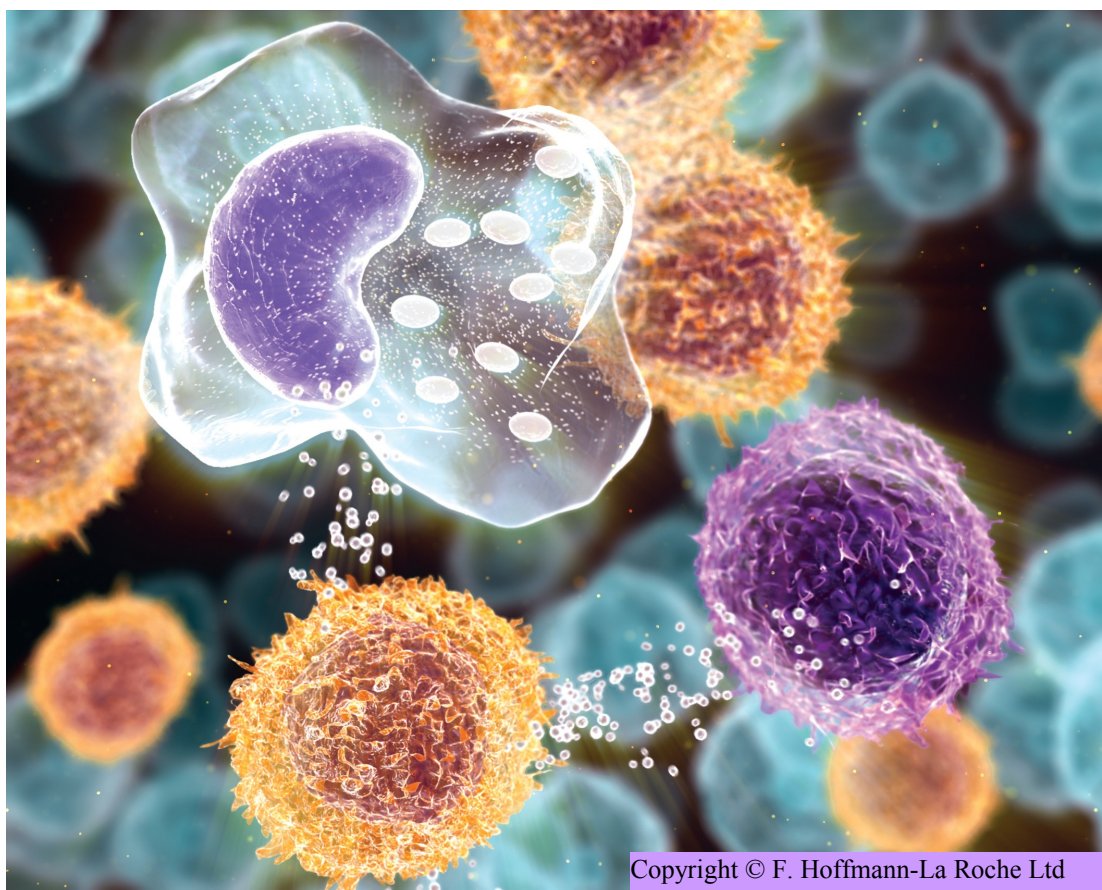


ΣΧΟΙΝΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ 20637

ΘΕΜΑ:
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΕ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ
ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2010
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΔΙΔΑΣΚΩΝ: ΔΕΔΟΥΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΑΝΑΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.2 ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	10
1.2.1 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ	11
1.2.2 ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΣ	14
1.2.3 ΕΠΠΤΩΣΕΙΣ	17
1.2.4 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	18
1.2.4.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	19
1.2.4.2 ΔΙΑΤΡΟΦΗ	20
2. ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ	22
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ	23
2.2.1 ΦΑΙΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ	23
2.2.2 ΛΕΥΚΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ	23
3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ	25
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
3.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	26
3.3 ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ – ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ	27
3.3.1 ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	27
3.3.2 ΥΠΟΞΙΑ	27
3.3.3 ΛΙΠΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	27
4. ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ	28
4.1 ΣΠΛΑΧΝΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΡΙΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ Η ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	28
4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΛΕΥΚΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ	30
4.3 ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	30
4.4 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	31
5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ – α (TNF-α)	32
5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	32
5.2 ΓΟΝΙΔΙΟ	32
5.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ	32
5.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	33
5.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	34
5.5.1 ΓΕΝΙΚΑ	34
5.5.2 TNF-α ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	34
5.5.3 TNF-α ΚΑΙ ΚΑΧΕΞΙΑ	35
6. ΛΕΠΤΙΝΗ	37
6.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	37
6.2 ΓΟΝΙΔΙΟ	37
6.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ	38
6.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	38
6.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	39

6.5.1 ΓΕΝΙΚΑ	39
6.5.2 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	40
6.5.3 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	41
6.5.4 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ	41
7. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 6 (IL-6)	43
7.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	43
7.2 ΓΟΝΙΔΙΟ	43
7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ	44
7.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	44
7.4.1 ΓΕΝΙΚΑ	44
7.4.2 Η IL-6 ΩΣ ΣΗΜΑ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΛΙΠΟΥΣ ΚΑΙ Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΤΗΣ ΡΟΛΟΣ	45
7.4.3 IL-6 ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ	45
8. ΒΙΣΦΑΤΙΝΗ	47
8.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	47
8.2. ΓΟΝΙΔΙΟ	47
8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ	47
8.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	48
8.4.1 ΓΕΝΙΚΑ	48
8.4.2 ΒΙΣΦΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ	49
9. ΑΛΛΕΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΟΚΙΝΕΣ	50
9.1 ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ	50
9.2 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 2	51
9.3 ΡΕΖΙΣΤΙΝΗ	51
Β. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
10. ΣΚΟΠΟΣ	52
11. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	52
11.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	52
11.2 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ	53
11.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	54
11.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	54
11.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMC's)	54
11.3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΑΙΜΑ	55
11.3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ PBMC's	56
11.3.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ	57
11.3.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	58
11.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΠΟΛΥΤΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (ABSOLUTE REAL TIME – PCR)	61
11.4.1 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ	61
11.4.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ cDNA	61
11.4.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ABSOLUTE REAL TIME – PCR	61
11.4.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	64
11.4.5 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	65
11.4.6 ΑΠΟΛΥΤΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	66
11.5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (ELISA)	67

11.5.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ELISA	67
11.5.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ ELISA	69
11.5.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	72
11.6 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	74
11.7 ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ	74
11.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	74
Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
12. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ	75
13. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
13.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ABSOLUTE REAL TIME – PCR	76
13.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ELISA	77
13.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	78
13.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	79
13.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	81
14. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παιδική παχυσαρκία αποτελεί ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα της παγκόσμιας υγείας στον 21^ο αιώνα. Ο επιπολασμός της παιδικής παχυσαρκίας έχει αυξηθεί εξαιρετικά επικίνδυνα και όπως καταγράφεται το 2007, 22 εκατομμύρια παιδιά κάτω από την ηλικία των 5 ετών ήταν υπέρβαρα, παγκοσμίως. Τα υπέρβαρα και παχύσαρκα παιδιά είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν από πολύ νωρίς ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, καρδιαγγειακά νοσήματα, η υπέρταση και υπερλιπιδαιμία ενώ ακόμα πιο ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι είναι πολύ πιθανόν να παραμείνουν παχύσαρκα και κατά την ενήλικη ζωή τους. Το φαινόμενο αυτό, ωστόσο, δεν πρέπει και δεν μπορεί να αποδοθεί σε μία και μόνη αιτία. Αντιθέτως, η παχυσαρκία, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών αλληλεπιδράσεων, μεταξύ του γενετικού υπόβαθρου και των περιβαλλοντικών παραγόντων. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των παραγόντων που συνεργούν είναι η δημιουργία ενός θετικού ισοζυγίου ενέργειας με συνέπεια την αύξηση βάρους.

Όλο και περισσότερα ευρήματα υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ παχυσαρκίας και φλεγμονής στους ενήλικες αλλά και στα παιδιά. Ο λιπώδης ιστός δεν θεωρείται πια ως ένα όργανο με κύρια λειτουργία την αποθήκευση λίπους. Αντίθετα, είναι εξακριβωμένο πλέον ότι συμμετέχει σε σημαντικό ποσοστό στην ενεργειακή και λιπιδική ομοιόσταση, στους ανοσολογικούς μηχανισμούς άμυνας και τη φλεγμονή μέσω των ορμονών και των κυτταροκινών που εκκρίνει. Οι κυτταροκίνες του λιπώδους ιστού, όπως είναι η λεπτίνη και η βισφατίνη εμπλέκονται σε πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια, μεταξύ των οποίων στο λιπιδικό μεταβολισμό και τις φλεγμονώδεις διαδικασίες με άμεσο ή άμεσο τρόπο. Η λεπτίνη, είναι μία από τις πρώτες λιποκυτταροκίνες που μελετήθηκαν και κωδικοποιεί την παραγωγή πρωτεΐνης η οποία συντίθεται κυρίως από το λιπώδη ιστό. Το γονίδιο αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ένα γονίδιο, η απουσία του οποίου προκαλούσε παχυσαρκία σε ποντικούς. Έκτοτε, διερευνάται ο ρόλος του μορίου αυτού και η συμβολή του στην ανθρώπινη παχυσαρκία χωρίς ακόμα να έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος της. Επιπλέον, το γεγονός ότι η δομή και η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής είναι παρόμοια με αυτή των κυτταροκινών, κατά την απόκριση στη φλεγμονή, διεγείρει το ερώτημα κατά πόσο όντως η λεπτίνη συμμετέχει ενεργά στη φλεγμονώδη διαδικασία. Όσον αφορά στη συμμετοχή της στη φλεγμονώδη διαδικασία, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά, προκαλώντας έτσι το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης σε ειδικά φλεγμονώδη κύτταρα, όπως είναι τα περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος.

Κυτταροκίνες, όπως είναι η IL-6 και ο TNFα, οι οποίες παράγονται κυρίως από τα φλεγμονώδη κύτταρα, εκκρίνονται επίσης από το λιπώδη ιστό. Επιπλέον, τα μακροφάγα που συσσωρεύονται στον ιστό αποτελούν πηγή για ένα μέρος των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τον ιστό αυτό και συμβάλλουν στην αύξηση των λιποκυτταροκινών που εκκρίνονται κατά τη φλεγμονή. Η βισφατίνη αποτελεί μία ακόμα, καινούργια λιποκυτταροκίνη. Αν και υπάρχουν έρευνες με τα πρώτα αποτελέσματα για τη σχέση της με την παχυσαρκία, ο βιολογικός της ρόλος παραμένει ακόμα εν πολλοίς άγνωστος. Εκτός από το λιπώδη ιστό εκφράζεται και από τα λεμφοκύτταρα και συγκεκριμένα από τα ουδετερόφιλα μετά από διέγερση από φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως είναι ο TNFα, ενώ η παραγωγή της φαίνεται ότι ρυθμίζεται εν μέρει από την IL-6. Έτσι, το γεγονός ότι η βισφατίνη αυξάνεται σε πολλές φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, τα σηψαιμικά επεισόδια και ο διαβήτης τύπου 2, φανερώνει ένα πιθανό ρόλο της βισφατίνης στη φλεγμονή παράλληλα με την κατάσταση παχυσαρκίας και χρίζει

περαιτέρω μελέτης για την διευκρίνιση της σχέσης μεταξύ των μεταβολικών και φλεγμονωδών δράσεών της.

Ο λιπώδης ιστός συμμετέχει ενεργά στον λιπιδιακό μεταβολισμό και παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς τα λιπαρά οξέα από τα οποία αποτελείται, έχει βρεθεί, ότι αντιπροσωπεύουν τη μακροχρόνια διατροφική πρόσληψη λιπαρών οξέων. Δεν είναι λίγα τα ευρήματα τα οποία υποστηρίζουν ότι η σύσταση του ορού σε λιπαρά οξέα επηρεάζει τη έκφραση διαφόρων γονιδίων φανερώνοντας έτσι μια αλληλεπίδραση ανάμεσα στα γονίδια και τη διατροφή. Ωστόσο, μέχρι στιγμής αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι ισχύει και για τα λιπαρά οξέα του λιπώδους ιστού καθώς δεν υπάρχουν μελέτες που να καθορίζουν το ποσοστό και τον μηχανισμό της επίδρασης της λιπιδικής σύστασης του λιπώδους ιστού στην έκφραση των λιποκυτταροκινών.

Σκοπός της δικής μας μελέτης ήταν η ποσοτική ανάλυση των κυτταροκινών του λιπώδους ιστού και των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος και η συσχέτιση τους με τις αντίστοιχες κυκλοφορούμενες πρωτεΐνες στο πλάσμα καθώς και η συσχέτισή τους με τα λιπαρά οξέα. Στη μελέτη έλαβαν μέρος 31 παιδιά ηλικίας 7-14 ετών τα οποία είχαν εισαχθεί στο νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία. Πραγματοποιήθηκε καταγραφή ανθρωπομετρικών στοιχείων, λήψη τμήματος υποδόριου λιπώδους ιστού για απομόνωση RNA ενώ λήφθηκε δείγμα αίματος για απομόνωση πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων, από τα οποία στη συνέχεια έγινε απομόνωση RNA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των IL-6, TNFα και Visfatin στους δύο ιστούς. Όσον αφορά στο ΔΜΣ, φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με το mRNA του γονιδίου visfatin και τη συγκέντρωση της Leptine στο πλάσμα σε αντίθεση με τον TNFα με τον οποίο συσχετίζεται αρνητικά. Στο λιπώδη ιστό τα γονίδια leptin και TNFα φάνηκε να σχετίζονται θετικά. Τέλος, αρκετές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φαίνεται να υπάρχουν ανάμεσα στα μετάγραφα των γονιδίων και συγκεκριμένες ομάδες λιπαρών οξέων όπως είναι τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα, τα ω3 και τα ω9.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος “παχυσαρκία” αναφέρεται στη σωματική κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από τη μαζική συσσώρευση λιπώδους μάζας σε σημείο που μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για την υγεία, οδηγώντας σε μικρότερο προσδόκιμο ζωής ή / και αυξημένη επίπτωση άλλων νοσημάτων (1,2). Ο Δείκτης Μάζας Σώματος ($BMI = w/h^2$) είναι ένα εργαλείο που συνδυάζει το βάρος με το ύψος, ώστε να χωρίσει τα άτομα σε νορμοβαρείς (18,5 – 24,9), υπέρβαρους (25 – 29,9) και παχύσαρκους (30+) (1).

Η παχυσαρκία αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης διαφόρων νοσημάτων, ιδιαίτερα καρδιαγγειακών, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, υπνικής άπνοιας, ορισμένων μορφών καρκίνου και οστεοαρθρίτιδας. Τις περισσότερες φορές η παχυσαρκία προκαλείται από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως η υπερβολική πρόσληψη θερμίδων μέσω της τροφής, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και η γενετική προδιάθεση. Σπανιότερα, το αίτιο μπορεί να είναι κάποια ενδοκρινολογική διαταραχή, φαρμακευτική αγωγή ή και ψυχιατρική νόσος. Στοιχεία που να αποδεικνύουν πως υπάρχουν παχύσαρκοι άνθρωποι που παίρνουν βάρος ενώ προσλαμβάνουν μικρές ποσότητες τροφής λόγω χαμηλού μεταβολικού ρυθμού δεν υπάρχουν. Η ενεργειακή κατανάλωση των παχύσαρκων ατόμων είναι αρκετά μεγαλύτερη από αντίστοιχα νορμοβαρή άτομα, εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται για τη διατήρηση της αυξημένης σωματικής τους μάζας.(3,4)

Ο επιπολασμός καθώς και η βαρύτητα της παχυσαρκίας αυξάνονται με ανησυχητικό βαθμό στις δυτικές κοινωνίες, και υπολογίζεται πως το 32% του πληθυσμού είναι υπέρβαροι ($\Delta.M.\Sigma. >25 \text{ kg/m}^2$) ή παχύσαρκοι ($\Delta.M.\Sigma. >30 \text{ kg/m}^2$) (5). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) προβλέπει πως το υπερβάλλον βάρος σύντομα θα αντικαταστήσει τα παραδοσιακά ζητήματα δημόσιας υγείας, όπως ο υποσιτισμός και οι μολυσματικές ασθένειες, ως η πιο σημαντική αιτία κακής υγείας (6), η οποία ταυτόχρονα έχει μεγάλο κόστος (7).

Η παχυσαρκία αποτελεί στις μέρες μας πρωταρχικό πρόβλημα δημόσιας υγείας και σημαντικό παράγοντα κινδύνου νοσηρότητας και θνησιμότητας (8). Πρόσφατες μελέτες, εκτιμούν πως στην Ελλάδα τα ποσοστά υπέρβαρου και

παχυσαρκίας αγγίζουν το 22% στους άντρες και το 12% στις γυναίκες (9) και παράλληλα επισημαίνεται, πως ο αυξανόμενος ρυθμός του ποσοστού παχυσαρκίας στον ενήλικο Ελληνικό πληθυσμό θα πρέπει άμεσα να αποτελέσει στόχο πρωτογενούς πρόληψης.

Σε παχύσαρκα άτομα, φαίνεται να υποβόσκει μία χαμηλού βαθμού συστηματική φλεγμονώδης κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από μία μέτρια, άλλα χρόνια αύξηση μίας ομάδας μορίων (λιποκυτταροκίνες), οι οποίες πέρα από τη δράση τους σαν προ-φλεγμονώδεις ή αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες, παρουσιάζουν και διάφορες άλλες μεταβολικές λειτουργίες, σχετιζόμενες με τη διήθηση μακροφάγων στο λιπώδη ιστό. Αυτοί οι δύο παράγοντες παρέχουν υλικό για καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της παχυσαρκίας και τις πιθανές μεταβολικές, καρδιαγγειακές και ηπατικές της επιπτώσεις (10). Μία μικρή ή μέτρια μείωση του σωματικού βάρους, μειώνει σημαντικά τους φλεγμονώδεις δείκτες, μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων στο λιπώδη ιστό σχετιζόμενων με τη φλεγμονή και μειώνει τον κίνδυνο για περαιτέρω νοσηρότητα (10).

1.2 ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Ανησυχητική είναι, ωστόσο, η εξάπλωση και της παιδικής παχυσαρκίας παράλληλα με την παχυσαρκία των ενηλίκων. Σύμφωνα με τη μελέτη NHANES (National Health and Nutrition Examination Surveys) τα ποσοστά της παχυσαρκίας σε προεφηβική ηλικία το 1999-2000 ήταν διπλάσια σε σχέση με αυτά 20 χρόνια πριν. Το 2007 υπολογίστηκε ότι περίπου 22 εκατομμύρια παιδιά προσχολικής ηλικίας και 155 εκατομμύρια παιδιά σχολικής ηλικίας είναι υπέρβαρα ή σε αυξημένο κίνδυνο να γίνουν υπέρβαρα. Τα παχύσαρκα παιδιά καθώς και οι παχύσαρκοι έφηβοι έχουν πιο συχνά από το φυσιολογικό πολλές παθήσεις που αφορούν σε πολλά συστήματα, όπως, άσθμα ή άπνοια στον ύπνο, πολυκυστικές ωοθήκες, συναισθηματικές διαταραχές και διαταραχές συμπεριφοράς, ορθοπεδικά προβλήματα, διαταραχή ανοχής της γλυκόζης, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία ή στεατοηπατίτιδα. Ακόμα πιο ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι το 1/3 των παχύσαρκων παιδιών τείνουν να παραμένουν παχύσαρκα άτομα και κατά την ενήλικη ζωή, ενώ τα υπόλοιπα κινδυνεύουν από τις επιπλοκές της παχυσαρκίας περισσότερο από ότι οι φυσιολογικού βάρους ενήλικες ακόμα και αν χάσουν βάρος. Τα παραπάνω ανησυχητικά στοιχεία μαζί με τη δυσοίωση πρόβλεψη ότι η παχυσαρκία τείνει να καταταχθεί ως μια από τις τρεις κυριότερες αιτίες θανάτου στον πληθυσμό, παγκοσμίως, συγκλίνουν στην επιτακτική ανάγκη για μελέτη των αιτιολογικών παραγόντων της παιδικής παχυσαρκίας. Παράλληλα, είναι αναγκαία η ανάπτυξη στρατηγικής που να συνιστάται από μία πληθώρα αλλαγών στον τρόπο ζωής σε ατομικό, εθνικό και διεθνικό επίπεδο, έτσι ώστε να αναστραφούν οι παράγοντες που έχουν συνδεθεί με την αύξηση των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών τα τελευταία 20 χρόνια.

1.2.1 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Η παχυσαρκία, όπως προαναφέρθηκε, ορίζεται ως η περίσσεια σωματικού λίπους που συντελεί στον αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας ή/ και πρόωρης θνησιμότητας. Οι μέθοδοι, συνεπώς, που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της παχυσαρκίας θα πρέπει να πληρούν δύο βασικές προϋποθέσεις. Καταρχάς, θα πρέπει να είναι σε θέση να διαγιγνώσκουν το υψηλό σωματικό λίπος και κατά δεύτερον θα πρέπει να επισημαίνουν τον αυξημένο κίνδυνο των δυσμενών συνεπειών στην υγεία. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του βαθμού της παχυσαρκίας. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση λίπους για ερευνητικούς κυρίως σκοπούς περιλαμβάνουν τις multi-frequency bioelectrical impedance analysis (BIA), (DEXA), underwater weighing (densitometry) και magnetic resonance imaging (MRI). Σε κλινικές μελέτες, ωστόσο, πιο διαδεδομένη η χρήση δεικτών όπως ο Δείκτης Μάζας Σώματος- ΔΜΣ (BMI), η περίμετρος περιφέρειας, ο λόγος περιμέτρου περιφέρειας προς περίμετρο μηρού και η μέτρηση δερματοπτυχής τρικεφάλου. Ο ΔΜΣ είναι ο πιο αποτελεσματικός και ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της παιδικής παχυσαρκίας. Ορίζεται από τον εξής λόγο: $\text{βάρος σε κιλά} / (\text{ύψος σε μέτρα})^2$, ο οποίος φαίνεται να πληρεί ικανοποιητικά και τις δύο προϋποθέσεις που αναφέραμε προηγουμένως. Επίσης, παρ' όλο που δεν μετρά άμεσα το σωματικό λίπος του ατόμου σχετίζεται αρκετά ισχυρά (~95-100%) με τις άμεσες μετρήσεις των ερευνητικών τεχνικών, γεγονός που τον καθιστά τον πλέον διαδεδομένο δείκτη εκτίμησης της παιδικής παχυσαρκίας(11).

Σε έναν πληθυσμό ενηλίκων, άτομα με $\Delta\text{ΜΣ} > 25 \text{ kg/m}^2$ θεωρούνται υπέρβαρα και άτομα με $\Delta\text{ΜΣ} > 30 \text{ kg/m}^2$ κατατάσσονται ως παχύσαρκα. Οι τιμές αυτές, ωστόσο, δεν βρίσκουν απόλυτη εφαρμογή και στον παιδικό πληθυσμό καθώς ο ΔΜΣ μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία και διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα. Για το λόγο αυτό, λοιπόν, ο υπολογισμός του γίνεται λαμβάνοντας υπόψιν και τους δύο αυτούς μεταβλητούς παράγοντες.

Δύο είναι, μέχρι στιγμής, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της παιδικής παχυσαρκίας. Η πρώτη μέθοδος προέκυψε από μία μετα-ανάλυση 6 εθνικών ερευνών, αντιπροσωπευτικών για κάθε χώρα (Βραζιλία, Μ. Βρετανία, Χονγκ Κονγκ, Ολλανδία, Σιγκαπούρη και ΗΠΑ) με συνολικό πληθυσμό μελέτης 97.876 αγόρια και 94.851 κορίτσια. Με τη μέθοδο αυτή έχουν καθιερωθεί κάποιες οριακές τιμές του ΔΜΣ, οι οποίες έχουν υιοθετηθεί από τον IOTF (International Obesity Task Force), που εκφράζουν το ΔΜΣ ανά φύλο και ηλικία, που αντιστοιχεί στην τιμή 25 kg/m^2 και 30 kg/m^2 για το υπέρβαρο και το παχύσαρκο στους ενήλικες, αντίστοιχα (11). Η δεύτερη μέθοδος αφορά σε καμπύλες ανάπτυξης για το ΔΜΣ που έχουν οριστεί από το Center for Disease Control (CDC) των ΗΠΑ. Βασίζεται στη χρήση εκατοστημορίων σε διαγράμματα ειδικά για την ηλικία και το φύλο. Κάθε εκατοστημόριο υποδεικνύει τη σχετική θέση του ΔΜΣ ενός παιδιού ή εφήβου σε σχέση με άλλα άτομα του ίδιου φύλου και της ίδιας ηλικίας. Με αυτόν τρόπο, έχει οριστεί ότι παιδιά με $\Delta\text{ΜΣ} > 85^\circ$ εκατοστημορίου θα χαρακτηρίζονται ως υπέρβαρα ή σε κίνδυνο για υπέρβαρο και παιδιά με $\Delta\text{ΜΣ} \geq 95^\circ$ εκατοστημορίου ως υπέρβαρα ή παχύσαρκα. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται πιο ικανοποιητικά ο υπολογισμός του σωματικού λίπους και επίσης εμφανίζει υψηλότερη ειδικότητα, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται εθνικά δεδομένα των τιμών του ΔΜΣ του παιδικού πληθυσμού (12).

Κάποιοι ερευνητές, ωστόσο, χρησιμοποιούν και άλλες μεθόδους χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν ο ΔΜΣ. Μία από αυτές είναι η εκτίμηση του ποσοστού του σωματικού λίπους με μέτρηση δερματοπτυχών. Σύμφωνα με τον Williams et al., με τη μέθοδο αυτή κατατάσσονται ως παχύσαρκα παιδιά με ποσοστό 25% και 30% για αγόρια και κορίτσια αντίστοιχα. Επίσης, πολύ συχνά χρησιμοποιείται και η περιφέρεια μέσης (Waist Circumference ,WC) ως δείκτης κοιλιακής παχυσαρκίας. Έτσι, εφόσον στην παιδική παχυσαρκία υφίσταται σημαντική εναπόθεση λίπους κεντρικά, γεγονός που έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη διαβήτη τύπου II και καρδιαγγειακών νοσημάτων, το WC θεωρείται από αρκετούς ερευνητές ως πιο αντιπροσωπευτικός δείκτης για το χαρακτηρισμό του σωματικού λίπους. Παρ' όλα αυτά όμως μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να ενισχύουν τη χρήση άλλων μεθόδων εκτός του ΔΜΣ, καθώς για αυτές δεν υπάρχουν οριακές τιμές καθορισμού της παχυσαρκίας. Ο ΔΜΣ καθίσταται συνεπώς το πιο εύχρηστο και αξιόπιστο εργαλείο για ερευνητές και παιδιάτρους (1).

Age(years)	BMI 25 kg/m ²		BMI 30 kg/m ²	
	Males	Females	Males	Females
2	18.41	18.02	20.09	19.81
2.5	18.13	17.76	19.80	19.55
3	17.89	17.56	19.57	19.36
3.5	17.69	17.40	19.39	19.23
4	17.55	17.28	19.29	19.15
4.5	17.47	17.19	19.26	19.12
5	17.42	17.15	19.30	19.17
5.5	17.45	17.20	19.47	19.34
6	17.55	17.34	19.78	19.65
6.5	17.71	17.53	20.23	20.08
7	17.92	17.75	20.63	20.51
7.5	18.16	18.03	21.09	21.01
8	18.44	18.35	21.60	21.57
8.5	18.76	18.69	22.17	22.18
9	19.10	19.07	22.77	22.81
9.5	19.46	19.45	23.39	23.46
10	19.84	19.86	24.00	24.11
10.5	20.20	20.29	24.57	24.77
11	20.55	20.74	25.10	25.42
11.5	20.89	21.20	25.58	26.05
12	21.22	21.68	26.02	26.67
12.5	21.56	22.14	26.43	27.24
13	21.91	22.58	26.84	27.76
13.5	22.27	22.98	27.25	28.20
14	22.62	23.34	27.63	28.57
14.5	22.96	23.66	27.98	28.87
15	23.29	23.94	28.30	29.11
15.5	23.60	24.17	28.60	29.29
16	23.90	24.37	28.88	29.43
16.5	24.19	24.54	29.14	29.56
17	24.46	24.70	29.41	29.69
17.5	24.73	24.85	29.70	29.84
18	25	25	30	30

Πίνακας 1.1: Οριακές τιμές ΔΜΣ για υπέρβαρο και παχύσαρκο στην παιδική και εφηβική ηλικία
Cole et al., bmj, 2000 (11)

1.2.2 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Η παιδική παχυσαρκία αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές προκλήσεις σε θέματα δημόσιας υγείας του 21^{ου} αιώνα. Το πρόβλημα είναι παγκόσμιο και επηρεάζει πολλές χώρες, ακόμα και αυτές χαμηλών και μεσαίων εισοδημάτων και κυρίως τις αστικές περιοχές. Ο επιπολασμός της νόσου έχει φτάσει σε ανησυχητικά επίπεδα. Το 2007, περίπου 22 εκατομμύρια παιδιά κάτω από την ηλικία των 5 ετών ήταν υπέρβαρα, παγκοσμίως. Περισσότερο από το 75% των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών διαβιούν σε χώρες χαμηλού ή μεσαίου εισοδήματος (1).

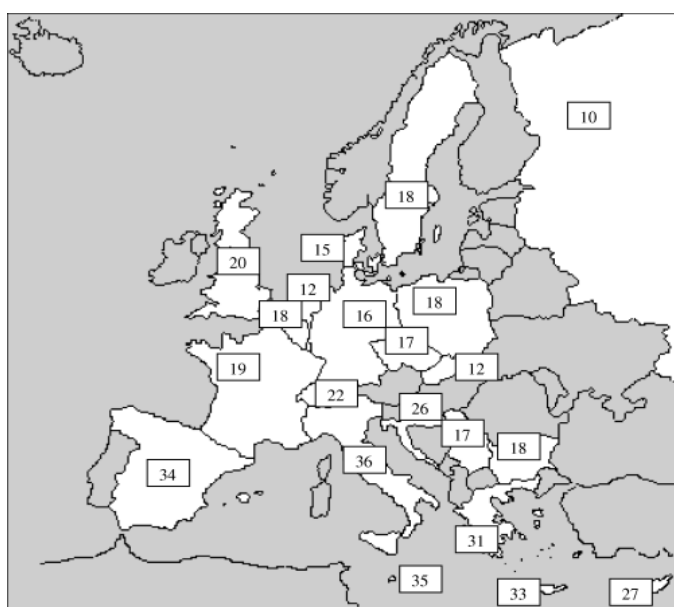
Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, σύμφωνα με τα δεδομένα από την έρευνα NHANES τα ποσοστά των υπέρβαρων παιδιών ή αυτών που βρίσκονται σε κίνδυνο να γίνουν υπέρβαρα είχαν αυξηθεί ραγδαία από το 1970 έως το 2004 κυρίως στις ηλικίες 2 έως 18 ετών. Τα ποσοστά των υπέρβαρων νέων αυξήθηκαν ακόμα περισσότερο στα έτη 1999 έως 2004 με αποτέλεσμα μέχρι τότε το 17,1% των Αμερικανών παιδιών να χαρακτηρίζονται υπέρβαρα και επιπρόσθετα ένα 16,5% να βρίσκονται σε κίνδυνο για υπερβάλλον βάρος. Πιο συγκεκριμένα, το 14% των παιδιών ηλικίας 2-5 χρόνων και το 19% των παιδιών ηλικίας 6-11 ήταν υπέρβαρα. Επιπρόσθετα, όμως, με το αυξανόμενο ΔΜΣ υπάρχουν επίσης τάσεις αύξησης των ποσοστών περιφέρειας μέσης τα οποία είναι χαρακτηριστικά της κοιλιακής παχυσαρκίας και αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου II και καρδιαγγειακών παθήσεων. Ο ερευνητής Li και συνεργάτες ανέφεραν αύξηση κατά 65% στην περιφέρεια μέσης στα αγόρια και 69% στα κορίτσια από τις έρευνες του NHANES 1988-94 έως 1999-2004. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα που παραθέτει ο ερευνητής Odgen και συνεργάτες, υπάρχουν χαρακτηριστικές φυλετικές/εθνικές διαφορές ανάμεσα στα ποσοστά αύξησης του βάρους. Ο υψηλότερος επιπολασμός του υπέρβαρου παρατηρείται στους νέους αφροαμερικανικής και μεξικανοαμερικανικής καταγωγής. Συγκεκριμένα, σε παιδιά αφροαμερικανικής καταγωγής ηλικίας 6-17 ετών παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση του μέσου ΔΜΣ και του επιπολασμού του υπερβάλλοντος βάρους τα τελευταία 30 χρόνια. Τα ίδια ποσοστά εμφανίζονται και ανάμεσα στα παιδιά από οικογένειες χαμηλού εισοδήματος (13)

Στην Ευρώπη, η οποία σύμφωνα με τον IOTF (Childhood obesity report May 2004) κατέχει μαζί με την Αμερική την πρωτιά σε υπέρβαρα και παχύσαρκα παιδιά, ο αριθμός των υπέρβαρων φτάνει τα 14 εκατομμύρια, τα 3 εκατομμύρια εκ των οποίων είναι παχύσαρκα (πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2: Αλλαγές στον επιπολασμό του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας σε μερικές αναπτυγμένες χώρες. Πηγή: Dehghan και συν. Nutrition Journal 2005 4:24

Χώρα/ έτη	Ηλικία	Μελέτη (συγγραφέας)	Αλλαγές στην παχυσαρκία
ΗΠΑ			
1973–1994	5–24	Bogalusa [67]	Το μέσο επίπεδο αυξήθηκε 0.2 kg/έτος, διπλάσια αύξηση στον επιπολασμό της παχυσαρκίας
1971–1974	6–19	NHANES I [68]	Σχετικά σταθερός
1976–1980	6–19	NHANES II [68]	Σχετικά σταθερός
1988–1994	6–19	NHANES III [68]	Διπλασιάστηκε στο 11%
1999–2000	6–19	NHANES IV [68]	Αύξηση κατά 4%
Ιαπωνία			
1974–1993	6–14	Kotani [69]	Διπλασιασμός (από 5% σε 10%)
Ηνωμένο Βασίλειο			
1984–98	7–11	Lobstein [70]	Μεταβολή από 8% σε 20%
Ισπανία			
1985/6 to 1995/6	6–7	Moreno [71]	Μεταβολή από 23% σε 35%
Γαλλία			
1992–1996	5–12	Rolland-Cachera [72]	Μεταβολή από 10% σε 14%
Ελλάδα			
1984–2000	6–12	Krassas [73]	Αύξηση κατά 7%

Αν και όπως φαίνεται και από τους παρακάτω χάρτες, σε κάποιες χώρες, όπως οι Σκανδιναβικές, τα ποσοστά των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των Μεσογειακών χωρών, εντούτοις και στις δύο περιπτώσεις με τα χρόνια αυξάνονται (γράφημα 1.1). Πιο αναλυτικά, στη Μεγάλη Βρετανία, ο επιπολασμός του υπέρβαρου στα παιδιά 7-11 ετών αυξήθηκε από 8% σε 20% στην περίοδο 1984-98, στην Ισπανία μεταξύ των παιδιών ηλικίας 6-7 ετών αυξήθηκε από 23% σε 35% στην περίοδο 1985/6-1995/6 και στη Γαλλία από 10% σε 16% κατά τη διάρκεια της περιόδου 1992-2000 (14).



Γράφημα 1.1: Επιπολασμός (%) των υπέρβαρων παιδιών ηλικίας 7-11 ετών χρησιμοποιώντας τις συνιστώμενες από τον IOTF οριακές τιμές (το υπέρβαρο συμπεριλαμβάνει και τα παχύσαρκα παιδιά)

Πηγή: Lobstein T, Freult M. Prevalence of overweight among children in Europe. Obesity Reviews 2003; 4:195-200.

Στην Ελλάδα έχουν πραγματοποιηθεί τρεις μεγάλες έρευνες που αφορούν στον επιπολασμό της παιδικής παχυσαρκίας. Στην πρώτη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη, σε 1046 παιδιά μετρήθηκε ο ΔΜΣ τρεις φορές ανά τρία χρόνια, δηλαδή στα 6, στα 9 και στα 12 έτη των παιδιών. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα μισά από τα παχύσαρκα παιδιά στην ηλικία των 6 ετών ήταν επίσης παχύσαρκα και στα 12. Σε σύγκριση με συνομήλικα παιδιά της Αμερικής, τα παιδιά της Κρήτης εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά υπέρβαρου και στα δύο φύλα και σε όλες τις ηλικίες (15). Συνολικά, τα στοιχεία της μελέτης φανερώνουν αύξηση στον επιπολασμό της παχυσαρκίας στα Ελληνόπουλα, αποτελέσματα που επιβεβαιώνονται και από μία δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Θεσσαλονίκη. Σε αυτή τη μελέτη συμμετείχαν 2458 παιδιά τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση την ηλικία. Στη νεότερη ομάδα ηλικίας 6-10 ετών ο επιπολασμός του υπερβάλλοντος βάρους και της παχυσαρκίας ήταν 25,3% και 5,6% αντίστοιχα ενώ για στη δεύτερη ομάδα που αφορούσε εφήβους δηλαδή ηλικίες 11-17 ετών τα ποσοστά ήταν 19,0% και 2,6% αντίστοιχα. Ύστερα από διαχωρισμό ανάλογα με το φύλο φάνηκε πως τα υπέρβαρα αγόρια είχαν ποσοστό 25,9% επί του συνολικού πληθυσμού της μελέτης ενώ τα υπέρβαρα 5,1%. Τα ποσοστά για τα κορίτσια ήταν 19,1% και 3,2% αντίστοιχα (16). Τέλος, μία τρίτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ακόμα μεγαλύτερο δείγμα, 4299, παιδιά ηλικίας 11-16 ετών έδειξε πως ο επιπολασμός του υπέρβαρου είναι σε ποσοστό 15,3% και του παχύσαρκου 1,8%, σύμφωνα με τα κριτήρια του IOTF και 13,6% και 3,8% αντίστοιχα σύμφωνα με τις τιμές CDC. Επίσης, από τη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε πως ο επιπολασμός του υπέρβαρου και του παχύσαρκου ήταν μεγαλύτερος σε παιδιά αστικών περιοχών που πηγαίνουν σε ιδιωτικά σχολεία σε σχέση με τον αντίστοιχο των παιδιών ημιαστικών περιοχών δημοσίων σχολείων (17). Συγκρίνοντας, λοιπόν, τα παραπάνω στοιχεία με τα αντίστοιχα άλλων χωρών, φαίνεται ότι στην Ελλάδα παρατηρείται ένα από τα μεγαλύτερα ποσοστά υπέρβαρου στις δυτικές κοινωνίες ενώ ο επιπολασμός της παχυσαρκίας είναι ίσος ή και χαμηλότερος σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες.

1.2.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, οι πιο σοβαρές συνέπειες της παχυσαρκίας είναι η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, η στεφανιαία νόσος, τα ισχαιμικά επεισόδια, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, κάποιοι τύποι καρκίνου, η οστεοπόρωση και τα ψυχολογικά προβλήματα (18). Παρατηρούνται, πλέον, ασθένειες οι οποίες εμφανίζονταν αποκλειστικά σε ενήλικες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία, να είναι πολύ συχνές και στα παιδιά αφού και ο επιπολασμός της παχυσαρκίας αυξάνεται. Το υπερβάλλον βάρος κατά τη διάρκεια της εφηβείας σχετίζεται με αύξηση κατά 8,5 φορές της υπέρτασης, κατά 2,4 φορές της εμφάνισης υψηλών τιμών ολικής χοληστερόλης ορού, κατά 3 φορές της εμφάνισης υψηλών τιμών LDL χοληστερόλης ορού και κατά 8 φορές της εμφάνισης χαμηλών τιμών HDL χοληστερόλης. Επίσης, πλήθος μελετών κυρίως στις ΗΠΑ, καταδεικνύουν ότι όσο αυξάνεται ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, αναμένεται να αυξηθεί και ο επιπολασμός του διαβήτη τύπου 2 (19).

Οι συνέπειες της παιδικής παχυσαρκίας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε βραχύχρονες (άμεσες δηλαδή σε παιδιά και εφήβους) και μακρόχρονες (δηλαδή έμμεσες συνέπειες σε ενήλικες που ήταν παχύσαρκοι ως παιδιά). Στις άμεσες συνέπειες ανήκουν, καταρχάς, οι ψυχολογικές συνέπειες οι οποίες επηρεάζουν περισσότερο τα κορίτσια από ότι τα αγόρια και ο κίνδυνος εμφάνισης τους φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία. Η χαμηλή αυτοεκτίμηση και προβλήματα συμπεριφοράς είναι από τις πιο συχνές ανωμαλίες που εμφανίζονται σε υπέρβαρα και παχύσαρκα παιδιά και εφήβους και πιθανόν να αποτελούν και τις πιο σημαντικές από τις επιπτώσεις για τους ίδιους και τις οικογένειες τους. Επίσης, μελέτες δείχνουν ότι εκδηλώσεις κοινωνικοποίησης, όπως είναι η δημοτικότητα και η ανάπτυξη φιλικών σχέσεων επηρεάζονται από την εμφάνιση παχυσαρκίας ή όχι (20).

Όπως προαναφέρθηκε, οι παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων σχετίζονται με την παιδική παχυσαρκία, όπως άλλωστε συμβαίνει και στους ενήλικες. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την παιδική παχυσαρκία ως έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες καρδιαγγειακών παθήσεων, ο οποίος μάλιστα θα έχει και τη μεγαλύτερη επίδραση στη δημόσια υγεία, αν ληφθούν υπ' όψιν τα ποσοστά των παχύσαρκων παιδιών που θα εξελιχθούν σε παχύσαρκους ενήλικες (21). Η εμφάνιση άσθματος ή η επιδείνωσή του φαίνεται επίσης να σχετίζεται με την παχυσαρκία χωρίς ωστόσο να είναι ακόμα πλήρως ξεκάθαροι οι μηχανισμοί που συσχετίζουν αυτές τις δύο καταστάσεις. Όλο και περισσότερες μελέτες ενισχύουν, πλέον, την άποψη ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής, με την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2, ορθοπεδικά προβλήματα, λιπώδες ήπαρ, ενδοκρινικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, και άλλες αναπνευστικές διαταραχές με πιο σημαντική την άπνοια κατά τον ύπνο. Ιδιαίτερα συχνή είναι και η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου στα παχύσαρκα παιδιά. Στη μελέτη NHANES III (1988-1994) στις ΗΠΑ αποκαλύφθηκε η σημαντική συσχέτιση του μεταβολικού συνδρόμου με το βάρος, αφού ο επιπολασμός του ήταν σχεδόν μηδενικός για τους εφήβους με φυσιολογικό βάρος, αυξανόταν σε ποσοστό 6,8% στους υπέρβαρους εφήβους και έφτανε ως το 28,7% στους παχύσαρκους συνομήλικους τους. Σε μελέτες σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό, έχει επίσης φανεί ότι το μεταβολικό σύνδρομο είναι ιδιαίτερα συχνό σε παχύσαρκους ενήλικες οι οποίοι ήταν παχύσαρκοι ως παιδιά.

Στις μακροχρόνιες συνέπειες της παιδικής παχυσαρκίας κατατάσσονται οι συνέπειες που επηρεάζουν το άτομο αργότερα κατά την ενήλικη ζωή. Τέτοιες είναι οι

ψυχολογικές επιπτώσεις, όπως είναι η κοινωνική απομόνωση των ατόμων, αλλά και οι οικονομικές, και φαίνεται πως επηρεάζουν περισσότερο τις γυναίκες από ότι τους άντρες. Η πιο σοβαρή συνέπεια, ωστόσο, είναι το γεγονός πως τα παχύσαρκα παιδιά ή έφηβοι συνεχίζουν να είναι παχύσαρκοι και στην ενήλικη ζωή επιδεινώνοντας παθολογικές καταστάσεις που έχουν ήδη ξεκινήσει. Επίσης, ακόμα και μετά από απώλεια βάρους οι ενήλικοι που ήταν παχύσαρκοι ως παιδιά ή έφηβοι εξακολουθούν να βρίσκονται στην ομάδα κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων, συνδέοντας ακόμα περισσότερο την παχυσαρκία με πρόωρη θνησιμότητα (22).

Τέλος, δεν πρέπει να παραβλέπονται και οι οικονομικές επιπτώσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Εφόσον η παιδική παχυσαρκία δείχνει να σχετίζεται με διαιώνιση του προβλήματος και στην ενήλικη ζωή, ο αυξημένος επιπολασμός της θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε συντομότερη αλλά ακριβότερη έναρξη χρήσης του Εθνικού Συστήματος Υγείας από τους νεαρούς ενήλικες για τη θεραπεία ασθενειών που συνδέονται με αυτήν. Η αύξηση, λοιπόν, του οικονομικού βάρους, το οποίο ασκεί η παχυσαρκία στο Εθνικό Σύστημα Υγείας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και μάλιστα να χρησιμοποιείται ως κίνητρο για το σχεδιασμό μέτρων πρόληψής της.

1.2.4 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Παρ' όλο που οι μηχανισμοί ανάπτυξης της παχυσαρκίας δεν είναι ακόμα και σήμερα πλήρως κατανοητοί, είναι, κατά γενική ομολογία, αποδεκτό ότι η αιτιολογία της παχυσαρκίας είναι πολυπαραγοντική και υφίσταται όταν η πρόσληψη ενέργειας είναι μεγαλύτερη από την κατανάλωση. Αυτή η διαταραχή του ισοζυγίου ενέργειας που προκαλεί και την αύξηση του αποθηκευμένου λίπους φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης γενετικών, συμπεριφοριστικών, περιβαλλοντικών, κοινωνικών, ψυχολογικών και πολιτισμικών επιδράσεων και η σχετική συμβολή καθενός από αυτούς τους παράγοντες έχει μελετηθεί εκτενώς (23). Αν και τα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του σωματικού βάρους, ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι συμπεριφοριστικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τη δραματική αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας. Ωστόσο, υπάρχουν συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις όπου η παχυσαρκία όπου εμφανίζεται σε πρώιμη παιδική ηλικία και στις οποίες εμπλέκονται συγκεκριμένοι νευρολογικοί μηχανισμοί ενώ άλλες αφορούν στην απορύθμιση του ισοζυγίου ενέργειας ή και του μηχανισμού αποθήκευσης λίπους. Αυτές οι καταστάσεις κατατάσσονται ως εξής:

- Μονογονιδιακές διαταραχές στο μονοπάτι της ενεργειακής ισορροπίας, όπως είναι η συγγενής έλλειψη λεπτίνης, η έλλειψη των υποδοχέων λεπτίνης, POMC κλπ
- Γενετικά σύνδρομα στα οποία συνυπάρχει και νοητική καθυστέρηση όπως Prader-Willi, Bardet-Biedl, Ahstrom, Cohen
- Κλασσικές ενδοκρινικές ανωμαλίες όπως υποθυροειδισμός, σύνδρομο Cushing, έλλειψη αυξητικής ορμόνης
- Διαταραχές της δυναμικής της ινσουλίνης δηλαδή υποθαλαμική παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη και αντίσταση στη λεπτίνη (24).

Το 1977 το NHBLI (National Heart lung and Blood Institute) υπέδειξε για πρώτη φορά την πιθανότητα η παχυσαρκία, όταν δεν οφείλεται στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις, να σχετίζεται με γενετικούς παράγοντες. Από τότε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μονοζυγωτικούς, διζυγωτικούς αλλά και υιοθετημένους διδύμους και στις οικογένειες τους επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό υποδεικνύοντας συσχέτιση της διακύμανσης του δείκτη μάζας σώματος με γενετικούς παράγοντες (25). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ωστόσο, τα γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη βάρους δεν προκαλούν άμεσα παχυσαρκία αλλά αυξάνουν την προδιάθεση για πρόσληψη βάρους του ατόμου που θα εκτεθεί σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, το οποίο πλέον χαρακτηρίζεται «obesogenic» (23). Στο ερώτημα, ωστόσο, εάν θα μπορούσε η παχυσαρκία να θεωρηθεί «γενετική» ασθένεια η απάντηση δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Έτσι, ενώ υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις, όπως οι μονογονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες ευθύνονται για την έλλειψη ενζύμων που επηρεάζουν την ενεργειακή ισορροπία, στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση φαινοτύπου-γονοτύπου, που οδηγεί στην συσσώρευση λίπους στο σώμα (26).

1.2.4.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας.

Ο ρόλος του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας φαίνεται από το γεγονός της ραγδαίας αύξησης της παχυσαρκίας το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, η οποία δε θα μπορούσε να αυξηθεί μόνο από αλλαγές στο ανθρώπινο γονιδίωμα και οι οποίες είναι απίθανο να συνέβησαν σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα. Ξεκινώντας με την επίδραση του κοινωνικού περιβάλλοντος, βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι ο επιπολασμός της παιδικής παχυσαρκίας διαφοροποιείται ανάμεσα σε παιδιά διαφορετικής χώρας, φυλής και γειτονιάς υποδεικνύοντας, έτσι, κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες που φαίνεται να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό αυτή τη διακύμανση. Πιο συγκεκριμένα, στον αναπτυγμένο κόσμο η παιδική παχυσαρκία συνδέεται αντιστρόφως με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, με τις πιο μειονεκτικές ομάδες να διατρέχουν το μέγιστο κίνδυνο. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές πεποιθήσεις γύρω από τη θεώρηση του «ωραίου» αλλά και τη διαφορετικότητα στον τρόπο έκφρασης της κοινωνικής ευημερίας (20). Από την άλλη, πολλοί κοινωνικοί φορείς, όπως σχολεία και φορείς δημόσιας υγείας επηρεάζουν τη συμπεριφορά των παιδιών απέναντι στη διατροφή και την άσκηση. Μια πληθώρα κοινωνικών αλλαγών, μεταξύ των οποίων η αλλαγή του τρόπου ζωής και των διαφορετικών συνηθειών, η μείωση της φυσικής δραστηριότητας, η επίδραση της διαφήμισης, η μεγάλη προσφορά χαμηλής ποιότητας γρήγορου φαγητού, οδηγούν σε αύξηση των ποσοστών των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών (27).

Η πιο σημαντική, ίσως, παράμετρος στο περιβάλλον των μικρών παιδιών είναι η οικογένεια, με ιδιαίτερη σημασία στη συμπεριφορά της μητέρας, αφού η πρώτη φυσιολογική επαφή του παιδιού με το περιβάλλον είναι κατά την ενδομήτριο ζωή. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης το έμβρυο αλληλεπιδρά με τη μητέρα και το μεταβολισμό της και μπορεί να επηρεαστεί από αυτόν, και το ίδιο συμβαίνει και αργότερα κατά τη γαλουχία, όπου διαφοροποιείται στον υποθάλαμο το κέντρο ελέγχου της πείνας και του κορεσμού αλλά και συμβαίνει η υπερπλασία του λιπώδους ιστού του εμβρύου (23). Έτσι, ο ενδομήτριος υποσιτισμός ή υπερσιτισμός έχει φανεί ότι οδηγεί σε προσαρμοστικές αλλαγές στο ενδοκρινικό σύστημα του εμβρύου με αποτέλεσμα τον κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου στην ενήλικη ζωή (28). Η παχυσαρκία των γονέων, ωστόσο, δεν επηρεάζει μόνο την ενδομήτριο ζωή. Αντίθετα, μετά τη γέννηση οι γονείς δε λειτουργούν μόνο ως

πρότυπα για το παιδί αλλά είναι και αυτοί που καθορίζουν τις διατροφικές επιλογές των παιδιών. Έτσι όλο και περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι η μόρφωση και η διατροφική πρόσληψη των γονέων σχετίζεται σημαντικά και θετικά με την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών από τα παιδιά (29). Ακόμα, έχει φανεί ότι το οικογενειακό γεύμα, το οποίο λόγω έλλειψης χρόνου των γονέων τείνει να εξαφανιστεί σχετίζεται με ένα καλύτερο διατροφικό προφίλ από τα παιδιά και από την άλλη περιοριστική διατροφικά συμπεριφορά από τους γονείς σχετίζεται με αυξημένη κατανάλωση και αυξημένο ΔΜΣ των παιδιών (30).

Τέλος, η τηλεόραση αποτελεί και αυτή έναν από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζει την παιδική παχυσαρκία με πολλούς τρόπους. Κατά μέσο όρο μέχρι τα 17 έτη ζωής ένα παιδί έχει σπαταλήσει περίπου 17.000 με 18.000 ώρες μπροστά στην τηλεόραση με αποτέλεσμα να είναι ευνόητο ότι η τηλεόραση εκτός των άλλων θα επηρεάσει και τις διατροφικές συνήθειες του. Έτσι, φαίνεται μέσα από μελέτες, ότι σε οικογένειες που επιτρέπεται η παρακολούθηση τηλεόρασης κατά τη διάρκεια του γεύματος τα παιδιά τείνουν να καταναλώνουν λιγότερα φρούτα και λαχανικά και περισσότερα σνακ χαμηλής ποιότητας σε σχέση με εκείνες όπου η τηλεόραση την ώρα του οικογενειακού γεύματος παραμένει κλειστή (30). Σπαταλώντας, λοιπόν τόσες ώρες μπροστά στην τηλεόραση οι ώρες δραστηριότητας μειώνονται και αντίθετα αυξάνεται η καθιστική ζωή. Τέλος, οι ώρες της τηλεθέασης αλλά και ο όγκος των διαφημίσεων που προωθούν την κατανάλωση ενεργειακά-πυκνών και χαμηλής ποιότητας τροφών τηλεθέασης φαίνεται μέσα από μελέτες ότι σχετίζονται με την εμφάνιση του υπέρβαρου στα παιδιά (31).

1.2.4.2 Διατροφή

Όσον αφορά τη διατροφή, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να επιβεβαιώνουν ότι η παιδική παχυσαρκία οφείλεται κυρίως στην αυξημένη πρόσληψη ενέργειας. Έτσι, ενώ υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η ενεργειακή πρόσληψη παιδιών και εφήβων έχει αυξηθεί από ~1800 kcal τη δεκαετία του 1970 σε ~1960 kcal τα μέσα του 1990, άλλες έχουν αποτύχει να δείξουν κάποια σταδιακά αυξανόμενη ενεργειακή πρόσληψη (32). Καταρχάς, όσον αφορά τη σύσταση της διατροφής, κάποιες μελέτες δείχνουν ότι τα παχύσαρκα παιδιά καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους και λιγότερους υδατάνθρακες σε σχέση με συνομήλικους φυσιολογικού βάρους. Συγκεκριμένα, διάφορες έρευνες σχετικά με την κατανάλωση τροφής σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό παιδιών έδειξαν γενικότερα μια υπερκατανάλωση λίπους και πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης και υποκατανάλωση φυτικών ινών σε σχέση με τις διεθνείς συστάσεις (23). Τα στοιχεία αυτά έρχονται σε αντίθεση με αποτελέσματα άλλων μελετών που δεν παρουσιάζουν καμία συσχέτιση ανάμεσα στο σωματικό λίπος και στα ποσοστά ενεργειακής πρόσληψης από μακροστοιχεία (31). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της έρευνας NHANES έχουν δείξει ότι η κατανάλωση λίπους από παιδιά των ΗΠΑ έχει μειωθεί τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Η κατανάλωση πρωτεΐνης, επίσης, φαίνεται αυξημένη σε σχέση με τη

συνιστώμενη ημερήσια ποσότητα, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας παίζει ρόλο και ο αυξημένος λόγος της προσλαμβανόμενης πρωτεΐνης σε σχέση με το λίπος. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το ότι η προσλαμβανόμενη πρωτεΐνη διεγείρει τον IGF-1 (insulin-like growth factor-1) καθώς και την έκκριση της ινσουλίνης που συντελεί στην αποθήκευση λίπους και στον πολλαπλασιασμό των ώριμων λιποκυττάρων (33,34).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα θετικού ενεργειακού ισοζυγίου, το οποίο εκτός από την πρόσληψη ενέργειας επηρεάζεται και από την κατανάλωσή της μέσω του βασικού μεταβολικού ρυθμού, της θερμογένεσης της φυσικής δραστηριότητας και της θερμογένεσης μέσω τροφής. Η ενεργειακή πρόσληψη και κατανάλωση, ωστόσο, είναι αρκετά δύσκολο να μετρηθούν σε πληθυσμιακό επίπεδο με αποτέλεσμα τα δεδομένα από μελέτες, που επιχειρούν να συσχετίσουν την ενεργειακή πρόσληψη-κατανάλωση με το επίπεδο της παχυσαρκίας, να είναι αρκετά αντιφατικά. Η αντίφαση αυτή πιθανόν να οφείλεται στις μεθόδους καταγραφής της διατροφικής πρόσληψης. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων τα οποία να μεν καταγράφουν τη δίαιτα που ακολούθησε το άτομο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, υπολογίζουν όμως με πολύ αδρό τρόπο τη συνολική θερμιδική πρόσληψη. Άλλες μέθοδοι, όπως οι εικοσιτετράωρες ανακλήσεις ή τα ημερολόγια τροφίμων υπολογίζουν τη θερμιδική πρόσληψη με μεγαλύτερη ακρίβεια, όμως η καταγραφή είναι βραχυπρόθεσμη και όχι μακροπρόθεσμη (35).

Πέρα από τη σύσταση της δίαιτας, ωστόσο, ένας ακόμα παράγοντας που φαίνεται να συμβάλλει στα αυξημένα ποσοστά της παχυσαρκίας είναι και το γεγονός πως ο αριθμός των γευμάτων μέσα στην ημέρα έχει ελαττωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αρκετά δεδομένα από μελέτες που συγκλίνουν στη συσχέτιση του πρωινού και των άλλων μικρών γευμάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας (δεκατιανό, απογευματινό) με τα αυξανόμενα ποσοστά της παιδικής παχυσαρκίας. Τα παχύσαρκα παιδιά έχουν ένα φτωχότερο σε ενέργεια πρωινό έως καθόλου πρωινό ενώ αντίθετα καταναλώνουν ένα πλουσιότερο ενεργειακά βραδινό (31). Η κατανάλωση σνακ ανάμεσα στα γεύματα και η συνολική συμβολή της στην ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και λίπους έχει επίσης αυξηθεί σε παιδιά και εφήβους την τελευταία δεκαετία. Η διατροφική αυτή συνήθεια παράλληλα με μία καθιστική ζωή σχετίζεται, σύμφωνα με μια μελέτη προοπτικής, με τη σωματική σύσταση λίπους (36).

2. ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σπονδυλωτά ζώα, και ειδικότερα τα θηλαστικά, δεδομένης της ανάγκης τους να επιβιώσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες, έχουν το λιπώδη ιστό, ο οποίος τους επιτρέπει να αποθηκεύουν περίσσεια ενέργεια με τη μορφή λιπιδίων και συγκεκριμένα τριακυλογλυκερολών. Οι τριακυλογλυκερόλες (ή τριγλυκερίδια) είναι υδρόφοβες ενώσεις που μπορούν να αποθηκευτούν σε μεγάλες ποσότητες χωρίς νερό σαν διαλύτη, ενώ περιέχουν σχεδόν τη διπλάσια ενέργεια ανά μονάδα μάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά.

Εφόσον είναι η πρωτεύουσα αποθήκη ενέργειας, ο λιπώδης ιστός ήταν από πάντα γνωστός με αυτή του την ιδιότητα και ως μονωτής θερμότητας. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, αυτές οι δύο ιδιότητες εφαρμόζονταν στη μελέτη για τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού και ελάχιστη προσοχή είχε δοθεί για την ανάλυση των λοιπών του ιδιοτήτων.

Τα λιποκύτταρα είναι ο μόνος τύπος κυττάρων τέλεια προσαρμοσμένα στο να αποθηκεύουν λιπίδια χωρίς αυτό να υπονομεύει τη λειτουργικότητά τους. Έχουν τα απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, διαδικασία γνωστή ως λιπογέννεση, και να τα αποθηκεύουν με τη μορφή τριακυλογλυκερολών σε περιόδους περίσσειας ενέργειας, ενώ αντίθετα τα κινητοποιούν μέσω της λιπόλυσης όταν υπάρχει ενεργειακό έλλειμμα. Το κεντρικό νευρικό σύστημα συμμετέχει στη ρύθμιση των δύο αυτών διαδικασιών μέσω άμεσης ή έμμεσης δραστηριότητας των νευρώνων (πχ μέσω της ώθησης για αναζήτηση τροφής). Άλλα ρυθμιστικά συστήματα, συμμετέχουν μέσω θρεπτικών συστατικών και ορμονών, ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις της στιγμής (37). Το αυτόνομο νευρικό σύστημα δρα απευθείας στο λιπώδη ιστό μέσω των υποκατηγοριών του, το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα. Το συμπαθητικό σύστημα προάγει τις καταβολικές διεργασίες (λιπόλυση), μέσω διέγερσης των β – αδρενεργικών υποδοχέων, οι οποίοι ενεργοποιούν την ορμονοευαίσθητη λιπάση (38). Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα οργανώνει τις αναβολικές διεργασίες, αυξάνοντας την παραγωγή ινσουλίνης, οδηγώντας στην ενδοκυττάρωση γλυκόζης και λιπαρών οξέων (39).

Στα θηλαστικά, υπάρχουν δύο τύποι λιπώδους ιστού: ο λευκός λιπώδης ιστός και ο φαιός λιπώδης ιστός. Τα λιποκύτταρά τους παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Τα ώριμα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού αποθηκεύουν τριακυλογλυκερόλες σε ένα μονό σταγονίδιο λιπιδίων που καταλαμβάνει το κέντρο

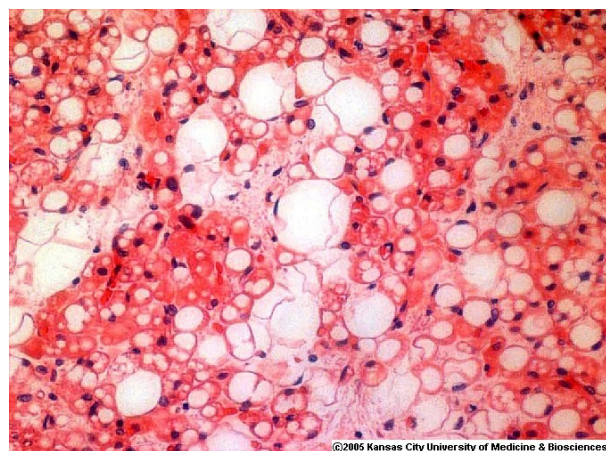
του κυττάρου, περίπου το 85 – 90 % της κυτταρικής μάζας και εκτοπίζει το κυτόπλασμα, τον πυρήνα και τα λοιπά οργανίδια στην περιφέρεια. Περιέργως, κατά την περίοδο ανάπτυξής τους, τα νεαρά λιποκύτταρα περιέχουν πολλαπλά μικρά σταγονίδια λιπιδίων, τα οποία συμπήσσονται προς σχηματισμό ενός μοναδικού σταγονιδίου καθώς το κύτταρο ωριμάζει. Παρόλο που ποικίλουν σε όγκο, τα ώριμα λευκά λιποκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα, εκατοντάδες έως χιλιάδες φορές μεγαλύτερα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τους ινοβλάστες και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενώ το μέγεθος τους μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά, εξαρτώμενο από την ποσότητα των περιεχόμενων τριακυλογλυκερολών (40).

Πέρα από τα λιποκύτταρα, ο λιπώδης ιστός περιέχει ένα στρώμα από συνδετικούς ιστούς (κολλαγόνο και συνδετικές ίνες), νευρικές ίνες, αγγεία, λεμφαδένες, ανοσοκύτταρα, ινοβλάστες και πρώιμα λιποκύτταρα (37).

2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

2.2.1 ΦΑΙΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ

Ο φαιός λιπώδης ιστός ειδικεύεται στην παραγωγή θερμότητας (θερμογένεση) και είναι πρακτικά απών στους ενήλικες ανθρώπους, βρίσκεται όμως στα έμβρυα και τα νεογνά. Τα λιποκύτταρά του έχουν διάμετρο 30 – 40 μm και είναι σαφώς μικρότερα από τα αντίστοιχα του λευκού λιπώδους ιστού, με διάμετρο 60 – 100 μm . Στο σχετικά άφθονο κυτόπλασμά τους περιέχουν πολλά σταγονίδια λιπιδίων ποικίλου μεγέθους, σφαιρικά και ένα μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων που παράγουν θερμότητα μέσω οξειδωσης των λιπαρών οξέων (41). Η θερμογένεση μεσολαβείται από την πρωτεΐνη θερμογενίνη (UCP-1), που βρίσκεται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη και δρα ως αντλία πρωτονίων. Η υψηλή συγκέντρωση κυτοχρωμικής οξειδάσης στα μιτοχόνδρια δίνει το χαρακτηριστικό αυτό σκούρο χρώμα (42).



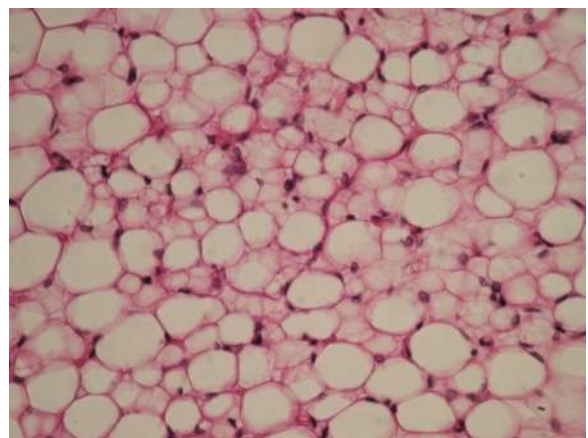
Εικ. 2.1 : Εγκάρσια τομή φαιού λιπώδους ιστού
© Kansas City University

2.2.2 ΛΕΥΚΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ

Παρόλο που η συμμετοχή του λευκού λιπώδους ιστού στη θερμογένεση είναι αμελητέα, η λειτουργική του ικανότητα είναι διευρυμένη. Κατανέμεται ευρέως στο σώμα υποδόρια, περιβάλλει τα όργανα της κοιλιακής χώρας και το μεσεντέριο, αλλά και τους περισσότερους από τους σκελετικούς μύες, προσφέροντάς τους μηχανική υποστήριξη και επιτρέποντας στις μυικές ίνες να γλιστρούν αναμεταξύ τους χωρίς μεγάλη τριβή. Επίσης, καθώς έχει την ικανότητα να μην άγει τη θερμότητα, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης στη θερμοκρασία του σώματος.

Χάρη στη δυνατότητά του να αποθηκεύει ενέργεια (200.000 – 300.000 Kcal σε νορμοβαρείς ανθρώπους) και να την παρέχει όταν είναι απαραίτητη, είναι το πιο σημαντικό ρυθμιστικό σύστημα του οργανισμού για το ενεργειακό ισοζύγιο (43).

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας 15ετίας, μετά την ανακάλυψη της ικανότητας του να εκκρίνει ορμόνες, μεγάλη σημασία έχει δοθεί στο ρόλο του ως ενδοκρινής αδένας. Αυτές οι ορμόνες, γνωστές ως λιποκυτταροκίνες, έφεραν επανάσταση στην αντίληψη της βιολογικής λειτουργίας του λιπώδους ιστού, φέρνοντας στην επιφάνεια την ιδέα πως δεν είναι μόνο αποθήκη και προμηθευτής ενέργειας, αλλά ένα δυναμικό όργανο, με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού. Δεδομένης της δομικής ποικιλομορφίας των λιποκυτταροκινών και την ποικιλία των λειτουργιών που τους έχουν αποδοθεί μέχρι στιγμής, μπορεί να ειπωθεί πως συμπεριλαμβάνουν από πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το ανοσοποιητικό σύστημα (TNF- α , IL-6), έως παράγοντες ανάπτυξης (transforming growth factor- β , TGF- β) και άλλες πρωτεΐνες (αδιψίνη). Υπάρχουν ακόμη λιποκυτταροκίνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (αγγειοτενσινογόνο), της πήξης του αίματος (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), της ομοιόστασης της γλυκόζης (αντιπονεκτίνη, ρεζιστίνη, βισφατίνη, λεπτίνη) και της αγγειογένεσης (vascular endothelial growth factor - VEGF) (43).



Εικ. 2.2: Εγκάρσια τομή λευκού λιπώδους ιστού
<http://histol.chuvashia.comatlas-enconnective-03-en.html>

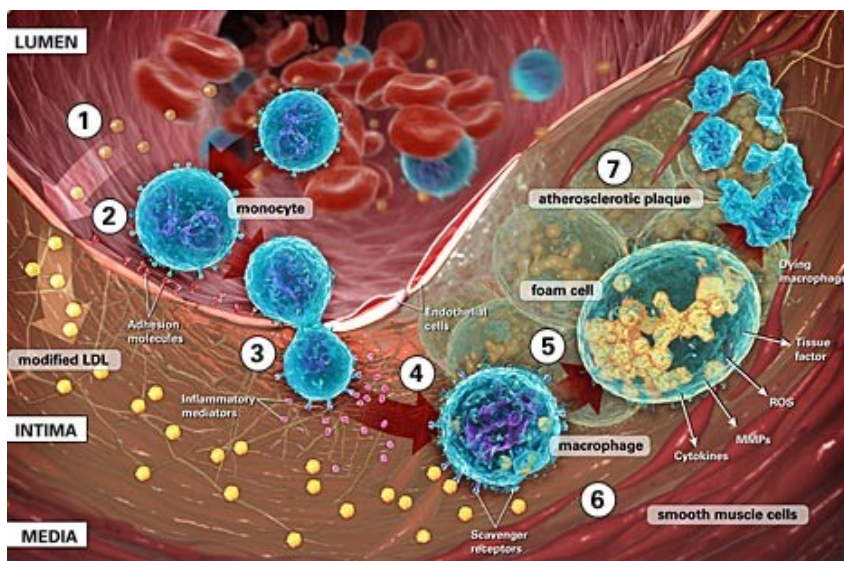
3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Φλεγμονή ονομάζεται μία σύνθετη βιολογική απόκριση του ενδοθηλίου έναντι βλαβερών ερεθισμάτων, όπως είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί, κατεστραμένα κύτταρα ή ερεθιστικές ουσίες (44). Η φλεγμονή είναι μία προσπάθεια του οργανισμού να προστατευθεί από τους παραπάνω παράγοντες, καθώς και να ξεκινήσει τη διαδικασία επούλωσης των ιστών. Η φλεγμονή δεν είναι συνώνυμο της μόλυνσης γι' αυτό το λόγο και δεν πρέπει να συγχέονται αυτοί οι δύο όροι. Μόλυνση προκύπτει από την είσοδο ενός παθογόνου μικροοργανισμού μέσα στον οργανισμό, ενώ η φλεγμονή είναι μία από τις αποκρίσεις του οργανισμού στην είσοδο του παθογόνου.

Η φλεγμονή μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε οξεία και χρόνια. Οξεία ονομάζεται η αρχική απόκριση του οργανισμού σε επιβλαβείς παράγοντες και επιτυγχάνεται με την αύξηση της ροής του πλάσματος και των λευκών αιμοσφαιρίων από το αίμα προς τους τραυματισμένους ιστούς. Μία ακολουθία βιοχημικών γεγονότων οδηγεί στη φλεγμονώδη απόκριση, συμπεριλαμβανομένων του κυκλοφορικού συστήματος, του ανοσοποιητικού συστήματος και διαφόρων κυττάρων του τραυματισμένου ιστού. Χρόνια φλεγμονή, ονομάζεται η προοδευτική αύξηση του τύπου των κυττάρων στην περιοχή που φλεγμαίνει και χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη καταστροφή και επούλωση των ιστών.

Το κυτταρικό μέρος της φλεγμονής περιλαμβάνει λευκοκύτταρα, τα οποία φυσιολογικά συναντώνται στο αίμα και χρειάζεται να βρεθούν στον φλεγμαίνων ιστό μέσω διήθησης προκειμένου να συμμετέχουν στη διαδικασία. Κάποια από αυτά τα κύτταρα δρουν ως φαγοκύτταρα, καταστρέφοντας παθογόνους μικροοργανισμούς και κυτταρικά απόβλητα με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης. Άλλα απελευθερώνουν ενζυματικά κοκκία τα οποία καταστρέφουν τους παθογόνους εισβολείς. Τα λευκά αιμοσφαίρια επίσης εκκρίνουν μεσολαβητές φλεγμονής οι οποίοι επάγουν και



Εικ. 3.1: Αναπαράσταση φλεγμονής εντός της κυκλοφορίας

http://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation#Vascular_changes

διατηρούν τη φλεγμονώδη απόκριση. Σε γενικές γραμμές, η οξεία φλεγμονή μεσολαβείται από κοκκιοκύτταρα, ενώ η χρόνια φλεγμονή από μονοπύρρηνα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα.

Σε γονιδιακό επίπεδο, η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μία αύξηση στην έκφραση προ-φλεγμονωδών, φλεγμονωδών παραγόντων και άλλων μορίων - μεσολαβητών, συχνότερα με ταυτόχρονη μείωση αντι-φλεγμονωδών παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι ιντερλευκίνες, με πιο σημαντικές την ιντερλευκίνη-2 και την ιντερλευκίνη-6 (IL-2, IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων - α (TNF- α), η αντιπνεεκτίνη (ApN), η βισφατίνη, η λεπτίνη και ο PPR- γ (25)

3.2 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Μία σημαντική ανακάλυψη των τελευταίων χρόνων στην κατανόηση της παχυσαρκίας είναι το γεγονός πως χαρακτηρίζεται από μία κατάσταση χρόνιας υποβόσκουσας φλεγμονής (46). Η βάση για αυτή τη θεωρία προέκυψε από τα αυξημένα επίπεδα δεικτών φλεγμονής, τόσο προφλεγμονωδών κυττοκινών, όσο και πρωτεϊνών οξείας φάσης στο αίμα παχύσαρκων ατόμων. Σε αυτούς τους δείκτες συμπεριλαμβάνονται η IL-6, ο TNF α , η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η απτοσφαιρίνη (47,48), καθώς και από την παρατήρηση της αυξημένης διήθησης των μακροφάγων στο λευκό λιπώδη ιστό. Είναι όλο και περισσότερο φανερό πως η φλεγμονώδης κατάσταση αποτελεί μέρος των αιτίων για την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και άλλων διαταραχών σχετιζόμενων με την παχυσαρκία, όπως η υπερλιπιδαιμία και το μεταβολικό σύνδρομο (49,50). Παρόλο που η γενική υπόθεση είναι πως η φλεγμονή είναι συνέπεια της παχυσαρκίας, έχει προταθεί πως η παχυσαρκία είναι στην πραγματικότητα αποτέλεσμα φλεγμονώδους νόσου (47).

Μία κεντρική ερώτηση είναι η προέλευση των φλεγμονωδών δεικτών στην παχυσαρκία, στην οποία δίνονται τρεις πιθανές απαντήσεις. Η πρώτη είναι πως προάγει την παραγωγή και απελευθέρωση τους από όργανα πέρα από το λιπώδη ιστό, όπως το ήπαρ και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η δεύτερη εξήγηση είναι πως ο λευκός λιπώδης ιστός εκκρίνει παράγοντες που διεγείρουν την παραγωγή φλεγμονωδών δεικτών από το ήπαρ και άλλα όργανα. Έτσι φαίνεται να εξηγείται και η ηπατική παραγωγή CRP, η οποία διεγείρεται από τα αυξημένα επίπεδα IL-6 στη λιπώδη μάζα των παχύσαρκων (51,52). Η τρίτη πιθανότητα είναι πως τα ίδια τα λιποκύτταρα είναι η πηγή κάποιων, των περισσότερων για την ακρίβεια, δεικτών φλεγμονής των οποίων τα υψηλά επίπεδα στους παχύσαρκους υποδικνύουν μαζική παραγωγή από τη μεγάλη σε έκταση μάζα λευκού λιπώδους ιστού. Υπάρχει φυσικά η πιθανότητα να είναι ένας συνδυασμός παραγωγής τους από το λιπώδη ιστό και τα υπόλοιπα όργανα.

Από την οπτική της βιολογίας του λιπώδους ιστού, μία ερώτηση κλειδί είναι κατά πόσο τα λιποκύτταρα ή ο λιπώδης ιστός συνεισφέρουν άμεσα στα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων κυκλοφορούντων φλεγμονωδών δεικτών και, εάν ναι, σε τι επίπεδο. Παρόλο που το να βρούμε ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη συνεισφορά συγκεκριμένων κυττάρων μέσα στο λιπώδη ιστό είναι δύσκολο, είναι εφικτό να δούμε κατά πόσο, στα ίδια τα λιποκύτταρα, εκφράζονται συγκεκριμένα γονίδια σχετιζόμενα με τη φλεγμονή και το είδος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται και εκκρίνονται. Πρόσφατες έρευνες που δείχνουν πως ο λευκός

λιπώδης ιστός διηθείται από τα μακροφάγα σε παχύσαρκα άτομα, προτείνουν ξεκάθαρα πως το τμήμα του ιστού που δεν αποτελείται από λιποκύτταρα φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας της φλεγμονώδους κατάστασης μέσα στο λιπώδη ιστό (53,54).

3.3 ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ – ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

3.3.1 ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η υπερτροφία, δηλαδή η υπερβολική αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων οδηγεί σε υπερπαραγωγή λιποκυτταροκινών. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως η αρχή της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού ξεκινά από λιποκύτταρα πολύ μεγάλου μεγέθους των οποίων η παραγωγή λιποκινών έχει απορρυθμιστεί και αυτό οδηγεί δευτερογενώς σε αυξημένη διήθηση των μακροφάγων στο λιπώδη ιστό. Η υπερτροφία των λιποκυττάρων σχετίζεται με παραποιημένη διακυτταρική επικοινωνία. Τα περιτοναϊκά λιποκύτταρα παχύσαρκων ατόμων έχουν φανεί να είναι υπερευαίσθητα στον TNF- α , κάτι το οποίο οδηγεί σε υπερπαραγωγή λιποκυτταροκινών (55,56,64).

3.3.2 ΥΠΟΞΙΑ

Ένας ξεκάθαρος μηχανισμός που θα μπορούσε να συνδέσει την παχυσαρκία με την απορρύθμιση της παραγωγής λιποκυτταροκινών είναι η υποξία του λιπώδους ιστού, η οποία είναι τοπική και όχι γενικευμένη (57,58,59). Παρά το γεγονός του ότι τα λιποκύτταρα στους παχύσαρκους είναι υπερμεγέθη, η υποξία συμβαίνει εξίσου και στα μικρότερου μεγέθους κύτταρα. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα πως η αιτία της υποξίας είναι η μειωμένη ροή αίματος στον ιστό και όχι το μέγεθος των κυττάρων (60). Η μειωμένη παροχή αίματος είναι ιδιαίτερα εμφανής στα αγγεία που υπάρχουν προσκολλημένα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, τα οποία συχνά αλληλεπιδρούν, όπως φαίνεται από μελέτες πάνω στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό (60,61). Ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην υποξία και τις μεταβολές στην παραγωγή λιποκυτταροκινών έχει μελετηθεί *in vitro*. Σε καλλιέργιες λιποκυττάρων, η μειωμένη παροχή οξυγόνου προκάλεσε μείωση των επιπέδων mRNA της αντιγονεκτίνης, με ταυτόχρονη αύξηση του mRNA προ-φλεγμονωδών γονιδίων, όπως ο TNF- α , η IL-6, η IL-6 κ.ά (57,60).

3.3.3 ΛΙΠΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα είναι μία χρόνια κατάσταση στην παχυσαρκία, εξαιτίας της ικανότητας της ινσουλίνης να αναστέλει τη λιπόλυση και της υπερβάλλουσας κατανάλωσης λιπιδίων μέσω της τροφής (62,64). Οι υποδοχείς TLR έχουν έναν ιδιαίτερο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενεργοποιώντας προφλεγμονώδεις μεσολαβητές ως απάντηση στην ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών. Ο TLR4 υποδοχέας, ο πιο γνωστός της ομάδας αυτής, προσδένεται στην επιφάνεια Gram αρνητικών βακτηρίων, αλλά και σε άλλα μη βακτηριακής προέλευσης μόρια, όπως τα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Η ενεργοποίηση του TLR4 προκαλεί αύξηση στην παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών που

σχετίζονται και με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν φλεγμονή και στα δύο κυτταρικά μέρη του λιπώδους ιστού, ενεργοποιώντας τόσο την παραγωγή λιποκυτταροκινών από τα λιποκύτταρα, όσο και από τα μακροφάγα (63,64).

4. ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

4.1 ΣΠΛΑΧΝΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΡΙΟΣ ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ Η ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

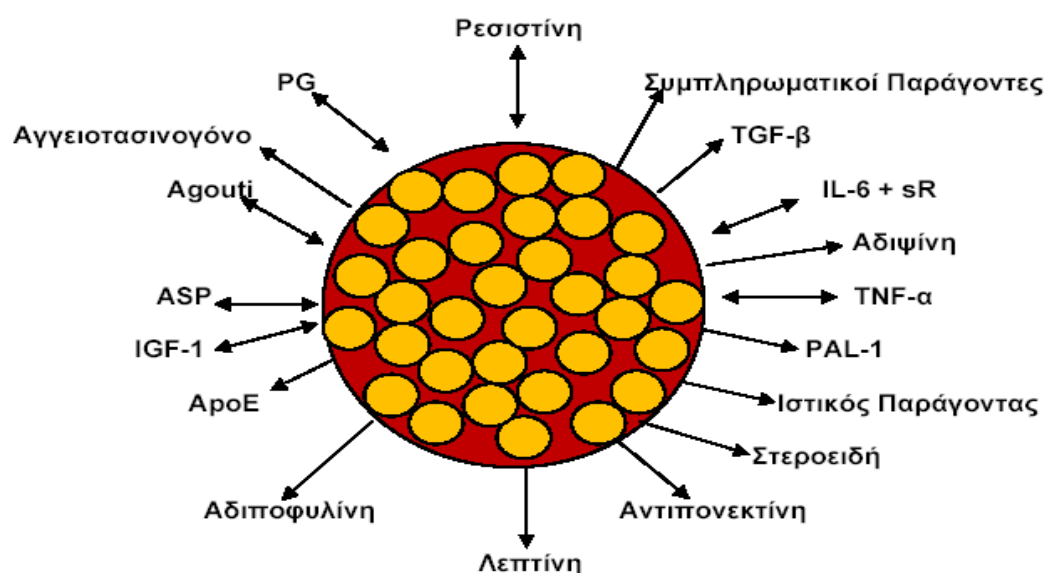
Η αναγνώριση μίας πρωτεΐνης ως λιποκυτταροκίνη γίνεται εφόσον αποδειχθεί η έκκρισή της από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού. Στην πράξη, αυτό γενικά αναφέρεται σε εκλεκτική απελευθέρωση *in vitro* από τα λιποκύτταρα. Αυτό μπορεί να γίνεται είτε από πρόσφατα απομονωμένα λιποκύτταρα είτε από λιποκύτταρα που προέκυψαν από διαφοροποίηση ινοβλαστικών προ – λιποκυττάρων από αρχική καλλιέργεια ή από κλωνοποιημένες σειρές. Εναλλακτικές προσεγγίσεις, περισσότερο δύσκολες για τον ερευνητή, περιλαμβάνουν ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών στη φλεβική ροή αίματος από το λευκό λιπώδη ιστό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την αντίστοιχη αρτηριακή ροή (65).

Η αυξημένη συγκέντρωση σπλαχνικού λίπους (μεσεντέριου και περιτοναϊκού) είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (66). Το λίπος που βρίσκεται αποθηκευμένο εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας (σπλαχνικό λίπος) είναι πιο αξιόπιστος παράγοντας πρόβλεψης κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου στις γυναίκες, σε σχέση με τη συνολική λιπώδη μάζα σώματος ή το ΔΜΣ (67). Η συσσώρευση σπλαχνικού λίπους είναι επίσης ένας σημαντικότερος παράγοντας για την πρόκληση του μεταβολικού συνδρόμου και της ινσουλinoαντίστασης (68, 69). Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο γιατί η μεγάλη συσσώρευση σπλαχνικού λιπώδους ιστού είναι τόσο μεγαλύτερος κίνδυνος για την υγεία σε σχέση με τον αντίστοιχη ποσότητα υποδόριου, ειδικά στους γοφούς και τους μηρούς. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι η εντεροηπατική κυκλοφορία, που οδηγεί σε μεγαλύτερη παροχή κυττοκινών / λιποκυτταροκινών, ελεύθερων λιπαρών οξέων και άλλων αγνώστων ουσιών από τα αποθέματα σπλαχνικού λίπους προς το ήπαρ.

Η έκκριση VEGF, ρεζιστίνης, IL-6, PAI-1, TGF- β , IL-8 και IL-10 μετρήθηκε μετά από επώαση 48 ωρών σε δείγματα ιστών και βρέθηκε ότι ήταν από 2 έως 4 φορές μεγαλύτερη στον σπλαχνικό απ' ό,τι στον υποδόριο κοιλιακό ιστό, σε άτομα με μέσο ΔΜΣ 32 Kg / m². Αυτή η διαφορά δεν παρατηρήθηκε όταν οι μετρήσεις έγιναν από λιποκύτταρα τα οποία είχαν απομονωθεί από σπλαχνικό και υποδόριο λιπώδη ιστό αντίστοιχα (70,71,72,73).

Η εναπόθεση λιπώδους ιστού σε διαφορετικές ανατομικά περιοχές του σώματος, σίγουρα παίζει ρόλο στην εμφάνιση της νοσηρότητας που συνοδεύει την παχυσαρκία. Η υπερβάλλουσα λιπώδης μάζα στο άνω μέρος του σώματος (γνωστή και ως κεντρική ή ανδροειδής παχυσαρκία) συνύθως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου II, υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας και καρδιαγγειακών νοσημάτων, ειδικά στις γυναίκες (74,75). Ανθρωπομετρικά δεδομένα, όπως ο ΔΜΣ και η περιφέρεια μέσης είναι πιθανά χρήσιμα εργαλεία για την αξιολόγηση του κινδύνου στην κλινική πράξη (74). Η δυσανοχή στη γλυκόζη είναι σημαντικά υψηλότερη στις γυναίκες με κεντρική παχυσαρκία. Αντιθέτως, η μεγάλη αποθήκευση λίπους στα κατώτερα μέρη του σώματος (γυναικοειδής παχυσαρκία) φαίνεται να μην έχει σημαντικές μεταβολικές συνέπειες (74,75).

Ο Λιπώδης Ιστός ως Ενδοκρινές Όργανο



Adapted from: Obesity Matters, 2001, 4, 16-19

Εικ. 4.1: Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο

Έτσι, στις γυναίκες, η περιοχή αποθήκευσης του λίπους παραμένει ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης για μεταβολικό κίνδυνο. Ο λιπώδης ιστός έχει ανατομική εξειδίκευση όσον αφορά στην παραγωγή και έκκριση πολλών λιποκινών. Η λεπτίνη εκκρίνεται συνήθως από τον υποδόριο λιπώδη ιστό, ενώ η έκφραση αδιπινεκτίνης, PAI-1 και IL-1 είναι σημαντικά μεγαλύτερη στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό. Οι διαφορές στις παραγωγικές και εκκριτικές ικανότητες ανάμεσα στον σπλαχνικό και τον υποδόριο λιπώδη ιστό και η αφθονία της αποθηκευμένης ενέργειας σε ορισμένα άτομα σίγουρα συνεισφέρουν στην επίπτωση μεταβολικών και καρδιαγγειακών επιπλοκών, όπως οι νόσοι του ήπατος. Παρόλα αυτά, ο ρόλος των μορίων που συνδέουν την παχυσαρκία με συγκεκριμένες επιπλοκές ακόμη δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος. Επιπλέον, άλλα τμήματα του λιπώδους ιστού, όπως ο λευκός λιπώδης ιστός στο περικάρδιο, εκφράζουν μεσολαβητές φλεγμονής ακόμη και απουσία παχυσαρκίας, εφόσον όμως υπάρχει διαβήτης. Αυτή η τοπική φλεγμονή του λιπώδους ιστού και η εγγύτητά του στα στεφανιαία αγγεία, μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεση της στεφανιαίας νόσου. Έτσι, οι βιοχημικοί δείκτες φλεγμονής στο

πλάσμα μπορεί να μην ανακλούν πάντα επαρκώς τη φλεγμονή εάν είναι τοπική (76,77).

4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΛΕΥΚΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

Σε γενικές γραμμές, το ήπαρ και τα λεμφικά όργανα είναι οι κύριοι παραγωγείς μεσολαβητών της φλεγμονής. Πρόσφατα δεδομένα έχουν επίσης δείξει ότι ο λευκός λιπώδης ιστός επίσης εκφράζει πολλούς φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και με αυτόν τον τρόπο συνεισφέρει προφανώς στην αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων φλεγμονωδών μορίων στην παχυσαρκία. Οντως, έχει φανεί πως ο λιπώδης ιστός είναι ικανός να παράγει φλεγμονώδεις κυττοκίνες, όπως ο TNF-α, ιντερλευκίνες όπως η IL-1 και η IL-6 και άλλους χημειοτακτικούς παράγοντες. Κάποια από αυτά τα μόρια αναγνωρίζονται ως πρωτεΐνες οξείας φασής της φλεγμονής (CRP, IL-6 και απτοσφαιρίνη). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως διαφορετικά ισομερή του Αμυλοειδούς ορού Α (SAA) (78), που μέχρι τώρα γνωρίζαμε πως παράγεται μόνο στο ήπαρ, μπορούν επίσης να παραχθούν και από το λευκό λιπώδη ιστό. Τα επίπεδα SAA είναι αυξημένα σε παχύσαρκους ανθρώπους, συσχετίζονται με τα αποθέματα λίπους στο σώμα και ρυθμίζονται από την απώλεια βάρους.

Από την άλλη πλευρά, η παχυσαρκία επίσης σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή αντιπυρεκτίνης, η οποία θεωρείται ως παράγοντας με σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (79). Σε αντίθεση με ό,τι έχει παρατηρηθεί στις αναγνωρισμένες φλεγμονώδεις νόσους, η παχυσαρκία σχετίζεται με μία ήπια, αλλά χρόνια αύξηση αυτού του μείγματος φλεγμονωδών παραγόντων. Η σχετική συνεισφορά διαφορετικών οργάνων και ιστών (όπως το ήπαρ, το λεμφικό σύστημα, ο υποδόριος και σπλαχνικός λιπώδης ιστός) στα επίπεδα φλεγμονωδών κυττοκινών στο αίμα είναι δύσκολο να διευκρινισθεί στην παχυσαρκία και κατά την εξέλιξή της. Πραγματικά, ειδικά σε περιπτώσεις νοσογόνου παχυσαρκίας, όπου όλες οι αποθήκες λίπους του οργανισμού είναι υπερβολικά γεμάτες, η αναλογία φλεγμονωδών παραγόντων που προέρχονται από το λιπώδη ιστό ή άλλους ιστούς είναι αδιευκρίνιστη.

4.3 ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ Ή ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΣΤΡΩΜΑΤΟΣ?

Ο λευκός λιπώδης ιστός χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων: ώριμα λιποκύτταρα και άλλα μικρότερα είδη κυττάρων, όπως πρόιμα λιποκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, ιστοκύτταρα και μακροφάγα, που όλα μαζί αναφέρονται συνήθως ως κύτταρα του στρώματος (77, 80). Εξαιτίας αυτής της ετερογένειας, η κυτταρική προέλευση των φλεγμονωδών παραγόντων διερευνάται ακόμη. Κάποιες μελέτες in vitro έδειξαν πως απομονωμένα λιποκύτταρα εκφράζουν φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNF-α και η πρωτεΐνη SAA (80,81). Πλέον όμως, η σημασία και η συνεισφορά των κυττάρων του στρώματος αναγνωρίζεται, ειδικότερα σε παθολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία.

Πρόσφατες μελέτες έδωσαν στοιχεία πως ο λευκός λιπώδης ιστός των ανθρώπων αποτελεί στόχο μακροφάγων, τα οποία διηθούνται σε μεγάλες ποσότητες και πως αυτή η διήθηση είναι ανάλογη του ΔΜΣ και της υπερτροφίας των λιποκυττάρων. Οι παράγοντες που επάγουν τη διήθηση των μακροφάγων στο λευκό

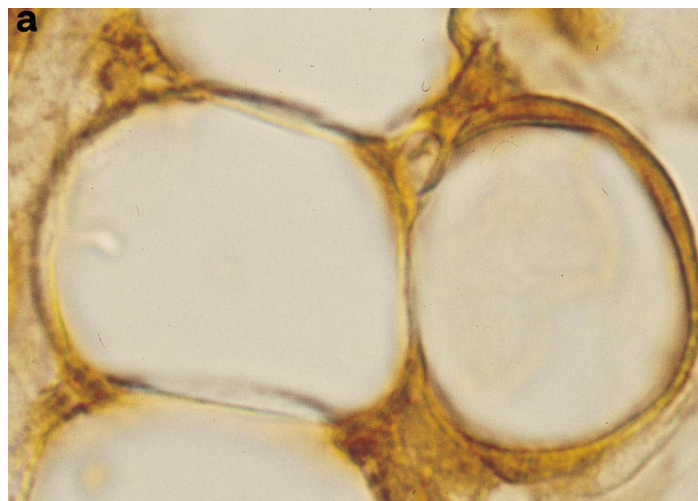
λιπώδη ιστό είναι περισσότεροι από ένας. Παρακρινή, αυτοκρινή και ενδοκρινή σήματα, καθώς επίσης και μετατροπές όπως η υπερτροφία και η υπερπλασία των λιποκυττάρων παίζουν κάποιο ρόλο σε αυτό το φαινόμενο. Επιπλέον, πολυάριθμοι χημειοτακτικοί παράγοντες και εξειδικευμένες κυτοκίνες εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Μελέτες *in vitro* δείχνουν πως και η ίδια η λεπτίνη είναι επαγωγικός παράγοντας για τα μακροφάγα που προέρχονται από το μυελό των οστών, ενώ η αντιπονεκτίνη έχει την αντίθετη δράση.

Η συσσώρευση μακροφάγων στο λιπώδη ιστό ίσως πράγματι να συνεισφέρει σε συστηματικά αυξημένες συγκεντρώσεις ορισμένων φλεγμονωδών κυτοκινών. Η δράση των φλεγμονωδών αυτών μορίων ίσως είναι και ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στο λιπώδη ιστό και τις μεταβολικές, καρδιαγγειακές ή ηπατικές επιπλοκές της παχυσαρκίας (77,80,82).

4.4 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Εφόσον απομονωθούν από το λευκό λιπώδη ιστό, τα λιποκύτταρα είναι σφαιρικά και το εσωτερικό τους είναι γεμάτο με ένα μεγάλο σταγονίδιο από τα αποθηκευμένα τριγλυκερίδια που περιβάλλεται από μία πολύ λεπτή στρώση κυτοπλάσματος και την κυτταρική μεμβράνη. Η τρισδιάστατη δομή τους σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα κύτταρα αυτά επιπλέουν σε σχέση με τα διπλανά τους, κάνουν τη μελέτη τους στο μικροσκόπιο μία πρόκληση για τους ερευνητές. Τα λιποκύτταρα αποτελούν το ενεργειακό απόθεμα του οργανισμού, συνεπώς είναι απαραίτητο να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες προκειμένου να μελετηθούν οι ορμονο-επαγόμενες αποκρίσεις σε πραγματικά λιποκύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν φυσιολογική συμπεριφορά που δεν μπορεί να αναπαραχθεί στα αντίστοιχα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί *in vitro* (83).

Ανοσοϊστοχημεία (IHC) ονομάζεται η μέθοδος που χρησιμοποιεί αντισώματα σε κύτταρα ενός συγκεκριμένου ιστού, βασισμένη στο γεγονός πως τα αντισώματα αυτά προσδένονται με μεγάλη εξειδίκευση στα διάφορα αντιγόνα των βιολογικών ιστών, εξού και η ονομασία της μεθόδου. Χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση μη φυσιολογικών κυττάρων που ανευρίσκονται σε νεοπλασίες. Η ανοσοϊστοχημεία επίσης χρησιμοποιείται στην έρευνα σχετικά με την κατανομή δεικτών και πρωτεϊνών που εκφράζονται σε διαφορετικά σημεία ενός βιολογικού ιστού, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση η παραγωγή λιποκυτταροκινών από κύτταρα του λιπώδους ιστού. Η οπτικοποίηση της επίδρασης αντιγόνου – αντισώματος επιτυγχάνεται με με αρκετούς τρόπους. Ο συχνότερος βασίζεται στην πρόσδεση του αντισώματος σε ένα ένζυμο, όπως η υπεροξειδάση, που μπορεί να καταλύσει μία χρωματοεπάγουσα αντίδραση. Εναλλακτικά, το αντίσωμα μπορεί να προσδεθεί σε μία φθορίζουσα ουσία (ανοσοφθορισμός) (84).



Εικ. 4.2: Ανοσοπροσδιορισμός λεπτίνης σε περιτοναϊκό λευκό λιπώδη ιστό

Immunohistochemical Localization of Leptin and Uncoupling Protein in White and Brown Adipose Tissue
Cinti et al., Endocrinology, 1997

5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ– α , TNF– α , (Tumor Necrosis Factor– α)

5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

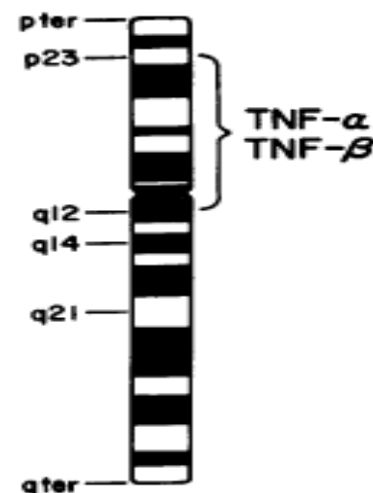
Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF– α) είναι μία ανοσοεπάγουσα και προφλεγμονώδης κυττοκίνη. Έχει περιγραφεί ως ο παράγοντας που επάγει την καχεξία και αναστέλει τη λιπογένεση στα λιποκύτταρα. Είναι μία κυττοκίνη που εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η φλεγμονή, η κυτταρική απόπτωση, η κυτταροτοξικότητα, η παραγωγή άλλων κυττοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6, και η ινσουλινοαντίσταση. Σε σχέση με τα λιποκύτταρα, συμμετέχει σε ινσουλινοεξαρτώμενες διαδικασίες, όπως η ομοιοστάση της γλυκόζης και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Συγκεκριμένα αναστέλει τη λιπογένεση και επάγει τη λιπόλυση (85).

Η έκφραση και κατά συνέπεια η έκκρισή του αυξάνονται στην παχυσαρκία και συσχετίζονται θετικά με τον ΔΜΣ, την ποσότητα του mRNA για αυτή την κυττοκίνη, καθώς και τον όγκο των λιποκυττάρων. Η εξουδετέρωση του TNF– α σε παχύσαρκα ποντίκια βελτιώνει την ευαισθησία τους στην ινσουλίνη, αποκαλύπτοντας τη σχέση του με την ινσουλινοαντίσταση. Σε παχύσαρκους ανθρώπους, υπάρχει μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στον TNF– α και το μεταβολισμό της γλυκόζης, εξαιτίας της δράσης του, που μειώνει τη σύνθεση και την εναπόθεση των ινσουλινοευαίσθητων υποδοχέων γλυκόζης GLUT-4 στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας τελικά την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης (86,43).

Αυτή η κυττοκίνη εμπλέκεται επίσης στην αθηρογένεση, συμμετέχοντας στη μετακίνηση των μονοκυττάρων και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα στο ενδοθηλιακό τοίχωμα μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κ-B (NFκB), πυριδοτώντας φλεγμονώδεις μεταβολές στο αγγειακό τοίχωμα (43).

5.2 ΓΟΝΙΔΙΟ

Το ανθρώπινο γονίδιο για τον TNF– α βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στη θέση 6p21.3 και κωδικοποιεί για μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 157 αμινοξέων η οποία συνοδεύεται από μια πρόδρομη αλληλουχία 233 αμινοξέων (87) (εικόνα 1.3). Είναι στενά συνδεδεμένο με την περιοχή στην οποία εντοπίζονται τα γονίδια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC), εξαπλώνεται στην περιοχή τάξης III και συγκεκριμένα ανάμεσα στα γονίδια που κωδικοποιούν το MHC τάξης II και το ανθρώπινο αντιγόνο των λευκοκυττάρων HLA (88). Αποτελείται από τέσσερα εξόνια και εκτείνεται σε μήκος 3kb στο γενωμικό DNA, ενώ διακόπτεται από τρία εσώνια. Σε μεταμεταφραστικό επίπεδο, το γονίδιο φαίνεται να ρυθμίζεται από την 3' αμετάφραστη περιοχή η οποία είναι πλούσια σε ουριδικό οξύ. Στον άνθρωπο, το mRNA κωδικοποιεί για ένα προϊόν 157 αμινοξέων ενώ στο ποντίκι για 156 αμινοξέα.



Εικόνα 5.1: Η θέση των γονιδίων TNF α και TNF β στο χρωμόσωμα 6.

Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά (49)

5.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ

Ο TNF– α εμφανίζεται με δύο μορφές, μία διαλυτή και μία διαμεμβρανική μορφή. Αρχικά παράγεται σαν μια προ-ορμόνη 233 αμινοξέων με μοριακό βάρος

25kDa η οποία αγκιστρώνεται στην κυτταρική μεμβράνη. Πρόκειται για μια τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη, με το αμινοτελικό άκρο να βρίσκεται εντός του κυττάρου και το καρβοξυτελικό άκρο στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης. Τα πρώτα 76 αμινοξέα αποτελούν μια αλληλουχία υψηλά συντηρημένη που φαίνεται να συμβάλει στο να αγκυροβολήσει το πρόδρομο πολυπεπτίδιο στη μεμβράνη. Τα αμινοξέα αυτά αποκόπτονται πρωτεολυτικά από ένα ένζυμο δεσμευμένο στη μεμβράνη που λέγεται TNF-α κονβερτάση (TNF-α Convertase, TACE) για να παραχθεί η μορφή του μορίου που αποτελείται από 157 αμινοξικά κατάλοιπα και η οποία αποτελεί και την ώριμη μορφή. Ο TNF-α τελικά κυκλοφορεί ως ένα σταθερό τριμερές 17kDa και στα διαλύματα κυκλοφορεί ως ένα ομοτριμερές συνολικού μοριακού βάρους 51kDa και είναι η μορφή που δεσμεύεται στους υποδοχείς (89) (εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Τριμερές TNFα
<http://en.wikipedia.org/wiki/TNF-alpha>

Σε απάντηση σε μια ευρεία ποικιλία ερεθισμάτων προερχόμενων από μόλυνση ή φλεγμονή (π.χ. λιποπολυσακχαρίδια, ιοί, μυκητιακά ή παρασιτικά αντιγόνα, Ιντερλευκίνη-1) αυξάνεται η μεταγραφή αλλά και η μετάφραση του πρόδρομου TNF-α και μεγάλες ποσότητες ώριμης πρωτεΐνης απελευθερώνονται γρήγορα στην κυκλοφορία. Παρ' όλα αυτά, δεν απελευθερώνεται όλος ο παράγοντας TNFα αφού ένα ποσοστό του παραμένει στη διαμεμβρανική μορφή (90).

5.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ο TNF-α λειτουργεί μέσω σύνδεσης του σε υποδοχείς, που είναι κατανομημένοι στα περισσότερα κύτταρα μέσα στο σώμα, με μεγάλη συγγένεια και επομένως μεγάλη ειδικότητα. Ο ένας υποδοχέας TNFR1 είναι πεπτίδιο μοριακού βάρους 60 kDa και ο δεύτερος υποδοχέας, ο TNFR2, πεπτίδιο 80kDa. Από την άποψη της δομής τους, παρουσιάζουν ομοιότητες στην εξωκυτταρική περιοχή ενώ δεν έχει φανεί να υπάρχει καμία ομολογία στις ενδοκυτταρικές περιοχές των δύο υποδοχέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο υποδοχείς ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταβίβασης σημάτων. Ουσιαστικά, και οι δύο υποδοχείς βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του σώματος με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα και τα μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, ενώ ορισμένοι τύποι κυττάρων εκφράζουν μόνο τον TNFR1.

Ο TNFR2 έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον TNFα και φαίνεται να προσδένει καλύτερα το μόριο του σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Φαίνεται ότι αυτός ο υποδοχέας μεταβιβάζει σήματα για τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και για τις προφλεγμονώδεις απαντήσεις. Ο TNFR1, αντίθετα, απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις TNF-α και μεταβιβάζει σήματα για τον κυτταρικό θάνατο μέσω κυτταροτοξικότητας ή απόπτωσης. Έτσι, φαίνεται από τα παραπάνω ότι η ποσότητα του παραγόμενου TNF-α έχει επίπτωση στο είδος της ανοσολογικής απόκρισης που προκαλείται από λοίμωξη ή ιστική βλάβη (89).

Και οι δύο υποδοχείς του TNF-α μπορούν να απελευθερωθούν μέσω πρωτεόλυσης από την κυτταρική επιφάνεια και να σχηματίσουν διαλυτά μόρια. Έτσι, έχει παρατηρηθεί ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα των υποδοχέων είναι αυξημένα σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως σήψη, καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα, πυρετός, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και παχυσαρκία (85).

5.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

5.5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Όπως προαναφέρθηκε, ο TNF-α ασκεί τις δράσεις του μέσω της πρόσδεσής του ως τριμερές σε υψηλής συγγένειας υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στις μεμβράνες των περισσότερων κυττάρων. Αφού πραγματοποιηθεί αυτή η πρόσδεση, ενεργοποιείται μεγάλος αριθμός δευτερευόντων πρωτεϊνών οι οποίες προκαλούν ποικιλία αποκρίσεων μέσα στα κύτταρα, όπως είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων και/ή παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου ή ριζών αζώτου. Επίσης, ενεργοποιεί G πρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες, όπως NF-κβ και AP-1, κινάσες πρωτεϊνών, μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αλλά και πρωτεΐνες σερίνης και μυελίνης. Φαίνεται, λοιπόν, από τα παραπάνω ότι ο TNF-α είναι πλειοτροπικός έχοντας πολλές διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια εξέλιξης μιας φλεγμονής. Επίσης, όπως όλες οι κυτταροκίνες μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ενώ προκαλεί άμεσα ή έμμεσα και οξειδωτικό στρες ή οξείδωση λιπιδίων, φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση. Όπως θα φανεί και παρακάτω, οι δράσεις του TNF-α ποικίλλουν και σχετίζονται άμεσα με τη συγκέντρωση και τη διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων σε αυτήν την κυτοκίνη και συχνά έχουν και αντιφατικό χαρακτήρα.

Είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της φλεγμονής και του σηπτικού σοκ και οι επιδράσεις του θεωρούνται άλλοτε επιβλαβείς και άλλοτε ωφέλιμες για τον ξενιστή (90). Σε απόκριση στη φλεγμονώδη διέγερση, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα εκκρίνουν TNF-α ο οποίος μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ή θάνατο διαφόρων τύπων κυττάρων ή να ρυθμίσει την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων που παίζουν σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις παθήσεις. Συγκεκριμένα, προκαλεί τη απελευθέρωση όλων των μεσολαβητών της φλεγμονής επάγοντας και εντείνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ταυτόχρονα επάγει και ένζυμα καθοριστές των ενεργών ριζών του οξυγόνου καθώς και προστατευτικές ενώσεις όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

Έχει φανεί, επίσης, ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο μέσα από μια ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι κυταροτοξικές αυτές επιδράσεις είναι σημαντικές στην άμυνα του ξενιστή προκαλώντας την έναρξη τόσο της αντιογκογόνου διαδικασίας όσο και τη ρύθμιση της ανάπτυξης και τη διαφοροποίηση του κυττάρου (91). Όσον αφορά στο ρόλο του ως παράγοντα ανάπτυξης, παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση αλλά και σε μια μεγάλη ποικιλία όγκων. Από την άλλη φαίνεται να παίζει ρόλο και στη διαδικασία της αιμοποίησης. Αρκετά ενδοκρινή όργανα επηρεάζονται, επίσης, από τη δράση του, όπου για παράδειγμα καταστέλλει την έκκριση προγεστερόνης και τεστοστερόνης και αυξάνει την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και της αυξητικής ορμόνης.

5.5.2 TNF ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Ο ακριβής ρόλος του TNF-α στην παχυσαρκία δεν είναι σαφώς καθορισμένος. Παρ' όλο που το 1970 προτάθηκε ότι ο TNF-α έχει ένα πιθανό ρόλο στην καχεξία, μόλις το 1993 άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες θεωρίες συσχέτισης αυτής της κυτοκίνης με την παχυσαρκία. Έτσι, είναι πιθανό να σχετίζεται είτε με την πρόσληψη, είτε με την κατανάλωση είτε με την αποθήκευση ενέργειας (92). Ο TNF-α

ανήκει σε μία πολύπλοκη οικογένεια κυτοκινών και φαίνεται να έχει δραματικές επιδράσεις στην πρόσληψη τροφής. Η δράση του μπορεί να ασκείται μέσω της Ιντερλευκίνης-1, η οποία δρα στον υποθάλαμο μειώνοντας την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, φαίνεται ότι επηρεάζει τα επίπεδα των ορμονών, όπως είναι η γλυκαγόνη, η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία επίσης επηρεάζουν την πρόσληψη τροφής.

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί μια σημαντική πηγή ενδογενούς παραγωγής του TNF-α. In vitro μελέτες σε παχύσαρκα τρωκτικά καθώς και σε παχύσαρκους ανθρώπους έχουν δείξει αυξημένη έκφραση του TNF-α στο λιπώδη ιστό και γι' αυτό το γονίδιο αυτό έχει θεωρηθεί ως υποψήφιο γονίδιο για την παχυσαρκία (93). Οι δράσεις του στο λιπώδη ιστό είναι πολλές και περιλαμβάνουν τη μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, τη μείωση της έκφρασης των μεταφορέων γλυκόζης GLUT4, και την άυξηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών και άλλων γονιδίων μπορεί να επηρεάσει την ινσουλινοευαισθησία των λιποκυττάρων και την κατανομή των λιπιδίων με μηχανισμούς που ακόμα δεν είναι ξεκάθαροι.

Η δράση της ινσουλίνης στα λιποκύτταρα επίσης φαίνεται να ρυθμίζεται από τον TNF-α, δηλαδή, πιθανόν να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα αποθήκευσης λίπους κατά την υπερινσουλιναιμία. Ήδη κάποιοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNF-α έχουν σχετιστεί με υψηλό αναπνευστικό πηλίκο, δηλαδή με υψηλά επίπεδα οξείδωσης γλυκόζης και σύνθεσης λιπιδίων κατά την υπερινσουλιναιμία. Έτσι, ο TNF-α μπορεί να σχετίζεται με αποθήκευση λίπους κατά την υπερινσουλιναιμία αλλά και μακροπρόθεσμα με αύξηση βάρους. Ακόμα, και το επίπεδο της υπερινσουλιναιμίας φαίνεται ότι σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TNF-α στον λιπώδη ιστό (94).

Από τα παραπάνω, φαίνεται αρκετά παράδοξο το γεγονός ότι μια κυτοκίνη η οποία προάγει την καχεξία βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε παχύσαρκα άτομα. Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι οι μελέτες που εξετάζουν την επίδραση του TNF-α στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού αξιολογούν κυρίως πολύ υψηλά επίπεδα της κυτοκίνης. Είναι, λοιπόν, πιθανό ο πραγματικός ρόλος του TNF-α στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού να έχει επικαλυφθεί σε αυτές τις μελέτες λόγω της χρήσης επιπέδων κυτοκίνης πολύ μεγαλύτερων από το φυσιολογικό. Επιπλέον, in vitro μελέτες εξετάζουν συγκεκριμένους μεμονωμένους παράγοντες ενώ στην πραγματικότητα πολλαπλοί ενδοκρινείς παράγοντες αλληλεπιδρούν για την τελική ανταπόκριση του κυττάρου. Για παράδειγμα ο IGF-1 (insulin-like growth factor 1), μια κυτοκίνη που παράγεται στα λιποκύτταρα, μπορεί να δρα ως παρακρινής παράγοντας για την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Το εάν ο IGF-1 θα διεγείρει τη διαφοροποίηση ή τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων εξαρτάται από την παρουσία ή την απουσία άλλων παραγόντων όπως ο TNF-α (95).

5.5.3 TNF- α ΚΑΙ ΚΑΧΕΞΙΑ

Αυξημένα επίπεδα TNFα έχουν βρεθεί στον ορό περίπου του 70% των ασθενών που πάσχουν από παρασιτικές λοιμώξεις και σηψαιμία, καταστάσεις δηλαδή που χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού καχεξία. Σε τέτοιες καταστάσεις παρατηρείται μια δραματική απώλεια λευκών λιποκυττάρων η οποία οφείλεται κυρίως στην μειωμένη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και την αυξημένη δραστηριότητα της ορμονοευαίσθητης λιπάσης. Ο TNFα φαίνεται να μειώνει τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ενώ συνεργιστικά με την

Ιντερλευκίνη-1 έχει φανεί να αναστέλλουν τη μεταφορά γλυκόζης στα λιποκύτταρα και επομένως να μειώνουν τα διαθέσιμα υποστρώματα λιπογένεσης. Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν τη συμμετοχή του TNFα στην απώλεια αζώτου και επομένως μυϊκής πρωτεΐνης. Τέλος μαζί με άλλες κυτοκίνες όπως η Ιντερλευκίνη-1 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη θερμογένεση και επομένως την αύξηση του μεταβολικού ρυθμού (92).

6. ΛΕΠΤΙΝΗ

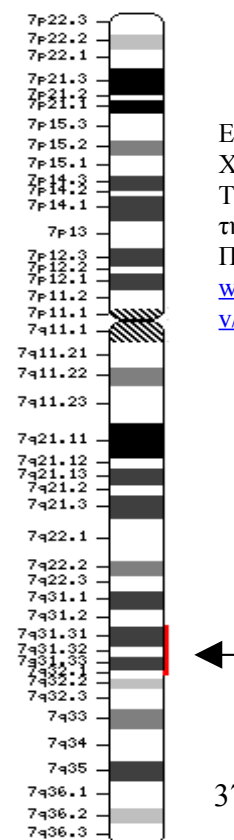
6.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η λεπτίνη ανακαλύφθηκε το 1994 ως προϊόν του γονιδίου *ob* που υπήρχε σε ποντίκια. Μία ομάδα παχύσαρκων ποντικών (*ob / ob*) παρουσίασαν ένα γενετικό ελλάτωμα που είχε ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης (96). Ανάμεσα σε άλλα συμπτώματα, αυτά τα ζώα είχαν τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία οργανισμών που βρίσκονταν σε συνεχή κατάσταση νηστείας, με ανεβασμένα επίπεδα κορτικοστεροειδών, αδυναμία διατήρησης της θερμοκρασίας του σώματος, ανεπαρκή ανάπτυξη, υπογοναδισμό και υπερβάλλουσα όρεξη για φαγητό. Όλα αυτά είχαν ως συνέπεια παχυσαρκία, ινσουλινοαντίσταση και σακχαρώδη διαβήτη. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 167 αμινοξέα και εκφράζεται από διάφορα είδη ιστών, όπως ο λιπώδης ιστός, ο πλακούντας και το γαστρικό βλεννογόνο, αν και οι μεγαλύτερες ποσότητες προέρχονται από το λιπώδη ιστό, καθώς τα επίπεδα κυκλοφορούσας λεπτίνης στο αίμα φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα mRNA στον ιστό αυτό. Ακόμη, μερικοί άλλοι μεταβολικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες συμβάλουν στη μεταγραφική ρύθμιση της λεπτίνης: η ινσουλίνη εμφανίζει μία άμεσα αναλογική σχέση με τα επίπεδα λεπτίνης. Τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα, φλεγμονώδεις κυττοκίνες και μολύνσεις του οργανισμού τα αυξάνουν, ενώ οι χαμηλές θερμοκρασίες, η διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων, η αυξητική ορμόνη, οι θυρεοειδικές ορμόνες, τα ανδρογόνα, η μελατονίνη και το κάπνισμα φαίνεται να τα μειώνουν. Τα επίπεδα της λεπτίνης στο πλάσμα εμφανίζουν επίσης κιρκαδική ρύθμιση, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τη νύχτα (43).

Επιπρόσθετα της σημαντικής της λειτουργίας ως δείκτης – μέτρο για την ποσότητα των αποθηκευμένων λιπιδίων στον ιστό, η λεπτίνη ρυθμίζει την αναπαραγωγή, την αγγειογένεση, την ανοσολογική απόκριση, τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και την οστεογένεση (97). Όσον αφορά στο μεταβολισμό των λιπιδίων, ενεργοποιεί την αδενυλο-κυκλάση, αυξάνει την οξείδωση των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες και μειώνει τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών στο ήπαρ (43).

6.2 ΓΟΝΙΔΙΟ

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λεπτίνη (Leptin) έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 7 και συγκεκριμένα στη θέση 7q31.3 (εικόνα 1.6), αποτελείται από ~20kb και οργανώνεται σε τρία εξόνια και δύο ιντρόνια. Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου εκτείνεται σε μια περιοχή ~3kb που περιλαμβάνει μία περιοχή TATA (TATAbox) από -26 ως -30, όπως επίσης και πολλαπλές C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) και SPA περιοχές. Επίσης φέρει ένα στοιχείο απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή GRE (glucocorticoid response element) και αρκετές περιοχές CREB που λειτουργούν ως στοιχεία απόκρισης στο cAMP (cAMP response element-binding protein). Το γονίδιο μεταγράφεται σε ένα mRNA 3.5 kb που κωδικοποιεί για μία προ-ορμόνη που αποτελείται από 167 αμινοξέα. Πριν την απελευθέρωση της λεπτίνης στην κυκλοφορία, η σηματοδοτική αλληλουχία που περιέχει 21 αμινοξέα αφαιρείται (98).

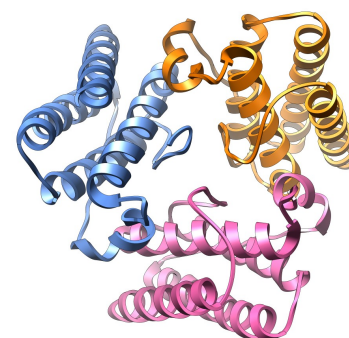


Εικόνα 6.1:
Χρωμόσωμα 7.
Το βέλος υποδεικνύει
τη θέση του γονιδίου.
Πηγή:
[www.ncbi.nlm.nih.gov
/mapview/maps](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps).

6.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η λεπτίνη είναι ένα πεπτίδιο 167 αμινοξέων με τα 21 τελικά αμινοξέα της να αποτελούν μια εκκριτική σηματοδοτική αλληλουχία. Πριν την απελευθέρωση του μορίου στην κυκλοφορία του αίματος συντελούνται δύο γεγονότα. Καταρχάς, η λεπτίνη μετατοπίζεται σε μικροσώματα και στη συνέχεια αφαιρείται το σηματοδοτικό πεπτίδιο. Εν τέλει, το μόριο που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία είναι ένα πεπτίδιο 146 αμινοξέων με μοριακή μάζα 14-16kDa. Η ανθρώπινη λεπτίνη είναι κατά 84% ομόλογη με αυτή του επίμυος και κατά 83% ομόλογη με του αρουραίου. Η κρυσταλλική δομή της λεπτίνης (εικόνα 1.7) φανερώνει ένα μόριο που αποτελείται από τέσσερις έλικες και συγκροτείται με τρόπο παρόμοιο με την οικογένεια ελικοειδών κυτταροκινών μακριάς αλυσίδας που περιλαμβάνει τα μόρια IL-6, IL-11, IL-12, LIF, G-CSF, CNTF και την ογκοστατίνη M (96).

Η μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου leptin γίνεται στο λιπώδη ιστό, στον πλακούντα και στην γαστρεντερική οδό, και ο ρυθμός παραγωγής της πρωτεΐνης σχετίζεται με τη μάζα λίπους. Σε φυσιολογικό βάρος, η λεπτίνη σχετίζεται καλύτερα με την απόλυτη μάζα λίπους παρά με το BMI ή το ποσοστό λίπους, ενώ τα κυκλοφορούντα επίπεδα της λεπτίνης φαίνονται να σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα mRNA του γονιδίου που παράγεται από το λιπώδη ιστό. Επίσης, και άλλοι μεταβολικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες συμβάλλουν στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου leptin στα λιποκύτταρα. Η ινσουλίνη, για παράδειγμα, είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του mRNA του γονιδίου leptin στα τρωκτικά, αν και αυτό δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί ότι συμβαίνει και στους ανθρώπους. Οι ανταγωνιστές των β_3 αδρενεργικών υποδοχέων μειώνουν τα επίπεδα του leptin mRNA ενώ αντίθετα η 17 β -εστραδιόλη διεγείρει την παραγωγή mRNA του γονιδίου leptin (99). Παρόλο που τα επίπεδα της ελεύθερης στη κυκλοφορία λεπτίνης φαίνεται να σχετίζεται με την ποσότητα του λιπώδους ιστού, έχει παρατηρηθεί επίσης πως επιδρά και το φύλο στα επίπεδά της. Έχει βρεθεί, δηλαδή, ότι με την ίδια ποσότητα λίπους και στα δύο φύλα, τα κορίτσια εκκρίνουν μέχρι και διπλάσια ποσότητα λεπτίνης από ότι τα αγόρια (100). Επιπρόσθετα, αλλαγές στην ενεργειακή πρόσληψη όπως και στην ανάπτυξη μπορούν να μεταβάλλουν τις συγκεντρώσεις της λεπτίνης στον ορό. Η ανθρώπινη λεπτίνη παράγεται με έναν κυρκαδικό και παλμικό τρόπο με μια νυχτερινή αύξηση και ένα οργανωμένο παλμικό μοτίβο, με κατά μέσο όρο 32 παλμούς τη μέρα και ο κάθε παλμός να διαρκεί 33 λεπτά (101). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι συντίθεται και στον πλακούντα σε επίπεδα συγκρίσιμα ή ακόμα και μεγαλύτερα από αυτά στο λιπώδη ιστό και έτσι μπορεί να λειτουργεί ως αναπτυξιακός παράγοντας για το έμβρυο, σηματοδοτώντας τη διατροφική κατάσταση από τη μητέρα στο έμβρυο. Η ανθρώπινη λεπτίνη έχει μέσο όρο ζωής 24.9 ± 4.4 λεπτά με το χρόνο αυτό να είναι ο ίδιος στους παχύσαρκους ενήλικες αλλά και στους ενήλικες φυσιολογικού βάρους (102).



Εικόνα 6.2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της λεπτίνης.

Πηγή:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leptin.png>

6.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ο υποδοχέας της λεπτίνης (OB-R) είναι μια μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που ανήκει στην gp130 οικογένεια υποδοχέων κυτταροκινών της τάξης 1. Στους

επίμνες, έχουν βρεθεί τουλάχιστον έξι ισομορφές (OB-Ra,-Rb,-Rc,-Rd,-Re και -Rf) που προκύπτουν μετά από εναλλακτικό μάτισμα ενός γονιδίου, του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης (ob-r gene). Υπάρχουν τέσσερις γνωστές ισομορφές του ανθρώπινου γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης με διαφορετικές C-τελικές κυτταροπλασματικές περιοχές, που καθορίζονται από τον αριθμό των καρβοξυτελικών αμινοξέων OB-R5,-15,-67 και 274. Όλες αυτές οι ισομορφές έχουν παρόμοιες εξωκυτταρικές περιοχές πρόσδεσης του συνδέτη αλλά διαφέρουν ως προς την ενδοκυτταρική καρβοξυτελική ακολουθία. Σε όλα τα είδη, ωστόσο, οι ισομορφές αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις τάξεις: στις μακριές, τις κοντές και τις διαλυτές ισομορφές. Η μακριά ισομορφή (OB-Rb) θεωρείται η κύρια σηματοδοτική ισομορφή αφού είναι και η μόνη που μπορεί να μεταδώσει το σήμα της λεπτίνης μέσω ολόκληρου του μονοπατιού JAK-STAT (103). Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε όλο το σώμα και εντοπίζεται στον υποθάλαμο, στα μονοκύτταρα, στα λεμφοκύτταρα, στα β-παγκρεατικά κύτταρα, στα κύτταρα του εντέρου, στα ενδοθηλιακά λεία μυϊκά κύτταρα και σε άλλα κύτταρα. Ο υποδοχέας OB-Ra είναι παρόν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και θεωρείται ότι είναι αυτός που μεταφέρει το σήμα της λεπτίνης κατά μήκος του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού. Ο υποδοχέας OB-Re διασπάται πριν τη διαμεμβρανική περιοχή και κυκλοφορεί ως διαλυτός υποδοχέας (sOB-R), ο οποίος δεσμεύει τη λεπτίνη που βρίσκεται στο αίμα. Υφίσταται σε δύο διαφορετικές N-γλυκοσυλιωμένες ισομορφές, δηλαδή είτε ως διμερές είτε σε ολιγομερή κατάσταση. Η λειτουργική sOB-R ισομορφή δυνητικά ρυθμίζει τα επίπεδα της λεπτίνης στο αίμα ώστε να βρίσκονται σε σταθερή κατάσταση, αναπληρώνοντας, όταν χρειάζεται, τα επίπεδα της κυκλοφορούμενης λεπτίνης και αποτρέποντας τη διάσπαση της ορμόνης. Έτσι, τα υψηλά επίπεδα του sOB-R στο αίμα, όπως καταγράφηκαν σε πολύ αδύνατα και ανορεξικά άτομα, πιθανών να δρουν ως αποθήκες βιοενεργούς λεπτίνης. Επιπλέον, όπως φαίνεται μέσα από την έρευνα του Yang και των συνεργατών του, μια διπλάσια ή και παραπάνω συγκέντρωση του διαλυτού υποδοχέα της λεπτίνης μπορεί να καταστείλει τη δράση της. Έτσι ο υποδοχέας αυτός μπορεί να ευθύνεται εν μέρει ή να συμμετέχει στην ανάπτυξη και εξέλιξη μιας τουλάχιστον μερικής αντίστασης στη λεπτίνη σε περιφερικούς ιστούς (104).

6.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

6.5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η δράση της λεπτίνης συντελείται μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων ισομορφών των υποδοχέων της. Οι υποδοχείς της λεπτίνης βρίσκονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του υποθαλάμου, την παρεγκεφαλίδα, το φλοιό, τον ιππόκαμπο, το θάλαμο, το χοροειδές πλέγμα και το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου. Η μακριά ισομορφή του υποδοχέα της λεπτίνης, η οποία είναι μέλος της τάξης 1 της οικογένειας των υποδοχέων των κυτταροκινών, ενεργοποιεί τον JAK σηματοδοτικό μεταγωγέα και τον ενεργοποιητή της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλει την έκφραση πολλών υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων. Τα καλύτερα μελετημένα νευροπεπτίδια είναι το νευροπεπτίδιο Υ, στον κοίλο εγκεφαλικό πυρήνα, που επηρεάζει τον υποθαλαμο-υποφυση-γοναδιακό άξονα, και η ορμόνη απελευθέρωσης θυροτροπίνης και κορτικοτροπίνης που επηρεάζει τους θυροειδικούς και αδρενεργικούς άξονες. Επιπρόσθετα, η μείωση του νευροπεπτιδίου Υ από τη λεπτίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της όρεξης, την αυξημένη διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και την ενεργειακή

κατανάλωση, καθώς και τη μεταβολή της περιφερικής μεταβολικής δραστηριότητας (105). Άλλοι στόχοι της λεπτίνης στον υποθάλαμο αποτελούν τα νευροπεπτίδια που ελέγχουν την όρεξη, την ορμόνη διέγερσης των μελανοκυττάρων και την ανταγωνιστική της πρωτεΐνη αγκούτι (agouti) (106).

Οι υποδοχείς της λεπτίνης, επίσης εκφράζονται σε περιφερικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, των νεφρών, του ήπατος, του παγκρέατος, των επινεφριδίων, των ωοθηκών, των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των σκελετικών μυών, ενώ η ισομορφία του διαλυτού υποδοχέα της λεπτίνης που εντοπίζεται στον ορό χρησιμεύει ως πρωτεΐνη πρόσδεσης της λεπτίνης. Στο ήπαρ, είναι παρούσες οι κοντές ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης και πιθανόν να εξυπηρετούν την ανανέωση της λεπτίνης, ενώ οι υποδοχείς στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου και στο χοριοειδές πλέγμα μεταφέρουν τη λεπτίνη από το αίμα εντός του διάμεσου εγκεφάλου. Όταν τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό ξεπεράσουν ένα συγκεκριμένο επίπεδο (25-30ng/ml), η αύξηση αυτή δεν μεταφράζεται με ανάλογες αυξήσεις στα επίπεδα του μορίου στην παρεγκεφαλίδα και τον εγκέφαλο (107). Έτσι, αυτό μπορεί να συντελεί σε μία κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη καθώς και παχυσαρκία.

6.5.2 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Η δραματική επίδραση που είχε η χορήγηση λεπτίνης σε ob/ob επίμυες, οι οποίοι στερούνταν λεπτίνης λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο, δημιούργησε πολλές προσδοκίες ότι η παχυσαρκία στους ανθρώπους μπορεί επίσης να αποτελεί μία κατάσταση έλλειψης λεπτίνης και η οποία να μπορεί να θεραπευτεί με χορήγηση λεπτίνης. Ωστόσο, στα πρώτα άτομα που μελετήθηκαν με οξεία παχυσαρκία που ξεκίνησε σε πολύ μικρή ηλικία λόγω αδρανοποιητικής μετάλλαξης του γονιδίου *leptin*, καθώς και σε άλλες πληθυσμιακές μελέτες δεν εντοπίστηκαν παρόμοιες μεταλλάξεις με αυτές των ποντικών. Έτσι, τα άτομα που στερούνται λεπτίνης πιθανόν να αποτελούν μειοψηφία στο γενικό πληθυσμό των παχύσαρκων ατόμων. Αντίθετα, στα περισσότερα παχύσαρκα άτομα παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, γεγονός που γεννά την υπόθεση ότι στα περισσότερα παχύσαρκα άτομα υφίσταται μια κατάσταση αντίστασης στην λεπτίνη (108).

Πρόσφατα, περιγράφηκε στα μέλη δύο ανεξάρτητων οικογενειών μία μετάλλαξη που έχει σαν αποτέλεσμα έναν διασπασμένο υποδοχέα, ο οποίος στερείται περιοχών στη διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή του. Άτομα ομόζυγα για αυτήν τη μετάλλαξη εμφανίζουν οξεία παχυσαρκία από πολύ μικρή ηλικία, απουσία εφηβικής ανάπτυξης καθώς και δυσλειτουργία της αναπτυξιακής ορμόνης και των θυροειδικών αξόνων. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστή η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτού του υποδοχέα, αν και εκτιμάται ότι πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή. Έτσι, οι μελέτες έχουν εστιάσει πλέον σε μόρια καθοδικά της λεπτίνης που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτήν και να προκαλέσουν αντίσταση στη λεπτίνη. Στο πλαίσιο αυτό, εντοπίστηκαν δύο άτομα με μετάλλαξη στην προ-οπιόμελανοκορτίνη, ένα μόριο το οποίο δρα καθοδικά του υποδοχέα της λεπτίνης τα οποία εμφάνισαν οξεία παχυσαρκία από μικρή ηλικία καθώς και αδρενεργική ανεπάρκεια (109). Ένας παρόμοιος φαινότυπος σχετίστηκε επίσης με ανώμαλη εξέλιξη της προ-ορμόνης, λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο της προκονβερτάσης 1 (*proconvertase1*). Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν ότι ο αναστολέας της σηματοδότησης των κυτταροκινών 3 είναι ένας λεπτινο-διεγερόμενος αναστολέας της σηματοδότησης από την λεπτίνη και πιθανόν ένας επαγωγέας της αντίστασης της λεπτίνης στην κατάσταση της παχυσαρκίας (110).

Περιφερικά σήματα, όπως τα γλυκοκορτικοειδή πιθανόν, επίσης, να παρεμβαίνουν στην αλληλεπίδραση της λεπτίνης με τον υποδοχέα της και να δημιουργούν κεντρικά αντίσταση στην λεπτίνη. Μια ακόμα πιθανή περιοχή που μπορεί να συμβάλλει την αντίσταση στη λεπτίνη είναι η μεταφορά της λεπτίνης στον εγκέφαλο μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι συχνά δόσεις λεπτίνης που χορηγούνται κεντρικά συντελούν στη μείωση της πρόσληψης τροφής, σε αντίθεση με τη περιφερική χορήγηση των ίδιων δόσεων που δεν έχουν καμία επίδραση. Σε αντίθεση όλων αυτών, ωστόσο, η μη φυσιολογική ένωση της λεπτίνης του πλάσματος στον υποδοχέα ή ο μη φυσιολογικός καταβολισμός της λεπτίνης δεν φαίνεται να συμβάλλουν στην ανθρώπινη παχυσαρκία καθώς ο υπολογισμένος χρόνος ημιζωής της κυκλοφορούμενης λεπτίνης όπως και η βιολογική δραστηριότητα της είναι παρόμοια σε αδύνατα και παχύσαρκα άτομα (111).

Η αποσαφήνιση, λοιπόν, των μηχανισμών εγκαθίδρυσης της αντίστασης στην λεπτίνη θεωρείται ότι θα συντελέσει στην καλύτερη κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της παχυσαρκίας καθώς και στην ανάπτυξη συγκεκριμένων και αποτελεσματικών θεραπειών. Παρόμοια, η διευκρίνιση του ρόλου της λεπτίνης στην μεταβολική και ενδοκρινική απόκριση των παχύσαρκων ατόμων απέναντι στην διατροφική πρόσληψη μπορεί να συντελέσει σημαντικά στην καθιέρωση κλινικών εφαρμογών απέναντι στην ασθένεια αυτή.

6.5.3 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της λεπτίνης στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Τα αυξημένα επίπεδα λεπτίνης σε υγιείς ενήλικες σχετίζονται με μειωμένη αρτηριακή διαστολή, με τη σκλήρυνση της καροτιδικής αρτηρίας, γεγονός που αποτελεί δείκτη αθηροσκλήρωσης. Τα παραπάνω είναι εμφανή σε φυσιολογικού βάρους και παχύσαρκους ενήλικες, όπως και σε παιδιά και εφήβους με διαβήτη τύπου I. Σε ασθενείς στους οποίους έχει επιβεβαιωθεί με αγγειογραφία αρτηριακή αθηροσκλήρωση, η λεπτίνη αποτέλεσε έναν πρωτότυπο δείκτη μελλοντικών αθηροσκληρωτικών γεγονότων ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως είναι η λιπιδιακή κατάσταση και η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 έχουν επίσης αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, παράλληλα με μία αυξημένη ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αρτηριών που αποτελεί ένδειξη της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης. Το κατά πόσο η δράση της λεπτίνης συμβάλλει άμεσα στην αθηροσκλήρωση και το αν μπορεί να αποτελέσει ένα θεραπευτικό στόχο για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης μένει ακόμα να μελετηθεί περαιτέρω (112).

6.5.4 ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Πέρα από τις προαναφερθείσες δράσεις της λεπτίνης, το μόριο αυτό θεωρείται ότι δρα και ως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Έχει αποδειχθεί ότι διαφορετικά φλεγμονώδη ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6 και του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ελέγχουν την έκφραση του mRNA της λεπτίνης όπως επίσης και τα επίπεδα της ελεύθερης λεπτίνης (113). Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί η λεπτίνη παράγεται και από κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της μπορεί να διεγείρει ή να συμμετέχει στη φλεγμονώδη διαδικασία μέσω άμεσων παρακρινών ή αυτοκρινών δράσεων (114). Επίμυες που στερούνταν λεπτίνης επέδειξαν αντίσταση ή λιγότερη προδιάθεση στην ανάπτυξη φλεγμονωδών παθήσεων που σχετίζονται με την έμφυτη αλλά και τη

επίκτητη ανοσολογική απόκριση, όπως είναι η πειραματικά επαγόμενη κολίτιδα, η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, ο διαβήτης τύπου I και η πειραματικά επαγόμενη ηπατίτιδα. Η λεπτινο-εξαρτώμενη αντίσταση στην ανάπτυξη της φλεγμονής μένει να εξακριβωθεί αν και έχει διαπιστωθεί μια ανισορροπία μεταξύ προ- και αντι-φλεγμονώδων κυτταροκινών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λεπτίνη πιθανόν να δύναται να τροποποιήσει το μοτίβο έκκρισης κυτταροκινών από μακροφάγα και μονοκύτταρα μέσω του μονοπατιού που διεγείρεται από την STAT-3 (115).

Η δράση της λεπτίνης έχει μελετηθεί και σε άλλα μοντέλα ανοσίας-φλεγμονής όπως είναι τα μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια (NOD mice). Τα θηλυκά αυτά ποντίκια παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά λεπτίνης στον ορό πριν ακόμα την εκδήλωση της ασθένειας. Παράλληλα, χορήγηση λεπτίνης φαίνεται να αυξάνει την φλεγμονώδη διήθηση καθώς και την παραγωγή ιντερφερόνης γάμμα στα περιφερικά T κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της καταστροφής των β-παγκρεατικών κυττάρων και την εκδήλωση του νοσήματος, με τη λεπτίνη, πιθανόν, να προωθεί την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου I μέσω της T_{H1} απόκρισης. Τέλος, η χορήγηση λεπτίνης αυξάνει τη φλεγμονώδη και αιμοπεταλιακή απόκριση κατά τη θερμидική στέρηση ενώ αυξάνει και την προδιάθεση για ηπατοτοξικότητα μέσω του ελέγχου της ενεργοποίησης των T κυτάρων και της έκκρισης των κυτταροκινών.

7. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-6 (IL-6)

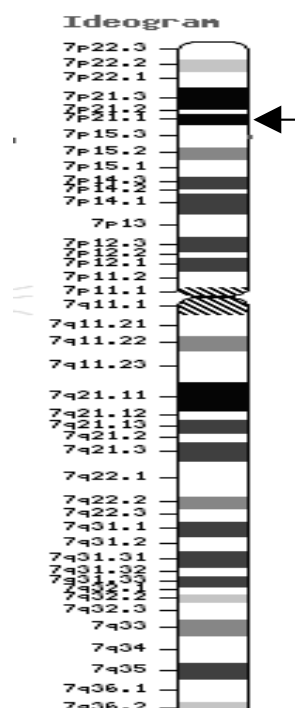
7.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ιντερλευκίνες ονομάζονται μία ομάδα κυττοκινών που πήραν το όνομά τους από τα πρώτα κύτταρα στα οποία φάνηκαν να εκφράζονται, τα λευκά αιμοσφαίρια. Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ιντερλευκίνες, και σπάνιες ανεπάρκειες αυτών έχουν περιγραφεί να οδηγούν όλες σε αυτοάνοσα νοσήματα ή ανοσοανεπάρκεια. Η πλειοψηφία των ιντερλευκινών συντίθεται από τα βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προάγουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των T, B και αιμοποιητικών κυττάρων (116).

Η IL-6 είναι μία κυττοκίνη με σημαντικότερο ρόλο στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (51). Είναι γνωστό πως έχει άμεση επίδραση στην έκκριση πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ (117). Η απάντηση οξείας φάσης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) στον ορό από 10 έως και 100 φορές, καθώς επίσης και αμυλοειδών πρωτεϊνών του ορού (SAA 1 και 2) και αποσφαιρίνης. Η παχυσαρκία στους ανθρώπους οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα IL-6, όπως και SAA 1 και 2 (118), αποσφαιρίνης (119) και CRP (73). Αυτές οι συσχετίσεις οδήγησαν στην υπόθεση πως η αυξημένη απελευθέρωση IL-6 από τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό καταλήγει σε αυξημένη συγκέντρωση κυκλοφορούσας IL-6 στο αίμα. Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο πως η αυξημένες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών οξείας φάσης σχετίζονται με την πρόκληση του διαβήτη τύπου II, την υπέρταση και την αθηροσκλήρωση ή ακόμη και αν η IL-6 είναι η μόνη κυττοκίνη που εμπλέκεται στη ρύθμισή τους. Πάντως, τεράστιες ποσότητες IL-6 απελευθερώνονται από τον ανθρώπινο λιπώδη ιστό, ειδικά από το σπλαχνικό τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*. Επιπλέον, κάποια από την IL-6 που παράγεται στον υποδόριο λιπώδη ιστό, φαίνεται να κυκλοφορεί στο αίμα (73).

7.2 ΓΟΝΙΔΙΟ

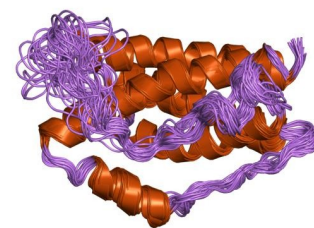
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-6 στους ανθρώπους οργανώνεται σε πέντε εξόνια και τέσσερα ιντρόνια και βρίσκεται στο κοντό άκρο του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα στη θέση 7p21 (120). Το mRNA του γονιδίου αυτού έχει μέγεθος 1.3kb. Η μετάφραση και οι μετα-μεταφραστικές διαδικασίες οδηγούν στη δημιουργία μιας πρωτεΐνης 21-28kDa με 184 αμινοξέα στην ώριμή της μορφή. Η ρυθμιστική περιοχή αλλά και η περιοχή του υποκινητή παρουσιάζουν μια πολύπλοκη οργάνωση, στην οποία μπορεί και να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η πολυλειτουργικότητα αυτής της κυτοκίνης. Αρκετοί ρυθμιστικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού παράγοντα κB (NFκβ), του πυρηνικού παράγοντα της IL-6 (nuclear factor IL-6/NF-IL6), της πρωτεΐνης ενεργοποίησης-1 (AP-1) και του στοιχείου πολλαπλής απάντησης (MLE) μεσολαβούν στην ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-6. από την άλλη, τα στεροειδή (γλυκοκορτικοειδή, οιστρογόνα και ανδρογόνα) αλλά και το στοιχείο ελέγχου του ρετινοβλαστώματος (RCE) οδηγούν σε αναστολή της δράσης του υποκινητή της. Εκτός της πολυπλοκότητας που προκύπτει από την οργάνωση του υποκινητή της IL-6, εναλλακτικό μάτισμα που συντελείται στο mRNA της αυξάνει την φαινοτυπική αστάθεια του προϊόντος (121).



Εικόνα 7.1: Χρωμόσωμα 7.
Το βέλος υποδεικνύει τη θέση του γονιδίου.
Πηγή:
www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.

7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής εκκρίνονται με την παρακάτω σειρά TNF- α , IL-1 και IL-6. Η IL-6 στη συνέχεια αναστέλλει την έκκριση TNF- α και IL-1, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί την παραγωγή ουσιών οξείας φάσης από το ήπαρ και ενεργοποιεί τον υποθάλαμο-υποφυσιακό άξονα ώστε να συμβάλλει στον έλεγχο της φλεγμονής (122). Με τον τρόπο αυτό η IL-6 αποτελεί τόσο μια προ-φλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη. Παράγεται όχι μόνο από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος αλλά και από τα βοηθητικά, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά, τους ινοβλάστες, τα μαστοκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Ακόμα, παράγεται από τους οστεοβλάστες, τα στηρικτικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα κερατινοκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα Leydig των όρχεων, τα κύτταρα της υπόφυσης, τα στηρικτικά κύτταρα του ενδομητρίου, οι τροφοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (123).



Εικόνα 7.2: Κρυσταλλική μορφή IL-6

Πηγή:

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PD_2il6_EBI.jpg

Απουσία φλεγμονής, ένα μεγάλο ποσοστό της IL-6 της κυκλοφορίας του αίματος προέρχεται από το λιπώδη ιστό και τα επίπεδα της στο αίμα σχετίζονται με τη μάζα του λιπώδους ιστού με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που σχετίζεται και η λεπτίνη (122). Μακροπρόθεσμες όσο και βραχυπρόθεσμες αλλαγές στην πρόσληψη τροφής επηρεάζουν την ποσότητα της IL-6 στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και στον λιπώδη ιστό. Κατά τη διάρκεια της άσκησης έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της IL-6 αυξάνονται κατά 100 φορές. Το εύρημα αυτό αντικατοπτρίζει την αυξημένη έκφρασή της στο σκελετικό μυ αλλά δεν φαίνεται, ωστόσο, να σχετίζεται με τη μυϊκή βλάβη. Επιπλέον η IL-6 και ο υποδοχέας της εκφράζονται στον πυρήνα του υποθαλάμου όπου έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της σύστασης σώματος (124).

7.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

7.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Όπως φαίνεται η IL-6 έχει πλειοτροπική δράση με αποτέλεσμα να εμπλέκεται σε πληθώρα διεργασιών μέσα στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του υποθάλαμο-υποφυσιακού άξονα και βρίσκεται σε αρνητικό έλεγχο από τα γλυκοκορτικοειδή. Διεγείρει την έκφραση αυξητικής ορμόνης, αναστέλλει την έκκριση της θυρεοειδοτρόπος ορμόνης και μειώνει τις συγκεντρώσεις των λιπιδίων στο πλάσμα. Επιπλέον, εκκρίνεται κατά το στρες και ρυθμίζεται θετικά από τις κατεχολαμίνες. Αρνητικά ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα και παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της οστεοπόρωσης, που παρατηρείται σε καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική απορρόφηση, όπως η έλλειψη στεροειδών και ο υπερπαραθυροειδισμός.

Συνοπτικά, οι αιματολογικές δράσεις της IL-6 είναι ο πολλαπλασιασμός των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, η κυτταρική αύξηση των κυττάρων του μυελώματος και του πλασματοκυτώματος. Ανοσολογικά δρα στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των B-κυττάρων, στην παραγωγή ανοσοσφαιρίνης από τα B-κύτταρα και

στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των T-κυττάρων. Στο ήπαρ, συμμετέχει στη διέγερση των ηπατικών κυττάρων και στη διέγερση πολλών γονιδίων της απάντησης οξείας φάσης, στο νευρικό σύστημα στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και στην καρδιά στην υπερτροφία του μυοκαρδίου. Τέλος, σημαντικές είναι και οι ενδοκρινικές δράσεις της IL-6 όπου φαίνεται να συμμετέχει στην πρόκληση θερμογένεσης, ως ενδογενές πυρετογόνο, στη διέγερση υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα, στη διέγερση της έκκρισης βασοπρεσσίνης, στη διέγερση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης, στην καταστολή του θυρεοειδούς, στη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων στο πλάσμα και στην οστεοπόρωση (125). Στη συνέχεια, θα αναφερθούν εκτενώς κάποιες πιθανές περιοχές δράσης της IL-6 με ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον.

7.4.2 IL-6 ΩΣ ΣΗΜΑ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΛΙΠΟΥΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ

Ανάμεσα στις κυτοκίνες που παράγονται από το λιπώδη ιστό, υπάρχουν κάποιες που μπορεί να συμβάλλουν στη σηματοδότηση στον εγκέφαλο για την ποσότητα της λιπώδους μάζας αλλά και στη διαφοροποίηση της. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι αρκετές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-6, IL-1 και η IL-8 και αρκετές χυμοκίνες μπορεί να συμμετέχουν στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής σε φυσιολογικές συνθήκες. Ανάμεσα στις άλλες, η IL-6 είναι πιθανότερα αυτή που παρουσιάζει καλύτερα τα πιο πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την ινσουλίνη, τη λεπτίνη και την αμυλίνη ως σήμα εναπόθεσης λίπους. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο λιπώδης ιστός παράγει περίπου το ένα τρίτο της IL-6 που υπάρχει στην κυκλοφορία. Επίσης, η IL-6 έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την ενεργειακή ισορροπία, τόσο μακροπρόθεσμα όσο και βραχυπρόθεσμα. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα IL-6 ορού συσχετίζονται με τη μάζα του λιπώδους ιστού στα ζώα και στον άνθρωπο, στον ίδιο βαθμό που σχετίζεται και η λεπτίνη. Όσον αφορά στον εγκέφαλο, η IL-6 ευνοεί ένα αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο αφού μειώνει την πρόσληψη τροφής και ενισχύει την ενεργειακή κατανάλωση. Στα τρωκτικά, η IL-6 και ο υποδοχέας της εκφράζονται στον υποθάλαμο, περιοχή του εγκεφάλου που συμμετέχουν στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου και υπάρχουν αρκετά δεδομένα ότι αυτή η παρατήρηση μπορεί να επεκταθεί και στους ανθρώπους (124).

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τόσο οι μακροπρόθεσμες όσο και οι βραχυπρόθεσμες αλλαγές στην ενεργειακή πρόσληψη επηρεάζουν την ποσότητα της IL-6 στο λιπώδη ιστό και στο αίμα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η IL-6 αυξάνει την ενεργειακή κατανάλωση και μειώνει τη λιπώδη μάζα μέσω επιδράσεων σε επίπεδο κεντρικού νευρικού συστήματος, πιθανώς στον υποθάλαμο (123). Η διεγερτική επίδραση στην ενεργειακή κατανάλωση μπορεί να ασκείται, τουλάχιστον στα τρωκτικά, μέσω διέγερσης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος που με τη σειρά του προκαλεί αυξημένη έκφραση της μη συζευγμένης πρωτεΐνης στο φαιό λιπώδη ιστό και επομένως αυξάνει τη θερμογένεση. Συγκριτικά, χαμηλά επίπεδα IL-6 απελευθερώνονται από το λευκό λιπώδη ιστό και μπορεί να φτάσουν στο ΚΝΣ. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις από πειραματικές μελέτες και μελέτες σε ανθρώπους πως επιπλέον ποσότητες IL-6 παράγονται από το ίδιο το ΚΝΣ υποδεικνύοντας ότι η τοπικά παραγόμενη IL-6 συμμετέχει στον έλεγχο της μεταβολικής λειτουργίας.

7.4.3 IL-6 ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Μεγάλες ποσότητες IL-6 παράγονται από τον ανθρώπινο λιπώδη ιστό τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, κυρίως από το σπλαχνικό περιτοναϊκό λιπώδη ιστό. Επιπλέον κάποια από την ποσότητα της IL-6 που παράγεται από τον ανθρώπινο υποδόριο λιπώδη ιστό εμφανίζεται στην κυκλοφορία (122,123). Έχει αναφερθεί, επίσης, θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων IL-6 στην κυκλοφορία του αίματος και της ινσουλινοαντίστασης, *in vivo* καθώς και θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του λιπώδους ιστού σε IL-6 και της ινσουλινοαντίστασης όσον αφορά στην πρόσληψη γλυκόζης σε ανθρώπους. Είναι πιθανό αυτές οι συσχετίσεις να μην έχουν αιτιολογική σχέση, αφού, υπάρχουν αρκετές καταστάσεις, κυρίως στο μυ, όπου η IL-6 αυξάνει παρά αναστέλλει την πρόσληψη γλυκόζης. Παρ' όλα αυτά, στο ήπαρ η IL-6 διαταράσσει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης (126). Παρόμοια, οι ερευνητές Rotter και συνεργάτες βρήκαν ότι η έγχυση για 2 ώρες μεγάλων ποσοτήτων IL-6 σε αρουραίους προκαλεί τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του μεταγωγέα σημάτων και ενεργοποιητή της μεταγραφής (STAT3) στο ήπαρ, στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό χωρίς να επηρεάζει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης σε αυτούς τους ιστούς. Μια εξήγηση για αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι ότι η IL-6 δεν επεμβαίνει στις δράσεις της ινσουλίνης αλλά κατά καιρούς ενεργοποιεί τη δημιουργία αντι-ινσουλινικών παραγόντων.

Συνοπτικά, η IL-6 φαίνεται να έχει ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου. Εδώ και αρκετό καιρό υποστηρίζεται ότι η IL-6 έχει δραματικές επιδράσεις στην έκκριση των πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ. Η απάντηση οξείας φάσης μπορεί να οδηγήσει σε 10-100 φορές αύξηση της CRP στον ορό αλλά και των Α αμυλοειδών πρωτεϊνών 1 και 2 (SAA1 & 2) στον ορό όπως και επίσης και σε κάπως μικρότερες αυξήσεις στην απτοσφαιρίνη. Η IL-6 έχει φανεί να είναι ο κυριότερος παράγοντας διέγερσης για την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ. Η παχυσαρκία σε ανθρώπους οδηγεί σε αυξήσεις στα επίπεδα της IL-6 στην κυκλοφορία. Επίσης έχει φανεί να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα στον ορό SAA1 & 2 απτοσφαιρίνης και CRP. Αυτές οι συσχετίσεις έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η παχυσαρκία οδηγεί σε αυξημένη έκκριση IL-6 από το σπλαχνικό λιπώδη ιστό που με τη σειρά της αυξάνει την παραγωγή και την έκκριση CRP, απτοσφαιρίνης και αμυλοειδών πρωτεϊνών από το ήπαρ. Παρ' όλα αυτά δεν είναι ξεκάθαρο πως οι αυξήσεις στις πρωτεΐνες οξείας φάσης σχετίζονται με την πρόκληση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και αθηροσκλήρωσης κι ακόμη αν η IL-6 είναι η μοναδική κυτοκίνη που παίρνει μέρος στη ρύθμισή τους (127).

8. ΒΙΣΦΑΤΙΝΗ

8.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Πρόσφατα, η βισφατίνη αναγνωρίστηκε ως ένα πεπτίδιο που εκφραζόταν και εκκρίνοταν κατά κύριο λόγο από τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό σε ανθρώπους και ποντίκια. Αυτό το πεπτίδιο είχε παλαιότερα περιγραφεί ως παράγοντας ανάπτυξης για τα πρόωμα Β κύτταρα. Η βισφατίνη ενεργοποιεί τους υποδοχείς ινσουλίνης *in vitro* σε διαφόρων τύπων ινσουλινο-ευαίσθητα κύτταρα και η χορήγησή της σε ποντίκια οδήγησε σε οξεία μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα *in vivo*. Επιπλέον, ποντίκια ετερόζυγα για μετάλλαξη που εκφράζει μη λειτουργικό μόριο βισφατίνης, είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα από τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Σε ανθρώπους, η ποσότητα σπλαχνικού λιπώδους ιστού που υπολογίστηκε με αξονική τομογραφία συσχετίστηκε ισχυρά με τα επίπεδα βισφατίνης στο πλάσμα, τη στιγμή που η συχέτιση τους με τον υποδόριο λιπώδη ιστό ήταν σχεδόν ανύπαρκτη. Συνδυάζοντας λοιπόν τα στοιχεία αυτά, προέκυψε το συμπέρασμα πως η βισφατίνη μπορεί να έχει ένα σημαντικό ρόλο στη σχέση μεταξύ σπλαχνικής παχυσαρκίας και αυξημένου μεταβολικού κινδύνου και θεωρείται πλέον ως ένας δείκτης σπλαχνικής παχυσαρκίας. (128,129)

8.2 ΓΟΝΙΔΙΟ

Το γονίδιο *visfatin* έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 7, ανάμεσα στη χρωμοσωμική περιοχή 7q22.1 και 7q31.33. κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 52-kDa που μοιάζει με κυτταροκίνη (εικόνα 1.8), και αρχικά απομονώθηκε ως ένας παράγοντας που συνεργάζεται με την IL-7 και τον παράγοντα εμβρυονικών κυττάρων για την ωρίμανση των Β προγονικών κυττάρων (130). Ο παράγοντας αυτός που ονομάστηκε PBEF βρέθηκε πρόσφατα, μόλις το 2004, ότι είναι το ίδιο μόριο με την πρωτεΐνη *visfatine* που παράγεται κυρίως από τον σπλαχνικό λιπώδη ιστό. Το mRNA του γονιδίου έχει μήκος περίπου 2.4 kb. Φέρει μόνο ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1470 βάσεων και η 3' αμετάφραστη περιοχή του αποτελείται κατά το 69% από AT με πολλαπλά μοτίβα TATT, τα οποία συνήθως εντοπίζονται σε mRNA κυτταροκινών και ογκογονιδίων. Υπάρχουν δύο μη τυπικά σήματα πολυαδενυλίωσης, AATAAA, ανάμεσα στις βάσεις 363 και 391 ανοδικά του 3' άκρου του μακρύτερου κλώνου. Υπάρχει και ένας μικρότερος κλώνος στον οποίο η πολυαδενυλίωση συμβαίνει μόλις 47 νουκλεοτίδια μετά το πρώτο σήμα πολυαδενυλίωσης (131). Αποτελείται από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια και η παρουσία δύο εκκινητών πιθανών να οδηγεί σε διαφορετική, ιστοειδική έκφραση των μεταγράφων. Η 5' περιοχή στερείται του κλασσικού μοτίβου αλληλουχίας που θα το ταξινομούσε μαζί με τις υπόλοιπες αιματοποιητικές κυτταροκίνες. Ωστόσο, φέρει διάφορα στοιχεία ελέγχου γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτό το γονίδιο να ανταποκρίνεται χημικά και μηχανικά σε διάφορους επαγωγείς της μεταγραφής (132).

8.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ

Γενομικές και γενετικές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει την PBEF ως ένα πρωτοπόρο και υποψήφιο γονίδιο και βιοδείκτη της άμεσης πνευμονικής κάκωσης και πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν ότι το μόριο αυτό συμμετέχει στην θρομβινοεπαγόμενη δυσλειτουργία του πνευμονικού ενδοθηλιακού φραγμού. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η PBEF εκφράζεται ιδιόστατικά από εμβρυικές μεμβράνες κατά

τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και εκφράζεται στο αμνιοτικό επιθήλιο και στα μεσεγγυματικά κύτταρα όπως επίσης και στην χοριονική κυττοτροφοβλάστη και στον τοιχωματικό υμένα. Ακόμα, θεωρείται ότι έχει κεντρικό ρόλο σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού λόγω φλεγμονής. Επίσης, έχει φανεί ότι ελέγχει την ενεργότητα της διακετυλάσης εξαρτώμενης από NAD⁺ και προωθεί την ωρίμανση των σπλαχνικών λείων μυϊκών κυττάρων (133).

Η PBEF που πλέον καλείται και βισφατίνη, εκφράζεται περισσότερο στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό σε σχέση με τον υποδόριο λιπώδη ιστό. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, τα επίπεδα της βισφατίνης μεταβάλλονται, και συγκεκριμένα αυξάνονται, υπονοώντας μια συσχέτιση της συγκεκριμένης πάθησης με το μορίου αυτό. Όπως αναφέραμε, τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό και τα επίπεδα της στο πλάσμα αυξάνονται παράλληλα με την κατάσταση της παχυσαρκίας. Εκτός από το σπλαχνικό λιπώδη ιστό, ωστόσο μπορεί να παραχθεί και από τους σκελετικούς μυς, το ήπαρ και τα λεμφοκύτταρα. Έχει ταυτοποιηθεί, πλέον, ότι η έκφραση της βισφατίνης ελέγχεται από κυτταροκίνες που προωθούν την ινσουλινοαντίσταση, όπως είναι ο λιποπολυσακχαρίτης, η IL-β, και οι IL-6, -4, και -5. Τέλος, φαίνεται ότι οι δράσεις του μορίου αυτού παρουσιάζουν ομοιότητες με τις αυξητικές δράσεις άλλων κυτταροκινών (134). Ωστόσο, παρά το πλήθος των πληροφοριών που έρχονται συνεχώς στην επιστημονική κοινότητα για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, χρειάζονται αρκετές μελέτες ακόμα για να διαλευκανθεί σε ικανοποιητικό βαθμό η ακριβής λειτουργία του.

8.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

8.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Αρκετά χαρακτηριστικά της βισφατίνης υποδηλώνουν πως αυτό το μόριο πιθανόν να είναι πολύ χρήσιμο στην κατανόηση των βιολογικών διαφορών μεταξύ σπλαχνικού και υποδόριου λιπώδους ιστού και της συμβολής τους στο μεταβολικό σύνδρομο. Καταρχάς, οι συγκεντρώσεις της που ανιχνεύονται στο πλάσμα σχετίζονται με τη σπλαχνική λιπώδη μάζα χωρίς να ισχύει το ίδιο και με την υποδόρια λιπώδη μάζα. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα επίπεδα της βισφατίνης αυξάνονται στο πλάσμα ύστερα από δίαιτα πλούσια σε λιπαρά υποδηλώνει ότι κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην ινσουλινοαντίσταση που προκαλείται είτε από την διατροφή είτε από την παχυσαρκία. Ο αρχικός χαρακτηρισμός της βισφατίνης την καθιστούσε ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη, παρ' όλο που δεν φέρει το τυπικό σηματοδοτικό πεπτίδιο που φέρουν άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Έτσι, με πρώτη ματιά, η βισφατίνη φαίνεται ως μια ιδανική υποψήφια λιποκυτταροκίνη που εκκρίνεται περισσότερο από το σπλαχνικό ιστό και συνδέει την εκτεταμένη εναπόθεση λίπους με την ινσουλινοαντίσταση (134). Παρ' όλο που ο Fukuhara και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ξεκάθαρα έναν ενδοκρινή ρόλο για τη βισφατίνη, δεν μπορεί να αποκλειστεί, ωστόσο, το ενδεχόμενο να ασκεί και παρακρινή δράση στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό, εξυπηρετώντας τη διαφοροποίηση του μέσω προ-λιπογενικών και λιπογενικών δράσεων. Στην πραγματικότητα, η υπερέκφραση της βισφατίνης σε μια προ-λιποκυτταρική σειρά οδηγεί στην ωρίμανσή της σε ώριμα λιποκύτταρα και προωθεί τη συσσώρευση λίπους μέσω της ενεργοποίησης της μεταφοράς γλυκόζης και της λιπογένεσης. Η άμεση επίδραση της βισφατίνης στο λιπώδη ιστό ενισχύεται περαιτέρω από τον εντοπισμό του μορίου στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας έτσι τη συμμετοχή της στον έλεγχο του κυτταρικού κύλου (135). Έτσι, η βισφατίνη πιθανόν να έχει διπλή λειτουργία: αφενός μια

αυτοκρινή / παρακρινή λειτουργία στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό εξυπηρετώντας τη διαφοροποίηση και την εναπόθεση λίπους, και αφετέρου μια ενδοκρινή δράση ρυθμίζοντας την ευαισθησία της ινσουλίνης στα περιφερικά όργανα (136).

8.4.2 ΒΙΣΦΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Η ανακάλυψη αυτής της «περίεργης» λιποκυτταροκίνης δίνει τη δυνατότητα να ενισχύσει στην κατανόηση του μεταβολικού συνδρόμου. Παρ' όλα αυτά όπως συμβαίνει με όλες τις ανακαλύψεις αυτά τα ευρήματα πρέπει να επιβεβαιωθούν. Ήδη υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου *visfatin* και στο μεταβολικό σύνδρομο πιθανόν να μην είναι καθολική σε όλα τα μοντέλα. Επίσης, εγείρονται και διάφορα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν πριν εκτιμηθεί η σημαντικότητα τους, όπως είναι για παράδειγμα ο καθορισμός της συμβολής της βισφατίνης που εκφράζεται από τον σπλαχνικό ιστό στον έλεγχο της συνολικής ινσουλινευαισθησίας. Παρ' όλο που η συνάφεια της βισφατίνης στους υποδοχείς της ινσουλίνης φαίνεται παρόμοια με αυτήν της ινσουλίνης, η συγκέντρωση της βισφατίνης στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλότερη, σε φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης, δεν επηρεάζεται από τη νηστεία και τη σίτιση. Το γεγονός αυτό δημιουργεί αμφιβολίες για τη σπουδαιότητα των συστηματικών ινσουλινευαίσθητων δράσεων της βισφατίνης. Ωστόσο, η δραματική αύξηση των επιπέδων της βισφατίνης στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό παχύσαρκων ποντικών καταδεικνύει ένα σημαντικό ρόλο του μορίου στην παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας. Έτσι, απομένει να ξεκαθαριστεί το κατά πόσο η παραγωγή της βισφατίνης αποτελεί αντισταθμιστική απόκριση στην ιστοειδική ινσουλινοαντίσταση ή είναι απλά ένας δείκτης ιστοειδικής φλεγμονώδους δράσης μιας κυτταροκίνης (137).

Από την άλλη, οι παρακρινείς ινσουλινονομιμητικές δράσεις της βισφατίνης στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό πιθανόν να φέρουν πιο άμεση συσχέτιση, ειδικά εάν η συγκέντρωση της βισφατίνης στον ιστό αυτό είναι υψηλότερη. Έτσι είναι πιθανό, οι αυτοκρινείς-παρακρινείς δράσεις της βισφατίνης, να σχετίζονται περισσότερο με την επέκταση των αποθεμάτων του σπλαχνικού λιπώδους ιστού παρά με τις ενδοκρινείς επιδράσεις στη βελτίωση της συνολικής ινσουλινευαισθησίας (134). Φαίνεται, λοιπόν, ότι για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη υπάρχουν πολλά πράγματα ακόμα που πρέπει να διευκρινιστούν προτού της αποδοθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο δράσης κατά την παχυσαρκία και άλλες παθολογικές καταστάσεις.

9. ΑΛΛΕΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

9.1 ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ

Η αντιπονεκτίνη αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1995 σε ορό από τρωκτικά (138). Αμέσως μετά, η πρωτεΐνη αυτή κλωνοποιήθηκε, μελετήθηκε και αρχικά ονομάστηκε AdipoQ (139). Το ερευνητικό ενδιαφέρον για αυτή παρέμεινε μειωμένο, έως το 2000 όπου βρέθηκε η ισχυρή συσχέτισή της με την παχυσαρκία, την ινσουλινοαντίσταση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (140,141).

Τα μονομερή της αντιπονεκτίνης έχουν ένα αμινοτελικό που προσομοιάζει τη δομή του κολλαγόνου και ένα καρβοξυτελικό σφαιρικό άκρο. Όταν τα μονομερή ενωθούν μεταξύ τους, σχηματίζουν τριμερή, εξαμερή και πολυμερή Υψηλού Μοριακού Βάρους (High Molecular Weight – HMW), αν και τα τελευταία φαίνονται να είναι τελικά η μορφή της με τη μεγαλύτερη ενεργότητα (142).

Η πρώτη αναγνωρισμένη μεταβολική ιδιότητα της αντιπονεκτίνης ήταν ο περιορισμός της αύξησης της μεταγευματικής συγκέντρωσης ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα χάρη στην διέγερση της οξειδωσης των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες (143). Η δεύτερη ιδιότητά της ανάγεται στη μειωμένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ (144).

Η παραγωγή αντιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα είναι μία σύνθετη διαδικασία, η οποία μπορεί να ρυθμιστεί σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, έκκρισης της αντιπονεκτίνης ή μετατροπής της στην πολυμερή της μορφή. Οι μοριακοί μηχανισμοί που αφορούν στην έκκριση και τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι, υπάρχουν όμως αρκετά στοιχεία για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της αντιπονεκτίνης. Ο λιπώδης ιστός παχύσαρκων ατόμων χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες (145), χρόνια φλεγμονή και διήθηση μακροφάγων (146). Έχει φανεί από πειράματα σε καλλιέργειες λιποκυττάρων, πως οι ελευθερες ρίζες οξυγόνου και οι προ-φλεγμονώδεις κυττοκίνες είναι οι πιο πιθανοί αναστολείς της έκφρασης του γονιδίου της αδιπονεκτίνης, γεγονός που εξηγεί τα μειωμένα της επίπεδα στα παχύσαρκα άτομα (145,147). Από την άλλη, η ίδια η αντιπονεκτίνη παρουσιάζει αντι-φλεγμονώδη δράση πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα (148) και τα μακροφάγα (149). Έτσι, η μειωμένη παραγωγή της μπορεί να χειροτερεύει τη φλεγμονή στο λιπώδη ιστό, οδηγώντας τελικά σε ακόμη μικρότερη παραγωγή της, δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο ανάμεσα στη φλεγμονή και την παχυσαρκία.

Στον ανθρώπινο οργανισμό, ένα ευρύ φάσμα συνεπειών φαίνεται να ακολουθεί τη χαμηλή συγκέντρωση αντιπονεκτίνης στο αίμα. Ανάμεσα σε αυτές, είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, με το δεύτερο να έχει σημαντικά υψηλή συσχέτιση (150). Επίσης, δεδομένα δείχνουν πως χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης ευνοούν τη δημιουργία ηπατικής ίνωσης (151), χειροτερεύουν τις ινο-φλεγμονώδεις εστίες στο ήπαρ (152) και ίσως να αυξάνουν τον κίνδυνο για την εμφάνιση κακοήθειας (153). Χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης στο αίμα συνήθως αντιπροσωπεύουν χαμηλά επίπεδα της HMW πολυμερούς μορφής της σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα ή ινσουλινοαντίσταση. Μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της αντιπονεκτίνης, που κυρίως αφορούν στο σχηματισμό των εξαμερών HMW μορφών της, έχουν συσχετιστεί άμεσα με την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (154). Αυτές και άλλες παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως η πολυμερής HMW μορφή της αντιπονεκτίνης είναι η πιο σημαντική κλινικά για την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων.

9.2 INTERΛΕΥΚΙΝΗ-2 (IL-2)

Η IL-2 ήταν το πρώτο από τα μόρια – ιντερλευκίνες που ανακαλύφθηκαν. Η ανακάλυψη του πρώτου μεσολαβητή του ανοσοποιητικού συστήματος που προσομοιάζε με ορμόνη έθεσε τις βάσεις για τη σημασία των κυττοκινών στην ανοσολογία. Η πρώτη λειτουργία της IL-2 που παρατηρήθηκε, ήταν η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων, ενώ αποτέλεσε την πρώτη κυττοκίνη που βρέθηκε να έχει ειδικό υποδοχέα και που κλωνοποιήθηκε και μελετήθηκε μέσω βιβλιοθήκης συμπληρωματικού DNA (cDNA). Έτσι, αν και πήρε τον αριθμό 2, ήταν πρώτη στη σειρά αναγνώρισης ως ιντερλευκίνη, υποδοχέας και γονίδιο (155,156).

Η IL-2 φυσιολογικά παράγεται από τον ανθρώπινο οργανισμό κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης (157,158). Όταν περιβαλλοντικοί παράγοντες (μόρια ή μικροοργανισμοί) βρίσκουν πρόσβαση στο σώμα, δρουν ως αντιγόνα και αναγνωρίζονται από του αντιγονο-υποδοχείς στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων. Η πρόσδεση ενός αντιγόνου ενεργοποιεί την έκκριση της IL-2 και την έκφραση των υποδοχέων της (IL-2R), η αλληλεπίδραση των οποίων με την IL-2 διεγείρει την ωρίμανση και την κυτταρική διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, η IL-2 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη “μνήμη” του ανοσοποιητικού συστήματος, που βασίζεται στην εξάπλωση ενός κλώνου T λεμφοκυττάρων, ειδικά για ένα αντιγόνο.

Επίσης, η IL-2 είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα και την ωρίμανση μίας υποομάδας τους, τα ρυθμιστικά T κύτταρα (T-regs) (159,160). Μετά την έξοδο τους από το θύμο αδένα, τα T-regs είναι υπεύθυνα να εμποδίζουν μέσω της αναστολής της παραγωγής IL-2 άλλα T κύτταρα από το να αναγνωρίσουν “αυτο-αντιγόνα”, να επιτεθούν δηλαδή σε κύτταρα ή μόρια που παράγει ο ίδιος ο οργανισμός (160). Έτσι, φαίνεται πόσο απαραίτητη είναι η IL-2 για τη διάκριση ανάμεσα στα εξωγενή και ενδογενή μόρια, μία από τις μοναδικές ικανότητες του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος, η IL-2 λαμβάνει μέρος στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα και επάγει τη διαφοροποίηση μίας άλλης κατηγορίας ανοσοκυττάρων που ονομάζονται Φυσικά Φονικά Κύτταρα (Natural Killer Cells, NK) (161,162).

9.3 ΡΕΖΙΣΤΙΝΗ

Αυτή η ορμόνη περιγράφηκε αρχικά το 2001, όταν η σχέση μεταξύ αυτής και την ινσουλινοαντίστασης στην παχυσαρκία βγήκε στην επιφάνεια. Ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται “μόρια προσομοιάζοντα στη ρεζιστίνη” (RELM). Είναι πλούσια σε κυστεΐνη και το μοριακό της βάρος είναι στα 12,5 KDa. Στον ανθρώπινο οργανισμό, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη ρεζιστίνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και η έκφρασή του δεν σχετίζεται ισχυρά με την παχυσαρκία. Μελέτες στο λιπώδη ιστό έχουν δείξει πως η ρεζιστίνη εκφράζεται περισσότερο στα πρώιμα λιποκύτταρα, παρά στα ώριμα, όπου η ποσότητά της είναι αμελητέα. Όπως ο TNF-α, η ρεζιστίνη είναι επίσης μία πρωτεΐνη με προ-φλεγμονώδη δράση, που εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα και τα λιποκύτταρα. Παρόλο που εκφράζεται και εκκρίνεται στα αδύνατα άτομα, τα επίπεδά της είναι γενικά περισσότερο υψηλά στην παχυσαρκία (43,162).

B. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ποσοτική ανάλυση των μεταγράφων των κυτταροκινών του λιπώδους ιστού και η συσχέτισή τους με δείκτες παχυσαρκίας. Συγκεκριμένα, μετρώνται οι συγκεντρώσεις των mRNA των κυτταροκινών TNFα, IL-6, leptin και visfatin στο λιπώδη ιστό και ερευνάται πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των μορίων αυτών στο λιπώδη ιστό. Παράλληλα, για τα ίδια γονίδια πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγράφων τους στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs). Έτσι, μελετάται συνολικά η έκφραση των παραπάνω κυτταροκινών ξεχωριστά στους δύο αυτούς ιστούς αλλά και μεταξύ τους, αναζητώντας συσχετίσεις ανάμεσα στην παιδική παχυσαρκία και τη φλεγμονή. Επιμέρους σκοποί είναι, επίσης, και ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύστασης του λιπώδους ιστού σε λιπαρά οξέα με σκοπό τον έλεγχο σχέσεων ανάμεσα στη διατροφή του πληθυσμού και στην έκφραση των συγκεκριμένων κυτταροκινών, θέμα το οποίο παρουσιάζεται σε αυτή την εργασία.

11. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

11.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμμετείχαν 31 παιδιά, ηλικίας 7-14 ετών, και των δύο φύλων (14 κορίτσια και 17 αγόρια) τα οποία έχουν εισαχθεί για εγχείρηση στο νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία στην Αθήνα, μετά από διάγνωση σκωληκοειδίτιδος ή κήλης, καταστάσεις που χρήζουν άμεσης χειρουργικής επέμβασης. Η συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα επιλέχθηκε, καθώς σε αυτήν την ηλικία είναι εφικτή η συνεργασία και η καλή επικοινωνία των παιδιών με τους ερευνητές (κάτι που δεν θα ήταν εφικτό αν τα παιδιά ήταν μικρότερης ηλικίας), ενώ ταυτόχρονα το μεγαλύτερο ποσοστό των παιδιών δεν έχει περάσει στο βιολογικό στάδιο της εφηβείας ώστε να επηρεάζονται διάφοροι ορμονικοί και βιοχημικοί παράγοντες από τις φυσιολογικές βιολογικές αλλαγές της εφηβείας.

Αρχικά, όσοι ασθενείς πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια (ηλικίας και είδους εγχείρισης) και βρίσκονταν υπό την επίβλεψη του παιδοχειρουργού Δρ Δημητριάδη, επιλέγονταν για τη μελέτη. Ο χειρουργός παρελάμβανε γραπτή συναίνεση συμμετοχής στη μελέτη από τους γονείς ή τους κηδεμόνες του παιδιού, αφού έχει περιγραφεί πλήρως από τον ίδιο ο σκοπός και το περιεχόμενο της μελέτης ενώ ταυτόχρονα παραλάμβαναν και το κατάλληλο ενημερωτικό φυλλάδιο του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου που αφορά στη συγκεκριμένη μελέτη. Συγκεκριμένα, με την εθελοντική συμμετοχή τους στην έρευνα, συναινούσαν για λήψη υποδόριου λιπώδους ιστού καθώς και για λήψη 10 ml αίματος. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της εγχείρισης πραγματοποιούταν λήψη μικρού δείγματος (5x5) υποδόριου λιπώδους ιστού.

Μετά το πέρας της εγχείρισης, πραγματοποιούνταν συνάντηση με εκπρόσωπο της ερευνητικής ομάδας με τους γονείς και το παιδί, όπου υπήρχε η δυνατότητα για περεταίρω επεξήγηση της μελέτης στην οποία συμμετείχαν εθελοντικά. Το νοσηλευτικό προσωπικό του νοσοκομείου πραγματοποιούσε λήψη 10ml αίματος με σκοπό την πραγματοποίηση γενικών και βιοχημικών εξετάσεων αίματος από το μικροβιολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου αλλά και για τις λοιπές ερευνητικές ανάγκες της μελέτης. Κατά τη διάρκεια της συνάντησης, εκτός από την ενημέρωση πραγματοποιούνταν και συμπλήρωση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων του τελευταίου χρόνου από το παιδί, με τη βοήθεια του κατάλληλα εκπαιδευμένου ατόμου από την επιστημονική ομάδα. Επίσης, πραγματοποιούνταν και λήψη οικογενειακού ιστορικού για παχυσαρκία, καρδιαγγειακά νοσήματα και διαβήτη τύπου II.

11.2 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ

Για την εκτίμηση του σωματικού λίπους χρησιμοποιήθηκε ο ΔΜΣ με βάση τον τύπο $\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{ΒΑΡΟΣ (kg)} / \text{ΥΨΟΣ}^2 \text{ (m}^2\text{)}$. Καθότι οι εθελοντές βρίσκονταν σε μετεγχειριστική κατάσταση δεν ήταν εφικτή η μέτρηση του ύψους όπως και του βάρους από το προσωπικό της ερευνητικής ομάδας. Έτσι, ως τιμές ύψους και βάρους λαμβάνονταν αυτές που αναφέρονταν από τους γονείς ή κηδεμόνες των εθελοντών. Επίσης, για τον ίδιο λόγο δεν ήταν εφικτές μετρήσεις όπως η περιφέρεια μέσης, ισχίων και βραχίονος καθώς και μετρήσεις δερματικών πτυχών.

Τα παιδιά κατηγοριοποιήθηκαν ως φυσιολογικού σωματικού βάρους, υπέρβαρα ή παχύσαρκα σύμφωνα με τις οριακές τιμές του ΔΜΣ που έχουν αναπτύξει οι Cole και συνεργάτες και έχει υιοθετήσει η Διεθνής Ομάδα Δράσης για την Παχυσαρκία (IOTF). Οι συγκεκριμένες τιμές προτιμήθηκαν από τα οριακά ποσοστημόρια των καμπύλων ανάπτυξης του CDC γιατί οι καμπύλες έχουν σχεδιαστεί βάση στοιχείων του αμερικάνικου πληθυσμού ενώ οι οριακές τιμές του Cole προέρχονται από στοιχεία 6 μεγάλων ερευνών από διάφορα κράτη, μεταξύ των οποίων και 2 ευρωπαϊκά (Ολλανδία, Μεγάλη Βρετανία), οι πληθυσμοί των οποίων αντιπροσωπεύουν καλύτερα τον ελληνικό πληθυσμό. Επιπλέον, οι οριακές τιμές του Cole αντιστοιχούν στις διεθνώς αναγνωρισμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες οριακές τιμές του ΔΜΣ (>25 και $>30 \text{ kg/m}^2$ για ενήλικες) για το υπερβάλλον βάρος και την παχυσαρκία, αντίστοιχα.

11.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

11.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Από τα δείγματα αίματος θα απομονωθούν ορός και πλάσμα για την πραγματοποίηση βιοχημικών μετρήσεων

Για απομόνωση πλάσματος χρησιμοποιούνται vacutainers με αντιπηκτικό (EDTA ή ηπαρίνη), ενώ για απομόνωση ορού χρησιμοποιούνται vacutainers με πήγμα ή μπίλιες ή χωρίς αντιπηκτικό.

Για την απομόνωση ορού ή πλάσματος φυγοκεντρούνται τα αντίστοιχα vacutainers με τα δείγματα σε 3000 rpm για 10 λεπτά (4 °C). Απομακρύνεται το πλάσμα ή ορός με αυτόματη πιπέτα και αποθηκεύεται στους –80°C.

11.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Από τα δείγματα αίματος θα πραγματοποιηθεί απομόνωση DNA, με τη χρήση των κατάλληλων πρωτοκόλλων (μέθοδος NaCl), από λευκοκύτταρα ολικού αίματος.

ΗΜΕΡΑ 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος μετά από φυγοκέντριση (10min, 3000rpm, 4°C).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος (λευκή στιβάδα) σε σωλήνα Falcon 50ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά τη διάρκεια των 20min).
5. Φυγοκέντριση (10min, 2000rpm, 4°C).
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 25ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
8. Φυγοκέντριση (10min, 2500rpm, 4°C).
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
10. Αν το ίζημα παραμένει κόκκινο επαναλαμβάνονται τα βήματα 7, 8 και 9.
11. Προσθήκη 3ml διαλύματος Lysis II και ισχυρή ανακίνηση.
12. Προσθήκη 50μl πρωτεΐνης K (20mg/ml).
13. Προσθήκη 150μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
14. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο ή φουρνάκι.

HMEPA 2''

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα Falcon 15ml.
2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
3. Φυγοκέντριση (10min, 3000rpm, 4°C). Με την φυγοκέντριση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντριση (10min, 3000rpm, 4°C).
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml.
6. Προσθήκη 2,5 φορές του όγκου σε αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.
8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
9. Μεταφορά του DNA σε σωλήνα eppendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
10. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (4°C).

11.3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMCs – Peripheral Blood Monocytes Cells)

Από τα δείγματα αίματος θα πραγματοποιηθεί απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με τη χρήση του πρωτοκόλλου επιστοίβασης με αντιδραστήριο φυκόλης. Τα απομονωμένα κύτταρα θα αποθηκευτούν σε βαθιά ψύξη (υγρό άζωτο) για τη διασφάλιση της ζωτικότητάς τους.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ PBMC ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΥΚΟΛΗΣ

1. Φυγοκέντρωση δειγμάτων αίματος (10 min, 3000 rpm) και απομάκρυνση πλάσματος (προσεχτικά να μην ανακινηθεί η λευκή στιβάδα).
2. Προσθήκη διαλύματος ίσου όγκου με το πλάσμα που απομακρύνθηκε και καλή ανακίνηση.
3. Προσθήκη φυκόλης ίσου όγκου με το αίμα σε νέο falcon (50 ml).
4. Με αποστειρωμένη πιπέτα 10 ml παίρνουμε το αίμα και με αργή ροή το ρίχνουμε στη φυκόλη, με προσοχή να μην την διαπερνά.
5. Φυγοκέντρωση (20 min, 1800 rpm, 20°C, 0 accel, 0 brake).
6. Με σύριγγα 10 ml απομακρύνουμε το υπερκείμενο σε απόβλητα (χλωρίνη) και συλλέγουμε τα κύτταρα από την ενδιάμεση στιβάδα. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε καθαρό falcon, αφού αφαιρέσουμε την βελόνα από τη σύριγγα.
7. Προσθέτουμε 25 ml PBS (Πρώτο πλύσιμο).
8. Φυγοκέντρωση (5 min, 1800 rpm).
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο στα απόβλητα. Χτυπάμε το ίζημα για να ανακατευτούν τα κύτταρα.
10. Προσθέτουμε 25 ml PBS (Δεύτερο πλύσιμο).
11. Φυγοκέντρωση (5 min, 1800 rpm).
12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο στα απόβλητα. Χτυπάμε το ίζημα για να ανακατευτούν τα κύτταρα.
13. Προσθέτουμε διάλυμα ψύξης (50 FBS:40 RPMI:10 DMSO).
14. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε cryovials και τα τοποθετούμε σε κουτί ισοπροπανόλης για 24 h και στη συνέχεια στο υγρό άζωτο.

11.3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ PBMCs (Isolation of RNA using Trizol Reagent)

Από τα δείγματα αίματος και ιστών θα πραγματοποιηθεί απομόνωση RNA, με τη χρήση κατάλληλου πρωτοκόλλου και αντιδραστηρίου (Trizol, Invitrogen).

1. Μετά την απομόνωση PBMC από 10 ml ολικού αίματος, διαλύεται το ίζημα κυττάρων σε 10 ml PBS και μεταφέρονται σε γυάλινο Falcon 15 ml.
2. Φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5' (20 °C) και απομάκρυνση υπερκείμενου.
3. Προσθήκη 1 ml Trizol και πιπετάρισμα για διάλυση ισζήματος.

4. Επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου (αποθήκευση στους -80°C).
5. Προσθήκη 200 µl χλωροφορμίου, ισχυρή ανακίνηση και επώαση για 2'-3' σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φυγοκέντριση σε 4000 rpm για 40' (2-8 °C).
7. Μετά την φυγοκέντριση διαχωρίζονται τρεις στοιβάδες: μια κόκκινη κατώτερη στοιβάδα (πρωτεΐνες), μια λευκή μεσοστοιβάδα (DNA) και μια διάφανη υδατική ανώτερη στοιβάδα. Το RNA περιέχεται στην ανώτερη υδατική στοιβάδα.
8. Μεταφορά της υδατικής στοιβάδας (600 µl) με προσοχή για να μην επιμολυνθεί από DNA (λευκή μεσοστοιβάδα) σε αποστειρωμένο screw cup tube και προσθήκη ίσου όγκου (600 µl) ισοπροπανόλης.
9. Ήπια ανακίνηση και επώαση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Φυγοκέντριση σε 12.000 g για 10' (μικρή φυγόκεντρος).
11. Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml αιθανόλης 75%.
12. Ήπιο vortex και φυγοκέντριση σε 7.500 g για 5' (μικρή φυγόκεντρος).
13. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το RNA (λευκή πελέτα στο τοίχωμα του tube). Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα RNA (~10', δεν πρέπει να αφυδατωθεί τελείως)
14. Προσθήκη 200-400 µl απεσταγμένου και αποστειρωμένου RNase-free νερού και πιπετάρισμα για να διαλυτοποιηθεί η πελέτα.
15. Επώαση για 10' σε 55-60 °C.
16. Αποθήκευση στους -80°C.

(Σε όλη τη διαδικασία χρησιμοποιούνται οι RNA πιπέτες και filter tips.)

11.3.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ

Μετά την αφαίρεση του λιπώδους ιστού από τον αρμόδιο γιατρό τοποθετείται αμέσως σε ειδικό δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο για περίπου μία ώρα. Αυτό αποσκοπεί στο άμεσο πάγωμα του ιστού με σκοπό την αποφυγή αλλοιώσεων της σύστασης του. Στη συνέχεια, τεμαχίζεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον και αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του. Για την απομόνωση RNA κόβουμε κομμάτι ιστού μεγέθους 220mg σε αποστειρωμένα τριβλία Petri με αποστειρωμένους κοπτήρες. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο και ταχύτατα με σκοπό να αποφύγουμε να ξεπαγώσει ο ιστός μέχρι να τοποθετηθεί στο αντιδραστήριο Trizol. Κατά τη διαδικασία αυτή κόβουμε ταυτόχρονα και 20-30mg ιστού, το οποίο αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι τη μέτρηση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία, διαδικασία που θα περιγραφεί παρακάτω.

Για την απομόνωση RNA από τον ιστό ακολουθήσαμε τα εξής στάδια:

1. Ομογενοποίηση του λιπώδους ιστού σε 4ml Trizol.
2. Φυγοκέντρηση (8.000rpm, 10min, 4°C).
3. Απομάκρυνση της ανώτερης λιπιδικής στιβάδας και μεταφορά της ενδιάμεσης χωρίς παράλληλα να μεταφερθεί και το ίζημα.
4. Προσθήκη 0,8 ml Trizol.
5. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3min.
6. Φυγοκέντρηση (10.000rpm, 15min, 4°C).
7. Μεταφορά της ανώτερης υδατινής φάσης.
8. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
9. Ήπια ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
10. Φυγοκέντρηση (12.000rpm, 10min).
11. Απομάκρυνση υπερκειμένου και πλύσιμο της πελέττας με 1ml αιθανόλης.
12. Φυγοκέντρηση (7.500rpm, 5min).
13. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
14. Διάλυση της πελέττας με 70-100μl RNase-free νερού.

Το αντιδραστήριο Trizol είναι προϊόν της εταιρείας Invitrogen και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε τόσο για την απομόνωση RNA από τα PBMCs αλλά όσο και από το λιπώδη ιστό διαμορφώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας, για τις ανάγκες του εκάστοτε ιστού. Μετά την απομόνωση RNA, ακολουθεί REAL-TIME PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό σε πραγματικό χρόνο των μεταγράφων των γονιδίων στο λιπώδη ιστό και στα PBMCs.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα στάδια αντίστροφης μεταγραφής του RNA, του καθαρισμού του cDNA, η Real-Time PCR καθώς και η μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στον ορό πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο φαρμακολογίας του ινστιτούτου INSERM U525 στο Nancy, ενώ, όλα τα υπόλοιπα πειραματικά στάδια πραγματοποιήθηκαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, από την ίδια ερευνητική ομάδα.

11.3.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Lysis I (20x)

- 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- 10,01gr KHCO_3 (200mM).
- 20ml EDTA (0,5M).
- Προσθήκη $\approx 400\text{ml}$ απεσταγμένο νερό.
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- Αποστείρωση.

Lysis I (1x)

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

Lysis II

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

Πρωτεΐνωση K (20mg/ml)

- 100mg πρωτεΐνωση K.
- 5ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
- Αποθήκευση στους -20 °C.

EDTA 0,5M

- 186,1gr EDTA2H₂O.
- Προσθήκη $\sim$ 700ml απεσταγμένου νερού.
- Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

SDS 20%

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

Tris-EDTA (TE)

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

Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)

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

Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)

- 200ml TBE 5x.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt. Ανάδευση.

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

- 10mg EtBr.
- 1ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.

- Φύλαξη στους 4° C

11.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΠΟΛΥΤΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (ABSOLUTE REAL-TIME PCR).

11.4.1 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής είναι η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με μήτρα το RNA. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται από τις αντίστροφες μεταγραφάσες, τα ένζυμα δηλαδή που μπορούν να χρησιμοποιούν ως μήτρα RNA με σκοπό τη σύνθεση του cDNA. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας επιλέξαμε το kit της εταιρείας Qiagen, συγκεκριμένα το ‘QuantiTect®Reverse Transcription Kit’. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: απομάκρυνση του γενομικού DNA και εν συνεχεία αντίστροφη μεταγραφή.

Για το πρώτο στάδιο στο RNA προστίθεται το διάλυμα ‘gDNA Wipeout Buffer’ και πραγματοποιείται επώαση για 2 min στους 42°C. Στη συνέχεια προσθέτουμε:

- 1) το έτοιμο διάλυμα ‘Quantiscript Reverse Transcriptase’ το οποίο συμπεριλαμβάνει και παράγοντα αναστολής RNασών
- 2) το έτοιμο διάλυμα με τη μεταγραφάση και
- 3) το διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, το οποίο περιέχει ένα μίγμα τυχαίων εκκινητών και εκκινητών oligo-dT.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση για 30 λεπτά στους 42°C και μετά για 3 λεπτά στους 95°C με σκοπό τη μετουσίωση των ενζύμων.

11.4.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ cDNA

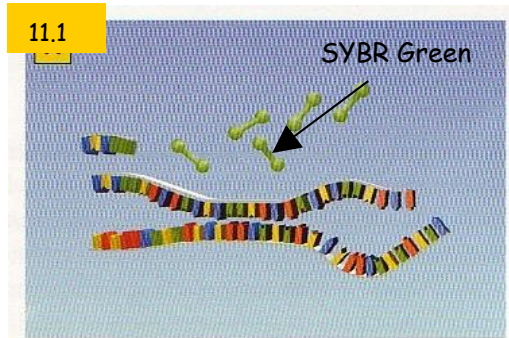
Μετά την αντίστροφη μεταγραφή τα δείγματα ‘καθαρίζονται’ με τη βοήθεια του kit QIAquick PCR Purification Kit και στο τέλος της διαδικασίας ανακτάται για κάθε δείγμα 200μl ‘καθαρού’ cDNA. Το στάδιο του καθαρισμού εξυπηρετεί τη φωτομέτρηση των cDNA, έτσι ώστε να βρίσκονται όλα τα δείγματα σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Μετά τον καθαρισμό όλα τα δείγματα φωτομετρούνται και διαλύονται έτσι ώστε να έχουμε σε όλα τα δείγματα τελική συγκέντρωση 5ng/μl. Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης απόλυτου πραγματικού χρόνου χρησιμοποιούμε δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

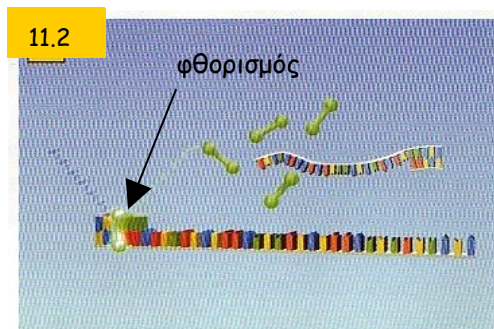
11.4.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ABSOLUTE REAL-TIME PCR

Η αντίδραση πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας cDNA πραγματοποιείται με ακριβώς τα ίδια βασικά βήματα μιας κλασσικής αντίδρασης πολυμεράσης. Αυτό σημαίνει ότι υφίσταται κανονικά το άνοιγμα των αλυσίδων, η υβριδοποίηση και η επιμήκυνση. Η διαφορά με την κλασσική PCR έγκειται στο ότι στη Real-Time PCR χρησιμοποιείται ένα φθορίζον μόριο που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση και το χαρακτηρισμό των αντιγράφων που σχηματίζονται σε πραγματικό χρόνο. (εικόνες 11.1, 11.2, 11.3, 11.4). Αυτή η τεχνική μας επιτρέπει να κάνουμε έναν σχετικό υπολογισμό των γονιδίων που περιέχονται στα δείγματα σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς. Επίσης είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί και απόλυτος προσδιορισμός (δηλαδή μέτρηση σε αριθμό αντιγράφων) σε σχέση με μία καθορισμένη καμπύλη αναφοράς. Σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης (κλασσική

PCR, Northern-Blot) η Real-time PCR απαιτεί τη μικρότερη αρχική ποσότητα cDNA, συγκεκριμένα ορισμένα ng. Είναι γρήγορη, με απόδοση 32 δείγματα σε δύομισι ώρες, ευαίσθητη και η ποσοτικοποίηση είναι ακριβής. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορούν να είναι ορατά κατά τη διάρκεια που πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, τα 32 δείγματα επεξεργάζονται ταυτόχρονα σε τριχοειδή (capillaries) μικρού όγκου και η καμπύλη αναφοράς επιτρέπει την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος που σχηματίζεται καθώς και την ειδικότητά του.



Εικόνα 11.1: αποδιάταξη → στην αρχή του πολλαπλασιασμού το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει το cDNA αποδιαταγμένο, τους εκκινητές και το SYBR Green ελεύθερο στο διάλυμα.



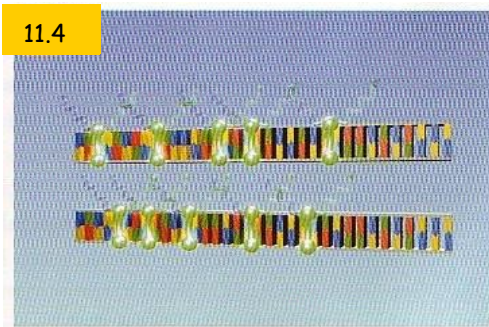
Εικόνα 11.2: υβριδοποίηση → μετά την ένωση των εκκινητών το φθορίζον μόριο ενώνεται στο δίκλωνο cDNA. Η συνάφεια μεταφράζεται με την αύξηση του φθορίζοντος σήματος.

11.3



Εικόνα 11.3: Επιμήκυνση→ κατά το στάδιο της επιμήκυνσης το φθορίζοντα μόρια ενώνονται στο cDNA που συντίθεται, κάτι που αντιστοιχεί σε αύξηση του σήματος φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης σε κάθε κύκλο.

11.4



Εικόνα 11.4: Λήξη επιμήκυνσης→ στο τέλος της φάσης της επιμήκυνσης, όλο το cDNA βρίσκεται σε δίκλωνη κατάσταση. Η μεγαλύτερη ποσότητα του SYBR Green βρίσκεται ενωμένο στο cDNA.

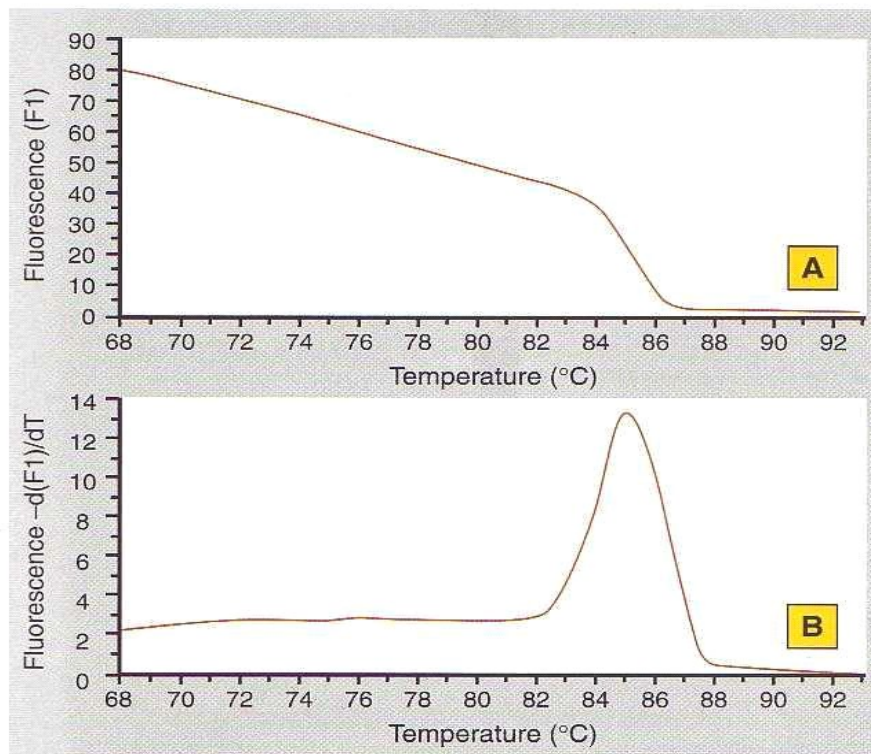
Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την Real-Time PCR ήταν το Light Cycler της εταιρείας Roche Molecular System. Το συγκεκριμένο μηχάνημα επιτρέπει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό 32 δειγμάτων με χρήση της φθορίζουσας βαφής SYBR Green. Σε κάθε κύκλο PCR, κάθε τριχοειδές περνά από ένα οπτικό σύστημα και μετράται ο φθορισμός. Η SYBR Green είναι ένα φθορίζον μόριο ικανό να ενώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA. Σε διάλυμα όπου βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση δεν φθορίζει, παρά μόνο όταν είναι συνδεδεμένο με δίκλωνο μόριο cDNA. Είναι εξαιρετικά σταθερό μόριο, με μόνο 6% της συνολικής ενεργότητας να χάνεται κατά την όλη διαδικασία. Το ειδικό σπεκτροφωτόμετρο του μηχανήματος επιτρέπει την ανάγνωση ενός τέτοιου φθορίζοντος μορίου.

Το kit που χρησιμοποιήθηκε για το μηχάνημα Light Cycler ήταν το Kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS}. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται περιέχει όλα τα αρχικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται και σε μία κλασσική PCR (dNTPs, MgCl₂, Taq Polymerase και το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου) καθώς και το φθορίζον μόριο SYBR Green. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται τα απαραίτητα βήματα που πρέπει να πραγματοποιηθούν και βελτιστοποιούνται οι συνθήκες της PCR. Παρ' όλα αυτά, η προετοιμασία του κύριου διαλύματος πρέπει να πραγματοποιείται με προσοχή, καθώς οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά μικροί και επίσης ελλοχεύει ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Το πρωτόκολλο του κύριου διαλύματος καθορίζεται από τον κατασκευαστή όσον αφορά στον όγκο του MasterMix που είναι 4μl και 5μl δείγματος. Ο τελικός όγκος πρέπει να είναι 20μl και από κει και πέρα έγκειται στον χειριστή του πειράματος για τους όγκους δεξιού και αριστερού εκκινητή.

Κάθε παράγωγο δίκλωνο cDNA συντίθεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης (T_m), η οποία καθορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του cDNA βρίσκεται σε δίκλωνη κατάσταση και το άλλο 50% σε μονόκλωνη κατάσταση. Μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR, η θερμοκρασία αυξάνεται ταχύτατα στους 95°C για το άνοιγμα των ελίκων του cDNA, μετά επανέρχεται στη θερμοκρασία υβριδοποίησης η οποία συντελεί την επαναδιάταξη του δίκλωνου cDNA. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ανεβαίνει ξανά στους 95°C.

Ο φθορισμός διαβάζεται συνέχεια όταν ξανανεβαίνει η θερμοκρασία (εικόνα 11.5):

- Το SYBR Green φθορίζει όταν είναι ενωμένο στο δίκλωνο cDNA.
- Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, οι δύο έλικες του cDNA διαχωρίζονται και αυτό είναι η αιτία για την απελευθέρωση του SYBR Green στο μέσο και μια σταδιακή μείωση του φθορισμού.
- Όταν έχει πια διαχωριστεί το 50% του δίκλωνου cDNA, ο φθορισμός μειώνεται στη συνέχεια απότομα μέχρι τον πλήρη διαχωρισμό των ελίκων. Η T_m αντιστοιχεί στη θερμοκρασία στην οποία ενώνεται το προϊόν που σχηματίζεται και αναπαριστάται με μία συγκεκριμένη κορυφή στην οθόνη (εικόνα 11.6).



Εικόνα 11.5: Ο φθορισμός σε σχέση με τη θερμοκρασία

Εικόνα 11.6: Καμπύλη αναφοράς όπου παρατηρούμε την συγκεκριμένη κορυφή που ανταποκρίνεται στην T_m του τμήματος που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε.

11.4.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Η επιλογή των εκκινήτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Primer Premier de Biosoft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Για το σκοπό αυτό αρκούσε να διευκρινίσουμε την αλληλουχία του cDNA που θέλαμε να πολλαπλασιάσουμε. Στη συνέχεια πρέπει να καθορίσουμε τα κριτήρια που επιθυμούμε για τους εκκινήτες. Για την επιλογή των εκκινήτων που χρησιμοποιούνται στην Real-Time PCR οι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνουμε υπ' όψιν είναι οι εξής:

- 1) το μήκος τους να είναι από 15 μέχρι 30 νουκλεοτίδια
- 2) να έχουν περιεκτικότητα 40-60% σε GC
- 3) η επί τις εκατό περιεκτικότητα σε GC κοντά στους εκκινήτες
- 4) το μήκος της ενδιάμεσης αλληλουχίας να έχει μήκος 150-300bp
- 5) η T_m των εκκινήτων να είναι πλησίον με της ακολουθίας και
- 6) οι εκκινήτες να μην βρίσκονται κοντά στην polyA ουρά του mRNA.

Το συγκεκριμένο λογισμικό μας ενημέρωνε επίσης για την κατάσταση των δευτεροταγών δομών που πιθανόν να υφίστανται σε κάθε ζευγάρι. Η εκπλήρωση όλων των παραπάνω κριτηρίων εξυπηρετούν την επιτυχία και την αξιοπιστία της Real-Time PCR.

Η αρχή της Real-Time PCR για ένα γονίδιο ελέγχεται από δύο σημεία:

- 1) Μια καμπύλη αναφοράς με μία κορυφή που αντιστοιχεί στην T_m συγκεκριμένη για το ενδιάμεσο τμήμα που μας ενδιαφέρει να πολλαπλασιάσουμε και
- 2) Μια μοναδική ζώνωση που αντιστοιχεί στον αριθμό των βάσεων του επιθυμητού τμήματος, μετά από φόρτωση του προϊόντος της PCR σε γέλη αгарόζης 2%.

Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες της PCR παρατίθενται στον πίνακα 11.1.

Γονίδιο	Συγκέντρωση εκκινητών	Εκκινητής	Αλληλουχία	Υβριδοποίηση	επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων
TNFα	0.75μM	Sense	5' TCTACTTTGGGATCATTGCC 3'	60°C 10 sec	72°C 7 sec	40
		Antisense	5' GTGGTGGTCTTGTGCTTA 3'			
IL6	1μM	Sense	5' TACCCCCAGGAGAAGATTCC 3'	60°C 5 sec	72°C 8 sec	40
		Antisense	5' GCCATCTTTGGAAGGTCAG 3'			
LEPTINE	0.5μM	Sense	5' GTGCGGATTCTTGTGG 3'	60°C 10 sec	72°C 6 sec	40
		Antisense	5' GACTTTCTGTTTGGAGGA 3'			
VISFATINE	0.5μM	Sense	5' TGTGGTCAGCGATAGC 3'	62°C 10 sec	72°C 8 sec	40
		Antisens	5' AAGATAAGGTGGCAGC 3'			

Πίνακας 11.1: Συνθήκες PCR

11.4.5 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Όταν η PCR φτάσει σε ένα σημείο, χρησιμοποιούμε ένα προϊόν της PCR για την προετοιμασία της καμπύλης αναφοράς για κάθε γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Αυτό το προϊόν καθαρίζεται με το kit QIAquick PCR Purification Kit της εταιρείας Qiagen και στη συνέχεια φωτομετράται. Ο υπολογισμός των αριθμών των αντιγράφων μετά την αντίδραση γίνεται ως εξής:

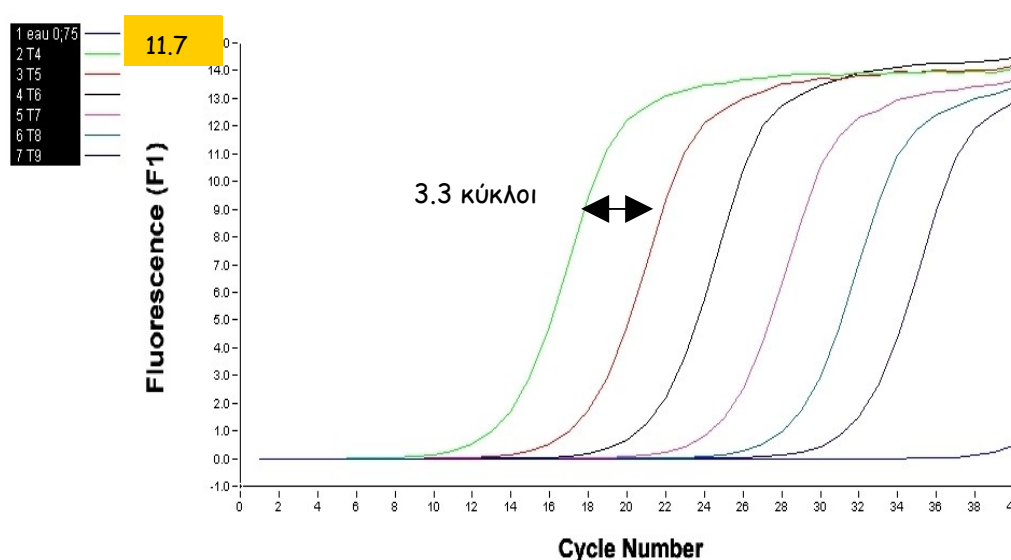
Αριθμός αντιγράφων/μl = 6×10^{23} μόρια (αντίγραφα/mol) x συγκέντρωση (g/ml) / μοριακή μάζα (g/mol).

1 mol = 6×10^{23} μόρια (αντίγραφα)

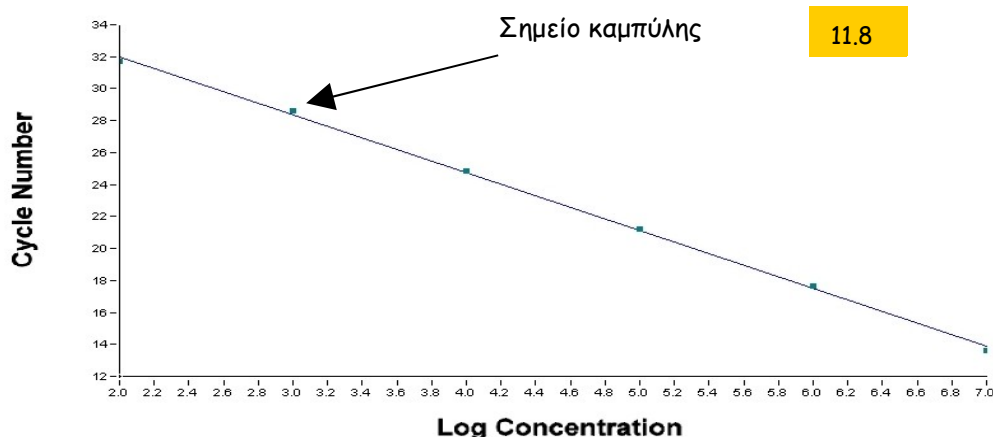
Μοριακή μάζα (g/mol) = αριθμός ζευγών βάσεων x 660 daltons.

1 D.O. = 50 ng/μl → πολλαπλασιασμός του D.O. του διαλύματος με τον παράγοντα διάλυσης.

Εν συνεχεία, πραγματοποιούμε συνεχείς διαλύσεις x10 κλιμακωτά με το αντιδραστήριο EB του kit καθαρισμού, έτσι ώστε να κατασκευάσουμε την καμπύλη. (κάθε διάλυση x10 αντιστοιχεί σε μία διαφορά 3.3 κύκλων). Για να ταυτοποιήσουμε την ποιότητα της καμπύλης πραγματοποιείται ένας πολλαπλασιασμός κάθε σημείου της κλίμακας σε Real-Time PCR.(εικόνα 11.7).



Ιδανικά, ένα ενδιάμεσο 3.3 κύκλων αντιστοιχεί σε 100% αποτελεσματικότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Όσο περισσότερο πλησιάζει η απόδοση της αντίδρασης το 100% τόσο περισσότερο προσεγγίζουμε μια αξιόπιστη μέτρηση των αριθμών των αντιγράφων των δειγμάτων με μη συνεχή συγκέντρωση. Η αποδοτικότητα υπολογίζεται σε συνάρτηση με μία κλίση, η οποία υπολογίζεται από το μηχάνημα. Μία άλλη ένδειξη, το λάθος, υπολογίζεται επίσης από το μηχάνημα και δίνει έτσι μια εικόνα για την ποιότητα της καμπύλης (ιδανικά, όλα τα σημεία πρέπει να βρίσκονται δεξιά της καμπύλης) (εικόνα 11.8).



Εφόσον για την απόλυτη ποσοτικοποίηση βασιζόμαστε στην καμπύλη για να υπολογίσουμε τα δείγματα που μας ενδιαφέρουν, πρέπει επίσης να καθοριστούν σωστά και οι αποστάσεις των διαλύσεων της καμπύλης με γνώμονα το ποσοστό της έκφρασης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει στον υπό μελέτη ιστό. Αυτό σημαίνει, ότι εάν η έκφραση του γονιδίου στο δείγμα ξεπερνά των αποστάσεων της καμπύλης, τότε δεν θα είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση.

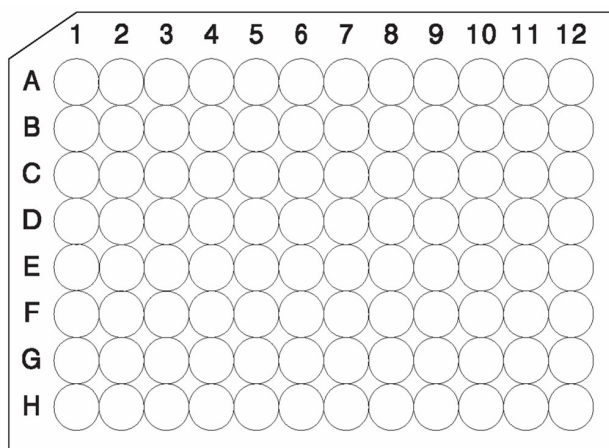
11.4.6 ΑΠΟΛΥΤΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό μιας ποσότητας ασυνεχούς cDNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει μαζί με τα διαφορετικά σημεία της καμπύλης για τα οποία είναι γνωστός ο αριθμός των αντιγράφων. Η συσκευή υπολογίζει στη συνέχεια τον αριθμό των αντιγράφων που αντιστοιχούν στο τμήμα του γονιδίου που μελετάμε. Κάθε δείγμα πολλαπλασιάζεται δύο φορές με σκοπό να ελέγξουμε τις διακυμάνσεις που πιθανόν να υπάρξουν κατά την πειραματικό χειρισμό και σε κάθε εφαρμογή της PCR χρησιμοποιείται ένα δείγμα συνεχόμενης συγκέντρωσης με σκοπό να ελέγξουμε τις διακυμάνσεις που πιθανόν να υπάρξουν κατά την εφαρμογή της PCR.

11.5 ENZYMΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (ELISA)

11.5.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ELISA

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων αντισωμάτων ή αντιγόνων σε ένα δείγμα. Είναι μία απλή δοκιμασία με δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων και αποτελεί μια σημαντική διαγνωστική τεχνική. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στη φυσική ιδιότητα των αντιγόνων και των αντισωμάτων να ενώνονται μεταξύ τους με εξαιρετικά μεγάλη συνάφεια και ειδικότητα. Μία πλαστική πλάκα (dish) με πολλά βοθρία (wells) (εικόνα 11.9) καλύπτεται με ένα αντίσωμα ειδικό για συγκεκριμένο αντιγόνο. Στη συνέχεια κάθε δείγμα τοποθετείται σε κάθε βοθρίο. Αρκετά από τα βοθρία δεν καλύπτονται από δείγμα καθώς περιέχουν θετικά και αρνητικά διαλύματα ελέγχου (positive και negative control) για την επιτυχία και απόδοση της τεχνικής. Αν τα αντιγόνα του δείγματος ταιριάζουν με το αντίσωμα στο βοθρίο δεσμεύονται ισχυρά. Όσα δεν ενώνονται απομακρύνονται από το βοθρίο με πλύσεις. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο αντίσωμα τοποθετείται στις πλάκες, τα οποία επίσης δεσμεύονται ειδικά μόνο στο αντιγόνο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο, το οποίο μπορεί να παράγει φως (ή φθορισμό σε παραλλαγές της μεθόδου), όταν προστεθεί ειδικό διάλυμα. Ολόκληρη η πλάκα στη συνέχεια διαβάζεται από μηχανήμα-σαρωτή που ανιχνεύει τη παρουσία του ενζύμου. Αν εμφανίζεται χρώμα, σημαίνει ότι στο δείγμα υπάρχει το αντίστοιχο αντιγόνο. Αν δεν εμφανίζεται χρώμα σημαίνει ότι δεν υπάρχει στο δείγμα το αντιγόνο που ενώνεται ειδικά με το πρώτο αντίσωμα. Τα δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται για να μπορούμε να εξακριβώσουμε ότι η όλη διαδικασία ήταν πετυχημένη. Στην περίπτωση αυτή τα θετικά δείγματα ελέγχου πρέπει να χρωματίζονται, όπως και τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ τα αρνητικά δείγματα ελέγχου πρέπει να παραμένουν άχρωμα.



Εικόνα 11.9: Σχηματική απεικόνιση των πλακών χωρητικότητας 96 βοθρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι θέσεις που χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου (θετικά/αρνητικά) είναι τυχαίες.

Στη παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό των επιπέδων στον ορό των κυτταροκινών TNF- α και IL-6 και της λιποκυτταροκίνης Leptine, χρησιμοποιήθηκε το kit Quantikine® της εταιρείας R&D Systems Inc., το αντίστοιχο για κάθε πρωτεΐνη που θέλαμε να μετρήσουμε. Η τεχνική στην οποία βασίζονται τα παραπάνω kit είναι η ποσοτική ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση τύπου «sandwich» και τα βήματα που ακολουθήσαμε ήταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εκάστοτε εταιρείας.

Για τη πρωτεΐνη Visfatine χρησιμοποιήθηκε το kit της Phoenix Pharmaceuticals. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται από αυτό το kit είναι η “competitive enzyme immunoassay”, μια παραλλαγή της κλασσικής Elisa, που περιγράψαμε παραπάνω. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα δευτερογενές αντίσωμα με το οποίο έχει επικαλυφθεί η πλάκα που προμηθεύει η εταιρεία, και στο οποίο έχουν μπλοκαρισθεί οι μη ειδικές περιοχές πρόσδεσης. Το δευτερογενές αντίσωμα μπορεί και ενώνεται στο τμήμα Fc του κυρίως αντισώματος, δηλαδή του αντισώματος που είναι ειδικό για το πεπτίδιο. Στις περιοχές Fab του πρωταρχικού αντισώματος θα δεσμευθούν ανταγωνιστικά το πεπτίδιο ενωμένο με βιοτίνη και το πεπτίδιο ελέγχου ή το πεπτίδιο του δείγματος. Το πεπτίδιο ενωμένο με βιοτίνη μπορεί να αλληλεπιδρά με την υπεροξειδάση της στρεπταβιδίνης (streptavidin-horseradish peroxidase-SA-HRP) και να καταλυει το διάλυμα υποστρώματος που αποτελείται από 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) και υπεροξείδιο του υδρογόνου με σκοπό την παραγωγή μπλε-χρωμοφόρου διαλύματος. Η αντίδραση ενζύμου υποστρώματος σταματά με HCL και το διάλυμα χρωματίζεται κίτρινο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος είναι άμεσα ανάλογη με την ποσότητα του συμπλόκου “πεπτίδιο ενωμένο με βιοτίνη-SA-HRP” και αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα του πεπτιδίου στα δείγματα ελέγχου ή στα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό συμβαίνει λόγω της ανταγωνιστικής πρόσδεσης του πεπτιδίου ενωμένο με βιοτίνη και του πεπτιδίου στα standards ή του πεπτιδίου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στα δείγματα με το πρωταρχικό αντίσωμα. Στη συνέχεια κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη του πεπτιδίου με γνωστή συγκέντρωση και το πεπτίδιο που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε μετράται με βάση αυτήν.

11.5.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ELISA

Ανεξάρτητα με το kit που χρησιμοποιείται, στα δείγματα ορού πριν την ανάλυση ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Η απομόνωση του ορού έχει ήδη πραγματοποιηθεί την ημέρα της αιμοληψίας και ο απομονωμένος ορός βρίσκεται στους -80°C . Πριν την πραγματοποίηση της ELISA τα δείγματα έχουν ξεπαγώσει και έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτήν την θερμοκρασία τα δείγματα παρέμειναν το πολύ για μισή ώρα προς αποφυγή αλλοίωσης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

Για τη μέτρηση των επιπέδων της λεπτίνης πραγματοποιήσαμε αραιώσεις των δειγμάτων (1:100) με Calibrator Diluent RD5P (1X).

➤ TNFa:

Πριν την ανάλυση είναι απαραίτητα η προετοιμασία των αντιδραστηρίων που προμηθεύονται από την εταιρεία.

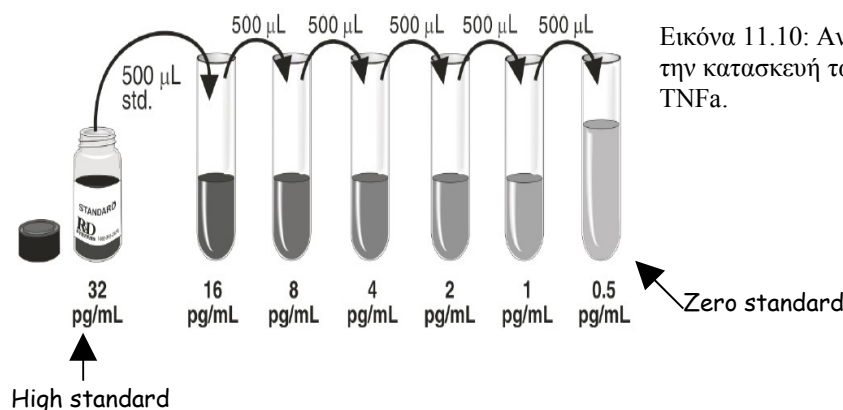
Wash Buffer → Αραίωση των 100mL πυκνού Wash Buffer με απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο διαλύματος 1000mL.

Substrate Solution → Προσθήκη 6ml Substrate Solution στο λυοφιλιωμένο υπόστρωμα και ισχυρή ανακίνηση.

Amplifier Solution → Προσθήκη 6ml Amplifier Solution στο λυοφιλιωμένο Amplifier και ισχυρή ανακίνηση.

TNFa Standard → Ανάμιξη του TNFa Standard με τόση ποσότητα Calibrator Diluent RD6-13 όση αναγράφεται στο δοχείο για τη δημιουργία διαλύματος stock συγκέντρωσης 32pg/ml (1X).

Αραιώσεις → Σε 6 eppendorfs προσθέτουμε στο καθένα 500μL Calibrator Diluent RD6-13 και πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις (εικόνα 11.10) με το διάλυμα stock που κατασκευάσαμε προγουμένως.



1. Προσθήκη 50μL assay diluent RD1F σε κάθε βοθρίο.
2. Προσθήκη 200μL από τα standards, τα δείγματα ή control στα αντίστοιχα βοθρία επικάλυψη της πλάκας με την κατάλληλη ταινία και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες.
3. Πλύσεις: αφαίρεση του υγρού των βοθρίων, προσθήκη 400μL Wash Buffer ξανά αφαίρεση του υγρού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 6 φορές.
4. Προσθήκη 200μL TFa HS Conjugate σε κάθε θέση, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Επανάληψη των πλύσεων όπως περιγράφηκαν στο στάδιο 3.

6. Προσθήκη 50μL Substrate solution σε κάθε βοθρίο, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προσθήκη 50μL Amplifier Solution σε κάθε βοθρίο, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε βοθρίο.

➤ IL-6:

Πριν την ανάλυση είναι απαραίτητα η προετοιμασία των αντιδραστηρίων που προμηθεύονται από την εταιρεία.

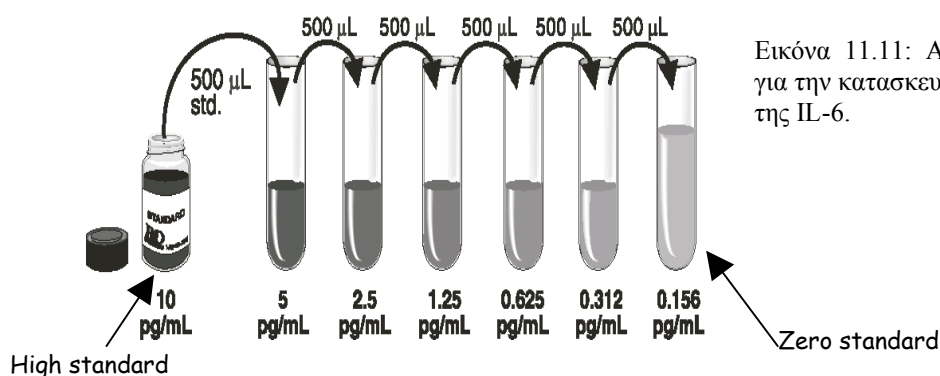
Wash Buffer → Αραίωση των 100mL πυκνού Wash Buffer με απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο διαλύματος 1000mL.

Substrate Solution → Προσθήκη 6ml Substrate Solution στο λυοφιλιωμένο υπόστρωμα και ισχυρή ανακίνηση.

Amplifier Solution → Προσθήκη 6ml Amplifier Solution στο λυοφιλιωμένο Amplifier και ισχυρή ανακίνηση.

IL-6 Standard → Ανάμιξη του IL-6 Standard με 5mL πυκνού Calibrator Diluent RD6-1 όση αναγράφεται στο δοχείο για τη δημιουργία διαλύματος stock συγκέντρωσης 10pg/ml (1X).

Αραιώσεις → Σε 6 eppendorfs προσθέτουμε στο καθένα 500μL πυκνού Calibrator Diluent RD6-11 και πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις (εικόνα 11.11) με το διάλυμα stock που κατασκευάσαμε προγουμένως.



Εικόνα 11.11: Αναπαράσταση των αραιώσεων για την κατασκευή των standards για τη μέτρηση της IL-6.

1. Προσθήκη 100μL Assay diluent RD1-75 σε κάθε βοθρίο.
2. Προσθήκη 100μL από τα standards, τα δείγματα ή control στα αντίστοιχα βοθρία επικάλυψη της πλάκας με την κατάλληλη ταινία και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες σε οριζόντιο αναδευτήρα πλάκας.
3. Πλύσεις: αφαίρεση του υγρού των βοθρίων, προσθήκη 400μL Wash Buffer ξανά αφαίρεση του υγρού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 6 φορές.
4. Προσθήκη 200μL IL-6 Conjugate σε κάθε θέση, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα πλάκας.
5. Επανάληψη των πλύσεων όπως περιγράφηκαν στο στάδιο 3.
6. Προσθήκη 50μL Substrate solution σε κάθε βοθρίο, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προσθήκη 50μL Amplifier Solution σε κάθε βοθρίο, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε βοθρίο.



➤ Leptine:

Πριν την ανάλυση είναι απαραίτητα η προετοιμασία των αντιδραστηρίων που προμηθεύονται από την εταιρεία.

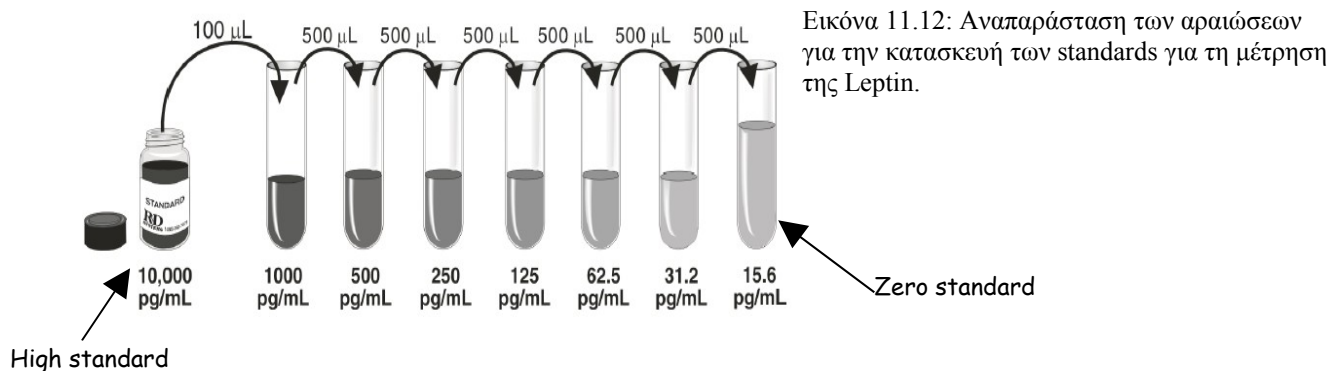
Wash Buffer → Αραίωση των 20mL πυκνού Wash Buffer με απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο διαλύματος 500mL.

Substrate Solution → Ανάμιξη ίσων όγκων από τις χρωστικές A και B.

Calibrator Diluent RD5P → Διάλυση 20mL πυκνού Calibrator Diluent RD5P με απεσταγμένο νερό για τη δημιουργία διαλύματος όγκου 100mL (1X).

Leptine Standard → Ανάμιξη του Leptine Standard με 1mL απεσταγμένου νερού για τη δημιουργία διαλύματος stock συγκέντρωσης 10,000pg/ml (1X).

Αραιώσεις → Σε 6 erppendorfs προσθέτουμε στο καθένα 900μL πυκνού Calibrator Diluent RD5P (1X) και πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις (εικόνα 11.12) με το διάλυμα stock που κατασκευάσαμε προογουμένως.



1. Προσθήκη 100μL assay diluent RD1-19 σε κάθε βοθρίο.
2. Προσθήκη 100μL από τα standards, τα δείγματα ή control στα αντίστοιχα βοθρία επικάλυψη της πλάκας με την κατάλληλη ταινία και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
3. Πλύσεις: αφαίρεση του υγρού των βοθρίων, προσθήκη 400μL Wash Buffer ξανά αφαίρεση του υγρού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 6 φορές.
4. Προσθήκη 200μL Leptin Conjugate σε κάθε θέση, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Επανάληψη των πλύσεων όπως περιγράφηκαν στο στάδιο 3.
6. Προσθήκη 200μL Substrate solution σε κάθε βοθρίο, επικάλυψη με κολλητική ταινία και επώαση για 30 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον.
7. Προσθήκη 50μL Stop Solution σε κάθε βοθρίο. Το χρώμα στα βοθρία πρέπει να μετατρέπεται από μπλέ σε κίτρινο.

➤ Visfatin:

1. Αραίωση του πυκνού assay buffer με 950mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τις αραιώσεις των αντιδραστηρίων.
2. Προετοιμασία των standards όπως φαίνεται στον πίνακα 11.2.

Νούμερο standard	Όγκος standard	Assay buffer	Συγκεντρώσεις
stock	1000ul		1000ng/ml
#1	100ul of stock	900ul	100ng/ml
#2	100ul από #1	900ul	10ng/ml
#3	100ul από #2	900ul	1ng/ml
#4	100ul από #3	900ul	0,1 ng/ml

Πίνακας 11.2: Ο πίνακας περιλαμβάνει τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για την παρασκευή των standards

3. Προσθήκη 50μL standard ή δείγματος σε κάθε βοθρίο, 25μL πρωταρχικού αντισώματος και 25μL βιοτινιλιωμένου πεπτιδίου
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2ώρες.
5. Πέντε πλύσεις της πλάκας με 300μL Assay Buffer/βοθρίο.
6. Προσθήκη 100μL SA-HRP σε κάθε βοθρίο.
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
8. Έξι πλύσεις της πλάκας με 300μL Assay Buffer/βοθρίο.
9. Προσθήκη 100μL substrate solution σε κάθε βοθρίο και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Τερματισμός της αντίδρασης με 100μL HCl 2N σε κάθε βοθρίο.

11.5.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

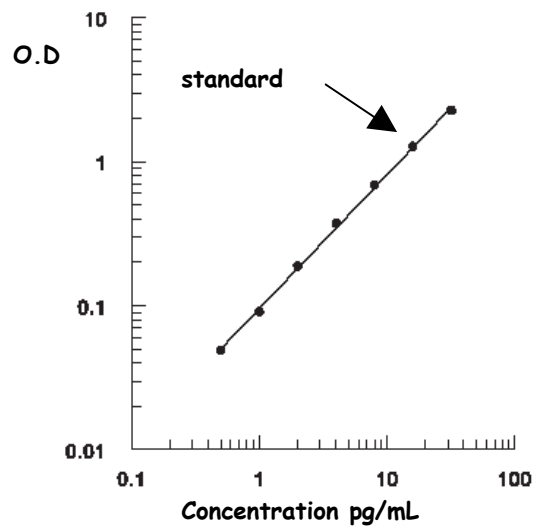
Ο καθορισμός της οπτικής πυκνότητας του κάθε βοθρίου πρέπει να πραγματοποιείται εντός μισής ώρας. Τοποθετούμε την πλάκα σε ειδικό σαρωτή και ρυθμίσαμε το μηχάνημα έτσι ώστε η μέτρηση να γίνεται στα 650 nm για τη μέτρηση του TNFα και της IL-6, στα 540nm για τη μέτρηση της λεπτίνης και στα 450 για τη μέτρηση της βισφατίνης. Υπολογίζουμε το μέσο όρο από τις δύο τιμές της οπτικής απορρόφησης για κάθε standard και για κάθε δείγμα.

Για τον υπολογισμό της τελικής τιμής οπτικής απορρόφησης χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

$O.D. \text{ Standard ή δείγματος} = \text{Μέσος όρος OD} - \text{OD του zero standard.}$

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του μορίου στο δείγμα κατασκευάζουμε ένα διάγραμμα της οπτικής πυκνότητας των standards (άξονας y) με τη συγκέντρωση τους (άξονας x) και σχεδιάζουμε την πρότυπη καμπύλη με βάση τα σημεία απορρόφησης των standards. Ένα παράδειγμα πρότυπη καμπύλης για TNFα, IL-6 και Leptin φαίνεται στην εικόνα 11.13. Σε αντίθεση με τα τρία αυτά μόρια η πρότυπη καμπύλη για τη βισφατίνη δείχνει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του πεπτιδίου και στην αντίστοιχη οπτική απορρόφηση. Έτσι, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των standards, η ένταση του κίτρινου χρώματος και κατά συνέπεια η οπτική πυκνότητα μειώνεται. Έτσι, η πρότυπη καμπύλη για η βισφατίνη δεν είναι ευθεία (εικόνα 11.14). Για να καθορίσουμε τη συγκέντρωση του πεπτιδίου στο δείγμα, πρώτα βρίσκουμε την τιμή απορρόφησης στον κάθετο άξονα και επεκτείνουμε μια οριζόντια γραμμή μέχρι την καμπύλη αναφοράς. Από το σημείο που

ενώνονται οι γραμμές επεκτείνουμε μια κάθετη γραμμή μέχρι τον άξονα X και η τιμή που λαμβάνουμε αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του πεπτιδίου στο δείγμα.

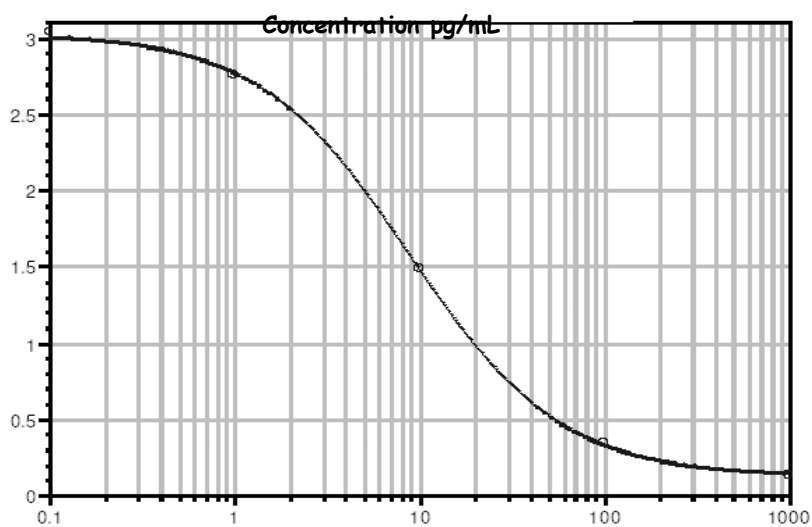


Εικόνα 11.13: Αναπαράσταση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για TNF α , IL-6, Leptin.

O.D

standard

Εικόνα 11.14: Αναπαράσταση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη Visfatin.



11.6 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Για τη μέτρηση των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Τα δείγματα ιστού, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους -80°C , ξεπαγώνουν και μεταφέρονται σε σωλήνες των 10ml όπου προσθέτουμε 2ml NaOH. Ακολουθεί η ομογενοποίηση του ιστού.

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAME) του ιστού ετοιμάζονται εντός του σωλήνα σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Metcalfe και τους συνεργάτες το 1966. Συνοπτικά, το δείγμα του ιστού σαπωνοποιήθηκε με το διάλυμα ομογενοποίησης (NaOH σε μεθανόλη) και οι μεθυλεστέρες δημιουργήθηκαν σε 14% boron trifluoride σε μεθανόλη. Στη συνέχεια, μετά από πλύση με κορεσμένο NaCl, αφαιρούνται με hexane που περιέχει BHT (0.010%w/v). Η ανώτερη στοιβάδα που περιέχει hexane και τους μεθυλεστέρες, μεταφέρεται σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας και ακολουθεί η ανάλυση τους.

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίζονται σε 50m x 0.22mm BPx70 τριχοειδείς στήλες καλυμμένες με ταινία από κυανοπροπυλική σιλικόνη (cyanopropyl silicone) 0.25mm της εταιρείας SGE, χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο εξοπλισμένο με ανιχνευτή ιονισμού μάζας. Για την ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των κορυφών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό HP MS Chemstation. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση κορυφών μεθυλεστερών με τη χρήση κανονικών διαλυμάτων μεθυλεστερών των εταιρείας Sigma και με βάση αναφοράς μια βιβλιοθήκη φάσματος μάζας. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν αναλυτικά είναι οι εξής:

όγκος ανάλυσης $\rightarrow 1\mu\text{L}$

ρυθμός μεταφοράς αέριου ήλιου $\rightarrow (1.0\text{mg}/\text{min})$

θερμοκρασία ακροφυσίου $\rightarrow 230^{\circ}\text{C}$

θερμοκρασία MSD $\rightarrow 280^{\circ}\text{C}$

λόγος διαχωρισμού $\rightarrow 1:20-1:50$

θερμοκρασία φούρνου $\rightarrow 120^{\circ}\text{C}-245^{\circ}\text{C}$ με πρόγραμμα κλιμακωτής αλλαγής θερμοκρασίας.

11.7 ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R, Eppendorf centrifuge 5417C, Stuart scientific Roller SRT1, Ομογενοποιητής: Ultra-Turrax T25, Janke&Kunkel IKA labortechnik, Thermos: Stainless steel Dewar Flask. Thermocut-D1000, Light Cyclor Roche Molecular System, αναδευτήρας: Titer plate shaker Barnstead Lab-line, σαρωτής: Sunrise tecan, HP 6890 gas chromatograph Agilent Technologies (former Hewlett-Packard).

11.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SpSS 10.0 for Windows.

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται στους πίνακες των αποτελεσμάτων ως μέσες τιμές $\pm$ μια τυπική απόκλιση.

Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Περιγραφική στατιστική – Συχνότητες
- Έλεγχος χ^2
- Σύγκριση μέσω T-test
- Συσχέτιση (Pearson correlation)

Σε όλες τις μεθόδους επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το 5%.

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

12. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στον πίνακα 12.1 περιγράφονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος μελέτης ανάλογα με το φύλο. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο βάρος, στο ύψος αλλά και στο Δείκτη Μάζας Σώματος ανάμεσα στα δύο φύλα.

Πίνακας 12.1: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος

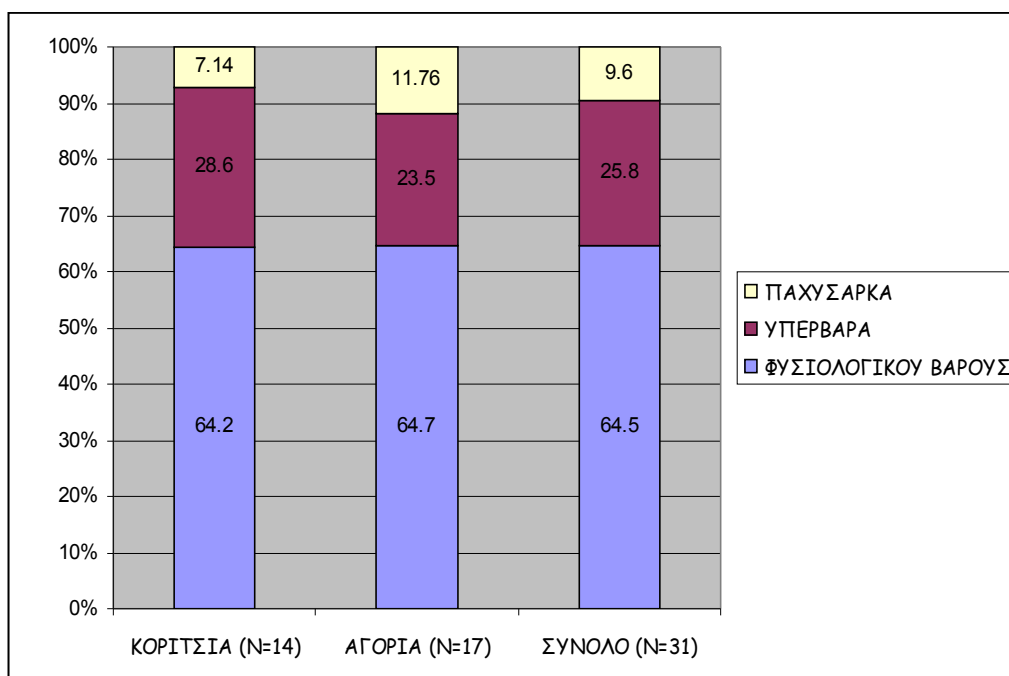
	Σύνολο δείγματος (n=31)	Αγόρια (n=17)	Κορίτσια (n=14)	P
Ηλικία (έτη)	10.9±1.8	10.9 ± 1.9	10.8 ± 1.8	0.94
BMI (kg/m ²)	19.3±3.5	20.0 ± 3.9	18.5 ± 2.9	0.25
Βάρος (kg)	42.3±12.0	43.6 ± 13.0	40.7 ± 11.2	0.52
Ύψος (m)	1.5±0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.84

Όσον αφορά στον επιπολασμό του υπερβάλλοντος βάρους και της παχυσαρκίας στο συγκεκριμένο δείγμα τα 20 παιδιά ήταν φυσιολογικού βάρους, 8 υπέρβαρα και 3 παχύσαρκα. Τα στοιχεία αναλυτικά φαίνονται στον πίνακα 12.2 αλλά και στο γράφημα 12.1 όπου φαίνονται οι συχνότητες των κατηγοριών του ΔΜΣ. Η κατηγοριοποίηση ανάλογα με το ΔΜΣ έγινε σε σχέση με την ηλικία του και σύμφωνα με τις οριακές τιμές που έχουν υιοθετηθεί από τον IOTF.

	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	ΥΠΕΡΒΑΡΑ	ΠΑΧΥΣΑΡΚΑ
ΚΟΡΙΤΣΙΑ (N=14)	9	4	1
ΑΓΟΡΙΑ (N=17)	11	4	2
ΣΥΝΟΛΟ (N=31)	20	8	3

Πίνακας 12.2: Κατηγοριοποίηση του πληθυσμού ανάλογα με το ΔΜΣ

Γράφημα 12.1: Συχνότητες κατηγοριών ΔΜΣ



13. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

13.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL-TIME PCR

Η REAL-TIME PCR ήταν επιτυχής και για τα 31 άτομα. Όπως αναφέραμε και στην παράγραφο 11.4.3 η αρχή της Real-Time PCR για ένα γονίδιο ελέγχεται από δύο σημεία:

1) μια καμπύλη αναφοράς με μία κορυφή που αντιστοιχεί στην T_m συγκεκριμένη για το ενδιάμεσο τμήμα που μας ενδιαφέρει να πολλαπλασιάσουμε και

2) μια μοναδική ζώνωση που αντιστοιχεί στον αριθμό των βάσεων του επιθυμητού τμήματος, μετά από φόρτωση του προϊόντος της PCR σε γέλη αгарόζης 2%.

Μία άλλη ένδειξη, το λάθος, υπολογίζεται επίσης από το μηχάνημα και δίνει έτσι μια εικόνα για την ποιότητα της καμπύλης (ιδανικά, όλα τα σημεία πρέπει να βρίσκονται δεξιά της καμπύλης).

Στον πίνακα 13.1 παρουσιάζεται η έκφραση των γονιδίων στα PBMC's και στο λιπώδη ιστό σε σχέση με το φύλο. Τόσο στα PBMCs όσο και στον λιπώδη ιστό δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων ανάμεσα στα δύο φύλα.

Πίνακας 13.1: Έκφραση των γονιδίων ανά φύλο

(αρ.αντιγράφων/ μ L)	Αγόρια (n=17)	Κορίτσια (n=14)	p
IL-6 λιπ.ιστού	114.14 $\pm$ 122.0	1362.6 $\pm$ 3056.5	0.322
IL-6 pbmcs	47.27 $\pm$ 33.7	32.4 $\pm$ 34.3	0.344
TNFa λιπ.ιστού	44.08 $\pm$ 44.8	58.15 $\pm$ 43.0	0.431
TNFa pbmcs	1911.94 $\pm$ 1332.5	5839.38 $\pm$ 9450.4	0.162
Leptin λιπ.ιστού	7757.1 $\pm$ 10466.176	11779.93 $\pm$ 12833.0	0.355
Leptin pbmcs	15.0 $\pm$ 7.6	10.3 $\pm$ 2.3	0.317
Visfatin λιπ.ιστού	48821.3 $\pm$ 54.074.2	77138.3 $\pm$ 121194.4	0.393
Visfatin pbmcs	2542367 $\pm$ 3122658.6	1138070 $\pm$ 1294287.7	0.128

Στον πίνακα 13.2 παρουσιάζεται η έκφραση των γονιδίων στο σύνολο του πληθυσμού ανάλογα με τον ιστό που εκφράζεται το κάθε γονίδιο. Παρατηρείται, στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης των γονιδίων IL-6, TNF-a και visfatin στα PBMCs και στον λιπώδη ιστό.

Πίνακας 13.2: Η έκφραση των γονιδίων ανάλογα με τον ιστό στο σύνολο του πληθυσμού.

	PBMC	Λιπώδης ιστός	p
N	31	31	
IL-6(αντ./ μ L)	35.7 $\pm$ 35.7	211.3 $\pm$ 196.5	0.034
TNF-a(αντ./ μ L)	4063.3 $\pm$ 7315.6	55.04 $\pm$ 43.4	0.015
Leptin(αντ./ μ L)	13.0 $\pm$ 6.1	3604.4 $\pm$ 4387.9	0.074
Visfatin *10 ³ (αντ./ μ L)	1887.0 $\pm$ 2510.4	63.3 $\pm$ 91.2	0.004 * 10⁻¹

13.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ELISA

Η τεχνική της ELISA ήταν επιτυχής για το σύνολο των δειγμάτων. Ο έλεγχος της επιτυχίας της μεθόδου πραγματοποιείται κατά τη πειραματική διαδικασία με τη χρήση των θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο. Στον πίνακα 13.3 παρατίθενται τα επίπεδα των πρωτεϊνών στον ορό στο συνολικό πληθυσμό ενώ στον πίνακα 13.4 οι συσχετίσεις των επιπέδων των πρωτεϊνών σε σχέση με το φύλο. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους ανάμεσα στα αγόρια και στα κορίτσια.

Πίνακας 13.3: Επίπεδα **πρωτεϊνών** στον **ορό** στο σύνολο του πληθυσμού

	Μέσος όρος ± τυπ. απόκλιση
IL6 (pg/ml)	8.3±5.5
Leptin (pg/ml)	12983±12939
TNFα (pg/ml)	2.3±1.1
Visfatine (pg/ml)	24.7±9.1

Πίνακας 13.4: Τα επίπεδα των **πρωτεϊνών** στον **ορό** σε σχέση με το φύλο

	Αγόρια (n=17)	Κορίτσια (n=14)	p
IL-6 (pg/ml)	8.71 ± 5.5	7.8 ± 5.7	0.687
TNFα (pg/ml)	2.3 ± 1.1	2.3 ± 1.2	0.991
Leptin (pg/ml)	10980.6 ± 10013.4	15349.4 ± 15919.2	0.422
Visfatin (pg/ml)	26.4 ± 9.1	22.6 ± 9.2	0.326

Εξετάσαμε, επίσης, τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών στον ορό και στην έκφραση των γονιδίων στο λιπώδη ιστό και στα PBMCs. Η συγκέντρωση της λεπτίνης στον ορό έδειξε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($\rho=0.050$) με την έκφραση του γονιδίου leptin στο λιπώδη ιστό (πίνακας 13.5). Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι όσο αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου στον ιστό αυξάνονται και τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό.

Πίνακας 13.5: Συσχέτιση έκφραση γονιδίου **leptin** στο **λιπώδη ιστό** με τα επίπεδα της **πρωτεΐνης** στον **ορό**.

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία (έτη)	-0.308	0.049
Φύλο	0.178	0.230
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.723	2 x 10⁻⁴
Leptin λιπ.ιστού(αντ./μL)	0.301	0.050
R ²	66.0	4 x 10⁻⁴

13.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.

Με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, μέσω της μέτρησης των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, μπορέσαμε να αξιολογήσουμε ποσοτικά τη σύσταση του λιπώδους ιστού για ~50 λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια ακολούθησε ομαδοποίηση των λιπαρών οξέων (κορεσμένα-MUFAs, πολυακόρεστα-PUFAs, TRANS, κορεσμένα, ω3, ω6, ω9). Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε ανά ομάδα λιπαρών οξέων. Στον πίνακα 13.6 φαίνονται τα επίπεδα των λιπαρών οξέων και στα αγόρια και στα κορίτσια, ενώ στον πίνακα 13.7 ανάλογα με το φύλο. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αγόρια και στα κορίτσια εμφανίζεται στη ποσότητα των ω3 λιπαρών οξέων ($p=0,019$). Συγκεκριμένα, ο λιπώδης ιστός των αγοριών φαίνεται να είναι πιο πλούσιος σε ω3 ($0,9 \pm 0,1$) σε σχέση με των κοριτσιών ($0,8 \pm 0,1$).

Πίνακας 13.6: η κατανομή των λιπαρών οξέων του λιπώδους ιστού στον πληθυσμό

Κατηγορία λ.ο.	Μέσος όρος (%Σλο) $\pm$ τυπ. απόκλιση
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	31.7 $\pm$ 4.9
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	48.4 $\pm$ 3.8
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	16.1 $\pm$ 3.0
ΣW3	0.8 $\pm$ 0.1
ΣW6	15.2 $\pm$ 3.1
ΣW9	46.4 $\pm$ 3.8
W6/W3	18.8 $\pm$ 4.7
Trans λιπαρά οξέα	1.7 $\pm$ 0.3

Πίνακας 13.7: Σύσταση του λιπώδους ιστού σε λιπαρά οξέα ανάλογα με το φύλο

Κατηγορία λ.ο. (%Σλο)	Αγόρια (n=17)	Κορίτσια (n=14)	p
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	31.0 $\pm$ 6.2	32.5 $\pm$ 2.8	0.395
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	47.9 $\pm$ 2.9	49.1 $\pm$ 4.8	0.395
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	16.8 $\pm$ 1.9	15.2 $\pm$ 4.0	0.164
ΣW3	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.019
ΣW6	15.9 $\pm$ 1.9	14.4 $\pm$ 4.0	0.193
ΣW9	46.2 $\pm$ 2.8	46.7 $\pm$ 4.8	0.692
W6/W3	18.6 $\pm$ 3.16	19.1 $\pm$ 6.2	0.805
Trans	1.7 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3	0.646

13.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Από τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων των λιπαρών οξέων του λιπώδους ιστού με αέρια χρωματογραφία παρατηρήσαμε αρκετές συσχετίσεις με την έκφραση των γονιδίων. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν ανά ομάδες λιπαρών οξέων και όχι για κάθε ένα λιπαρό οξύ ξεχωριστά. Έτσι έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

- Η έκφραση του γονιδίου **TNFα στα PBMCs** φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι επηρεάζεται από τέσσερις παράγοντες σε σχέση με τα λιπαρά οξέα. Το εντυπωσιακό είναι ότι και οι τέσσερις αυτοί παράγοντες επιδρούν αρνητικά στην έκφραση του γονιδίου στον ιστό. Συγκεκριμένα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ($\rho=0.020$), το σύνολο των $\omega 6$ στον ιστό ($\rho=0.018$), ο λόγος $\omega 6/\omega 3$ ($\rho=0.006$) και τέλος η ακορεστότητα του ιστού (χωρίς να λαμβάνονται υπ' όψιν τα TRANS) εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα των mRNA του TNFα στον ιστό. Οι συσχετίσεις αυτές φαίνονται λεπτομερώς στους πίνακες 13.8- 13.11.

- Πίνακας 13.8: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα στα PBMCs με PUFAs**

Μεταβλητή	παράγοντας β	ρ
Ηλικία(έτη)	0.032	0.869
Φύλο	0.125	0.508
$\Delta M \Sigma (kg/m^2)$	-0.215	0.269
PUFA (% Σ λο)	-0.470	0.020
R^2	20.1%	0.056

Πίνακας 13.9: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα στα PBMCs με το σύνολο των $\omega 6$**

Μεταβλητή	παράγοντας β	ρ
Ηλικία(έτη)	0.034	0.862
Φύλο	0.129	0.490
$\Delta M \Sigma (kg/m^2)$	-0.217	0.262
$\Sigma \omega 6$ (% Σ λο)	-0.477	0.018
R^2	21.0%	0.050

Πίνακας 13.10: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα στα PBMCs με το λόγο $\omega 6/\omega 3$**

Μεταβλητή	παράγοντας β	ρ
Ηλικία(έτη)	0.032	0.863
Φύλο	0.251	0.151
$\Delta M \Sigma (kg/m^2)$	-0.238	0.204
$\Sigma \omega 6/\Sigma \omega 3$	-0.518	0.006
R^2	27.4%	0.022

Πίνακας 13.11: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα** στα **PBMCs** με την **ακορεστότητα** του ιστού (χωρίς TRANS)

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	-0.028	0.885
Φύλο	0.178	0.344
ΔΜΣ(kg/m ²)	-0.066	0.737
Ακορεστότητα(-TRANS)	-0.439	0.031
R ²	29.7%	0.077

➤ Και στο λιπώδη ιστό η έκφραση του **TNFα** φαίνεται πως επηρεάζεται από τα λιπαρά οξέα. Συσχετίζεται αρνητικά με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και με το σύνολο των ω9 με $\rho=0.033$ και 0.035 αντίστοιχα (πίνακες 13.12 και 13.13).

Πίνακας 13.12: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα** στο λιπώδη ιστό με το περιεχόμενο του ιστού σε **μονοακόρεστα**

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	-0.321	0.168
Φύλο	0.327	0.161
ΔΜΣ(kg/m ²)	0.230	0.333
Μονοακόρεστα (%Σλο)	-0.535	0.033
R ²	24%	0.241

Πίνακας 13.13: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **TNFα** στο λιπώδη ιστό με το σύνολο των **ω9**

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	-0.336	0.155
Φύλο	0.276	0.219
ΔΜΣ(kg/m ²)	0.206	0.379
Σω9 (%Σλο)	-0.522	0.035
R ²	7.7%	0.247

➤ Η έκφραση του γονιδίου **IL-6** στα **PBMCs** σχετίζεται θετικά με τα ω3 λιπαρά οξέα ($\rho=0.038$). (πίνακας 13.14).

Μεταβλητή	β παράγοντας	p
Ηλικία(έτη)	-0.543	0.043
Φύλο	0.352	0.289
ΔΜΣ(kg/m ²)	0.149	0.581
ΣW3	0.657	0.038
R ²	36%	0.155

Πίνακας 13.14: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **IL-6** στο λιπώδη ιστό με το σύνολο των **ω3**

- Θετική στατιστική συσχέτιση φάνηκε να έχει, επίσης, και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου **leptin** σε σχέση με τα **TRANS** λιπαρά οξέα, με $\rho=0.049$ (πίνακας 13.15).

Πίνακας 13.15: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **leptin** στο **λιπώδη ιστό** με το σύνολο των **TRANS**

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	0.121	0.500
Φύλο	0.233	0.189
$\Delta\text{ΜΣ}(\text{kg}/\text{m}^2)$	0.396	0.039
Trans (%Σλο)	0.344	0.049
R^2	20.7%	0.043

- Τέλος, η έκφραση του γονιδίου visfatin στα PBMC's φαίνεται ότι επηρεάζεται επίσης από τα $\omega 3$ λιπαρά οξέα (πίνακας 13.16). Συγκεκριμένα, με το σύνολο των $\omega 3$ έδειξε μια θετική συσχέτιση με $\rho=0.007$.

Πίνακας 13.16: Συσχέτιση έκφρασης γονιδίου **visfatin** στα **PBMC's** με το σύνολο των **$\omega 3$**

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	0.196	0.265
Φύλο	-0.080	0.658
$\Delta\text{ΜΣ}(\text{kg}/\text{m}^2)$	0.044	0.805
ΣW3 (%Σλο)	0.523	0.007
R^2	37.6	0.019

13.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Η τελευταία κατηγορία συσχετίσεων που επιχειρήσαμε ήταν ανάμεσα στις πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα και κατά πόσο φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσά τους. Όντως, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα τα επίπεδα της IL-6 στον ορό δείχνουν μια θετική συσχέτιση με το σύνολο των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\rho=0.016$ (πίνακας 13.18).

Πίνακας 13.18: Συσχέτιση **IL-6 ορού** με το σύνολο των **$\omega 3$**

Μεταβλητή	παράγοντας β	p
Ηλικία(έτη)	-0.497	0.015
Φύλο	0.259	0.251
$\Delta\text{ΜΣ}(\text{kg}/\text{m}^2)$	0.102	0.601
ΣW3 (%Σλο)	0.563	0.016
R^2	38.4	0.038

Πίνακας 2.20: Συσχέτιση **IL-6 ορού** με το σύνολο των **$\omega 3$**

14. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 31 υγιή παιδιά ηλικίας, ηλικίας 7-14 ετών, (14 κορίτσια και 17 αγόρια) τα οποία είχαν εισαχθεί για εγχείρηση σκωληκοειδίτιδας ή κήλης στο νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία. Στα παιδιά πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με σκοπό την απομόνωση RNA από τα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος. Επίσης, αφαιρέθηκε κατά την εγχείρηση τμήμα λιπώδους ιστού με σκοπό την απομόνωση RNA από τα λιποκύτταρα αλλά και τη μέτρηση των λιπαρών οξέων του ιστού. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν, αφενός, να αξιολογήσουμε τις συσχετίσεις μεταξύ των λιποκυτταροκινών (leptin, visfatin) και των κυτταροκινών (TNFα, IL-6) σε δείγματα λιπώδους ιστού και μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος αλλά και των επιπέδων των αντίστοιχων πρωτεϊνών στον ορό αίματος. Η φλεγμονή, κατάσταση που συνυπάρχει με την παχυσαρκία, έχει μελετηθεί στους ενήλικες όχι όμως, ιδιαίτερα, στα παιδιά (164). Εστίασαμε, λοιπόν, στις πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στη λεπτίνη και τη βισφατίνη με μόρια που κατ' εξοχήν εκφράζονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις με σκοπό να ερευνήσουμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, πριν ακόμα την εκδήλωση της παχυσαρκίας.

Επίσης, επιχειρήσαμε να εξετάσουμε την αλληλεπίδραση των παραπάνω γονιδίων και πρωτεϊνών με στοιχεία διατροφής. Για το σκοπό αυτό μετρήσαμε τη σύσταση του λιπώδους ιστού σε λιπαρά οξέα. Έχει φανεί ότι τα λιπαρά οξέα που αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό αντιπροσωπεύουν τη διατροφική κατανάλωση των λιπαρών για διάστημα μέχρι και ένα έτος (165). Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από το λιπώδη ιστό κυκλοφορούν ελεύθερα μέσω του περιφερικού αίματος σε διάφορους ιστούς. Έτσι, τα επίπεδα των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η σχέση της διατροφικής κατανάλωσης με τη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων leptin, visfatin, TNFα και IL-6, τα επίπεδα των πρωτεϊνών στον ορό αλλά και με το ΔΜΣ, ως δείκτη παχυσαρκίας.

Από την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων και τη μελέτη της σύστασης του λιπώδους ιστού σε λιπαρά οξέα φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της συνολικής ποσότητας ω3 ανάμεσα στα αγόρια και στα κορίτσια. Συγκεκριμένα τα αγόρια είχαν περισσότερα λιπαρά οξέα ($0,9 \pm 0,1$) από ότι τα κορίτσια ($0,8 \pm 0,1$), με στατιστική σημαντικότητα των γονιδίων στο λιπώδη ιστό και στα PBMCs, φάνηκε ότι τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της λεπτίνης στους δύο αυτούς σχετίζονται μεταξύ τους.

Σε καταστάσεις παχυσαρκίας ο λιπώδης ιστός του ατόμου εμφανίζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά λιπογένεσης, πολλαπλασιασμού των λιποκυττάρων καθώς επίσης και της διάστασής τους. Η αύξηση στον αριθμό και στο μέγεθος των λιποκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μακροφάγων τα οποία αποτελούν κύρια αιτία παραγωγής φλεγμονωδών παραγόντων, όπως ο TNFα (166). Τα επίπεδα της λεπτίνης, παρατηρήθηκε πως έχουν επίσης θετική συσχέτιση με τη σύσταση του λιπώδους ιστού σε Trans λιπαρά οξέα.

Η σύσταση του ιστού σε λιπαρά οξέα, όπως προαναφέραμε, αντικατοπτρίζει τη μακροχρόνια διατροφική κατανάλωση του ατόμου. Τα λιπαρά οξέα αυτά εκκρίνονται από τον ιστό, με αργούς βιολογικούς ρυθμούς, απελευθερώνονται και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται σε διάφορα όργανα, όπου πιθανόν να επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή των γονιδίων. Παρατηρήσαμε μια συσχέτιση ανάμεσα σε συγκεκριμένες ομάδες λιπαρών οξέων και της γονιδιακής έκφρασης TNFα από τα PBMC's. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα πολυακόρεστων, των ω-6, του λόγου ω6/ω3 και με τον δείκτη ακορεστότητας, εξαιρουμένων των Trans λιπαρών οξέων, φαίνεται να συσχετίζονται αρνητικά με την

έκφραση του TNFα από τα PBMC's. Είναι γνωστό ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ασκούν ανασταλτική δράση στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες υποδηλώνοντας μια πιθανή συμβολή των συγκεκριμένων συστατικών στη χρόνια φλεγμονή και σε παθολογικές καταστάσεις συχνές σε παχύσαρκα άτομα, όπως η ινσουλινοαντίσταση (167). Το γεγονός ότι στη δική μας μελέτη παρατηρήσαμε, όπως προαναφέραμε, αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του TNFα με τα πολυακόρεστα φαίνεται να ενισχύει την παραπάνω αναφορά.

Επιπρόσθετα, η έκφραση του TNFα στον λιπώδη ιστό, σχετίζεται αρνητικά με τα ω9 και με τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Η επίδραση των λιπαρών οξέων στα επίπεδα έκφρασης του TNFα δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στα παιδιά και τα αποτελέσματα των μελετών που ήδη υπάρχουν φαίνονται αντιφατικά. Σε μελέτη όπου αξιολογήθηκε η πρόσληψη λιπαρών οξέων μέσω ερωτηματολογίων, δεν φάνηκαν συσχετίσεις ανάμεσα στα λιπαρά και τα επίπεδα της πρωτεΐνης του TNFα στον ορό, κάτι που επιβεβαιώνεται και στη δική μας μελέτη (168).

Τα ω3 λιπαρά οξέα, από την έρευνα, μας φάνηκε πως έχουν θετική συσχέτιση και σε επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του IL-6 στα PBMC's. Η συγκεκριμένη παρατήρηση, ωστόσο, έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα από μελέτες σε ενήλικες όπου έχει φανεί ότι αυτή η ομάδα των λιπαρών οξέων έχει προστατευτική δράση στον οργανισμό.

Η βισφατίνη φαίνεται, επίσης, να σχετίζεται με ομάδες λιπαρών οξέων. Το σύνολο των ω3 λιπαρών οξέων στον ιστό σχετίζονται θετικά με την έκφραση του γονιδίου visfatin από τα PBMC's, σε αντίθεση με το λόγο ω-6/ω-3 λιπαρών οξέων με τα οποία σχετίζονται αρνητικά. Από τη βιβλιογραφική έρευνα δεν βρήκαμε δεδομένα που να αφορούν τη συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου με λιπαρά οξέα, είτε σε παιδιά, είτε σε ενήλικες. Ωστόσο, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργεια κυτταρικής σειράς προλιποκυττάρων, φάνηκε ότι συγκεκριμένα λιπαρά οξέα, το ολεικό και το παλμιτικό, μείωσαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου (169). Φαίνεται, λοιπόν, ότι είναι ελάχιστα τα επιστημονικά δεδομένα για το κατά πόσο τα λιπαρά οξέα της διατροφής ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου visfatin και καθίσταται αναγκαία περαιτέρω μελέτη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη ο ιστός που μελετήθηκε ήταν υποδόριος, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου εντοπίζονται στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό (170).

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη φάνηκαν τα εξής:

- ◆ Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων IL-6, TNF α , visfatin που εκφράζονται στο λιπώδη ιστό διαφέρουν σημαντικά με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής τους στα PBMC's
- ◆ Τα αγόρια φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση $\omega 3$ λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό, σε σχέση με τα κορίτσια
- ◆ Η έκφραση του γονιδίου TNF α στα PBMCs σχετίζεται αρνητικά με τα πολυακόρεστα, τα $\omega 6$, το λόγο των $\omega 6/\omega 3$ και την ακορεστότητα του ιστού εξαιρουμένων των trans λιπαρών οξέων
- ◆ Η σύσταση του λιπώδους ιστού σε $\omega 3$ λιπαρά οξέα σχετίζεται θετικά με την έκφραση του γονιδίου visfatin στο λιπώδη ιστό και του γονιδίου IL-6 στα PBMC's όπως και με τα επίπεδα της πρωτεΐνης IL-6 στον ορό.
- ◆ Τα TRANS λιπαρά οξέα έχουν θετική συσχέτιση με την έκφραση του γονιδίου leptin στο λιπώδη ιστό.

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα γονίδια των λιποκυτταροκινών visfatin και leptin και στα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες φλεγμονής δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα όχι μόνο στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και παγκοσμίως. Ακόμα λιγότερο έχουν μελετηθεί οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα λιπαρά οξέα του λιπώδους ιστού και στην γονιδιακή έκφραση αυτών των γονιδίων. Είναι, λοιπόν, αναγκαίο οι επιδράσεις αυτές να αποτελέσουν θέμα ερευνητικού ενδιαφέροντος και στο μέλλον έτσι ώστε να ξεκαθαριστούν οι γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην παχυσαρκία αλλά και να αναγνωριστούν οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα γονίδια και τη διατροφή. Έτσι, πιθανόν να προκύψουν περισσότερα έγκυρα συμπεράσματα που να ωφελήσουν στην πρόληψη και αντιμετώπιση της παιδικής παχυσαρκίας.

15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. WHO Technical Report Series 894. www.who.int Haslam DW, James WP (2005). "Obesity". *Lancet*
2. Kushner, Robert (2007). *Treatment of the Obese Patient (Contemporary Endocrinology)* Totowa, NJ: Humana Press
3. Adams JP, Murphy PG (July 2000). "Obesity in anaesthesia and intensive care". *Br J Anaesth*
4. Zohrabian A. The long-term effects and economic consequences of treatments for obesity: work in progress. *Lancet* 2005;365:104-5.
5. Loscalzo, Joseph; Fauci, Anthony S.; Braunwald, Eugene; Dennis L. Kasper; Hauser, Stephen L; Longo, Dan L. (2008). *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill Medical. ISBN 0-07-146633-9.
6. Satcher D (2001). *The Surgeon General's Call to Action to Prevent and Decrease Overweight and Obesity*. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Surgeon General
7. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 2005;352:1138-45.
8. Yannakoulia M, Panagiotakos D, Pitsavos C, et al. Five-year incidence of obesity and its determinants: the ATTICA study. *Public Health Nutr* 2009;12:36-43
9. Inflammation, adipokines et obésité, K. Clément, *La Revue de médecine interne* 30 (2009) 824–832
10. Cole tj, Bellizzi MG, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: an international survey. *BMJ* 2000; 320:1240-3
11. Reilly J. John. Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity. *Best practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005, Vol.19, No. 3, 327-341.
12. Dehghan Mashid, Akhtar-Daneshand Noori, T Merchant Anwar. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutrition Journal* 2005; 4:24
13. Adair LS. Child and adolescent obesity: epidemiology and developmental perspectives. *Physiology & Behaviour* 2008 Apr 22;94(1):8-16. Epub 2007 Nov 22
14. Lobstein T, Freult M. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obesity Reviews* 2003; 4:195-200
15. Mamalakis G, Kafatos A, Manios Y, Anagnostopoulou T, Apostolaki I. Obesity indices in a cohort of primary school children in Crete: a six year prospective study. *International Journal of Obesity* 2000; 24:765-771
16. Krassas G.E., Tzotzas Th., Tsametis Ch., Konstantinidis T. Prevalence and trends in overweight and obesity among children and adolescents in Thessaloniki (Greece). *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2001; 14:1319-1326
17. Karayiannis D., Yannakoulia M., Terzidou M., Sidossis LS. And Kokkevi A. Prevalence of overweight and obesity in Greek school-aged children and adolescents. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57: 1189-1192
18. The challenge of obesity in the WHO European Region. Fact sheet EURO/13/05

19. Φαρατζιάν Π., Γιαννακούλια Μ., Ρίσβας Γ., Μελίστας Λ., Κωνσταντινίδου Μ. Παιδική και εφηβική παχυσαρκία. Ένα κρίσιμο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. *Διατροφή- Διαιτολογία* 2004, Περίοδος Β, 8(3-4): 65-110
20. Reilly JJ. Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity. *Best Practise & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 19: 327-41
21. Williams CL, Hayman LL, Daniels SR et al. Cardiovascular health in childhood. *Circulation* 2002; 106: 143-160
22. Hofmanns MD, Kromhout D & de-Lezanne-Coulander C. The impact of body mass index of 78.612 18-year old Dutch men on 32 year mortality from all causes. *Journal of Clinical Epidemiology* 1988; 41: 749-756
23. Maffeis Claudio. Aetiology of overweight and obesity in children and adolescents. *European Journal of Pediatrics* 2000;159: [Suppl 1] S35-S44
24. Lustig RH. Pediatric endocrine disorders of energy balance. *Reviews in Endocrine & Metabolism Disorders* 2005 Dec;6 (4): 245-60
25. Bell C.G, Walley A.J., Froguel P. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics* 2005 Mar;6(3):221-34
26. Rosenbaum M, Leibel RL. Te physiology of body weight regulation: relevance to the etiology of obesity in children. *Pediatrics* 1998 Mar; 101 (3Pt 2): 525-39. Review
27. Korner A, Bluher S, Kapellen T, Garten A, Klammt J, Kratzsch J, Kiess W. Obesity in childhood and adolescence: a review in the interface between adipocyte physiology and clinical challenges. *Hormones (Athens, Greece)* 2005 Oct-Dec;4(4):189-199
28. Faramarz I.B, Catalano P.M, Hanson R.W, Metabolic programming: fetal origins and metabolic syndrome in the adult. *Am. J. Physiology Endocrin. & Metab.* 2006; 291: E439-E440
29. Klazine van der Horst, Oenema A, Ferreira I, Wendel-Vos W, Giskes K, van Lenthe F, Brug J. A systematic review of environmental correlates of obesity-related dietary behaviours in youth. *Health Education Research.* 2007; 22:203-226
30. Heather P, Nicklas T.A. A review of family and social determinants of Children's eating patterns and diet quality. *Journal of American College of Nutrition.* 2005; 24:(2): 83-92
31. Moreno L.A, Rodriguez G. Dietary risk factors for development of childhood obesity. *Current Opinion of Nutrition and Metabolism Care.* 2007;10:336-341
32. Huang T-K Terry, Howarth C. Nancy, Lin Biin-Hwan, Roberts B. Susan, McCrory A. Megan. Energy intake and meal portions: Associations with BMI percentile in U.S. children. *Obesity Research* 2004 Vol.12 No. 11:1875-1885
33. Rolland-Cachera MF Deheeger M, Arkout M, Bellisle F. Influence of macronutrients on adiposity development: a follow-up study of nutrition and growth from 10 months to 10 years of age. *International Journal of Obesity Related Metaboli Disorders.* 1995; 19: 573-578
34. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45: 1435-1438
35. Dehghan M, Akhtar-Danesh N, Merchant AT. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutrition Journal* 2005;4:24
36. Phillips SM, Bandini LG, Naumova EN, et al. Energy-dense snack food intake in adolescence: longitudinal relationship to weight and fatness. *Obesity Reviews* 2004; 12:461-472

37. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:327-332
38. Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition.* 2000;16:903-8.
39. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat – functional implications. *J Clin Invest.* 2002;110:1243-50
40. Pond C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2001. p. 1-5
41. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84:277-359
42. Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole; 2002
43. M. Alanis et al., Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice, *Jornal de Pediatria*, 2007
44. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE (February 2007). "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation". *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2): 227–35
45. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(3): p. 514-25
46. Festa A, D'Agostino R Jr, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP & Haffner SM (2001) The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obesity* 25, 1407–1415.
47. Das UN (2001) Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 17, 953–966
48. Bullo' M, Garcia-Lorda P, Megias I & Salas-Salvado J (2003) Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Res* 11, 525–531
49. Hotamisligil GS (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obesity* 27, Suppl. 3, S53–S55
50. Yudkin JS (2003) Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obesity* 27, Suppl. 3, S25–S28.
51. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE & Mohamed-Ali V (2000) Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148,
52. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209–214
53. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796–1808
54. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821–1830
55. Berg, A.H., Lin, Y., Lisanti, M.P., Scherer, P.E., 2004. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E1178–E1188.

56. Jiao, P., Chen, Q., Shah, S., Du, J., Tao, B., Tzamelis, I., Yan, W., Xu, H., 2008. Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of NF- κ B and JNK pathways. *Diabetes*
57. Ye, J., Gao, Z., Yin, J., He, Q., 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1118–E1128
58. Ye, J., 2009. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond)* 33, 54–66
59. Trayhurn, P., Wang, B., Wood, I.S., 2008. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br. J. Nutr.* 100, 227–235
60. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., Shimomura, I., 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56, 901–911.
61. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., Sugiura, S., 2008. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 118, 710–721
62. Cnop, M., 2008. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 348–352
63. Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., Flier, J.S., 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025
64. E. Maury, S.M. Brichard, Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome, *Molecular and Cellular Endocrinology* 314 (2010) 1–16
65. Trayhurn P., Wood S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue, *British Journal of Nutrition* (2004), 92, 347–355
66. Carr, M. C., and Brunzell, J. D. (2004). Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: Importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2601–2607
67. Nicklas, B. J., Penninx, B. W., Cesari, M., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Kanaya, A. M., Pahor, M., Jingzhong, D., and Harris, T. B. (2004). association of visceral adipose tissue with incident myocardial infarction in older men and women. *Am. J. Epidemiol.* 160, 741–749
68. Piche, M. E., Weisnagel, S. J., Corneau, L., Nadeau, A., Bergeron, J., and Lemieux, S. (2005). Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes* 54, 770–777
69. Goodpaster, B. H., Krishnaswami, S., Harris, T. B., Katsiaras, A., Kritchevsky, S. B., Simonsick, E. M., Nevitt, M., Halvoet, P., and Newman, A. B. (2005). Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch. Intern. Med.* 165, 777–783
70. Fain, J. N., Cheema, P. S., Bahouth, S. W., and Hiler, M. L. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 674–678
71. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., and Bahouth, S. W. (2004a). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose

- tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273–2282
72. Fain, J. N., Tichansky, D. S., and Madan, A. K. (2005b). Transforming growth factor b1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism* 54, 1546–1551
 73. Fain et al., Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells, 2006, *Vitamins and Hormones*, 0083-6729/06
 74. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:614–19
 75. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, et al. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:254–60
 76. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003;108:2460–6
 77. Cencello R., Clement K., Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue *BJOG* 2006;113:1141–1147
 78. Gerhard CC, Romero IA, Cencello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2001;175:81–92
 79. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin—its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 2002;34:469–74
 80. Clement K., Vignes S., Inflammation, adipokines et obésité, *La Revue de médecine interne* 30 (2009) 824–832
 81. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91
 82. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 847–50
 83. Malide D (2001) Confocal microscopy of adipocytes. *Methods Mol Biol* 155:53–64
 84. Ramos-Vara, JA (2005). "Technical Aspects of Immunohistochemistry". *Vet Pathol* 42 (4): 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405
 85. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:19-29
 86. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med.* 1995;27:435-8
 87. Beutler B, Cerami A. Cachectin and TNF α as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584-88
 88. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13(17):6361-73
 89. Idriss TH, Naismith HJ. TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationships. *Microscopia Research Technology* 2000;50:184-195

90. Feldman A, Combes A, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Blaxter JD, Kushner PJ, West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998;280:1747-49
91. Ferrari R. The role of TNF α in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 1999; 40(2):97-105
92. Arjiles JM, Lopez-Soriano J et al. The expression of Tumor Necrosis Factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95:2111-19
93. Norman RA, Bogardus C, Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the TNF α locus in Pima Indians. *J Clin Invest* 1995;96:158-162
94. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-68
95. Kras M, Hausman BD, Martin JR. Tumor necrosis factor- α stimulates cell proliferation in adipose tissue-derived stromal-vascular cell culture: promotion of adipose tissue expansion by paracrine growth factors. *Obes Res* 2000;8 (2):186-93
96. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32
97. Fruhbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal J, Burrel MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E827-47
98. Prolo P, Wong ML, Licinio J. Leptin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30(12):1285-90
99. Mantzoros CS, Qu D, Frederich RC, Susulic VS, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS. Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes*. 1996;45(7):909-14
100. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995;1(12):1311-4
101. Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Mulla A, Cernal L, Veldhuis JD, Flier JS, McCann SM, Gold PW. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2541-6
102. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3(9):1029-33
103. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin- the classical, resistin- the controversial, adiponectin-the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(4):525-46
104. Maamra M, Bidlingmaier M, Postel-Vinay MC, Wu Z, Strasburger CJ, Ross RJ. Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology*. 2001;142(10):4389-93
105. Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-

- resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(5):1328-33
106. Gerber M, Boettner A, Seidel B, Lammert A, Bär J, Schuster E, Thiery J, Kiess W, Kratzsch J. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4503-9
 107. Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE. Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule- α in adipose tissue. *Mol Endocrinol.* 2002;16(8):1920-30
 108. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 1999;130(8):671-80
 109. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19(2):155-7
 110. Bjørbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell.* 1998 Mar;1(4):619-25
 111. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes.* 1996 Jul;45(7):984-7
 112. Ciccone M, Vettor R, Pannacciulli N, Minenna A, Bellacicco M, Rizzon P, Giorgino R, De Pergola G. Plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the common carotid artery. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(6):805-10
 113. Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.* 2001;15(14):2565-71
 114. Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, Matarese G. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest.* 2003;111(2):241-50
 115. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):567-76
 116. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology(July 1, 2007)ISBN 0781795435
 117. Heinrich, J. N., and Bravo, R. (1995). The orphan mouse receptor interleukin (IL)-8R beta binds N51. Structure-function analysis using N51/IL-8 chimeric molecules. *J. Biol. Chem.* 270, 4987–4989
 118. Poitou, C., Viguerie, N., Cancellou, R., De Matteis, R., Cinti, S., Stich, V., Coussieu, C.,vGauthier, E., Courtine, M., Zucker, J. D., Barsh, G. S., Saris, W., et al. (2005). Serum amyloid A: Production by human white adipocytes and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* 48, 519–528
 119. Hannerz, J., Greitz, D., and Ericson, K. (1995). Is there a relationship between obesity and intracranial hypertension? *Int. J. Obes. (Lond.)* 19, 762–763
 120. Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, Sehgal PB, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL. The human "interferon-beta

- 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics*. 1988 Jul;3(1):8-16
121. Kestler DP, Goldstein KM, Agarwal S, Fuhr JE, Andrews R, Hall RE. Hematopoietic differentiation activity of a recombinant human interleukin-6 (IL-6) isoform resulting from alternatively spliced deletion of the second exon. *Am J Hematol*. 1999 Jul;61(3):169-77
 122. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4196-200.
 123. Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jun;84(6):2126-33
 124. Cancellaro R, Tounian A, Poitou Ch, Clément K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab*. 2004 Jun;30(3):215-27
 125. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of IL-6 and its receptor. *Front Biosci*. 1996;1:340-57
 126. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*. 2005 Aug;146(8):3417-27
 127. Van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers of morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Dec;25(12):1759-66
 128. Bernt et al., Plasma Visfatin concentrations and Fat Depot-Specific RNA Expression in Humans, *Diabetes* vol. 54, Oct 2005
 129. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):911-9
 130. Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1318-27
 131. Samal B, Sun Y, Stearn G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor. *Mol Cell Bio*. 1994;14(2):1431-1437
 132. Ognanovic S, Bao S, Yamamoto SY, Garibay-Tupas J, Samal B, Bryant-Greenwood GD. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*. 2001;26(2):107-17
 133. Stephens, Jacqueline M; Vidal-Puig, Antonio J. An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Genetics and molecular biology*. 2006;17(2):128-131.
 134. Sethi JK, Vidal-Puig A. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med*. 2005;11(8):344-7
 135. Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS Lett*. 2003;544(1-3):74-8

136. Fukuhara A et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005;307(5708):426-30
137. Klöting N, Klöting I. Visfatin: gene expression in isolated adipocytes and sequence analysis in obese WOKW rats compared with lean control rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(4):1070-2
138. Scherer et al., A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J Biol Chem*, 1995
139. Hu et al., AdipoQ is a novel adipose-specific gene, dysregulated in obesity, *J Biol Chem*, 1996
140. Arita et al., Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin in obesity, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999
141. Hotta et al., Plasma concentrations of a novel, adipose specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients, *Arterioscler Thromb Vasc* 2000
142. Kadowaki et al., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes and the metabolic syndrome, *J clin Invest*, 2006
143. Fruebis et al., Pretolytic cleavage product of 30-kDA adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001
144. Combs et al., Endogenous glucose production is inhibited by the adipose derived protein Acrp30, *J Clin Invest*, 2001
145. Furukawa et al., Increased oxidative stress in obesity an its impact on metabolic syndrome, *J Clin Invest* 2004
146. Clement et al., Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects, *FASEB J*, 2004
147. Bruun et al., Regulation of adiponectin by adipose tissue-cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003
148. Ouchi et al., Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin, *Circulation*, 1999
149. Yokota et al., Adiponectin, a new member of the family of soluble defence collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages, *Blood*, 2000
150. Sattar et al., Adiponectin and coronary heart disease, a prospective study and metanalysis, *Circulation* 2006
151. Schaffler et al., Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in non alcoholic fatty liver disease, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005
152. Cencello et al., Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity, *Diabetes*, 2006
153. Kelesidis et al., Adiponectin and cancer: a systematic review, *Br J Cancer*, 2006
154. Waki et al., Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes – Molecular structure and multimere formation of adiponectin, *J Biol Chem*, 2003
155. Robb RJ, Munck A, Smith KA (1981). "T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance". *J. Exp. Med.* 154 (5): 1455–74

156. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J (1983). "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2". *Nature* 302 (5906): 305
157. Cantrell DA, Smith KA (1984). "The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model". *Science*. 224: 1312–6
158. Smith KA (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications". *Science*. 240: 1169–76
159. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases". *J. Immunol.* 155: 1151–6
160. Thornton AM, Shevach EM (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production". *J. Exp. Med.* 188: 287–96
161. Waldmann TA (2006). "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design". *Nature Rev. Immun.* 6 (8): 595–601
162. Waldmann TA, Tagaya Y (1999). "The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens". *Annu. Rev. Immunol.* 17: 19–49
163. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerje RR, Wright CM, al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409:307-12
164. Schwarzenberg S.J, Sinaiko A.R. Obesity and inflammation in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 2006;7:239-246
165. Kohleier L. Future of dietary exposure assessment. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1995;61(suppl):702S-9S
166. [Kaufman CL](#), [Kaiser DR](#), [Steinberger J](#), [Kelly AS](#), [Dengel DR](#). Relationships of cardiac autonomic function with metabolic abnormalities in childhood obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 May;15(5):1164-7
167. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 2001 Nov-Dec;17(11-12):953-66
168. Aeberli I, Molinari L, Spinaz G, Lehmann R, l'Allemand D, Zimmermann MB. Dietary intakes and antioxidant vitamins are predictors of subclinical inflammation in overweight Swiss children. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006 Oct;84(4):748-55
169. [Wen Y](#), [Wang HW](#), [Wu J](#), [Lu HL](#), [Hu XF](#), [Cianflone K](#). Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes. *Chin Med J (Engl)*. 2006 Oct 20;119(20):1701-8
170. Adeghate E. Visfatin: Structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunction. *Curr. Med. Chem.* 2008;15(18):1851-62
171. Samara A, Pfister M, Marie B, Visvikis-Siest S. Visfatin, low-grade inflammation and BMI. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jan 29
172. Moon YS, Kim DH, Song DK. Serum tumor necrosis factor-alpha levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism*. 2004 Jul;53(7):863-7
173. Caballero AE, Bousquet-Santos K, Robles-Orsorio L et al. Overweight Latino children and adolescents have marked endothelial dysfunction and subclinical vascular inflammation in association with excess body fat and insulin resistance. *Diabetes care*. 2008 Mar;31(3):576-82

174. Dixon D, Goldberg R, Schneiderman N, Delamater A. Gender differences in TNF α levels among obese vs non-obese Latino children. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2004 Apr;58(4):696-9

Για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Τον Κο Δεδούση Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του ανθρώπου, στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τον Κο Σφαέλο Κωνσταντίνο, Μοριακό Βιολόγο – Γενετιστή, υποψήφιο διδάκτορα του Χαροκοπέιου πανεπιστημίου

Την Α' χειρουργική κλινική του Νοσηλευτικού Ιδρύματος ΜΤΣ και συγκεκριμένα τον Κο Βίλλια Κωνσταντίνο, διευθυντή της κλινικής, τους Κους Δουκουμόπουλο Ιωάννη, Μαθιουλάκη Σταύρο, Μουχασίρη Χρήστο, Μπουτζουβή Σταύρο, Παυλάκη Νικόλαο, γενικούς χειρουργούς - επιμελητές της κλινικής, καθώς και τους Κους Αναστασάκη Ιωάννη, Ζέη Μάριο, Ξένο Αντώνιο, Παραουλάκη Ιωάννη, Στεφανίδη Ιωάννη, Τούμπη Σεραφείμ, Φαλίδα Ευάγγελο, Χριστόπουλο Γεώργιο, ειδικευόμενους χειρουργούς της κλινικής

Την Κα Αμερικάνου Χαραλαμπία, τελειόφοιτη του τμήματος Βιολογίας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών