



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συσχέτιση πολυμορφισμών κυτταροκινών και διαιτητικών συνηθειών σε παιδιά

Βίδα Νικολέτα



Τριμελής Επιτροπή

Δεδούσης Γεώργιος, Επιβλέπων Καθηγητής

Γιαννακούλια Μαίρη

Παναγιωτάκος Δημοσθένης

Αθήνα 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	σελ.2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ.5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.6
1.1. ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	σελ.7
1.1.1 Εισαγωγή	σελ.8
1.1.2 Διαγνωστικά κριτήρια	σελ.9
1.1.3 Επιπολασμός παιδικής παχυσαρκίας	σελ.11
1.1.4 Επιπτώσεις παιδικής παχυσαρκίας	σελ.15
1.1.5 Αιτιολογία παιδικής παχυσαρκίας	σελ.17
1.1.5 Α)Γενετικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες στην εμφάνιση της παχυσαρκίας	σελ. 17
1.1.5 Β)Επίδραση του περιβάλλοντος στην παιδική παχυσαρκία	σελ. 18
1.1.6. Η παχυσαρκία ως φλεγμονώδης νόσος	σελ.25
1.2 TNFα	σελ.28
1.2.1 Εισαγωγή	σελ.29
1.2.2 Γονίδιο του TNFα	σελ.30
1.2.3 Δομή και σύνθεση	σελ.31
1.2.4 Υποδοχείς TNFα	σελ.32
1.2.5 Μηχανισμοί δράσης	σελ.33
1.2.6 Λειτουργίες	σελ.34
1.2.6.Α) TNFα και καχεξία	σελ.35
1.2.6.Β) TNFα και παχυσαρκία.	σελ.35
1.2.7 Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNFα	σελ.37
1.2.8 Ο πολυμορφισμός TNFα -308 G>A	σελ.38
1.2.9 Αποτελέσματα ερευνών	σελ.39
1.3 PPARγ	σελ.42
1.3.1 Εισαγωγή	σελ.43
1.3.2 PPARγ	σελ.44
1.3.3 Ειδική ιστική έκφραση των PPARs	σελ.45
1.3.4. Μόρια-σύνδεσμοι των PPARs	σελ.46
1.3.5 Γονίδιο PPARγ	σελ.47
1.3.6 Δομή και λειτουργίες των PPARs	σελ.48

1.3.7 Επίδραση συμπαραγόντων και αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα κατά την πρόσδεση μορίων-συνδέσμων	σελ.51
1.3.8 Ρόλοι του PPAR γ	σελ.52
1.3.8 Α) Το PPAR γ ως ένα γονίδιο μοντέλο για την πρόσληψη τροφής και το ενεργειακό ισοζύγιο	σελ.52
1.3.8 Β) Ρόλος του στη λιπογένεση	σελ.53
1.3.8 Γ) Ρόλος του στη φλεγμονή	σελ.56
1.3.9 Ο πολυμορφισμός Pro12 Ala στο PPAR Γ 2	σελ.57
1.3.10 Αποτελέσματα ερευνών	σελ.58
1.4 IL-6	σελ.63
1.4.1 Εισαγωγή	σελ.64
1.4.2 Γονίδιο IL-6	σελ.64
1.4.3 Παραγωγή IL-6	σελ.65
1.4.4 Δράσεις IL-6	σελ.67
1.4.4 Α) IL-6 και αθηροθρομβτικός κίνδυνος	σελ.68
1.4.4 Β) Η IL-6 ως σήμα εναπόθεσης λίπους	σελ.69
1.4.4 Γ) IL-6 και Ινσουλινοαντίσταση	σελ.71
1.4.5 Πολυμορφισμός IL-6-174G>C	σελ.72
1.4.6 Αποτελέσματα ερευνών	σελ.72
2. ΣΚΟΠΟΣ	σελ.75
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	σελ.77
3.1. Πληθυσμός και δείγμα μελέτης	σελ.78
3.2 Ανθρωπομετρία	σελ.79
3.3. Εργαστηριακές Αναλύσεις	σελ.81
3.4 Απομόνωση DNA	σελ.81
3.5 Έλεγχος Πολυμορφισμών	σελ.82
3.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για τον πολυμορφισμό TNFa-308G>A	σελ.82
3.5.2 Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	σελ.87
3.5.3 Διαλύματα	σελ.90
3.5.4 Μέθοδος iPLEX για την ανίχνευση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12Ala	σελ.91
3.5.5. Μέθοδος διαχωρισμού αλληλίων για την ανίχνευση του πολυμορφισμού IL-6 - 174G>C	σελ.96
3.6. Διατροφική Αξιολόγηση	σελ.100

3.7. Αξιολόγηση Φυσικής Δραστηριότητας	σελ.100
3.8. Δημογραφικά Στοιχεία	σελ.101
3.9. Στατιστική Επεξεργασία	σελ.101
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.102
4.1 Χαρακτηριστικά Πληθυσμού Μελέτης	σελ.103
4.2 Κατανομή πληθυσμού μελέτης ανά κατηγορία ΔΜΣ	σελ.106
4.3 Πρόσληψη θρεπτικών συστατικών σε φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρα/ παχύσαρκα παιδιά	σελ.108
4.4 Αποτελέσματα για τους μελετούμενους πολυμορφισμούς	
4.4.1 Αποτελέσματα PCR και πέψης για τον πολυμορφισμό TNFa-308G>A	σελ.109
4.4.2 Αποτελέσματα iPLEX Assay για τον πολυμορφισμό PPARγ Pro12Ala	σελ.110
4.4.3 Αποτελέσματα Allelic Discrimination Assay για τον πολυμορφισμού IL-6 - 174G>C	σελ.110
4.5 Συχνότητες γονοτύπων και κατανομή τριών πολυμορφισμών ανά φύλο και ανά κατηγορία ΔΜΣ	σελ.111
4.6 Έλεγχος συσχέτισης των 3 πολυμορφισμών με επιλεγμένα χαρακτηριστικά του δείγματος	σελ.116
4.7 Έλεγχος συσχέτισης των 3 πολυμορφισμών με δείκτες παχυσαρκίας	σελ.119
4.8 Έλεγχος αλληλεπίδρασης των 3 πολυμορφισμών με συστατικά της διατροφής	σελ.126
Συζήτηση	σελ. 129
Βιβλιογραφία	σελ.136

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παχυσαρκία στα παιδιά και τους εφήβους έχει λάβει επιδημικές διαστάσεις. Στο Δυτικό Κόσμο αυξάνεται με ένα ετήσιο ρυθμό που αγγίζει το 4% στα παιδιά ηλικίας 6-18 ετών ενώ στην Ευρώπη, τα δεδομένα των πρόσφατων ερευνών καταδεικνύουν μια τάση αύξησης του σωματικού βάρους των παιδιών, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός αυτών που θεωρούνται υπέρβαρα ή παχύσαρκα. Από την άλλη η παχυσαρκία αποτελεί μια φλεγμονώδη κατάσταση στην οποία εμπλέκονται και κυτταροκίνες. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών TNFα -308G>A, PPPARγ Pro12Ala, IL-6-174G>C με διατροφικές συνήθειες στην παιδική παχυσαρκία. Σε 1132 παιδιά, ηλικίας 10- 12 ετών, τα οποία αποτελούσαν στον πληθυσμό της συγχρονικής μελέτης GENDAI (Gene-Diet Attica Investigation on childhood obesity) έγινε πλήρης διατροφική αξιολόγηση, βιοχημικές μετρήσεις και σε ένα τμήμα αυτού του πληθυσμού προσδιορίστηκαν επιτυχώς οι γονότυποι για τους τρεις προαναφερθέντες πολυμορφισμούς. Για τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A η συχνότητα του A αλληλίου ήταν 0,08, για τον πολυμορφισμό PPPARγ Pro12Ala η συχνότητα του Ala ήταν 0,08 και για τον πολυμορφισμό IL-6-174G>C η συχνότητα για το C αλληλίο ήταν 0,24. Η κατανομή των πολυμορφισμών TNFα -308G>A και IL-6-174G>C δε διέφερε μεταξύ παιδιών φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρων/ παχύσαρκων παιδιών ενώ φάνηκε μια τάση διαφοράς στην κατανομή για τον πολυμορφισμό PPPARγ Pro12Ala ($p=0,068$). Οι πολυμορφισμοί TNFα -308G>A και IL-6-174G>C δεν βρέθηκαν να σχετίζονται με καμία από τις ανθρωπομετρικές αλλά και βιοχημικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Από την άλλη, για τον πολυμορφισμό PPPARγ Pro12Ala, οι Pro/Pro ομοζυγώτες βρέθηκε να έχουν στατιστικά υψηλότερες τιμές δερματοπτυχής τρικεφάλου συγκριτικά με τους ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό ($p=0,038$). Ο πολυμορφισμός PPAR γPro12Ala φαίνεται να είχε την τάση να επηρεάζει το ΔΜΣ ($p=0,069$), όταν λαμβάνονταν υπόψη και άλλοι παράγοντες. Όσο αφορά στους μελετούμενους πολυμορφισμούς και τη διατροφή των παιδιών, βρέθηκε να υπάρχει μια αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με τα τεταρτημόρια του λίπους της δίαιτας που φαινόταν να επηρέαζε το ΔΜΣ. Για τους άλλους δύο πολυμορφισμούς δεν βρέθηκαν αλληλεπιδράσεις με τη διατροφή, τουλάχιστον για τους παράγοντες που ερευνήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη.

Ο Ιπποκράτης έγραψε « Η παχυσαρκία δεν αποτελεί μόνο μια ασθένεια, αλλά είναι και προάγγελος άλλων ασθενειών», αναγνωρίζοντας ότι η παχυσαρκία είναι μία νοσηρή κατάσταση που οδηγεί σε επιπρόσθετες δυσλειτουργίες. Παρόλο που αυτή η συσχέτιση είναι ιδιαίτερα προφανής στα προσβεβλημένα άτομα, η νοσηρότητα που σχετίζεται με την παχυσαρκία έχει βλαβερές συνέπειες σε όλη την κοινωνία. Ο αριθμός των ετησίως αποδοτέων στην παχυσαρκία θανάτων, είναι κατά προσέγγιση 30.000 στο Ηνωμένο Βασίλειο (NAO 2001) και δεκαπλάσιος στις ΗΠΑ (Allison DB et al 1999), όπου η παχυσαρκία τείνει να ξεπεράσει το κάπνισμα σαν κύρια αιτία ασθένειας και πρόωρου θανάτου (Mokdad AH et al 2005).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), (World Health Organization- WHO), (WHO 2000) περιέγραψε την παχυσαρκία σαν ένα από τα πιο προφανή και παρόλα αυτά πιο παραβλέψιμο πρόβλημα της δημόσιας υγείας, που πλήττει τόσο τις ανεπτυγμένες όσο και τις αναπτυσσόμενες χώρες. Το πρόβλημα του υπερβολικού βάρους και της παχυσαρκίας αναγνωρίστηκε παγκοσμίως σαν πρόβλημα δημόσιας υγείας μόνο τα προηγούμενα 10 δέκα χρόνια ενώ ο υποσιτισμός και οι μολυσματικές ασθένειες ήταν από πάντα αναγνωρισμένα. (Haslam DW and James WPT 2005).

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, η παχυσαρκία είναι η ασθένεια κατά την οποία η συσσώρευση του σωματικού λίπους είναι μεγαλύτερη του φυσιολογικού και συνοδεύεται από πολλές αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία του ανθρώπου (WHO 1997). Πλέον, το πρόβλημα της παχυσαρκίας έχει λάβει επιδημικές διαστάσεις αφού περισσότεροι από 1 εκατομμύριο ενήλικες έχουν βάρος υψηλότερο του φυσιολογικού. Η παχυσαρκία αλλά και το υπερβάλλον βάρος, είναι γνωστοί παράγοντες κινδύνου για ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, όπως η ουρική αρθρίτιδα, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, ο διαβήτης τύπου 2, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η χολολιθίαση, η νεφρολιθίαση, η οστεοαρθρίτιδα, η άπνοια ύπνου, τα αναπνευστικά προβλήματα, οι επιπλοκές στη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και ψυχολογικές διαταραχές αλλά και κάποιοι τύποι καρκίνου (Haslam DW and James WPT 2005).

Από το 1980 η παιδική παχυσαρκία αυξάνεται με αλματώδη ρυθμό παγκοσμίως. Από το 1980 ως το 2004 ο επιπολασμός από 6% αυξήθηκε σε 19% στις ΗΠΑ, ενώ η αντίστοιχη αύξηση τον ελληνικό πληθυσμό ήταν από 15% σε 33% (Odgen CL et al 2006). Οι επιπτώσεις της παχυσαρκίας είναι όμοιες τόσο για τους ενήλικες όσο και για τα παιδιά, ενώ είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ασθένειες που αποτελούσαν κατ' εξοχήν ασθένειες των

ενηλίκων, τώρα κάνουν την εμφάνισή τους στα παχύσαρκα και υπέρβαρα παιδιά όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, η υπέρταση και τα καρδιαγγειακά προβλήματα. Επίσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα παχύσαρκα και υπέρβαρα παιδιά είναι πιθανό να διατηρήσουν το αυξημένο βάρος τους και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής τους έχουν ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν χρόνιες ασθένειες που προέρχονται από την παχυσαρκία. Επομένως, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η περαιτέρω μελέτη των αιτιολογικών παραγόντων καθώς και ο σχεδιασμός των μέτρων πρόληψης της παχυσαρκίας, ώστε να μειωθεί ο επιπολασμός της παχυσαρκίας τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά (Cole TJ et al 2000).

1.1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Η εκτίμηση της σύστασης σώματος, του ποσοστού σωματικού λίπους και της κατανομής αυτού, έχει μεγάλη σημασία στην αξιολόγηση της παχυσαρκίας, καθώς με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται και ο κίνδυνος εμφάνισης ορισμένων ασθενειών, όπως των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Για την αξιολόγηση του σωματικού λίπους υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, οι οποίες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

Α) οι εργαστηριακές μέθοδοι (όπως η αξονική τομογραφία, ή μαγνητική τομογραφία, απορροφησιομετρία ακτινών X διπλής ενέργειας, υποβρύχια ζύγιση, μέθοδος διάλυση διπλά σημασμένου νερού)

Β) οι μέθοδοι πεδίου, δηλαδή μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ευκολία στην κλινική πρακτική, όπως η ανθρωπομετρία (βάρος, ύψος, δερματικές πτυχές και περιφέρειες) και η ανάλυση της βιοηλεκτρικής εμπέδησης (Ellis et al 2001).

Από την άλλη, ο πιο εύχρηστος τρόπος αξιολόγησης του σωματικού βάρους και της παχυσαρκίας είναι ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ), ο οποίος προτάθηκε από τον Quetelet και χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα (Macdonald et al 1986).

Ο υπολογισμός του Δείκτη Μάζας Σώματος, $\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{Βάρος σώματος} / \text{ύψος}^2 \text{ (kg/m}^2\text{)}$, αποτελεί τον πιο γρήγορο, άμεσο και αποτελεσματικό τρόπο εκτίμησης της παχυσαρκίας όχι μόνο σε ενήλικες αλλά και σε παιδιά. Ο ΔΜΣ των παιδιών αλλάζει με την ηλικία και διαφέρει σε κάθε

φύλο, γι' αυτό εκτιμάται ανάλογα με την ηλικία και το φύλο του παιδιού (Cole TJ et al 2000).

Υπάρχουν 2 διεθνώς αναγνωρισμένοι μέθοδοι εκτίμησης της παχυσαρκίας των παιδιών με βάση το ΔΜΣ. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην χρήση των ποσοστημορίων του ΔΜΣ στις καμπύλες ανάπτυξης που έχει ορίσει το CDC (Center for Disease Control) των ΗΠΑ. Οι καμπύλες ανάπτυξης του CDC έχουν σχεδιαστεί βασιζόμενες σε στοιχεία που έχουν συλλεχθεί από τον Αμερικάνικο πληθυσμό. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, τα παιδιά με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 85^{ου} ποσοστημορίου χαρακτηρίζονται ως υπέρβαρα και τα παιδιά με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 95^{ου} ποσοστημορίου χαρακτηρίζονται ως παχύσαρκα. Υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι παιδιά με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 85^{ου} και του 95^{ου} ποσοστημορίου βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο νοσηρότητας σε σχέση με συνομηλίκους τους με χαμηλότερο ΔΜΣ. Το συγκεκριμένο διαγνωστικό κριτήριο χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για εθνικά δεδομένα τιμών ΔΜΣ (Reilly JJ et al 2005).

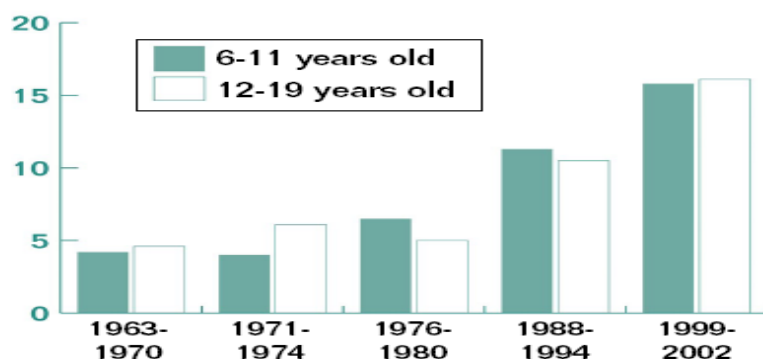
Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στην χρήση των οριακών τιμών του ΔΜΣ, οι οποίες έχουν προταθεί από τους Cole και συνεργάτες και έχουν υιοθετηθεί από τον IOTF (International Obesity Task Force). Οι συγκεκριμένες οριακές τιμές προέκυψαν από μετά-ανάλυση 6 εθνικών ερευνών με μεγάλο (>10000 παιδιά σε κάθε έρευνα) και αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά χώρα, και εκφράζουν την τιμή ΔΜΣ ανά φύλο και ηλικία που αντιστοιχεί σε τιμή 25kg/m² του ΔΜΣ των ενηλίκων για το υπέρβαρο και στο 30kg/m² του ΔΜΣ των ενηλίκων για την παχυσαρκία (Cole TJ et al 2000).

Παρά την έλλειψη δεδομένων για τη δημιουργία επιπλέον μεθόδων για την εκτίμηση της παχυσαρκίας (Reilly JJ et al 2005), ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν το ποσοστό του σωματικού λίπους για την αξιολόγηση του υπερβάλλοντος βάρους. Το σωματικό λίπος εκτιμάται με τη βοήθεια των δερματικών πτυχών και ορίζεται ως >30% και >25% για τα παχύσαρκα κορίτσια και αγόρια αντίστοιχα (Dehghan N et al 2005).

1.1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Υπάρχουν αρκετά επιστημονικά δεδομένα, από πολλές μελέτες, που αφορούν στον επιπολασμό της παχυσαρκίας. Οι έρευνες αυτές χρονολογούνται από τις αρχές του 1960 και τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της παχυσαρκίας ήταν η διαιτητική πρόσληψη, η φυσική δραστηριότητα και οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (Center of Disease Control [CDC] μέσω της (NHES). Από το 1963 μέχρι το 1974 η παιδική παχυσαρκία παρέμενε σε ποσοστό περίπου 4% σε παιδιά ηλικίας 6-11 ετών και περίπου 5,5% σε παιδιά 12-19 ετών. Μέχρι το 2000 το ποσοστό αυτό έφτασε το στο επίπεδο του 15% και για τις δύο ηλικιακές ομάδες (Hardy LR et al 2004), ενώ το 2002 το 16% των παιδιών 6-19 ετών ήταν υπέρβαρα.

Ποσοστά υπέρβαρου σε παιδιά και εφήβους ΗΠΑ 1963-2002



Διάγραμμα 1.1.1. Επιπολασμός υπέρβαρου σε παιδιά & εφήβους 1963-2002, >95^ο εκατοστημόριο για το ΔΜΣ ανά ηλικία και φύλο με βάση τις καμπύλες CDC του 2000.
Πηγή : National Centre for Health Statistics (Hardy 2004)

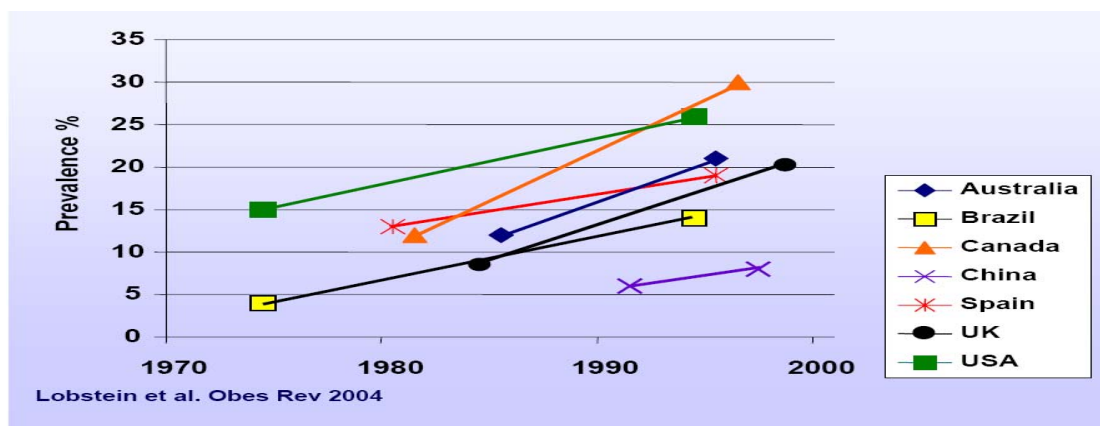
Με βάση τα πιο πρόσφατα δεδομένα από την Αμερική (NHANES 2003-2004), το 17.1% των παιδιών ηλικίας 2-19 ετών ήταν υπέρβαρα. Παρατηρήθηκε μάλιστα μία αύξηση του υπέρβαρου στα κορίτσια από 13% το 1999-2000 σε 16% το 2003-2004. Μετά την στάθμιση που έγινε για την ηλικία σε ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο που συμπεριλάμβανε δεδομένα από τις μελέτες NHANES 1999-2000 2001-2002, 2003-2004, η επικράτηση του υπέρβαρου για τα αγόρια ήταν μεγαλύτερη σε παιδιά και σε εφήβους με Μεξικανική καταγωγή σε σχέση με τους λευκούς μη Ισπανικής καταγωγής, ενώ μεταξύ λευκών και μαύρων μη Ισπανικής καταγωγής δεν διέφερε. Για τα κορίτσια, ο επιπολασμός ήταν μεγαλύτερος σε παιδιά Μεξικανικής καταγωγής, και σε μαύρη μη Ισπανικής καταγωγής φυλή, σε σχέση με την λευκή φυλή. Τα ποσοστά ήταν μεγαλύτερα στους εφήβους ενώ δεν διέφεραν ανάμεσα σε αγόρια και κορίτσια (Ogden CL et al 2006).

Επιπλέον, από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τον IOTF (Childhood Obesity Report May 2004), το 10% των παιδιών παγκοσμίως είναι υπέρβαρα και το 3% είναι παχύσαρκα, με την Αμερική και την Ευρώπη να παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά. Όπως αναφέρουν οι ερευνητές Kaare και συνεργάτες, από το 1980 έως και το 2003 ο επιπολασμός του υπέρβαρου στα παιδιά διπλασιάστηκε ενώ στους εφήβους τριπλασιάστηκε. Αντίστοιχα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας στα παιδιά 6-11 ετών διπλασιάστηκε. Σε εφήβους 12-17ετών, το ποσοστό των παχύσαρκων αγοριών έφτασε το 13% από ένα ποσοστό της τάξης του 5% ενώ στα κορίτσια της ίδιας ηλικίας από το αρχικό ποσοστό του 5% έφτασε στο 9%. Οι παραπάνω αλλαγές σημειώθηκαν από το 1966-70 μέχρι το 1988-91 (Kaare R et al 2003).

Ο επιπολασμός της τάξης του 24% το 2002 είναι κατά 5 μονάδες υψηλότερος από αυτόν που προβλεπόταν από τα στοιχεία της δεκαετίας του 1980 και είναι ήδη μεγαλύτερος από αυτόν που είχε προβλεφθεί για το 2010. Επί του παρόντος, εκτιμάται ότι 14 εκατομμύρια παιδιά είναι σήμερα υπέρβαρα, 3 εκατομμύρια εκ των οποίων είναι παχύσαρκα με σημαντικές διαφοροποιήσεις στα ποσοστά ανάλογα με το γεωγραφικό τόπο. Πιο συγκεκριμένα, στις ΗΠΑ το ποσοστό των υπέρβαρων παιδιών 7-12 ετών, αυξήθηκε από 8% στο 20% (1984-1998), στην Ισπανία τα υπέρβαρα 6-7 ετών αυξήθηκαν από το 23% στο 35% (1985/86-1995/96), στη Γαλλία από το 10% στο 16% (1993-2000) και στην Πολωνία από το 8% στο 18% (1994-2000). Στις Μεσογειακές Χώρες, το ποσοστό των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών είναι 20-35% ενώ στις Σκανδιναβικές Χώρες το ίδιο ποσοστό είναι μικρότερο της τάξης του 10-20%(Dehghan M et al 2005).

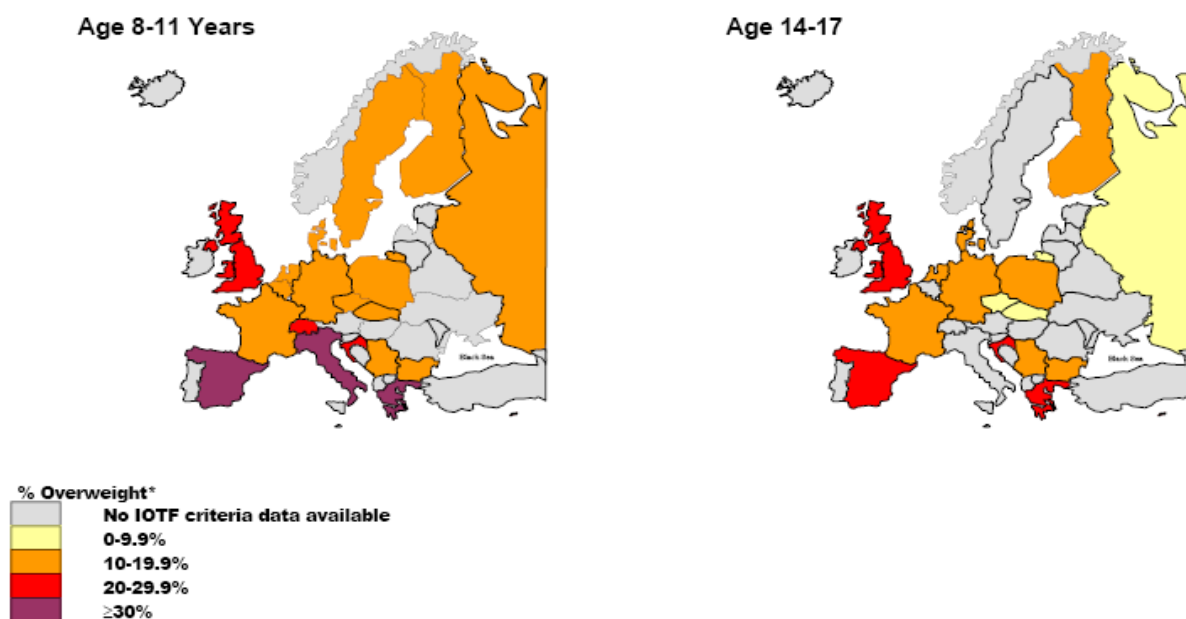
Στο διάγραμμα 1.1.2 φαίνεται η τάση αύξησης της παιδικής παχυσαρκίας σε παγκόσμιο επίπεδο(Lobstein T et al 2004).

Διάγραμμα 1.1.2. Η μεταβολή του επιπέδου παχυσαρκίας και υπέρβαρου στα παιδιά από το 1970



Τα δεδομένα από την Ευρώπη είναι εξίσου ανησυχητικά και η αύξηση φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στη Νότια Ευρώπη. 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. Στην Γαλλία, έρευνες παρουσιάζουν αύξηση από 10% σε 16% κατά τη διάρκεια της περιόδου 1992 –2000 (Lobstein T and Frelut ML 2003)

Διάγραμμα 1.1.3.: Επιπολασμός υπέρβαρου και παχυσαρκίας σε παιδιά στην Ευρώπη (Πηγή IOTF 2000)



Στην Ελλάδα, έχουν πραγματοποιηθεί 3 μεγάλες μελέτες για την εκτίμηση του επιπολασμού της παιδικής παχυσαρκίας (Mamalakis G et al 2000, Krassas GE et al 2001, Karayiannis D et al 2003). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη το 1992, στην οποία συμμετείχαν 1000 παιδιά ηλικίας 6 ετών, βρέθηκε ότι από τα αγόρια το 23,2% και το 10,9% ήταν υπέρβαροι και παχύσαρκοι αντίστοιχα. Τα ίδια ποσοστά για τα κορίτσια ήταν 28,8% και 9,2%. Μετά την πάροδο 3 ετών, όταν τα παιδιά ήταν στην ηλικία των 9 ετών, τα παραπάνω ποσοστά διαφοροποιήθηκαν. Έτσι μετά την πρώτη επανεξέταση, το 18,9% των αγοριών ήταν υπέρβαροι και το 4,9% ήταν παχύσαρκοι, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα κορίτσια ήταν 18,1% και 4,5%. Η δεύτερη επανεξέταση έλαβε χώρα 3 χρόνια αργότερα, στην ηλικία των 12 ετών και το ποσοστό των υπέρβαρων και παχύσαρκων αγοριών ήταν 24% και 8,2% αντίστοιχα ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα κορίτσια διαμορφώθηκαν στο 19,2% και 5%. Οι οριακές τιμές του ΔΜΣ που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της παχυσαρκίας ήταν αυτές του CDC (Mamalakis G et al 2000).

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Θεσσαλονίκη το 2000-2001, είχε δείγμα περίπου 2500 παιδιά ηλικίας 6-17 ετών. Στα παιδιά αυτά μετρήθηκε ο ΔΜΣ και με βάση τα κριτήρια του IOTF αξιολογήθηκε ότι το ποσοστό των υπέρβαρων παιδιών ήταν 22,2% και το ποσοστό παχύσαρκων παιδιών ήταν 4,1%. Τα παιδιά διαχωρίστηκαν ανάλογα με την ηλικία και

ανάλογα με το φύλο. Ανάλογα με την ηλικία, χωρίστηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες και συγκεκριμένα τα παιδιά δημοτικού 6-10 ετών και τους εφήβους 11-17 ετών. Στην πρώτη ομάδα, τα ποσοστά ήταν 25,3% και 5,6% για τα υπέρβαρα και παχύσαρκα αντίστοιχα ενώ για τη δεύτερη ομάδα τα ποσοστά ήταν 19% και 2,6% αντίστοιχα. Κατά το δεύτερο διαχωρισμό ανάλογα με το φύλο, διαπιστώθηκε ότι υπέρβαρα ήταν το 25,9% των αγοριών και το 19,1% των κοριτσιών, ενώ παχύσαρκα ήταν το 5,1% των αγοριών και το 3,2% των κοριτσιών (Krassas GE et al 2001).

Ακόμη μία έρευνα με αντιπροσωπευτικό δείγμα 4299 παιδιών εκτίμησε τον επιπολασμό της παχυσαρκίας στην Ελλάδα. Η ηλικία των παιδιών ήταν 11-16 ετών και τα στοιχεία του βάρους και του ύψους ήταν αυτοδηλούμενα. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι οριακές τιμές του ΔΜΣ του IOTF όσο και του CDC. Βάση των οριακών τιμών του IOTF, το 21,7% των αγοριών και το 9,1% των κοριτσιών ήταν υπέρβαρα, ενώ το 2,5% και το 1,2% των αγοριών και κοριτσιών αντίστοιχα ήταν παχύσαρκα. Σύμφωνα με τις οριακές τιμές του CDC υπέρβαρα ήταν το 18,8% των αγοριών και το 8,1% των κοριτσιών και παχύσαρκα ήταν το 5,8% και το 1,7% των αγοριών και κοριτσιών αντίστοιχα (Karayiannis D et al 2003).

Όπως αναφέρουν οι Κρασσάς και συνεργάτες, συγκρίνοντας τα δεδομένα που προέκυψαν για την Ελλάδα με αυτά 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 (Krassas GE et al 2001).

1.1.4 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 (The challenge of obesity in the WHO European Region. Fact sheet EURO/13/05).

Παρατηρείται 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 την 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, ενώ πλήθος μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως στις ΗΠΑ, καταδεικνύουν ότι όσο αυξάνεται ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, αναμένεται να αυξηθεί και ο επιπολασμός του διαβήτη τύπου 2 (Φαρατζιάν και συν 2004).

Ιδιαίτερα συχνή είναι και η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου στα παχύσαρκα παιδιά. Στην 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 έως το 28,7% στους παχύσαρκους συνομήλικες 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 (Φαρατζιάν και συν 2004).

Επιπλέον, παρατηρείται ότι ένα μεγάλο ποσοστό παχύσαρκων παιδιών και εφήβων παραμένει παχύσαρκο καθώς μεγαλώνει. Στην διαχρονική μελέτη των Κρασσά και συν φάνηκε ότι μόνο το 2,1% των μη παχύσαρκων παιδιών ηλικίας 6 ετών ήταν παχύσαρκα στην ηλικία των 12 ετών ενώ το 50% των παχύσαρκων παιδιών στην ηλικία των 6 ετών παρέμεινε παχύσαρκο και στην ηλικία των 12 ετών (Krassas GE et al 2001). Επειδή η παιδική παχυσαρκία συχνά παραμένει και στην ενήλικη ζωή, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ενηλίκων θα βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παθήσεων όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, οστεοαρθρίτιδα και διαφόρων τύπων καρκίνου (Maffeis C et al 2000).

Άλλες βιολογικές επιπτώσεις της παιδικής και εφηβικής παχυσαρκίας είναι οι αναπνευστικές (άσθμα, άπνοια ύπνου), οι γαστρεντερικές (λιπώδες ήπαρ) και οι ενδοκρινικές (διαταραχές εμμηνορρυσίας, καθυστέρηση σεξουαλικής ωρίμανσης αγοριών) (Φαρατζιάν και συν 2004).

Συχνές είναι και οι ψυχολογικές επιπτώσεις της παιδικής παχυσαρκίας, η οποία φαίνεται να επηρεάζει την αυτοεκτίμηση και να έχει αρνητικές συνέπειες στην γνωσιακή και κοινωνική ανάπτυξη (Maffeis C et al 2000). Ο στιγματισμός των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών έχει καταγραφεί πολλές φορές στις δυτικές κοινωνίες και είναι ιδιαίτερα έκδηλος στις μικροκοινότητες των ανηλίκων. Παιδιά που έχουν ενοχληθεί από τον εμπαιγμό των συνομηλίκων τους σχετικά με το σχήμα του σώματός τους είναι πιθανότερο να είναι δυσαρεστημένα με την εμφάνισή τους ως ενήλικες, μέχρι του βαθμού ανάπτυξης διαταραχών λήψης τροφής (Φαρατζιάν και συν 2004).

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 και άρα 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 τον σχεδιασμό μέτρων πρόληψης της (Φαρατζιάν και συν 2004).

1.1.5 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Η αιτιολογία της παχυσαρκίας είναι πολυπαραγοντική και φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης γενετικών, συμπεριφοριστικών, περιβαλλοντικών, κοινωνικών, ψυχολογικών, και πολιτισμικών επιδράσεων στην ισορροπία του ισοζυγίου ενέργειας. Η διαταραχή του ισοζυγίου ενέργειας (αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης σε σχέση με την ενεργειακή κατανάλωση), προκαλεί αύξηση του αποθηκευμένου λίπους, και παχυσαρκία. Η σχετική συμβολή κάθε ενός από αυτούς τους παράγοντες έχει μελετηθεί εκτενώς. Αν και τα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του σωματικού βάρους, ο WHO κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι συμπεριφοριστικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την δραματική έξαρση του φαινομένου της παχυσαρκίας (Racette SB et al 2003).

1.1.5 Α) Γενετικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες στην εμφάνιση της παχυσαρκίας

Η άποψη ότι η παχυσαρκία αποτελεί τον φαινότυπο πολλών παθογενετικών καταστάσεων αποδεικνύεται από την ανακάλυψη συγκεκριμένων ενδοκρινικών ανωμαλιών που προκαλούν στην εμφάνισή της, στην πρώιμη παιδική ηλικία. Σε ορισμένες από τις ανωμαλίες αυτές, εμπλέκονται νευρολογικοί μηχανισμοί, ενώ άλλες αφορούν την απορύθμιση του ισοζυγίου ενέργειας ή και του μηχανισμού αποθήκευσης λίπους.

Οι παθολογικές αυτές καταστάσεις κατατάσσονται ως εξής:

1. Μονογονιδιακές διαταραχές στο μονοπάτι της ενεργειακής ισορροπίας (πχ. συγγενής έλλειψη λεπτίνης, έλλειψη των υποδοχέων λεπτίνης, POMC μετάληψη κλπ) .
2. Γενετικά σύνδρομα στα οποία συνυπάρχει και νοητική καθυστέρηση (σύνδρομο όπως Prader-Willi, Bardet-Biedl, Ahstrom, Cohen, κλπ.)
3. Κλασικές ενδοκρινικές ανωμαλίες

- (υποθυρεοειδισμός, σύνδρομο Cushing, έλλειψη αυξητικής ορμόνης, κλπ.)
4. Διαταραχές της δυναμικής της Ινσουλίνης (υποθαλαμική παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη, αντίσταση στην λεπτίνη) (Lustig RH 2005).

Έρευνες σε υιοθετημένους δίδυμους και στις οικογένειες τους έδειξε ότι περισσότερο από το 80% της διακύμανσης του ΔΜΣ αποδίδεται σε γενετικούς παράγοντες. Τα γονίδια επηρεάζουν πολλές παραμέτρους που σχετίζονται τόσο με την ενεργειακή πρόσληψη, όσο και με την ενεργειακή κατανάλωση. Σύμφωνα με μελέτες, ο μεταβολικός ρυθμός, η θερμογένεση λόγω λήψης τροφής και η διάθεση για την εκτέλεση σωματικής δραστηριότητας έχουν γενετικό υπόβαθρο (Rosenbaum M and Leibel RL 1998). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σήμερα έχει επικεντρωθεί στα γονίδια των αδρενεργικών υποδοχέων, στις πρωτεΐνες αποσύζευξης, στους πυρηνικούς υποδοχείς PPRAs και στον υποδοχέα τη λεπτίνης (Loos RJF and Bouchard C2003), ενώ ολοένα ανακαλύπτονται πολυμορφισμοί γονιδίων οι οποίοι πιθανά να σχετίζονται με την παχυσαρκία .

Όσο αφορά στα μονογονιδιακά γενετικά σύνδρομα που οδηγούν σε παχυσαρκία, αυτά είναι σχετικά σπάνια (Prader-Willi, Bardet-Biedl, Ahstrom, Cohen) (Rosenbaum M and Leibel RL 1998). Το σύνδρομο Prader Willi είναι μια από τις Μενδελιανές διαταραχές για τις οποίες η παχυσαρκία είναι μία κλινική εκδήλωση αλλά όχι ένα επικρατές χαρακτηριστικό. Είναι το πιο συχνό και το καλύτερα μελετημένο σύνδρομο που σχετίζεται με την παχυσαρκία. Πρόκειται για μια αυτονομική επικρατή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένη εμβρυϊκή κινητικότητα, μυϊκή υποτονικότητα κατά τη στιγμή της γέννησης, χαμηλό ύψος, υπογοναδισμό, πνευματική καθυστέρηση, μικρά χέρια και πόδια και υπερφαγία, η οποία συνήθως εμφανίζεται μεταξύ των 12 και 18 μηνών. Κατά την διάρκεια της εφηβείας παρουσιάζονται και προβλήματα στην συμπεριφορά τα οποία προσθέτουν επιπλέον δυσκολία στην προσπάθεια αντιμετώπισης. Η επίπτωση του συνδρόμου υπολογίζεται περίπου 1 στις 25000 γεννήσεις (Whitman BY and Accardo P 1987).

Στο ερώτημα αν θα μπορούσε η παχυσαρκία να θεωρηθεί "γενετική" ασθένεια σε ορισμένες περιπτώσεις η απάντηση φαίνεται πως είναι ναι, όπως στην περίπτωση μονογονιδιακών μεταλλάξεων οι οποίες ευθύνονται για την έλλειψη ενζύμων που επηρεάζουν την ενεργειακή ισορροπία. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, όμως, φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση γονότυπου - περιβάλλοντος, η οποία συγκλίνει προς τη συσσώρευση λίπους στο σώμα.

(Rosenbaum M and Leibel RL 1998).

1.1.5 Β) Επίδραση του περιβάλλοντος στην παιδική παχυσαρκία

Οι γενετικοί παράγοντες δεν μπορούν να εξηγήσουν εξολοκλήρου το τεράστιο πρόβλημα της παχυσαρκίας. Φαίνεται λοιπόν ότι στους περισσότερους ανθρώπους, η παχυσαρκία είναι ένα αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης της εξέλιξης του περιβάλλοντος με τον γονότυπο (Rosenbaum M and Leibel RL 1998).

Ο όρος περιβάλλον είναι πολύ ευρύς και περιλαμβάνει α) το ευρύτερο κοινωνικό, δημογραφικό, οικονομικό, πολιτισμικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσεται ένα παιδί και β) το οικογενειακό περιβάλλον (γονική επίδραση, διαθεσιμότητα τροφίμων στο σπίτι). Οι παραπάνω παράγοντες ωστόσο επιδρούν έμμεσα στην παιδική παχυσαρκία, καθώς καθορίζουν τις συμπεριφορές των παιδιών γύρω από το φαγητό, την άσκηση, και τις γενικότερες δραστηριότητες. Παρακάτω θα αναφερθούμε εκτενέστερα σε αυτούς τους παράγοντες.

1. Κοινωνικό περιβάλλον

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η επίπτωση της παχυσαρκίας στον παιδικό πληθυσμό διαφοροποιείται ανάμεσα σε παιδιά διαφορετικής χώρας, φυλής, και γειτονίας. Κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες φαίνεται ότι καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την διακύμανση αυτή. Στον αναπτυγμένο κόσμο η παιδική παχυσαρκία συνδέεται αντιστρόφως με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση με τις πιο μειονεκτικές ομάδες να διατρέχουν το μέγιστο κίνδυνο, ενώ αντίθετα, στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες τα πλουσιότερα παιδιά εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο παχυσαρκίας. Μία εξήγηση αυτού είναι οι διαφορετικές πεποιθήσεις γύρω από την θεώρηση του «ωραίου», αλλά και ο διαφορετικότητας στον τρόπο έκφρασης της κοινωνικής ευημερίας (Reilly JJ 2005). Από την άλλη πλευρά, η πολιτεία έχει ένα μεγάλο μερίδιο ευθύνης. Πολλοί κοινωνικοί φορείς όπως σχολεία, και φορείς δημόσιας υγείας, επηρεάζουν την συμπεριφορά των παιδιών απέναντι στην διατροφή και την άσκηση. Η εφαρμογή προγραμμάτων προώθησης της δημόσιας υγείας, όπως το πρόγραμμα της δωρεάν παροχής πρωινού στα σχολεία που εφαρμόστηκε στην Αμερική (Crepinsek MK et al, 2006), ή εφαρμογή προγραμμάτων προώθησης της φυσικής δραστηριότητας (Reilly JJ and McDowell ZC) αποτελούν παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο η κοινωνία μπορεί να συμβάλλει στη μείωση του φαινομένου της παχυσαρκίας.

Σύμφωνα με το οικολογικό μοντέλο συμπεριφοράς, η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής είναι μία εξελικτική διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε πολυδιάστατο επίπεδο στο οποίο αλληλεπιδρούν διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, πολιτιστικοί κοινωνικοί ψυχολογικοί οικονομικοί ηθικοί (French SA et al 2003, Rennie KL et al 2005) πριν και μετά την γέννηση του ανθρώπου. Μία πληθώρα κοινωνικών αλλαγών, μεταξύ των οποίων η αλλαγή του τρόπου ζωής και των διατροφικών συνηθειών, η μείωση της φυσικής δραστηριότητας, η επίδραση της διαφήμισης, η μεγάλη προσφορά χαμηλής ποιότητας γρήγορου φαγητού, οδηγούν σε αύξηση της επίπτωσης της παχυσαρκίας.

2. Οικογενειακό περιβάλλον

Η πιο σημαντική ίσως παράμετρος στο περιβάλλον των μικρών παιδιών είναι η οικογένεια και οι συμπεριφορές των γονιών με ιδιαίτερη σημασία στη συμπεριφορά της μητέρας, καθώς είναι αυτή που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τόσο άμεσα όσο και έμμεσα τις συμπεριφορές των παιδιών (Cooke 2004).

Κατά την ενδομήτριο ζωή η μητέρα είναι αυτή που διαμορφώνει το ενδομήτριο περιβάλλον. Τα έμβρυα διαβητικών μητέρων είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο μπορεί να επιδράσει ο ενδομήτριος υπερσιτισμός στη μετέπειτα λιπογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία ΣΔ (οφειλόμενο σε παχυσαρκία) της μητέρας και στην εμφάνιση παχυσαρκίας κατά την παιδική ηλικία (Rosenbaum M and Leibel RL 1998). Από την άλλη πλευρά ο ενδομήτριος υποσιτισμός, έχει φανεί ότι οδηγεί σε προσαρμοστικές αλλαγές στο ενδοκρινικό σύστημα του εμβρύου με αποτέλεσμα τον κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου στη ενήλικη ζωή (Ismail-Beigi F et al 2006).

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με ευρήματα επιδημιολογικών ερευνών από πολλές χώρες που δείχνουν η παχυσαρκία των γονέων σχετίζεται με εμφάνιση παχυσαρκίας στο παιδί. Μάλιστα ο ΔΜΣ του παιδιού σχετίζεται περισσότερο με το ΔΜΣ της μητέρας παρά με του πατέρα. Πίσω από τον μηχανισμό αυτόν βρίσκονται ποικίλες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο περιβάλλον και την κληρονομικότητα (Wu Q and Suzuki M 2006). Μετά τη γέννηση, η γονείς δεν λειτουργούν μόνο ως πρότυπα για το παιδί αλλά κατά την πρώιμη παιδική ηλικία είναι και αυτοί που καθορίζουν τις διατροφικές επιλογές των παιδιών. Μία ανασκόπηση των 58 ερευνών που αξιολόγησε ποικίλους παράγοντες που αφορούν το περιβάλλον της οικογένειας έδειξε ότι η μόρφωση και η διατροφική πρόσληψη των γονέων

σχετίζονται σημαντικά και θετικά με την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών από τα παιδιά (van der Horst K et al 2007). Μάλιστα πολλές είναι οι έρευνες που έχουν δείξει ότι το οικογενειακό γεύμα σχετίζεται με ένα καλύτερο διατροφικό προφίλ από τα παιδιά (αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ασβεστίου, σιδήρου, βιταμίνης A & C (Patrick H and Nicklas TA 2005). Όσον αφορά τις στάσεις και τις συμπεριφορές των γονιών φάνηκε ότι η περιοριστική συμπεριφορά από τους γονείς σχετίζεται με αυξημένη κατανάλωση και αυξημένο ΔΜΣ του παιδιού (Faith MS et al 2004).

3. Τηλεόραση

Η τηλεόραση αποτελεί ένα από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζει την παιδική παχυσαρκία με τρεις τρόπους:

- 1) Αποτελεί μία συνήθεια που έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα του οικογενειακού γεύματος αφού πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρακολούθηση τηλεόρασης μειώνει την ποιότητα του οικογενειακού γεύματος και αυξάνει τη συχνότητα κατανάλωσης σνακ χαμηλής ποιότητας (Campbell KJ et al 2006, Patrick H and Nicklas TA 2005)
- 2) Μειώνει τις ώρες δραστηριότητας και αυξάνει την καθιστική ζωή και πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τις ώρες τηλεθέασης με την εμφάνιση του υπέρβαρου στα παιδιά (Zizza C et al 2001)
- 3) Μέσω της διαφήμισης προωθεί την κατανάλωση χαμηλής ποιότητας φαγητού. Μία πρόσφατη ανασκόπηση της επίδρασης της τηλεόρασης στην παιδική παχυσαρκία, έδειξε ότι υπάρχει μία σημαντική σχέση ανάμεσα στο ποσοστό του υπέρβαρου και στον αριθμό των διαφημίσεων ανά ώρα στην τηλεόραση, ειδικά εκείνων που ενθαρρύνουν την κατανάλωση ενεργειακά-πυκνών, και χαμηλής ποιότητας τροφών (Lobstein T and Dobb S 2005.)

4. Διατροφή

Μικροθρεπτικά συστατικά και ενέργεια

Ένα βασικό ερώτημα που τίθεται είναι: «Υπάρχει καμιά διαφορά στην ενεργειακή πρόσληψη ανάμεσα σε μη παχύσαρκα και παχύσαρκα παιδιά;». Συχνά γίνεται η υπόθεση ότι τα υπέρβαρα παιδιά τρώνε περισσότερο από τους μη υπέρβαρους συνομηλίκους τους. Όμως, στην πραγματικότητα αυτή η υπόθεση σπάνια επιβεβαιώνεται. Πιο συγκεκριμένα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 181 Καναδούς, ηλικίας 4-16 ετών, έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ παιδικής παχυσαρκίας και διαιτητικής ενεργειακής πρόσληψης (Gillis LJ et al 2002). Αντίθετα, άλλες παρόμοιες μελέτες έχουν δείξει ότι η συνολική ενεργειακή πρόσληψη δε σχετίζεται με την σύσταση σώματος ή το σωματικό λίπος (Guillaume M et al 1998, Atkin LM

and Davies PS 2000, McGloin AF et al 2002). Ακόμη, σε μια μελέτη που περιλάμβανε 4408 παιδιά και εφήβους (3-19 ετών) από στοιχεία του USDA CSFII 1994-1996 και 1998, βρέθηκε ότι στο τελικό δείγμα η ενεργειακή πρόσληψη είχε θετική συσχέτιση με το εκατοστημόριο για το ΔΜΣ σε αγόρια 6-11 ετών και σε παιδιά 12-19 ετών. Όμως, στην ίδια μελέτη, δεν βρέθηκε καμία αντίστοιχη σχέση σε παιδιά 3-5 χρόνων και κορίτσια 6-11 χρόνων (Huang TK et al 2004).

Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν προκύψει από επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες υπόκειται σε διάφορους περιορισμούς. Όταν η συνολική ενεργειακή πρόσληψη δεν έχει σχέση ή συσχετίζεται αντίστροφα με το σωματικό λίπος, τότε προκύπτουν διάφορες πιθανές ερμηνείες για να εξηγήσουν αυτά τα αποτελέσματα: (α) τα παχύσαρκα παιδιά πιθανά τρώνε περισσότερο από τα μη παχύσαρκα αλλά η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κατανάλωσης φαγητού αδυνατεί να εντοπίσει αυτές τις διαφορές, (β) τα παιδιά που βρίσκονται σε κίνδυνο υπέρβαρου, προτού γίνουν παχύσαρκα έτρωγαν πιο πολύ από τα φυσιολογικού βάρους παιδιά αλλά αφότου έγιναν παχύσαρκα σταμάτησαν να συμπεριφέρονται έτσι, (γ) τα παχύσαρκα παιδιά είτε συνειδητά είτε ασυνείδητα έχουν την τάση να υποκαταγράφουν τη διαιτητική τους πρόσληψη (Bandini LG et al 1990, Livingstone MBE et al 1992), και τέλος, (δ) μερικά παχύσαρκα παιδιά συχνά ακολουθούν ήδη κάποιο διαιτολογικό πρόγραμμα ελέγχου του βάρους τους, ή τρώνε λιγότερο υπακούοντας σε σχετική προτροπή από την οικογένεια ή το γιατρό τους. Συμπερασματικά, λοιπόν, τα αποτελέσματα των εκάστοτε επιδημιολογικών μελετών αναφορικά με την ενεργειακή πρόσληψη και την παιδική παχυσαρκία ίσως να μη θεωρούνται αξιόπιστα, ενώ, αντίθετα, μπορεί να επηρεάζονται από συγχυτικούς παράγοντες που σχετίζονται με το υπέρβαρο ή/και με μεθοδολογικά σφάλματα.

Ένα άλλο ερώτημα που συχνά τίθεται είναι αν υπάρχουν συγκεκριμένα μακροθρεπτικά συστατικά της διατροφής που μπορεί να έχουν σχέση με το υπέρβαρο σε παιδιά και εφήβους. Τα μακροθρεπτικά συστατικά της τροφής επιδρούν στο ενεργειακό ισοζύγιο καθώς επηρεάζουν το αίσθημα κορεσμού, την πείνα, την αποδοχή του φαγητού και το μεταβολισμό. Αυτές οι επιμέρους σχέσεις βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς (Rodriguez G & Moreno LA 2006):

- Ο Η ικανότητα κορεσμού των μακροθρεπτικών συστατικών και οι επιδράσεις του μέγιστου δυνατού όγκου τείνουν να προωθούν ή να εμποδίζουν την ενεργειακή πρόσληψη.

- Η ενεργειακή πυκνότητα, η οποία εξαρτάται κυρίως από την υψηλή ή χαμηλή σύσταση της δίαιτας σε λίπος, επηρεάζει την ευληπτότητα και συνεπώς την ποσότητα του φαγητού που καταναλώνεται.
- Τα επιμέρους μακροθρεπτικά συστατικά έχουν διαφορετικό μεταγευματικό μεταβολισμό και επακόλουθα, ξεχωριστή επίδραση στην ενεργειακή δαπάνη λόγω διαφορετικής θερμογένεσης που προκαλεί το καθένα.
- Η σύσταση της τροφής επηρεάζει τη μεταβολική ικανότητα του οργανισμού να αποθηκεύει λίπος και συνεπώς τα ενεργειακά αποθέματα.

Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παραπάνω μηχανισμούς, είναι εύκολο να συμπεράνουμε ότι η υπερκατανάλωση τροφών με υψηλή ενεργειακή πυκνότητα και σύσταση σε λίπος μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της καθημερινής ενεργειακής πρόσληψης και ακολούθως, διαταραχές στο ισοζύγιο ενέργειας.

Όπως παρατηρήθηκε και με την ενεργειακή πρόσληψη, οι μελέτες παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση της σύστασης της δίαιτας στο σωματικό λίπος. Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες σε παιδιά και εφήβους ελέγχοντας για το φύλο, την ενεργειακή δαπάνη, την ενεργειακή πρόσληψη και τη σύσταση σώματος, έχουν δείξει ότι στους παχύσαρκους η προσλαμβανόμενη ενέργεια προέρχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από λίπος και σε λιγότερο από υδατάνθρακες συγκριτικά με τους φυσιολογικού βάρους συνομηλίκους τους (Guillaume et al 1998, McGloin AF et al 2002). Στον αντίποδα των παραπάνω μελετών συναντάμε ένα σημαντικό αριθμό άλλων οι οποίες δεν βρήκαν καμία σχέση ανάμεσα στα ποσοστά ενεργειακής πρόσληψης από μακροθρεπτικά συστατικά και στο σωματικό λίπος (Atkin LM and Davies PS 2000, Maffei C et al 2000).

Το ενεργειακό ισοζύγιο ρυθμίζεται από πλήθος ορμονικών και μεταβολικών διεργασιών. Διακυμάνσεις σε οποιοδήποτε συστατικό ή καθοριστικό φυσιολογικό παράγοντα του ισοζυγίου εξισορροπούνται με άλλες αλλαγές που μεταβάλλουν την ενεργειακή κατανάλωση ή πρόσληψη προκειμένου να αποκατασταθεί ξανά ισορροπία. Ακόμη, υπάρχει έντονη δυσκολία να διατηρηθεί η σύσταση σώματος ενός ατόμου και είναι επίσης δύσκολο να μεταβληθεί με βραχύχρονες αλλαγές στην ενεργειακή κατανάλωση ή πρόσληψη. Από την άλλη πλευρά, μικρές αλλαγές στο ισοζύγιο ενέργειας που διατηρήθηκαν για μεγάλη χρονική περίοδο θα μπορούσαν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στη σύσταση σώματος και γι' αυτό, όταν υπάρχει μικρό αλλά θετικό ισοζύγιο ενέργειας για μεγάλο χρονικό διάστημα

μπορεί να επιφέρει την εμφάνιση υπέρβαρου.

Σχετικά με τους διαιτητικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση σώματος, οφείλουμε στο σημείο αυτό να αναλύσουμε αποτελέσματα που προέρχονται από προοπτικές μελέτες σε παιδιά και εφήβους πριν γίνουν υπέρβαροι και να αξιολογήσουμε αν τελικά η συνολική ποσότητα ενεργειακής πρόσληψης ή συγκεκριμένα μακροθρεπτικά συστατικά αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την ανάπτυξη παχυσαρκίας.

Έχουν γίνει μικρού και μέτριου χρόνου εργαστηριακές μελέτες, καθώς επίσης και μεγάλου χρόνου προοπτικές μελέτες που βασίστηκαν σε διαφορετικές μεθοδολογίες αναφορικά με την επίδραση της σύστασης σώματος στην ενεργειακή πρόσληψη και την αύξηση σωματικού βάρους. Συμπεράσματα από τέτοιες μελέτες που αφορούσαν κυρίως ενήλικες, έδειξαν ότι σε σύντομο ή μέτριο χρονικό διάστημα: (α) οι εξισορροπητικές αντιδράσεις του οργανισμού που συμβαίνουν προκειμένου να ανταποκριθεί στην υπερβολική πρόσληψη τροφής δεν επαρκούν για να σταματήσουν την πείνα ή να καθυστερήσουν την πρόσληψη τροφής, (β) η ενεργειακή πυκνότητα θα μπορούσε να έχει σημαντικές «παθητικές» επιδράσεις στην ενεργειακή πρόσληψη, (γ) η ευληπτότητα των γευμάτων, η οποία σχετίζεται με τροφές με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο ίσως επηρεάζει την ενεργειακή πρόσληψη, (δ) απροσδόκητα, όταν η ενεργειακή πρόσληψη παραμένει σταθερή, η σύσταση της δίαιτας ασκεί μικρή επίδραση στο ισοζύγιο ενέργειας ή το σωματικό βάρος, (ε) η σημασία των τροφίμων από τα οποία αποτελείται η διαίτα έγκειται κυρίως στον τρόπο που επηρεάζουν τη διαιτητική συμπεριφορά παρά στις μεταβολικές διεργασίες καθαυτές. Για παράδειγμα, όταν ένα τρόφιμο είναι ιδιαίτερα εύγευστο (και υψηλού ενεργειακού περιεχομένου), τότε ευνοεί την κατανάλωση μεγαλύτερης ποσότητας τέτοιων τροφίμων (Mela DJ and Rogers PJ 1998).

Δεν υπάρχουν πολλές προοπτικές μελέτες σε παιδιά και εφήβους πάνω στις μεταβολές του σωματικού λίπους που εξαρτώνται από την ενεργειακή πρόσληψη ή τη σύσταση της δίαιτας κατά τη διάρκεια περιόδου παρακολούθησης (Maffei C et al 1998, Bogaert N et al 2003, Magarey AM et al 2003, Berkey CS et al 2000). Σε 10.769 Βορειοαμερικανούς εφήβους και παιδιά, ηλικίας 9-14 ετών, η αύξηση ενεργειακής πρόσληψης στη διάρκεια ενός χρόνου παρακολούθησης είχε θετική συσχέτιση με την αύξηση του ΔΜΣ (Berkey CS et al 2000). Αντίθετα, σημαντικές μελέτες σε μικρότερο δείγμα αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρακολούθησης (4-15 χρόνια) έχουν δείξει ότι η ενεργειακή πρόσληψη δεν σχετίζεται με αύξηση του σωματικού βάρους (Maffei C et al 1998, Bogaert N et al 2003).

Μια προοπτική μελέτη που χρησιμοποίησε δεδομένα από την ANS (Adelaide Nutrition Study) σε συνολικό δείγμα 243 ατόμων με παρακολούθησή τους από τη γέννηση μέχρι τα 15 έτη είχε τα εξής αποτελέσματα: (α) Δεν βρέθηκε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ΔΜΣ ή δερματοπτυχής τρικέφαλου (TC) και οποιουδήποτε μακροθρεπτικού συστατικού. (β) Υπήρξε όμως στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη λίπους και την κοιλιακή δερματική πτυχή και επίσης, στατιστικά σημαντική αρνητική σχέση μεταξύ της πρόσληψης υδατανθράκων και της ίδιας δερματοπτυχής (Magarey AM et al 2001). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι στην παραπάνω μελέτη δεν έγινε έλεγχος για την ενεργειακή κατανάλωση και επιπλέον, πιθανά να υπήρξαν προβλήματα ανακρίβειας ως προς την καταγραφή της πρόσληψης και τη χρήση δερματοπτυχών για τον προσδιορισμό του σωματικού λίπους. Όσον αφορά στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και τη σύσταση της διαίτας στα παιδιά. Προοπτικές μελέτες δεν έχουν δείξει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό πρόσληψης κάποιου μακροθρεπτικού και την αύξηση σωματικού βάρους. Επίσης, μεταβολές στη σύσταση σώματος δεν έχουν συσχετιστεί με ανάλογη πρόσληψη κάποιου μακροθρεπτικού συστατικού σε πιο μικρή ηλικία ή καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης (Maffei C et al 1998, Magarey AM et al 2003).

Ανακεφαλαιώνοντας, λοιπόν, η πλειονότητα των μελετών που σχεδιάστηκαν με σκοπό να διερευνήσουν την υπόθεση ότι το υπέρβαρο σχετίζεται με υπέρμετρη ενεργειακή πρόσληψη ή με σύσταση διαίτας δεν κατόρθωσαν να φτάσουν σε ομοφωνία ως προς τα αποτελέσματά τους. Ίσως τέτοιες έρευνες είτε αδυνατούν να ανιχνεύσουν διαφορές που σχετίζονται με τη διαιτητική πρόσληψη ανάμεσα στα άτομα που βρίσκονται σε κίνδυνο για παχυσαρκία και σε όμοιά τους φυσιολογικού βάρους, ή, απλά δεν υπάρχουν διαφορές. Προκειμένου, λοιπόν, να αξιολογήσουμε τους διατροφικούς παράγοντες που συνδέονται με την παιδική παχυσαρκία, αντί να εξετάζουμε μόνο τη σύσταση της διαίτας σε τρόφιμα, θα πρέπει να εστιάσουμε και στις ομάδες τροφίμων και τις διαιτητικές συνήθειες και συμπεριφορές.

1.1.6 Η ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ ΩΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η παχυσαρκία σχετίζεται με συστηματική φλεγμονή (Nanji AA et al 1985) όπως φαίνεται από μελέτες οι οποίες αναφέρουν τη συσχέτιση του ΔΜΣ και της σπλαχνικής παχυσαρκίας με τα επίπεδα κυτοκινών και αντιδρώντων οξειάς φάσης (acute-phase reactants) στην κυκλοφορία (Das UN et al 2001, Sbarbati A et al 2006). Παρόλο που το ήπαρ συμμετέχει στη συστηματική φλεγμονή της παχυσαρκίας, σε αντίθεση με την κλασσική φλεγμονώδη απάντηση, το κύριο όργανο- ρυθμιστής της φλεγμονής φαίνεται να είναι ο λιπώδης ιστός.

Ένας αριθμός κυτοκινών που μεσολαβούν τη φλεγμονή παράγονται από το λιπώδη ιστό. Τα λιποκύτταρα παράγουν ρυθμιστικούς παράγοντες-κλειδιά συμπεριλαμβανομένης της λεπτίνης, των κυτοκινών, και μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα. Μέσω αυτών των μεσολαβητών τα λιποκύτταρα αλληλεπιδρούν με τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα (Mohamed-Ali V et al 1998). Με την ωρίμανση του προ-λιποκυττάρου αυτό αποκτά δράσεις παρόμοιες με αυτές των μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να ξεκινούν την έκκριση ενός καταρράκτη κυτοκινών και αντιδρώντων οξείας φάσης (Berg AH et al 2005). Από την άλλη, το αυξημένο μέγεθος των λιποκυττάρων στην παχυσαρκία οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεσολαβητών και απορυθμίζει τα φυσιολογικά ρυθμιστικά μονοπάτια που οδηγούν σε χρόνια συστηματική φλεγμονή (McPherson R et al 2003).

Από ότι φαίνεται, δεν είναι όλο το λίπος σώματος εξίσου ενεργό στη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση στην παχυσαρκία. Η κοιλιακή παχυσαρκία όπως εκτιμάται από την περιφέρεια μέσης φαίνεται να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ινσουλινοαντίσταση και την καρδιαγγειακή νόσο (Berg AH et al 2005)). Το σπλαχνικό λίπος εκκρίνει περισσότερες κυτοκίνες (π.χ. IL-6 and TNF-a) και πρωτεΐνες οξείας φάσης (CRP) από ότι τα αποθέματα υποδόριου λίπους. Παράλληλα άτομα με μεγαλύτερο ποσοστό του λίπους τους ως σπλαχνικό λίπος έχουν υψηλότερα επίπεδα κυτοκινών και αντιδρώντων οξείας φάσης από ότι τα άτομα με μεγαλύτερο ποσοστό υποδόριου λίπους. Επομένως, ενώ όλο το λίπος είναι μεταβολικά ενεργό το σπλαχνικό είναι ξεκάθαρα πιο σημαντικό στην ανάπτυξη φλεγμονής

Υπάρχουν δεδομένα για τα παχύσαρκα παιδιά όλων των ηλικιών ότι βρίσκονται σε χαμηλού βαθμού φλεγμονώδη κατάσταση κι ότι ακόμα και τα πολύ νεαρά παιδιά δεν διαφέρουν από τους ενήλικες όσο αφορά στη φλεγμονή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο βαθμός φλεγμονής, όπως μετριέται από τα αντιδρώντα οξείας φάσης και τις κυτοκίνες, σχετίζεται με την παρουσία συγγενών καταστάσεων με την παχυσαρκία όπως η ινσουλινοαντίσταση, η δυσλιπιδαιμία, το λιπώδες ήπαρ, και η αθηροσκλήρυνση. Άμεσα κλινικά δεδομένα προτείνουν έναν αιτιολογικό ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια ορισμένων νοσημάτων, ειδικά της αθηροσκλήρυνσης και της ινσουλινοαντίστασης (Schwarzenberg SJ et al 2007).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παχυσαρκία πλέον αναγνωρίζεται ως φλεγμονώδης κατάσταση γι' αυτό και στη συγκεκριμένη μελέτη εκτός των διατροφικών παραγόντων, θα

ασχοληθούμε και με 3 πολυμορφισμούς γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, οι οποίοι και αναφέρονται εκτενώς στις επόμενες ενότητες.

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου- άλφα (Tumor Necrosis Factor-alpha –TNFα) είναι μια πολυλειτουργική προφλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα/ μακροφάγα κι έχει επιδράσεις στο μεταβολισμό των λιπιδίων, την πήξη, την ινσουλिनoαντίσταση και την ενδοθηλιακή λειτουργία. Ο TNFα αρχικά αναγνωρίστηκε στον ορό ποντικών μετά από έγχυση μυκοβακτηριδίου και συγκεκριμένα *Mycobacterium bovis* και ενδοτοξίνης. Ο ορός των ζώων παρήγαγε αιμορραγική νέκρωση και σε μερικές περιπτώσεις και πλήρη αναστροφή κάποιων μεταμοσχευμένων όγκων (Shirai et al 1985, Pennica et al 1984) .

Παράλληλα, οι Kawasaki και Cerami αναγνώρισαν ένα μόριο υπεύθυνο για το σύνδρομο απίσχανσης, το οποίο εμφανίζεται σε πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Το μόριο αυτό ονομάστηκε καχεκτίνη, καθώς θεωρήθηκε υπεύθυνο για την επαγωγή της καχεξίας. Αργότερα, ταυτοποιήθηκε ότι η καχεκτίνη και ο TNFα είναι το ίδιο ακριβώς μόριο (Josep AM et al 1997).

Εκτός από τον TNFα, υπάρχει και ο TNFβ, που είναι επίσης γνωστός και ως Λεμφοτοξίνη α (Lta) και ο όρος TNF χρησιμοποιείται και για τις δύο πρωτεΐνες (Idriss TH et al 2000).

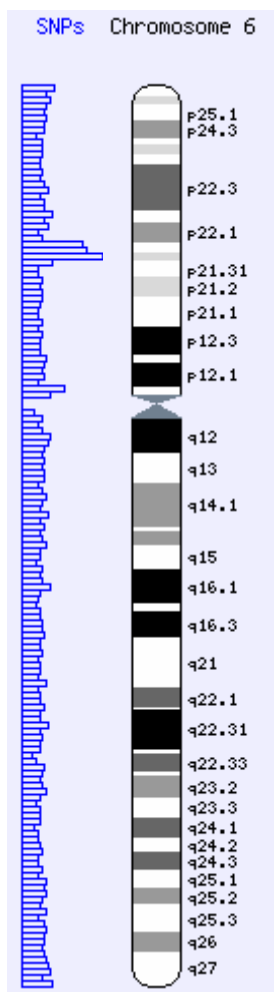
Η απομόνωση και η ταυτοποίηση του TNFα και TNFβ έθεσαν τα θεμέλια για την εύρεση μιας πολύ μεγαλύτερης οικογένειας κυτοκινών, η οποία πλέον ονομάζεται TNF υπεροικογένεια. Ο TNFα είναι το πρώτο μέλος αυτής της υπερ-οικογένειας ([www.infobiogen.fr/ services/chromcancer/Genes/TNFaIS319. html](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS319.html)). Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TNF ενεργοποιούν οδούς παραγωγής σημάτων που σχετίζονται με την επιβίωση, τον θάνατο και την διαφοροποίηση των κυττάρων (Ware CF 2003). Η υπερ-οικογένεια αυτή περιλαμβάνει συνολικά 19 διαφορετικά μέλη, τα οποία εμφανίζουν 15-25% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων. Τα πιο γνωστά είναι ο TNFα ή καχεκτίνη, ο TNFβ ή Λεμφοτοξίνη α και ο TNFC ή Λεμφοτοξίνη β. Όλα τα μέλη επιδεικνύουν μια εξελικτική διατήρηση στις ακολουθίες των αμινοξέων τους, πολλές από τις οποίες έχουν χαρακτηριστικά των μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου 2, με αποτέλεσμα να υπάρχει η υπόθεση ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής μπορεί να προέρχονται από το ίδιο προγονικό γονίδιο. Εκτός από τον TNFβ και τον TNFC, που μπορεί να σχηματίσουν είτε ομοτριμερή είτε ετεοτριμερή, η ενεργή μορφή όλων των υπόλοιπων μελών είναι ομοτριμερής ([www. infobiogen. fr/ services / chromcancer/ Genes / TNFaIS319.html](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS319.html)).

1.2.2 ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ TNF α

Το ανθρώπινο γονίδιο για το TNF α , βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στη θέση 6p21.3 (Nedwin et al 1985), όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.2.1, και κωδικοποιεί για μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 157 αμινοξέων η οποία συνοδεύεται από μια πρόδρομη αλληλουχία 233 αμινοξέων (Beutler B et al 1986). Είναι στενά συνδεδεμένο με την περιοχή στην οποία εντοπίζονται τα γονίδια του Μείζονου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC). Συγκεκριμένα εξαπλώνεται στην περιοχή τάξης III, ανάμεσα στα γονίδια που κωδικοποιούν το MHC τάξης II και το ανθρώπινο αντιγόνο των λευκοκυττάρων (HLA) (Nedwin et al 1985, Ragoussis et al 1988).

Το TNF α είναι πάντα 3'ως προς το γονίδιο του TNF β και βρίσκεται περίπου 3kb μακριά. Αποτελείται από 4 εξόνια και εκτείνεται σε μήκος 3 kb στο γενωμικό DNA, ενώ διακόπτεται από 3 εσώνια. Περισσότερο από 80% της ώριμης αλληλουχίας του TNF κωδικοποιείται από το τέταρτο εξόνιο (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim). Όσο αφορά στον TNF α , το γονίδιο φαίνεται να ρυθμίζεται σε μεταφραστικό επίπεδο από την 3'αμετάφραστη περιοχή η οποία είναι πλούσια σε ουριδιλικό οξύ. Στον άνθρωπο, το mRNA κωδικοποιεί για ένα προϊόν 157 αμινοξέων ενώ στο ποντίκι για 156 αμινοξέα (Idriss TH et al 2000).

Τα γονίδια του TNF α και TNF β έχουν παρόμοιες δομές και συγκεκριμένα καλύπτουν περίπου 3 kb, περιλαμβάνουν 3 εσώνια ενώ μόνο τα τελευταία εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν για περισσότερο από το 80% της εκκρινόμενης πρωτεΐνης είναι σημαντικά ομόλογα (56%) (Hajeer AJ et al 2001).



Εικόνα 1.2.1. Ανθρώπινο χρωμόσωμα 6 και θέση γονιδίου TNF

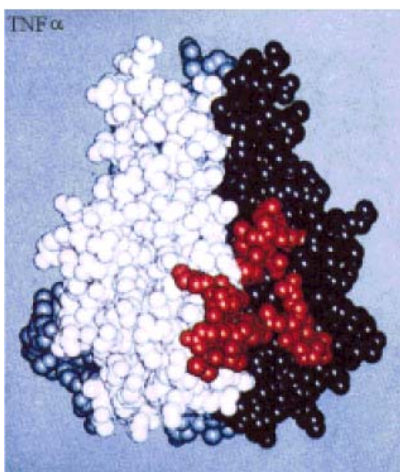
1.2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ

Ο TNF α εμφανίζεται με διαλυτή και με διαμεμβρανική μορφή. Αρχικά παράγεται σαν προ-ορμόνη 233 αμινοξέων με μοριακό βάρος 25kDa η οποία αγκιστρώνεται στην κυτταρική μεμβράνη. Πρόκειται για μια τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη, δηλαδή το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται εντός του κυττάρου και το καρβοξυτελικό άκρο στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης, στην οποία τα αμινοξικά κατάλοιπα -44 μέχρι -26 της προαλληλουχίας του TNF α αποτελούν την υδρόφοβη μεμβρανική περιοχή και τα κατάλοιπα -76 μέχρι -50 αποτελούν την ενδοκυτοπλασματική περοχή. Τα πρώτα 76 αμινοξέα αποτελούν μια αλληλουχία υψηλά διατηρούμενη που φαίνεται να συμβάλλει στο να αγκυροβολήσει το πρόδρομο πολυπεπτίδιο στη μεμβράνη. Τα αμινοξέα αυτά αποκόπτονται πρωτεολυτικά από ένα ένζυμο δεσμευμένο στη μεμβράνη που καλείται TNF α κονβερτάση (TNF α Convertase, TACE) για να παραχθεί η ώριμη μορφή του μορίου που αποτελείται από 157 αμινοξικά κατάλοιπα (διαλυτή μορφή). Ο TNF α κυκλοφορεί τελικά ως ένα σταθερό τριμέρες 17 kDa, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.2.2, και στα διαλύματα υπάρχει σαν ομοτριμέρες συνολικού μοριακού βάρους 51 kDa κι είναι

αυτή η μορφή που δεσμεύεται στους υποδοχείς (Idriss TH et al 2001, [www. infobiogen.fr /services/ chromcancer / Genes/ TNFaIS 319](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS319)).

Το κάθε μονομερές της οποίας έχει μήκος 60 Å και πλάτος 30 Å και φέρει χαρακτηριστικές δομές β πτυχωτής επιφάνειας ([www. infobiogen.fr /services /chromcancer/ Genes/ TNFaIS 319](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS319)) .

Σε απάντηση σε μια ευρεία ποικιλία ερεθισμάτων προερχόμενων από μόλυνση ή φλεγμονή (π.χ. λιποπολυσακχαρίδια, ιοί, μυκητιακά- μυκητιασικά ή παρασιτικά αντιγόνα, Ιντερλευκίνη-1), αυξάνεται η μεταγραφή αλλά και η μετάφραση του πρόδρομου TNFα και μεγάλες ποσότητες ώριμης πρωτεΐνης απελευθερώνονται γρήγορα στην κυκλοφορία. Παρόλ'αυτά, δεν απελευθερώνεται όλος ο παραγόμενος TNFα αφού ένα ποσοστό του παραμένει στη διαμεμβρανική μορφή (Feldman A et al 2000).



Εικόνα 1.2.2: Τριμερές TNFα

1.2.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ TNFα

Ο TNFα αμέσως μετά την έκκρισή του από το κύτταρο αλληλεπιδρά με έναν από τους δύο υποδοχείς του, έναν υψηλής συγγένειας υποδοχέα 55 kDa που ονομάζεται TNFR1 και έναν χαμηλής συγγένειας υποδοχέα που ονομάζεται TNFR2. Στους ανθρώπους ο TNFR1 αποτελείται από 434 αμινοξέα και ο TNFR2 περιλαμβάνει 439 κατάλοιπα (Pfeffer K 2003) . Παρουσιάζουν ομολογία στην εξωκυτταρική περιοχή ενώ δεν έχει φανεί να υπάρχει καμία ομολογία στις ενδοκυτταρικές περιοχές των δύο υποδοχέων, γεγονός που δηλώνει ότι οι δύο υποδοχείς ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταβίβασης σημάτων (Idriss TH et al 2000). Οι δύο τύποι υποδοχέων βρίσκονται ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα του σώματος με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα και τα μη ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα ενώ ορισμένοι τύποι

κυττάρων εκφράζουν μόνο τον TNFR1 (Idriss TH et al 2000, www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim).

Ο TNFR2 έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον TNFα και φαίνεται να προσδένει το μόριό του καλύτερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτός ο υποδοχέας φαίνεται να μεταβιβάζει σήματα για τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και για τις προφλεγμονώδεις απαντήσεις. Αντίθετα ο υποδοχέας TNFR1 απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις TNFα και μεταβιβάζει σήματα για τον κυτταρικό θάνατο μέσω κυτταροτοξικότητας ή απόπτωσης. Είναι επομένως προφανές ότι η ποσότητα του παραγόμενου TNFα έχει επίπτωση στο είδος της ανοσολογικής απάντησης που προκαλείται από λοίμωξη ή ιστική βλάβη (Idriss TH et al 2000, www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim).

Και οι 2 υποδοχείς του TNFα μπορούν να απελευθερωθούν μέσω πρωτεόλυσης από την κυτταρική επιφάνεια και να σχηματίσουν διαλυτά μόρια. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα των υποδοχέων είναι αυξημένα σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως σήψη, καρκίνος, αυτοάνοσες νόσοι, πυρετός, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και παχυσαρκία (Sethi K et al 1999).

1.2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Ο TNFα, όπως προαναφέρθηκε, ασκεί τις δράσεις του με πρόσδεσή του ως τριμερές σε υψηλής συγγένειας υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στις μεμβράνες των περισσότερων κυττάρων. Μετά την πρόσδεσή του στον υποδοχέα, ενεργοποιείται μεγάλος αριθμός δευτερευόντων πρωτεϊνών οι οποίες προκαλούν ποικιλία απαντήσεων μέσα στα κύτταρα όπως ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων και/ή την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου ή ριζών αζώτου. Στις πρωτεΐνες τις οποίες ενεργοποιεί περιλαμβάνονται G πρωτεΐνες, μεταγραφικοί παράγοντες (π.χ. NF-κβ, AP-1), κινάσες των πρωτεϊνών (π.χ. CKII, erk-1, erk-2 και MAP2), φωσφολιπάσες (π.χ. PLA2, PLC, PLD και σφιγκομυελινάση), μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αλλά και πρωτεάσες σερίνης και μυελίνης.

Το τριμερές του TNFα υφίσταται σε σχετικά χαμηλό pH και απουσία του υποδοχέα αλλάζει διαμόρφωση η οποία του επιτρέπει να σχηματίσει ένα λειτουργικό κανάλι ιόντων. Από το γεγονός αυτό διαφαίνεται ότι το μόριο του TNFα εκτελεί πολλές περίπλοκες και διαφορετικές μεταξύ τους λειτουργίες (Hajeer AJ et al 2001).

1.2.6 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Ο TNFα είναι πλειοτροπικός, δηλαδή μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια εξέλιξης μιας φλεγμονής. Έτσι εκτός από την φλεγμονώδη δράση του έχει και κατασταλτική δράση στην αυτοανοσοποίηση (Ivashkin BL 2003).

Τέλος όπως όλες οι κυτοκίνες μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ενώ προκαλεί άμεσα ή έμμεσα και οξειδωτικό στρες ή οξείδωση λιπιδίων, φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (Wang XL and Oosterhof J 2000).

Οι βιολογικές δράσεις του TNFα ποικίλλουν και σχετίζονται άμεσα με τη συγκέντρωσή του αλλά και τη διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων σε αυτή την κυτοκίνη και συχνά έχουν και αντιφατικό χαρακτήρα (Hajeer AJ et al 2000), όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Αποτελεί ένα σημαντικό μεσολαβητή της φλεγμονής και του σηπτικού σοκ και οι επιδράσεις του θεωρούνται άλλοτε επιβλαβείς κι άλλοτε ωφέλιμες για το ξενιστή (Feldman A et al 2000). Σε απάντηση στην φλεγμονώδη διέγερση, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα εκκρίνουν TNFα που μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ή θάνατο κυττάρων διαφόρων τύπων (π.χ. καρκινικών) ή να ρυθμίσει την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδεις παθήσεις ([www. infobiogen.fr /services /chromcancer/ Genes/ TNFaIS](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS) 319, Ivashkin BL 2003). Συγκεκριμένα, προκαλεί την απελευθέρωση πρακτικά όλων των μεσολαβητών της φλεγμονής και καταστρέφει τον κενιστή επάγοντας και εντείνοντας, συχνά σε συνεργασία με την ιντερφερόνη-γ , την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, επάγει ταυτόχρονα και ένζυμα-εκκαθαριστές των ενεργών ριζών οξυγόνου και προστατευτικές ενώσεις όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Feldamn A et al 2000).

Έχει επίσης φανεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο μέσα από μια ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών (Feldman A et al 2000). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αυτές οι κυτοτοξικές επιδράσεις είναι σημαντικές στην άμυνα του ξενιστή προκαλώντας της ένατξη τόσο αντιογκογόνου διαδικασίας όσο και τη ρύθμιση της ανάπτυξης και τη διαφοροποίηση του κυττάρου (Ferrari R 1999). Όσο αφορά στη δράση του ως παράγοντα ανάπτυξης, παίζει ένα μείζονα ρόλο στην εμβρυογένεση αλλά και σε μια μεγάλη ποικιλία όγκων.

Από την άλλη, ο TNFα φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της αιματοποίησης. Επηρεάζει επίσης αρκετά ενδοκρινή όργανα, καταστέλλοντας την έκκριση προγεστερόνης και τεστοστερόνης και αυξάνει την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και αυξητικής ορμόνης (Ferrari R 1999).

Τέλος όπως όλες οι κυτοκίνες μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (Ivashkin BL 2003) ενώ προκαλεί άμεσα ή έμμεσα και οξειδωτικό στρες ή οξείδωση λιπιδίων (Li WX and Oosterhof J 2000) και είναι σημαντικός μεσολαβητής της ινσουλινοαντίστασης (Sethi KJ and Hotamisligil SG 1999, Boyle J et al 2003).

Όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα παρακάτω, έχει ένα σημαντικό ρόλο στην καχεξία και την παχυσαρκία.

1.2.6. A) TNFα και καχεξία

Αυξημένα επίπεδα TNFα έχουν βρεθεί στον ορό περίπου του 70% των ασθενών που πάσχουν από παρασιτικές λοιμώξεις και σηψαιμία, καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού καχεξία. Σε καταστάσεις καχεξίας, παρατηρείται μία 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 την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ενώ συνεργιστικά με την Ιντερλευκίνη -1 έχει φανεί να αναστέλλουν την μεταφορά γλυκόζης στα λιποκύτταρα και επομένως μειώνουν τα διαθέσιμα υποστρώματα για λιπογένεση. Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν την συμμετοχή του TNFα στην απώλεια αζώτου και επομένως μυϊκής πρωτεΐνης. Τέλος, ο TNFα μαζί με άλλες κυτοκίνες όπως η Ιντερλευκίνη - 1 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην θερμογένεση και επομένως την αύξηση του μεταβολικού ρυθμού (Argiles MJ et al 1997).

1.2.6.B) TNFα και παχυσαρκία

Ο ακριβής ρόλος του TNFα στην παχυσαρκία δεν είναι σαφώς καθορισμένος (Bronwen D et al 2002). Παρόλο που περί το 1970, προτάθηκε ότι ο TNFα έχει ένα πιθανό ρόλο στην καχεξία, μόλις το 1993 άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες θεωρίες συσχέτισης αυτής της κυτοκίνης με την παχυσαρκία. Ο TNFα είναι πιθανό να σχετίζεται είτε με την πρόσληψη, είτε με την κατανάλωση, είτε με την αποθήκευση ενέργειας (Argiles MJ et al 1997).

Ο TNFα ανήκει σε μία πολύπλοκη οικογένεια κυτοκινών που φαίνεται να έχει δραματικές επιδράσεις στην πρόσληψη τροφής. Η δράση του TNFα μπορεί να διαμεσολαβείται από την Ιντερλευκίνη-1, η οποία δρα στον υποθάλαμο μειώνοντας την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, ο TNFα έχει φανεί να επηρεάζει τα επίπεδα ορμονών, όπως είναι η γλυκαγόνη, η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, οι οποίες επίσης επηρεάζουν την πρόσληψη τροφής (Argiles MJ et al 1997).

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί μια σημαντική πηγή ενδογενούς παραγωγής του TNFα (Young UJ et al 2003). In vitro μελέτες σε παχύσαρκα τρωκτικά καθώς και σε παχύσαρκους ανθρώπους έχουν δείξει αυξημένη έκφραση του TNFα στον λιπώδη ιστό, γι' αυτό και αυτό το γονίδιο θεωρηθεί ως υποψήφιο γονίδιο για την παχυσαρκία (Norman RA et al 1995). Οι δράσεις του στον λιπώδη ιστό είναι πολλές και περιλαμβάνουν τη μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, τη μείωση της έκφρασης των μεταφορέων γλυκόζης GLUT4, και την αύξηση 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 δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι (Kern A et al 1995).

Ο TNFα ρυθμίζει επίσης την δράση της ινσουλίνης στα λιποκύτταρα με αποτέλεσμα να υπάρχει μία πιθανή διαφορά της ικανότητας αποθήκευσης λίπους κατά την διάρκεια της υπερινσουλιναιμίας. Κάποιοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNFα έχουν σχετιστεί με υψηλό αναπνευστικό πηλίκο, δηλαδή με υψηλά επίπεδα οξείδωσης γλυκόζης και σύνθεσης λιπιδίων κατά την υπερινσουλιναιμία. Επομένως, ο TNFα μπορεί να σχετίζεται με αποθήκευση λίπους κατά την υπερινσουλιναιμία αλλά και μακροπρόθεσμα με αύξηση βάρους (Pihlajamaki J et al 2003). Η αυξημένη έκφραση του TNFα στον λιπώδη ιστό στην παχυσαρκία φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με το επίπεδο της υπερινσουλιναιμίας (Hotamisligil S et al 1995).

Φαίνεται αρκετά παράδοξο το γεγονός ότι μία 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 TNFα στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού αξιολογούν κυρίως πολύ υψηλά επίπεδα της κυτοκίνης. Είναι λοιπόν πιθανό ο πραγματικός ρόλος του TNFα 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 το τελική ανταπόκριση του κυττάρου. Για παράδειγμα ο IGF-1 (insulin-like growth factor 1), μία κυτοκίνη που παράγεται στα λιποκύτταρα μπορεί να δρα ως παρακρινής παράγοντας για την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Το εάν ο IGF-1 θα διεγείρει την διαφοροποίηση ή τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων εξαρτάται από την παρουσία ή την απουσία άλλων παραγόντων όπως ο TNF α (Kras MK et al 2000).

1.2.7 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ TNF α

Πολυμορφισμοί που οφείλονται σε αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο [Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων των κυτοκινών έχουν συσχετιστεί με αυξημένη επιδεκτικότητα σε έναν αριθμό πολυπαραγοντικών ασθενειών (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον TNF α βρίσκεται στην περιοχή του MHC, η οποία είναι η πιο πολυμορφική περιοχή όλου του γονιδιώματος (Hajeer AJ et al 2000, Francis ES 1999). Πολλοί πολυμορφισμοί που οφείλονται σε αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) έχουν βρεθεί μέσα ή γύρω από το γονίδιο του TNF. Εξάλλου, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.2.1, η περιοχή γύρω από το γονίδιο του TNF εμφανίζει τους περισσότερους πολυμορφισμούς σε όλο το χρωμόσωμα 6.

Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί βρίσκονται στις αναρροϊκές πλευρές του γονιδίου και συγκεκριμένα στις παρακάτω θέσεις:

1. -1031
2. -863
3. -857
4. -851
5. -419
6. -376
7. -308
8. -238
9. -163
10. -49

Από αυτούς του πολυμορφισμούς, αυτοί στις θέσεις -419, -163 και -49 είναι σπάνιοι. Οι περισσότεροι από τους πολυμορφισμούς είναι αντικαταστάσεις της Γουανίνης (G) από Αδενίνη (A). Υπάρχουν εξαιρέσεις που αφορούν τον πολυμορφισμό -419 όπου γίνεται αντικατάσταση Γουανίνης από Κυτοσίνη, τον -851 όπου γίνεται αντικατάσταση Κυτοσίνης από Θυμίνη, τον -857 και τον -863 όπου γίνεται αντικατάσταση Κυτοσίνης από Αδενίνη και τον -1031 όπου γίνεται αντικατάσταση Θυμίνης από Κυτοσίνη. Τέλος, έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός σε μη μεταγραφόμενη περιοχή στην θέση +691, όπου υπάρχει απώλεια Γουανίνης (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim).

Πολλοί από τους πολυμορφισμούς στον γενετικό τόπο του TNF φαίνεται να σχετίζονται με διαφορές στην κυτταρική έκκριση του TNF α , όπως θα αναφερθεί και εκτενέστερα παρακάτω για τον πολυμορφισμό TNF α -308G>A.

1.2.8 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ TNF α -308 G>A

Ο πολυμορφισμός TNF α -308 G>A είναι ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του TNF α , στη θέση 308 και οφείλεται σε αντικατάσταση της Γουανίνης από Αδενίνη.

Ο πολυμορφισμός αυτός έχει φανεί να σχετίζεται με παχυσαρκία, υπερλεπτιναιμία, ινσουλινοαντίσταση και αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του TNF α (Scoog T et al 1999). Η ύπαρξη του A αλληλίου έχει επίσης σχετιστεί με αυξημένη παραγωγή TNF α σε καλλιέργειες κυττάρων ολικού αίματος με λιποπολυσακχαρίτες (Bronwen D et al 2002).

Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι αυξημένη μεταγραφική δράση του γονιδίου του TNF α πιθανότατα σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης και αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους (Alison MA et al 2003).

Επίσης, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών στον οποίο φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία και το ποσοστό σωματικού λίπους αν και ταυτόχρονα υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός μελετών με αντίθετα αποτελέσματα, όπως θα αναφερθεί και εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα.

1.2.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που έχει αξιολογήσει τη σχέση του πολυμορφισμού TNFα-308 G>A με την παχυσαρκία αλλά και με άλλα νοσήματα. Μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη είναι η μετα- ανάλυση των Sookoian και συνεργατών η οποία δημοσιεύτηκε το 2005. Σε αυτή τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFα-308 G>A με τους επιμέρους διαγνωστικούς παράγοντες του Μεταβολικού Συνδρόμου και συγκεκριμένα την υπέρταση, την ινσουλίνη νηστείας, τη γλυκόζη νηστείας, την ινσουλινοαντίσταση, την παχυσαρκία μέσω του ΔΜΣ και το πηλίκο περιφέρειας μέσης/ περιφέρεια ισχίων. Στη συγκεκριμένη μετα- ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 31 μελέτες οι οποίες πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής. Συγκεκριμένα, ήταν είτε μελέτες ασθενών- μαρτύρων είτε διατμηματικές μελέτες και το δείγμα ήταν είτε βασισμένο στο γενικό πληθυσμό είτε είχε προκύψει από νοσοκομειακούς ασθενείς και όλες αφορούσαν σε έναν ή περισσότερους παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου. Σε δύο μελέτες η ηλικία του πληθυσμού ήταν μεταξύ 21-40 χρονών ενώ στις υπόλοιπες ήταν μεταξύ 41-60. Η συνολική συχνότητα του πολυμορφισμού υπολογίστηκε σε 0.18 για τους Κινέζους, 0.03 για τους Γιαπωνέζους, 0.45 για τους Λευκούς, 0.36 για τους Φινλανδούς και 0.23 για τους Βραζιλιάνους καταδεικνύοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά της συχνότητας του πολυμορφισμού ($p<0.001$) ανάμεσα στις διάφορες εθνικότητες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μετα- ανάλυσης, από 8 ομογενείς μελέτες με συνολικό δείγμα 3652 άτομα και 8 ομογενείς μελέτες με δείγμα 1624 ατόμων, οι φορείς του A αλληλίου φάνηκε να έχουν 23% μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν παχυσαρκία και παρουσίαζαν μια σημαντική αύξηση της τάξης των 3.5mmHg στη συστολική αρτηριακή πίεση συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (G). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η παρουσία του A αλληλίου σχετίζεται με μια αύξηση 1.25 φορές στα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας στο πλάσμα. Αντίθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους γονότυπους του TNFα και το ΔΜΣ, το λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, τη γλυκόζη νηστείας, τα επίπεδα λεπτίνης στο πλάσμα, το διαβήτη και την υπέρταση (Sookoian SC^a et al 2005). Όσο αφορά στην πιθανή σχέση του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία, μια υπόθεση που έχει αναφερθεί από τους Kras και συνεργάτες είναι ότι η μεγαλύτερη παραγωγή TNFα που σχετίζεται με την παρουσία του πολυμορφισμού μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού.

Όσο αφορά στις μελέτες που αξιολογούν τη σχέση του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία σε παιδιά και εφήβους, από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση φάνηκε ότι υπάρχουν 2 μελέτες, οι οποίες και ανφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

Η μελέτη των Sookoian και συνεργατών πραγματοποιήθηκε σε 175 εφήβους που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για τη Συστυλική ή τη Διατολική Αρτηριακή Πίεση. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του πολυμορφισμού TNFα-308G>A σε επιμέρους παράγοντες του Μεταβολικού Συνδρόμου. Η συχνότητα των γονότυπων στο συνολικό δείγμα ήταν 78,8% για τον GG γονότυπο (φυσιολογικά άτομα), 18,8% για τον GA γονότυπο (ετεροζυγώτες στον πολυμορφισμό) και 2,4% για τον AA γονότυπο (ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα του A αλληλίου στους εφήβους με υπέρταση (17,74% σε σχέση με 8,41% στους εφήβους με φυσιολογική αρτηριακή πίεση) ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και το WHR, όμως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φορέων και μη φορέων του A αλληλίου όσον αφορά τον ΔΜΣ, το WHR και άλλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου (HDL, LDL, τριγλυκερίδια, γλυκόζη νηστείας). Από τη συγκεκριμένη έρευνα, δεν βρέθηκε καμία διαφορά μεταξύ φορέων και μη φορέων του αλληλίου A στο ΔΜΣ, στην περιφέρεια μέσης/ περιφέρεια ισχίου, στην ολική χοληστερόλη στην HDL και LDL χοληστερόλη, στα τριγλυκερίδια αλλά και στη γλυκόζη νηστείας (Sookoian SC^b et al 2005).

Μία άλλη μελέτη η οποία έχει πραγματοποιηθεί σε παιδιά είναι αυτή των Casano - Sancho και συνεργατών. Το δείγμα της μελέτης αυτής αποτελούνταν από 180 παιδιά, είτε γεννημένα μικρά για την ηλικία κύησης (SGA) (90 παιδιά ηλικίας 7,4±4,5) είτε κανονικά για την ηλικία κύησης (AGA) (108 παιδιά ηλικίας 8,7±4 χρόνια). Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η επίδραση του πολυμορφισμού TNFα-308 G>A στην ινσουλινοευσαιθησία. Η συχνότητα των γονοτύπων, GG και GA/AA, διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων, δηλαδή των SGA και AGA παιδιών και ήταν 86% έναντι 72% και 14% έναντι 28% αντίστοιχα (p=0,025). Στη μελέτη αυτή, από πολυπαραγοντική ανάλυση, βρέθηκε ότι ο γονότυπος GG προέβλεπε ανεξάρτητα την ινσουλινοαντίσταση στην παιδική ηλικία, εξηγώντας το 8% της διακύμανσης (Casano-Sancho P et al 2006).

Απ όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα για την αξιολόγηση της πιθανής αλληλεπίδρασης του πολυμορφισμού με συστατικά της διατροφής σε παιδιά ή εφήβους. Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε, βρέθηκε δύο μελέτες οι οποίες αξιολογούσαν τις αλληλεπιδράσεις γονιδίων-διατροφής. Η μία από αυτές δημοσιεύθηκε το 2006 σε πληθυσμό 549 ενήλικων παχύσαρκων γυναικών, Ευρωπαϊκής καταγωγής, και αξιολογούσε 42 πολυμορφισμούς 26 γονιδίων, μεταξύ των οποίων και ο πολυμορφισμός TNFα-308 G>A, και πιθανές αλληλεπιδράσεις με τη διατροφή. Συγκεκριμένα, από 3ήμερο

ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν οι φυτικές ίνες, ο λόγος πολυακόρεστων/κορεσμένων λιπαρών οξέων και το ποσοστό της ενέργειας που προέρχεται από το λίπος της δίαιτας. Η συχνότητα του Α αλληλίου βρέθηκε ίση με 0,16 ενώ δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού με τη διατροφή στην παχυσαρκία (Santos JL et al 2006). Η δεύτερη μελέτη είναι αυτή που δημοσιεύτηκε το 2002 από τους Nieters A και συνεργάτες. Ο πληθυσμός της μελέτης αυτής αποτελούνταν από 154 άτομα με $\Delta M\Sigma \geq 35 \text{ kg/m}^2$ και 154 άτομα με $\Delta M\Sigma 18.5 \leq 25 \text{ kg/m}^2$, που συνιστούσαν τον πληθυσμό Heidelberg της μελέτης EPIC. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις υποψήφιων γονιδίων για την παχυσαρκία, μεταξύ των οποίων και ο TNFα, με τη διατητική πρόσληψη λιπαρών οξέων όπως αυτή υπολογίστηκε από Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης για τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A υπήρχαν ενδείξεις για ελάχιστη επίδραση στον κίνδυνο παχυσαρκίας. Από την άλλη βρέθηκε ότι υπήρχε μια αλληλεπίδραση της πρόσληψης αραχιδονικού οξέος ($p < 0,001$) και λινολεϊκού οξέος ($p = 0,024$) με το αλληλίο Α του πολυμορφισμού TNFα -308G>A που φαινόταν να επηρέαζε τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας αλλά και με τους πολυμορφισμούς PPARγ2C>T και Leptin -2548G>A. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης για τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A υπήρχαν ενδείξεις για ελάχιστη επίδραση στον κίνδυνο παχυσαρκίας.

1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων (Peroxisome Proliferator- Activated Receptors –PPARs) είναι μέλη της υπερ- οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων των μεταγραφικών παραγόντων η οποία εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό και στο ανοσολογικό σύστημα (Greene et al 1995, Jones et al 1995). Οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες που χαρακτηρίζονται από δύο σημαντικές ιδιότητες: 1) ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεσή τους με συγκεκριμένους προσδέτες και

2) συνδέονται σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης (Response Elements-RE) τα οποία βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων. Επομένως, η δράση των πυρηνικών υποδοχέων σε ένα κύτταρο είναι η προσαρμογή του προγράμματος έκφρασης των γονιδίων σύμφωνα με τα σήματα που λαμβάνονται ως ειδικοί συνδέτες (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999).

Αναλυτικότερα, οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς αποτελούν μια μεγάλη υπέρ-οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι τροποποιούνται από μόρια συνδέτες (ligands) και περιλαμβάνουν: τους στεροειδείς και θυρεοειδικούς ορμονικούς υποδοχείς, τους ρετινοειδείς ορμονικούς υποδοχείς όπως επίσης και τους Α ορφανούς Β (A orphan B) υποδοχείς οι οποίοι τελευταίοι αποτελούν μέλη για τα οποία δεν έχουν βρεθεί μέχρι τώρα συνδέτες ή ενεργοποιητές (Mangelsdorf et al 1995, Beato et al 1995, Blumberg et al 1998). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν γονίδια στόχους με πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA οι οποίες καλούνται στοιχεία απόκρισης και βρίσκονται στον υποκινητή αυτών των γονιδίων (Green et al 1988, Evans et al 1988).

Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος αναγνωρίστηκαν 48 πυρηνικοί υποδοχείς και οι περισσότεροι από αυτούς βρίσκονται σε περισσότερες από μία ισομορφές. Οι κλασσικοί ορμονικοί υποδοχείς προσδένουν μόρια όπως τα γλυκοκορτικοειδή, η θυρεοειδική ορμόνη, το ρετινοϊκό οξύ και τα οιστρογόνα με υψηλή συγγένεια. Οι ορφανοί υποδοχείς έχουν τα δομικά χαρακτηριστικά των πυρηνικών υποδοχέων συμπεριλαμβανομένης μιας αλληλουχίας εξαρτώμενης από την παρουσία μιας περιοχής πρόσδεσης συνδετών. Παρόλ'αυτά δεν έχει αναγνωριστεί ακόμη κανένας συνδέτης γι'αυτούς τους υποδοχείς. Οι υποδοχείς που ανήκουν στην Τρίτη τάξη είναι μεταβολικοί αισθητήρες (metabolic sensors). Αυτή η τάξη περιλαμβάνει υποδοχείς που προσδένουν ένα μεγάλο εύρος μορίων με χαμηλή συγγένεια. Αντί να απαντούν στις ορμόνες που εκκρίνονται από ενδοκρινείς αδένες με παλίνδρομη ρύθμιση, αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να προσδένουν μόρια τα οποία αποτελούν συστατικά μεταβολικών μονοπατιών όπως υποστρώματα, ενδιάμεσες ουσίες ή τελικά

προϊόντα όπως λιπαρά οξέα, εικοσανοειδή και οξυστερόλες. Αυτοί οι υποδοχείς συνεπώς είναι αισθητήρες της μεταβολικής κατάστασης, απαντώντας τόσο σε σήματα προερχόμενα από τη διαίτα όσο και σε μεταβολίτες που παράγονται μέσα στον οργανισμό και είναι υπεύθυνοι για τη μεταβολική προσαρμογή σε επίπεδο κυττάρου, οργάνων αλλά και ολόκληρου του οργανισμού. Σε αυτή την τάξη ανήκουν μεταξύ άλλων τα PPARs (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999).

Τα PPARs αποτελούν την ομάδα C στην υπο-οικογένεια 1 της υπερ-οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NR1C). Αυτή η μεγάλη υπο-οικογένεια επίσης συμπεριλαμβάνει τους στεροειδικούς και θυρεοειδικούς ορμονικούς υποδοχείς, τους all-trans υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος και τους υποδοχείς της βιταμίνης D3 (Lemberger et al 1996). Έχουν αναγνωριστεί 3 τύποι PPAR μέχρι τώρα, ο PPARα, ο PPARβ που επίσης καλείται και PPARδ και ο PPARγ οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια που βρίσκονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 22, 6 και 3 αντίστοιχα (Sher et al 1993, Greene et al 1995, Jones et al 1995, Yoshikawa et al 1996).

1.3.2. PPARγ

Ο PPARγ είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων (Tontonoz^a et al 1994, Chawla et al 1994, Tontonoz^b et al 1994, Tontonoz et al 1995, Kliewer et al 1995, Forman et al 1995) και αποτελεί επίσης το μόριο-στόχο των θειαζολιδινεδιονών, παραγόντων που διεγείρουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη in vivo (Lehmann et al 1995, Berger et al 1996, Hofmann et al 1992).

Με διαφορετική χρήση υποκινητών και με άλλη διαδικασία ματίσματος προκύπτουν από το ίδιο γονίδιο τρεις ισομορφές του PPARγ, το PPARγ1, το PPARγ2 και PPARγ3. Επειδή η έκφραση του PPARγ3 περιορίζεται στα μακροφάγα και στο παχύ έντερο, θα αναφερθούμε εκτενέστερα μόνο στο PPARγ1 και PPARγ2 (Zhu et al 1995). Το ανθρώπινο PPARγ2 έχει 28 επιπλέον αμινοξέα σε σχέση με το PPARγ1 και το PPARγ2 των ποντικών έχει 30 επιπλέον αμινοξέα (Zhu et al 1995, Elbrecht et al 1996). Επιπλέον, το PPARγ1 κωδικοποιείται από οχτώ εξόνια και το PPARγ2 από επτά εξόνια ενώ Το PPARγ περιλαμβάνει 9 εξόνια και καλύπτει περισσότερο από 100kb (Fajas L et al 1997). Το PPARγ1 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του λιπώδους ιστού, του σκελετικού μυ, της καρδιάς και του ήπατος ενώ το PPARγ2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό (Vidal-Puig et al 1997, Mukherjee et al 1997, Park et al 1997, Auboeuf et al 1997).

Τα PPAR γ όπως και άλλοι ορμονικοί υποδοχείς έχει μια μοριακή δομή η οποία αποτελείται από ξεχωριστούς λειτουργικούς τομείς:

α) την αμινοτελική A/B περιοχή που επιτελεί μια ανεξάρτητη μεταγραφική λειτουργία από τη πρόσδεση με μόρια συνδέσμων η οποία ονομάζεται λειτουργία ενεργοποίησης-1 (Activation Function-1, AF-1) και είναι ισχυρότερη για τη $\gamma 2$ από ότι για τη $\gamma 1$ ισομορφή

β) την κεντρική περιοχή σύνδεσης με το DNA, η οποία φέρει δύο «δάκτυλα» ψευδαργύρου και διευκολύνει την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα σημεία πρόσδεσης (PPAR στοιχεία απόκρισης) σε υποκινητές γονιδίων στόχων

γ) τη μεγαλύτερη καρβοξυτελική περιοχή η οποία μεσολαβεί την πρόσδεση των μορίων συνδέσμων, τη δημιουργία ετεροδιμερών με το ρετινοϊκό X υποδοχέα (Retinoid X Receptor-RXR) και επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία εξαρτώμενη από την πρόσδεση με μόρια συνδέσμων η οποία ονομάζεται λειτουργία ενεργοποίησης 2 (Activation Function -2, AF-2)(Gurnell M et al 2005).

1.3.3 ΕΙΔΙΚΗ ΙΣΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ PPARs

Τα επίπεδα του PPAR α είναι υψηλότερα στο φαιό λιπώδη ιστό και στο ήπαρ ενώ μικρότερες ποσότητες βρίσκονται στη καρδιά, στους νεφρούς και στα εντεροκύτταρα (Wahli W et al 2002). Επίσης, έκφραση του PPAR α φαίνεται να υπάρχει στο σκελετικό μυ και στο πάγκρεας (Komuro T et al 2002), καθώς και στους πνεύμονες σε μικρότερα ποσά (Escher P and Wahli W 2000). Γενικά, μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου παρουσιάζεται σε ιστούς που έχουν αυξημένη ικανότητα οξείδωσης λιπαρών οξέων, όπως η καρδιά και οι σκελετικοί μύες(Wahli W et al 2002).

Η έκφραση του PPAR β φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη, με επίπεδα που ποικίλλουν στα διάφορα όργανα (Wahli W et al 2002). Παρόλ'αυτά, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η έκφραση του γονιδίου στους διάφορους ιστούς (Komuro T et al 2002).

Οι ιστοί που εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του PPAR γ είναι ο λιπώδης ιστός, το παχύ έντερο και τα αιμοποιητικά κύτταρα. Μέτρια έκφραση του γονιδίου παρατηρείται στο ήπαρ, στο νεφρό και στο λεπτό έντερο ενώ η έκφραση είναι μικρή στο μυϊκό ιστό. Το PPAR $\gamma 1$ είναι η ισομορφή που κυριαρχεί ενώ το PPAR $\gamma 2$ βρίσκεται σε αρκετά μικρότερες ποσότητες (Aurwex J 1999). Το PPAR $\gamma 1$ εκφράζεται κυρίως στο φαιό και λευκό λιπώδη ιστό, αλλά επίσης στο κόλον, στη σπλήνα, στον αμφιβληστροειδή και στα

αιμοποιητικά κύτταρα (Wahli W et al 2002). Ο μόνος ιστός που εμφανίζει μεγάλες ποσότητες του PPAR γ 2 είναι ο λιπώσης ιστός, όπου το PPAR γ 2 mRNA αποτελεί περίπου το 20% της συνολικής έκφρασης του PPAR γ (Aurwex J et al 1999). Έτσι το PPAR γ 2 εκφράζεται κυρίως στο λευκό και φαιό λιπώδη ιστό (Wahli W et al 2002).

1.3.4 ΜΟΡΙΑ- ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ ΤΩΝ PPARs

Τα πρώτα μόρια που αναγνωρίστηκαν ως ενεργοποιητές του PPAR γ και αργότερα χαρακτηρίστηκαν ως συνδέτες, ανήκουν σε μια ομάδα που προκαλούν πολλαπλασιασμό των υπεροξειδιοσωμάτων σε τρωκτικά εξηγώντας έτσι και το όνομα που δόθηκε σε αυτό τον υποδοχέα (Surapureddi S et al 2002).

Η περιοχή πρόσδεσης των μορίων- συνδέσμων έχει αρκετά διαφορετική αμινοξική αλληλουχία ανάμεσα στα διάφορα PPARs, επιτρέποντας την ειδίκευση του κάθε τύπου ως προς συγκεκριμένα μόρια- συνδέσμους. Τα μόρια- σύνδεσμοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στα συνθετικά όπως οι παράγοντες πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων, οι φιβράτες, διάφορα αντιφλεγμονώδη και υπολιπιδαιμικά φάρμακα καθώς και οι ευσαθητοποιητές της ινσουλίνης, και σε φυσικά όπως τα μέσης και μακράς αλύσου λιπαρά οξέα και τα εικοσανοειδή (Escher P and Wahli W 2000).

Το PPAR α είναι ο κυτταρικός στόχος για τις φιβράτες γεμφιβροζίλη, βεζαφιβράτη, φενοφιβράτη που είναι υπολιπιδαιμικά φάρμακα ευρέως χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το PPAR γ είναι ο στόχος για ένα σύνολο φαρμάκων που ονομάζονται θειαζολιδινεδιόνες (TZDs), όπως η ροζιγλιταζόνη και η πιогλιταζόνη, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Τα φάρμακα αυτά είναι αποτελεσματικά για τη μείωση της γλυκόζης αίματος κι έχουν μέτρια αποτελέσματα στα λιπίδια των ασθενών αυτών (Wahli W 2002).

Όσο αφορά στα ενδογενώς συντιθέμενα μόρια- συνδέσμους των PPARs, το PPAR α ενεργοποιείται από ποικιλία λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (μόρια- σύνδεσμοι), κυρίως από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το δοκοσαεξενικό οξύ, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ (Escher P and Wahli W 2000). Φαίνεται όμως να ενεργοποιείται σε μικρότερο βαθμό και από κορεσμένα λιπαρά οξέα. Ο βαθμός ακορεστότητας των ακόρεστων λιπαρών οξέων, δε φαίνεται να επηρεάζει τη συμπληρωματικότητα του υποδοχέα με το μόριο- σύνδεσμο (Smith SA 2002). Επίσης το 8-

ύδροξυ- εικοσατετρανοϊκό οξύ και το λευκοτριένιο B4 ταυτοποιήθηκαν ως μόρια- σύνδεσμοι για το PPAR α .

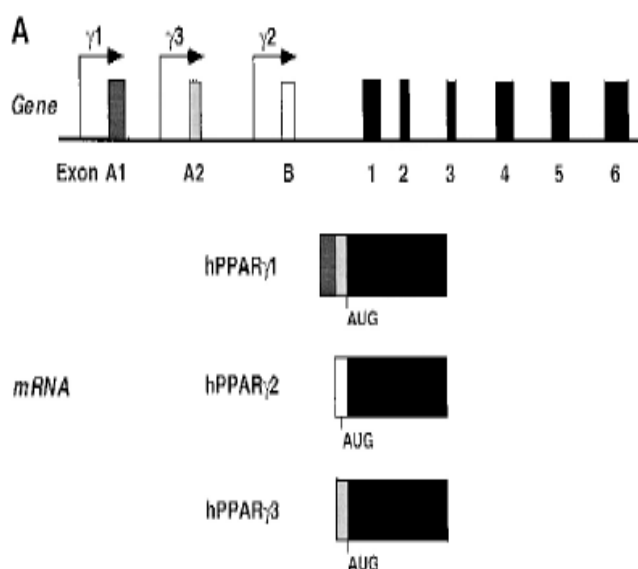
Όσο αφορά στο PPAR γ , πολλά μακράς αλύσου λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ αποτελούν γι' αυτό μόρια συνδέσμων (Wahli W 2002). Επίσης προσταγλαδίνες προερχόμενες από την PGD2 και συγκεκριμένα ο μεταβολίτης της 15-δέοξυ- Δ 12, 14PGJ2 ταυτοποιήθηκε σαν ειδικό μόριο- σύνδεσμος για το PPAR γ (Wahli W 2002, Komuro T 2002, Smith SA 2002). Ακόμη, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της συνθάσης της PGD2 είναι μεγαλύτερη σε ιστούς που εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό το PPAR γ (Smith SA 2002). Επιπλέον, οξειδωμένοι μεταβολίτες του λινελαϊκού οξέος που βρίσκονται στις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL) όπως το 9-ύδροξυ- οκταδεκανικό οξύ και το 13- ύδροξυ- οκταδεκανικό οξύ, ταυτοποιήθηκαν ως μόρια σύνδεσμοι για το PPAR γ (Wahli W 2002, Smith SA 2002).

Μόρια- σύνδεσμοι για το PPAR β είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινολενικό οξύ, λινελαϊκό οξύ και αραχιδονικό οξύ (Wahli W 2002). Επίσης διάφορα προστανοειδή έχουν ταυτοποιηθεί σαν πιθανά μόρια- σύνδεσμοι για το PPAR β (Komuro T 2002).

1.3.5 ΓΟΝΙΔΙΟ PPAR γ

Το ανθρώπινο γονίδιο του PPAR γ αποτελείται από 9 εξόνια και εκτείνεται σε απόσταση πάνω από 100kb στο γενωμικό DNA. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 και συγκεκριμένα στη θέση 3p25. Στον άνθρωπο, όπως προαναφέρθηκε έχουν ταυτοποιηθεί 3 ισομορφές, οι PPAR γ 1, PPAR γ 2 και PPAR γ 3 ενώ στα ποντίκια έχουν ταυτοποιηθεί 2 και συγκεκριμένα οι PPAR γ 1 και PPAR γ 2. Διαφορετικά σημεία εκκίνησης της μεταγραφής και διαφορετική διαδικασία ματίσματος (splicing) δίνουν 3 PPAR γ mRNAs, που διαφέρουν στο 5' άκρο τους. Οι σχετικές θέσεις εκκίνησης της αντιγραφής και τα φαίνονται στην εικόνα 1.3.1. Το PPAR γ 1 κωδικοποιείται από 8 εξόνια, ενώ τα PPAR γ 2 και PPAR γ 3 από 7 εξόνια. Η 5' αμετάφραστη περιοχή του PPAR γ 1 αποτελείται από τα εξόνια A1 και A2 ενώ αυτή του PPAR γ 3 αποτελείται μόνο από το εξόνιο A2. Η 5' αμετάφραστη περιοχή του PPAR γ 2 καθώς και η επιπρόσθετη - ειδική για το PPAR γ 2 αμινοτελική αμινοξική αλληλουχία, κωδικοποιούνται από το εξόνιο B, που βρίσκεται ανάμεσα στα εξόνια A1 και A2. Τα υπόλοιπα εξόνια 1-6 είναι κοινά και για τα 3 PPAR γ . Όπως προαναφέρθηκε επίσης, υπάρχουν και 3 διαφορετικοί υποκινητές για κάθε ένα από τα PPAR γ . Ενώ τα PPAR γ 1 και

PPAR γ 2 δίνουν το ίδιο ακριβώς πρωτεϊνικό προϊόν, το PPAR γ 2mRNA δίνει την PPAR γ 2 πρωτεΐνη που φέρει 28 επιπλέον αμινοξέα (Aurwex J 1999).



Εικόνα 1.3.1. Στην πάνω πλευρά της εικόνας διακρίνονται τα σημεία εκκίνησης της αντιγραφής στο γονίδιο του PPAR γ , καθώς και τα κοινά εξόνια 1-6 για τις 3 ισομορφές.

Στην κάτω πλευρά της εικόνας φαίνονται τα mRNAs που όλα διαφέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους.

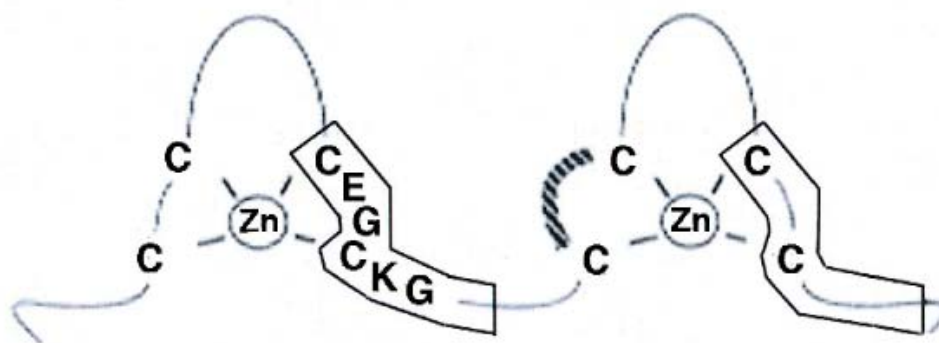
1.3.6 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ PPARs

Η πρωτεΐνη των PPARs αποτελείται από τομείς και προσομοιάζει σε αυτή όλων των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων που ήδη αναφέρθηκε. Συγκεκριμένα:

Α) Η αμινοτελική A/B περιοχή είναι φτωχά διατηρούμενη μεταξύ των ισοτύπων των PPAR. Όπως ήδη προαναφέρθηκε επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία ή ανασταλτική λειτουργία, ανεξάρτητη από την πρόσδεση του υποδοχέα με μόρια- συνδέσμους η οποία ονομάζεται λειτουργία ενεργοποίησης-1 (Activation Function-1). Η περιοχή αυτή μέσω φωσφορυλίωσης των αμινοξέων μπορεί να αναστείλει ή να διεγείρει τη μεταγραφική λειτουργία του υποδοχέα. Συγκεκριμένα η δραστηριότητα του υποδοχέα μειώνεται με φωσφορυλίωση μιας σερίνης στη θέση 112 ή στη θέση 82 από μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινάσων των ενεργοποιούμενων από τη μίτωση (Mitogen-activated Protein Kinase- MAP kinase). Αντιθέτως, φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A φαίνεται να ενισχύει τη μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα (Shalev et al 1996, Juge-Aubry et al 1999, Zhang et al

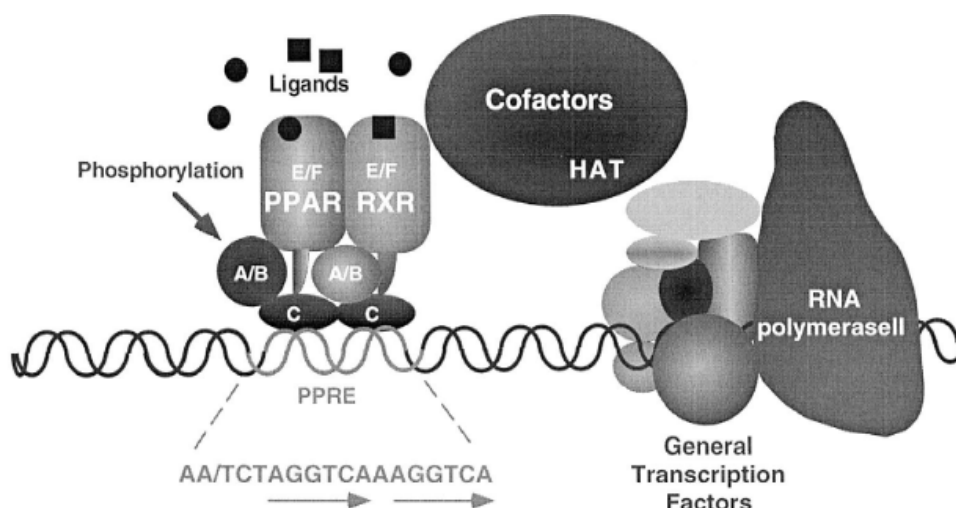
1996, Hu et al 1996). Σε κάθε περίπτωση η δέμευση των μορίων- συνδέσμων φαίνεται να ρυθνίζεται από ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της A/B περιοχής και της περιοχής LBD (Ligand –Binding Domain) (Shao et al 1998). Τα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του PPAR γ 2 επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας του υποδοχέα, ενώ έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός PRO 12 ALA πιθανά σχετίζεται με μειωμένη συμπληρωματικότητα του υποδοχέα με το DNA του γονιδίου- στόχου (Deeb et al 1998).

B) Η περιοχή C αποτελείται από 70 αμινοξέα και είναι η περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain- DBD). Φέρει δύο «δάκτυλα» ψευδαργύρου που αποτελούν το χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (Hård et al 1990, Luisi et al 1991, Schwabe et al 1990, Lee et al 1993). Δεν έχει μελετηθεί η δομή για τους PPARs, αλλά η κλασσική διατηρούμενη αμινοξική αλληλουχία ανάμεσα στα είδη, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι η δομή αυτή στους PPAR μοιάζει κατά πολύ με αυτήν στους άλλους ορμονικούς υποδοχείς (εικόνα 1.3.2). Κάθε «δάκτυλο» ψευδαργύρου φέρει ένα άτομο ψευδαργύρου που ενώνεται με δύο κυστεΐνες και η α - έλικα του κάθε δακτύλου βρίσκεται ακριβώς κάθετα στην άλλη. Το καρβοξυτελικό άκρο του πρώτου δακτύλου περιλαμβάνει το αποκαλούμενο P-κουτί (P-box) που ενώνεται με τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια του DNA του γονιδίου- στόχου (Schwabe et al 1993). Η πρωταρχική αλληλουχία του P-κουτιού (CEGCKG) του PPAR είναι ίδια με σίτοι των άλλων μελών της υπο-οικογένειας 1, και όλοι αυτοί οι υποδοχείς αναγνωρίζουν στο DNA του γονιδίου- στόχου την αλληλουχία AGGTCA (Mangelsdorf et al 1995, Zechel et al 1994, Rastinejad et al 1995). Μεταλλάξεις στο P-κουτί μπορούν να καταργήσουν τη μεταγραφική λειτουργία (Myers et al 1997). Η μορφή των δακτύλων αυτών φαίνεται στην εικόνα 1.3.2



Εικόνα 1.3.2. Στην παραπάνω εικόνα διακρίνονται τα δύο «δάκτυλα» ψευδαργύρου καθώς και η αλληλουχία του P- κουτιού.

Καθώς το PPAR ενώνεται ως ετεροδιμερές με το DNA του γονιδίου- στόχου με άλλο μέλος της υπερ- οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, τον υποδοχέα του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (RXR), η λειτουργική περιοχή του στοιχείου απόκρισης φέρει 2 αντίγραφα του παραπάνω μοτίβου (AGGTCA). Οργανώνονται είτε ως άμεσες επαναλήψεις ή ορίζονται από ένα νουκλεοτίδιο οπότε και ονομάζονται DR-1(Kliwer et al 1992, Tugwood et al 1992, Keller et al 1993). Η περιοχή ανάμεσα στις δύο κυστεΐνες του δεύτερου δακτύλου των πυρηνικών υποδοχέων είναι το κουτί D (D-box). Περιέχει 3 αμινοξέα σε αντίθεση με τους περισσότερους πυρηνικούς υποδοχείς που περιέχουν πέντε αμινοξέα. Αυτό πιθανά δεικνύει τη μοναδική διαμόρφωση του ετεροδιμερούς PPAR/RXR στο DR-1, με το PPAR τοποθετημένο 5'ως προς τον RXR. Η συμπληρωματικότητα του ετεροδιμερούς επιπλέον αυξάνεται όταν το DR-1 είναι μια αδερίνη (Jpenberg et al 1997, Juge-Aubry et al 1997, Hsu et al 1998). Οι σχετικές θέσεις των PPAR και RXR αλλά και η διαμόρφωσή τους ώστε να επιτευχθεί η έκφραση των γονιδίων στόχων φαίνονται στην εικόνα 1.3.3.



Εικόνα 1.3.3. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η μεταγραφική μηχανή στην οποία συμμετέχει το ετεροδιμερές PPAR:RXR. Φαίνεται η επανάληψη των δύο εξαμερών αλληλουχιών καθώς και η παρεμβολή μιας βάσης μεταξύ τους (DR-1). Φαίνονται επίσης οι διάφορες περιοχές στο μόριο των υποδοχέων, καθώς και η τοποθέτηση του RXR 5' ως προς τον PPAR.

Γ) Η περιοχή D που συνδέει την περιοχή C με την επόμενη περιοχή, την E/F.

Δ) Η καρβοξυτελική E/F περιοχή ή περιοχή πρόσδεσης των μορίων -συνδέσμων (Ligand Binding Domain-LBD) επιτελεί ενεργοποιητική λειτουργία εξαρτώμενη από την πρόσδεση με μόρια- συνδέσμους και ονομάζεται λειτουργία ενεργοποίησης-2 (Activation Function-2, AF-2). Οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν κάποια ομολογία στις δύο ισομορφές και συγκεκριμένα στο PPARα και PPARγ. Συγκεκριμένα, οι καλύτερα διατηρούμενες περιοχές είναι οι θέσεις της δέσμευσης του μορίου- συνδέσμου, η θέση όπου συμβαίνει ο ετεροδιμερισμός και οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους συμπαράγοντες.

Σε γενικές γραμμές, η περιοχή αποτελείται από 13 α- έλικες με την παρεμβολή διαμορφώσεων β-δομής. Σε σχέση με την περιοχή αυτή στους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, στους PPAR περιέχεται μια επιπλέον α- έλικα. Οι έλικες αυτές οργανώνονται σε 3 λωρίδες, σχηματίζοντας ανάμεσά τους μια υδρόφοβη «τσέπη», που αποτελεί την ακριβή θέση- δέσμευσης του μορίου- συνδέσμου. Μετά τη δέσμευση, η «τσέπη» κλείνει. Το μέγεθος της, είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτής των άλλων πυρηνικών υποδοχέων. Από το γεγονός αυτό φαίνεται να εξηγείται η ικανότητα των PPAR να έχουν μεγάλη ποικιλία μορίων- συνδέσμων, που η δέσμευση μπορεί να γίνεται και με μικρή συμπληρωματικότητα μεταξύ της περιοχής LBD και του μορίου- συνδέσμου (Xu et al 1999, Nolte et al 1998).

1.3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΜΟΡΙΩΝ-ΣΥΝΔΕΣΜΩΝ

Η σύνδεση του υποδοχέα με το μόριο- σύνδεσμο έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση της LBD και κυρίως της καρβοξυτελικής περιοχής AF-2. Μετά την πρόσδεση ενός υποκαταστάτη όπως π.χ. η ρογλιταζόνη, η έλικα AF διπλώνεται και σχηματίζεται υδρόφοβη σχισμή με τις έλικες 3 και 4 επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τους συμπαράγοντες. Οι συμπαράγοντες αυτοί βοηθούν στην καλύτερη επαφή των παραγόντων μεταγραφής με τη μεταγραφική μηχανή, αλλά και κάποιες φορές παρουσιάζουν ενζυματική δράση και κατά συνέπεια θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης τροποποιώντας κατάλληλα τη δομή του DNA και της χρωματίνης. Πέρα από τους συμπαράγοντες, στην περιοχή LBD δεσμεύονται και πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη δέσμευση του μορίου-συνδέσμου (Feng et al 1998, Onate et al 1995, Spencer et al 1997, Krey et al 1997).

Απουσία μορίου-συνδέσμου, πιθανά υπάρχει ενεργή διαμόρφωση της περιοχής LBD, αλλά δεν είναι επαρκώς σταθερή για την δέσμευση των συμπαραγόντων. Παρουσία μορίου-συνδέσμου, οι αλλαγές στη διαμόρφωση του PPAR, όχι μόνο επιτρέπουν τη δέσμευση των συμπαραγόντων, αλλά και προκαλούν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στον υποδοχέα και εμποδίζουν τη δράση του όταν δεν υπάρχει μόριο-σύνδεσμος (Escher P and Walhi W 2000).

1.3.8 ΡΟΛΟΙ ΤΟΥ PPAR γ

Το PPAR γ αποτελεί την καλύτερα μελετημένη ισομορφή των PPARs. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας αυτός συμμετέχει σε βιολογικά μονοπάτια μεγάλου ενδιαφέροντος όπως ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η λιπογένεση, η πρόσληψη τροφής, η ευαισθησία στην ινσουλίνη και η αθηροσκλήρυνση (Rosen ED, Spiegelman BM et al 2001). Παρακάτω, θα αναφερθούμε εκτενέστερα σε κάποιους από αυτούς τους ρόλους.

1.3.8 A) Το PPAR γ ως ένα γονίδιο- μοντέλο για την πρόσληψη τροφής και το ενεργειακό ισοζύγιο

Το PPAR γ εμφανώς μεσολαβεί ένα αιτιολογικό μονοπάτι ανάμεσα στην αυξημένη εναπόθεση λίπους και το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο. Τα διαιτητικά λιπαρά οξέα είναι σημαντικοί ρυθμιστές της μετάφρασης του γονιδίου του PPAR γ και σχηματίζουν ένα μονοπάτι μέσω του οποίου αυτό το γονίδιο μπορεί να ρυθμίζει το ενεργειακό ισοζύγιο. Σε ποντίκια, η νηστεία έχει συσχετιστεί με καταστολή της έκφρασης του PPAR γ ενώ η έκθεση σε δίαιτα υψηλή σε λίπος οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του PPAR γ στο λιπώδη ιστό (Vidal-Puig A et al 1996). Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, μια χαμηλή σε ενέργεια δίαιτα έχει βρεθεί να καταστέλλει την έκφραση του mRNA του PPAR γ στα λιποκύτταρα παχύσαρκων ατόμων (Meirhaeghe A et al 2003). Το PPAR γ μπορεί να συμβάλλει στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και της όρεξης μέσω της σχέσης του με τις αλλαγές στην ινσουλινοευαισθησία. Ο PPAR γ , όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι στόχος για τα φάρμακα που αποτελούν ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης, τις θειαζολιδινεδιόνες (TZD)(Forman BM et al 1995, Lehmann JM et al 1995). Αυτά τα μόρια ενισχύουν τη δράση της ινσουλίνης μέσω της ενεργοποίησης της διάθεσης της ινσουλίνης στο μυ αλλά και μέσω της αναστολής της απόδοσης της γλυκόζης από το ήπαρ. Η Τρογλιταζόνη, ένα μέλος της οικογένειας των TZD έχει φανεί να τροποποιεί την όρεξη και συγκεκριμένα η αγωγή με Τρογλιταζόνη οδηγεί σε αύξηση της πείνας (Shimizu H et al 1998) και αυτό τα φαινόμενα φαίνεται να μεσολαβείται μερικώς από το PPAR γ μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου της λεπτίνης

(Hollenberg AN et al 1997). Μέχρι τώρα, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα τα οποία να δείχνουν ότι το PPAR γ εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση του κορεσμού και της πρόσληψης τροφής. Παρόλ'αυτά, η έκφραση και η λειτουργία του PPAR γ τροποποιείται από τα διαιτητικά λιπαρά οξέα κι επιπλέον το PPAR γ μπορεί να δρα άμεσα μέσω επιδράσεων στην έκφραση της λεπτίνης η οποία έχει σημαντική επίδραση στον κορεσμό. Δεδομένα από μελέτες σε ζώα, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του PPAR γ από TZD οδηγεί σε καταστολή του γονιδίου της λεπτίνης (Zhang B et al 1996). Αυτή η συσχέτιση του PPAR γ και των επιπέδων λεπτίνης υποστηρίζει το ρόλο του ως ένα υποψήφιο γονίδιο στη μεσολάβηση της απάντησης στο φαγητό και στην όρεξη, αφού η λεπτίνη είναι ένα πιθανό σήμα εναπόθεσης λίπους.

Υπάρχει ένας μικρός αριθμός μελετών στις οποίες έχει ερευνηθεί και αξιολογηθεί αν κοινοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο του PPAR γ σχετίζονται με διαφορετικές απαντήσεις σε διάφορες δίαιτες. Τουλάχιστον 4 μελέτες έδειξαν ότι τα αλληλία του PPAR γ αλληλεπιδρούν με θρεπτικά συστατικά της τροφής ώστε να τροποποιηθεί το σωματικό βάρος. Από αυτές τις μελέτες αναδεικνύεται η ύπαρξη της αλληλεπίδρασης γονιδίων- διατροφής μεταξύ του ALA αλληλίου του πολυμορφισμού Pro12 Ala και των διαιτητικών υδατανθράκων (Martí A et al 2002) αλλά και της πρόσληψης λίπους (Luan J et al 2001, Memisoglu A et al 2003, Robitaille J et al 2003), προτείνοντας ότι η απάντηση σε συστατικά της διατροφής όσο αφορά στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, μπορεί να εξαρτάται από το γονότυπο.

1.3.8 B) ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ

Ο λιπώδης ιστός αποτελείται από λιποκύτταρα που αποθηκεύουν ενέργεια σε μορφή τριγλυκεριδίων όταν αυτή λαμβάνεται σε αφθονία από την τροφή, και απελευθερώνουν την αποθηκευμένη ενέργεια στη μορφή μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων σε περίπτωση νηστείας. Υπερβολική συσσώρευση λιπώδους ιστού οδηγεί σε παχυσαρκία, ενώ η απουσία του σχετίζεται με λιποδυστροφικά σύνδρομα. Ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων από πρόδρομα κύτταρα του λιπώδους ιστού, παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα και ελέγχεται από πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια (Aurwex J 1999). Η ισομορφή των PPARs PPAR γ , έχει ταυτοποιηθεί σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας-κλειδί στη διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων σε λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι γονίδια-στόχοι για το PPAR γ , όπως το κωδικοποιούν γονίδιο για την πρωτεΐνη δέσμευσης των λιπαρών οξέων και το γονίδιο για την φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυκινάση, αποτελούν δείκτες τελικής διαφοροποίησης

των λιποκυττάρων και η ρύθμισή τους από το PPAR γ δείχνει τη μεγάλη συμβολή του υποδοχέα αυτού στη διατήρηση του φαινοτύπου των κυττάρων του λιπώδους ιστού (Escher P and Wahli W 2000).

Γενικά η διαδικασία της λιπογένεσης απαιτεί την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ετεροδιμερές PPAR γ /RXR και δύο άλλων ομάδων μεταγραφικών παραγόντων: των πρωτεϊνών δέσμευσης στο «κουτί» CCAAT (CCAAT enhancer binding Proteins-C/EBP) και του παράγοντα-1 διαφοροποίησης και καθορισμού των λιποκυττάρων/ πρωτεΐνη δέσμευσης ρυθμιστικού στοιχείου στερολών-1 (adipocyte differentiation and determination factor 1/ sterol regulatory element binding Protein 1 ADD-1/SREBP-1). Οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργιστικά στην διαδικασία της λιπογένεσης (Aurwex J 1999, Fajas L et al 1997).

Στις αρχικές φάσεις της λιπογένεσης, με την επίδραση ορμονών που επάγουν τη λιπογένεση, όπως η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, ενεργοποιούνται οι παράγοντες C/EBP β και δ . Και οι δύο αυτοί παράγοντες επάγουν τη μεταγραφή του PPAR γ 2 με επίδρασή τους στον υποκινητή του γονιδίου του PPAR γ 2. Στη συνέχεια, το PPAR γ 2 ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του PPAR γ 1 (Aurwex J 1999, Rosen ED et al 2001).

Ο Ρετινοϊκός X υποδοχέας (RXR), που σχηματίζει ετεροδιμερές με το PPAR γ , αποτελεί άλλον έναν ρυθμιστικό παράγοντα της διαδικασίας της λιπογένεσης. Συγκεκριμένα, στα στοιχεία απόκρισης του PPAR γ , όταν ο RXR βρίσκεται ως ετεροδιμερές με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor-RAR), εμποδίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Όταν βρίσκεται σε μορφή ετεροδιμερούς με τον υποδοχέα PPAR γ στα ίδια γονίδια επάγει τη μεταγραφική διαδικασία. Η έκφραση των RAR και PPAR γ αλλάζει σημαντικά κατά την έναρξη της λιπογένεσης. Η έκφραση του PPAR γ αυξάνεται σημαντικά, ενώ αυτή του RXR μειώνεται. Κατά συνέπεια, ο RX βρίσκεται σε μορφή που επιτρέπει τη μεταγραφική διαδικασία αφού βρίσκεται κυρίως ενωμένος με τον υποδοχέα PPAR γ (Aurwex J 1999).

Ο παράγοντας ADD-1/SREBP-1, που παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία της χοληστερόλης, εμπλέκεται όπως αναφέρθηκε και στη διαδικασία της λιπογένεσης. Σαν μεταγραφικός παράγοντας, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κι έτσι φαίνεται να τροφοδοτεί το PPAR γ με μόρια-συνδέσμους που αυξάνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα. (Escher P and Wahli W 2000, Aurwex J 1999). Το τελικό στάδιο της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων απαιτεί

τη συντονισμένη δράση των PPAR γ και C/EBP α . Το C/EBP α ενεργοποιείται από τα C/EBP β και C/EBP δ . Η έκφραση του C/EBP α ελέγχεται και από το PPAR γ , αλλά και το C/EBP α με τη σειρά του ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του PPAR γ μέσω της σύνδεσης του C/EBP α με το στοιχείο απόκρισης του PPAR γ , που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου του (Aurwex J 1999, Rosen ED et al 2001).

Η ανίχνευση στοιχείων απόκρισης του PPAR γ σε γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη δέσμευσης λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα (aP2), για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, την συνθάση του άκυλο-CoA, την Φωσφοενόλο-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση και την πρωτεΐνη μεταφοράς λιπαρών οξέων, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι το PPAR γ μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή αλλά και την πρόσληψη από το κύτταρο μορίων-συνδέσμων και ενεργοποιητών του.

Δύο κυτοκίνες που παράγονται από τα λιποκύτταρα εμπλέκονται επίσης στη διαδικασία της λιπογένεσης: η λεπτίνη και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου α (Tumor Necrosis Factor α -TNF α). Η λεπτίνη προσδεδεμένη σε ειδικούς υποδοχείς προκαλεί γενικευμένη απόκριση που περιλαμβάνει έλεγχο του σωματικού βάρους και της κατανάλωσης ενέργειας. Η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης μειώνεται με τη δράση του PPAR γ και αυξάνεται με τη δράση του C/EBP α . Η μείωση των επιπέδων λεπτίνης στο αίμα μετά από επίδραση του PPAR γ , σχετίζεται με αύξηση της πρόσληψης τροφής, που οδηγεί σε αύξηση των διατιθέμενων υποστρωμάτων και κατά συνέπεια σε αποθήκευση αυτών στα λιποκύτταρα.

Όσον αφορά στον TNF α , αυτός αποτελεί έναν πιθανό ανασταλτικό παράγοντα στη διαδικασία της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Ο TNF α φαίνεται να δρα μερικώς μέσω καταστολής της έκφρασης των PPAR γ και C/EBP α . Σε περιπτώσεις παχυσαρκίας, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα TNF α , που ίσως προστατεύουν από επιπλέον αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού και πιθανώς σχετίζονται με τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη που είναι χαρακτηριστικό των περιπτώσεων παχυσαρκίας. Όταν σε παχύσαρκα ζώα χορηγήθηκαν αγωνιστές του PPAR γ , παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής TNF α από το λιπώδη ιστό και αύξηση του βάρους. Επιπλέον η χορήγηση αγωνιστών του PPAR γ φάνηκε να καταργεί την ανασταλτική δράση του TNF α στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, καθώς και να αναστέλλει την απελευθέρωση με εστεροποιημένων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης από το λιπώδη ιστό.

Πέρα από το ρόλο του PPAR γ στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, φαίνεται να εμπλέκεται και στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των λιποκυττάρων. Συγκεκριμένα, ευνοεί την απόπτωση κυρίως πλήρως διαφοροποιημένων και μεγάλου μεγέθους κυττάρων. Συνδυάζοντας τη δράση στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση των λιποκυττάρων, συμπεραίνουμε με τη δράση του PPAR γ τείνουν να αντικαθίστανται τα μεγάλα λιποκύτταρα που συνήθως αποτελούν το λιπώδη ιστό από άλλα μικρότερου μεγέθους (Aurwex J 1999). Η αλλαγή αυτή στη μέγεθος των λιποκυττάρων έχει διαπιστωθεί από μελέτες σε τρωκτικά, ενώ μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν επιβεβαιώσει αυτές τις αλλαγές.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι θειαζολιδινεδιόνες (συνθετικά μόρια-σύνδεσμοι του PPAR γ) ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση πρόδρομων κυττάρων του λιπώδους ιστού σε λιποκύτταρα κυρίως περιφερικά και όχι στο λιπώδη ιστό των σπλάχνων. Αυτό όμως φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του RXR στο σπλαχνικό λίπος, κι όχι με μειωμένη έκφραση ή δραστηριότητα του PPAR γ (Wahli W 2002).

1.3.8 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η πιθανή εμπλοκή του PPAR γ στις φλεγμονώδεις διαδικασίες προτάθηκε αρχικά λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF α και του PPAR γ . Επίσης, αγωνιστές του PPAR γ φάνηκε ότι αναστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την παραγωγή κυτοκινών. Μεγάλες δόσεις μορίων-συνδέσμων ή συνθετικών αγωνιστών του PPAR γ στα μονοκύτταρα μειώνουν την παραγωγή των TNF α , IL-1 β και IL-6 (Aurwex J 1999 Komuro T et al 2002, Lee CH et al 2002). Επιπλέον, οι αγωνιστές του PPAR γ καταστέλλουν την ζελατινάση B, τη συνθάση του νιτρικού οξέος και τον scavenger υποδοχέα A (Aurwex J 1999 Komuro T et al 2002, Lee CH et al 2002 Rosen ED et al 2001). Αυτές οι διαδικασίες φαίνεται να λαμβάνουν χώρα με αλληλεπίδραση του PPAR γ με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση κυτοκινών. Όμως, από τις έρευνες αυτές φάνηκε ότι απαιτούνται πολύ μεγάλες δόσεις αγωνιστών του PPAR γ , που ξεπερνούν κατά πολύ τις απαραίτητες για την ενεργοποίηση του υποδοχέα, οπότε ίσως στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες πέραν του PPAR γ (Aurwex J 1999).

Μια άλλη συσχέτιση του PPAR γ με τις διαδικασίες της φλεγμονής είναι το γεγονός ότι κάποια φυσικά μόρια-σύνδεσμοι για το PPAR γ είναι προϊόντα στο μονοπάτι της κυκλοοξυγενάσης , όπως η 15-δέοξυ προσταγλαδίνη J2. Η καταστολή της κυκλοοξυγενάσης

από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αποτελεί συνήθη θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στόχος των φαρμάκων αυτών δεν είναι μόνο η κυκλοοξυγενάση, αλλά και το PPAR γ . Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα δρουν σε ένα βαθμό μέσω της καταστολής της παραγωγής κυτοκινών από το PPAR γ (Aurwex J 1999, Rosen ED et al 2001)

1.3.9 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Pro12 Ala ΣΤΟ PPAR γ 2

Ο πολυμορφισμός Pro 12 Ala στο γονίδιο του ενεργοποιημένου υποδοχέα πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων PPAR γ , αποτέλεσμα μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης στο εξόνιο B του γ 2 τύπου, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1997 και θεωρείται ότι οδηγεί σε χαμηλή μεταφραστική δράση (Yen CJ et al 1997).

Ο πολυμορφισμός Pro12Ala αποτελεί τη πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταλλαγή. Αποτέλεσμα του πολυμορφισμού αυτού, είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ αλανίνη στο κωδικόνιο 12 της ισομορφής PPAR γ 2. Η αντικατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στο αμινοτελικό άκρο της. Η περιοχή αυτή του υποδοχέα φαίνεται να σχετίζεται με ενεργοποίηση του, ανεξάρτητη από την πρόσδεση με μόρια-συνδέσμους (Yen CJ et al 1997).

Το αλληλίο PPAR γ Ala φάνηκε ότι εμφανίζει μικρότερη ικανότητα στο να αλληλεπιδρά με τους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Επίσης, αναφέρεται ότι εμφανίζει μικρότερη μεταγραφική ικανότητα. Αφού ο PPAR γ 2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό, οποιαδήποτε μεταβολική επίδραση του πολυμορφισμού αναμένεται να ασκείται μέσω του ιστού αυτού.

Στο γενετικό τόπο του PPAR γ 2 έχουν αναφερθεί διάφορες μεταλλαγές. Η μεταλλαγή Pro115Gln, στην αμινοτελική περιοχή, είναι πολύ σπάνια και οδηγεί σε υπερλειτουργία του υποδοχέα. Σχετίζεται με παχυσαρκία αλλά όχι ινσουλινοαντίσταση.

Έχουν αναφερθεί και δυο άλλες μεταλλάξεις, εξαιρετικά σπάνιες, οι Val290Met και Pro465Leu, που οδηγούν σε απώλεια της δραστηριότητας του υποδοχέα. Έχουν αναφερθεί σε τρία άτομα μόνο, τα οποία είχαν φυσιολογικό βάρος σώματος αλλά εμφάνιζαν σοβαρή

ινσουλινοαντίσταση. Η μετάλλαξη αυτή συμβαίνει στην περιοχή πρόσδεσης του μορίου-συνδέσμου (Auwerx J et al 1999).

1.3.10 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

Ο πολυμορφισμός Pro 12 Ala στο γονίδιο του ενεργοποιημένου υποδοχέα του PPAR γ , όπως προαναφέρθηκε αποτελεί τη πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταλλαγή. Η συχνότητα του Ala αλληλίου ποικίλλει από περίπου 4% σε Ασιάτες (Morri H et al 2001) σε περίπου 28% σε Καυκάσιους (Frederiksen L et al 2002). Αφού ο τύπος PPAR γ 2 στον οποίο εμφανίζεται αυτός ο πολυμορφισμός εκφράζεται αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό, ο Pro12Ala αρχικά μελετήθηκε για τη συσχέτισή του με την παχυσαρκία. Σύντομα όμως προέκυψαν δεδομένα που έδειχναν ότι το Ala αλληλίο σχετίζεται με αυξημένη ινσουλινοευαισθησία σε μη διαβητικούς Καυκάσιους. Κατά συνέπεια άρχισε να μελετάται η συσχέτισή του πολυμορφισμού αυτού με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 και δημοσιεύτηκε μια πρώιμη μετά- ανάλυση όπως χαρακτηρίζεται από τους Tönjes A και συνεργάτες. Η μετά-ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε 3000 άτομα, υγιή και διαβητικά, και έδειξε πως ο γονότυπος Pro/Pro σχετιζόταν με μια μέτρια (1,25 φορές) αλλά ισχυρή ($p=0,002$) αύξηση με τον κίνδυνο για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (Altshuler D et al 2000).

Το 2003 δημοσιεύτηκε μια άλλη μετά-ανάλυση η οποία συμπεριλάμβανε 14 μελέτες κι επιβεβαίωνε τα αποτελέσματα της συσχέτισης του πολυμορφισμού Pro12Ala με τον κίνδυνο για Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (Lohmueller KE et al 2003).

Η μετά-ανάλυση των Tönjes και συνεργατών που δημοσιεύτηκε το 2006 περιελάμβανε δεδομένα από 57 μελέτες υγιών πληθυσμών και μελετούσε αν ο γονότυπος Pro/Pro σχετίζεται με πιο «διαβητικό» φαινότυπο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σε όλες τις μελέτες που αναλύθηκαν, ο πολυμορφισμός Pro12 Ala δεν είχε σημαντική επίδραση σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το διαβήτη σε μη διαβητικό πληθυσμό. Μόνο σε επιλεγμένες υπο-ομάδες όπως οι Καυκάσιοι και οι παχύσαρκοι, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το Ala αλληλίο συσχετιζόταν με μεγαλύτερο ΔΜΣ($p=0,015$) στους Καυκάσιους ενώ στους παχύσαρκους η γλυκόζη ($p=0,041$) και η ινσουλινοαντίσταση (HOMA-IR)($p=0,020$) ήταν σημαντικά υψηλότερες στους Pro/Pro ομοζυγώτες. Η μετά-ανάλυση για τους Ala/Ala ομοζυγώτες έδειξε ακόμη πιο καθαρά τη συσχέτιση του Ala αλληλίου με μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία, αφού οι ομόζυγοι Ala/Ala είχαν στατιστικά χαμηλότερη ινσουλίνη νηστείας συγκριτικά με το γονότυπο Pro/Pro ($p=0,040$) (Tönjes A et al 2006).

Όσο αφορά στην αλληλεπίδραση αυτού του πολυμορφισμού με τη διατροφή, η μελέτη των Luan J και συνεργατών προβάλλει ένα από τα πρώτα παραδείγματα αλληλεπίδρασης γονιδίων- διατροφής. Η μελέτη αυτή περιελάμβανε 592 μη διαβητικά άτομα, οι οποίοι ήταν συμμετέχοντες σε μια προοπτική πληθυσμιακή μελέτη, και εξέτασε την αλληλεπίδραση μεταξύ του PPAR γ Pro12Ala και του λόγου Πολυακόρεστων/Κορεσμένων λιπαρών οξέων της δίαιτας. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις ινσουλίνης νηστείας ή στο ΔΜΣ μεταξύ των φορέων του Ala αλληλίου και των ομοζυγώτων για το Pro αλλήλιο. Από την άλλη, η συγκέντρωση ινσουλίνης νηστείας συσχετίστηκε αρνητικά με το λόγο Πολυακόρεστων/Κορεσμένων λιπαρών οξέων ($p=0.011$) αφού έγινε διόρθωση για την ηλικία και το φύλο κι επίσης βρέθηκε μια ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στο λόγο Πολυακόρεστων/Κορεσμένων λιπαρών οξέων και τον πολυμορφισμό Pro12Ala τόσο για το ΔΜΣ όσο και για την ινσουλίνη ($p=0.003$ και $p=0.009$ αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, όταν ο λόγος πολυακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν χαμηλός, ο μέσος ΔΜΣ των φορέων του Ala αλληλίου ήταν μεγαλύτερος από ότι στους ομοζυγώτες για το Pro αλλήλιο. Όταν ο ίδιος λόγος ήταν υψηλός, οι φορείς του Ala αλληλίου φαινόταν να έχουν χαμηλότερο ΔΜΣ. Αυτή η αλληλεπίδραση, όπως αναφέρουν οι Luan και συνεργάτες μπορεί να εξηγεί τα αντικρουόμενα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών για τον πολυμορφισμό Pro12Ala. Αναφέρουν ότι τα αποτελέσματα αυτών των μελετών θα εξαρτώνται ισχυρά από τις τυπικές δίαιτες που ακολουθούσαν αυτοί οι πληθυσμοί και γι' αυτό, όπως προτείνουν οι ερευνητές, σε μελετούμενους πληθυσμούς στους οποίους γίνεται γονοτυπική ανάλυση θα πρέπει να υπάρχουν και διατροφικές πληροφορίες (Luan et al 2001). Η βιολογική σημασία της προαναφερθείσας συσχέτισης είναι υψηλή, όπως αναφέρουν οι ερευνητές αυτής της μελέτης. Από δεδομένα προηγούμενων μελετών είχε φανεί ότι το Ala αλλήλιο σχετίζεται με μέτρια με χαμηλή μεταφραστική δραστηριότητα (Deeb et al 1998). Επομένως αν κάποιοι μεταβολίτες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι συνδότες για το PPAR γ , αναμένεται να είναι πιο αποτελεσματικοί ενεργοποιητές της εναπόθεσης λίπους στους Pro/Pro ομοζυγώτες από ότι στους φορείς του Ala αλληλίου. Αυτή η εξήγηση είναι σύμφωνη με τη μειωμένη παχυσαρκία που παρατηρείται σε φορείς του Ala αλληλίου με αυξημένο λόγο Πολυακόρεστων/Κορεσμένων λιπαρών οξέων. Παρόλα αυτά, οι ερευνητές τονίζουν πως θα πρέπει να αποφεύγονται οι πολύ απλές εξηγήσεις αφού οι βιολογικές δράσεις του PPAR γ είναι πιθανό να είναι ιδιαίτερα σύνθετες και να εξαρτώνται αρκετά από τον ειδικό συνδέτη που εμπλέκεται (Luan et al 2001).

Στη μελέτη των Memisoglu και συνεργατών διερευνήθηκε το αν ο πολυμορφισμός Pro12 Ala στο γονίδιο του PPAR γ τροποποιεί τη συσχέτιση μεταξύ του λίπους στη διαίτα, της παχυσαρκίας και των λιπιδίων στο πλάσμα. Σε 2141 άτομα τα οποία αποτελούσαν τους μάρτυρες σε 3 μελέτες ασθενών – μαρτύρων, που προέρχονται από τη μελέτη Nurses' Health Study, βρέθηκαν διαφορετικές συσχετίσεις μεταξύ της συνολικής πρόσληψης λίπους, των τύπων του λίπους και του ΔΜΣ στους φορείς του Ala αλληλίου συγκριτικά με τους μη φορείς. Ανάμεσα στους Pro/Pro ομοζυγώτες, αυτοί που βρίσκονταν στο υψηλότερο πεμπτημόριο (quintile) της συνολικής πρόσληψης λίπους είχαν υψηλότερο μέσο ΔΜΣ συγκρινόμενοι με αυτούς με το χαμηλότερο πεμπτημόριο (27.3 vs 25.4 kg/m², αντίστοιχα, $p < 0.0001$), ενώ ανάμεσα τους φορείς του Ala αλληλίου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της διαιτητικής πρόσληψης λίπους και του ΔΜΣ ($p = 0.99$) (Memisoglu A et al 2003). Όπως αναφέρουν οι ερευνητές, αυτό το εύρημα συμφωνεί με μοντέλα ποντικών στα οποία η μειωμένη δραστηριότητα του PPAR γ είτε γενετικά είτε φαρμακολογικά, οδηγεί σε ζώα με αντιστάτη στην προκαλούμενη από παχυσαρκία διαίτα (Kubota et al 1999, Yamauchi^a et al 2001, Yamauchi^b et al 2001). Αυτή η αντίσταση είναι ειδική σε παχυσαρκία προκαλούμενη από διαίτα υψηλή σε λίπος ενώ δεν παρατηρείται με υψηλή διαίτα σε υδατάνθρακες (Kubota et al 1999). Τα λιπαρά οξέα και ειδικά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν συνδέτες για το PPAR γ (Xu et al 1999). Επομένως η σχέση της πρόσληψης λιπαρών οξέων με την παχυσαρκία μπορεί να εξαρτάται από τη μεταγραφική απάντηση του PPAR γ . Αντίθετα, η πρόσληψη του μονοακόρεστου λίπους δε συσχετίστηκε με το ΔΜΣ στις ομόζυγες γυναίκες για το Pro αλληλίο ενώ συσχετίστηκε αντίστροφα στους φορείς του Ala αλληλίου (ο μέσος στο χαμηλότερο πεμπτημόριο 27.6 έναντι του μέσου 25.5. στο υψηλότερο πεμπτημόριο, $p = 0.006$) (Memisoglu A et al 2003).

Στη μελέτη των Robitaille και συνεργατών, εξετάστηκε σε ένα δείγμα 720 ενηλίκων που συμμετείχαν στη μελέτη Québec Family Study αν το διαιτητικό λίπος αλληλεπιδρά με τον πολυμορφισμό Pro12Ala στο γονίδιο του PPAR γ . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης οι φορείς του Ala αλληλίου είχαν υψηλότερο ΔΜΣ, περιφέρεια μέσης και ποσοστό σωματικού λίπος ($p < 0,05$) συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες για το Pro αλληλίο. Επίσης, η συνολική πρόσληψη λίπους και το κορεσμένο λίπος, όπως υπολογίστηκαν από 3ήμερο ημερολόγιο, συσχετίστηκαν, στατιστικά σημαντικά, αρνητικά με την HDL ($p < 0.001$), και θετικά με το ΔΜΣ ($p < 0.001$), την περιφέρεια μέσης ($p < 0.001$), το πηλίκΟ Ολικής Χοληστερόλης/ HDL ($p < 0.001$), και τη γλυκόζη ($p < 0.001$), στους ομοζυγώτες για το Pro αλληλίο αλλά όχι για τους φορείς του Ala αλληλίου (Robitaille J et al 2003).

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη είναι αυτή που δημοσιεύτηκε το 2002 από τους Nieters A και συνεργάτες. Ο πληθυσμός της μελέτης αυτής αποτελούνταν από 154 άτομα με $\Delta\text{ΜΣ} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ και 154 άτομα με $\Delta\text{ΜΣ} 18.5 \leq 25 \text{ kg/m}^2$, που συνιστούσαν τον πληθυσμό Heidelberg της μελέτης EPIC. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις υποψήφιων γονιδίων για την παχυσαρκία, μεταξύ των οποίων και τα γονίδια PPAR γ και TNF α , με τη διαιτητική πρόσληψη λιπαρών οξέων όπως αυτή υπολογίστηκε από Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης για τους πολυμορφισμούς PPAR γ Pro12Ala και TNF α -308G>A υπήρχαν ενδείξεις για ελάχιστη επίδραση στον κίνδυνο παχυσαρκίας. Από την άλλη βρέθηκε ότι οι φορείς του PPAR γ Ala οι οποίοι κατανάλωναν υψηλότερες ποσότητες αραχιδονικού οξέος είχαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο για παχυσαρκία από ότι οι ομόζυγοι φυσιολογικοί. Επιπλέον, βρέθηκε ότι υπήρχε μια αλληλεπίδραση της πρόσληψης αραχιδονικού οξέος και λινολεϊκού οξέος με το αλληλίο A του πολυμορφισμού TNF α -308G>A που φαινόταν να επηρέαζε τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας (Nieters A et al 2002).

Όσο αφορά στην επίδραση του πολυμορφισμού στο $\Delta\text{ΜΣ}$, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών ο οποίος έχει εξετάσει τον πολυμορφισμό Pro12 Ala σε σχέση με το $\Delta\text{ΜΣ}$ (Beamer BA et al 1998) αλλά τα αποτελέσματα αυτών δεν ήταν εντελώς σύμφωνα. Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα, όπως αναφέρεται από τους Masud και συνεργάτες, μπορεί να οφείλονται σε μη επαρκή στατιστική δύναμη (power) σε κάποιες μελέτες (Masud S and Ye S 2003). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο πολυμορφισμός Pro12Ala έχει μια επίδραση στο $\Delta\text{ΜΣ}$ ατόμων με έκδηλη παχυσαρκία κι ότι αυτή η επίδραση δεν είναι εμφανής σε αδύνατα άτομα (Ek J et al 1999).

Η μετά-ανάλυση που δημοσιεύτηκε από τους Masud και Ye το 2003, συμπεριέλαβε 30 ανεξάρτητες μελέτες και είχε σκοπό να εξετάσει την επίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στο $\Delta\text{ΜΣ}$ σε όλο τον αριθμό ατόμων αρχικά ($n=19136$) και στη συνέχεια ξεχωριστά σε παχύσαρκα ($n=8365$) και αδύνατα άτομα ($n=10771$). Σε όλο το δείγμα, φάνηκε ότι η ομάδα που είχε το γονότυπο Ala/Ala είχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο μέσο $\Delta\text{ΜΣ}$ από ότι οι ομάδες με γονότυπους Pro/Ala και Pro/Pro. Επειδή έχει φανεί ότι ο πολυμορφισμός PPAR γ Pro12Ala μπορεί να έχει επίδραση στο $\Delta\text{ΜΣ} \geq 27 \text{ kg/m}^2$ μόνο σε άτομα με έκδηλη παχυσαρκία (Ek J et al 1999), όπως αναφέρουν οι ερευνητές, χωρίστηκε το δείγμα σε δύο ομάδες, σε αυτούς με $\Delta\text{ΜΣ} \geq 27 \text{ kg/m}^2$ ($n=19136$) και σε αυτούς με $\Delta\text{ΜΣ} < 27 \text{ kg/m}^2$

($n=10771$). Στα άτομα με μέση τιμή ΔΜΣ >27 , οι φορείς του Ala αλληλίου είχαν υψηλότερες τιμές ΔΜΣ ($p=0,0006$) συγκριτικά με τους μη φορείς, ενώ η ίδια διαφορά δεν βρέθηκε στα άτομα με $<27 \text{ kg/m}^2$ (Maud S and Ye S 2003).

Όσο αφορά στη συχνότητα του πολυμορφισμού, στη μελέτη ανασκόπησης των Paracchini και συνεργατών, φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα του Ala αλληλίου ανάμεσα σε ομάδες διαφορετικής εθνικότητας (Paracchini V et al 2005). Σε αυτή τη μελέτη αναφέρεται ένα εύρος συχνοτήτων που έχει δημοσιευθεί, με τη συχνότητα του Ala αλληλίου να ποικίλλει από 0.02 σε πληθυσμό Αφροαμερικανών (Muller YL et al 2003) και Γιαπωνέζων (Kahara T et al 2003) ως 0.15 σε Καυκάσιους (Evans D et al 2000).

Στην ίδια μελέτη, οι ερευνητές πραγματοποιούν και μια μετά-ανάλυση των διαθέσιμων δεδομένων για τη συσχέτιση διαφόρων πολυμορφισμών, μεταξύ των οποίων και του πολυμορφισμού PPAR γ Pro 12 Ala, και της παχυσαρκίας στηριζόμενοι σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων και καταλήγουν στη μη ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ αυτού του πολυμορφισμού και της παχυσαρκίας (Paracchini V et al 2005).

Μία μελέτη που αφορούσε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12Ala με την ινσουλινοευαισθησία σε παχύσαρκα παιδιά Ιταλικής καταγωγής ηλικίας 10.38 ± 2.8 δημοσιεύτηκε το 2005. Για να εκτιμηθεί το επίπεδο ινσουλινοευαισθησίας υπολογίστηκε το ομοιοστατικό μοντέλο ινσουλινοευαισθησίας (HOMA-IR). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η συχνότητα των φορέων του Ala ήταν 17% ενώ ταυτόχρονα ο γονότυπος X12Ala (είτε Pro12Ala είτε Ala12Ala) συσχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης συγκριτικά με τον Pro/Pro ($p=0,008$). Επίσης σημαντικά χαμηλότερο HOMA-IR παρατηρήθηκε στον X12Ala γονότυπο ($p=0,023$) (Buzetti R et al 2005).

Στη μελέτη των Chen και συνεργατών αξιολογήθηκε η επίδραση διαφόρων πολυμορφισμών στο γονίδιο του PPAR γ , μεταξύ των οποίων και ο πολυμορφισμός Pro12Ala σε 1210 μαθητές στο Μεξικό. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με το ΔΜΣ (Chen L et al 2006).

1.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

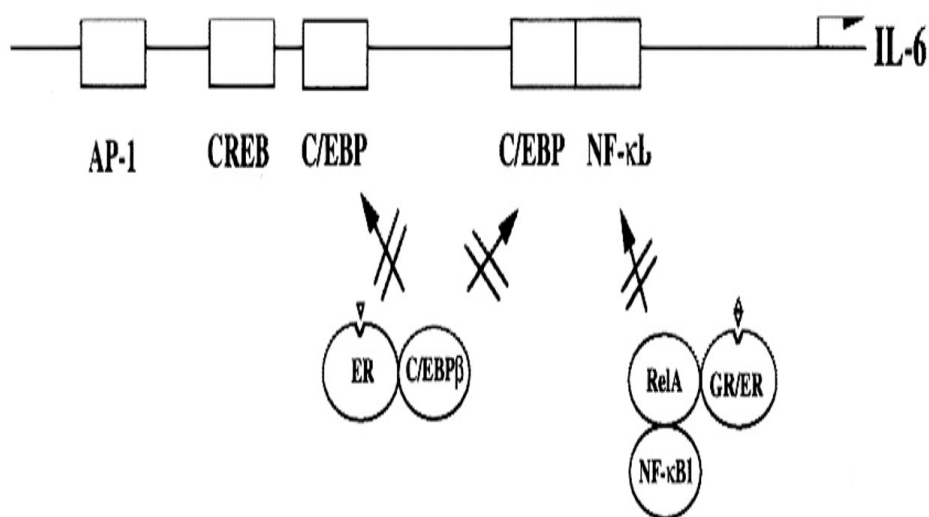
Η Ιντερλευκίνη-6 (συνώνυμα: Ιντερφερόνη 2, παράγοντας διαφοροποίησης των β-κυττάρων, αυξητικός παράγοντας του υβριδώματος κ.λ.π) είναι μια πολυπαραγοντική κυτοκίνη που συμμετέχει στη ρύθμιση της οξείας φλεγμονώδους απάντησης-acute inflammatory response όπως και στην τροποποίηση των ειδικών ανοσολογικών αντιδράσεων (Akira S et al 1993, Muraguchi A et al 1988, Renauld JC et al 1989). Εκτός του ρόλου της σε ανοσολογικές/φλεγμονώδεις διαδικασίες, η Ιντερλευκίνη-6 (IL-6) συμμετέχει σε πολλές βιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός των οστών (Kurihara N et al 1990), η θρομβοποίηση (Hill RJ et al 1991), ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων της επιδερμίδα (Grossman RM et al 1989), η έμμηνος ρύση (Tabibzadeh S et al 1995), η διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων (Satoh et al 1988), η προστασία των νευρικών κυττάρων (Loddick SA et al 1998), η γήρανση (Ershler et al 1993) , και ο καρκίνος (Zhang XG et al 1989).

Η IL-6 είναι μια κυτοκίνη που παράγεται από έναν αριθμό διαφορετικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιημένων μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων. Οι λειτουργίες της IL6 μεσολαβούνται μέσω ενός ειδικού συμπλόκου υποδοχέα που αποτελείται έναν προσδέτη ο οποίος είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στη μεμβράνη και αναφέρεται ως gp80 (IL6R) και ένα προσδέτη ο οποίος είναι επίσης μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στη μεμβράνη η οποία μεταβιβάζει σήματα και αναφέρεται ως gp130(IL6ST). Μετά από σύνδεση της IL-6 στον IL6R, το σύμπλοκο IL6/IL6R συνδέεται στην υπομονάδα του υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης gp130. Επιπλέον, διαλυτές μορφές της γλυκοπρωτεΐνης gp80 (sIL6R) και της γλυκοπρωτεΐνης μεταβίβασης σημάτων gp130 (sgp130) μπορούν να παίξουν ένα ρόλο στη σηματοδότηση της IL6 : η sIL6R μπορεί να συνδέεται στην IL6 για να ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του που ξεκινά από το gp130. Σε αντίθεση με αυτό το αγωνιστικό χαρακτηριστικό της sIL6R, ένας αρνητικός ρυθμιστικός μηχανισμός έχει προταθεί για την sgp130, που συνδέεται στην IL6 και μ' αυτό τον τρόπο αναστέλλει τη δράση της (Keller ET et al 1996).

1.4.2 ΓΟΝΙΔΙΟ IL-6

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 (Bowcock AM et al 1988, Yasukawa K et al 1987). Το mRNA αυτού του γονιδίου έχει μέγεθος 1.3 kb. Μετάφραση του RNA της IL-6 και μετα-μεταφραστικές διαδικασίες οδηγούν στη δημιουργία μιας πρωτεΐνης 21-28 kDa με 184 αμινοξέα στην ώριμή της μορφή

(May LT et al 1988). 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 κάπα Β (NFκβ), του πυρηνικού παράγοντα της (nuclear factor IL-6/NF-IL6), της πρωτεΐνης ενεργοποίησης-1 (activator protein-1/AP-1), και του στοιχείου πολλαπλής απάντησης (multiple response element/MLE) μεσολαβούν την ενεργοποίηση του υποκινητή της IL-6. Από την άλλη τα στεροειδή (γλυκοκορτικοειδή, οιστρογόνα και ανδρογόνα) αλλά και το στοιχείο ελέγχου του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma control element-RCE) οδηγούν σε αναστολή της δράσης του υποκινητή της. Εκτός της πολυπλοκότητας που προκύπτει από την οργάνωση του υποκινητή της IL-6, εναλλακτικό μάτισμα του mRNA της IL-6 αυξάνει τη φαινοτυπική της αστάθεια (Kestler DP et al 1999).



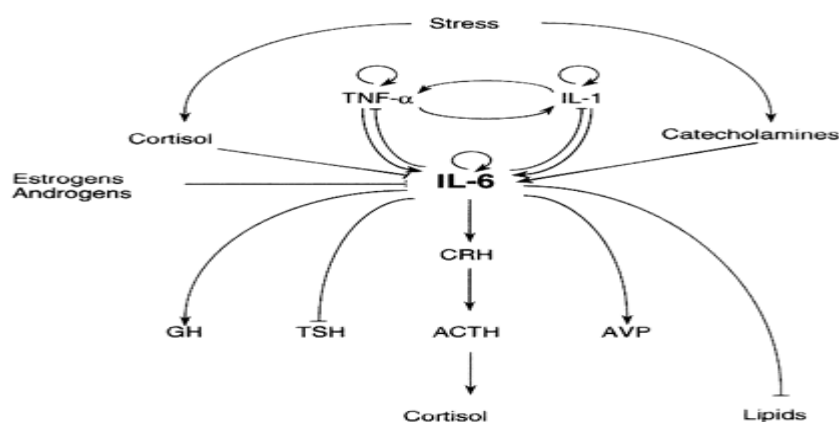
Εικόνα 1.4.1: Μεταφραστική ρύθμιση του υποκινητή της IL-6

1.4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ IL-6

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής εκκρίνονται με την παρακάτω σειρά TNFα, IL-1, IL-6 (Van Snick et al 1990, Hirano et al 1998). Η IL-6 στη συνέχεια αναστέλλει την έκκριση TNF-α και IL-1 (Kopf M et al 1994), ενώ ενεργοποιεί την παραγωγή ουσιών οξείας φάσης (acute-phase reactants) από το ήπαρ (Xing Z et al 1998) και ενεργοποιεί τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα (Mohamed-Ali V et al 1997) ώστε να συμβάλλει στον έλεγχο της φλεγμονής. Με αυτή την έννοια, η IL-6 αποτελεί τόσο μια προ-φλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη. Παράγεται όχι μόνο από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος αλλά και τα βοηθητικά

αυτού, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά, τους ινοβλάστες, τα μαστοκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Παράγεται επίσης από τους οστεοβλάστες, τα στηρικτικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα κερατινοκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα Leydig των όρχεων, κύτταρα της υπόφυσης, τα στηρικτικά κύτταρα του ενδομητρίου, οι τροφοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (Xing Z et al 1998, Vgontzas AN et al 1997, Orban Z et al 1999, Bastard JP et al 2000, Febbraio MA et al 2002, Jonsdottir IH et al 2000, Schobitz B et al 1993, Shizuya K et al 1998).

Σε απουσία φλεγμονής, ένα μεγάλο ποσοστό της IL-6 στην κυκλοφορία προέρχεται από το λιπώδη ιστό (Mohamed-Ali V et al 1997) και τα επίπεδα της IL-6 στο αίμα σχετίζονται με τη μάζα του λιπώδους ιστού (Mohamed-Ali V et al 1997, Vgontzas AN et al 1997) με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που συσχετίζεται η λεπτίνη. Τόσο μακροπρόθεσμες όσο και βραχυπρόθεσμες αλλαγές στην πρόσληψη τροφής επηρεάζουν την ποσότητα IL-6 και στο λιπώδη ιστό αλλά και στην κυκλοφορία (Orban Z et al 1999, Bastard JP et al 20007). Τα επίπεδα IL-6 στην κυκλοφορία αυξάνονται 100 φορές κατά τη διάρκεια της άσκησης. Αυτό το εύρημα αντικατοπτρίζει την αυξημένη έκφραση της IL-6 στο σκελετικό μυ αλλά δεν φαίνεται να σχετίζεται με τη μυϊκή βλάβη (Febbraio MA et al 2002, Jonsdottir IH et al 2000). Επιπλέον η IL-6 και ο υποδοχέας της εκφράζονται στον πυρήνα του υποθαλάμου (discrete hypothalamic nuclei) που έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της σύστασης σώματος (Febbraio MA et al 2002, Jonsdottir IH et al 2000). Στην εικόνα 1.4.1 παρουσιάζεται η ρύθμιση της έκκρισης της IL-6.



Εικόνα 1.4.2: Ρύθμιση της έκκρισης και των ενδοκρινικών δράσεων της IL-6.

1.4.4 ΔΡΑΣΕΙΣ IL-6

Η IL-6 έχει πλειοτροπική δράση με αποτέλεσμα να εμπλέκεται σε πληθώρα διεργασιών μέσα στον οργανισμό. Συγκεκριμένα αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα και βρίσκεται σε αρνητικό έλεγχο από τα γλυκοκορτικοειδή. Διεγείρει την έκκριση 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. Η IL-6 ρυθμίζεται αρνητικά από τα οιστρογόνα και ανδρογόνα και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοπόρωσης που παρατηρείται σε καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική απορρόφηση όπως η έλλειψη στεροειδών και ο υπερπαραθυρεοειδισμός. Συνοπτικά, οι δράσεις της φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στην εικόνα 1.4.1 παρουσιάζεται η ρύθμιση των ενδοκρινικών δράσεων της IL-6.

Αιματολογικές

Πολλαπλασιασμός των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων

Κυτταρική αύξηση των κυττάρων του μυελώματος και του πλάσματοκυτώματος

Ανοσολογικές

Διαφοροποίηση και ωρίμανση των B κυττάρων (B-cell stimulating factor-2)

Παραγωγή ανοσοσφαιρίνης από τα β- κύτταρα

Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των T-κυττάρων

Ηπατικές

Διέγερση ηπατικών κυττάρων

Διέγερση πολλών γονιδίων της απάντησης οξείας φάσης (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, απτοσφαιρίνης, ινωδογόνο)

Νευρολογικές

Διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων

Καρδιακές

Υπερτροφία μυοκαρδίου

Ενδοκρινικές

Πρόκληση θερμογένεσης (ενδογενές πυρετογόνο)

Διέγερση υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα

Διέγερση της έκκρισης βασοπρεσσίνης

Διέγερση της έκκρισης αυξητικής ορμόνης

Καταστολή του θυρεοειδούς

Μείωση των επιπέδων λιπιδίων στο πλάσμα

Οστεοπόρωση (μεταεμμηνοπαυσική είτε οφειλόμενη σε υπογοναδισμό)

(Keller et al 1996)

Παρακάτω, θα αναφερθούν εκτενώς κάποιες πιθανές περιοχές δράσης της IL-6 με ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον.

1.4.4 Α) IL-6 και αθηροθρομβωτικός κίνδυνος

Η IL-6 αυξάνει τη βασική πρόσληψη γλυκόζης, τροποποιεί την ινσουλινοευαισθησία, αυξάνει την έκκριση των μορίων προσκόλλησης από το ενδοθήλιο και αυξάνει την ηπατική έκκριση ινωδογόνου έχοντας επίσης προ-πηκτικές επιδράσεις στα αιμοπετάλια (Yudkin JS et al 1999). Τόσο η IL-6 όσο και ο TNF-α αναστέλλουν τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και διεγείρουν τη λιπόλυση (Van Snick J 1990, Greenberg AS et al 1992). Υπερέκφραση του TNF-α στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων σχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα του υποδοχέα της ινσουλίνης, που πιθανώς είναι το αποτέλεσμα η φυσιολογικής φωσφορυλίωσης του υποστρώματος της ινσουλίνης -1 (insulin-substrate-1) και του ίδιου του υποδοχέα της ινσουλίνης (Hotamisligil GS et al 1996). Το αν η IL-6 ασκεί τις ίδιες δράσεις στη σηματοδότηση της ινσουλίνης ερευνάται, αλλά η IL-6 έχει βρεθεί να αναστέλλει τη σύνθεση του γλυκογόνου ως επακόλουθο της διέγερσης της ινσουλίνης από απομονωμένα ηπατοκύτταρα (Kanemaki T et al 1998).

Από την άλλη, η σημασία των αυξημένων επιπέδων IL-6 σε παχύσαρκους δεν είναι ευρέως αποδεκτή αλλά υπάρχουν δεδομένα ότι σε πρωτοσχηματιζόμενες αθηρωματικές πλάκες, τα μακροφάγα αφρώδη κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων εκφράζουν IL-6, προτείνοντας ότι αυτή η κυτοκίνη έχει ένα ρόλο στην αρχική φάση της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας (Yudkin JS et al 2000).

Επιπλέον, τα επίπεδα IL-6 στην κυκλοφορία διεγείρουν τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα που με τη σειρά του σχετίζεται με την κεντρική παχυσαρκία, την υπέρταση και την ινσουλινοαντίσταση.

Η IL-6 παράγεται από τον υποδόριο λιπώδη ιστό in vivo, κυρίως σε παχύσαρκους. Τα αυξημένα επίπεδα IL-6 που παρατηρούνται στην παχυσαρκία διεγείρουν την ηπατική

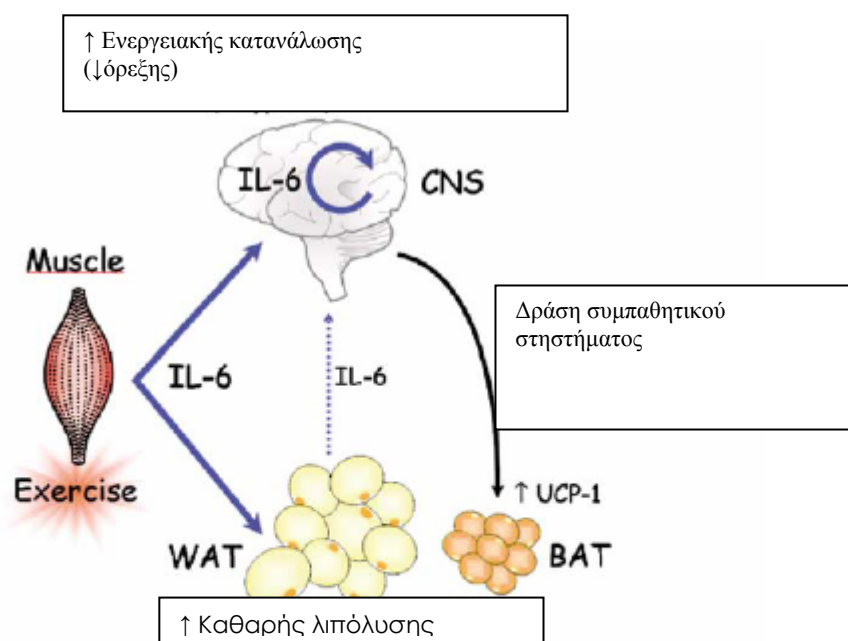
παραγωγή και έκκριση C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και ρυθμίζουν τα επίπεδα της CRP στην κυκλοφορία (Harris TB et al 1999). Σε μια πληθυσμιακή μελέτη με υγιείς ηλικιωμένους ο Harris και οι συνεργάτες παρατήρησαν ότι άνθρωποι με υψηλότερα επίπεδα IL-6 και CRP είχαν 2.6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από καρδιαγγειακή νόσο από ότι αυτοί με φυσιολογικά επίπεδα ακόμη κι όταν οι συμπαράγοντες παρέμεναν σταθεροί. Μακροπρόθεσμη συνεχής έγχυση IL-6, ελαττώνει την παραγωγή TNF-a και IL-6 αλλά διεγείρει την ηπατική παραγωγή CRP και ινωδογόνου (Vgontzas AN et al 1998).

1.4.4 B) Η IL-6 ως σήμα εναπόθεσης λίπους και ο ρόλος της στο μεταβολισμό

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 τη διαφοροποίησή της. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι αρκετές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-6, η IL-1 και η IL-8 και χημοκίνες μπορεί να συμμετέχουν στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής σε φυσιολογικές συνθήκες. Η IL-6 ανάμεσα στις άλλες κυτοκίνες 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 (κυρίως ο περιτοναϊκός) παράγει περίπου το ένα τρίτο της IL-6 που υπάρχει στην κυκλοφορία(41). Η IL-6 επίσης έχει την ικανότητα 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 συσχετίζεται και η λεπτίνη. Όσο αφορά στον εγκέφαλο, η IL-6 ευνοεί ένα αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο αφού μειώνει την πρόσληψη τροφής και ενισχύει την ενεργειακή κατανάλωση. Η IL-6 και ο υποδοχέας της στα τρωκτικά εκφράζεται στον υποθάλαμο (dorsomedial και ventromedial), δύο περιοχές του εγκεφάλου που συμμετέχουν στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου και υπάρχουν αρκετά δεδομένα ότι αυτή η παρατήρηση μπορεί να επεκταθεί και στους ανθρώπους (Cancello R et al 2004).

Επιπλέον, τόσο οι μακροπρόθεσμες όσο και οι βραχυπρόθεσμες αλλαγές στην ενεργειακή πρόσληψη επηρεάζουν την ποσότητα IL-6 τόσο στο λιπώδη ιστό όσο και στην κυκλοφορία (Orban Z et al 1999, Bastard JP et al 2000). Επίσης, η IL-6 και ο υποδοχέας της εκφράζονται στον πυρήνα του υποθαλάμου που έχει ένα τεκμηριωμένο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της σύστασης σώματος (Schobitz B et al 1993, Shizuya K et al 1998).

Κάποια από τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με τις μεταβολικές επιδράσεις της IL-6 φαίνονται στην εικόνα 1.4.3. Η IL-6 φαίνεται να αυξάνει την ενεργειακή κατανάλωση και να μειώνει τη λιπώδη μάζα μέσω επιδράσεων σε επίπεδο Κεντρικού Νευρικού συστήματος (Wallenius V et al 2002, Wallenius K et al 2002), πιθανώς στον υποθάλαμο (Schobitz B et al 1993, Shizuya K et al 1998). 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 (uncoupling protein-1/UCP-1) στο φαιό λιπώδη ιστό κι επομένως αυξάνει τη θερμογένεση (Li G et al 2002). Συγκριτικά χαμηλά επίπεδα IL-6 απελευθερώνονται από το λευκό λιπώδη ιστό και μπορεί να φτάσουν το ΚΝΣ (Mohamed-Ali V et al 1997). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις από πειραματικές μελέτες και μελέτες σε ανθρώπους πως επιπλέον ποσότητες IL-6 παράγονται από το ίδιο το ΚΝΣ (Schobitz B et al 1993, Shizuya K et al 1998), υποδεικνύοντας ότι η τοπικά παραγόμενη IL-6 συμμετέχει στον έλεγχο της μεταβολικής λειτουργίας.



Εικόνα 2: Σύνοψη των πιθανών σημείων και μηχανισμών δράσης της ανστολής του σωματικού λίπους από την IL-6. UCP-1: , BAT: φαιός λιπώδης ιστός , WAT: λευκός λιπώδης ιστός

1.4.4 Γ) IL-6 ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Μεγάλες ποσότητες IL-6 παράγονται από τον ανθρώπινο λιπώδη ιστό τόσο *in vivo* (Orban Z et al 1999) όσο και *in vitro*, κυρίως από το σπλαχνικό περιτοναϊκό λιπώδη ιστό (Fain et al 2004, Fried et al 1998). Επιπλέον, κάποια από την IL-6 που παράγεται από τον ανθρώπινο υποδόριο λιπώδη ιστό εμφανίζεται στην κυκλοφορία (Mohamed-Ali V et al 1997). Θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων IL-6 στην κυκλοφορία και της ινσουλινοαντίστασης, *in vivo*, έχει αναφερθεί από τους Kern και συνεργάτες (Kern et al 2001) ενώ οι Bastard και συνεργάτες (Bastard et al 2002) βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του λιπώδους ιστού σε IL-6 και της ινσουλινοαντίστασης, όσο 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 (Carey & Febbraio 2004, Pedersen et al 2003). Παρόλα αυτά, στο ήπαρ η IL-6 διαταράσσει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης (Klover et al 2005). Οι ερευνητές Rotter Sopasakis και συνεργάτες (Rotter Sopasakis et al 2004) παρόμοια βρήκαν ότι η έγχυση για 2 ώρες μεγάλων ποσοτήτων IL-6 σε αρουραίους τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του μεταγωγέα σημάτων και ενεργοποιητή της μεταγραφής (STAT 3) στο ήπαρ, στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό χωρίς να επηρεάσει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης σε αυτούς τους ιστούς. Μια εξήγηση γι' αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι ότι η IL-6 δεν επεμβαίνει στις δράσεις της ινσουλίνης αλλά κατά καιρούς ενεργοποιεί την δημιουργία αντι-ινσουλινικών παραγόντων.

Συνοπτικά, όπως υποστηρίχθηκε από τους (Yudkin et al 2000), 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 (Heinrich et al 1990). Η απάντηση οξείας φάσης μπορεί να οδηγήσει σε 10-100 φορές αύξηση της CRP στον ορό αλλά και των Α αμυλοϊδών πρωτεϊνών 1 και 2 στον ορό (serum amyloid A proteins 1 & 2 - SAA1 & 2) όπως επίσης και σε κάπως μικρότερες αυξήσεις στην αποσφαιρίνη. Η IL-6 έχει φανεί να είναι ο κυριότερος παράγοντας διέγερσης για την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ (Heinrich et al., 1990).

Η παχυσαρκία σε ανθρώπους οδηγεί σε αυξήσεις στα επίπεδα της IL-6 στην κυκλοφορία. Επίσης η παχυσαρκία έχει φανεί να συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα στον ορό SAA 1 & 2 (Poitou C et al 2005, van Dielen FM et al 2001), αποσφαιρίνης (Hannerz et al 1995, Scriba et al 1979), και CRP (Engeli S et al 2003, Festa A et al 2001, Ouchi N et al 2003, Pannacciulli N

et al 2001, van Dielen FM et al 2001). 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 IL-6 στην πυλαία κυκλοφορία. Έχει επίσης επιβεβαιωθεί ότι η IL-6 αυξάνει την παραγωγή και την έκκριση CRP, απτοσφαιρίνης και αμυλοειδών πρωτεϊνών από το ήπαρ. Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο πώς οι αυξήσεις στις πρωτεΐνες οξείας φάσης σχετίζονται με την πρόκληση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και αθηροσκλήρυνσης κι ακόμη αν η IL-6 είναι η μοναδική κυτοκίνη που παίρνει μέρος στη ρύθμισή τους.

1.4.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ IL-6-174G>C

Οι Fishman και συνεργάτες το 1988 αναγνώρισαν ένα πολυμορφισμό στο γονίδιο της Ιντερλευκίνης στη θέση -174 και βρήκαν ότι η συχνότητα για το C αλληλίο ήταν 40% ενώ η συχνότητα για το G αλληλίο ήταν 60% σε υγιή άτομα (Fishman D et al 1988). Ο πολυμορφισμός IL-6 -174G>C είναι ένας σημαντικός υποψήφιος πολυμορφισμός στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης. Βρίσκεται κοντά σε ένα σημείο πρόσδεσης για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και η αντικατάσταση των νουκλεοτιδίων δημιουργεί ένα πιθανό σημείο πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα (Fishman D et al 1988).

Αρκετοί πολυμορφισμοί που οφείλονται σε αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο (single-nucleotide polymorphisms-SNPs) έχουν περιγραφεί στην περιοχή του γονιδίου της IL-6 (10). Ο πολυμορφισμός IL-6-174G>C που βρίσκεται στην αρνητική ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της IL-6 έχει βρεθεί να επιδρά στη μεταφραστική ρύθμιση. Αρκετές μελέτες για τη βιολογική σημασία αυτού του πολυμορφισμού έχουν δείξει ότι οι πιο συνηθισμένοι -174C- απλότυποι είναι ασθενέστεροι ενισχυτικοί παράγοντες της μεταγραφής από ότι αυτοί που περιλαμβάνουν το -174G (Fishman D et al 1998, Terry CF et al 2000, Rivera-Chavez FA et al 2003, Acalovschi D et al 2003). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι ο πολυμορφισμός IL-6 -572G>C είναι ένας ισχυρότερος ενισχυτικός παράγοντας για τη μεταγραφή της IL-6 (Ferrari SL et al 2003).

1.4.6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

Στη μετά-ανάλυση που δημοσιεύτηκε το 2007 από τους Qi L και συνεργάτες σε 26944 άτομα και στόχευε στην εύρεση συσχετίσεων της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου της IL-6 και της παχυσαρκίας, βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός IL-6 -174G>C δεν συσχετιζόταν με την παχυσαρκία (abstract) (Qi L et al 2007).

Το 2006 οι ίδιοι ερευνητές πραγματοποίησαν μια άλλη μετά-ανάλυση για τη συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού πολυμορφισμός IL-6 -174G>C και του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη σε 5383 διαβητικούς και 12069 μάρτυρες από 11 μελέτες. Βρήκαν ότι ο γονότυπος GG δε σχετιζόταν σημαντικά με τον κίνδυνο εμφάνισης Διαβήτη τύπου 2 συγκρινόμενος με το γονότυπο GC ή CC. Επίσης αναφέρουν ότι η συχνότητα ήταν του C αλληλίου ήταν 0,43 για τις γυναίκες και 0,44 για τους άντρες(Qi L et al 2007).

Μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη είναι αυτή των Wernstedt και συνεργατών σε 2 μελετούμενους πληθυσμούς που προέρχονταν από 2 διαφορετικές μελέτες. Η ερευνητική τους υπόθεση στηριζόταν στο ότι η μειωμένη παραγωγή IL-6 που προκαλείται, μεταξύ άλλων, από το -174 C αλληλίο μπορεί να συμβάλλει στην παχυσαρκία στους ανθρώπους οπότε και μελέτησαν αυτή την υπόθεση σε δύο πληθυσμούς. Ο ένας πληθυσμός περιλάμβανε υπέρτασικά άτομα (n=485, μέσος όρος ηλικίας 57 έτη) ενώ ο άλλος περιλάμβανε 74 μη παχύσαρκες υγιείς γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 20 χρόνια λιγότερο. Η συχνότητα για τα -174 C και G αλληλίου ήταν 0,47 και 0,53 αντίστοιχα. Επίσης βρέθηκε ότι το C αλληλίο σχετιζόταν με υψηλότερο ΔΜΣ και υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης και στους 2 μελετούμενους πληθυσμούς. Οι ερευνητές λοιπόν αναφέρουν ότι αφού το -174 C αλληλίο μειώνει την παραγωγή IL-6 που κι αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε μειωμένη ενεργειακή κατανάλωση και συσσώρευση σωματικού λίπους, οπότε πιθανώς και μέσω αυτού του μηχανισμού να εξηγείται το εύρημά τους (Wernstedt I et al 2004) .

Έχει δημοσιευτεί μια άλλη έρευνα η οποία στόχευε να διερευνήσει τη σχέση του πολυμορφισμού IL-6 -174G>C με τη μακρόχρονη πρόσληψη σωματικού βάρους. Σε 334 άτομα φυσιολογικού βάρους ($20 < \Delta\text{ΜΣ} < 25 \text{ kg/m}^2$) και 334 παχύσαρκα ($\Delta\text{ΜΣ} > 30 \text{ kg/m}^2$) που ταίριαζαν στην ηλικία και στο φύλο, οι οποίοι προέρχονταν από τη μελέτη EPIC-Potsdam ανακάλεσαν τις αλλαγές του σωματικού βάρους από 25 χρονών μέχρι τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Ο πολυμορφισμός IL-6 -174G>C συσχέτιστηκε ισχυρά με την παχυσαρκία ($p=0,026$) ενώ ο σχετικός κίνδυνος για τα άτομα με γονότυπους GC ή CC για παχυσαρκία ήταν 1,19 (95% επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας: 0,84 με 1,68, $p=0.323$) και 1,91 (95% επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας: 1,19 με 3,08, $p=0,026$) αντίστοιχα. Η ανακαλούμενη πρόσληψη σωματικού βάρους επίσης διέφερε σημαντικά ανάλογα με το γονότυπο ($p=0,044$) και ήταν πιο εμφανής στα άτομα με γονότυπο CC, προτείνοντας όπως αναφέρουν οι ερευνητές, ότι ο πολυμορφισμός IL-6 -174G>C μπορεί να σχετίζεται με επιρρέπεια ή τροποποίηση της παχυσαρκίας και της πρόσληψης λίπους (Kerstin Klipstein-Grobusch et al 2006). Υπάρχουν

αρκετές μελέτες που έχουν ερευνήσει τη σχέση του πολυμορφισμού IL-6 -174G>C με το Διαβήτη τύπου 2. Για να ξεκαθαρίσουν περαιτέρω αυτή τη σχέση, όπως αναφέρουν οι ερευνητές αυτής της μελέτης, μελέτησαν τα δεδομένα από περισσότερους από 20000 συμμετέχοντες από 21 δημοσιευμένες και μη δημοσιευμένες μελέτες. Τα συλλεχθέντα στοιχεία αντιπροσώπευαν 8 διαφορετικές χώρες (Γερμανία, Δανία, Σουηδία, Φιλανδία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ελλάδα, Ισπανία) κάνοντας αυτή την ανάλυση μία από τις μεγαλύτερες. Οι γονότυποι GC και CC (σχετικός κίνδυνος 0,91, $p=0.037$) συσχετίστηκαν με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 η οποία αντιστοιχεί σε μια τροποποίηση του κινδύνου κατά 9%. Παρόλα αυτά, αναφέρουν ότι χρειάζονται κι άλλες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί αυτό το εύρημα (Huth C et al 2006).

Στο πλαίσιο του προγράμματος NUGENOB (Nutrient- Gene interactions in human obesity) δημοσιεύτηκε από τους Santos JL και συνεργάτες μια μελέτη στη οποία ερευνούνταν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις γονιδίων – διατροφής στην παχυσαρκία. Σε 549 ενήλικες παχύσαρκες γυναίκες μελετήθηκαν 42 πολυμορφισμοί 26 υποψήφιων γονιδίων για την παχυσαρκία σε σχέση με την πρόσληψη διαιτητικών φυτικών ινών, το λόγο πολυακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων και το ποσοστό της ενέργειας που προέρχεται από λίπος. Για τον πολυμορφισμό IL6 -174 G>C δεν βρέθηκαν αλληλεπιδράσεις με τα διατροφικά δεδομένα που μελετήθηκαν ενώ η συχνότητα του C αλληλίου ήταν 0,44 (Santos JL et al 2006).

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου των πολυμορφισμών TNFα-308G>A, PPARγPro12Ala και IL-6-174G>C σε δείκτες παχυσαρκίας, καθώς και η μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτών, με συστατικά της διατροφής, σε παιδιά πέμπτης και έκτης δημοτικού.

3.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο πληθυσμός της μελέτης GENDAI (Gene-Diet Attica Investigation on childhood obesity) αποτελείται από μαθητές πέμπτης και έκτης τάξης Δημοτικού του Νομού Αττικής. Έγκριση για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης λήφθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και από το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο.

Όσο αφορά στις περιοχές από τις οποίες προέρχεται ο μελετούμενος πληθυσμός, έγινε προσπάθεια ώστε υπάρξει συμμετοχή σχολείων από διάφορες περιοχές, και τελικά να υπάρχουν συμμετέχοντες από ένα μεγάλο εύρος του Νομού Αττικής. Η διαδικασία επαφής με τα σχολεία γινόταν ως εξής: Μεταξύ των μηνών Νοέμβριος 2005 και Ιούνιος 2006, πριν από τη συμμετοχή του σχολείου στην έρευνα γινόταν ταχυδρομική αποστολή μιας ενημερωτικής επιστολής προς τους διευθυντές, η οποία συνοδευόταν από την επίσημη έγκριση του Υπουργείου Παιδείας με πλήρεις πληροφορίες όσο αφορά τους αντικειμενικούς σκοπούς και τη μεθοδολογία της έρευνας. Κατόπιν, ακολουθούσε μια τηλεφωνική επικοινωνία κατά την οποία ο διευθυντής μετά την δική του έγκριση, καθόριζε το πότε θα ξεκινούσαν οι διαδικασίες της έρευνας στο σχολείο του. Εν συνεχεία, ακολουθούσαν τρεις διαδοχικές συναντήσεις με τους μαθητές του σχολείου. Η αρχική συνάντηση γινόταν υπό τη μορφή παρουσίασης στους μαθητές της πέμπτης και έκτης τάξης και ως σκοπό είχε την κατανοητή, για τους μαθητές, παρουσίαση της έρευνας όπου και διαβεβαιώνονταν για το απόρρητο των δεδομένων και κατανοούσαν ότι η συμμετοχή ήταν εθελοντική. Οι γονείς ή κηδεμόνες των παιδιών που ήθελαν να συμμετέχουν υπέγραφαν ένα συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής. Πρόσκληση για συμμετοχή στην έρευνα έλαβαν 2492 μαθητές. Οι λόγοι για τους οποίους κάποιοι μαθητές δεν συμμετείχαν συμπεριλαμβάνουν την έλλειψη ενδιαφέροντος ή την άρνηση συμμετοχής, κάποια χρόνια ή προσωρινή ασθένεια και απουσία από το σχολείο ή μετακόμιση της οικογένειας κατά τη διάρκεια της έρευνας (Papoutsakis C et al 2007). Συγκεκριμένα, από το Νοέμβριο του 2005 ως τον Ιούνιο του 2006 έγινε τηλεφωνική και γραπτή επικοινωνία με 48 σχολεία, από τα 593 της Αττικής, τα οποία και επικύρωσαν τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Αναλυτικά, συμμετείχαν :

- 13 σχολεία από το Δήμο Καλλιθέας
- 2 σχολεία από το Δήμο Μοσχάτου
- 4 σχολεία από το Δήμο Νέας Σμύρνης
- 6 σχολεία από το Δήμο Αμαρουσίου
- 3 σχολεία από το Δήμο Ηρακλείου
- 4 σχολεία από το Δήμο Αθήνας

- 1 σχολείο από το Δήμο Πεύκης
- 1 σχολείο από το Δήμο Αλίμου
- 2 σχολεία από το Δήμο Ιλίου
- 2 σχολεία από το Δήμο Χαλανδρίου
- 5 σχολεία από το Δήμο Νέας Ιωνίας
- 1 σχολείο από το Δήμο Αγίου Δημητρίου
- 2 σχολεία από το Δήμο Χολαργού
- 2 σχολεία από το Δήμο Περιστερίου
-

Το σύνολο των μαθητών, οι οποίοι προέρχονταν από αυτά τα 48 σχολεία, ήταν 3124 ενώ ο αριθμός των μαθητών ο οποίος σε πρώτη φάση έδωσε ενυπόγραφο συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής ήταν 1207 (ποσοστό αρχικής συμμετοχής=38,6%). Οι μαθητές οι οποίοι τελικά συμμετείχαν στη μελέτη ήταν 1138 οπότε και το τελικό ποσοστό συμμετοχής ανέρχεται σε 36,4%.

Στη συνέχεια της ερευνητικής διαδικασίας, γινόταν μια δεύτερη προσωπική συνάντηση του ερευνητή με τα παιδιά που εθελοντικά συμμετείχαν στην έρευνα. Η συνάντηση αυτή, είχε ως σκοπό την πλήρη διατροφική αξιολόγηση με ανάκληση 24ώρου, ανάκληση φυσικής δραστηριότητας, ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (food frequency questionnaire- FFQ) και επιπλέον ερωτηματολογίων όσο αφορά τις διατροφικές συνήθειες, ιατρικό ιστορικό και οικογενειακά κοινωνικοοικονομικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά. Η τελευταία επικοινωνία με τους μαθητές ήταν τηλεφωνική όπου πραγματοποιούνταν μια δεύτερη ανάκληση 24ώρου. Η ερευνητική ομάδα απαρτιζόταν από επαγγελματίες διατροφής και παιδίατρους, εκπαιδευμένους κατάλληλα για τη λήψη μετρήσεων.

3.2 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ

Για την μέτρηση των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών ζητήθηκε από τα παιδιά να φορούν ελαφρύ ρουχισμό. Το σωματικό βάρος των παιδιών μετρήθηκε με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας στο πλησιέστερο 0,5 kg. Το ύψος μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0,5 cm με φορητό αναστημόμετρο προσαρμοσμένο σε κατακόρυφο τοίχο. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος υπολογίστηκε με τον τύπο $\Delta\text{ΜΣ} = \text{ΒΑΡΟΣ (kg)} / \text{ΥΨΟΣ}^2 (\text{m}^2)$.

Οι περιφέρειες μέσης, ισχίων και μέσου βραχίονα μετρήθηκαν στο πλησιέστερο 0,1 cm με πλαστική μεζούρα και ο δείκτης λόγου περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων (WHR) υπολογίστηκε με τον τύπο $WHR = \text{περιφέρεια μέσης (cm)} / \text{περιφέρεια ισχίων (cm)}$. Η περιφέρεια μέσου βραχίονα (mid-upper arm circumference) μετρήθηκε σε γυμνό βραχίονα στη μισή απόσταση μεταξύ ακρώμιου οστού της ωμοπλάτης και την εσωτερική κορυφή του αγκώνα. Η περιφέρεια μέσης, μετρήθηκε απουσία ρουχισμού, στο μέσο της απόστασης μεταξύ του τελευταίου πλευρού και του άκρου του λαγονίου οστού, περίπου στο ύψος του αφαλού. Η περιφέρεια ισχίων μετρήθηκε στο σημείο που παρουσίαζε την μεγαλύτερη περίμετρο.

Για την εκτίμηση του σωματικού λίπους μετρήθηκαν οι δερματικές πτυχές τρικεφάλου και υποωμοπλατιαίου μυός στο πλησιέστερο 0,2 mm με δερματοπτυχόμετρο Lange (Cambridge Scientific Instruments, Cambridge, MA, USA). Οι μετρήσεις έγιναν στην δεξιά πλευρά του σώματος (δεξιός βραχίονας). Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Οι δερματοπτυχές τρικεφάλου προσδιορίστηκαν ως εξής: με μεζούρα μετρήθηκε κάθετα στο πίσω μέρος του βραχίονα η απόσταση μεταξύ του κατώτερου ορίου του ακρώμιου οστού και του ωλέκranου (εσωτερικής κορυφής του αγκώνα), ενώ το χέρι σχηματίζει ορθή γωνία. Με ένα στυλό σημειώθηκε το σημείο αυτό και στη συνέχεια ο εξεταστής ανασήκωσε το δέρμα κατά 1 εκ. άνω του μέσου και κρατώντας με το ένα χέρι του την δερματοπτυχή και με το άλλο χέρι το δερματοπτυχόμετρο, πραγματοποίησε την μέτρηση προσέχοντας να περιλαμβάνεται όλη η δερματοπτυχή αφήνοντας απ' έξω τον μυϊκό ιστό. Η υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή μετρήθηκε δύο εκατοστά κάτω από την έσω γωνία του οστού της ωμοπλάτης σε μία νοητή διαγώνια γραμμή (45° με το οριζόντιο ή/και κάθετο επίπεδο).

Τα παιδιά κατηγοριοποιήθηκαν ως ελλειποβαρή, φυσιολογικού σωματικού βάρους, υπέρβαρα ή παχύσαρκα σύμφωνα με τις οριακές τιμές του ΔΜΣ που έχουν αναπτύξει οι Cole et al και έχει υιοθετήσει η Διεθνής Ομάδα Δράσης για την Παχυσαρκία (IOTF). Οι συγκεκριμένες τιμές προτιμήθηκαν από τα οριακά ποσοστημόρια των καμπυλών ανάπτυξης του CDC γιατί οι καμπύλες αυτές 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 για το υπερβάλλον βάρος (25 kg/m²) και την παχυσαρκία (30 kg/m²) (Cole et

al 2000, Cole et al 2007). Για την αξιολόγηση του ποσοστού σωματικού λίπους χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις του Slaughter ξεχωριστά για αγόρια και κορίτσια οι οποίες βασίζονται στην μέτρηση του αθροίσματος της δερματοπτυχής τρικέφαλου και της υποωμοπλατιαίας δερματοπτυχής (Slaughter et al 1984, Slaughter et al 1988).

3.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Από κάθε παιδί λήφθηκαν ~3ml αίματος για:

- Ο γενική εξέταση αίματος (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, MCV, MCH, MCHC),
- Ο απομόνωση πλάσματος για ορμονικές εξετάσεις,
- Ο απομόνωση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Επίσης λήφθηκαν ~7ml αίματος για:

- Ο βιοχημικές εξετάσεις (γλυκόζη ορού, ολική χοληστερόλη ορού, HDL-χοληστερόλη, LDL-χοληστερόλη, τριγλυκερίδια ορού)

3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρωτόκολλο της απομόνωσης του DNA από λευκά αιμοσφαίρια είναι το εξής:

Ημέρα 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος μετά από φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
2. Μεταφορά στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων σε σωλήνα Falcon 15ml
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (1X) μέχρι τελικό όγκο ~15ml
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20 min (ανακίνηση και κατά την διάρκεια των 20min)
5. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm)
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου
7. Προσθήκη 10ml Lysis I (1X) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος
8. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm)
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου
10. Προσθήκη 1,5ml διαλύματος Lysis II και ισχυρή ανακίνηση
11. Προσθήκη 25μl πρωτεΐνάσης K (20mg/dl)
12. Προσθήκη 75μl SDS 20% και ήπια ανάδευση

13. Επώαση στους 56° C σε υδατόλουτρο

Ημέρα 2^η

1. Προσθήκη 0,5ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec
2. Φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
3. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
4. Μεταφορά υπερκείμενου με πλαστική Pasteur σε σωλήνα Falcon 50ml που περιέχει 12-15ml αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή την φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε rollerbench.
5. Απομάκρυνση κουβαριού DNA από το διάλυμα με πιπέτα και τοποθέτηση για πλύσιμο σε eppendorf 1,5ml που έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει 70% αιθανόλη.
6. Προσθήκη 3-4 σταγόνες οξικό αμμώνιο
7. Φυγοκέντρηση 14.000g, 15min
8. Άδειασμα υπερκείμενου και στέγνωμα για 20-30 min έως ότου δεν υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης
9. Προσθήκη 0,2-0,5ml TE και επώαση 10min, 60° C.

Μετά την απομόνωση το DNA ελέγχθηκε για την παρουσία των 3 μελετούμενων πολυμορφισμών με 3 διαφορετικές μεθόδους αντίστοιχα.

3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

3.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για τον πολυμορφισμό TNFα-308G>A

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR για τον πολυμορφισμό TNFα-308G>A, η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει την γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για την αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μίας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά

μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72° C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95° C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

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

2.Σύνδεση εκκινητών (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.

3.Επιμήκυνση (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5' – 3' κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72° C.

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

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

Αντιδραστήρια

❖ Εκκινητές:

- Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την ακολουθία
5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'

και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 390μl διαλύματος TE, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl (stock solution)

- Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία
5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'

και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 548 μl διαλύματος TE έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl (stock solution)

- Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραίωση 1:8 (working solutions: 3μl stock + 21μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20° C.
- ❖ Τaq πολυμεράση: Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση που είχε συγκέντρωση 5U/μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C.
- ❖ PCR buffer: Η συγκέντρωση του ήταν 10X και περιείχε: 200mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C.
- ❖ Διάλυμα MgCL₂: Η συγκέντρωση του ήταν 50mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία-20° C.
- ❖ Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs): Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.
- ❖ Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

Διαδικασία

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

Πίνακας 3.1: ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ TNFα -308 G>A		
Αντιδραστήρια	Όγκος	Συγκέντρωση
Taq Πολυμεράση	0,3μl	1,5 Units
PCR Buffer	1,25μl	1 X
MgCl ₂	1,0μl	1,5mM
dNTPs	0,2μl	20mM
Δεξιός Εκκινητής	0,3μl	3,75pmol
Αριστερός Εκκινητής	0,3μl	3,75pmol
Enhancer	1,25μl	
Νερό απεσταγμένο και αποστειρωμένο	7,6μl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένο erppendorf των 0,2ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erppendorf τοποθετούνται 12,5μl από το μίγμα με πιπέτα και με το ίδιο αποστειρωμένο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα erppendorfs με το μίγμα διατηρούνται στον πάγο.

3. Σε κάθε erppendorf προστίθενται 0,3μl DNA από τα δείγματα. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 12,8μl.

4. Τα erppendorfs τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000rpm) για λίγα δευτερόλεπτα (short spin) ώστε να αναμιχθεί το μίγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες.

5. Τα erppendorfs μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα:

Βήμα 1° : 95°C για 3 min

Βήμα 2° : 94°C για 30 sec

Βήμα 3° : 57°C για 30 sec

Βήμα 4° : 72°C για 45 sec

Επανάληψη βημάτων 2,3,4 επί 33 φορές

Βήμα 5° : 72°C για 5 min

Βήμα 6° : Αποθήκευση στους 4° C

Έλεγχος Επιτυχίας PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και

την συγκέντρωση της αгарόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 1% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 kb.

Το πήκτωμα της αгарόζης 1% παρασκευάζεται ως ακολούθως:

1. Ζυγίζονται 0,5 gr αгарόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 50 ml διαλύματος TBE 0,5 X (Tris Borate Acid)
3. Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αгарόζη.
4. Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο.
5. Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό «χτένες» ώστε να δημιουργηθούν «πηγάδια» καθώς πηζει το πήκτωμα της αгарόζης.
6. Το διάλυμα αφήνεται να πηξει για ~10 min
7. Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αгарόζης, αφαιρούνται οι «χτένες» από αυτό και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

Μετά την παρασκευή του πηκτώματος γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση ως ακολούθως:

1. Σε parafilm τοποθετούνται 2μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης και φυγοκεντρώνονται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
2. Μεταφέρονται 5μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και τοποθετείται 5μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4° C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20° C.
3. Στην συνέχεια μεταφέρεται κάθε δείγμα με την χρωστική σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται και ο μάρτυρας.

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

3.5.2 Πέψη με Περιοριστική Ενδονουκλεάση για τον πολυμορφισμό TNFα-308G>A

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, και περιοριστικές επειδή η δραστηριότητα τους περιορίζεται σε «ξένο» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες («διαβάζονται» το ίδιο και από τις ίδιες κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA).

Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μία περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα (Λεκανίδου P 1998).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στην θερμοκρασία επώασης και στην σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στην σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαραγόντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT, κ.α) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην

αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν την δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους -20° C μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (Λεκανίδου P 1998).

Για τον πολυμορφισμό TNFα -308G/A χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Nco I (26). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου είναι

5' C / C A T G G 3'

3' G G T A C / G 5'

Αντιδραστήρια

- ο Ένζυμο Nco I σε συγκέντρωση 2500 U/ml το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C
- ο Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) σε συγκέντρωση 1X, το οποίο περιείχε 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol και είχε pH 7,5 στους 25°C.
- ο Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.
- ο BSA

Διαδικασία

1. Παρασκευή μίγματος αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει η πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 3.2: ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΠΕΨΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ TNFα -308 G/A		
Αντιδραστήριο	Όγκος	Συγκέντρωση
Ένζυμο NcoI	0,3 μl	1,25 U
Buffer 2	1,0 μl	1 x
BSA	1,0 μl	
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	3,7 μl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα erppendorfs του 1,5ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erppendorf μεταφέρονται 6μl από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip. Τα erppendorfs με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.
3. Στα erppendorfs προστίθενται 4μl από το προϊόν της PCR κάθε δείγματος. Ο συνολικός όγκος μίγματος για την πέψη είναι 10μl.
4. Τα erppendorfs τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37° C για 12 ώρες.

Έλεγχος του προϊόντος της πέψης

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αгарόζης 4%. Για την προετοιμασία του πηκτώματος ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης 2% για τον έλεγχο επιτυχίας PCR. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

- ο Ζυγίζονται 4γραμ αгарόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- ο Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~20min

Μετά την παρασκευή του πηκτώματος γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση ως ακολούθως:

1. Αφού αποσυρθούν τα erppendorfs με το προϊόν της πέψης από τους 37° C μετά το πέρας των 12 ωρών, προστίθενται στο καθένα 5μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης. Σε καθαρό erppendorf τοποθετείται 1μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp) και 5μl χρωστικής.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (short spin) για την ανάμιξη του προϊόντος της πέψης με την χρωστική και του μάρτυρα με την χρωστική.
3. Στην συνέχεια μεταφέρεται κάθε δείγμα με την χρωστική σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται και ο «μάρτυρας».

Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος γίνεται στα 150V για περίπου 40 min. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πηκτώμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα 2 αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον «μάρτυρα» και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό σε κάθε δείγμα.

3.5.3 Διαλύματα

Tris Borate Acid 5X (TBE 5X)

- ο 54 gr Tris Base
- ο 27,5 gr Boric Acid
- ο 20ml EDTA 0,5 M
- ο ~800ml απεσταγμένο νερό
- ο ανάδευση
- ο έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt

EDTA 0,5M

- ο 186,1 gr EDTA $2H_2O$
- ο ~700ml απεσταγμένο νερό
- ο ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH υπό ανάδευση στο 8
- ο προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt

Tris-EDTA (TE)

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

Tris Borate Acid 1X (TBE 1X)

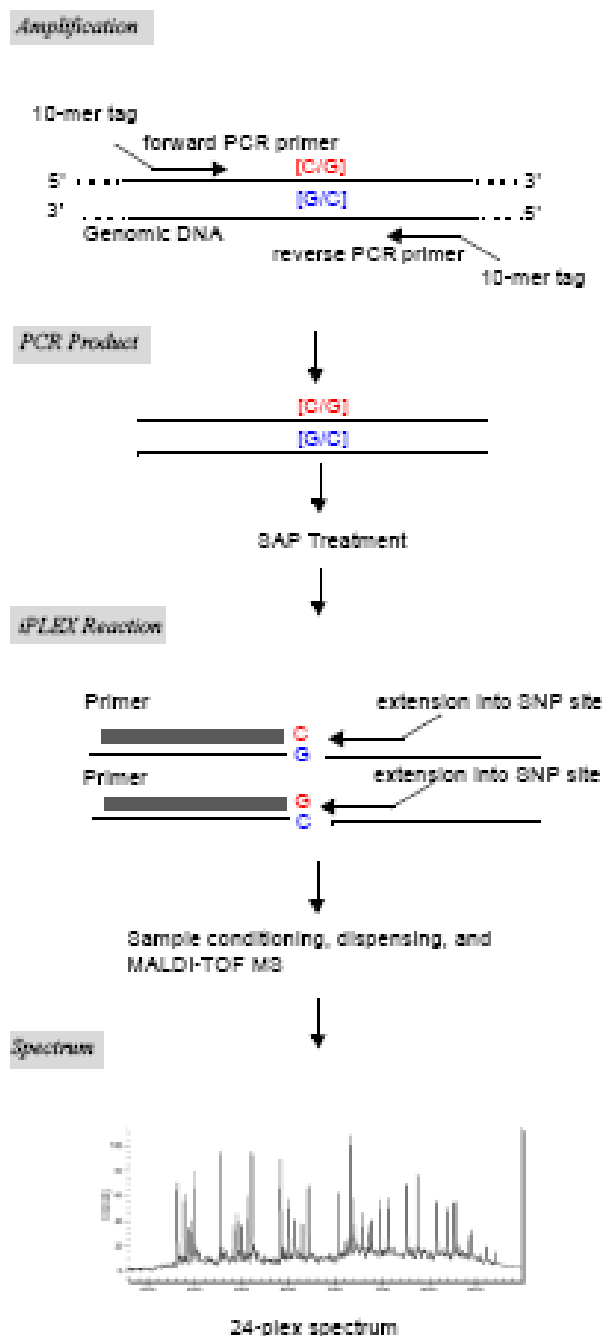
- ο 200ml TBE 5X
- ο προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt
- ο ανάδευση

Βρωμιούχο Αιθίδιο (10mg/ml)

- ο 10mg EtBr
- ο 10ml αποστειρωμένο νερό
- ο ανάδευση σε vortex
- ο φύλαξη στους 4° C

3.5.4 Μέθοδος iPLEX για την ανίχνευση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12 Ala

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12 Ala χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System, η οποία πραγματοποιήθηκε σε άλλο εργαστήριο.



Εικόνα 3.1. Η μέθοδος iPLEX

❖ Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης είναι τα παρακάτω:

1. Παρασκευή μίγματος αντιδραστηρίων της PCR.

Οι ποσότητες αυτών απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3.3: ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ PPAR γ Pro12ALA		
Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση σε 5 μ L	Όγκος (1 αντίδραση, μ L)
Απιονισμένο νερό		1850
PCR buffer με MgCl ₂ (10x)	1,25x	0,625
MgCl ₂ (25x)	1,625 mM	0,325
dNTP mix (25mM)	500 μ L	0,100
Primer Mix (500nM)	100nM	1000
DNA (5-10 ng/ μ L)	5-10ng/ αντίδραση	1000
Hotstar Taq (5U/ μ L)	0,5U/ αντίδραση	0,100
Σύνολο		5000

2. Απαλό vortex των δειγμάτων

3. Στο θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα:

- i. 94° C για 15 min
 - ii. 94° C για 20 sec
 - iii. 56° C για 30 sec
 - iv. 72° C για 1 min
 - v. 72° C για 3 min
 - vi. Αποθήκευση στους 4° C.
- Επανάληψη βημάτων ii, iii, iv επί 45 φορές

Έγιναν πολλαπλές αντιδράσεις PCR για 24 γονίδια σε πλάκες PCR των 384^{ov} πηγαδιών και η συνολική αντίδραση ήταν 6μl. Η PCR αποτελεί μια μέθοδο η οποία χρησιμεύει στην

εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά, μήκους 20-30 βάσεων, χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για την *in vitro* σύνθεση του DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των 4 τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72° C, ενώ παραμένει ενεργή μέχρι τη θερμοκρασία των 95° C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη 3 αντιδράσεων:

- **Αποδιάταξη (template denaturation).** Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94- 96° C).
- **Σύνδεση εκκινητών (primer annealing).** Οι δυο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δυο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
- **Επιμήκυνση (primer extension).** Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την κατεύθυνση 5' προς 3', χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση του πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72° C.

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

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

❖ **Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός του προϊόντος. Τα στάδια που ακολουθούνται είναι τα εξής:**

1. Ανάμιξη των παρακάτω αντιδραστηρίων για τον καθαρισμό του προϊόντος

Πίνακας 3.4: ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	
Αντιδραστήριο	Όγκος (1 αντίδραση, μL)
Απιονισμένο νερό	1,530
10x SAP buffer	0,170
SAP enzyme (1U/ μL)	0.300
Σύνολο	2000

2. Προσθήκη 2 μL του μίγματος SAP σε κάθε 5 μL της αντίδρασης PCR
3. Ελαφρή ανακίνηση ή vortex των δειγμάτων
4. Επώαση του προϊόντος SAP στο θερμικό κυκλοποιητή
 - i. 94° C για 20 min
 - ii. 85° C για 5 min
 - iii. Αποθήκευση στους 4° C.

❖ **Μετά τον καθαρισμό του δείγματος ακολουθεί η αντίδραση iPLEX, τα βήματα της οποίας περιγράφονται παρακάτω.**

1. Ανάμιξη των αντιδραστηρίων για την αντίδραση iPLEX. Οι ποσότητες αυτών των αντιδραστηρίων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 3.5: ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ iPLEX		
Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση σε 9μ L	Όγκος (1 αντίδραση, μL)
Απιονισμένο νερό		0,755
iPLEX buffer (10x)	0,222x	0,200
iPLEX termination mix	1x	0,200
Primer Mix (7μM: 14μM)	0,625uM: 1,25uM	0,804
iPLEX enzyme	1x	0,041
Σύνολο		2000

2. Κύκλος της αντίδρασης iPLEX στον οποίο γίνονται 2 βήματα σε ένα πρόγραμμα 200 μικρών κύκλων στο θερμικό κυκλοποιητή όπως φαίνεται παρακάτω
- 94° C για 30 sec
 - 94° C για 5 sec
 - 52° C για 5 sec
 - 80° C για 5 sec
 - 72° C για 3 min
 - Αποθήκευση στους 4° C.
- Επανάληψη βημάτων ii, iii, iv επί 40 φορές
Επανάληψη βημάτων iii, iv επί 5 φορές

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι τα παρακάτω:

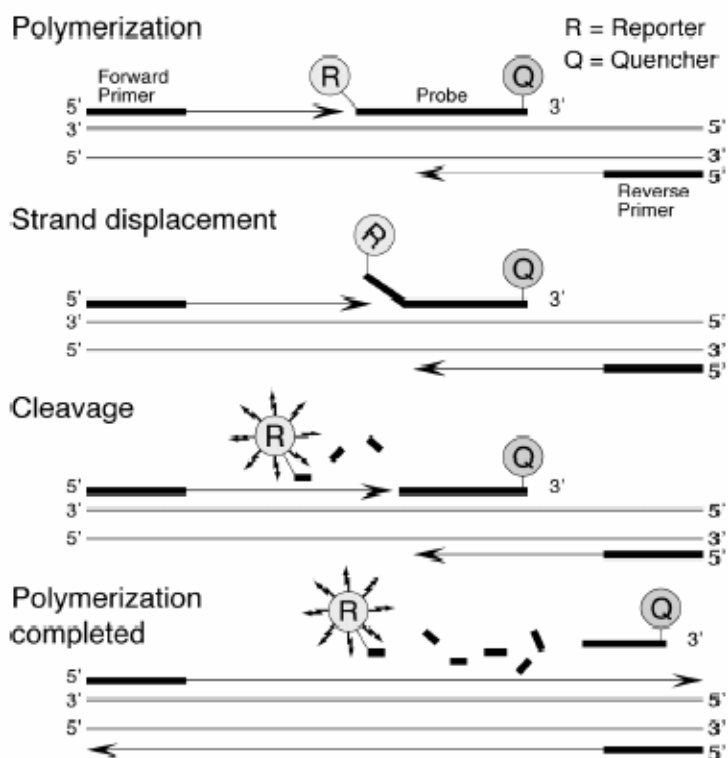
- Επιτυχής ταυτόχρονη ανάλυση μέχρι και για 24 διαφορετικούς πολυμορφισμούς (έχει γίνει και για 29 πολυμορφισμούς με παρόμοια αποτελέσματα, αδημοσίευτα δεδομένα).
- Πρακτικός και αποτελεσματικός σχεδιασμός της μεθόδου έτσι που να επιτρέπει την πολλαπλή ανάλυση με περιορισμένα μέσα.
- Ακρίβεια σε υψηλότερα επίπεδα ανάλυσης
- Σημαντικά μειωμένο κόστος για κάθε γονότυπο (χαμηλότερο από 5 cents για κάθε γονότυπο)

3.5.5 Μέθοδος Διαχωρισμού Αλληλίων για την ανίχνευση του πολυμορφισμού IL-6 - 174G>C

Η μέθοδος διαχωρισμού αλληλίων (Allelic Discrimination Assay) βασίζεται στη μέθοδο Taqman. Η μέθοδος Taqman αποτελεί εξέλιξη της κλασικής μεθόδου ανίχνευσης πολυμορφισμών με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση. Με τη μέθοδο Taqman μπορούν να προσδιοριστούν γνωστές μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί σε μια αλληλουχία, ακόμη κι αν πρόκειται για αλλαγή μιας μόνο βάσης.

Χρησιμοποιούνται δύο ανιχνευτές υβριδισμού συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία-στόχο, για παρουσία και απουσία του πολυμορφισμού. Οι ανιχνευτές φέρουν χρωστική φθορισμού είτε 6-κάρβοξυ φλουορεσκίνη (FAM), είτε τη χρωστική VIC. Ο κάθε ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του την χρωστική φθορισμού, ενώ στο 3' άκρο του φέρει μια άλλη χρωστική η τετραμέθυλροδαμίνη (TAMRA) που ονομάζεται παρεμποδιστής (quencher). Εξαιτίας της παρουσίας του παρεμποδιστή η χρωστική στο 5' άκρο δε δίνει σήμα φθορισμού. Πέρα από τους ανιχνευτές, χρησιμοποιούνται και εκκινητές όπως γίνεται στην κλασική PCR. Η αντίδραση γίνεται σε θερμικό κυκλοποιητή, με βήματα αντίστοιχα αυτών της συμβατικής PCR. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing), υβριδοποιούνται και οι ανιχνευτές. Στη συνέχεια, κατά το στάδιο της επιμήκυνσης (extension) η πολυμεράση υδρολύει τους υβριδοποιημένους ανιχνευτές, οπότε ο παρεμποδιστής απομακρύνεται από τη χρωστική, κι έτσι η τελευταία εκπέμπει σήμα φθορισμού (Εικόνα 3.2). Το σήμα αυτό αυξάνεται σε κάθε κύκλο, καθώς αυξάνεται ποσοτικά το προϊόν της αντίδρασης, και στο τέλος μετράται από ειδικό μηχάνημα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλάκα 96 ή 384 θέσεων επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων. Στο τέλος της αντίδρασης δέσμη laser συλλέγει από κάθε κελί το φθορίζον σήμα (που αποτελεί συνδυασμό των εκπομπών από κάθε μια χρωστική FAM και VIC) και με τη βοήθεια ειδικών αλγορίθμων μετράται η συμμετοχή κάθε χρωστικής φθορισμού στο συνολικό σήμα που λαμβάνεται. Τελικά, δημιουργείται από το μηχάνημα ένα διάγραμμα στο οποίο φαίνεται το σήμα φθορισμού που λήφθηκε από κάθε κελί της πλάκας. Αυξημένη εκπομπή χρωστικής FAM ή VIC υποδηλώνει ομοζυγωτία για το συγκεκριμένο αλληλόμορφο για το οποίο ο ανιχνευτής φέρει την αντίστοιχη χρωστική, ενώ ισόποση εκπομπή και από τις δύο χρωστικές υποδηλώνει ετεροζυγωτία (Watson DE et al 1995).

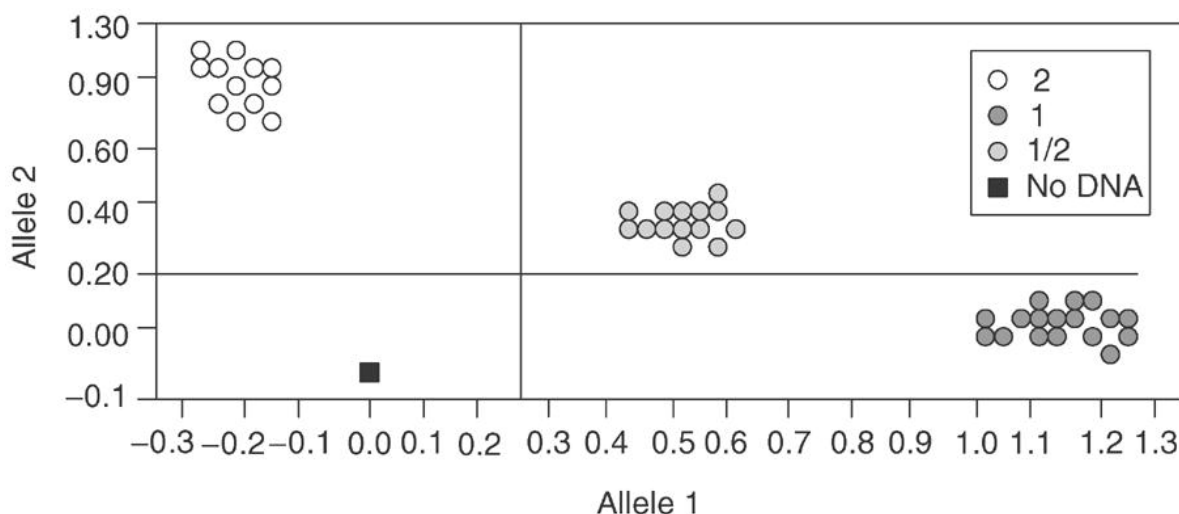


Εικόνα 3.2: Στην εικόνα φαίνεται η αρχή της μεθόδου Taqman. Όταν ο ανιχνευτής υβριδισμού (probe) δεν έχει υβριδοποιηθεί ακόμη στη συμπληρωματική του αλληλουχία ο παρεμποδιστής (quencher) εμποδίζει την εκπομπή σήματος φθορισμού από τη χρωστική φθορισμού (reporter). Όταν η πολυμεράση υδρολύσει τους υβριδοποιημένους ανιχνευτές εκπέμπεται σήμα φθορισμού.

Στην αντίδραση πέρα από τα δείγματα συμπεριλαμβάνονται και 3 διαφορετικοί μάρτυρες:

1. ένα κελί στο οποίο περιέχεται μίγμα των αντιδραστηρίων χωρίς όμως DNA. Από το κελί αυτό η εκπομπή φθορισμού οφείλεται σε ανιχνευτές που είναι ενωμένοι με παρεμποδιστή.
2. ένα κελί στο οποίο τοποθετείται δείγμα ομόζυγο για το ένα αλληλόμορφο. Το σήμα φθορισμού αντιπροσωπεύει την χρωστική που είναι συνδεδεμένη με το αντίστοιχο αλληλόμορφο.
3. ένα κελί στο οποίο τοποθετείται δείγμα ομόζυγο για το άλλο αλληλόμορφο. Το σήμα φθορισμού αντιπροσωπεύει την χρωστική που είναι συνδεδεμένη με το αλληλόμορφο αυτό.

Η εικόνα που λαμβάνεται τελικά από το μηχάνημα και με την οποία γίνεται ο προσδιορισμός των γονοτύπων φαίνεται παρακάτω (Watson DE et al 2005)(εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Στην εικόνα φαίνεται το διάγραμμα με το οποίο γίνεται ο προσδιορισμός των γονοτύπων. Στον κάθετο άξονα φαίνονται τα δείγματα τα ομόζυγα για ένα υποθετικό αλληλόμορφο 2 (allele 2), ενώ στον οριζόντιο άξονα τα δείγματα τα ομόζυγα για ένα υποθετικό αλληλόμορφο 1 (allele 1). Ενδιάμεσα βλέπουμε τα ετερόζυγα άτομα. Το μαύρο τετράγωνο στην αρχή των αξόνων αντιστοιχεί στο κελί στο οποίο δεν έχουμε τοποθετήσει DNA.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων έχει ως εξής:

1. Τοποθετούνται 10 μ l DNA συγκέντρωσης 5-20 μ l στα κελιά της πλάκας. Αφήνεται να στεγνώσει.
2. Παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex.

Πίνακας 3.5: ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ PCR	
Αντιδραστήριο	Όγκος (1 αντίδραση, μL)
Hot start Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (5U/ μL)	0.05
PCR BUFFER (10X)	1.1
MgCl ₂ (50mM)	0.65
dNTP's	0.45
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (100mM)	0.0325
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (100mM)	0.0325
VAM (100mM)	0.0325
FIC (100mM)	0.0325
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	7.12

3. 5 μL μίγματος τοποθετούνται σε κάθε κελί της πλάκας.
4. Η πλάκα μεταφέρεται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα:

ΒΗΜΑ 1^ο: 37°C για 10 min

ΒΗΜΑ 2^ο: 95°C για 10 min

ΒΗΜΑ 3^ο: 95°C για 15 seconds

ΒΗΜΑ 4^ο: 60°C για 1 min

ΒΗΜΑ 5^ο: (Βήμα 3^ο και Βήμα 4^ο) x 49

ΒΗΜΑ 7^ο: 25°C αποθήκευση

Μετά το τέλος της αντίδρασης η πλάκα μεταφέρεται στο μηχάνημα στο οποίο θα γίνει η ταυτοποίηση των γονοτύπων με τη χρήση ειδικού λογισμικού. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το (ABI PRISM 7700). Τελικά σε αρχείο excel λαμβάνεται λίστα με τον αριθμό των κελιών και τον γονότυπο που αντιστοιχεί σε κάθε κελί.

3.6. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η διατροφική αξιολόγηση των παιδιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ερωτηματολογίων και τη μέθοδο της ανάκλησης 24ώρου. Συγκεκριμένα τη δεύτερη φορά επίσκεψης στο σχολείο δίδονταν σε κάθε παιδί από ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων(FFQ), το οποίο βασίστηκε σε αυτό της Rockett (Rockett HR et al 1997) στο οποίο λαμβάνονταν πληροφορίες σχετικά με το πόσο συχνά κατανάλωσε τα αναγραφόμενα 116 τρόφιμα τη χρονιά που μας πέρασε. Επίσης δίδονταν ένα ερωτηματολόγιο διατροφικών συνηθειών στο οποίο περιγράφονται πόσο συχνά συνηθίζει το παιδί να καταναλώνει πρωινό, μεσημεριανό, βραδινό, πρόχειρο φαγητό, συνθήκες που επικρατούν την ώρα του φαγητού, συγκεκριμένες συμπεριφορές που συνοδεύουν το γεύμα και αν κάνει τώρα δίαιτα. Η ανάκληση 24ώρου πραγματοποιούνταν την ημέρα που γινόταν η αιμοληψία στο σχολείο και στα πλαίσια της ατομικής συνέντευξης κάθε παιδιού. Κάθε ερευνητής που αναλάμβανε ένα παιδί έπρεπε να είναι διαιτολόγος, να έχει εκπαιδευτεί για αυτή τη διαδικασία με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο, να έχει μπροστά του προπλάσματα και εικόνες τροφίμων, χάρακα και δείγματα διαφόρων μεγεθών κουπών και κουταλιών. 3-10 ημέρες αργότερα πραγματοποιούνταν τηλεφωνικά η δεύτερη ανάκληση 24ώρου ολοκληρώνοντας τη συλλογή διατροφικών πληροφοριών με τη μέθοδο αυτή (Frank GC et al 1977). Στη συνέχεια τα δεδομένα από τις δυο ανακλήσεις καταχωρούνταν στο ειδικό λογισμικό Nutritionist Pro, version 2.2(Axxya Systems-Nutritionist Pro, Stafford, TX, USA). Η βάση δεδομένων του Nutritionist Pro εμπλουτίστηκε προσθέτοντας αναλύσεις παραδοσιακών τροφίμων και συνταγών (Trichopoulou A et al 2004,Kafatos A et al 2000) καθώς και τις πληροφορίες για τη διατροφική σύσταση κάποιων τυποποιημένων τροφίμων όπως αυτή παρουσιάζονταν στις ετικέτες των τροφίμων ή παραχωρούνταν μετά από ειδική αίτηση από τις βιομηχανίες τροφίμων. Συνολικά καταχωρήθηκαν 124 συνταγές, 21 παραδοσιακά και 47 τυποποιημένα τρόφιμα.

3.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Η φυσική δραστηριότητα των παιδιών αξιολογήθηκε με ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας. Στο ερωτηματολόγιο τα παιδιά καλούνταν να σημειώσουν όλες τις δραστηριότητες που είχαν κάνει το προηγούμενο 24ωρο από μία λίστα που περιείχε αθλήματα αλλά και άλλες δραστηριότητες όπως δουλειές στο σπίτι, περπάτημα κλπ. Επίσης τα παιδιά σημείωναν την χρονική διάρκεια της δραστηριότητας καθώς και το αν ξεκουράστηκαν λίγο, πολύ ή καθόλου. Τέλος, τα παιδιά κατέγραφαν και τις ώρες που παρακολούθησαν τηλεόραση ή βίντεο ή ασχολήθηκαν με παιχνίδια σε ηλεκτρονική υπολογιστή, βίντεο κλπ την προηγούμενη μέρα.

Τα στοιχεία επεξεργάστηκαν σε ειδικό πρόγραμμα του Microsoft Excel όπου εισάγονταν τα METs της φυσικής δραστηριότητας, η χρονική διάρκεια, ένας συντελεστής ανάλογα με το πόσο κουράστηκε το παιδί, και η χρονική διάρκεια ενασχόλησης με καθιστικές δραστηριότητες. Το πρόγραμμα υπολόγιζε την συνολική χρονική διάρκεια των δραστηριοτήτων και την ενεργειακή κατανάλωση του παιδιού, στοιχεία τα οποία τελικά εισάγονταν στην βάση δεδομένων. (Ainsworth E et al 2000).

3.8 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι γονείς των παιδιών κλήθηκαν να συμπληρώσουν ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με τα δημογραφικά στοιχεία της οικογένειας, δηλαδή την καταγωγή και ηλικία των γονέων, την περιοχή διαμονής, την επαγγελματική τους κατάσταση, το μορφωτικό επίπεδο, την οικογενειακή κατάσταση και την οικονομική κατάσταση. Επίσης το ερωτηματολόγιο περιείχε ένα σκέλος όπου οι γονείς έπρεπε να συμπληρώσουν το βάρος τους, το ύψος τους και την ομάδα αίματος και τέλος ένα σκέλος όπου έπρεπε να δώσουν πληροφορίες σχετικά με το βάρος γέννησης και τον θηλασμό του συμμετέχοντος παιδιού.

3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13.0 for Windows.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το συνολικό δείγμα αποτελούν 1138 άτομα αλλά το σύνολο των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε στα 1132.

Στον πίνακα 4.1 περιγράφονται τα γενικά χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης ανά φύλο. Όσο αφορά στις ανθρωπομετρικές μετρήσεις, ανάμεσα στα δύο φύλα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιφέρεια μέσης, στο λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχύος (WHR) και στην υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή με τα αγόρια να έχουν υψηλότερη περιφέρεια μέσης και WHR συγκριτικά με τα κορίτσια ($70,51 \pm 9,97$ vs. $68,92 \pm 9,61$, και $0,82 \pm 0,08$ vs. $0,79 \pm 0,07$, $p < 0,001$), ενώ η υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή και το %λίπος ήταν υψηλότερο στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια ($11,28 \pm 5,84$ vs. $12,20 \pm 5,98$, $p = 0,00925$, $90 \pm 10,46$ vs. $31,95 \pm 12,34$ $p < 0,001$ αντίστοιχα). Όσο αφορά στο ΔΜΣ παρατηρήθηκε μια τάση ($p = 0,074$) στα αγόρια να έχουν μεγαλύτερο ΔΜΣ συγκριτικά με τα κορίτσια.

Όσο αφορά στις βιοχημικές παραμέτρους, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στις τιμές της γλυκόζης, στα τριγλυκερίδια, στην ολική χοληστερόλη, στην υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) και στην ινσουλινοαντίσταση. Συγκεκριμένα τα αγόρια, συγκριτικά με τα κορίτσια, βρέθηκαν να έχουν υψηλότερες τιμές γλυκόζης ($86,69 \pm 9,08$ vs $85,19 \pm 12,97$, $p = 0,028$), ολικής χοληστερόλης ($189,47 \pm 28,94$ vs $185,01 \pm 31,95$, $p = 0,016$), HDLc ($54,12 \pm 11,41$ vs $51,31 \pm 10,43$, $p < 0,001$). Μία τάση των αγοριών να έχουν υψηλότερες τιμές LDLc παρατηρήθηκε συγκριτικά με τα κορίτσια ($p = 0,070$). Αντίθετα, τα κορίτσια παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα αγόρια ($67,42 \pm 25,60$ vs. $62,06 \pm 24,37$, $p < 0,001$). Επιπρόσθετα, τα κορίτσια φαινόταν να έχουν μεγαλύτερη ινσουλινοαντίσταση (HOMA-IR) σε σχέση με τα αγόρια ($1,72 \pm 1,27$ vs. $1,52 \pm 0,91$, $p = 0,047$).

Επίσης, όσο αφορά στην πρόσληψη μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα δύο φύλα, με τα αγόρια να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές στην ενεργειακή πρόσληψη, στην πρόσληψη πρωτεΐνης, υδατανθράκων, συνολικού λίπους, κορεσμένου, μονοακόρεστου λίπους και διαιτητικών ινών συγκριτικά με τα κορίτσια ($2025,70 \pm 618,71$ vs. $1774,13 \pm 554,40$ $p < 0,001$, $76,19 \pm 65,96$ vs. $65,96 \pm 22,37$ $p < 0,001$, $227,11 \pm 76,98$ vs. $201,60 \pm 68,66$ $p < 0,001$, $91,71 \pm 33,34$ vs.

79,79±31,92 $p<0,001$, 33,67±13,37 vs. 29,00±11,78 $p<0,001$, 33,03 ±15,74 vs. 37,95 ±15,83 $p<0,001$ αντίστοιχα, 16,57 ±9,44 vs. 14,95 ±8,42 $p=0,002$). Τα αγόρια επίσης είχαν υψηλότερες τιμές πρόσληψης ασβεστίου, σε σχέση με τα κορίτσια (1134,38 ±462,69 vs. 961,80 ±358,78 $p<0,001$,). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στην πρόσληψη βιταμίνης Α και C.

Πίνακας 4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά (M±TA) ανά φύλο

	Σύνολο (n= 1132)	Αγόρια (n= 528)	Κορίτσια (n=604)	P-value
Ηλικία (έτη)	11,17±0,66	11,18 ±0,66	11,16 ±0,66	0,626
Συστολική Αρτηριακή πίεση (mm Hg)	120,71±15,07	120,97 ±15,26	120,48 ±14,91	0,585
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	75,27±12,54	75,54 ±13,01	75,03 ±12,12	0,493
Ινσουλινοαντίσταση	1,63 ±1,10	1,52±0,91	1,72±1,27	0,047
Ανθρωπομετρικές μετρήσεις				
ΔΜΣ (kg/m ²)	20,14±3,61	20,34 ±3,55	19,96 ±3,65	0,074
Περιφέρεια μέσης (cm)	68,92±9,89	70,51 ±9,97	67,53 ±9,61	<0,001
Περιφέρεια ισχίων (cm)	85,44±8,96	85,34 ±8,60	85,54 ±9,28	0,708
WHR	0,80±0,07	0,82 ±0,08	0,79 ±0,07	<0,001
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	19,65±7,78	19,38 ±8,22	19,90 ±7,38	0,268
Υποωμοπλατιαία Δερματοπτυχή (mm)	11,77±5,92	11,28 ±5,84	12,20 ±5,98	0,009
Λίπος σώματος (%)	29,15±11,89	25,90 ±10,46	31,95 ±12,34	0,001
Βιοχημικές παράμετροι				
Γλυκόζη (mg/dL)	85,90±11,33	86,69 ±9,08	85,19 ±12,97	0,027
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	64,91±25,16	62,06 ±24,37	67,42 ±25,60	<0,001
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	187,10±30,64	189,47 ±28,94	185,01 ±31,95	0,015
HDLc (mg/dL)	52,63±10,98	54,12 ±11,41	51,31 ±10,43	<0,001
LDLc (mg/dL)	121,48±25,00	122,94 ±23,44	120,21±26,27	0,070
Μακροθρεπτικά συστατικά				
Ενέργεια (kcal)	1891,88±598,44	2025,70±618,71	1774,13±554,40	<0,001
Πρωτεΐνη (gr)	70,60±25,50	76,19±65,96	65,96±22,37	<0,001
Υδατάνθρακες (gr)	213,54±73,75	227,11±76,98	201,60 ±68,66	<0,001
Λίπος (gr)	85,37±33,11	91,71±33,34	79,79±31,92	<0,001
Κορεσμένο λίπος (gr)	31,18±12,76	33,67±13,37	29,00±11,78	<0,001
Μονακόρεστο λίπος (gr)	35,33±15,96	33,03 ±15,74	37,95 ±15,83	<0,001
Διατητικές ίνες (mg)	15,71±8,94	16,57 ±9,44	14,95 ±8,42	0,002

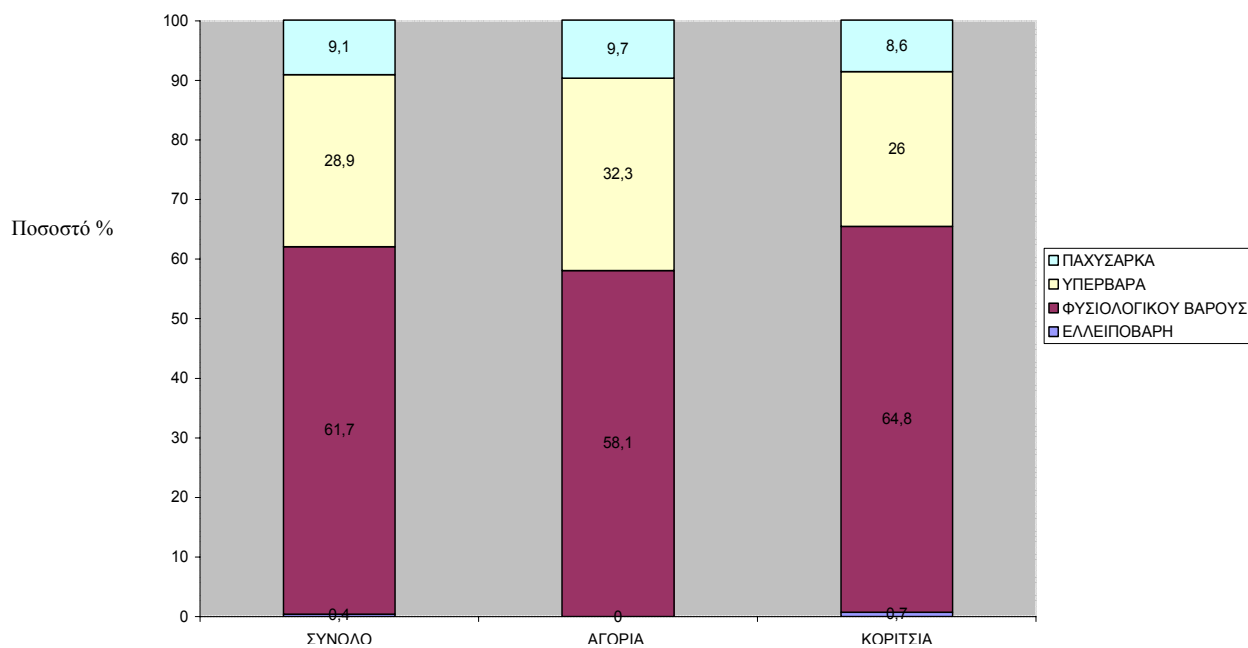
Μικροθρεπτικά συστατικά

Βιταμίνη Α (IU)	4725,80±4678,1	4902,76	4570,08±4732,2	0,234
	9	±4614,07	6	
Βιταμίνη C (IU)	97,69±76,56	97,52 ±76,74	97,83 ±76,48	0,945
Ασβέστιο (mg)	1042,58±419,46	1134,38	961,80 ±358,78	<0,001
		±462,69		

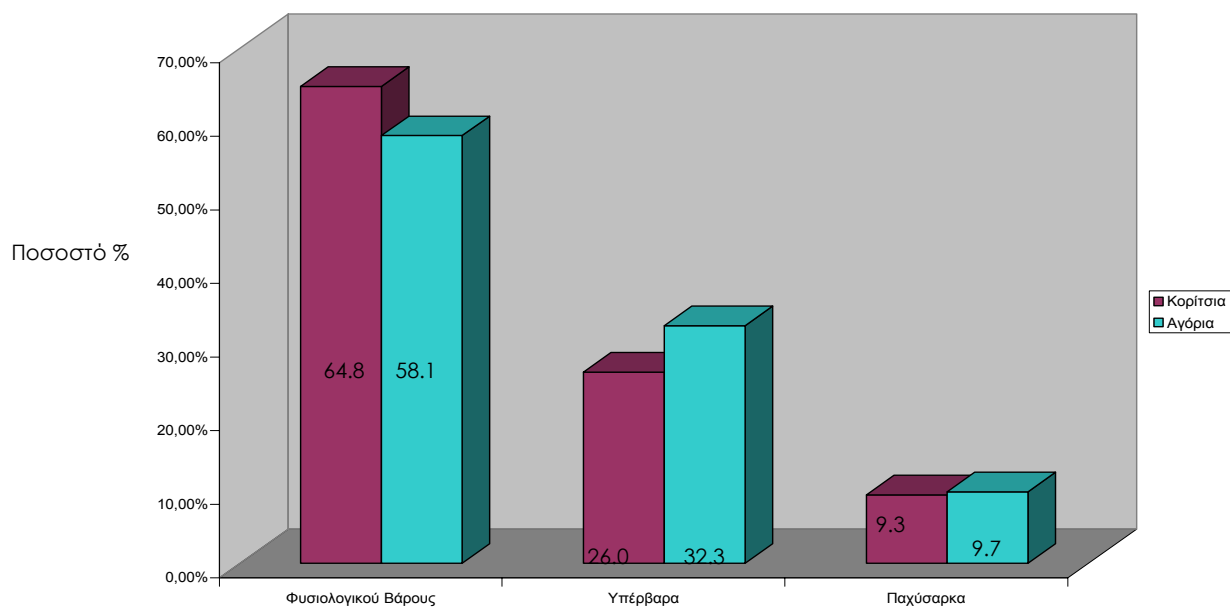
4.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΜΣ

Όσο αφορά στην κατανομή του πληθυσμού της συγκεκριμένης μελέτης ανά κατηγορία ΔΜΣ (ελλειποβαρή, φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρα, παχύσαρκα), 4 παιδιά ήταν ελλειποβαρή, 698 παιδιά ήταν φυσιολογικού βάρους, 327 παιδιά ήταν υπέρβαρα και 103 ήταν παχύσαρκα. Συγκεκριμένα το 0,4% του δείγματος ήταν ελλειποβαρές, το 61,7% φυσιολογικού βάρους, το 28,9% υπέρβαρα και το 9,1% παχύσαρκα, όπως φαίνεται και στο γράφημα 4.1. Μελετώντας ξεχωριστά τα δύο φύλα, κανένα αγόρι δεν ήταν ελλειποβαρές, 306 αγόρια ήταν φυσιολογικού βάρους, 170 ήταν υπέρβαρα και 51 ήταν παχύσαρκα (0%, 43,8%, 32,3% και 9,1% και για το σύνολο των αγοριών). Στα κορίτσια, 4 ήταν ελλειποβαρή, 392 είχαν φυσιολογικό βάρος, 157 ήταν υπέρβαρα και 52 ήταν παχύσαρκα (0,7%, 56,2%, 26,0% και 8,6% αντίστοιχα για το σύνολο των κοριτσιών του δείγματος). Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στα γραφήματα 4.1. Στη συνέχεια, επειδή ο αριθμός των ελλειποβαρών παιδιών ήταν πολύ μικρός (n=4), αυτά συμπεριλήφθηκαν στα παιδιά φυσιολογικού βάρους οπότε και βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα στην κατανομή στις 3 κατηγορίες ΔΜΣ (φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρα, παχύσαρκα) (p=0,050). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στο γράφημα 4.2.

Γράφημα 4.1. Συχνότητες κατηγοριών ΔΜΣ



Γράφημα 4.2. Σύγκριση κατηγοριών ΔΜΣ στα δύο φύλα



4.3 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΒΑΡΑ/ ΠΑΧΥΣΑΡΚΑ ΠΑΙΔΙΑ

Στη συνέχεια κάναμε έναν έλεγχο σύγκρισης των μέσων (T-test) για να εξεταστεί αν υπάρχει διαφορά στην ενεργειακή πρόσληψη και στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ανάμεσα σε παιδιά φυσιολογικού βάρους και σε υπέρβαρα/παχύσαρκα παιδιά. Επιλέχθηκε να γίνει ομαδοποίηση των ελλειποβαρών παιδιών, επειδή ήταν πολύ λίγα, καθώς και των υπέρβαρων με τα παχύσαρκα παιδιά. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.2, τα υπέρβαρα/ παχύσαρκα παιδιά είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές πρόσληψης ενέργειας, υδατανθράκων, λίπους και διαιτητικών ινών σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους ($1750,43 \pm 524,64$ $p=0,002$, vs. $1979,05 \pm 625,17$, $197,39 \pm 65,98$ vs. $223,46 \pm 76,64$ $p=0,010$, $77,98 \pm 29,23$ vs. $223,46 \pm 76,64$ $p=0,010$, $14,95 \pm 8,42$ vs. $16,57 \pm 9,44$ $p=0,002$ αντίστοιχα) ενώ είχαν στατιστικά υψηλότερη πρόσληψη μονοακόρεστου λίπους ($37,95 \pm 15,83$ vs. $33,03 \pm 15,74$, $p<0.001$)

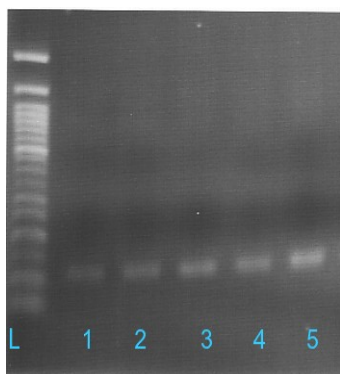
Πίνακας 4.2 Διατροφική πρόσληψη (M $\pm$ TA) σε φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρα/παχύσαρκα παιδιά

	Φυσιολογικού (n= 698)	βάρους Υπέρβαρα/Παχύσαρκα (n=426)	P-value
Ενέργεια (kcal)	1979,05 $\pm$ 625,17	1750,43 $\pm$ 524,64	0,002
Πρωτεΐνη (gr)	72,66 $\pm$ 26,26	67,31 $\pm$ 23,96	0,296
Υδατάνθρακες (gr)	223,46 $\pm$ 76,64	197,39 $\pm$ 65,98	0,010
Λίπος (gr)	89,92 $\pm$ 34,58	77,98 $\pm$ 29,23	0,029
Κορεσμένο λίπος (gr)	33,67 $\pm$ 13,37	29,00 $\pm$ 11,78	0,097
Μονακόρεστο λίπος (gr)	33,03 $\pm$ 15,74	37,95 $\pm$ 15,83	<0,001
Διαιτητικές ίνες (mg)	16,53 $\pm$ 9,49	14,34 $\pm$ 7,41	0,002
Βιταμίνη A (IU)	4862,86 $\pm$ 4363,16	4501,66 $\pm$ 5151,05	0,681
Βιταμίνη C (IU)	101,28 $\pm$ 79,05	92,05 $\pm$ 72,28	0,303
Ασβέστιο (mg)	1066,14 $\pm$ 428,92	1004,93 $\pm$ 401,67	0,360

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ

4.4.1 Αποτελέσματα PCR και Πέψης για τον πολυμορφισμό TNFα-308G>A

Από τα 1132 άτομα του δείγματος η PCR ήταν επιτυχής για τα 620 άτομα. Ο έλεγχος για την επιτυχία της έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.5.1 της Μεθοδολογίας. Ένα τέτοιο πήκτωμα φαίνεται στην εικόνα 4.1. Η ζώνη που φαίνεται σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 107bp, όπως προκύπτει από το μάρτυρα γνωστού Μοριακού Βάρους (100bp Ladder).



Εικόνα 4.1: Έλεγχος επιτυχίας PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

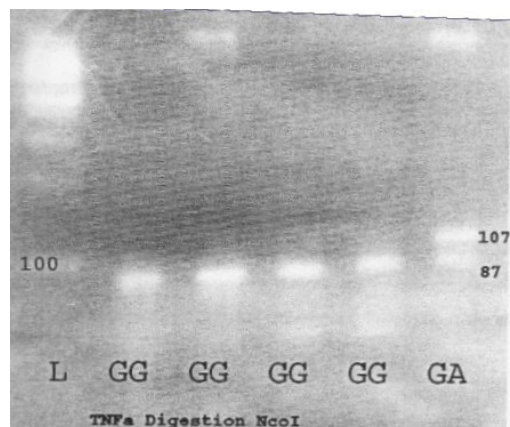
L : ladder 100bp

1-5 : προϊόντα PCR 107 bp

Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο NcoI, υπάρχει στο γονίδιο του TNFα μόνο απουσία του πολυμορφισμού TNFα-308G>A. Μετά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αγαρόζης, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.5.2, έγινε παρατήρησή του στο υπεριώδες. Στα δείγματα DNA που δε φέρνουν τον πολυμορφισμό, το ένζυμο εντοπίζει την αλληλουχία αναγνώρισης και στα δύο αλληλόμορφα και προκύπτουν 2 ζώνες που αντιστοιχούν σε κομμάτια DNA ίσα με 87 bp και 20 bp αλλά στο πήκτωμα παρατηρούμε μία ζώνη που αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 87 bp. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν GG. Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό μόνο στο ένα αλληλόμορφο, το ένζυμο εντόπισε μία αλληλουχία αναγνώρισης στο φυσιολογικό αλληλόμορφο και στο πήκτωμα παρατηρήθηκαν 2 ζώνες που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA ίσα με 107 bp και 87 bp. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν GA, δηλαδή ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό. Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό και στα δύο αλληλόμορφα, το ένζυμο δεν εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στο πήκτωμα παρατηρήθηκε μόνο μία ζώνη που αντιστοιχούσε

σε κομμάτι DNA ίσο με 107 bp (άκοπο κομμάτι). Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν AA, δηλαδή ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Πήκτωμα ελέγχου της πέψης φαίνεται στην εικόνα 4.2, όπου ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχούσε σε κομμάτι DNA ίσο με 100bp.



Εικόνα 4.2: Έλεγχος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης.

L : ladder 100bp

GG: 87bp

GA: 107bp + 87bp

4.4.2 Αποτελέσματα iPLEX Assay για τον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12Ala χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System, όπως περιγράφεται στη ενότητα 3.5.4 της Μεθοδολογίας. Τα άτομα με γονότυπο Pro/Pro χαρακτηρίστηκαν ομόζυγα φυσιολογικά, τα άτομα με γονότυπο Pro/Ala χαρακτηρίστηκαν ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό και τα άτομα με γονότυπο Ala/Ala χαρακτηρίστηκαν ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

4.4.3 Αποτελέσματα Allelic Discrimination Assay για τον πολυμορφισμό IL-6 -174 G>C

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού IL-6 -174 G>C χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Allelic Discrimination Assay όπως αναφέρεται στην ενότητα 3.5.5 της Μεθοδολογίας. Τα άτομα με γονότυπο GG χαρακτηρίστηκαν ομόζυγα φυσιολογικά, τα άτομα με γονότυπο GC

χαρακτηρίστηκαν ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό και τα άτομα με γονότυπο CC χαρακτηρίστηκαν ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

4.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΡΙΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΑΝΑ ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΜΣ

Στα 620 άτομα του δείγματος που προσδιορίστηκε επιτυχώς ο γονότυπος για τον πολυμορφισμό TNFα -308 G>A, βρέθηκαν 525 άτομα με γονότυπο GG (84,7%), 93 άτομα με γονότυπο GA (15,0%) και 2 άτομα με γονότυπο AA (0,3%) (πίνακας 4.3). Η συχνότητα για το A αλληλίο ήταν 0,08 και ο πληθυσμός βρέθηκε σε ισορροπία Hardy- Weinberg ($p=0,60$). Όσο αφορά στον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala, ο γονότυπος προσδιορίστηκε επιτυχώς σε 764 άτομα και βρέθηκε ότι 645 (84,4%) άτομα είχαν γονότυπο CC οπότε ήταν Pro/Pro ομοζυγώτες, 112 (14,7%) άτομα είχαν γονότυπο CG οπότε ήταν Pro/Ala ετεροζυγώτες και 7 (0,9%) άτομα είχαν γονότυπο GG οπότε ήταν Ala/Ala ομοζυγώτες (πίνακας 4.4). Η συχνότητα για το G αλληλίο ήταν 0,08 και ο πληθυσμός ήταν σε ισορροπία Hardy- Weinberg ($p=0,68$).

Για τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C, ο γονότυπος προσδιορίστηκε επιτυχώς για τα 840 άτομα και 487 (58%) απ'αυτά είχαν γονότυπο GG, 304 (26,7%) είχαν γονότυπο GC και 49 (5,8%) είχαν γονότυπο CC (πίνακας 4.5). Η συχνότητα για το C αλληλίο ήταν 0,24 και ο πληθυσμός ήταν σε ισορροπία Hardy- Weinberg ($p=0,98$).

Πίνακας 4.3. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων στο δείγμα για τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A

Γονότυποι					Αλληλόμορφα	
N	GG	GA	AA	Σύνολο	G	A
(%)	525	93	2	620	1143	95
	(84,7)	(15,0)	(0,3)	(100)	(92,3)	(7,7)

Πίνακας 4.4. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων στο δείγμα για τον πολυμορφισμό PPAR γ PRO 12 ALA

Γονότυποι					Αλληλόμορφα	
N	CC	CG	GG	ΣΥΝΟΛΟ	C	G
(%)	645	112	7	764	1402	119
	(84,4)	(14,7)	(0,9)	(100)	(92,2)	(7,8)

Πίνακας 4.5. Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων στο δείγμα για τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C

Γονότυποι					Αλληλόμορφα	
N	GG	GC	CC	ΣΥΝΟΛΟ	G	C
(%)	487	304	49	840	1278	353
	(58,0)	(26,7)	(5,8)	(100)	(78,3)	(21,7)

Επειδή ο αριθμός των ομοζυγοτών για το A αλληλίο για τον πολυμορφισμό TNFα -308 G>A ήταν πολύ μικρός (n=2), για την στατιστική ανάλυση που ακολουθεί τα άτομα αυτά ενοποιήθηκαν με τους ετεροζυγώτες για A αλληλίο, με αποτέλεσμα τελικά σε όλες τις αναλύσεις να λαμβάνονται υπ' όψη 2 ομάδες:

1. μία ομάδα η οποία περιλαμβάνει τα άτομα με γονότυπο GG
2. μία ομάδα η οποία περιλαμβάνει τα άτομα με γονότυπο είτε GA είτε AA (GA+AA)

Με τον ίδιο τρόπο έγιναν και οι στατιστικές αναλύσεις για τον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12 Ala όπου πάλι λήφθηκαν υπ' όψη 2 ομάδες:

1. μία ομάδα η οποία περιλαμβάνει τα άτομα με γονότυπο Pro/Pro
2. μία ομάδα η οποία περιλαμβάνει τα άτομα με γονότυπο είτε Pro/Ala είτε Ala/Ala (Pro/Ala+Ala/Ala)

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης ανάλυσης λάβαμε υπόψη μόνο δύο κατηγορίες ΔΜΣ οι οποίες είναι οι παρακάτω:

1. οι ελλειποβαρείς λόγω του πολύ μικρού αριθμού συμπτύχθηκαν με τα άτομα φυσιολογικού βάρους και δημιουργήθηκε μία ομάδα η οποία στο εξής θα καλείται φυσιολογικού βάρους

2. οι υπέρβαροι συμπτύχθηκαν με τους παχύσαρκους και δημιουργήθηκε μια νέα ομάδα η οποία στο εξής θα καλείται υπέρβαροι/ παχύσαρκοι.

Η κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308G>A ανά φύλο παρουσιάζεται στον πίνακα 4.6 και στον πίνακα 4.9 παρουσιάζεται η κατανομή του πολυμορφισμού ανά φύλο και ανά κατηγορία ΔΜΣ.

Η κατανομή του πολυμορφισμού PPAR γ PRO 12 ALA ανά φύλο παρουσιάζεται στον πίνακα 4.7 και στον πίνακα 4.10 παρουσιάζεται η κατανομή του πολυμορφισμού ανά φύλο και ανά κατηγορία ΔΜΣ.

Η κατανομή του πολυμορφισμού IL-6 -174G>C ανά φύλο παρουσιάζεται στον πίνακα 4.8 και στον πίνακα 4.11 παρουσιάζεται η κατανομή του πολυμορφισμού ανά φύλο και ανά κατηγορία ΔΜΣ.

Πίνακας 4.6. Κατανομή του Πολυμορφισμού TNFα -308G>A ανά φύλο

	Αγόρια (n=318)	Κορίτσια (n=302)	Σύνολο (n=620)	p- value
GG	251 (47,8%)	274 (86.2%)	525 (84,7)	0,292
GA+AA	51 (53,7%)	44 (13,8%)	95 (15,3%)	

Πίνακας 4.7. Κατανομή του Πολυμορφισμού PPAR γ PRO 12 ALA ανά φύλο

	Αγόρια (n=361)	Κορίτσια (n=402)	Σύνολο (n=763)	p-value
Pro/Pro	303 (83,9%)	341 (84,8%)	644 (84,4%)	0,734
Pro/Ala+Ala/Ala	58 (16,1%)	61 (15,2%)	119 (15,6%)	

Πίνακας 4.8. Κατανομή του Πολυμορφισμού IL-6 -174G>C ανά φύλο

	Αγόρια (n=446)	Κορίτσια (n=394)	Σύνολο (n=840)	p-value
GG	234 (59,4)	253 (56,7)	487 (58,0)	0,736
GC	138 (35,0)	166 (37,2)	304 (36,2)	
CC	22 (5,6)	27 (6,1)	49 (5,8)	

Πίνακας 4.9. Κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308G>A ανά κατηγορία ΔΜΣ

Γονότυποι TNFα -308G>A		GG	GA+AA	p-value
N		524	95	0,430
Κατηγορίες ΔΜΣ N (%)	Φυσιολογικού βάρους	328 (62,6)	58 (15,0)	
	Υπέρβαρα /Παχύσαρκα	196 (37,4)	37 (38,9)	

GA+AA vs. GG

OR=1.05, 95% CI (0.69-1.57) p-value=0.8

Allele based (A vs. G) OR=1.05 95% CI(0.7-1.53) p=0.81

Πίνακας 4.10. Κατανομή του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12Ala ανά κατηγορία ΔΜΣ

Γονότυποι PPAR γ PRO 12 ALA				
		Pro/Pro	Pro/Ala+Ala/Ala	p-value
N		645	118	
	Φυσιολογικού βάρους	393	81	
		(60,9)	(68,6)	
Κατηγορίες ΔΜΣ	Υπέρβαρα/ Παχύσαρκα	252	37	0,068
N (%)		(39,1)	(31,4)	

Pro/Ala + Ala/Ala vs. Pro/Pro

OR= 1.02 95%CI (0.68-1.51), p-value=0.91

Allele based (Ala vs. Pro) OR=0.78 95% CI (0.53-1.13) p=0.18

Πίνακας 4.11. Κατανομή του πολυμορφισμού IL-6 -174G>C ανά φύλο και ανά κατηγορία ΔΜΣ

Γονότυποι IL-6 -174G>C					
		GG	GC	CC	p-value
N		486	304	49	
	Φυσιολογικού βάρους	297	198	31	
		(61,1)	(65,1)	(63,3)	
Κατηγορίες ΔΜΣ	Υπέρβαρα/ Παχύσαρκα	189	106	18	0,522
		(38,9)	(34,9)	(36,7)	

GC+CC vs GG;

OR=0.88 95%CI (0.68-1.14) p=0.33

Allele based (C vs. G) OR=0.91 0.74-1.13 p=0.41

Όσο αφορά στον πολυμορφισμό -308G>A στο γονίδιο του TNFα, όπως φαίνεται στους πίνακες 4.6 και 4.9 αντίστοιχα, η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα (p=0,292) αλλά και στις 2 κατηγορίες του ΔΜΣ (p=0,430). Επίσης η κατανομή του πολυμορφισμού δεν διέφερε στις 2 κατηγορίες ΔΜΣ όταν λήφθηκε υπ' όψη και το φύλο. Για τον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala, όπως φαίνεται στους πίνακες 4.7 και 4.10, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή του μεταξύ των δύο φύλων (p=0,734), αλλά παρατηρήθηκε μια τάση διαφοροποίησης της

κατανομής ανά κατηγορία ΔΜΣ ($p=0,068$). Από την άλλη, η κατανομή του πολυμορφισμού δεν διέφερε στις 2 κατηγορίες ΔΜΣ όταν δεν λήφθηκε υπ' όψη το φύλο. Επίσης και για τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C, όπως φαίνεται στους πίνακες 4.8 και 4.11 αντίστοιχα, η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα ($p=0,736$) αλλά και στις 2 κατηγορίες του ΔΜΣ ($p=0,522$). Επίσης η κατανομή του πολυμορφισμού δεν διέφερε στις 2 κατηγορίες ΔΜΣ όταν λήφθηκε υπ' όψη το φύλο.

4.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συσχέτισης των 3 μελετούμενων πολυμορφισμών με συγκεκριμένους ανθρωπομετρικούς δείκτες και αλλά και με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες. Όπως φαίνεται στον πίνακα 4.12, ο πολυμορφισμός TNFα -308G>A, δεν βρέθηκε να σχετίζεται με καμία παράμετρο.

Πίνακας 4.12. Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με ανθρωπομετρικούς, κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες

	GG	GA+AA	p-value
ΔΜΣ (kg/m^2)	20,18±3,57	20,23±3,50	0,892
Περιφέρεια μέσης (cm)	69,54±10,35	68,34±9,25	0,291
Περιφέρεια ισχίων (cm)	85,57±8,58	84,66±9,98	0,355
WHR	0,81±0,06	0,81±0,14	0,746
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	20,31±8,34	19,73±7,60	0,534
Υποωμοπλατιαία Δερματοπτυχή (mm)	11,62±5,72	11,75±5,76	0,838
Ποσοστό λίπους	29,46±12,31	28,68±11,50	0,571
Συστολική Αρτηριακή πίεση (mm Hg)	121,10±15,16	119,30±17,74	0,305
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	75,61±12,12	76,37±14,30	0,590
Γλυκόζη (mg/dL))	84,70±13,41	85,01±8,86	0,632
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	0,81±0,06	0,81±0,14	0,693
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	186,85±30,10	192,10±29,16	0,119
HDLc (mg/dL)	52,48±10,86	54,34±11,59	0,131
LDLc (mg/dL)	29,46±12,31	28,68±11,50	0,245
Ινσουλινοαντίσταση	1,61±1,19	1,62±1,00	0,987

Όσο αφορά στον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.13, βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη δερματοπτυχή τρικεφάλου με τους ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλίο να έχουν υψηλότερες τιμές δερματοπτυχής τρικεφάλου συγκριτικά με τους ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό (19,85 $\pm$ 7,88 vs. 18,20 $\pm$ 7,50, p=0,038). Μία τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού φάνηκε να υπάρχει με την περιφέρεια μέσης, την περιφέρεια ισχίων και την υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή. Συγκεκριμένα, οι Pro/Ala ή Ala/Ala είχαν μικρότερες τιμές περιφέρειας μέσης, περιφέρειας ισχίων αλλά και υποωμοπλατιαίας δερματοπτυχής συγκριτικά με τα άτομα με γονότυπο Pro/Pro (67,33 $\pm$ 9,30 vs. 69,08 $\pm$ 9,83, p=0,074, 85,59 $\pm$ 8,71 vs. 84,11 $\pm$ 9,11 p=0,093 και 10,90 $\pm$ 5,43 vs. 11,96 $\pm$ 6,08 p=0,079, αντίστοιχα).

Πίνακας 4.13. Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού PPAR γ PRO12ALA με ανθρωπομετρικούς, κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες

	Pro/Pro	Pro/Ala+Ala/Ala	p-value
Δ ΜΣ (kg/m ²)	20,24 $\pm$ 3,59	19,67 $\pm$ 3,63	0,114
Περιφέρεια μέσης (cm)	69,08 $\pm$ 9,83	67,33 $\pm$ 9,30	0,074
Περιφέρεια ισχίων (cm)	85,59 $\pm$ 8,71	84,11 $\pm$ 9,11	0,093
WHR	0,80 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,04	0,393
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	19,85 $\pm$ 7,88	18,20 $\pm$ 7,50	0,038
Υποωμοπλατιαία Δερματοπτυχή (mm)	11,96 $\pm$ 6,08	10,90 $\pm$ 5,43	0,079
Ποσοστό λίπους	29,42 $\pm$ 12,16	27,75 $\pm$ 11,92	0,243
Συστολική Αρτηριακή πίεση (mm Hg)	121,23 $\pm$ 15,77	120,98 $\pm$ 14,38	0,857
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	75,31 $\pm$ 12,83	74,73 $\pm$ 11,49	0,647
Γλυκόζη (mg/dL))	86,04 $\pm$ 9,04	84,89 $\pm$ 8,72	0,203
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	0,81 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,14	0,793
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	187,98 $\pm$ 29,32	187,41 $\pm$ 34,9	0,849
HDLc (mg/dL)	52,75 $\pm$ 11,00	52,15 $\pm$ 10,32	0,580
LDLc (mg/dL)	122,21 $\pm$ 23,99	122,11 $\pm$ 27,71	0,966
Ινσουλινοαντίσταση	1,64 $\pm$ 1,06	1,50 $\pm$ 0,90	0,324

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4.14, ο πολυμορφισμός IL-6 -174G>C , δεν βρέθηκε να σχετίζεται με καμία μελετούμενη παράμετρο.

Πίνακας 4.14. Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού IL-6 -174G>C με ανθρωπομετρικούς, κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες

	GG	GC	CC	p-value
BMI (kg/m ²)	20,09 ±3,69	20,20 ±3,56	19,99 ±3,33	0,884
Περιφέρεια μέσης (cm)	68,76 ±10,05	69,23 ±10,01	68,02 ±8.86	0,666
Περιφέρεια ισχίων (cm)	85,24 ±9,00	85,55 ±9,00	84,39 ±7,72	0,685
WHR	0,80 ±0,05	0,81 ±0,09	0,80 ±0,05	0,685
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	19,45 ±7,87	19,90 ±7,68	19,89 ± 7,97	0,713
Δερματοπτυχή υποωμοπλατιαία (mm)	11,68 ±6,00	11,96 ±6,00	11,70 ±5,34	0,516
Ποσοστό λίπους	28,74±11,98	29,67±11,74	29,56±12,29	0,624
Συστολική Αρτηριακή πίεση (mm Hg)	121,15±16,10	120,86±13,4 9	118,16±14,4 0	0,426
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	75,53±13,71	74,83±10,48	75,48±14,40	0,739
Γλυκόζη (mg/dL)	86,01 ±13,66	85,86 ±8,79	84,10 ±12,91	0,581
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	65,24 ±25,64	63,05 ±21,39	65,33 ±20,48	0,445
HDLc (mg/dL)	52,63±11,04	53,02±11,49	53,08±9,59	0,866
LDLc (mg/dL)	122,04±25,24	122,99±24,3 5	123,53±28,2 7	0,837
Ινσουλινοαντίσταση	1,66±1,10	1,46±0,89	1,44±0,81	0,138

4.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ 3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Για την διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ γονότυπων και

α)ΔΜΣ

β)περιφέρειας μέσης

γ)δερματοπτυχής τρικεφάλου

εφαρμόστηκαν 3 μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης(Linear Regression). Σε κάθε μοντέλο στην αρχή λαμβάναμε υπό όψη τον κάθε πολυμορφισμό μόνο του και στη συνέχεια και τους 3 μαζί. Επειδή ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι κυρίως να εξετάσει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών και των διατητικών συνηθειών σε παιδιά, επιλέχθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης ο ΔΜΣ, η περιφέρεια μέσης και η δερματοπτυχή τρικεφάλου αφού αυτές έχουν φανεί, από τη βιβλιογραφία, να σχετίζονται καλύτερα με την παχυσαρκία. Επίσης λάβαμε υπό όψη, την ενέργεια και παράγοντες που αφορούσαν στο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Όσο αφορά στο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, όπως αυτό αξιολογήθηκε από το ερωτηματολόγιο με τα Δημογραφικά στοιχεία, επιλέχθηκαν να μπούνε στο μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης οι μεταβλητές έτη σπουδών πατέρα(≤ 12 έτη, >12 έτη), έτη σπουδών μητέρας(≤ 12 έτη, >12 έτη), και αριθμός τετραγωνικών σπιτιού γιατί αυτές βρέθηκαν να συσχετίζονται καλύτερα με το ΔΜΣ στο συγκεκριμένο δείγμα.

4.7.A) TNFa -308G>A

Όπως φαίνεται από τα παρακάτω αποτελέσματα ο πολυμορφισμός TNFa-308G>A δε φαίνεται να επηρέαζε το ΔΜΣ, την περιφέρεια μέσης αλλά και τη δερματοπτυχή τρικεφάλου στο μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης στο οποίο λήφθηκαν υπ'όψη και άλλοι παράγοντες. Από την άλλη, τα λεπτά/ ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων, και τα έτη σπουδών μητέρας επηρέαζαν θετικά το ΔΜΣ αλλά και το φύλο, ενώ η ενέργεια είχε αρνητική επίδραση. Όσο αφορά στην περιφέρεια μέσης η ενέργεια και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού είχαν αρνητική επίδραση ενώ το φύλο είχε θετική, δηλαδή τα αγόρια φαινόταν να έχουν μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης. Για τη δερματοπτυχή τρικεφάλου στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση φαινόταν να έχει η ενέργεια.

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης του ΔΜΣ με τον πολυμορφισμό TNFa -308G>A

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,034	0,447
Φύλο	0,120	0,010
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,095	0,037
Ενέργεια	-0,096	0,004
Έτη σπουδών πατέρα	-0,112	0,818
Έτη σπουδών μητέρας	0,099	0,048
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,088	0,061
GG vs. GA+AA	0,013	0,776

p=0,001, R² adj=7,4%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της περιφέρειας μέσης με τον πολυμορφισμό TNFa -308G>A

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,055	0,223
Φύλο	0,190	0,001
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,081	0,079
Ενέργεια	-0,165	0,001
Έτη σπουδών πατέρα	-0,020	0,704
Έτη σπουδών μητέρας	0,085	0,091
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,096	0,042
GG vs. GA+AA	-0,028	0,527

P=0,001, R² adj=7,8%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της δερματοπτυχής τρικεφάλου με τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,010	0,830
Φύλο	0,011	0,825
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,031	0,508
Ενέργεια	-0,174	0,002
Έτη σπουδών πατέρα	-0,064	0,226
Έτη σπουδών μητέρας	0,059	0,256
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,049	0,304
GG vs. GA+AA	0,006	0,894

p=0,023, R² adj=2,2%

4.7 B) PPARγ Pro12Ala

Ο πολυμορφισμός PPARγ Pro12Ala φαίνεται να είχε την τάση να ασκεί αρνητική επίδραση στο ΔΜΣ (p=0,062) ενώ η ενέργεια είχε στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση. Από την άλλη το φύλο και τα λεπτά ανά ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων είχαν θετική επίδραση ενώ ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού αρνητική. Όταν στο ίδιο μοντέλο συμπεριλήφθηκαν οι παράγοντες ΔΜΣ πατέρα και ΔΜΣ μητέρα, ο πολυμορφισμός PPAR γPro12Ala δεν επηρέαζε πλέον στατιστικά σημαντικά το ΔΜΣ (p=0,182). Όσο αφορά στην περιφέρεια μέσης, αρνητική επίδραση είχε η ενέργεια και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού ενώ θετική είχε η ηλικία και το φύλο. Για τη δερματοπτυχή τρικεφάλου αρνητική επίδραση φαινόταν να έχει η ενέργεια και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού.

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης του ΔΜΣ με τον πολυμορφισμό PPARγ Pro12Ala

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,058	0,154
Φύλο	0,082	0,060
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,080	0,058
Ενέργεια	-0,174	0,002
Λίπος	-0,042	0,450
Έτη σπουδών πατέρα	-0,001	0,984
Έτη σπουδών μητέρας	0,074	0,093
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,081	0,057
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,074	0,069

p<0,001, R² adj=5,2%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της περιφέρειας μέσης με τον πολυμορφισμό PPARγ Pro12Ala

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,104	0,011
Φύλο	0,192	<0,001
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,074	0,077
Ενέργεια	-0,158	0,005
Έτη σπουδών πατέρα	-0,032	0,453
Έτη σπουδών μητέρας	0,058	0,182
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,087	0,037
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,046	0,257

P<0,001, R² adj=6,7%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της δερματοπτυχής τρικεφάλου με τον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,048	0,249
Φύλο	-0,018	0,675
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,041	0,332
Ενέργεια	-0,161	<0,001
Έτη σπουδών πατέρα	-0,038	0,388
Έτη σπουδών μητέρας	0,074	0,094
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,086	0,045
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,052	0,205

P<0,001, R² adj=4,5%

4.7 Γ) IL-6 -174G>C

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, ο πολυμορφισμός IL-6-174G>C 308G>A δε φαίνεται να επηρεάζε το ΔΜΣ ενώ η ενέργεια και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού είχαν αρνητική επίδραση και το φύλο και τα λεπτά καθιστικών δραστηριοτήτων θετική. Στη μεταβλητή περιφέρεια μέσης αρνητική επίδραση είχε η ενέργεια και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού και θετική το φύλο, η ηλικία και τα λεπτά καθιστικών δραστηριοτήτων. Για τη δερματοπτυχή τρικεφάλου αρνητική επίδραση είχε ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού και η ενέργεια ενώ θετική είχε το φύλο.

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης του ΔΜΣ με τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,067	0,084
Φύλο	0,116	0,004
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,089	0,026
Ενέργεια	-0,128	0,001
Έτη σπουδών πατέρα	-0,011	0,788
Έτη σπουδών μητέρας	0,307	0,072
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,095	0,020
GG vs. GC vs. CC	0,005	0,903

P=0,001, R² adj=8,0%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της περιφέρειας μέσης με τον πολυμορφισμό II-6 -174G>C

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,114	0,003
Φύλο	0,203	0,001
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,086	0,030
Ενέργεια	-0,128	0,001
Έτη σπουδών πατέρα	0,059	0,153
Έτη σπουδών μητέρας	-0,102	0,010
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	0,012	0,748
GG vs. GC vs. CC	-0,046	0,738

P<0,001, R² adj=5,6%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της δερματοπτυχής τρικεφάλου με τον πολυμορφισμό II-6 -174G>C

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,044	0,273
Φύλο	0,028	0,003
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,058	0,154
Ενέργεια	-0,159	0,003
Έτη σπουδών πατέρα	-0,039	0,359
Έτη σπουδών μητέρας	0,062	0,144
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,091	0,027
GG vs. GC vs. CC	0,036	0,359

P<0,001, R² adj=7,8%

4.7 Δ)TNFa-308G>A, PPARγ Pro12Ala, II-6 -174G>C

Όπως φαίνεται από τους παρακάτω πίνακες, στο μοντέλο εκτίμησης της σχέσης του ΔΜΣ με τους 3 μελετούμενους πολυμορφισμούς, ο πολυμορφισμός PPARγ Pro12Ala φαίνεται να έχει την τάση να ασκεί αρνητική επίδραση στο ΔΜΣ, όπως επίσης και ο αριθμός τετραγωνικών σπιτιού ενώ θετική είχε το φύλο.

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης του ΔΜΣ με τους 3 μελετούμενους πολυμορφισμούς

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,048	0,397
Φύλο	0,149	0,012
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,037	0,526
Ενέργεια	-0,188	0,001
Έτη σπουδών πατέρα	0,053	0,428
Έτη σπουδών μητέρας	0,038	0,564
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,123	0,044
GG vs. GA+AA	-0,031	0,582
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,097	0,082
GG vs. GC vs. CC	-0,611	0,541

p=0,011, R² adj=4,3%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της περιφέρειας μέσης με τους 3 μελετούμενους πολυμορφισμούς

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,092	0,103
Φύλο	0,214	<0,001
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	0,032	0,575
Ενέργεια	-0,136	0,082
Έτη σπουδών πατέρα	0,007	0,918
Έτη σπουδών μητέρας	0,047	0,471
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,125	0,040
GG vs. GA+AA	-0,070	0,209
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,076	0,177
GG vs. GC vs. CC	0,016	0,773

p=0,002, R² adj=6,0%

Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης της δερματοπτυχής τρικεφάλου με τους 3 μελετούμενους πολυμορφισμούς

Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,079	0,177
Φύλο	0,004	0,945
Λεπτά/ημέρα καθιστικών δραστηριοτήτων	-0,035	0,559
Ενέργεια	-0,090	0,264
Έτη σπουδών πατέρα	-0,069	0,314
Έτη σπουδών μητέρας	0,047	0,442
Αριθμός τετραγωνικών σπιτιού	-0,099	0,113
GG vs. GA+AA	-0,021	0,713
Pro/Pro vs. Pro/Ala+Ala/Ala	-0,080	0,168
GG vs. GC vs. CC	-0,021	0,713

p=0,509, R² adj=0,2%

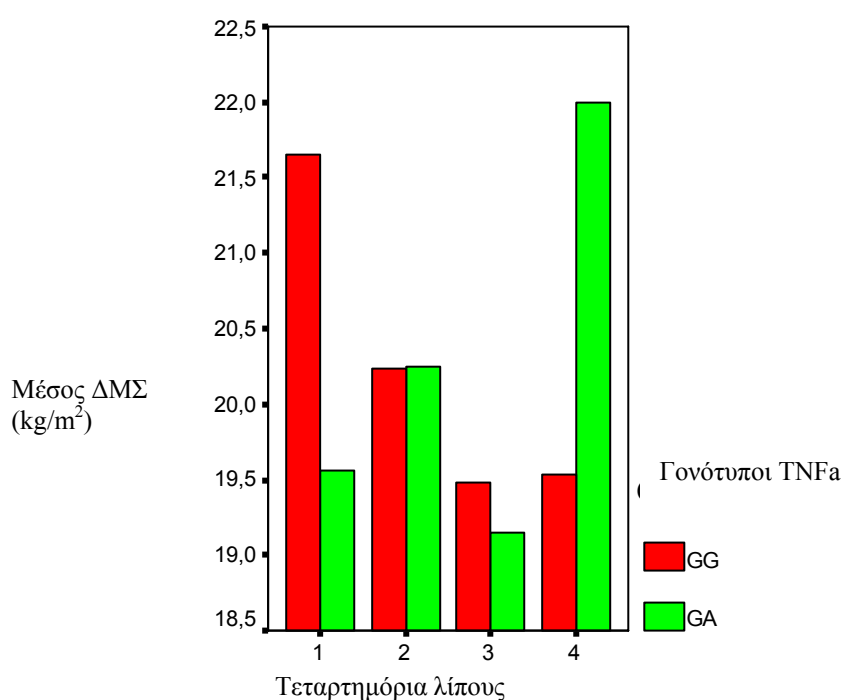
4.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ 3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.2.9. της Εισαγωγής, για τον πολυμορφισμό TNFa - 308G>A έχει αναφερθεί να υπάρχει αλληλεπίδραση με την πρόσληψη αραχιδονικού οξέος και λινολεϊκού οξέος στο ΔΜΣ. Επίσης, για τον πολυμορφισμό PPARγPro12Ala υπάρχουν διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα που δείχνουν μια αλληλεπίδραση αυτού του πολυμορφισμού με το συνολικό λίπος της δίαιτας αλλά και τους διάφορους τύπους (κορεσμένα, πολυακόρεστα, μονακόρεστα). Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης επιλέχθηκε να γίνει έλεγχος της αλληλεπίδρασης των 3 πολυμορφισμών με τις συνολικό λίπος της δίαιτας γιατί η ως τώρα διατροφική ανάλυση της συγκεκριμένης έρευνας δεν ήταν πλήρης όσο αφορά στα είδη του λίπους. Το λίπος επιλέχθηκε καθώς υπάρχουν κάποια δεδομένα που αναφέρουν ότι στα παχύσαρκα παιδιά, μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας προέρχεται από λίπος κι επειδή ως τώρα έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις γενετικών παραγόντων-διατροφής μόνο όσο αφορά στο λίπος.

Το προσλαμβανόμενο λίπος της δίαιτας(gr.) χωρίστηκε σε τεταρτημόρια ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση στην πρόσληψη αλλά και επειδή, από τις υπάρχουσες μελέτες, φαίνεται να είναι αυτά που χρησιμοποιούνται συχνότερα .

Από τη Ανάλυση Διακύμανσης (Univariate Analysis of Variance) δεν βρέθηκε να υπάρχει αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού PPAR γ Pro12Ala με το λίπος της διαίτας στο ΔΜΣ, έχοντας λάβει υπόψη την ηλικία και το φύλο. Το ίδιο εύρημα ίσχυε και για τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C.

Από την ίδια ανάλυση, βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση τεταρτημορίων λίπους με τον πολυμορφισμό TNF α -308G>A επηρέαζε στατιστικά σημαντικά το ΔΜΣ ($p=0,001$). Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι διαφορές στο μέσο ΔΜΣ ανάλογα με τα τεταρτημόρια του λίπους και το γονότυπο.



Διάγραμμα 4.1 Μέσες τιμές ΔΜΣ ανά γονότυπο και τεταρτημόριο λίπους

Στη συνέχεια έγινε γραμμική παλινδρόμηση κατά γονότυπο (GG vs. GA+AA) όπου βρέθηκε ότι στους GG τα τεταρτημόρια του λίπους είχαν αρνητική επίδραση στο ΔΜΣ, δηλαδή μεγαλύτερη πρόσληψη λίπους σχετιζόταν με μικρότερο ΔΜΣ($p<0.001$). Στους GA+AA φάνηκε η τάση τα τεταρτημόρια του λίπους να επιδρούν θετικά στο ΔΜΣ ($p=0,067$), δηλαδή αύξηση της πρόσληψης λίπους σχετιζόταν με μεγαλύτερο ΔΜΣ, όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο παρακάτω μοντέλο.

	GG		GA+AA	
Μεταβλητή	β-συντελεστής	p-value	β-συντελεστής	p-value
Ηλικία	0,037	0,387	0,009	0,935
Φύλο	0,116	0,008	-0,004	0,969
Τεταρτημόρια	-0,236	<0,001	0,200	0,067
λίπους				
R ² adj=5.5%			R ² adj =0,8%	

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 1132 παιδιά ηλικίας 10-12 ετών, τα οποία υποβλήθηκαν σε ανθρωπομετρικές και βιοχημικές μετρήσεις, γονοτυπική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς TNFα -308 G>A, PPARγ Pro12Ala IL-6-174G>C και αξιολόγησης της διατροφικής τους πρόσληψης με 2 ανακλήσεις 24ώρου.

Όσο αφορά στις ανθρωπομετρικές μετρήσεις, ανάμεσα στα δύο φύλα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιφέρεια μέσης, στο λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχύος (WHR) και στην υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή με τα αγόρια να έχουν υψηλότερη περιφέρεια μέσης και WHR συγκριτικά με τα κορίτσια ενώ η υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή ήταν υψηλότερη στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια (Πίνακας 4.1). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Mamalakis και συνεργατών σε παιδιά στην Κρήτη, όπου το WHR ήταν υψηλότερο στα αγόρια όλων των ηλικιακών ομάδων και οι μετρήσεις των δερματοπτυχών υψηλότερες στα κορίτσια (Mamalakis G et al 2002).

Όσο αφορά στις βιοχημικές παραμέτρους, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στις τιμές της γλυκόζης, στα τριγλυκερίδια, στην ολική χοληστερόλη, στην υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) και στην ινσουλινοαντίσταση (Πίνακας 4.1). Συγκεκριμένα τα αγόρια, συγκριτικά με τα κορίτσια, βρέθηκαν να έχουν υψηλότερες τιμές γλυκόζης ολικής χοληστερόλης και HDLc σε σχέση με τα κορίτσια το οποίο έχει φανεί και στη Bogalusa Heart Study (David S et al 1999).

Όσο αφορά στην πρόσληψη μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών, όπως φαίνεται τον πίνακα 4.1, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα δύο φύλα, με τα αγόρια να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές στην ενεργειακή πρόσληψη, στην πρόσληψη πρωτεΐνης, υδατανθράκων, λίπους, κορεσμένου και μονοακόρεστου λίπους, ασβεστίου και διαιτητικών ινών συγκριτικά με τα κορίτσια. Όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες τα κορίτσια συνήθως παρουσιάζουν μικρότερες τιμές μακροθρεπτικών αλλά και μικροθρεπτικών συστατικών (Rolland-Cachera MF et al, 2000, Lytle LA et al, 2002, Suitor CW and Cleason PM 2002). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη γνώση που έχουν οι γυναίκες σχετικά με τη διατροφή (Pirouznia M 2001) αλλά πολύ πιθανό και στις αυξημένες ανησυχίες που παρατηρούνται στα νεαρά κορίτσια σχετικά με το σωματικό τους βάρος και την ενασχόλησή τους με δίαιτες αδυνατίσματος (Yiannakoulia M 2004).

Ο επιπολασμός του υπερβάλλοντος βάρους ήταν 28,9% και της παχυσαρκίας 9,1% στην παρούσα μελέτη. Τα ποσοστά αυτά είναι υψηλότερα από τα ποσοστά άλλων ερευνών που

έχουν γίνει σε Ελληνικό πληθυσμό παιδιών (Mamalakis G et al 2000, Karayiannis D et al 2003, Georgiadis G et al 2003), αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ο σχεδιασμός της κάθε μελέτης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στη μελέτη των Georgiadis και συνεργατών που αφορά σε αντιπροσωπευτικό δείγμα, το ποσοστό υπερβάλλοντος βάρους ήταν 17,3% και της παχυσαρκίας 3,6% σε παιδιά ηλικίας 6-17 ετών (Georgiadis G et al 2007), Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα στην κατανομή στις κατηγορίες ΔΜΣ ($p=0,050$), με τα αγόρια να παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά υπέρβαρου και παχύσαρκου. Άλλες 3 μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε Ελληνικό πληθυσμό παιδιών βρήκαν επίσης ότι τα αγόρια παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά υπέρβαρου και παχύσαρκου σε σχέση με τα κορίτσια (Mamalakis G et al 2000, Karayiannis D et al 2003, Papadimitriou A et al 2005) ενώ στη μελέτη των Georgiadis και συνεργατών το ποσοστό υπέρβαρου ήταν μεγαλύτερο στα κορίτσια ενώ της παχυσαρκίας μεγαλύτερο στα αγόρια (Georgiadis G et al 2007).

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι τα υπέρβαρα/ παχύσαρκα παιδιά είχαν μικρότερες μέσες τιμές πρόσληψης ενέργειας, υδατανθράκων, λίπους και διαιτητικών ινών σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους (Πίνακας 4.2). Αυτό το εύρημα ίσως να φαίνεται αρχικά παράδοξο. Όπως όμως αναφέρεται και στη μελέτη ανασκόπησης του Rodríguez G, συχνά γίνεται η υπόθεση ότι τα υπέρβαρα/ παχύσαρκα παιδιά τρώνε περισσότερο από ότι οι συνομήλικοί τους με φυσιολογικό βάρος αλλά αυτή η υπόθεση σπανίως έχει αποδειχθεί. Αντιθέτως οι συγχρονικές μελέτες συνήθως δείχνουν ότι η συνολική πρόσληψη ενέργειας δεν σχετίζεται με τη σύσταση σώματος ή το λίπος σώματος (Guillaume M et al 1998, Davies BSW et al 2000, McGloin AF et al 2002) και συχνά, αφού γίνει διόρθωση για την ενεργειακή κατανάλωση, διαφαίνεται ότι τα παχύσαρκα παιδιά καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια από ότι τα μη παχύσαρκα (Gazanniga JM et al 1993, Maffei C et al, 1996). Πιθανές εξηγήσεις για το εύρημα ότι σε συγχρονικές μελέτες που περιλαμβάνουν παχύσαρκα και υπέρβαρα παιδιά, που ήδη έχουν πλεονάζον σωματικό λίπος, και καταλήγουν στο ότι η ενέργεια δε σχετίζεται ή σχετίζεται αντίθετα με το λίπος σώματος είναι: α) τα παχύσαρκα παιδιά τρώνε περισσότερο από ότι τα μη παχύσαρκα αλλά η μεθοδολογία για την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης πιθανά να μην μπορεί να εκτιμήσει αυτές τις διαφορές, β) τα υπέρβαρα παιδιά σε κίνδυνο να γίνουν παχύσαρκα πιθανά έτρωγαν περισσότερο σε ένα προηγούμενο στάδιο αλλά όχι πλέον, γ) τα υπέρβαρα παιδιά τείνουν να υποεκτιμούν την ενεργειακή τους πρόσληψη, συνειδητά ή ασυνειδητά, (Bandini LG et al 1990, Livingstone MB et al 1992) και δ) συχνά τα παχύσαρκα παιδιά είναι σε δίαιτα για ρύθμιση του σωματικού τους βάρους ή τρώνε λιγότερο εξαιτίας της οικογένειας ή επαγγελματιών υγείας.

Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν συγχρονικές μελέτες στις οποίες δεν έχουν φανεί συσχετίσεις μεταξύ ποσοστών πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών και σωματικού λίπους (Maffei C et al 2000, Davies PS 1997)

Όσο αφορά στους μελετούμενους πολυμορφισμούς, η συχνότητα του TNFα -308 A αλληλίου στα 620 παιδιά στα οποία προσδιορίστηκε επιτυχώς ο γονότυπος ήταν 0,08. Η συχνότητα αυτή είναι χαμηλότερη από αυτή που αναφέρεται στη μετά-ανάλυση του Sookoian για τον πολυμορφισμό TNFα -308 G>A η οποία έχει υπολογιστεί σε 0,45 για τους Λευκούς αλλά αφορά τη συνολική συχνότητα που έχει υπολογιστεί σε αυτή τη μετά-ανάλυση τόσο από συγχρονικές μελέτες όσο και από μελέτες ασθενών- μαρτύρων (Sookoian SC^a et al 2005). Η συχνότητα του A αλληλίου ήταν παρόμοια με τη συχνότητα που βρέθηκε από τους Sookoian και συνεργάτες σε εφήβους. Επίσης η συχνότητα αυτή βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Ελληνικό πληθυσμό στην οποία η συχνότητα για το A αλληλίο βρέθηκε 0,02 (Dedoussis GV et al 2005). Από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν άλλες δημοσιευμένες μελέτες, με ίδιο σχεδιασμό, οι οποίες να έχουν εκτιμήσει τη συχνότητα του πολυμορφισμού αυτού σε παιδιά ώστε να γίνουν πιο ασφαλείς συγκρίσεις.

Επίσης στη συγκεκριμένη μελέτη η κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308G>A βρέθηκε να μην έχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα αλλά και στις 2 κατηγορίες του ΔΜΣ (φυσιολογικού βάρους+ελλειποβαρή παιδιά vs. υπέρβαρα και παχύσαρκα). Ο πολυμορφισμός αυτός δεν βρέθηκε να σχετίζεται με καμία από τις ανθρωπομετρικές αλλά και βιοχημικές παραμέτρους που αξιολογήθηκαν αλλά ούτε και με την ινσουλινοαντίσταση, τη Συστολική και τη Διαστολική αρτηριακή πίεση (Πίνακας 4.12). Τα αποτελέσματα των μελετών σχετικά με τη συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με διάφορους δείκτες είναι αντικρουόμενα. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει να υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με δείκτες παχυσαρκίας ενώ κάποιες άλλες όχι (Sookoian SC^a et al 2005). Στη μετά-ανάλυση των Sookoian , στην οποία συμπεριλήφθηκαν 31 μελέτες που αξιολογούσαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με παράγοντες του Μεταβολικού Συνδρόμου, οι φορείς του A αλληλίου φάνηκε να έχουν 23% μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν παχυσαρκία συγκρινόμενοι με τους ομόζυγους φυσιολογικούς αλλά επίσης είχαν και σημαντικά υψηλότερη συστολική αρτηριακή πίεση (Sookoian SC^a et al 2005). Επιπλέον, συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με ένα πιο κοντινό ηλικιακό δείγμα από τη μελέτη των Sookoian και συνεργατών σε 175 εφήβους που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για τη Συστολική ή τη Διαστολική Αρτηριακή Πίεση, φαίνεται να υπάρχει μια συμφωνία αφού και σε αυτή τη μελέτη δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των φορέων και μη φορέων του A

αλληλίου όσον αφορά τον ΔΜΣ, το WHR, την HDL και LDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, και τη γλυκόζη νηστείας (Sookoian SC^b et al 2005).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε να υπάρχει αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με τα τεταρτημόρια του λίπους της δίαιτας η οποία φάνηκε να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ΔΜΣ ($p=0,001$). Όταν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση, βρέθηκε ότι στους ομοζυγώτες φυσιολογικούς μεγαλύτερη πρόσληψη λίπους σχετιζόταν με μικρότερο ΔΜΣ, ενώ στους φορείς του A αλληλίου μεγαλύτερη πρόσληψη λίπους σχετιζόταν με μεγαλύτερο ΔΜΣ, έχοντας διορθώσει για την ηλικία και το φύλο. Κατά συνέπεια τα άτομα που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό φαινόταν να είναι ευνοημένα σε σχέση με αυτά που τον έφεραν. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι μεγάλη πρόσληψη λίπους φαίνεται να σχετίζεται με την παχυσαρκία (Robitaille J et al 2003), αν και όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν μελέτες οι οποίες καταλήγουν στην μη ύπαρξη συσχέτισης. Από την άλλη, δεν φαίνεται να απαντούν όλοι στον ίδιο βαθμό σε μία δίαιτα υψηλή σε λίπος (Robitaille J et al 2003), τουλάχιστον όπως φαίνεται και από την παρούσα μελέτη αφού παρουσία ή απουσία του πολυμορφισμού TNFα -308G>A διαφοροποιούνταν η απάντηση στο προσλαμβανόμενο λίπος, όπως φαινόταν από το ΔΜΣ. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να τονίσουμε ότι είναι δύσκολο να δοθούν απλές εξηγήσεις οι οποίες να αιτιολογούν αυτό το εύρημα κι ότι θα χρειαστούν και περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί και αξιολογηθεί καλύτερα αυτή η αλληλεπίδραση.

Θα πρέπει επίσης εδώ να αναφέρουμε ότι υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με τη διατροφή. Από τη μελέτη των Santos και συνεργατών σε 549 παχύσαρκες ενήλικες γυναίκες, δεν βρέθηκαν αλληλεπιδράσεις με τα συστατικά της διατροφής που μελετήθηκαν (διαιτητικές φυτικές ίνες, λόγος πολυακόρεστων /κορεσμένων λιπαρών οξέων, ποσοστό της ενέργειας που προέρχεται από λίπος) (Santos JI et al 2003). Η μοναδική μελέτη που βρέθηκε από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση να δείχνει μια αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308G>A με τη διατροφή ήταν αυτή των Nieters και συνεργατών και πρόκειται για μελέτη ασθενών (παχύσαρκοι)-μαρτύρων (φυσιολογικού βάρους) Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης για τον πολυμορφισμό TNFα -308G>A υπήρχαν ενδείξεις για ελάχιστη επίδραση στον κίνδυνο παχυσαρκίας. Από την άλλη βρέθηκε ότι υπήρχε μια αλληλεπίδραση της πρόσληψης αραχιδονικού οξέος ($p<0,001$) και λινολεϊκού οξέος ($p=0,024$) με το αλληλίο A του πολυμορφισμού TNFα -308G>A που φαινόταν να επηρεάζε τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας αλλά και με την παρουσία των πολυμορφισμών

PPAR γ 2C>T και Leptin -2548G>A. Παρόλα αυτά οι ερευνητές αναφέρουν ότι αυτό το εύρημα θα πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο πληθυσμιακό δείγμα (Nieters A et al 2002). Όσο αφορά στον πολυμορφισμό PPAR γ Pro12Ala, η συχνότητα του Ala στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ίση με 0,08. Η συχνότητα αυτή ήταν σχεδόν όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε Ελληνικό πληθυσμό παιδιών ηλικίας 11-12 χρονών η οποία ήταν 0,069 (Dedoussis GVZ et al 2007) και σε παιδιά Ιταλικής καταγωγής στα οποία η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 0,09 (Buzetti R et al 2005), αλλά διέφερε σχετικά από τη συχνότητα 0,15 που έχει αναφερθεί σε Καυκάσιους (Evans D et al 2000). Επίσης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών του ΔΜΣ ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στην κατανομή του πολυμορφισμού μεταξύ των δύο φύλων. Όσο αφορά στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, τα παιδιά με γονότυπο Pro/Pro βρέθηκε να έχουν στατιστικά υψηλότερες τιμές δερματοπτυχής τρικεφάλου συγκριτικά με τους ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με το ΔΜΣ (πίνακας 4.13). Οι παραπάνω συσχετίσεις δεν φαίνεται να συμφωνούν με τη μελέτη των Robitaille και συνεργατών όπου οι φορείς του Ala αλληλίου φάνηκε να έχουν υψηλότερο ΔΜΣ και περιφέρεια μέσης συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες για το Pro αλληλίο (Robitaille J et al 2003). Για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με το ΔΜΣ, τα υπάρχοντα δεδομένα είναι αντικρουόμενα αφού άλλοτε οι φορείς του Ala αλληλίου φαίνεται να έχουν υψηλότερο ΔΜΣ (Masud S and Ye S 2003) κι άλλοτε φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με το ΔΜΣ (Nieters A et al 2002, Chen L et al 2006, Paracchini V et al 2005).

Στην παρούσα μελέτη, ο πολυμορφισμός PPAR γ Pro12Ala φαίνεται να είχε την τάση να επηρεάζει σημαντικά το ΔΜΣ ($p=0,060$), σε μοντέλο στο οποίο λήφθηκαν υπό όψη η ηλικία, το φύλο, τα λεπτά καθιστικών δραστηριοτήτων ανά ημέρα, η ενέργεια και κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες. Όταν όμως στο ίδιο μοντέλο συμπεριλήφθηκαν οι παράγοντες ΔΜΣ πατέρα και ΔΜΣ μητέρα, ο πολυμορφισμός PPAR γ Pro12Ala δεν φαινόταν πλέον να επηρεάζει το ΔΜΣ.

Η συχνότητα του C αλληλίου για τον πολυμορφισμό IL-6 -174G>C βρέθηκε 0,24 και φαίνεται να διαφέρει από αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών όπου αναφέρονται συχνότητες της τάξης 0,44 αλλά και 0,47 (Santos JL et al 2006, Qi L et al 2007) Wernstedt I et al 2004). Γι αυτόν τον πολυμορφισμό, η συχνότητα εμφάνισής του δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα αλλά και στις κατηγορίες του ΔΜΣ κι επίσης δεν βρέθηκε να σχετίζεται με καμία μελετούμενη παράμετρο (πίνακας 4.14), το οποίο έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Qi L et al 2007, (Santos JL et al 2006).

Συμπερασματικά, η εύρεση επιδράσεων και συσχετίσεων γενετικών αλλά και διατροφικών παραγόντων σε ένα πολυπαραγοντικό νόσημα όπως η παχυσαρκία αποτελεί ένα πολύπλοκο θέμα, που οπωσδήποτε χρειάζεται περισσότερη μελέτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AAP American Academy of Pediatrics: Committee on Nutrition. On the feeding of supplemental foods to infants. *Pediatrics* 1980 Jun; 65(6):1178-8.

AAP American Academy of Pediatrics: Committee on Nutrition. The use and misuse of fruit juice in pediatrics. *Pediatrics* 2001 May;107(5):1210-13.

Acalovschi D, Wiest T, Hartmann M, Farahmi M, Mansmann U, Auffarth GU, Grau AJ, Green FR, Grond-Ginsbach C, Schwaninger M. Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke* 2003; 34: 1864–69.

Adair LS, Popkin BM. Are child eating patterns being transformed globally? *Obes Res* 2005 Jul;13(7):1281-99.

Affenito SG, Thompson DR, Barton BA, Franko DL, Daniels SR, Obarzanek E, Schreiber GB, Striegel-Moore RH. Breakfast consumption by African-American and white adolescent girls correlates positively with calcium and fiber intake and negatively with body mass index. *J Am Diet Assoc* 2005;105: 938-45.

Ainsworth E, Haskell L, Whitt C, Irwin L, Swartz M, Strath J, O'Brien L, Bassett R, Schmitz H, Emplainscourt O, Jacobs R, Leon S. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2000; S498-S516.

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 (IL-6) in biology, and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54:1–78.

Albertson AM, Anderson GH, Crockett SJ et al. Ready-to-eat cereal consumption: its relationship with BMI and nutrient intake of children aged 4–12 years. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 1613–19.

Alexy U, Sichert-Hellert W, Kersting M, Manz F, Schoch G. Fruit juice consumption and the prevalence of obesity and short stature in German preschool children: results of the DONALD Study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 Sep; 29(3): 343-49.

Alexy U, Sichert-Hellert W, Kersting M, Schultze-Pawlitschko V. Pattern of Long-term Fat Intake and BMI during Childhood and Adolescence – Results of the DONALD Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(10): 1203-9.

Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stephens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999; 282: 1530–38.

Andersen LF, Lillegaard IT, Overby N, Lytle L, Klepp KI, Johansson L. Overweight and obesity among Norwegian schoolchildren: Changes from 1993 to 2000. *Scand J Public Health*. 2005; 33: 99-106.

Andersson I, Rossner S. Meal patterns in obese and normal weight men: the “Gustaf” study. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 639–46.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1117—24.

Argiles JM, Lopez-Soriano J, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Journey from cachexia to obesity by TNF. *FASEB J* 1997; 11(10): 743-51. Kern AP, Seghizadeh M, Ong MJ, Bosch JR, Deem R, Simsolo BR. 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.

Arnold L, Ball M, Duncan A, Mann J. Effect of isoenergetic intake of three or nine meals on plasma lipoproteins and glucose metabolism. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 446–51.

Arsanian SA, Saad R, Lewy V, Danadian K, Janosky J. Hyperinsulinaemia in african-american children: decreased insulin clearance and increased insulin secretion and its relationship to insulin sensitivity. *Diabetes* 2002; 51: 3014–19.

Arsanian SA. Type 2 diabetes mellitus in children: pathophysiology and risk factors. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(suppl 6):1385–94.

Ashley MA, Buckley AJ, Criss AL, Ward JA, Kemp A, et al. Familial, anthropometric and metabolic associations of intramyocellular lipid levels in prepubertal males. *Pediatr Res* 2002; 51: 81–86.

Atkin LM, Davies BSW. Diet composition and body composition in preschool children. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:15-21.

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFAIS319.html

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome Proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 46: 1319–27.

Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999 Sep; 42(9): 1033-49.

Bailey RL, Mitchell DC, Miller C, Smiciklas-Wright H. Assessing the effect of underreporting energy intake on dietary patterns and weight status. *J Am Diet Assoc* 2007 Jan; 107(1): 64-71.

Ballard-Barbash R, Graubard I, Krebs-Smith SM, Schatzkin A, Thompson FE. Contribution of dieting to the inverse association between energy intake and body mass index. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 98-106.

Bandini LG, Schoeller DA, Cyr HN, Dietz WH. Validity of reported energy intake in obese and nonobese adolescents. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 421-25.

Barba G, Troiano E, Russo P, Siani A; ARCA Project Study group. Total fat, fat distribution and blood pressure according to eating frequency in children living in southern Italy: the ARCA project. *Int J Obes (Lond)* 2006 Jul; 30(7):1166-69. [Epub 2006 Feb 7].

Barrett-Connor E. Nutrition epidemiology: how do we know what they ate? *Am J Clin Nutr* 1991; 54(Suppl. 1): 182S–7S.

Barton BA, Eldridge AL, Thompson D et al. The relationship of breakfast and cereal consumption to nutrient intake and body mass index: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Am Diet Assoc* 2005; 105: 1383–89.

Basdevant A, Craplet C, Gut-Grand B. Snacking patterns in obese French women. *Appetite* 1993; 21: 17–23.

Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3338–42.

Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2084–89.

Baur L, O'Connor J, Pan DA, Kriketos AD, Storlien LH. The fatty acid composition of skeletal muscle membrane phospholipids: its relationship with the type of feeding and plasma glucose levels in young children. *Metabolism* 1998; 47: 106–12.

Baur LA, O'Connor J, Pan DA, Storlien LH. Relationships between maternal risk of insulin resistance and the child's muscle membrane fatty acid composition. *Diabetes* 1999; 48: 112–16.

Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998; 47: 1806–8.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83: 851–57.

Bell AC, Kremer PJ, Magarey AM, Swinburn BA. Contribution of 'Noncore' Foods and Beverages to the Energy Intake and Weight Status of Australian Children. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(5): 639-45.

Bellisle F, McDevitt R, Prentice AM. Meal frequency and energy balance. *Br J Nutr* 1997 Apr; 77 (Suppl. 1): S57-70. Review.

Bellisle F, Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Guillaud-Bataille M. Obesity and food intake in children: evidence for a role of metabolic and/or behavioral daily rhythms. *Appetite* 1988; 11: 111–18.

Benton D, Sargent J. Breakfast, blood glucose and memory. *Biol Psychol* 1992; 33: 207-10.

Berger J, Biswas C, Hayes N, Ventre J, Wu M, Doebber TW. An antidiabetic thiazolidinedione potentiates insulin stimulation of glycogen synthase in rat adipose tissues. *Endocrinology* 1996; 137: 1984–90.

Bergman RN, Ader M. Free fattyacids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11: 351–56.

Berkey CS, Rockett HR, Field AE, Gillman MW, Colditz GA. Sugar-added beverages and adolescent weight change. *Obes Res* 2004 May; 12(5): 778-88.

Berkey CS, Rockett HR, Field AE, Gillman MW, Frazier AL, Camargo Jr CA, et al. Activity, dietary intake, and weight changes in a longitudinal study of preadolescent and adolescent boys and girls. *Pediatrics* 2000; 105: E56.

Berkey CS, Rockett HR, Gillman MW, Field AE, Colditz GA. Longitudinal study of skipping breakfast and weight change in adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003 Oct; 27(10): 1258-66.

Berkey CS, Rockett HR, Willett WC, Colditz GA. Milk, Dairy Fat, Dietary Calcium, and Weight Gain: A Longitudinal Study of Adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159(6): 543-55.

Bernstein IL, Zimmerman JC, Czeisler CA, Weitzman ED. Meal patterns in ‘free-running’ humans. *Physiol Behav* 1981; 27: 621-23.

Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-88.

Birch LL, McPhee LS, Bryant JL, Johnson SL. Children's lunch intake: effects of midmorning snacks varying in energy density and fat content. *Appetite* 1993; 20: 83-94.

Black AE, Cole TJ. Biased over- or under-reporting is characteristic of individuals whether over time or by different assessment methods. *J Am Diet Assoc* 2001; 101: 70–80.

Black AE. Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000a Sep; 24(9): 1119-30.

Black AE. Small eaters or under-reporters? In: Ailhaud G, Guy-Grand B. (eds) Progress in obesity research 8th International Congress on Obesity, John Libbey Paris, 1999, pp 223-28.

Black AE. The sensitivity and specifcity of the Goldberg cut off for EI: BMR for identifying dietary reports of poor validity. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 395-404.

Blumberg B, Evans RM. Orphan nuclear receptors - new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 1998; 12: 3149–55.

Bogaert N, Steinbeck KS, Baur LA, Brock K, Bermingham MA. Food, activity and family environmental vs biochemical predictors of weight gain in children. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1242-49.

Booth DA. Mechanisms from models – actual effects from real life: The zero-calorie drink-break option. *Appetite* 1988; 11: 94–102.

Boutelle K, Neumark-Sztainer D, Story M, Resnick M. Weight control behaviors among obese, overweight, and nonoverweight adolescents. *J Pediatr Psychol* 2002; 27: 531-40.

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/IL-6” gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 1988; 3(1): 8–16.

Bowman SA, Gortmaker SL, Ebbeling CB, Pereira MA, Ludwig DS. Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. *Pediatrics* 2004 Jan; 113(1 Pt 1): 112-18.

Braam L, Ocke MC, Buenode Mesquita HB, Seidell JC. Determinants of obesity related underreporting of energy intake. *Am J Physiol* 1998; 147: 1081-86.

Bratusch-Marrian P, Bjorkmann O, Hagenfeldt L, et al. Influence of arginine on splanchnic glucose metabolism in man. *Diabetes* 1979; 28: 126–31.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004 Apr; 79(4): 537-43. Review. Erratum in: *Am J Clin Nutr* 2004 Oct; 80(4): 1090.

Briefel RR, Sempos CT, McDowell MA, Chien S, Alaimo K. Dietary methods research in the third National Health and Nutrition Examination Survey: under-reporting of energy intake. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(Suppl): 1203S-1209S.

Brugman E, Meulmeester JF, Spee-van der Wekke A, Beuker RJ, Zaadstra BM, Radder JJ, Verloove-Vanhorick PS. Dieting, weight and health in adolescents in The Netherlands. *Int J Obes* 1997; 21: 54-60.

Burley VJ, Cotton JR, Weststrate JA, Blundell JE. Effect on appetite of replacing natural fat with sucrose polyester in meals or snacks across one whole day. In Obesity in Europe, 1993, pp. 213–219 [H Ditschuneit, FA Gries, H Hauner, V Schusdziarra and JG Wechsler, editors]. London: John Libbey & Co

Buzzetti R, Petrone A, Caiazzo AM, Alemanno I, Zavarella S, Capizzi M, Mein CA, Osborn JA, Vania A, di Mario U. PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity in childhood obesity. *Pediatr Res* 2005 ;57(1):138-40.

Campbell KJ, Crawford DA, Ball K. Family food environment and dietary behaviors likely to promote fatness in 5-6 year-old children. *Int J Obes (Lond)* 2006 Aug; 30(8): 1272-80. [Epub 2006 Feb 21].

Cañete R, Gil-Campos M, Aguilera CM, Gil A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr* 2007 Jun; 46(4):181-87. [Epub 2007 Mar 26].

Carey AL, Febbraio MA. Interleukin-6 and insulin sensitivity: Friend or foe? *Diabetologia* 2004; 47: 1135–42.

Carruth BR, Skinner JD. The Role of Dietary Calcium and other Nutrients in Moderating Body Fat in Preschool Children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(4): 559-66.

Casano-Sancho P, López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Monrós E, Valls C, Rodríguez-González FX, Ricart W, Ibáñez L. The tumour necrosis factor (TNF)- α 308GA promoter polymorphism is related to prenatal growth and postnatal insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 129–35.

Cecil JE, Watt P, Palmer CN, Hetherington M. Energy balance and food intake: the role of PPAR gamma gene polymorphisms. *Physiol Behav* 2006 Jun 30; 88(3): 227-33. [Epub 2006 Jun 13].

Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome Proliferator-activated receptor γ : Adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994; 135: 798–800.

Chen AK, Roberts CK, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on metabolic syndrome in overweight children. *Metabolism* 2006; 55: 871–78.

CMA Committee on Medical Aspects. Dietary Sugars and Human Disease, HMSO, London, 1989.

Cole TJ, Bellizzi MG, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and children worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1240-43.

Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007 Jul 28; 335(7612):194. [Epub 2007 Jun 25].

Cooke L. The development and modification of children's eating habits. *Nutrition Bulletin* 2004; 29(1): 31-35(5).

Cram P, Nallamotheu BK, Fendrick AM, Saint S. Fast food franchises in hospitals. *JAMA* 2002; 287: 2945–46.

Crawley H, Summerbell C. Feeding frequency and BMI among teenagers aged 16-17 years. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997 Feb; 21(2): 159-61.

Crepinsek MK, Singh A, Bernstein LS, McLaughlin JE. Dietary effects of universal-free school breakfast: findings from the evaluation of the school breakfast program pilot project. *J Am Diet Assoc* 2006 Nov; 106(11): 1796-803.

Cromer BA, Tamowski KJ, Stein AM, Harton P, Thomson DJ. The school breakfast program and cognition in adolescents. *J Dev Behav Pediatr* 1990; 11: 295-300.

Cross AT, Babicz D, Cushman LF. Snacking patterns among 1800 adults and children. *J Am Diet Assoc* 1994; 94: 1398—403.

Cruz ML, Shaibi GQ, Weigensberg MJ, Spruijt-Metz, Ball GDC, Goran MI. Pediatric obesity and insulin resistance: chronic disease risk and implications for treatment and prevention beyond body weight modification. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 435–68.

Dalziel B, Gosby KA, Richman MR, Bryson MJ, Caterson DI. Association of the TNF-alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes Res* 2002;10(5) : 401-7.

Davies PS. Diet composition and body mass index in preschool children. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 443-8.

de Castro JM. Genetic influences on daily intake and meal patterns of humans. *Physiol Behav* 1993a; 53: 777-82.

de Castro JM. Social facilitation of duration and size but not rate of the spontaneous meal intake humans. *Physiol Behav* 1990; 47: 1129-35.

de la Hunty A, Ashwell M. Are people who regularly eat breakfast cereals slimmer than those who don't? A systematic review of the evidence. *Nutrition Bulletin* 2002; 32: 118–28.

Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Vidra NV, Louizou E, Chrysohooou C, Germanos A, Mantas Y, Tokmakidis S, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between TNF-alpha -308G>A polymorphism and the development of acute coronary syndromes in Greek subjects: the CARDIO2000-GENE Study. *Genet Med* 2005 Jul-Aug; 7(6): 411-16.

Dedoussis GV, Theodoraki EV, Manios Y, Yiannakouris N, Panagiotakos D, Papoutsakis C, Skenderi K, Zampelas A. The Pro12Ala polymorphism in PPARgamma2 gene affects lipid parameters in Greek primary school children: A case of gene-to-gender interaction. *Am J Med Sci* 2007 ;333(1):10-5.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARg associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20: 284 –87.

Dehghan M, Akhtar-Danesh N, Merchant AT. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutr J* 2005; 4: 24.

Dennison BA, Rockwell HL, Baker SL. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. *Pediatrics* 1997 Jan; 99(1):15-22. Erratum in: *Pediatrics* 1997 Oct;100(4):733.

Dennison BA, Rockwell HL, Nichols MJ, Jenkins P. Children's growth parameters vary by type of fruit juice consumed. *J Am Coll Nutr* 1999 Aug; 18(4): 346-52.

Devaney B, Fraker T. The dietary impact of the school breakfast program. *Amer J Agr Econ* 1998; 71: 932-48.

DiMeglio DP, Mattes RD. Liquid Versus Solid Carbohydrate: Effects on Food Intake and Body Weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(6): 794-800.

Dixon LB, Pellizzon MA, Jawad AF, Tershakovec AM. Calcium and Dairy Intake and Measures of Obesity in Hyperand Normocholesterolemic Children. *Obes Res* 2005; 13(10): 1727-38.

Dreon DM, Frey-Hewitt B, Ellsworth N, Williams PT, Terry RB, Wood PD. Dietary fat: carbohydrate ratio and obesity in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 995– 1000.

Drummond S, Crombie NE, Kirk TR. A critique of the effects of snacking on weight status. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 779–83.

Drummond S, Kirk T, Looy AD. Snacking: implications in body composition and energy balance. *Br Food J* 1995; 97(5): 12-15(4).

Drummond SE, Crombie NE, Cursiter MC, Kirk TR. Evidence that eating frequency is inversely related to body weight status in male, but not female, non-obese adults reporting valid dietary intakes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998 Feb; 22(2): 105-12.

Dubois L, Girard M, Potvin Kent M. Breakfast eating and overweight in a pre-school population: is there a link? *Public Health Nutr* 2006 Jun; 9(4): 436-42.

Dwyer JT, Evans M, Stone EJ, Feldman HA, Lytle L, Hoelscher D, Johnson C, Zive M, Yang M. Child, Adolescent Trial for Cardiovascular Health Cooperative Research G. Adolescents' eating patterns influence their nutrient intakes. *J Am Diet Assoc* 2001; 101: 798-802.

Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002; 360: 473–82.

Ebbeling CB, Sinclair KB, Pereira MA, Garcia-Lago E, Feldman HA, Ludwig DS. Compensation for energy intake from fast food among overweight and lean adolescents. *JAMA* 2004 Jun 16; 291(23): 2828-33.

Eckel RH, Yost TJ. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J Clin Invest* 1987; 80: 992–97.

Edelstein SL, Barrett-Connor EL, Wingard DL, Cohn BA. Increased meal frequency associated with decreased cholesterol concentrations; Rancho Bernardo CA, 1984–1987. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 664–69.

Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999; 42: 892–95.

Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J. Molecular cloning expression and characterization of human peroxisome Proliferators activated receptors $\gamma 1$ and $\gamma 2$. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 431–37.

Ellis KJ. Selected body composition methods can be used in field studies. *J Nutr* 2001 May;131(5):1589S–95S.

Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Mohlig M, Pfeiffer AF, Luft FC, Sharma AM. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003; 52: 942–47.

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 2000; 448: 121–38.

Evans D, Mann WA, Heer J, et al. Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor G (PPARG) does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 647–51.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1998; 240: 889–95.

Ezell JM, Skinner JD, Penfield MP. Appalachian adolescents snack patterns: morning, afternoon and evening snacks. *J Am Diet Assoc* 1985; 85: 1450–54.

Fabry P, Fodor J, Heji Z, Geizerova H, Balcarova O, Zvolankova K. Meal frequency and ischaemic heart disease. *Lancet* 1968; 27: 190–91.

Fabry P, Hejda S, Cerny K, Osancova K, Pechar J. Effect of meal frequency in schoolchildren. Changes in weight-height proportion and skinfold thickness. *Am J Clin Nutr* 1966 May;18(5): 358–61.

Fabry P, Hejl Z, Fodor J, Braun T, Zvolankova K. The frequency of meals: its relation to overweight, hypercholesterolaemia, and decreased glucose-tolerance. *Lancet* 1964; 18: 614–15.

Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, et al. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000; 136: 664–67.

Fagot-Campagna A. Emergence of type 2 diabetes mellitus in children: epidemiological evidence. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13(suppl 6): 1395-402.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 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* 2004; 145: 2273–82.

Faith MS, Dennison BA, Edmunds LS, Stratton HH. Fruit juice intake predicts increased adiposity gain in children from low-income families: weight status-by-environment interaction. *Pediatrics* 2006 Nov; 118(5): 2066-75.

Faith MS, Scanlon KS, Birch LL, Francis LA, Sherry B. Parent-child feeding strategies and their relationships to child eating and weight status. *Obes Res* 2004 Nov;12(11):1711-22. Review.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997 Jul 25; 272(30): 18779-89.

Farchi G, Mariotti S, Menotti A, et al. Diet and 20-y mortality in two rural population groups of middle-aged men in Italy. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1095-1103.

Farshchi HR, Taylor MA, Macdonald IA. Beneficial metabolic effects of regular meal frequency on dietary thermogenesis, insulin sensitivity, and fasting lipid profiles in healthy obese women. *Am J Clin Nutr* 2005 Jan; 81(1): 16-24.

Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB* 2002;16: 1335–47.

Feldamn A, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li Y, McTiernan C. The Role of Tumor Necrosis Factor in the Pathophysiology of Heart Failure. *J Am Coll Card* 2000; 35: 537-44.

Felig P. Amino acid metabolism in man. *Ann Rev Biochem* 1975; 44: 933–55.

Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998; 280: 1747–49.

Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 1999; 40(2): 97-105.

Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 255–59.

Festa A, D'Agostino Jr.R, Williams K, Karter AJ, Mayer-David EJ, Tracy RP, Haffner SM. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes(Lond)* 2001; 25: 1407–15.

Field AE, Austin SB, Gillman MW, Rosner B, Rockett HR, Colditz GA. Snack food intake does not predict weight change among children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 Oct; 28(10): 1210-16.

Field AE, Gillman MW, Rosner B, Rockett HR, Colditz GA. Association between fruit and vegetable intake and change in body mass index among a large sample of children and adolescents in the United States. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003 Jul; 27(7): 821-26.

Fisher JO, Birch LL. Eating in the absence of hunger and overweight in girls from 5 to 7 y of age. *Am J Clin Nutr* 2002 Jul; 76(1): 226-31.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369–76.

Floyd J, Fayans S, Conn J, et al. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* 1966; 45:1487–502.

Foltin RW, Fischman MW, Moran TH, Rolls BJ, Kelly TH. Caloric compensation for lunches varying in fat and carbohydrate content by humans in a residential laboratory. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 969-80.

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy-D12, 14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995; 83: 803–12.

Forshee RA, Anderson PA, Storey ML. Changes in Calcium Intake and Association with Beverage Consumption and Demographics: Comparing Data from CSFII 1994-1996, 1998 and NHANES 1999-2002. *J Am Coll Nutr* 2006; 25(2): 108-16.

Forshee RA, Storey ML. Total Beverage Consumption and Beverage Choices among Children and Adolescents. *Int J Food Sci Nutr* 2003; 54(4): 297-307.

Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2082–90.

Francis ES. Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease. *Circulation* 1999; 99: 861-66.

Francis LA, Lee Y, Birch LL. Parental weight status and girls' television viewing, snacking, and body mass indexes. *Obes Res* 2003 Jan;11(1):143-51.

Frank GC, Berenson GS, Schilling PE, Moore MC. Adapting the 24-hr recall for epidemiologic studies of school children. *J Am Diet Assoc* 1977; 71: 26-31.

Frape DL, Williams NR, Pickersgill J, Murrills R, Palmer C, Fletcher RJ. The postprandial response to high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate meals providing the same amounts of energy in subjects at risk of heart disease. *Proc Nutr Soc* 1994; 53: 221A.

Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? *Br J Nutr* 2000; 83: 71–77.

Frederiksen L, Brodbæk K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 ;87(8):3989-92.

Freedman DS, Srinivasan SR, Valdez RA, Williamson DF, Berenson GS. Secular increases in relative weight and adiposity among children over two decades: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 1997; 99: 420–26.

French SA, Harnack L, Jeffrey RW. Fast food restaurant use among women in the Pound of Prevention study: dietary, behavioral and demographic correlates. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1353–59.

French SA, Story M, Jeffrey RW. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22: 309–35.

French SA, Story M, Neumark-Sztainer D, Fulkerson JA, Hannan P. Fast food restaurant use among adolescents: associations with nutrient intake, food choices and behavioral and psychosocial variables. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001a; 25: 1823–33.

French SA. Pricing effects on food choices. *J Nutr* 2003; 133: 841S–3S.

Fricker J, Giroux S, Fumeron F, Apfelbaum M. Circadian rhythm of energy intake and corpulence status in adults. *Int J Obes* 1990; 14, 387–93.

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.

Gatenby SJ. Eating frequency: methodological and dietary aspects. *Br J Nutr* 1997 Apr; 77 (Suppl 1): S7-20. Review.

Gazanniga JM, Burns TL. Relationship between diet composition and body fatness, with adjustment for resting energy expenditure and physical activity, in preadolescent children. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 21-8.

Georgiadis G, Nassis GP. Prevalence of overweight and obesity in a national representative sample of Greek children and adolescents. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(9):1072-4.

Giammattei J, Blix GJ, Marshak HH, Wollitzer AO, Pettitt DJ. Television Watching and Soft Drink Consumption: Associations with Obesity in 11- to 13-Year-Old Schoolchildren. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157(9): 882-86.

Gibson RA, Kneebone GM. Fatty acid composition of infant formulae. *Aust Paediatr J* 1981; 17: 46-53.

Gibson SA, O'Sullivan KR. Breakfast cereal consumption patterns and nutrient intakes of British schoolchildren. *J R Soc Health* 1995; 115: 366-70.

Gil-Campos M, Canete R, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 2004^a ; 24: 963-74.

Gil-Campos M, Canete R, Gil A. Hormones regulating lipid metabolism and plasma lipids in childhood obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 75-80.

Gillis LJ, Kennedy LC, Gillis AM, Bar-Or O. Relationship between juvenile obesity, dietary energy and fat intake and physical activity. *Int J Obes* 2002; 26: 458-63.

Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Frazier AL, et al. Family dinner and diet quality among older children and adolescents. *Arch Fam Med* 2000; 9: 235-240.

Glinsman WH, Irasquin I, Park Y. Report from FDAs Sugar Task Force, USFDA Report, 1986.

Gortmaker SL, Must A, Perrin JM, et al. Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med* 1993; 329:108-12.

Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 1988; 4: 309-14.

Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin-6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 1992; 52: 4113-16.

Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome Proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995; 4: 281-99.

Greene-Finestone LS, Campbell MK, Evers SE, Gutmanis IA. Adolescents' Low-carbohydrate-density Diets are Related to Poorer Dietary Intakes. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(11): 1783-88.

Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin, and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(16): 6367-71.

Guillaume M, Lapidus L, Lambert A. Obesity and nutrition in children. The Belgian Luxembourg child study IV. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 323-28.

Gurnell M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the regulation of adipocyte function: lessons from human genetic studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005 Dec; 19(4): 501-23.

Guthrie JF, Lin B-H, Frazao E. Role of food prepared away from home in the American diet, 1977–78 versus 1994–96: changes and consequences. *J Nutr Educ Behav* 2002; 34:140–50.

Gwinup G, Bryon R, Rousch W, Kruger F, Hamwi G: Effect of nibbling versus gorging on serum lipids in man. *Am J Clin Nutr* 1963; 13: 209–13.

Hajeer AJ, Huthchinson IV. TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 216-28.

Hanley AJ, Harris SB, Gittelsohn J, Wolever TM, Saksvig B, Zinman B. Overweight among children and adolescents in a Native Canadian community: prevalence and associated factors. *Am J Clin Nutr* 2000 Mar; 71(3): 693-700.

Hannerz J, Greitz D, Ericson K. Is there a relationship between obesity and intracranial hypertension? *Int J Obes (Lond)* 1995; 19: 762–63.

Hannon TS, Rao G, Arslanian SA. Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005 Aug; 116(2): 473-80. Review.

Hård T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 1990; 249: 157–160.

Hardy LR, Harrell JS, Bell RA. Overweight in children: definitions, measurements, confounding factors, and health consequences. *J Pediatr Nurs* 2004; 19(6): 376-84.

Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH et al. Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999; 106: 506.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-209

Hassapidou M, Fotiadou E, Maglara E, Papadopoulou SK. Energy intake, diet composition, energy expenditure, and body fatness of adolescents in northern Greece. *Obesity (Silver Spring)* 2006 May; 14(5): 855-62.

Heidemann C, Hoffmann K, Spranger J, Klipstein-Grobusch K, Mohlig M, Pfeiffer AF, et al. A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)—Potsdam Study cohort. *Diabetologia* 2005; 48(6): 1126–34.

Heidemann C, Hoffmann K, Spranger J, Klipstein-Grobusch K, Mohlig M, Pfeiffer AF, et al. A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)—Potsdam Study cohort. *Diabetologia* 2005; 48(6): 1126–34.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621–36.

Heitmann BL, Lissner L. Dietary underreporting by obese individuals--is it specific or non-specific? *BMJ* 1995 Oct 14; 311(7011): 986-89.

Heitmann BL. The influence of fatness, weight change, slimming history and other lifestyle variables on diet reporting in adult Danish men and women aged 35-65 years. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17: 329-36.

Hejda S, Fabry P. Frequency of food intake in relation to some parameters of the nutritional status. *Nutrition Dieta* 1964; 6: 216-21.

Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Yacoub N, Kara G, Deheeger M. Nutritional value of breakfast and relationships with nutritional balance and mineral and vitamin status. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 1996; 31 (Suppl. 1): 18-25.

Hill RJ, Warren MK, Stenberg P, Levin J, Corash L, Drummond R, Baker G, Levin F, Mok Y. Stimulation of megakaryocytopoiesis in mice by human recombinant IL-6. *Blood* 1991; 77(1): 42–48.

Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 1998; 16 249–84.

Hofmann CA, Colca JR. New oral thiazolidinedione antidiabetic agents act as insulin sensitizers. *Diabetes Care* 1992; 15: 1075–78.

Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, et al. Functional antagonism between CCAAT/ Enhancer binding protein- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ on the leptin promoter. *J Biol Chem* 1997; 272(8): 5283–90.

Hoppe C, Mølgaard C, Vaag A, Barkholt V, Michaelsen KF. High intakes of milk, but not meat, increase s-insulin and insulin resistance in 8-year-old boys. *Eur J Clin Nutr* 2005 Mar; 59(3): 393-98.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tumor necrosis factor- α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665–68.

Hotamisligil SG, Arner P, Caro FJ, Atkinson LR, Spiegelman MB. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-15.

Hruban IA. Selection of snack foods from vending machines by high school students. *J Sch Health* 1977; 47: 33.

Hsu MH, Palmer CNA, Song W, Griffin KJ, Johnson EF. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome Proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem* 1998; 273: 27988–97.

Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996; 274: 2100–103.

Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002 Feb;13(1): 3-9.

Huang TT, Howarth NC, Lin BH, Roberts SB, McCrory MA. Energy intake and meal portions: associations with BMI percentile in U.S. children. *Obes Res* 2004 Nov; 12(11): 1875-85.

Huang, Terry TK, McCrory, Megan A. Dairy Intake, Obesity, and Metabolic Health in Children and Adolescents: Knowledge and Gaps. *Nutr Rev* 2005; 63(3): 71-80(10).

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6-174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease, systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22: 2243–52.

Hyams JS, Etienne NL, Leichtner AM, Theuer RC. Carbohydrate malabsorption following fruit juice ingestion in young children. *Pediatrics* 1988 Jul; 82(1): 64-68.

Idriss TH, Naismith HJ. TNFα and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; 50:184–195.

Isganaitis E, Lustig RH. Fast food, central nervous system insulin resistance, and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2451–62.

Ismail-Beigi F, Catalano PM, Hanson RW. Metabolic programming: fetal origins of obesity and metabolic syndrome in the adult. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 Sep; 291(3): E439-40. Review. [Epub 2006 Apr 25].

Ivashkiv BL. The history, basic science and biology of TNF. Hospital for Special Surgery (www.hss.edu) 2003.

Jahns L, Siega-Riz AM, Popkin BM. The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. *J Pediatr* 2001 Apr; 138(4): 493-98.

Jenkins D, Wolever T, Vuksan V, Brighenti F, Cunnane S, Rao A, Jenkins A, Buckley G, Patten R, Singer W, Corey P, Josse RG. Nibbling versus gorging: metabolic advantages of increased meal frequency. *N Engl J Med* 1989; 5: 929–34.

Jenkins DJ, Khan A, Jenkins AL, et al. Effect of nibbling versus gorging on cardiovascular risk factors: serum uric acid and blood lipids. *Metabolism* 1995; 44: 549 –55.

Johansson G, Wikman A, Åhrén AM, Hallmans G, Johansson I. Underreporting of energy intake in repeated 24-hour recalls related to gender, age, weight status, day of interview, educational level, reported food intake, smoking habits and area of living. *Public Health Nutr* 2001 Aug; 4(4): 919-27.

Johnson RK, Soultanakis RP, Matthews DE. Literacy and body fatness are associated with underreporting of energy intake in US low-income women using the multiple-pass 24-hour recall: a doubly labeled water study. [Journal Article] *J Am Diet Assoc* 1998 Oct; 98(10) :1136-40.

Joint FAO/WHO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech Rep Ser 2003; 916: 58–63.

Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bell DR. Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-Proliferator- activated-receptor genes. *Eur J Biochem* 1995; 233: 219–26.

Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* 2000; 528: 157–63.

Jpenberg AI, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome Proliferator-activated receptor_PPAR. α retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 1997; 272: 20108–17.

Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B. DNA binding properties of peroxisome Proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome Proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 1997; 272: 25252–59.

Kaare R. Norum Obesity and overweight. Global strategy on diet, physical activity and health. World Health Organization. 2003

Kafatos A, Verhagen H, Moschandreas J, Apostolaki I, Van Westerop JJ. Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J Am Diet Assoc* 2000;100:1487-93.

Kahara T, Takamura T, Hayakawa T, et al. PPAR γ gene polymorphism is associated with exercise-mediated changes of insulin resistance in healthy men. *Metabolism* 2003; 52: 209–12.

Kanemaki T, Kitade H, Kaibori M, et al. Interleukin 1 β and Interleukin 6, but not tumor necrosis factor α , inhibit insulin- stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 27: 1296–303.

Kant AK, Schatzkin A, Block G, et al. Food group intake patterns and associated nutrient profiles of the US population. *J Am Diet Assoc* 1991; 91:1532-37.

Kant AK, Schatzkin A, Graubard BI, Ballard-Barbash R. Frequency of eating occasions and weight change in the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19: 468 –74.

Kant AK. Indexes of Overall Diet Quality: A Review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96(8): 785-91.

Karayiannis D, Yannakoulia M, Terzidou M, Sidossis LS, Kokkevi A. Prevalence of overweight and obesity in Greek school-aged children and adolescents. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1189-92.

Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 1995; 83: 859-69.

Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of IL-6 and its receptor. *Front Biosci* 1996; 1: 340-57.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome Proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 2160-64.

Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001 Jul-Aug;17(7-8):669-73

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E745-E751.

Keski-Rahkonen A, Kaprio J, Rissanen A, Virkkunen M, Rose RJ. Breakfast skipping and health-compromising behaviors in adolescents and adults. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 842-53.

Kestler DP, Goldstein KM, Agarwal S, Fuhr JE, Andrews R, Hall RE. Hematopoietic differentiation activity of a recombinant human IL-6 (IL-6) isoform resulting from alternatively spliced deletion of the second exon. *Am J Hematol* 1999; 61(3): 169-77.

Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(6 Suppl): 1321S-3S.

Kirk RR. 2nd plenary session of 'body weight balance and regulation'. Role of dietary carbohydrate and frequent eating in body-weight control. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 349-58.

Kirk TR, Cursiter MC. Long-term snacking intervention did not lead to weight gain in free-living man. *Scand J Nutr* 1999; 2 (Suppl. 34): 3-17.

Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Yamauchi K. Increased incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus among Japanese schoolchildren correlates with an increased intake of animal protein and fat. *Clin Pediatr* 1998; 37: 111-15.

Kiyak HA, McNeill RW, West RA, Hohl T, Heaton PJ. Personality characteristics as predictors and sequelae of surgical and conventional orthodontics. *Am J Orthod* 1986 May; 89(5): 383-92.

Klein-Platat C, Draï J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 1178–84.

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A Prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome Proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813–19.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome Proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358: 771–74.

Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005;146: 3417–27.

Knol LL, Haughton B, Fitzhugh EC. Dietary Patterns of Young, Low-income U.S. Children. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(11): 1765-73.

Koletzko B, Girardet JP, Klish W, Tabacco O. Obesity in children and adolescents worldwide: current views and future directions: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35(Suppl 2): S205–S212.

Komuro T, Takano H. Roles of Peroxisome Proliferator-activated receptor γ in cardiovascular disease. *J Diab Complications* 2002;16:108-14.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; 368: 339–42.

Kras MK, 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.

Krassas GE, Tzotzas TH, Tsamatis CH, Konstantinidis TH. Prevalence and Trends in Overweight and Obesity among Children and Adolescents in Thessaloniki (Greece). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14: 1319-26.

Krebs M, Brehm A, Krssak M, et al. Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 2003; 46: 917–25.

Krebs M. Amino acid-dependent modulation of glucose metabolism in humans. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 351–54.

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome Proliferator-

activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay, *Mol Endocrinol* 1997;11: 779–91.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999; 4: 597–609.

Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990; 144(11): 4226–30.

Lafay L, Basdevant A, Charles M-A, Vray M, Balkau B, Borys J-M, Eschwege E, Romon M. Determinants and nature of dietary underreporting in a free-living population: the Fleurbaix Laventie Ville-Santé (FLVS) Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 27: 567-73.

Lafay L, Mennen L, Basdevant A, Charles MA, Borys JM, Eschwege E, Romon M. Does energy intake underreporting involve all kinds of food or only specific food items? Results from the Fleurbaix Laventie Ville Sante (FLVS) study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 Nov; 24(11):1500-6.

Larque E, Perez-Llamas F, Zamora S, Gil A. Biochemical and physiological effects of dietary trans fatty acids. In: Landow MV (ed) Trends in dietary fats research. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 2005, pp51–66.

Larque E, Gil-Campos M, Ramírez-Tortosa MC, Linde J, Can  ete R, Gil A. Postprandial response of trans fatty acids in prepubertal obese children. *Int J Obes* 2006; 30: 1488–93.

Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 469–75.

Lee CH, Evans RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2002 Oct; 13(8): 331-35.

Lee CN, Reed DM, MacLean CJ, et al. Dietary potassium and stroke. *N Engl J Med* 1988; 318: 995-96.

Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM. Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 1993; 260: 1117–21.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome Proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 1995; 270: 12953-56.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995; 270(22): 12953–56.

Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 335–63.

Lennernas MA-C, Akerstedt T, Hagman U, Bruce A, Hambræus L. A new approach for evaluation of meal quality and meal patterns. *J Hum Nutr Diet* 1993; 6(3): 261-73.

Levine J. Food industry marketing in elementary schools: implications for school health professionals. *J Sch Health* 1999; 69: 290–91.

Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience* 2002; 115: 879–89.

Lin BH, Guthrie JF, Frazao E. Nutrient contribution of food away from home. In: Frazao E (ed). *America's eating habits: changes and consequences*. USDA: Washington, DC; 1999. pp 213 – 242.

Lindquist CH, Gower BA, Goran MI. Role of dietary factors in ethnic differences in early risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2000 Mar; 71(3): 725-32.

Lissner L, Levitsky DA, Strupp BJ, Kalkwarf HJ, Roe DA. Dietary fat intake and regulation of energy intake in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 886-92.

Livingstone MB, Black AE. Markers of the validity of reported energy intake. *J Nutr* 2003; 133(Suppl. 3): 895S–920S.

Livingstone MB, Prentice AM, Coward WA, Strain JJ, Black AE, Davies PS, et al. Validation of estimates of energy intake by weighed dietary record and diet history in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 29-35.

Livingstone MBE, Prentice AM, Strain JJ, Coward WA, Black AE, Barker ME, McKenna PG, Whitehead RG. Accuracy of weighed dietary records in studies of diet and health. *BMJ* 1990 Mar 17; 300(6726): 708-12.

Lobstein T, Baur L, Uauy R; IASO International Obesity TaskForce. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004 May; 5(Suppl 1): 4-104.

Lobstein T, Dobb S. Evidence of a possible link between obesogenic food advertising and child overweight. *Obes Rev* 2005 Aug; 6(3): 203-8. Review.

Lobstein T, Frelut ML. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obes Rev* 2003; 4: 195–200.

Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral IL-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(2): 176–79.

Loos RJJ, Bouchard C. Obesity – is it a genetic disorder? *Intern Med* 2003; 254: 401–25.

Luan J, Browne PO, Harding A-H, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VKK, Wareham NJ. Evidence for Gene-Nutrient Interaction at the *PPAR γ* Locus. *Diabetes* 2001; 50: 686-89.

Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* 2001 Feb 17; 357(9255): 505-8.

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; 352: 497-505.

Lustig RH. Pediatric endocrine disorders of energy balance. *Rev Endocr Metab Disord* 2005 Dec; 6(4): 245-60.

Lytle LA, Himes JH, Feldman H, Zive M, Dwyer J, Hoelscher D, Webber L, Yang M. Nutrient intake over time in a multi-ethnic sample of youth. *Public Health Nutr* 2002;5(2):319-28.

Lytle LA, Seifert S, Greenstein J & McGovern P. How do children's eating patterns and food choices change over time? Results from a cohort study. *Am J Health Promot* 2000;14:222-8.

Macdonald FC. Quetelet index as indicator of obesity. *Lancet* 1986 May 3; 1(8488): 1043.

Maffeis C, Pinelli L, Schutz Y. Fat intake and adiposity in 8 to 11-year-old obese children. *Int J Obes* 1996; 20:170-4.

Maffeis C, Provera S, Filippi L, Sidoti G, Schena S, Pinelli L, Tato L. Distribution of food intake as a risk factor for childhood obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 Jan; 24(1): 75-80.

Maffeis C, Talamini G, Tato L. Influence of diet, physical activity and parents' obesity on children's adiposity: a four-year longitudinal study. *Int J Obes* 1998; 22: 758-64.

Maffeis C. Aetiology of overweight and obesity in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2000; 159: [Suppl 1] S35-S44. Review.

Magarey AM, Daniels LA, Boulton TJ, Cockington RA. Does fat intake predict adiposity in healthy children and adolescents aged 2-15 years? A longitudinal analysis. *Eur J Clin Nutr* 2003; 55: 471-81.

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. *Int J Obes* 2000; 24: 1319-26.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-50.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-39.

Marti A, Corbalan MS, Martinez-Gonzalez MA, Forga L, Martinez JA. CHO intake alters obesity risk associated with Pro12Ala polymorphism of PPAR gamma gene. *J Physiol Biochem* 2002; 58: 219–20.

Masud S, Ye S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor- γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet* 2003; 40: 773-80.

Mattes RD. Dietary Compensation by Humans for Supplemental Energy Provided as Ethanol or Carbohydrate in Fluids. *Physiol Behav* 1996; 59(1): 179-87.

May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Sthoeger Z, Helfgott DC, Chiorazzi N, Grieninger G, Sehgal PB. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 1988; 263(16): 7760–66.

McAuley KA, Mann JI. Nutritional determinants of insulin resistance. *J Lipid Res* 2006; 24 [Epub ahead of print].

McBride A, Wise A, McNeill G, James WPT. The pattern of food consumption related to energy intake. *J Hum Nutr Diet* 1990; 3: 27-32.

McCoy H, Moak S, Kenney MA, Kirby A, Chopin L, Billon W, Clark A, Disney G, Ercarli FG, Glover E, Korslund M, Lewis H, Ritchey J, Schilling P, Schuffner S, Wakefield T. Snacking patterns and nutrient density of snacks consumed by Southern girls. *J Nutr Ed* 1986;18: 61-66.

McGarry JD Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002 Jan; 51(1): 7-18.

McGloin AF, Livingstone MB, Greene LC, Webb SE, Gibson JM, Jebb SA, et al. Energy and fat intake in obese and lean children at varying risk of obesity. *Int J Obes* 2002; 26: 200-7.

Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F et al. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 289–94.

Mela DJ, Rogers PJ. Food composition, food intake and energy balance. In: Mela DJ, Rogers PJ, editors. Food, eating and obesity. London: Chapman and Hall; 1998. p. 74-100.

Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor γ gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet* 2003; 12(22): 2923–29.

Metzner HL, Lamphiear DE, Wheeler NC, Larkin FA. The relationship between frequency of eating and adiposity in adult men and women in the Tecumseh Community Health Study. *Am J Clin Nutr* 1977; 30: 712–15.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, and Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196–200.

Mokdad, AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA* 2004; 291: 1238–45. Erratum in: *JAMA* 2005; 293: 293-94.

Montonen J, Knekt P, Harkanen T, Jarvinen R, Heliovaara M, Aromaa A, et al. Dietary patterns and the incidence of type 2 diabetes. *Am J Epidemiol* 2005; 161(3): 219– 27.

Moore LL, Singer MR, Bradless ML, et al. Intake of fruits, vegetables, and dairy products in early childhood and subsequent blood pressure change. *Epidemiology* 2005; 16: 4-11.

Moreira P, Padez C, Mourao I, Rosado V. Dietary Calcium and Body Mass Index in Portuguese Children. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(70): 861-67.

Moreno LA, Tresaco B, Bueno G, Fleta J, Rodriguez G, Garagorri JM, Bueno M. Psyllium fibre and the metabolic control of obese children and adolescents. *J Physiol Biochem* 2003; 59: 235–42.

Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12 $\rightarrow$ Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001;504:891-4.

Mrdjenovic G, Levitsky DA. Nutritional and Energetic Consequences of Sweetened Drink Consumption in 6- to 13- Year-Old Children. *J Pediatr* 2003; 142(6): 604-10.

Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome Proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 1997; 272: 8071–76.

Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, et al. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor G2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 2003; 52: 1864–71.

Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988; 167(2): 332–44.

Myers KA, Lambe KG, Aldridge TC, Macdonald N, Tugwood JD. Amino acid residues in both the DNA-binding and ligand-binding domains influence transcriptional activity of the

human peroxisome Proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 522–26.

National Audit Office. Tackling obesity in England: a report by the Comptroller and auditor General. London: National Audit Office, 2001.

National Research Council - Committee on Diet and Health. Diet and health: implications for reducing chronic disease risk. Washington, DC: National Academy Press; 1989.

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-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.

Nelson M. Workshop on 'Nutrition and the Schoolchild' food, vitamins and IQ. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 29-55.

Newby PK, Peterson KE, Berkey CS, Leppert J, Willett WC, Colditz GA. Beverage consumption is not associated with changes in weight and body mass index among low-income preschool children in North Dakota. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 1086–94.

Newby PK, Tucker KL. Empirically Derived Eating Patterns Using Factor or Cluster Analysis: A Review. *Nutr Rev* 2004; 62(5): 177-203.

Newby PK. Are dietary intakes and eating behaviors related to childhood obesity? A comprehensive review of the evidence. *J Law Med Ethics* 2007 Spring; 35(1): 35-60. Review

Nicklas TA, Baranowski T, Cullen KW, Berenson G. Eating patterns, dietary quality and obesity. *J Am Coll Nutr* 2001 Dec; 20(6): 599-608. Review.

Nicklas TA, Morales M, Linares A, Yang SJ, Baranowski T, De Moor C, Berenson G. Children's meal patterns have changed over a 21-year period: the Bogalusa Heart Study. *J Am Diet Assoc* 2004 May; 104(5): 753-61.

Nicklas TA, Reger C, Myers L, O'Neil C. Breakfast consumption with and without vitamin-mineral supplement use favorably impacts daily nutrient intake of ninth-grade students. *J Adolesc Health* 2000; 27: 314-21.

Nicklas TA, Yang SJ, Baranowski T, Zakeri I, Berenson G. Eating patterns and obesity in children. The Bogalusa Heart Study. *Am J Prev Med* 2003 Jul; 25(1): 9-16.

Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: similar shifts seen across age groups. *Obes Res* 2002 May; 10(5): 370-78.

Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Prev Med* 2002; 35: 107–13.

Nieters A, Becker N, Linseisen J. Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort. *Eur J Nutr* 2002; 41(5):210-21.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998; 395: 137–43.

Norman RA, Bogardus C, and Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor- α locus in Pima Indians. *J Clin Invest* 1995; 96: 158-162.

Novotny R, Daida YG, Acharya S, Grove JS, Vogt TM. Dairy Intake is Associated with Lower Body Fat and Soda Intake with Greater Weight in Adolescent Girls. *J Nutr* 2004;134(8): 1905-9.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; 97:161–63.

O'Connor TM, Yang SJ, Nicklas TA. Beverage intake among preschool children and its effect on weight status. *Pediatrics* 2006 Oct;118(4):e1010-8.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006 Apr 5; 295(13): 1549-55.

Ohneda A, Parada E, Eisentraut A, Unger R. Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids. *J Clin Invest* 1968; 47: 2305–22.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley B. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995; 270: 1354–57.

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; 84(6): 2126–33.

Ortega RM, Requejo AM, Lopez-Sobaler AM et al. Difference in the breakfast habits of overweight/obese and normal weight schoolchildren. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68: 125–32.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003; 107: 671–74.

Ovaskainen ML, Reinivuo H, Tapanainen H, Hannila ML, Korhonen T, Pakkala H. Snacks as an element of energy intake and food consumption. *Eur J Clin Nutr* 2006 Apr; 60(4): 494-501.

Paeratakul S, Ferdinand DP, Champagne CM, Ryan DH, Bray GA. Fast-food consumption among US adults and children: dietary and nutrient intake profile. *J Am Diet Assoc* 2003 Oct; 103(10): 1332-38.

Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, and De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes (Lond)* 2001; 25: 1416–20.

Papadimitriou A, Kounadi D, Konstantinidou M, Xepapadaki P, Nicolaidou P. Prevalence of obesity in elementary schoolchildren living in Northeast Attica, Greece. *Obesity* 2006;14(7):1113-7.

Papoutsakis C, Vidra NV, Hatzopoulou I, Tzirkalli M, Farmaki AE, Evagelidaki E, Kapravelou G, Kontele IG, Skenderi KP, Yannakoulia M, Dedoussis GV. The Gene-Diet Attica investigation on childhood obesity (GENDAI): overview of the study design. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(3): 309-15.

Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005 Jul 15; 162(2): 101-14. Review. [Epub 2005 Jun 22].

Park KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Henry RR. PPAR γ gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes* 1997; 46: 1230–34.

Patrick H, Nicklas TA. A review of family and social determinants of children's eating patterns and diet quality. *J Am Coll Nutr* 2005 Apr; 24(2): 83-92. Review.

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B. Searching for the exercise factor: Is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24: 113–19.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-29.

Pereira MA, Jacobs DR Jr, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *JAMA* 2002 Apr 24; 287(16): 2081-89.

Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 2005; 365: 36–42.

Perez A, Hoelscher DM, Brown HS 3rd, Kelder SH. Differences in food consumption and meal patterns in Texas school children by grade. *Prev Chronic Dis* 2007 Apr; 4(2):A23. [Epub 2007 Mar 15].

Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia* 2001; 44(11): 2038–43.

Pfeffer K. Biological Functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 185-91.

Phillips SM, Bandini LG, Cyr H, Colclough-Douglas S, Naumova E, Must A. Dairy Food Consumption and Body Weight and Fatness Studied Longitudinally over the Adolescent Period. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(9): 1106-13.

Phillips SM, Bandini LG, Naumova EN, Cyr H, Colclough S, Dietz WH, et al. Energy-dense snack food intake in adolescence: longitudinal relationship to weight and fatness. *Obes Res* 2004;12: 461-72.

Pihlajamaki J, Ylinen, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M. The effect of the -308a allele of the TNF- α gene on insulin action is dependent on obesity. *Obes Res* 2003;11(7): 912-17.

Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Standiford D, Khoury PR, Zeitler P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr* 1996; 128: 608–15.

Poitou C, Viguerie N, Cancellio R, De Matteis R, Cinti S, Stich V, Coussieu C, Gauthier E, Courtine M, Zucker JD, Barsh GS, Saris W, et al. Serum amyloid A: Production by human white adipocytes and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* 2005; 48: 519–28.

Poppitt SD, Swan D, Black AE, Prentice AM. Is underreporting of energy intake in obese women macronutrient specific? Covert measurements in a metabolic facility. *Int J Obes* 1995; 19(Suppl. 2): 29.

Racette SB, Deusinger SS, Deusinger RH. Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Phys Ther* 2003 Mar; 83(3): 276-88.

Ragoussis J, Bloemer K, Weiss EH, Ziegler A. Localization of the genes for tumor necrosis factor and lymphotoxin between the HLA class I and III regions by field inversion gel electrophoresis. *Immunogenetics* 1988; 27: 66-69.

Randall E, Marshall JR, Graham S, Brasure J. Patterns in food use and their associations with nutrient intakes. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 739-45.

Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 1995; 375: 203–11.

Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 363–68.

Reaven GM. Why syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. *Cell Metab* 2005; 1: 9–13

Redondo MR, Ortega RM, Zamora MJ, Quintas ME, Lopez-Sobaler AM, Andres P et al. Influence of the number of meals taken per day on cardiovascular risk factors and the energy and nutrient intakes of a group of elderly people. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67: 176–82.

Reilly JJ, McDowell ZC. Physical activity interventions in the prevention and treatment of paediatric obesity: systematic review and critical appraisal. *Proc Nutr Soc* 2003 Aug; 62(3): 611-19. Review.

Reilly JJ. Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 327-41.

Reinehr T, Roth CL, Alexy U, Kersting M, Kiess W, Andler W. Ghrelin levels before and after reduction of overweight due to a low-fat high-carbohydrate diet in obese children and adolescents. *Int J Obes* 2005; 29: 362-68.

Remesar X, Tang V, Ferrer E, Torregrosa C, Virgili J, Masanes RM, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Estrone in Food: A Factor Influencing the Development of Obesity? *Eur J Nutr* 1999; 38(5): 247-53.

Renauld JC, Vink A, Van Snick J. Accessory signals in murine cytolytic T cell responses. Dual requirement for IL-1 and IL-6. *J Immunol* 1989; 143(6): 1894-98.

Rennie KL, Johnson L, Jebb SA. Behavioural determinants of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005 Sep; 19(3): 343-58. Review.

Resnicow K. The relationship between breakfast habits and plasma cholesterol levels in schoolchildren. *J Sch Health* 1991; 61: 81-85.

Riddick H, Kramer-LeBlanc C, Bowman SA, Davis C. Is fruit juice dangerous for children? U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. *Nutr Insights*, March 1997.

Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock* 2003; 20: 218-23.

Robitaille J, Després JP, Périusse L, Vohl MC. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Québec Family Study. *Clin Genet* 2003; 63: 109-16.

Rockett HR, Breitenbach M, Frazier AL, Witschi J, Wolf AM, Field AE, et al. Validation of a youth/adolescent food frequency questionnaire. *Prev Med* 1997; 26: 808-16.

Roden M, Perseghin G, Petersen KF, et al. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J Clin Invest* 1996; 97: 642-48.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996 Jun 15; 97(12): 2859-65.

Rodriguez G, Moreno LA. Is dietary intake able to explain differences in body fatness in children and adolescents? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006 May; 16(4): 294-301. Review. [Epub 2006 Jan 18].

Rodriguez-Cruz M, Tovar AR, del Prado M, Torres N. Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids. *Rev Invest Clin* 2005; 57: 457–72.

Rolland-Cachera M-F, Bellisle F, Deheeger M. Nutritional status and food intake in adolescents living in Western Europe. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:S41–6.

Rolls BJ, Kim-Harris S, Fischmann MW, Foltin RW, Moran TH, Stoner SA. Satiety after preloads with different amounts of fat and carbohydrate: implications for obesity. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 476-87.

Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001 Oct 12; 276(41): 37731-34. Review. [Epub 2001 Jul 17].

Rosenbaum M, Leibel RL. The physiology of body weight regulation: relevance to the etiology of obesity in children. *Pediatrics* 1998 Mar; 101(3 Pt 2): 525-39. Review.

Rosenbloom AL. Increasing incidence of type 2 diabetes in children and adolescents: treatment considerations. *Paediatr Drugs* 2002; 4: 209–21.

Rotenberg R. The impact of industrialisation on meal patterns in Vienna, Austria. *Ecol Food Nutr* 1981;11: 25-35.

Rotter Sopasakis V, Larsson BM, Johansson A, Holmang A, Smith U. Short term infusion of interleukin-6 does not induce insulin resistance in vivo or impair insulin signaling in rats. *Diabetologia* 2004; 47: 1879–87.

Ruxton CH, Kirk TR. Breakfast: a review of associations with measures of dietary intake, physiology and biochemistry. *Brit J Nutr* 1997;78: 199-213.

Ruxton CHS, Kirk TR, Belton NR. The contribution of specific dietary patterns to energy and nutrient intakes in 7- 8 year old Scottish schoolchildren. *J Hum Nutr Diet* 1996; 9: 23-31.

Sacks FM, Obarzanek E, Windhauser MM, for the DASH investigators. Rational and design of the Dietary Approaches to Stop Hypertension Trial (DASH): a multicenter controlled-feeding study of dietary patterns to lower blood pressure. *Ann Epidemiol* 1994; 5:108-18.

Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, et al. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2074–81.

Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L. Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int J Obes (Lond)* 2005; 30(2): 350– 58.

Santos JL, Boutin P, Verdich C, Holst C, Larsen LH, Toubro S, Dina C, Saris WHM, Blaak EE, Hoffstedt J, Taylor MA, Polak J, Clement K, Langin D, Astrup A, Froguel P, Pedersen O, Sorensen TIA, Martinez JA. Genotype-by-nutrient interactions assessed in European obese women. *Eur J Nutr* 2006; 45: 454-62.

Satia JA, Galanko JA, Siega-Riz AM. Eating at fast-food restaurants is associated with dietary intake, demographic, psychosocial and behavioural factors among African Americans in North Carolina. *Public Health Nutr* 2004 Dec; 7(8):1089-96.

Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* 1988; 8(8): 3546-49.

Schluter G, Lee C. Changing food consumption patterns: their effects on the US food system, 1972-92. *Food Rev* 1999; 22: 35-37.

Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1426-35.

Schroder H, Fito M, Isabel Covas M. Association of fast food consumption with energy intake, diet quality, body mass index and the risk of obesity in a representative Mediterranean population. *Br J Nutr* 2007;:1-7.

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993; 75: 567-78.

Schwabe JW, Neuhaus D, Rhodes D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 1990; 348: 458-61.

Scriba PC, Bauer M, Emmert D, Fateh- Moghadam A, Hoffman GG, Horn K, Pickard CR. Effects of obesity, total fasting and re-alimentation on L-thyroxine (T4), 3,5,30-L-triiodothyronine (T3), 3,30,50-L-triiodothyronine (rT3), thyroxine binding globulin (TBG), cortisol, thyrotrophin, cortisol binding globulin (CBG), transferrin, a 2-haptoglobin and complement C03 in serum. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1979; 91: 629-43.

Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckel J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 416-22.

Sethi KJ, Hotamisligil SG. The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10(1): 19-29.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome Proliferator-activated receptor α is a phosphoProtein: regulation by insulin. *Endocrinology* 1996;137: 4499-502.

Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature* 1998; 396: 377-80.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome Proliferator activated receptor. *Biochemistry* 1993; 32: 5598-604.

Shimizu H, Tsuchiya T, Sato N, Shimomura Y, Kobayashi I, Mori M. Troglitazone reduces plasma leptin concentration but increases hunger in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1998; 21: 1470–74.

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 1985; 313: 803-6.

Shizuya K, Komori T, Fujiwara R, Miyahara S, Ohmori M, Nomura J. The expressions of mRNAs for interleukin-6 (IL-6) and the IL-6 receptor (IL-6R) in the rat hypothalamus and midbrain during restraint stress. *Life Sci* 1998; 62: 2315–20.

Siega-Riz AM, Popkin BM, Carson T. Trends in breakfast consumption for children in the United States from 1965–1991. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 748S–56S.

Simopoulos AP. Is insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids? *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 367–72.

Sjoberg A, Hallberg L, Hoglund D, Hulthen L. Meal pattern, food choice, nutrient intake, and lifestyle factors in The Goteborg Adolescence Study. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1569-78.

Skinner JD, Bounds W, Carruth BR, Ziegler P. Longitudinal Calcium Intake is Negatively Related to Children's Body Fat Indexes. *J Am Diet Assoc* 2003; 103(12): 1626-31.

Skinner JD, Salvetti NN, Ezell JM, Penfield MP, Costello CA. Appalachian adolescents' eating patterns and nutrient intakes. *J Am Diet Assoc* 1985; 85: 1093-99.

Skoog T, Ferdinand M, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α gene associated with reduced circulating levels of TNF α . *Hum Mol Gen* 1999; 8:1443-49.

Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, Bembien DA. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol* 1988; 60(5): 709–23.

Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Stillman RJ, Van Loan M, Horswill CA, Wilmore JH. Influence of maturation on relationship of skinfolds to body density: a cross-sectional study. *Hum Biol* 1984; 56(4): 681–89.

Smith MM, Davis M, Chasalow FI, Lifshitz F. Carbohydrate absorption from fruit juice in young children. *Pediatrics* 1995 Mar; 95(3): 340-44.

Smith SA. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 2002 Nov; 30(Pt 6): 1086-90.

Sooikoian SC, González, Pirola CJ. Meta- analysis on the G-308A Tumor Necrosis Factor α Gene Variant and Phenotypes associated with the Metabolic Syndrome. *Obes Res* 2005;13(12): 2122-31 a.

Sookoian SC, García SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, González CD, Pirola CJ. The G-308A Promoter Variant of the Tumor Necrosis Factor- α Gene Is Associated With Hypertension in Adolescents Harboring the Metabolic Syndrome. *Am J Hypertens* 2005; Oct;18(10): 1271-75.

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is histone acetyltransferase. *Nature* 1997; 389: 194–98.

Spiegel TA, Shrager EE, Stellar E. Responses of lean and obese subjects to preloads, deprivation and palatability. *Appetite* 1989; 13: 45-69.

Stanton JL, Keast DR. Serum cholesterol, fat intake, and breakfast consumption in the United States adult population. *J Am Coll Nutr* 1989; 8: 226-29.

Steffen LM, Jacobs DR Jr, Murtaugh MA, Moran A, Steinberger J, Hong CP, Sinaiko AR. Whole grain intake is associated with lower body mass and greater insulin sensitivity among adolescents. *Am J Epidemiol* 2003;158: 243–50.

Stenlöf K, Wernstedt I, Fjällman T, Wallenius VKW, Jansson JO. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9): 4379-83.

Stern L, Iqbal N, Seshadri P, et al. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med* 2004; 140: 778–85.

St-Onge MP, Keller KL, Heymsfield SB. Changes in childhood food consumption patterns: a cause for concern in light of increasing body weights. *Am J Clin Nutr* 2003 Dec; 78(6): 1068-73. Review.

Strok GA, Cottrell ER, Abang AE, Buschbacher RM, Hannon TS. Childhood obesity: a simple equation with complex variables. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; 15: 15–32.

Suitor CW, Gleason PM. Using Dietary Reference Intake-based methods to estimate the prevalence of inadequate nutrient intake among school-aged children *J Am Diet Assoc* 2002 Apr;102(4):530-6.

Summerbell CD, Moody RC, Shanks J, Stock MJ, Geissler C. Relationship between feeding pattern and body mass index in 220 free-living people in four age groups. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 513–19.

Summerbell CD, Moody RC, Shanks J, Stock MJ, Geissler C. Sources of energy from meals versus snacks in 220 people in four age groups. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49: 33–41.

Summerbell CD. Differences in reported macronutrient composition of the diet in overweight and lean individuals dependent on validity of reported energy intakes. *Proc Nut Soc* 1996; 55: 232A.

Sunehag AL, Toffolo G, Campioni M, Bier DM, Haymond MW. Effects of dietary macronutrient intake on insulin sensitivity and secretion and glucose and lipid metabolism in healthy, obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4496–502.

Surapureddi S, Yu S, Bu H, Hashimoto T, Yeldandi AV, Kashireddy P, Cherkaoui-Malki M, Qi C, Zhu YJ, Rao MS, and Reddy JK. Identification of a transcriptionally active peroxisome Proliferator-activated receptor alpha-interacting cofactor complex in rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11836–41.

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of IL-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod* 1995;10(10): 2793–99.

Takano H, Komuro I. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cardiovascular disease. *J Diabetes Complications* 2002 Jan-Feb;16(1): 108-14.

Tam CS, Garnett SP, Cowell CT, Campbell TK, Cabrera G, Baur LA. Soft Drink Consumption and Excess Weight Gain in Australian School Students: Results from the Nepean Study. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(7): 1091-93.

Tapper K, Murphy S, Lynch R, Clark R, Moore GF, Moore L. Development of a scale to measure 9-11-year-olds' attitudes towards breakfast. *Eur J Clin Nutr* 2007 Mar 21; [Epub ahead of print].

Taylor MA, Garrow JS. Compared with nibbling, neither gorging nor a morning fast affect short-term energy balance in obese patients in a chamber calorimeter. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 519–28.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275: 18138–44.

The challenge of obesity in the WHO European Region. Fact sheet EURO/13/05 Copenhagen, Bucharest, 12 September 2005.

Thompson OM, Ballew C, Resnicow K, Gillespie C, Must A, Bandini LG, Cyr H, Dietz WH. Dietary pattern as a predictor of change in BMI z-score among girls. *Int J Obes (Lond)* 2006 Jan; 30(1):176-82.

Titan SM, Bingham S, Welch A, Luben R, Oakes S, Day N et al. Frequency of eating and concentrations of serum cholesterol in the Norfolk population of the European prospective investigation into cancer (EPIC-Norfolk): cross sectional study. *BMJ* 2001; 323:1286–90.

Togo P, Osler M, Sorensen TI, Heitmann BL. Food intake patterns and body mass index in observational studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(12):1741–51.

Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ RXR α . *NucAcids Res* 1994; 22: 5628–34.

Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phos- phenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 351–57.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147–56.

Toschke AM, Kuchenhoff H, Koletzko B, von Kries R. Meal frequency and childhood obesity. *Obes Res* 2005 Nov; 13(11): 1932-38.

Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Role of Dietary Proteins and Amino Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Annu Rev Nutr* 2007 Aug 21; 27: 293-310.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003; 348(26): 2599– 608.

Trichopoulou A, Georga K. Composition tables of simple and composite foods. Athens: Parisianos, 2004.

Trichopoulou A, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(5): 935– 40.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome Proliferators activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992; 11: 433–39.

Tumor Necrosis Factor. Online Mendelian Inheritance in Man. www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim.

Turner RC. The UK Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 1998; 21 (suppl 3): C35–C38.

Um JY, Park JH, Kim HM. Gene polymorphisms in tumor necrosis factor locus and waist–hip ratio in obese Koreans. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 117–22.

Utter J, Scragg R, Mhurchu CN, Schaaf D. At-home breakfast consumption among New Zealand children: associations with body mass index and related nutrition behaviors. *J Am Diet Assoc* 2007 Apr; 107(4): 570-76.

Vagstrand K, Barkeling B, Forslund HB, Elfhag K, Linne Y, Rossner S, Lindroos AK. Eating habits in relation to body fatness and gender in adolescents-results from the 'SWEDES' study. *Eur J Clin Nutr* 2007 Apr; 61(4): 517-25. [Epub 2006 Sep 27].

Van Dam RM, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Ann Intern Med* 2002; 136(3): 201– 9.

Van der Horst K, Oenema A, Ferreira I, Wendel-Vos W, Giskes K, van Lenthe F, Brug J. A systematic review of environmental correlates of obesity-related dietary behaviors in youth. *Health Educ Res* 2007 Apr; 22(2): 203-26. Review. [Epub 2006 Jul 21].

Van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB., Buurman, WA, and Greve, JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 2001; 25: 1759–66.

Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253–78.

Ventura AK, Loken E, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H, Birch LL. Understanding reporting bias in the dietary recall data of 11-year-old girls. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Jun; 14(6): 1073-84.

Vgontzas AN, Bixler EO, Tan TL, Kantner D, Martin LF, Kales A. Obesity without sleep apnea is associated with daytime sleepiness. *Arch Int Med* 1998; 158: 1333-37.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1313–16.

Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996; 97(11): 2553–61.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome Proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99: 2416–22.

Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz- Krynska R, Hindmarsh P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* 2005; 90: 10–14.

Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med* 2002; 132: 83-91.

Wallenius K, Wallenius VW, Sunter D, Dickson SL, Jansson J-O. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 560–65.

Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002; 8: 75–79.

Wang XL, Oosterhof J. Tumour necrosis factor a G–308A polymorphism and risk for coronary artery disease. *Clin Sci* 2000; 98: 435–37.

Ware CF. The TNF Superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 181-194.

Watson DE, Li B. TaqMan applications in genetic and molecular toxicology. *Int J Toxicol* 2005 ;24(3):139-45.

Weiss R, Dufour S, Taksali S, Tamborlane W, Petersen K, Bonadonna R, Boselli L, Barbetta G, Allen K, Rife F, Savoye M, Dziura J, Sherwin R, Shulman G, Caprio S. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet* 2003; 362: 951–57.

Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane W, Taksali S, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin R, Caprio S. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350: 2362–74.

Welsh JA, Cogswell ME, Rogers S, et al. Overweight among low-income preschool children associated with the consumption of sweet drinks: Missouri, 1999–2002. *Pediatrics* 2005;115: 223–29.

Westerterp-Plantenga MS, Wijckmans-Duysens NA & ten Hoor F. Food intake in the daily environment after energy reduced lunch, related to habitual meal frequency. *Appetite* 1994; 22: 173–82.

Whitman BY, Accardo P. Emotional symptoms in Prader-Willi syndrome adolescents. *Am J Med Genet* 1987 Dec; 28(4): 897-905.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series number 894. Geneva: WHO, 2000.

Wilson JAW, Enns CS, Goldman JD. Data tables: Combined Results from USDA's 1994 and 1995 Continuing Survey of Food Intakes of Individuals (serial online). Available at: <http://www.barc.usda.gov/bhnrc/foodsurvey/home.htm>. Accessed February 10, 1998.

Wolever TMS. Dietary carbohydrates and insulin action in humans. *BrJ Nutr* 2000; 83(suppl 1): 97–102.

Wolfe WS, Campbell CC, Frongillo EA Jr, Haas JD, Melnik TA. Overweight schoolchildren in New York State: prevalence and characteristics. *Am J Public Health* 1994 May; 84(5): 807-13. Erratum in: *Am J Public Health*. 2005 Jul; 95(7): 1093

Wu Q, Suzuki, M. Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. *Obes Rev* 2006; 7(2): 201-208(8).

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101: 311–20.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome Proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 1999; 3: 397–403. (ΔEN EINAI ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΑ)

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 1999; 3: 397–403.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 41245–54. a

Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A et al. Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2001; 108: 1001–13. b

Yannakoulia M, Karayiannis D, Terzidou M, Kokkevi A, Sidossis LS. Nutrition-related habits of Greek adolescents. *Eur J Clin Nutr.* 2004 ;58(4):580-6

Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 1987; 6(10): 2939–45.

Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Dec 18; 241(2): 270-74.

Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1_PPARdelta., to chromosome 6p21.1–p21.2. *Genomics* 1996; 35: 637–38.

Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148: 209-14.

Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects-associations with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction. A potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Art Thromb Vasc Biol* 1999;19: 972–78.

Zechel C, Shen XQ, Chen JY, Chen ZP, Chambon P, Gronemeyer H. The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 1994;13: 1425–33.

Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of Adiposity by Dietary Calcium. *FASEB J* 2000;14(9): 1132-38.

Zemel MB. Calcium Modulation of Adiposity. *Obes Res* 2003; 11(3): 375-76.

Zemel MB. Mechanisms of Dairy Modulation of Adiposity. *J Nutr* 2003a; 133(1): 252S-256S.

Zemel MB. The Role of Dairy Foods in Weight Management. *J Am Coll Nutr* 2005; 24(6) Supplement: 537S-546S.

Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. Insulin- and mitogen-activated Protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome Proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1996; 271: 31771–74.

Zhang B, Graziano MP, Doeber TW, Leibowitz MD, White-Carrington S, Szalkowski DM, et al. Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice. *J Biol Chem* Apr 19 1996; 271(16): 9455–9.

Zhang XG, Klein B, Bataille R. IL-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989; 74(1):11–13.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome Proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: Alternative Promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7921–25.

Zive MM, Elder JP, Prochaska JJ, et al. Sources of dietary fat in middle schools. *Prev Med* 2002; 35: 376–82.

Zizza C, Siega-Riz AM, Popkin BM. Significant increase in young adults' snacking between 1977–1978 and 1994–1996 represents a cause for concern! *Prev Med* 2001; 32: 303–10.

Λεκανίδου Ρ, Τσιτήλου Σ, Ροδάκης Γ. Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Βιολογίας 1998.

Φαρατζιάν Π, Γιαννακούλια Μ, Ρίσβας Γ, Μελίστας Α, Κωνσταντινίδου Μ. Παιδική και εφηβική παχυσαρκία. Ένα κρίσιμο πρόβλημα για την δημόσια υγεία. *Διατροφή – Διαιτολογία* 2004, Περίοδος Β, 8(3-4): 65-110.