κρύπτες ειλεού ενήλικων ποντικών (adult mouse ileal crypt- AMIC), τα οποία βρίθουν L κυττάρων που εκκρίνουν GLP-1. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα BMAL1 knockout, BMAL1 wild-type και κύτταρα από ποντίκια C57Bl/6J (ομάδα ελέγχου). Έπειτα, σε όλες τις ομάδες χορηγήθηκαν ουσίες που ενισχύουν την έκκριση του GLP-1 και μετρήθηκε η συγκέντρωσή του, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του BMAL1 status και της έκκρισης GLP-1. Στις καλλιέργειες BMAL1 knockout μετά την έγχυση εκκριταγωγών ουσιών, η διέγερση έκκρισης του GLP-1 ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς να παρατηρείται διαφορά στη βασική έκκριση. Από τα συγκεκριμένα ευρήματα φαίνεται πως η επίδραση του BMAL1 στο GLP-1 δεν επηρεάζει τη βασική έκκριση, παρά μόνο στην έκκριση

μετά από τροφοδοτικά ερεθίσματα (διεγερμένη). Μετά την επώαση των κυττάρων σε παλμιτικό, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντική ελάττωση της έκφρασης της NAMPT (ένζυμο του πρώτου βήματος βιοσύνθεσης του NAD) και αντίστοιχα, στατιστικά σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις NAD και Sirt1. Η συγκεκριμένη μεταβολή δεν παρατηρήθηκε σε ταυτόχρονη χορήγηση του PC73 (ενεργοποιητής του ενζύμου της Nampt), αναιρώντας τη δράση του παλμιτικού. Στο χρονικό σημείο των 8 ωρών, η μιτοχονδριακή λειτουργία (τόσο η βασική όσο και διεγερμένη από το GIP) φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την επίδραση του παλμιτικού, ενώ ταυτόχρονα διαπιστώθηκαν σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις ATP. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως η επίδραση του παλμιτικού είναι επιβλαβής για τα εντεροενδοκρινή κύτταρα, καθώς μειώνει σημαντικά την έκφραση του BMAL-1 και περιορίζει τη βιοσύνθεση του NAD, δυο παραγόντων που απαιτώνται για την ακεραιότητα της κιρκάδιας έκκρισης του GLP-1. Η συγκεκριμένη μελέτη πρωτοπόρησε με την ανάδειξη συσχέτισης μεταξύ της κιρκάδιας έκκρισης του GLP-1 και του μονοπατιού BMAL-1/ Nampt/Sirt1, που εμπλέκεται στη σύνθεση του NAD και στο οξειδωτικό δυναμικό των μιτοχονδρίων.

Οι ανωτέρω μελέτες σε τρωκτικά ανέδειξαν τις δυσμενείς επιδράσεις στην κιρκάδια έκκριση του GLP-1 από τη χορήγηση του κορεσμένου λιπαρού οξέος παλμιτικού. Για τον άνθρωπο, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις επιπτώσεις της πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών στην έκκριση του GLP-1. Ωστόσο, εξετάστηκε η κιρκάδια έκκριση του πεπτιδίου GLP-1, αλλά και οι διαταραχές της, σε κλινική μελέτη από τους Galindo Muñoz και συνεργάτες σε υγιείς αλλά και υπέρβαρους- παχύσαρκους συμμετέχοντες **(62)**. Κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες των 25 ατόμων ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος (BMI): φυσιολογικοί, υπέρβαροι και παχύσαρκοι, με μετρήσεις του GLP-1 σε 5 χρονικά σημεία εντός του 24ώρου και προσδιορισμό της κιρκάδιας έκκρισης. Ακολούθησε διαιτητική και συμπεριφορική παρέμβαση με στόχο την απώλεια βάρους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στα άτομα φυσιολογικού βάρους, η βασική τιμή του GLP-1 βρισκόταν σε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα, όμως παρουσίαζε σημαντικά υψηλότερη διακύμανση εντός του 24ώρου και σημαντικά μεγαλύτερο πλάτος έκκρισης. Στα υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα, η ανάλυση έδειξε απουσία της κιρκάδιας ρυθμικότητας, η οποία δεν επανήλθε ούτε και μετά την απώλεια σωματικού βάρους. Συμπερασματικά, η απώλεια σωματικού λίπους από μόνη της δεν

επαναφέρει την κirkάδια έκκριση του GLP-1. Το κορεσμένο λίπος απαντάται σε αφθονία στη δυτικού τύπου δίαιτα και στις μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να αναζητηθούν οι σχετικοί διαιτητικοί παράγοντες που δύνανται να βλάψουν την ακεραιότητα της κirkάδιας έκκρισης του GLP-1, με ιδιαίτερη σημασία για την αντιμετώπιση μεταβολικών νοσημάτων. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε εκδήλωση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) μέσω διαταραχών του κirkάδιου ρυθμού έκκρισης του GLP-1 παρουσιάστηκαν σε πρόσφατα δημοσιευμένη ανασκόπηση **(8)**.

5.8 Κεντρικό ρολόι- υποθάλαμος

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το κεντρικό ρολόι του κirkάδιου ρυθμού εντοπίζεται στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, όπου δέχεται άμεσες επιρροές από τον κύκλο φωτός και σκότους. Στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου εντοπίζεται το κέντρο του κορεσμού. Λαμβάνει σήματα μέσω ορμονών και νευροδιαβιβαστών για την ενεργειακή κατάσταση της περιφέρειας και διαβιβάζει σήματα που ρυθμίζουν την πρόσληψη τροφής, ώστε να επιτυγχάνεται ισορροπία στο ενεργειακό ισοζύγιο με βάση την ενεργειακή κατάσταση των κυττάρων. Απαρτίζεται από 2 διακριτούς πληθυσμούς νευρώνων: τους POMC/CART (ανορεξιογόνοι, δέχονται σήματα από τη λεπτίνη και την ινσουλίνη) και τους NPY/AgRP (ορεξιογόνοι, δέχονται σήματα από τη γκρελίνη, παράγουν τα ορεξιογόνα νευροπεπτίδια NPY και AgRP και αναστέλλουν τους ανορεξιογόνους νευρώνες). Η έρευνα για τις επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών στον υποθάλαμο εστιάζει στα επίπεδα των νευροπεπτιδίων και στο περιβάλλον νευροφλεγμονής που δημιουργείται στην περιοχή.

5.8.1 Διαταραχές νευροπεπτιδίων

Σε μελέτες σε ποντίκια, η έκκριση των AgRP και NPY απορρυθμίστηκε μετά την έκθεση των νευρώνων σε παλμιτικό, αλλά και μετά 20 εβδομάδες αυξημένης πρόσληψης κορεσμένου λίπους **(63)**. Ακόμα, φαίνεται άμεση συσχέτιση μεταξύ της έκκρισης των συγκεκριμένων

πεπτιδίων και της δραστηριότητας της AMPK (AMP- activated protein kinase- AMPK). **(64)**. Το ένζυμο δρα ως 'αισθητήρας' της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Ενεργοποιείται από τα χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Μεταξύ των πολλαπλών της δράσεων, αναστέλλει την καρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου Α ευνοώντας την οξείδωση λιπαρών οξέων και μειώνει τη βιοσύνθεσή τους. Ως προς τον κερκάρδιο ρυθμό, η AMPK μεσολαβεί στη φωσφορυλίωση του CRY1 και το αποσταθεροποιεί. Επομένως, συνδέει τον κερκάρδιο ρυθμό με το μεταβολισμό στα κύτταρα του υποθαλάμου.

Έπεται λοιπόν το ερώτημα αν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παρεμβαίνουν στον κερκάρδιο ρυθμό μέσω της AMPK, επηρεάζοντας γονίδια του κερκάρδιου ρυθμού και την έκφραση ορεξιόγόνων νευροπεπτιδίων. Την απάντηση έδωσε μελέτη σε μονιμοποιημένους υποθαλαμικούς νευρώνες ποντικών από τους Fick και συνεργάτες **(65)**. Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές μονιμοποιημένων υποθαλαμικών νευρώνων από ποντικούς mHypocE-44. Στη μία σειρά έγινε έγχυση παλμιτικού σε τελική συγκέντρωση 300 μM , ενώ η άλλη ορίστηκε ως σειρά ελέγχου (controls). Έγινε συγχρονισμός των κυττάρων προκειμένου να προσδιοριστεί η έκφραση γονιδίων του κερκάρδιου ρυθμού σε διαδοχικά χρονικά σημεία (μία μέτρηση κάθε 3 ώρες, για 36 ώρες συνολικά). Μετρήθηκε το mRNA των γονιδίων CLOCK, BMAL1, PER2, REV-ERB και προσδιορίστηκε το mRNA των ορεξιόγόνων νευροπεπτιδίων NPY και AgRP. Τα αποτελέσματα έδειξαν: σημαντική επιβράδυνση φάσης του CLOCK και σημαντική μείωση πλάτους έκφρασης του BMAL1. Το πλάτος έκφρασης των PER2 και REV-ERB έδειξε σημαντική μείωση. Από τις επιδράσεις στα νευροπεπτίδια, δε διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση στην έκκριση του AgRP, όμως το πλάτος έκφρασης του νευροπεπτιδίου Y (NPY) ήταν σημαντικά μεγαλύτερο κατόπιν χορήγησης παλμιτικού, όπως και τα επίπεδα mRNA του 1, 9, 21 ώρες μετά τον κυτταρικό συγχρονισμό. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της AMPK, ενώ στις 2 και στις 12 ώρες μετά τον κυτταρικό συγχρονισμό δεν παρουσίαζαν σημαντικές μεταβολές, στις 24 ώρες έδειξαν σημαντική αύξηση. Οι ερευνητές απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στην πολύωρη επώαση των κυττάρων με παλμιτικό και την επερχόμενη συσσώρευση μεταβολιτών του, που αποτελεί στρεσογόνο ερέθισμα για τα κύτταρα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε AICAR- ενεργοποιητής της AMPK και Compound C- αναστολέας της AMPK. Ακολούθησαν μετρήσεις mRNA του NPY στα ίδια χρονικά σημεία. Μετά τη χορήγηση AICAR διαπιστώθηκε σημαντική ελάττωση της

επαγόμενης από το παλμιτικό έκφρασης του NPY. Στην περίπτωση αναστολής της AMPK από το Compound C, διαπιστώθηκε σημαντικά μειωμένη βασική τιμή mRNA του NPY στις 9 ώρες, όπως και μετά τη χορήγηση παλμιτικού. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η AMPK μεσολαβεί στη διέγερση έκφρασης του NPY στον υποθάλαμο από το παλμιτικό. Η επίδραση όμως ενός ενεργοποιητή της AMPK μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη συγκεκριμένη επίδραση. Η μελέτη υπήρξε η πρώτη που αποκάλυψε τη σύνδεση ενός κορεσμένου λιπαρού οξέος στην έκφραση των υποθαλαμικών ορεξιογόνων πεπτιδίων NPY.

Η έκκριση του NPY και ο ρόλος του BMAL1 στον υποθάλαμο ποντικών εξετάστηκαν περαιτέρω στην εργασία των Clemenzi και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2020 στο περιοδικό *Molecular and Cellular Endocrinology* (66). Χορηγήθηκε δίαιτα δυτικού τύπου για 16 εβδομάδες σε ποντίκια C57BL/6J αρσενικά και θηλυκά ηλικίας 8 εβδομάδων. Τα ποντίκια εμφάνισαν διαταραχή ρυθμού στη σίτιση, καθώς προτιμούσαν να καταναλώνουν τα περισσότερα γεύματα στη διάρκεια της ανενεργής περιόδου. Ως προς τη ρυθμικότητα έκφρασης των ορεξιογόνων νευροπεπτιδίων, το AgRr έχασε την 24ωρη διακύμανσή του. Δεν εμφανίστηκε το μέγιστο έκφρασης mRNA του NPY και AgRr που απαντήθηκε στα φυσιολογικά ποντίκια. Διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά φάσης του POMC. Για τις *in vitro* παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένοι νευρώνες mHypA υποθαλάμου ποντικών με ή χωρίς το γονίδιο BMAL1 (knockout). Στα άθικτα ποντίκια mHypA-BMAL1-WT τα γονίδια BMAL1 και PER2 παρουσίαζαν 24ωρο ρυθμό έκφρασης σε αντίθετη φάση, ενώ το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε στα mHypA-BMAL1-KO. Το NPY δεν παρουσίασε κιρκάδια διακύμανση στα φυσιολογικά ποντίκια και στην περίπτωση των θηλυκών, η έκφρασή του ήταν υψηλότερη στα knockout ποντίκια στις 3,6,9 και 12 ώρες. Η 24ωρη διακύμανση του AgRr διαπιστώθηκε μόνο στα θηλυκά άθικτα και τα αρσενικά knockout ποντίκια, ενώ του POMC διαπιστώθηκε στα θηλυκά και των 2 σειρών. Λόγω απουσίας αξιολογικών μεταβολών στους νευρώνες των αρσενικών, μόνο νευρώνες θηλυκών ποντικών χρησιμοποιήθηκαν για το επόμενο στάδιο, όπου επωάστηκαν σε παλμιτικό (50μM) και υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, προς μίμηση των συνθηκών δίαιτας δυτικού τύπου. Μετά την έκθεση στο παλμιτικό, η έκφραση του NPY αυξήθηκε σημαντικά στους νευρώνες των άθικτων ποντικών, ενώ απουσίαζε από τους νευρώνες των ποντικών knockout για το BMAL1. Συγκεκριμένα, με την επίδραση του

παλμιτικού έδειξε να αυξάνεται η πρόσδεση του BMAL1 σε περιοχή του εκκινητή του γονιδίου του NPY, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενη μελέτη (67). Αυτό σημαίνει πως η παρουσία του γονιδίου BMAL1 απαιτείται για την επαγόμενη από το παλμιτικό αύξηση της έκφρασης του NPY.

5.8.2 Περιβάλλον νευροφλεγμονής

Η δίαιτα υψηλού λίπους και η έκθεση σε υψηλά επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οδηγούν σε αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό. Η περιοχή της μέσης προεξοχής στον υποθάλαμο αποτελεί το διαπερατό σημείο του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπου οι νευρώνες εκτίθενται στα κορεσμένα λίπη και οδηγούνται σε κατάσταση αντιδραστικής γλοιώσης, διαταραχής μεταβολισμού του λίπους και αύξησης φλεγμονωδών κυτταροκινών, που ονομάζεται νευροφλεγμονή. Εμφανίζεται αρκετές ημέρες πριν την παχυσαρκία και την εκδήλωση φλεγμονής στα περιφερικά όργανα. Στη νευροφλεγμονή παρατηρείται αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6 και TNFα. Σημαντικό ρόλο παίζουν οι υποδοχείς toll-like receptors (TLR), που φυσιολογικά ενεργοποιούνται από αντιγόνα βακτηρίων. Στον υποθάλαμο ποντικών η παρουσία των υποδοχέων TLR2 και TLR4 είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της νευροφλεγμονής μετά τη χορήγηση παλμιτικού (αν και το παλμιτικό δεν προσδέεται απευθείας σε αυτούς). Μετά την είσοδο του παλμιτικού, οι TLR ενεργοποιούνται και πυροδοτείται η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως και το μονοπάτι του πυρηνικού υποδοχέα NF-κΒ (72). Εφόσον η παρουσία παλμιτικού είτε στη δίαιτα είτε στον ορό συνοδεύεται από τις αλλοιώσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως, κρίνεται απαραίτητη η αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων δεικτών φλεγμονής και παραμέτρων του κερκάδιου ρυθμού. Στον εγκέφαλο, η διατήρηση της ακεραιότητας των νευρώνων και η ανοσιακή απόκριση ελέγχονται από τη μικρογλοία, τα κύτταρα της οποίας παράγουν τις κυτταροκίνες. Η δίαιτα υψηλού λίπους σχετίστηκε με τη χρόνια φλεγμονώδη ενεργοποίηση της μικρογλοίας και την απώλεια νευρώνων.

Η παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ακολουθεί κινκάρδιο ρυθμό. Στη μικρογλοία ποντικών η έκφραση του BMAL1 είναι εντονότερη στην περίοδο φωτός **(68)**. Επομένως, το γονίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας του υποθαλάμου, όπως διερευνήθηκε και στη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020 στο *Frontiers in Immunology* από τους Wang και συνεργάτες **(69)**. Στις in vivo παρατηρήσεις ποντικών φυσιολογικών συνθηκών, η έκκριση των κυτταροκινών IL-1β, IL-6, ήταν αυξημένη κατά την περίοδο φωτός, ενώ δεν παρατηρήθηκε κινκάρδιος ρυθμός στην έκκριση του TNFα. Στα ποντίκια με απαλοιφή του BMAL1 η έκφραση των γονιδίων κινκάρδιου ρυθμού διαταράχθηκε σημαντικά: μειώθηκε η έκφραση των NR1D1 και DBP και αυξήθηκε των PER2 και CRY 1, CRY2. Αντίστοιχα, χαμηλότερη ήταν η παραγωγή IL-1β και αμετάβλητη των TNFα και IL-6. Ως προς την επίδραση του παλμιτικού, χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες μικρογλοίας ποντικών BV-2 που επώαστηκαν για 12 ώρες σε διάλυμα παλμιτικού συγκέντρωσης είτε 100 είτε 200 μΜ. Η έκκριση IL-1β και TNFα αυξήθηκε σημαντικά και στις δυο συγκεντρώσεις, ενώ της IL-6 μόνο στην περίπτωση των 100 μΜ. Το παλμιτικό κατάργησε την έκφραση των γονιδίων CLOCK και BMAL1. Οι ερευνητές προχώρησαν σε μελέτη της έκφρασης των γονιδίων κινκάρδιου ρυθμού στα κύτταρα με έλλειψη (knock-down) του BMAL1 που επώαστηκαν στη συγκέντρωση των 100 μΜ. Στα κύτταρα αυτά, μετά την προσθήκη παλμιτικού, παρουσιάστηκαν οι εξής διαταραχές: αυξήθηκε η έκφραση των PER2, DBP, CRY1, CRY2, ενώ των CLOCK, NR1D1 και PER1 παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με τα ποντίκια χωρίς έλλειψη του BMAL1. Στην περίπτωση knock-down του BMAL1, σημαντικά αυξημένα επίπεδα έδειξε η IL-1β στις 16 ώρες, η IL-10 στις 20 ώρες, ενώ η IL-6 μειώθηκε στις 20 ώρες. Φάνηκε λοιπόν, πως στη μικρογλοία το BMAL1 συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από το παλμιτικό. Τα ευρήματα για τις συνέπειες του παλμιτικού επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης που χρησιμοποίησε δίαιτα υψηλού γενικότερα λίπους σε αρουραίους Wistar, όπου σημειώθηκαν διαταραχές της νυχθημερινής έκφρασης γονιδίων clock στη μικρογλοία **(70)**.

Η μελέτη των Tran και συνεργατών που δημοσιεύτηκε στο *Frontiers in Endocrinology* το 2020 αναζήτησε συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας του BMAL1 γονιδίου, του γονιδίου της NAMPT και των μεταβολών δεικτών φλεγμονής μετά τη χορήγηση παλμιτικού σε νευρώνες υποθαλάμου ποντικών **(71)**. Για τις κυτταροκαλλιέργειες, μονιμοποιημένοι νευρώνες σειράς

mHγο-E46 επώαστηκαν σε διάλυμα παλμιτικού (συγκέντρωση 50 μ M) για 24 ώρες. Το παλμιτικό οδήγησε σε αύξηση του mRNA της NAMPT και μείωση των BMAL1 και PER2. Ως προς τη φλεγμονή, μειώθηκε η έκφραση του NF- κ B και αυξήθηκε των IL-6 και TLR4. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι υποθαλαμικοί νευρώνες θηλυκών ποντικών με ή χωρίς απαλοιφή του BMAL1 (knockout) που περιγράφηκαν στις προηγούμενες μελέτες (66-67), για να διευκρινιστεί αν οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται από την παρουσία του γονιδίου αυτού. Φάνηκε πως η έκφραση της NAMPT ήταν ανεξάρτητη του BMAL1, αφού παρέμεινε σταθερή μετά τη χορήγηση παλμιτικού. Επιπλέον, με τη χρήση αναστολέα της NAMPT, απουσίασαν οι προαναφερθείσες επιδράσεις στις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Επομένως, η NAMPT μεσολαβεί στη φλεγμονώδη απόκριση της μικρογλοίας. Σε αντίθεση με τους περιφερικούς ιστούς, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρήθηκε ρυθμικότητα στο γονίδιο της NAMPT. Τέλος, σημειώνεται πως το παλμιτικό προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της NAMPT στους υποθαλαμικούς νευρώνες, σε αντίθεση με τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου που είχε διαπιστωθεί σε άλλη μελέτη στο ήπαρ και στο έντερο (61).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η χορήγηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το DHA φαίνεται να αναστρέφει μερικώς τις δυσμενείς επιπτώσεις του παλμιτικού στην έκφραση γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού στον υποθάλαμο. Οι Greco και συνεργάτες, σε μελέτη τους το 2014 χρησιμοποίησαν παλμιτικό και δοκοσαεξανοϊκό (DHA). Σε νευρώνες mHγο-E37, η χορήγηση 25 μ M παλμιτικού προκάλεσε σημαντικές διαταραχές στα επίπεδα mRNA γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού: διαπιστώθηκε αύξηση στα επίπεδα BMAL1 τις ώρες 3,6,12 και 21 μετά το συγχρονισμό. Σημειώθηκε καθυστέρηση φάσης κατά 1.4 ώρα στην έκφρασή των BMAL1 και REV-ERBa. Επίσης σημειώθηκε μικρή (όχι στατιστικά σημαντική) αύξηση στα επίπεδα IL-6 και TLR4. Στους νευρώνες που προηγουμένως είχαν επωαστεί σε 25 μ M DHA τα επίπεδα IL-6 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις ώρες 21 ως 33. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου BMAL1 στους νευρώνες που αρχικά εκτέθηκαν σε DHA και έπειτα σε παλμιτικό ήταν σημαντικά υψηλότερα μόνο στην 9η ώρα μετά το συγχρονισμό, ενώ στα κύτταρα που δεν είχε προηγηθεί έκθεση σε DHA τα επίπεδα παρέμεναν υψηλά σε όλα τα χρονικά σημεία. Επιπλέον, η αύξηση στο πλάτος έκφρασης του γονιδίου αυτού μετά την έκθεση σε παλμιτικό δεν σημειώθηκε στους νευρώνες με προηγούμενη έκθεση σε DHA. Φάνηκε λοιπόν πως η αρχική έκθεση των νευρώνων σε DHA

αποτρέπει ορισμένες από τις διαταραχές που προκαλούνται από το παλμιτικό **(73)**. Σε αντίστοιχη μελέτη τους το 2018 για τις επιπτώσεις του παλμιτικού στους νευρώνες ποντικών mHypocA- POMC και αν αυτές αναστρέφονται από τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, οι Tse και συνεργάτες χρησιμοποίησαν το ελαϊκό **(74)**. Το παλμιτικό (50 μ M) προκάλεσε αύξηση του mRNA του ορεξιογόνου νευροπεπτιδίου POMC και αύξηση δεικτών stress ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε δείκτες μονοπατιών σηματοδότησης της ινσουλίνης. Αυξήθηκαν οι δείκτες φλεγμονής IL-1 β , IL-6, TNF α και ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B. Η χορήγηση ελαϊκού (50 μ M) εμπόδισε την εμφάνιση των διαταραχών ενδοπλασματικού δικτύου, την αύξηση του POMC και της IL-6, αναδεικνύοντας την προστατευτική του δράση έναντι των επιπτώσεων του παλμιτικού. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν εξετάστηκαν παράμετροι έκφρασης γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού, ωστόσο μια τέτοια διερεύνηση και συσχέτιση με τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του ελαϊκού θα ήταν χρήσιμη για το μέλλον.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέχρι στιγμής απουσίαζε από τη βιβλιογραφία μια συστηματική ανασκόπηση σχετικά με τις επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών στους μηχανισμούς του κερκάδιου ρυθμού. Οι περισσότερες ανασκοπήσεις εστιάζουν στις επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών στα μονοπάτια φλεγμονής του υποθαλάμου, αλλά και στο εντερικό μικροβίωμα. Βασίζονται σε παρατηρήσεις από καταστάσεις προϋπάρχουσας παχυσαρκίας ή υπερβαρότητας, όπου απαντώνται διαταραχές γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού. Επιπλέον, πρόκειται για συμπεράσματα από ετερογένεια μελετών σε πληθυσμούς με ή χωρίς υπόβαθρο μεταβολικής νόσου. Καθώς η διατροφή περιέχει πολλά συστατικά, είναι δύσκολο να εξεταστούν οι επιμέρους επιδράσεις ενός συστατικού στον κερκάδιο ρυθμό και να παρουσιαστούν ανεξάρτητα από τις επιδράσεις άλλων ομάδων τροφίμων.

Στην κατηγορία των κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους τα δεδομένα προκύπτουν από νορμοβαρείς αλλά και υπέρβαρους εθελοντές και αναδεικνύουν τη θαυμαστή ικανότητα προσαρμογής του οργανισμού σε νέες συνθήκες πρόσληψης τροφής: φάνηκε ότι ένα και μόνο γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λίπη σχετίζεται με μειωμένη έκφραση συστάδας γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού. Αντίστοιχο ήταν το εύρημα επαγωγής των γονιδίων PER (που αναστέλλουν την έκφραση των κύριων γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού) μετά από διαιτολόγιο LCHF 6 εβδομάδων. Το ίδιο διαιτολόγιο προκάλεσε και μετάθεση του ναδέρ της κορτιζόλης κατά τις νυχτερινές ώρες. Σημαντικό ρόλο παίζει και η ώρα πρόσληψης των λιπαρών: γεύματα υψηλού λίπους τις απογευματινές ώρες σχετίστηκαν με επαγωγή του BMAL1 στο υποδόριο λίπος, αντανακλώντας την αυξημένη κυτταρική δραστηριότητα στον ιστό αυτό. Αν και η μελέτη νυχθημερινών διακυμάνσεων στις βιοχημικές παραμέτρους όπως γλυκόζη, ινσουλίνη και ελεύθερων λιπαρών οξέων χαρακτηρίζει αυτά τα ευρήματα, ενδιαφέροντα αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μελέτη των γονιδίων τους: τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ορού δε φάνηκαν να ακολουθούν κερκάδια διακύμανση, οι τιμές τους αντιστοιχούσαν στη διαιτητική πρόσληψη. Όμως φάνηκε πως τα ένζυμα για τη σύνθεση λιπαρών οξέων (FASN) παρουσίασαν κερκάδιο ρυθμό μετά από 6 εβδομάδες σε διαιτολόγιο LCHF. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για την έρευνα της κλινικής σημασίας της διατροφής στον ανθρώπινο κερκάδιο ρυθμό, ωστόσο συναντώνται διάφοροι

περιορισμοί: οι ορμόνες που φυσιολογικά εκκρίνονται με κερκάδιο ρυθμό, όπως η κορτιζόλη, είναι σημαντικό να προσδιορίζονται με ακρίβεια σε τέτοιες μελέτες, όπως και η πραγματοποίηση δειγματοληψιών σε ορισμένα διαδοχικά χρονικά σημεία του 24ώρου, προκειμένου να λαμβάνονται ευκρινώς αποτελέσματα που ακολουθούν συγκεκριμένα μοτίβα κερκάδιας διακύμανσης. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν ιδιαίτερα δυσχερή τη διεξαγωγή τέτοιων κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους.

Αντίθετα με τις κλινικές μελέτες, οι επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο δεν περιλαμβάνουν επεμβατικές διαδικασίες. Στην έρευνα του κερκάδιου ρυθμού, έχει ήδη διαπιστωθεί σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας του ύπνου και της κατανάλωσης κορεσμένων λιπαρών στην ηλικιακή ομάδα 20-64 ετών σε μελέτη κοόρτης. Στο μέλλον, αντίστοιχες έρευνες μπορούν να εστιάσουν και στις ώρες πρόσληψης των λιπαρών γευμάτων, αν για παράδειγμα επιδρούν διαφορετικά η πρωινή, απογευματινή και βραδινή κατανάλωση λίπους στη διάρκεια του ύπνου και στις άλλες παραμέτρους του κερκάδιου ρυθμού, όπως στην ώρα αφύπνισης. Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμο να προσδιοριστεί η “περίοδος δραστηριότητας” σε επίπεδο ανθρώπινου οργανισμού και να διερευνηθούν η επιδράσεις της πρόσληψης λιπαρών γευμάτων εντός ή εκτός αυτής. Οι περιορισμοί των επιδημιολογικών μελετών εντοπίζονται στη δυσκολία διαπίστωσης αιτιολογικής σχέσης. Για παράδειγμα αν η προτίμηση σε λιπαρά φαγητά προκαλεί μειωμένη διάρκεια ύπνου ή το αντίστροφο.

Αναφορικά με τις ερευνητικές εργασίες, εξερευνούν μηχανισμούς στο κεντρικό αλλά και στα περιφερικά ρολόγια. Οι *in vivo* μελέτες χορηγούν δίαιτα υψηλού λίπους σε πειραματόζωα και οι *in vitro* μελέτες εκθέτουν την κυτταροκαλλιέργεια του υπό διερεύνηση ιστό σε διαλύματα παλμιτικού, το κορεσμένο λιπαρό οξύ που απαντάται συχνότερα στη δυτικού τύπου δίαιτα. Στα κύτταρα του ήπατος, διαπιστώθηκε πως τα διαφορετικά είδη λιπαρών οξέων (κορεσμένα, μονο- και πολυ-ακόρεστα) έχουν και ξεχωριστές επιδράσεις στην έκφραση γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού, κυρίως στη μεταγραφή του BMAL1 και του PER2. Η μεταγραφή του BMAL1 περιορίζεται σημαντικά από το παλμιτικό, ωστόσο διαπιστώθηκαν και ενώσεις που μπορούν να αναστρέψουν αυτήν την επίδραση. Αντίθετα, στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, η μεταγραφή του BMAL1 αυξήθηκε μετά την έκθεση σε δόσεις παλμιτικού (πρόοδος φάσης και

αύξηση πλάτους έκφρασης), με παράλληλη επαγωγή μονοπατιών βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, γεγονός που υποδεικνύει την αυξημένη δραστηριότητα στο λιπώδη ιστό μετά την έκθεση σε κορεσμένα λίπη. Όμως, επί παρουσίας ουσιών με αντιφλεγμονώδη δράση, οι επιδράσεις αυτές περιορίστηκαν σημαντικά. Στον κικκάδιο ρυθμό του λιπώδους ιστού, τα κορεσμένα λίπη επεμβαίνουν στις διαδικασίες βιοσύνθεσης του λίπους και της φλεγμονής. Τα ρολόγια των μυικών κυττάρων επηρεάζονται από το κορεσμένο λίπος στην παχυσαρκία: μειώνεται η μεταγραφή των CLOCK, BMAL1, PER2, CRY2 στα ποντίκια και των CRY1 και DBP στον άνθρωπο. Αντίθετα, φάνηκε η ενεργοποίηση του NR1D2 μετά από επώαση σε ελαϊκό και μετά από απώλεια βάρους. Εκτός από τα ερεθίσματα πρόσληψης τροφής, ενδιαφέρουσα θα ήταν και η διερεύνηση της επίδρασης της άσκησης στο ρολόι του μυικού κυττάρου, όπως και για το μυοκαρδιακό κύτταρο. Οι επιδράσεις του κορεσμένου λίπους στον κικκάδιο ρυθμό του μυοκαρδίου δεν έχουν εξεταστεί, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις από μελέτη με χρήση λιπαρών γευμάτων είτε στην αρχή είτε στο τέλος της περιόδου δραστηριότητας των πειραματοζώων. Τα ρολόγια του νεφρού εξετάστηκαν στα ποδοκύτταρα: η παρουσία του γονιδίου PER3 φάνηκε να δρα προστατευτικά από τις δυσμενείς επιδράσεις του παλμιτικού. Το ίδιο γονίδιο παίζει σημαντικό ρόλο και στα β κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων: η έκφρασή του μειώθηκε όταν καλλιέργειες παγκρεατικών κυττάρων επώαστηκαν σε παλμιτικό. Η γλυκολιποτοξικότητα στα κύτταρα αυτά προσομοιάζει τις συνθήκες εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη: έχουν διαπιστωθεί μεταλλάξεις αυξημένου κινδύνου για τη νόσο σε γονίδια κικκάδιου ρυθμού (όπως του υποδοχέα της μελατονίνης). Αντίστοιχα, η κικκάδια έκκριση του GLP-1 περιορίστηκε σημαντικά από το παλμιτικό, όπως και το πλάτος του BMAL1. Στο κεντρικό ρολόι του υποθαλάμου, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα συμμετέχουν στην έκκριση των ορεξιόγόνων νευροπεπτιδίων (NPY και AgRP) και στη νευροφλεγμονή (μικρογλοία). Διαπιστώθηκε πως η φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου BMAL1 είναι απαραίτητη για την έκκριση του NPY: συνδέει τον κικκάδιο ρυθμό με τους μηχανισμούς της όρεξης. Το παλμιτικό επιδρώντας στο γονίδιο αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής NPY. Αντίστοιχα, στο μηχανισμό της νευροφλεγμονής, η έκφραση του γονιδίου BMAL1 είναι απαραίτητη για την ανταπόκριση της μικρογλοίας στη χορήγηση παλμιτικού.

Από τη μελλοντική έρευνα απομένει να διευκρινιστούν οι επιδράσεις των κορεσμένων λιπαρών στα υπόλοιπα περιφερικά ρολόγια (όπως του εντέρου και των γονάδων) και να

προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που είναι ικανές να προκαλέσουν τις διαταραχές αυτές, ανεξάρτητα του θερμιδικού περιεχομένου και της αντίστασης στην ινσουλίνη, της χρόνιας φλεγμονής και παχυσαρκίας. Οι υψηλές δόσεις παλμιτικού είναι βλαπτικές για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, συνεπώς θα πρέπει να δοκιμάζονται ξεχωριστά μικρότερες δόσεις προκειμένου να ελεγχθούν οι δράσεις του. Επιπλέον, καθώς αποκαλύπτονται περισσότεροι μηχανισμοί του κερκάδιου ρυθμού που επηρεάζονται από τη διατροφή, καλό θα ήταν να ελέγχονται παράλληλα και οι δράσεις μονο- και πολυ-ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως με την περίπτωση του DHA, που αποτρέπει την εμφάνιση των δυσμενών επιπτώσεων νευροφλεγμονής από το παλμιτικό στους νευρώνες του υποθαλάμου. Τέλος, αναμένεται να διερευνηθούν και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των γονιδίων του κερκάδιου ρυθμού στα ανθρώπινα κύτταρα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

3T3-L1 pre-adipocytes: κυτταρική σειρά προ-λιποκυττάρων ποντικού για καλλιέργειες λιπώδους ιστού

ACC: Acetyl CoA Carboxylase, καρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου A, ένζυμο- κλειδί στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων

AgRP: Agouti-Related Peptide, ορεξιογόνο νευροπεπτίδιο. Παράγεται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου από τους νευρώνες AgRP/NPY

AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β -d-ribofuranoside. Ανάλογο αδενοσίνης που δρα ως ενζυμικός ενεργοποιητής της AMPK

AMIC: Adult Mouse Ileal Crypt, κυτταροκαλλιέργειες από κρύπτες ειλεού ενήλικων ποντικών

AML-12: Alpha Mouse Liver 12, κυτταρική σειρά ήπατος φυσιολογικών ποντικών ηλικίας 3 μηνών

AMPK: AMP-activated protein kinase, ένζυμο που ενεργοποιείται από τα χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα ATP, δρα ως 'αισθητήρας' της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες CRY και PER

Amplitude: Πλάτος έκφρασης

ARNTL: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like, γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMAL1

ATPase B2: ATPase H⁺ Transporting V1 Subunit B2, διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από πολλές υπομονάδες και απαντάται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, μειώνοντας το pH των ενδοκυττάρων κυστιδίων τους

BMAL1: Brain and Muscle Arnt-Like protein-1, κύριος μεταγραφικός παράγοντας που (ως ετεροδιμερές με το CLOCK) ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων PER 1/ 2/ 3 (PERIOD 1,2,3) και CRY1, CRY2 (Cryptochrome 1,2). Κωδικοποιείται από το γονίδιο ARNTL

BMAL1-dLuc: λουσιφεράση συνδεδεμένη με το γονίδιο BMAL1 για τη διεξαγωγή δοκιμασιών βιοφωταύγειας

BMI: Body Mass Index, δείκτης μάζας σώματος

BV-2: κυτταρική σειρά μικρογλοίας με ιδιότητες που προσομοιάζουν της πρωτογενούς μικρογλοίας ποντικών

c-FOS: βλ. FOS

CAT: Catalase, καταλάση. Ένζυμο που εντοπίζεται στα υπεροξειδοσώματα σχεδόν όλων των κυττάρων και καταλύει τη μετατροπή της ρίζας υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, προστατεύοντας τα κύτταρα από την τοξική δράση αυτής της ρίζας

CAY 10591: ειδικός ενεργοποιητής της πρωτεΐνης SIRT1

CCN2 ή CTGF: connective tissue growth factor, εξωκυττάρια χημειοτακτική πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε διεργασίες φλεγμονής και μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων

CEBPA: CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha, γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί τη δεσμευτική πρωτεΐνη CCAAT/Enhancer-α. Συμμετέχει στην ομοιοστάση του σωματικού βάρους και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις της ενοχοποιούνται για οξεία μυελογενή λευχαιμία

CIART: Circadian Associated Repressor of Transcription, αναστέλλει τη μεταγραφή των CLOCK-BMAL1 και την αλληλεπίδρασή τους με την CREBBP. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 και η έκφρασή του παρουσιάζει αντίθετη φάση από το CLOCK-BMAL1

CID: clinical investigation day, ημέρα προσδιορισμού κλινικών παραμέτρων

CK1E: Casein Kinase 1 Epsilon, ευθύνεται για διαδικασίες αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA, φωσφορυλιώνει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Ρυθμίζει τη διάρκεια του κικαδίου ρυθμού μέσω φωσφορυλίωσης των PER 1 και 2 (PERIOD- περίοδος), ελέγχοντας τη ρυθμικότητα της έκφρασής τους, τη μεταφορά τους στον πυρήνα και την αποδόμησή τους

CLOCK: circadian locomotor output cycles kaput, κύριος μεταγραφικός παράγοντας που (ως ετεροδιμερές με το BMAL1) ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων PER 1/ 2/ 3 (PERIOD 1,2,3) και CRY1, CRY2 (Cryptochrome 1,2)

Compound C: αναστολέας της AMPK

COX5B: Cytochrome C Oxidase Subunit 5B, ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων

CPT1A: Carnitine Palmitoyltransferase 1A (ισομορφή ήπατος), καταλύει τη μεταφορά της ακυλομάδας των ακυλο-CoA μακράς αλύσου στην καρνιτίνη του μιτοχονδρίου για να χρησιμοποιηθεί στη β-οξείδωση

CREB: cAMP Response Element Binding Protein

CREBBP: CREB Binding Protein, μεταγραφικός παράγοντας που δρα ως δεσμευτική πρωτεΐνη του CREB. Ενισχύει τη μεταγραφή των NPAS2-BMAL1 και CLOCK-BMAL1

CRY: Cryptochrome 1 και Cryptochrome 2, γονίδια κερκάρου ρυθμού, ενεργοποιούνται σε όλους τους ιστούς, το CRY1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 και το CRY2 στο χρωμόσωμα 11

DBP: D-Box Binding PAR BZIP transcription factor ή Albumin D Box-Binding Protein. Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας PAR bZIP που προσδένεται στους εκκινητές γονιδίων της αλβουμίνης, του CYP2A4, του CYP2A5 και γονιδίων του κερκάρου ρυθμού, ελέγχοντας την έκφρασή τους. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19

DHA: δοκοσαεξανοϊκό οξύ, πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase (ή MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase). Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιεί πολλές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού. Κατά την ενεργοποίησή της μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί τους επόμενους γονιδιακούς στόχους. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22

EX527: αναστολέας της πρωτεΐνης SIRT1, χρησιμοποιείται σε κυτταροκαλλιέργειες με επώαση κυττάρων ήπατος ποντικού

FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4, γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Fatty Acid Binding Protein 4, η οποία ανήκει σε οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που προσδέχουν λιπαρά οξέα μακράς αλύσου και άλλες υδρόφοβες ομάδες. Ευνοεί τη σύνδεση του PPARγ με την ουβικουΐνη και την

επακόλουθη αποδόμησή του

FASN: Fatty Acid Synthase, καταλύει τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων μακράς αλύσου από μηλονυλο- και ακετυλο-συνένζυμο Α με την παρουσία NADPH

FK866: αναστολέας της πρωτεΐνης SIRT1, χρησιμοποιείται σε κυτταροκαλλιέργειες με επώαση κυττάρων ήπατος ποντικού

FOS: οικογένεια πρωτο-ογκογονιδίων που σχηματίζουν διμερή με την οικογένεια JUN και ως σύμπλοκα σχηματίζουν το μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Συμμετέχουν στις διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και απόπτωσης σε πολλούς ιστούς

GIP: Glucose-dependent Insulinotropic Peptide, πεπτίδιο που εκκρίνεται από τα εντεροενδοκρινή Κ-κύτταρα του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδος ως απόκριση στην παρουσία γλυκόζης και λιπαρών εντός του εντερικού σωλήνα (ινκρετίνη), διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης και ασκεί αντι-αποπτωτική δράση στα β-κύτταρα του παγκρέατος

GDAP1: Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1, πρωτεΐνη που ευθύνεται για τη λειτουργία των υπεροξυσωμάτων και των μιτοχονδρίων των νευρώνων. Μεταλλάξεις της εντοπίστηκαν σε περιπτώσεις ασθενών με νόσο Charcot-Marie-Tooth

GLP-1: Glucagon-like Peptide-1, πεπτίδιο που εκκρίνεται από τα εντεροενδοκρινή L-κύτταρα του λεπτού εντέρου ως απόκριση στην παρουσία τροφής στον εντερικό σωλήνα (ινκρετίνη), ενώ υπόκειται και σε ρύθμιση της κερκάδιας έκκρισης

GPX1: Glutathione Peroxidase 1, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καταλύει την αναγωγή ριζών υπεροξειδίου από τη γλουταθειόνη

GSH: Glutathione Synthetase, συνθετάση της γλουταθειόνης

Hera1: κυτταροκαλλιέργειες από ηπάτωμα ποντικών

HCLF: High Carbohydrate, Low Fat, δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακα και χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος

HFD: High-Fat Diet, δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος

IDH3A: Isocitrate Dehydrogenase (NAD(+)) 3 Catalytic Subunit Alpha, καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό

IMG: Immortalized Mouse Microglial Cell Line, κυτταρική σειρά από μικρογλοία ενηλίκων ποντικών. Τα κύτταρα φαγοκυτταρώνουν πρωτεΐνες με σφάλματα στην τριτοταγή τους δομή. Χρησιμοποιούνται για τη μελέτη φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών ερεθισμάτων, καθώς εκφράζουν ειδικούς δείκτες φλεγμονής που ανιχνεύονται από την κυτταρομετρία ροής

LCHF: Low Carbohydrate, High Fat, δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακα και υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος

LPL: Lipoprotein Lipase, λιποπρωτεϊνική λιπάση, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και διασπά τα τριγλυκερίδια

LPS: Lipopolysaccharides, βακτηριακή ενδοτοξίνη εξωτερικού τοιχώματος Gram αρνητικών βακτηρίων, υπεύθυνη για την κινητοποίηση της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή

mHypoE-37: Embryonic Mouse Hypothalamus Cell Line 37, σειρά νευρώνων υποθαλάμου ενήλικων ποντικών για κυτταροκαλλιέργειες

mHypoE-N44: Embryonic Mouse Hypothalamus Cell Line N44

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase (ή ERK: Extracellular Signal- Regulated Kinase). Κινάση που ενεργοποιεί πολλές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού. Κατά την ενεργοποίησή της μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί τους επόμενους γονιδιακούς στόχους. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22

MTT: Meal Tolerance Test, έτοιμο γεύμα προκαθορισμένης σύστασης που χρησιμοποιείται για τη διενέργεια δυναμικών δοκιμασιών του μεταβολισμού σε εθελοντές

MUFA: Mono-Unsaturated Fatty Acids, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

NAMPT: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase ή visfatin, το ένζυμο του πρώτου βήματος βιοσύνθεσης του NAD⁺ από νικοτιναμίδη

ND5: Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5, υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH της αναπνευστικής αλυσίδας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη

NDUFA: NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1, υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH της αναπνευστικής αλυσίδας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη

NF-κB: Nuclear Factor κB, μεταγραφικός παράγοντας που επάγει την έκφραση γονιδίων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών

NPAS2: Neuronal PAS Domain Protein 2, ενεργοποιητής μεταγραφής, διαμορφώνει σύμπλοκο με το BMAL1 και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των κύριων γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού PER 1,2,3 και CRY 1,2. Το ετεροδιμερές NPAS2/BMAL1 ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης που είναι απαραίτητη για τη διαμόρφωση του κύκλου φωτός και σκότους από τον αμφιβληστροειδή και ευθύνεται για την ομοίωση του ύπνου και την πρόσληψη τροφής με βάση την αναμενόμενη διαθεσιμότητα γευμάτων

NPY: Neuropeptide-Y, ορεξιογόνο νευροπεπτίδιο, παράγεται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου από τους νευρώνες AgRP/NPY

NR1D1: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1, γονίδιο στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα REV-ERB α, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού

NR1D2: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 2, γονίδιο στο χρωμόσωμα 3 και κωδικοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα REV-ERB β, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων του κιρκάδιου ρυθμού

P70S6K: κινάση πρωτεΐνης 70, στόχος του μονοπατιού mTOR, φωσφορυλιώνει το BMAL1 με ρυθμό ώστε να συνδέει την πρωτεϊνοσύνθεση με τον κιρκάδιο ρυθμό

PER: γονίδιο κιρκάδιου ρυθμού που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Period που όταν εκφράζεται αναστέλλει τη μεταγραφή του BMAL1

PUFA: Poly-Unsaturated Fatty Acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

REV-ERB α: μεταγραφικός παράγοντας υπο-οικογένειας 1 (nuclear receptor subfamily 1) που περιορίζει τη μεταγραφή γονιδίων clock και κυρίως του ARNTL, ενώ ρυθμίζει και τη μεταγραφή γονιδίων του μεταβολισμού λιπιδίων. Κωδικοποιείται από το γονίδιο NR1D1

REV-ERB β: μεταγραφικός παράγοντας υπο-οικογένειας 1 (nuclear receptor subfamily 1) που περιορίζει τη μεταγραφή γονιδίων clock και κωδικοποιείται από το γονίδιο NR1D2

ROR α: RAR Related Orphan Receptor A, πυρηνικός υποδοχέας που προσδένεται ως μονομερές στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης, του κικκάρδιου ρυθμού και του μεταβολισμού λιπιδίων, στεροειδών και ξενοβιοτικών. Μπορεί να αναστείλει τη λιπογένεση μέσω ανταγωνισμού με τον PPARγ για την πρόσδεση στο DNA

SFA: Saturated Fatty Acids, κορεσμένα λιπαρά οξέα

SIRT1: γονίδιο στο χρωμόσωμα 10, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Sirtuin-1 (NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-1), αποακετυλάση εξαρτώμενη από το NAD, η οποία εμπλέκεται σε μονοπάτια ομοιόστασης λιπιδίων και χοληστερόλης, ρυθμίζει τη δραστηριότητα του συμπλόκου πρωτεϊνών CLOCK- BMAL1, το αποσταθεροποιεί και αποακετυλιώνει το BMAL1, αναστέλλοντας τη μεταγραφή του

SCN: Suprachiasmatic Nucleus, υπερχιασματικός πυρήνας υποθαλάμου

SOD1: Superoxide Dismutase 1, υπεροξειδική δισμουτάση, ένζυμο που εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου σε πολλούς τύπους κυττάρων

TBF: total body fat, ολικό λίπος σώματος

TEF: Thyrotroph Embryonic Factor, Transcription Factor, PAR BZIP Family Member. Μεταγραφικός παράγοντας που κατά την εμβρυϊκή ζωή ευθύνεται για τη διαμόρφωση των θυρεοτρόφων κυττάρων του πρόσθιου λοβού της υποφύσεως και την εμφάνιση της ορμόνης TSHβ. Κατά την ενήλικη ζωή εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ τα επίπεδά του στο ήπαρ και το νεφρό ακολουθούν κικκάρδιο ρυθμό

TLR4: Toll-Like Receptor 4, υποδοχέας που ενεργοποιείται από το παλμιτικό και συμμετέχει σε μονοπάτια φλεγμονής

WHR: Waist-to-Hip Ratio, λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. PRISMA STATEMENT (2020). Προσπελάστηκε στις 3 Ιουνίου 2022 στο <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Checklist.aspx>
2. Herrera-Marcos LV, Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Transcriptomics and the Mediterranean Diet: A Systematic Review. *Nutrients*. 2017;9(5):E472. doi:10.3390/nu9050472
3. Paula ABR, de Coutinho Miranda D, Nogueira FT, de Lauro Castrucci AM, Isoldi MC. Does a high-fat diet affect the circadian clock, or is it the other way around? A systematic review. *Nutr Res*. 2020;84:1-13. doi:10.1016/j.nutres.2020.10.003
4. McCommis KS, Butler AA. The Importance of Keeping Time in the Liver. *Endocrinology*. 2021 Feb 1;162(2):bqaa230. doi: 10.1210/endocr/bqaa230
5. Lieu CV, Loganathan N, Belsham DD. Mechanisms Driving Palmitate-Mediated Neuronal Dysregulation in the Hypothalamus. *Cells*. 2021 Nov 11;10(11):3120. doi:10.3390/cells10113120
6. Straat ME, Hogenboom R, Boon MR, Rensen PCN, Kooijman S. Circadian control of brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021Aug;1866(8):158961. doi: 10.1016/j.bbalip.2021.158961
7. Romaní-Pérez M, Bullich-Vilarrubias C, López-Almela I, Liébana-García R, Olivares M, Sanz Y. The Microbiota and the Gut-Brain Axis in Controlling Food Intake and Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021 May 29;22(11):5830. doi:10.3390/ijms22115830
8. Martchenko A, Brubaker PL. Effects of Obesogenic Feeding and Free Fatty Acids on Circadian Secretion of Metabolic Hormones: Implications for the Development of Type 2 Diabetes. *Cells*. 2021 Sep 3;10(9):2297. doi: 10.3390/cells10092297
9. Schmalte V, Lorentz A. Role of the microbiota in circadian rhythms of the host. *Chronobiol Int*. 2020 Mar;37(3):301-310. doi:10.1080/07420528.2020.1726374
10. Butler TD, Gibbs JE. Circadian Host-Microbiome Interactions in Immunity. *Front Immunol*. 2020 Aug 14;11:1783. doi: 10.3389/fimmu.2020.01783

11. Frazier K, Chang EB. Intersection of the Gut Microbiome and Circadian Rhythms in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2020 Jan;31(1):25-36. doi:10.1016/j.tem.2019.08.013
12. Oh HYP, Visvalingam V, Wahli W. The PPAR-microbiota-metabolic organ trilogy to fine-tune physiology. *FASEB J.* 2019 Sep;33(9):9706-9730. doi:10.1096/fj.201802681RR
13. Bohan R, Tianyu X, Tiantian Z, Ruonan F, Hongtao H, Qiong W, Chao S. Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. *J Nutr Biochem.* 2019 Feb;64:206-217. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.10.020
14. Tse EK, Salehi A, Clemenzi MN, Belsham DD. Role of the saturated fatty acid palmitate in the interconnected hypothalamic control of energy homeostasis and biological rhythms. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018 Aug 1;315(2):E133-E140. doi: 10.1152/ajpendo.00433.2017
15. Engin A. Circadian Rhythms in Diet-Induced Obesity. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:19-52. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_2
16. Young ME. Circadian Control of Cardiac Metabolism: Physiologic Roles and Pathologic Implications. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2017 Jan-Mar;13(1):15-19. doi: 10.14797/mdcj-13-1-15
17. Broussard JL, Devkota S. The changing microbial landscape of Western society: Diet, dwellings and discordance. *Mol Metab.* 2016 Jul 21;5(9):737-42. doi: 10.1016/j.molmet.2016.07.007
18. Gooley JJ. Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc.* 2016 Nov;75(4):440-450. doi: 10.1017/S0029665116000288
19. Oosterman JE, Kalsbeek A, la Fleur SE, Belsham DD. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Mar1;308(5):R337-50. doi: 10.1152/ajpregu.00322.2014
20. Bray MS, Young ME. Regulation of fatty acid metabolism by cell autonomous circadian clocks: time to fatten up on information? *J Biol Chem.* 2011 Apr8;286(14):11883-9. doi: 10.1074/jbc.R110.214643
21. Kessler K, Gerl MJ, Hornemann S, et al. Shotgun Lipidomics Discovered Diurnal Regulation of Lipid Metabolism Linked to Insulin Sensitivity in Nondiabetic Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(5):dgz176. doi:10.1210/clinem/dgz176

22. Lemay DG, Huang S, Huang L, Alkan Z, Kirschke C, Burnett DJ, Wang YE, Hwang DH. Temporal changes in postprandial blood transcriptomes reveal subject-specific pattern of expression of innate immunity genes after a high-fat meal. *J Nutr Biochem*. 2019 Oct;72:108209. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.06.007
23. Pivovarov O, Jürchott K, Rudovich N, et al. Changes of Dietary Fat and Carbohydrate Content Alter Central and Peripheral Clock in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2291-2302. doi:10.1210/jc.2014-3868
24. Magkos F, Smith GI, Reeds DN, Okunade A, Patterson BW, Mittendorfer B. One day of overfeeding impairs nocturnal glucose but not fatty acid homeostasis in overweight men. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Feb;22(2):435-40. doi: 10.1002/oby.20562
25. Milagro FI, Gómez-Abellán P, Campión J, Martínez JA, Ordovás JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiol Int*. 2012;29(9):1180-1194. doi: 10.3109/07420528.2012.719967
26. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 2012;15(6):848-860. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019
27. Dashti HS, Follis JL, Smith CE, et al. Habitual sleep duration is associated with BMI and macronutrient intake and may be modified by CLOCK genetic variants. *Am J Clin Nutr*. 2015 Jan;101(1):135-43. doi: 10.3945/ajcn.114.095026
28. Hsieh MC, Yang SC, Tseng HL, Hwang LL, Chen CT, Shieh KR. Abnormal expressions of circadian clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *Int J Obes (Lond)* 2009; 34(2):227–39. doi: 10.1038/ijo.2009. 228
29. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab*. 2007; 6(5):414–21. doi: S1550-4131(07)00266-5 [pii] doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.006
30. Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A. High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int*. 2006; 23(5):905–14. doi: M6X0146501105014
31. Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, et al. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*. 2013; 155(7):1464–78. doi: 10.1016/j.cell.2013.11. 034

32. Tong X, Zhang D, Arthurs B, et al. Palmitate Inhibits SIRT1-Dependent BMAL1/CLOCK Interaction and Disrupts Circadian Gene Oscillations in Hepatocytes. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130047. doi:10.1371/journal.pone.0130047
33. Tal Y, Chapnik N, Froy O. Non-obesogenic doses of fatty acids modulate the functionality of the circadian clock in the liver. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(9):1795-1806. doi:10.1007/s00018-019-03023-6
34. Guo R, Zhao B, Wang Y, et al. Cichoric Acid Prevents Free-Fatty-Acid-Induced Lipid Metabolism Disorders via Regulating Bmal1 in HepG2 Cells. *J Agric Food Chem*. 2018;66(37):9667-9678. doi:10.1021/acs.jafc.8b02147
35. Li J, Wei L, Zhao C, et al. Resveratrol Maintains Lipid Metabolism Homeostasis via One of the Mechanisms Associated with the Key Circadian Regulator Bmal1. *Molecules*. 2019;24(16):E2916. doi:10.3390/molecules24162916
36. Qi G, Guo R, Tian H, et al. Nobiletin protects against insulin resistance and disorders of lipid metabolism by reprogramming of circadian clock in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(6):549-562. doi:10.1016/j.bbaliip.2018.02.009
37. Heo JI, Yoon DW, Yu JH, et al. Melatonin improves insulin resistance and hepatic steatosis through attenuation of alpha-2-HS-glycoprotein. *J Pineal Res*. 2018;65(2):e12493. doi:10.1111/jpi.12493
38. Tognini P, Murakami M, Liu Y, et al. Distinct Circadian Signatures in Liver and Gut Clocks Revealed by Ketogenic Diet. *Cell Metab*. 2017;26(3):523-538.e5. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.015
39. Tal Y, Chapnik N, Froy O. Non-obesogenic doses of palmitate disrupt circadian metabolism in adipocytes. *Adipocyte*. 2019;8(1):392-400. doi:10.1080/21623945.2019.1698791
40. Kim SM, Neuendorff N, Chapkin RS, Earnest DJ. Role of Inflammatory Signaling in the Differential Effects of Saturated and Poly-unsaturated Fatty Acids on Peripheral Circadian Clocks. *EBioMedicine*. 2016;7:100-111. doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.037
41. Pivovarova O, Gögebakan Ö, Sucher S, et al. Regulation of the clock gene expression in human adipose tissue by weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(6):899-906. doi:10.1038/ijo.2016.34

42. Parsanathan R, Jain SK. Hydrogen sulfide regulates circadian-clock genes in C2C12 myotubes and the muscle of high-fat-diet-fed mice. *Arch Biochem Biophys.* 2019;672:108054. doi:10.1016/j.abb.2019.07.019
43. Budai Z, Balogh L, Sarang Z. Short-term high-fat meal intake alters the expression of circadian clock-, inflammation-, and oxidative stress-related genes in human skeletal muscle. *Int J Food Sci Nutr.* 2019;70(6):749-758. doi:10.1080/09637486.2018.1557607
44. Sardon Puig L, Pillon NJ, Näslund E, Krook A, Zierath JR. Influence of obesity, weight loss, and free fatty acids on skeletal muscle clock gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;318(1):E1-E10. doi:10.1152/ajpendo.00289.2019
45. Lassiter DG, Sjögren RJO, Gabriel BM, Krook A, Zierath JR. AMPK activation negatively regulates GDAP1, which influences metabolic processes and circadian gene expression in skeletal muscle. *Mol Metab.* 2018;16:12-23. doi:10.1016/j.molmet.2018.07.004
46. Gutierrez-Monreal MA, Harmsen JF, Schrauwen P, Esser KA. Ticking for Metabolic Health: The Skeletal-Muscle Clocks. *Obesity (Silver Spring).* 2020;28 Suppl 1(Suppl 1):S46-S54. doi:10.1002/oby.22826
47. Peliciari-Garcia RA, Goel M, Aristorenas JA, et al. Altered myocardial metabolic adaptation to increased fatty acid availability in cardiomyocyte-specific CLOCK mutant mice. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(10):1579-1595. doi:10.1016/j.bbali.2015.12.012
48. Boucher A, Lu D, Burgess SC, et al. Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27263-27271. doi:10.1074/jbc.M401167200
49. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 2009;41: 82-88. doi:10.1038/ng.288
50. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 2009;41:89-94. doi: 10.1038/ng.277
51. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 2009;41: 77-81. doi:10.1038/ng.290

52. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):105-16. doi: 10.1038/ng.520
53. Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS, Blum B, Weitz CJ. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia.* 2011;54(1):120-124. doi:10.1007/s00125-010-1920-8
54. Stamenkovic JA, Olsson AH, Nagorny CL, et al. Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism.* 2012;61(7):978-985. doi:10.1016/j.metabol.2011.11.013
55. Tain YL, Lin YJ, Sheen JM, et al. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. *Nutrients.* 2017;9(4):E357. doi:10.3390/nu9040357
56. Ansermet C, Centeno G, Nikolaeva S, Maillard MP, Pradervand S, Firsov D. The intrinsic circadian clock in podocytes controls glomerular filtration rate. *Sci Rep.* 2019;9(1):16089. doi:10.1038/s41598-019-52682-9
57. Peng L, Zhang K, Chen K. Period circadian clock 3 inhibits palmitic acid-induced oxidative stress and inflammatory factor secretion in podocytes. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2021;46(11):1177-1186. doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.210019
58. Drucker DJ. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab.* 2018 Apr 3;27(4):740-756. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.001
59. Biancolin A.D., Martchenko A., Mitova E., Gurses P., Michalchyshyn E., Chalmers J.A., Doria A., Mychaleckyj J.C., Adriaenssens A.E., Reimann F., et al. The core clock gene, *Bmal1*, and its downstream target, the SNARE regulatory protein secretagogin, are necessary for circadian secretion of glucagon-like peptide-1. *Mol. Metab.* 2020;31:124–137. doi: 10.1016/j.molmet.2019.11.004
60. Gil-Lozano M, Wu WK, Martchenko A, Brubaker PL. High-Fat Diet and Palmitate Alter the Rhythmic Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 by the Rodent L-cell. *Endocrinology.* 2016 Feb;157(2):586-99. doi: 10.1210/en.2015-1732
61. Martchenko A, Oh RH, Wheeler SE, Gurses P, Chalmers JA, Brubaker PL. Suppression of circadian secretion of glucagon-like peptide-1 by the saturated fatty acid, palmitate. *Acta Physiol (Oxf).* 2018 Apr;222(4):e13007. doi: 10.1111/apha.13007

62. Galindo Muñoz JS, Jiménez Rodríguez D, Hernández Morante JJ. Diurnal rhythms of plasma GLP-1 levels in normal and overweight/obese subjects: lack of effect of weight loss. *J Physiol Biochem*. 2015 Mar;71(1):17-28. doi: 10.1007/s13105-014-0375-7
63. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(1):149-158. doi:10.1038/ijo.2016.183
64. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougère F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):569-74. doi: 10.1038/nature02440
65. Fick LJ, Fick GH, Belsham DD. Palmitate alters the rhythmic expression of molecular clock genes and orexigenic neuropeptide Y mRNA levels within immortalized, hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Sep 30;413(3):414-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.103
66. Clemenzi MN, Martchenko A, Loganathan N, Tse EK, Brubaker PL, Belsham DD. Analysis of Western diet, palmitate and BMAL1 regulation of neuropeptide Y expression in the murine hypothalamus and BMAL1 knockout cell models. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;507:110773. doi:10.1016/j.mce.2020.110773
67. Fick LJ, Belsham DD. Nutrient sensing and insulin signaling in neuropeptide- expressing immortalized, hypothalamic neurons: a cellular model of insulin resistance. *Cell Cycle*. 2010;9:3186-93
68. Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*. 2015;45:171. doi: 10.1016/j.bbi.2014.11.009
69. Wang XL, Wolff SEC, Korpel N, et al. Deficiency of the Circadian Clock Gene *Bmal1* Reduces Microglial Immunometabolism. *Front Immunol*. 2020;11:586399. doi:10.3389/fimmu.2020.586399
70. Milanova IV, Kalsbeek MJT, Wang XL, et al. Diet-Induced Obesity Disturbs Microglial Immunometabolism in a Time-of-Day Manner. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:424. doi:10.3389/fendo.2019.00424
71. Tran A, He W, Jiang N, Chen JTC, Belsham DD. NAMPT and BMAL1 Are Independently Involved in the Palmitate-Mediated Induction of Neuroinflammation in Hypothalamic Neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:351. doi:10.3389/fendo.2020.00351

72. Kim SM, McIlwraith EK, Chalmers JA, Belsham DD. Palmitate Induces an Anti-Inflammatory Response in Immortalized Microglial BV-2 and IMG Cell Lines that Decreases TNF α Levels in mHypoE-46 Hypothalamic Neurons in Co-Culture. *Neuroendocrinology*. 2018;107(4):387-399. doi:10.1159/000494759

73. Greco JA, Oosterman JE, Belsham DD. Differential effects of omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid and palmitate on the circadian transcriptional profile of clock genes in immortalized hypothalamic neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307: R1049–R60

74. Tse EK, Belsham DD. Palmitate induces neuroinflammation, ER stress, and Pomc mRNA expression in hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neurons through novel mechanisms that are prevented by oleate. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;472:40-49. doi:10.1016/j.mce.2017.11.017