



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ

Διευθύντρια: Επικ. Καθηγήτρια Μπαργιώτα Αλεξάνδρα

Διδακτορική Διατριβή

"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ ΣΤΑ
ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΤΑ ΙΣΟΜΕΡΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ"

υπό

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑΣ Π. ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

Φαρμακοποιός

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

© 2015 Χατζηδημητρίου Κωνσταντία

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος ΠΘ *-(Επιβλέπουσα)*.
2. Στεφανίδης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
3. Καψωριτάκης Ανδρέας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος ΠΘ *-(Επιβλέπουσα)*.
2. Στεφανίδης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
3. Καψωριτάκης Ανδρέας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
4. Μεσσήνης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
5. Φουρτούνας Κων/νος, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
6. Νταφόπουλος Κωνσταντίνος, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.
7. Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ.

Η διατριβή μου διεξήχθη υπό την επίβλεψη του **κυρίου Γεώργιου Ν. Κουκούλη, Αν. Καθηγητή Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας** ο οποίος αφυπηρέτησε και τη θέση του επιβλέποντος διαδέχθηκε η κυρία Αλεξάνδρα Μπαργιώτα, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ πάνω από όλους τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής αυτής κ. Γεώργιο Ν. Κουκούλη για την επιστημονική και ηθική βοήθεια και τις συμβουλές του όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Επικ. Καθηγήτρια κα Αλεξάνδρα Μπαργιώτα, για τη βοήθεια και τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής κ. Ιωάννη Στεφανίδη και κ. Ανδρέα Καψωριτάκη.

Ευχαριστώ θερμά τη φίλη και Μεταδιδακτορική συνεργάτη κα Σοφία Γκούγκουρα για τη βοήθεια και συμπαράσταση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα άτομα τα οποία συμμετείχαν ως αιμοδότες, χωρίς τη συμβολή των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσης διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για τη δική τους βοήθεια και στήριξη σε αυτή μου την προσπάθεια.

Χατζηδημητρίου Κωνσταντία

**Αφιερώνεται στο σεβαστό μου
Καθηγητή κ. Γεώργιο Ν. Κουκούλη
ως δείγμα ευγνωμοσύνης.**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	σελ.10
Summary.....	σελ.13
Συντμήσεις.....	σελ.15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ.20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Δομή, μεταβολισμός και βιολογικές δράσεις της λιπονεκτίνης.....	σελ.20
1.1 Προέλευση και μοριακή δομή της λιπονεκτίνης.....	σελ.20
1.2. Πολυμερή της λιπονεκτίνης.....	σελ.21
1.3. Υποδοχείς της λιπονεκτίνης.....	σελ.23
1.3.1 Δομή, ιστική κατανομή, έκφραση.....	σελ.23
1.4 Μηχανισμοί δράσης της λιπονεκτίνης.....	σελ.27
1.4.1 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης. Δράση της λιπονεκτίνης μέσω της AMPK, p38 MAPK και PPARα οδού.....	σελ.27
1.4.2 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με άλλες πρωτεΐνες ή αυξητικούς παράγοντες.....	σελ.30
1.4.2.1 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με την πρωτεΐνη APPL1.....	σελ.30
1.4.2.2 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με τους αυξητικούς παράγοντες PDGF-BB, b FGF και HB EGF.....	σελ.32
1.4.2.3 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με τον υποδοχέα GPVI (γλυκοπρωτεΐνη VI).....	σελ.34
1.4.2.4 Αλληλεπίδραση/αναστολή της έκφρασης των MSR-A.....	σελ.34
1.5 Βιολογικές δράσεις της λιπονεκτίνης.....	σελ.34
1.5.1 Επίδραση στο μεταβολισμό των υδατανθράκων.....	σελ.34
1.5.2 Επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων.....	σελ.38
1.5.3 Επίδραση στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών.....	σελ.40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Ινσουλινοαντίσταση, φλεγμονή και λιποκίνες.....	σελ.43
2.1.1 Ορισμός ινσουλινοαντίστασης.....	σελ.43
2.1.2 Παθοφυσιολογία των μηχανισμών που οδηγούν σε ινσουλινοαντίσταση.....	σελ.43
2.1.2.1 Εκτοπική συσσώρευση λιπιδίων.....	σελ.44
2.1.2.2 Λιπιδικοί διαμεσολαβητές της ινσουλινοαντίστασης.....	σελ.47
2.1.2.3 Υποδοχέας Toll-like Receptor-4 (TLR-4).....	σελ.51
2.1.2.4 Ο ρόλος του TNF-α στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη.....	σελ.52
2.1.2.5 Retinol-binding protein-4.....	σελ.54

2.2 Καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ινσουλινοαντίσταση.....σελ.54	σελ.54
2.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....σελ.54	σελ.54
2.2.2 Παχυσαρκία.....σελ.55	σελ.55
2.2.2.1 Επιπολασμός της παχυσαρκίας.....σελ.55	σελ.55
2.2.2.2 Ιστολογικές αλλαγές και λειτουργικές μεταβολές στη νεύρωση του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία.....σελ.56	σελ.56
2.2.2.3 Παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας.....σελ.57	σελ.57
2.3.1 Λιπονεκτίνη και ινσουλινοαντίσταση.....σελ.59	σελ.59
2.3.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της λιπονεκτίνης και ινσουλινοαντίσταση.....σελ.61	σελ.61
2.3.3 Δράση της λιπονεκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα.....σελ.62	σελ.62
2.3.4 Αλληλεπίδραση λιπονεκτίνης και Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων-άλφα.....σελ.62	σελ.62
2.3.5 Δράση λιπονεκτίνης μέσω του υποδοχέα καλρετικούλίνης.....σελ.63	σελ.63
2.4 Λιπονεκτίνη και φλεγμονή.....σελ.64	σελ.64
2.4.1 Φλεγμονώδεις λιποκίνες και Δείκτες φλεγμονής.....σελ.64	σελ.64
2.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης.....σελ.65	σελ.65
2.4.2.1 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης στα μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα.....σελ.65	σελ.65
2.4.2.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα.....σελ.67	σελ.67
2.4.3 Επίπεδα λιπονεκτίνης στη φλεγμονή.....σελ.68	σελ.68
2.5 Λιπονεκτίνη και αθηρογένεση.....σελ.68	σελ.68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παραγωγή και δράση των στεροειδών ορμονών των ωοθηκών.....σελ.72	σελ.72
3.1.1 Φυσιολογία του καταμήνιου κύκλου.....σελ.72	σελ.72
3.1.2 Εμμηνόπαυση.....σελ.74	σελ.74
3.2 Στεροειδή των γονάδων.....σελ.75	σελ.75
3.2.1 Σύνθεση.....σελ.75	σελ.75
3.2.2 Τρόπος κυκλοφορίας των στεροειδών ορμονών.....σελ.79	σελ.79
3.2.3 Μηχανισμοί δράσης των γοναδικών στεροειδών.....σελ.79	σελ.79
3.2.3.1 Υποδοχείς.....σελ.79	σελ.79
3.2.3.1.1 Υποδοχείς προγεστερόνης.....σελ.80	σελ.80
3.2.3.1.2 Υποδοχείς οιστρογόνων.....σελ.81	σελ.81

3.2.3.2 Μηχανισμοί σηματοδότησης της οιστραδιόλης (E2).....σελ.81	σελ.81
3.2.3.3 Υποδοχέας Ανδρογόνων.....σελ.83	σελ.83
3.3 Θέσεις παραγωγής και επίπεδα των ωοθηκικών ορμονών- Αναπαραγωγικό σύστημα...σελ.84	σελ.84
3.3.1 Προγεστερόνη.....σελ.84	σελ.84
3.3.2 Οιστρογόνα-Οιστραδιόλη.....σελ.86	σελ.86
3.3.2.1 Βιολογικές δράσεις των ωοθηκικών ορμονών.....σελ.87	σελ.87
3.3.2.1.1 Επίδρασεις των οιστρογόνων στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου.....σελ.88	σελ.88
3.3.2.1.2 Επίδραση της λιπονεκτίνης στην στεροειδογένεση από τα κύτταρα του ωοθυλακίου.....σελ.89	σελ.89
3.3.3 Τεστοστερόνη.....σελ.90	σελ.90
3.3.3.1 Επίδρασεις των ανδρογόνων στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου.....σελ.91	σελ.91
3.3.3.2 Σχέση επιπέδων τεστοστερόνης-ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη τύπου 2.....σελ.93	σελ.93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Φυλετικός διμορφισμός της λιπονεκτίνης.....σελ.95	σελ.95
4.1 Επίδραση των γοναδικών στεροειδών στην έκκριση της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος.....σελ.95	σελ.95
4.1.1 Επίδραση των οιστρογόνων.....σελ.95	σελ.95
4.1.2 Επίδραση των ανδρογόνων.....σελ.98	σελ.98
4.2 Ερευνητικό ερώτημα.....σελ.102	σελ.102
5. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣσελ.105	σελ.105
5.1 Σχεδιασμός της μελέτης.....σελ.105	σελ.105
5.2 Υλικά και συσκευές.....σελ.106	σελ.106
5.3 Υλοποίηση του πειραματικού μέρους.....σελ.106	σελ.106
5.3.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης με Western Blotting.....σελ.107	σελ.107
5.3.2 Ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία “sandwich” enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....σελ.112	σελ.112
5.4 Στατιστική ανάλυση.....σελ.114	σελ.114
5.5 Αποτελέσματα.....σελ.115	σελ.115
5.5.1 Αποτελέσματα λιπονεκτίνης με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting).....σελ.117	σελ.117

5.5.2 Αποτελέσματα από Τεχνική ELISA.....σελ.121	σελ.121
6. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....σελ.130	σελ.130
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.134	σελ.134
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ.139	σελ.139
9. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....σελ.139	σελ.139
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.141	σελ.141

Περίληψη

Η λιπονεκτίνη παράγεται από το λιπώδη ιστό και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος σε ποσοστό μέχρι 0.05% των συνολικών πρωτεϊνών του αίματος. Στο ανθρώπινο αίμα, η λιπονεκτίνη κυκλοφορεί υπό μορφή τριμερών (LMW, ~65 kDa), εξαμερών (MMW, ~150 kDa), και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών (HMW, ~280 και ~420 kDa). Τα πολυμερή HMW αποτελούν την περισσότερο δραστική μορφή του μορίου της λιπονεκτίνης και σχετίζονται με το μειωμένο κοιλιακό λίπος και την υψηλή οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η HMW λιπονεκτίνη και η αναλογία HMW προς ολική λιπονεκτίνη σχετίζονται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, την αντι-αθηρογόνο δράση, το μεταβολικό σύνδρομο και την πρόβλεψη για καρδιαγγειακή νόσο.

Η λιπονεκτίνη του αίματος παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό με το θηλυκό φύλο να έχει σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικής και HMW λιπονεκτίνης σε σχέση με τα αρσενικό φύλο, τόσο στο ανθρώπινο είδος όσο και στα τρωκτικά, ενώ τα επίπεδα των MMW και LMW πολυμερών είναι συγκρίσιμα στα δύο φύλα. Ο φυλετικός διμορφισμός της λιπονεκτίνης οδήγησε τους ερευνητές στην υπόθεση ότι η έκκριση και/ή ο μεταβολισμός της ορμόνης ρυθμίζεται από τα στεροειδή των γονάδων. Εντούτοις, προηγούμενες μελέτες που έγιναν με διαφορετικά μοντέλα, για την επίδραση των στεροειδών των γονάδων στην έκκριση της λιπονεκτίνης παρουσίασαν αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Σε αρκετές μελέτες, αλλά όχι όλες, διαπιστώθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές και τις έγκυες γυναίκες. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της ολικής και HMW λιπονεκτίνης ήταν υψηλότερες στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και χαμηλότερες στις έγκυες γυναίκες, ενώ τα MMW και LMW πολυμερή της λιπονεκτίνης παρουσίαζαν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις στις τρεις ομάδες των γυναικών (μετεμμηνοπαυσιακές, προεμμηνοπαυσιακές και έγκυες γυναίκες). Τα δεδομένα που υπάρχουν όσον αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης και της οιστραδιόλης (E2) είναι αντικρουόμενα και δείχνουν ότι εκτός από την οιστραδιόλη, άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία και οι μεταβολές στην αναλογία ανδρογόνων/οιστρογόνων, πιθανόν να συμβάλλουν στις διαφορές των επιπέδων της λιπονεκτίνης. Οι παράγοντες αυτοί πιθανόν να ευθύνονται και για το γεγονός ότι οι γυναίκες με το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα λιπονεκτίνης

στο αίμα και υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης, χωρίς να αποκλείεται η συνύπαρξη παχυσαρκίας και/ή αντίστασης στην ινσουλίνη. Τα ανδρογόνα φαίνονται να επηρεάζουν τα επίπεδα της λιπονεκτίνης. Οι υπογοναδικοί άνδρες σε σχέση με τους ευγοναδικούς παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης, τα οποία ελαττώνονται μετά από θεραπεία υποκατάστασης με τεστοστερόνη. Παρόμοια, σε φυσιολογικούς άνδρες, η πειραματική πρόκληση ανεπάρκειας/έλλειψης τεστοστερόνης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης. Η επίδραση αυτή δεν σημειωνόταν όταν χορηγείτο θεραπεία υποκατάστασης τεστοστερόνης. Εντούτοις, η υπερφυσιολογική χορήγηση τεστοστερόνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης.

Προηγούμενες μελέτες οι οποίες εξετάζουν τις πιθανές διακυμάνσεις της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, είναι περιορισμένες/ελάχιστες και παρουσίασαν αντικρουόμενα στοιχεία. Επιπλέον, μετρήθηκαν μόνο επίπεδα ολικής λιπονεκτίνης και η εικασία ότι μόνο η ΗΜW ισομορφή της λιπονεκτίνης είναι ευαίσθητη στις αλλαγές των φυλετικών στεροειδών δεν έχει περαιτέρω διερευνηθεί. Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, μόνο σε μία μελέτη μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην πρώτη φάση του καταμήνιου κύκλου, όπου παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ οιστραδιόλης και ΗΜW λιπονεκτίνης, και μεταξύ τεστοστερόνης, ελεύθερης τεστοστερόνης και ανδροστενεδιόνης και της αναλογίας ΗΜW λιπονεκτίνη/ολική λιπονεκτίνη. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση των φυλετικών στεροειδών στη συγκέντρωση της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της σε όλες τις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου. Ο φυσιολογικός καταμήνιος κύκλος αποτελείται από τρεις φάσεις με τα χαμηλότερα επίπεδα της E2 στην παραγωγική φάση, αυξημένα επίπεδα E2 στην προωορρηκτική φάση και αυξημένα επίπεδα E2 και προγεστερόνης στην εκκριτική φάση, με τα ανδρογόνα να παραμένουν αμετάβλητα. Επιπρόσθετα, έγινε αξιολόγηση των συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης στο αίμα, με τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης, της ΗΜW ισομορφής και της αναλογίας ΗΜW/ολικής λιπονεκτίνης σε υγιείς προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια των τριών φάσεων του γυναικείου καταμήνιου κύκλου οι φυσιολογικές διακυμάνσεις των οιστρογόνων και της

προγεστερόνης δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της στην κυκλοφορία του αίματος. Τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης και των ΗΜW και ΜΜW ισομερών, ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των προ- και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, αλλά σημαντικά χαμηλότερα στους άνδρες. Αντίθετα, δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των ΛΜW ισομερών της λιπονεκτίνης και της αναλογίας ΗΜW/ ολική λιπονεκτίνη στις τρεις ομάδες. Παρόμοια, η ποσοστιαία διακύμανση των ΗΜW, ΜΜW και ΛΜW ισομερών της λιπονεκτίνης δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων.

Συμπερασματικά, τα ωοθηκικά στεροειδή, κατά τη διάρκεια ενός φυσιολογικού καταμήνιου κύκλου, δεν ενέχονται ευθέως στη ρύθμιση της έκκρισης ή/και του μεταβολισμού της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της. Η τεστοστερόνη φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τον διμορφισμό των επιπέδων λιπονεκτίνης στα δύο φύλα.

Summary

Adiponectin is produced by the adipose tissue and secreted into the bloodstream where it accounts for up to 0.05% of total serum protein. In human plasma, adiponectin was found to circulate as a LMW trimer (~65 kDa), MMW hexamer (~150 kDa), and HMW multimers (~280 and ~420 kDa). HMW isoforms appears to be the most biological active form of adiponectin related to reduced abdominal fat and high basal lipid oxidation. Recent studies also suggest that HMW adiponectin and the ratio of HMW to total adiponectin are associated with insulin sensitivity, antiatherogenic activities, metabolic syndrome and prediction of cardiovascular disease.

Plasma adiponectin reveals a sexual dimorphism with females having significantly higher circulating levels of total adiponectin and HMW isoforms than males in both humans and rodents whereas the levels of MMW and LMW forms are comparable between sexes. This sexual dimorphism leads to the hypothesis that adiponectin secretion and/or metabolism are regulated by gonadal steroids. However, previous reports, applying different study models to investigate the effect sex steroids might exert on adiponectin secretion, are conflicting.

Many previous studies, but not all, have shown significantly higher circulating adiponectin concentrations in postmenopausal than in premenopausal and pregnant women. Particularly, serum concentrations of total and HMW adiponectin were highest in postmenopausal women and lowest in pregnant women, whereas between the 3 groups MMW and LMW isoforms were comparable. Existing data regarding the association between estradiol (E2) and adiponectin levels are conflicting indicating that in women besides E2 other factors, such as age and alterations in the androgen-to-estrogen ratio, may contribute to the mentioned differences. These might be the reason of the low adiponectin levels reported in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and elevated testosterone (T) levels although the coexistent obesity and/or insulin resistance cannot be excluded. Androgens seem also to influence plasma adiponectin levels. Hypogonadal men, compared to eugonadal, have significantly higher plasma adiponectin levels, which are reduced by testosterone replacement therapy. Similarly, in normal men experimental testosterone deficiency increased plasma adiponectin levels an effect that was

prevented when testosterone replacement therapy was also given. However, supraphysiologic testosterone administration resulted in decreased plasma adiponectin levels.

Previous studies investigating variations of circulating adiponectin concentrations during menstrual cycle are limited and have shown contradictory data. Moreover, only total circulating adiponectin levels were measured and the speculation that mainly the HMW isoform of adiponectin is sensitive to female sex steroids changes has not been further investigated. As far as we know there is only one study where circulating adiponectin multimer forms concentrations were measured at the early phase of the menstrual cycle and a negative association between estradiol and HMW adiponectin, and between testosterone, free testosterone, and androstenedione and the HMW to adiponectin ratio was observed. Therefore we examined whether sex hormones affect not only total plasma adiponectin levels but also adiponectin multimer forms in all phases of a normal menstrual cycle. A normal menstrual cycle corresponds to a three-step model with low E2 levels in the follicular phase, increased E2 levels in the preovulatory phase, and increased E2 plus progesterone levels in the luteal phase with androgens remaining unchanged. Moreover, we assessed the associations between blood testosterone and estradiol with total adiponectin, HMW adiponectin and the HMW/total adiponectin ratio in healthy premenopausal and postmenopausal women and men.

Our results demonstrate that during the three phases of an ovulatory menstrual cycle the normal changes of estrogen and progesterone do not affect the circulating levels of total adiponectin and its multimer forms. Total, HMW, and MMW adiponectin levels were comparable between pre- and postmenopausal women but significantly lower in men whereas no difference was found in the LMW adiponectin levels, and HMW/total adiponectin ratio between the studied groups. Similarly, the percent distribution of HMW, MMW, and LMW adiponectin isoforms did not show significant difference between the three groups.

In conclusion, normal menstrual cycle ovarian steroids are not involved directly in the regulation of secretion and/or metabolism of total adiponectin and its multimers. Testosterone seems to be responsible for the sexual dimorphism of adiponectin.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACC (acetyl-CoA carboxylase, καρβοξυλάση του ακετυλο-συνενζύμου A)

Acetyl-CoA (ακετυλο-συνένζυμο A)

Acrp 30 (adipocyte complement-related protein, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το συμπλήρωμα του λιποκυττάρου)

ADP (Adenosine diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη)

AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, 5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο ριβονουκλεοτίδιο)

Akt (πρωτεϊνική κινάση B)

AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης)

AMPKK (AMPK kinase(s), κινάση (εξ) της AMPK)

apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript, Τα αφθονότερα προϊόντα μεταγραφής γονιδίων του λιπώδη ιστού)

ApoC3 (Apolipoprotein C-III, απολιποπρωτεΐνη C-III)

APPL1 (adaptor protein-containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif, πρωτεΐνη προσαρμογέας η οποία περιέχει μία περιοχή με ομολογία πλεκστρίνης, μια περιοχή δεσμεύουσα τη φωσφο-τυροσίνη και ένα μοτίβο λευκίνης.

ATP (adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη)

Atrogin-1/MAFbx (muscle atrophy F-box, πρωτεΐνες F-box που σχετίζονται με μυϊκή ατροφία)

b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών)

3β-HSD (3β-Hydroxysteroid dehydrogenase, 3β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση)

bio-T (bioavailable testosterone, βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη)

BMI (Body Mass Index, Δείκτης Μάζας Σώματος)

BPP (region between PH and PTB domains, περιοχή ανάμεσα στις PH και PTB περιοχές)

CBG (Corticosteroid-binding globulin, σφαιρίνη δεσμεύουσα τα κορτικοστεροειδή)

Ca (calcium, ασβέστιο)

cAMP (Cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

CC (Coil-Coiled region, περιοχή ελίκωσης)

CD36 (Cluster of Differentiation 36, συστάδα διαφοροποίησης 36)

cGMP (cyclic guanosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη)

CoA oxidase (acyl-coenzyme A oxidase, οξειδάση του ακετυλο-συνενζύμου-A)

CPT1 (Carnitine palmitoyltransferase I, παλμίτυλοτρανσφεράση -1 της καρνιτίνης)

CRP (C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη)

DAG (diacyl-glycerol, διακυλογλυκερόλη)

DBD (DNA-binding domain, περιοχή δεσμεύουσα το DNA)

DCC (deleted in colorectal carcinoma, απαλείφεται στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου)

E₂ (estradiol, οιστραδιόλη)

ELISA (“sandwich” enzyme-linked immunosorbent assay, Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία ELISA)

eNOS (endothelial Nitric-Oxide Synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου)

EREs (Estrogen Response Elements, περιοχές απόκρισης οιστρογόνων)

ERKs (extracellular-signal-regulated kinases, Εξωκυτταρική Σηματο-Ρυθμιστική Κινάση)

FAD (flavin adenine dinucleotide, δινουκλεοτίδιο αδεΐνης φλαβίνης)

FADH₂ (reduced flavin adenine dinucleotide, ανηγμένη μορφή δινουκλεοτιδίου αδεΐνης φλαβίνης)

FAI (Free Androgen Index, Δείκτης Ελεύθερων Ανδρογόνων)

FATPs (specific Fatty Acid Transport Proteins, πρωτεΐνες μεταφορείς των λιπαρών οξέων)

FOXO (forkhead transcription factor family, οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων forkhead)

FSH (Follicle Stimulating Hormone, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη)

FSHR (FSH receptor, υποδοχέας της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης)

FT₄ (Free thyroxine, ελεύθερη θυροξίνη)

GBP28 (gelatin-binding protein 28kDa, πρωτεΐνη δεσμεύουσα σε γέλη, μοριακού βάρους 28kDa)

GIPC1 (GAIP-interacting protein, G Alpha αντιδρώσα πρωτεΐνη)

GLUTs (Glucose Transporters, γλυκομεταφορείς)

GMCSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων)

GPCR (G protein-coupled receptor, υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες G)

GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1, υποδοχέας οιστρογόνων συζευγμένος με πρωτεΐνες G)

GPVI (Glycoprotein VI, γλυκοπρωτεΐνη VI)

HASMCs (human aortic smooth muscle cells, ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα)

HbA1c (Glycated hemoglobin A1c, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη)

HB EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like growth factor, αυξητικός παράγοντας ομοιάζοντας με τον συνδεόμενο με την ηπαρίνη επιδερμικό αυξητικό παράγοντα)

HK (hexokinase, εξοκινάση)

HMW adiponectin (High molecular weight adiponectin, υψηλού μοριακού βάρους λιπονεκτίνη)

HOMA-R (Homeostasis model assessment of insulin resistance, Δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη)

IGF-I (insulin-like growth factor I, ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας I)

IKK (I κ B kinase, inhibitor of kappa B, αναστολέας του NF κ B)

IL-12 (interleukin-12, ιντερλευκίνη-12)

IL-13 (interleukin-13, ιντερλευκίνη-13)

INF (Interferon, ιντερφερόνη)

IRS-1 (Insulin receptor substrate 1- υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης 1)

LBD (Ligand-binding domain, περιοχή δεσμεύουσα τον προσδέτη)

LCAD (Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, αφυδρογονάση του ακυλοσυνενζύμου Α μακριάς αλυσίδα)

LH (Luteinizing Hormone, ωχρινοτρόπος ορμόνη)

LMW (Low molecular weight, χαμηλού μοριακού βάρους)

LpL (Lipoprotein lipase, λιποπρωτεϊνική λιπάση)

MAPK (Mitogen-activated protein kinase, μιτογόνο-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση)

MCP (Monocyte Chemoattractant Protein, μονοκυτταρική χημειοελκτική πρωτεΐνη)

MMW (Mean molecular weight, μεσαίου μοριακού βάρους)

MSR-A (Macrophage Scavenger Receptor, υποδοχέας-καθαριστής των μακροφάγων)

mTOR (mammalian Target of Rapamycin, στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά)

MuRF-1 (Muscle-specific RING finger protein 1, ειδική των μυών πρωτεΐνη)

NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide, νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο)

NADH (reduced Nicotinamide adenine dinucleotide, ανηγμένη μορφή νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτιδίου)

NF κ -B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells/ nuclear factor kappa B, πυρηνικός παράγοντας κ-B)

OCRL (Lowe oculocerebrorenal syndrome protein, οφθαλμοεγκεφαλονεφρικό σύνδρομο του Lowe)

PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-BB, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια-BB)

PDH (pyruvate dehydrogenase, πυροσταφυλική αφυδρογονάση)

PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase, φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυκινάση)

PFK (Phosphofructokinase, φωσφοφρουκτοκινάση)

PH (Pleckstrin Homology domain, περιοχή με ομολογία πλεκστρίνης)

PHD (pyruvate dehydrogenase, πυροσταφυλική αφυδρογονάση)

PI-3 kinase (phosphatidylinositide 3-kinase, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη 3-κινάση, κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης)

PIP3 (Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate, τριφωσφορική φωσφατιδική ινοσιτόλη)

PKC (Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C)

PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , ενεργοποιημένος υποδοχέας του πολλαπλασιαστή του υπεροξεισώματος)

PP2 (protein phosphatase 2A, πρωτεϊνική φωσφατάση 2A)

PRG (progesterone, προγεστερόνη)

PRL (prolactin, προλακτίνη)

PTB (PhosphoTyrosine-Binding domain, περιοχή δεσμεύουσα τη φωσφο-τυροσίνη)

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, δωδέκυλο-σουλφονικό νάτριο- ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης)

SHBG (Sex hormone-binding globulin, σφαιρίνη δεσμεύουσα τις φυλετικές ορμόνες)

StAR (steroidogenic acute regulatory protein, οξεία ρυθμιστική πρωτεΐνη της στεροειδογένεσης)

Syk (Spleen tyrosine kinase, κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης)

T (testosterone, τεστοστερόνη)

TAG (triacyl-glyceride, τριακυλ-γλυκερίδιο)

TCA (tricarboxylic acid, τρικαρβοξυλικό οξύ)

TLR4 (Toll-Like Receptor 4, ανάλογος των Toll υποδοχέας 4)

TNF (Tumor Necrosis Factor, Παράγοντας νέκρωσης όγκων)

TrkA (Tropomyosin receptor kinase A, κινάση A του υποδοχέα της τροπομυοσίνης)

TSH (Thyroid-stimulating hormone, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη)

UCP2 (Uncoupling Protein 2, πρωτεΐνη αποσύζευξης-2)

UDP-glucose (uracil-diphosphate glucose, ουρακιλοδιφωσφορική γλυκόζη)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)

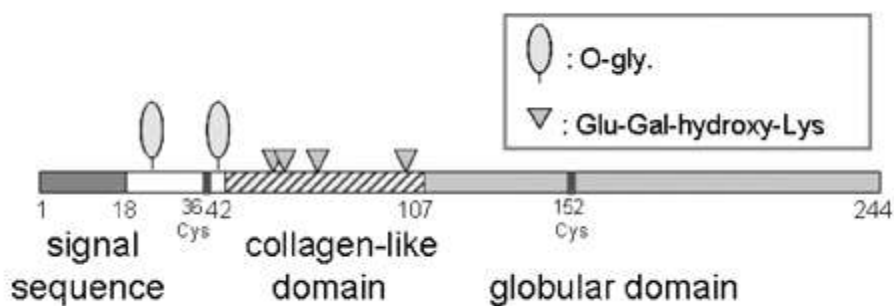
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Δομή, μεταβολισμός και βιολογικές δράσεις της λιπονεκτίνης

1. 1 Προέλευση και μοριακή δομή της λιπονεκτίνης

Η λιπονεκτίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό [1]. Διαχωρίστηκε από το ανθρώπινο πλάσμα και ονομάστηκε GBP28 (gelatin-binding protein 28kDa) [2], apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1) [3] ή αλλιώς Acyrp 30 (adipocyte complement-related protein) [4]. Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι σημαντική αφού καταλαμβάνει το 0,05% της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών [1]. Το γονίδιο APM1, που κωδικοποιεί την λιπονεκτίνη βρίσκεται στο χρωματόσωμα 3q27 [5]. Έχει μέγεθος 17 kb, αποτελείται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια [5] και ομοιάζει με τα γονίδια του κολλαγόνου X και VIII και του παράγοντα C1q του συμπληρώματος [1].

Το μόριο της λιπονεκτίνης αποτελείται από 244 αμινοξέα και περιλαμβάνει μια περιοχή σηματοδότησης, στο N-τελικό άκρο, μία περιοχή όμοια με το κολλαγόνο (collagen-like), και μία σφαιρική περιοχή, στο C-τελικό άκρο [1] (Σχήμα 1). Ειδικότερα, το μόριο της λιπονεκτίνης αποτελείται από μία N-τελική αλληλουχία σηματοδότησης από 18 αμινοξέα, ακολουθούμενη από μίαν αλληλουχία 24 αμινοξέων στην οποία δύο O-γλυκοσιδικές αλυσίδες είναι ενσωματωμένες στη θρεονίνη 22 και θρεονίνη 37. Αυτή η περιοχή ακολουθείται από 22 Gly-X-Pro ή Gly-X-X επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (περιοχή που ομοιάζει με το κολλαγόνο) και την C-τελική σφαιρική περιοχή [1]. Μέσω των δύο τελευταίων περιοχών τρία μονομερή της λιπονεκτίνης σχηματίζουν ένα σταθερό τριμερές το οποίο πολυμερίζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τα διάφορα πολυμερή [1] (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του μορίου της λιπονεκτίνης

1.2 Πολυμερή της λιπονεκτίνης

Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η λιπονεκτίνη σχηματίζει, στα 3T3-L1 λιποκύτταρα, τριμερή, εξαμερή και μεγαλύτερα πολυμερή [1]. Αργότερα, με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης οι ερευνητές διαχώρισαν τα διάφορα πολυμερή της ορμόνης στην κυκλοφορία του ανθρώπινου αίματος [2]. Μία άλλη ομάδα ερευνητών, προκειμένου να προσδιορίσει ποσοτικά τη συγκέντρωση της λιπονεκτίνης στο ανθρώπινο αίμα, παρήγαγε μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα και ανέπτυξε μίαν ενζυμική ανοσοπροσοφορική δοκιμασία (ELISA) [6]. Τα επίπεδα της λιπονεκτίνης στο πλάσμα υγιών ατόμων κυμαίνονται από 3 έως 30 $\mu\text{g/ml}$ [7]. Το 2003 οι Waki και συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδα (SDS-PAGE) σε συνθήκες μη αναγωγής και θέρμανσης– αποδιάταξης της ορμόνης, διαχώρισαν τα πολυμερή της λιπονεκτίνης προερχόμενα από διάφορα είδη, σε τρεις κατηγορίες: χαμηλού μοριακού βάρους τριμερή $\sim 67\text{kDa}$ (LMW, Low molecular weight), μεσαίου μοριακού βάρους πολυμερή $\sim 136\text{kDa}$ (MMW, Mean molecular weight) και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή $>300\text{kDa}$ (HMW, High molecular weight) [8].

Δύο από τα τρία μονομερή της τριμερούς λιπονεκτίνης συνδέονται ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στα μόρια κυστεΐνης στη θέση 22 για να σχηματίσουν το τριμερές μόριο [9]. Στη συνέχεια, τα τριμερή μόρια συνδέονται με ενδιάμεσους Cys³⁹ δισουλφιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν εξαμερή και υψηλότερου μοριακού βάρους πολυμερή [10].

Η σύνθεση της λιπονεκτίνης ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφής του γονιδίου της, της μετάφρασης του RNA σε πρωτεΐνη και της μετά-μεταφραστικής διαφοροποίησης που οδηγεί στον πολυμερισμό του μορίου της σε τριμερή (LMW), εξαμερή (MMW) και μεγαλύτερου μοριακού βάρους πολυμερή (HMW) (Σχήμα 2). Ο σχηματισμός των ισομερών της λιπονεκτίνης πραγματοποιείται στα λιποκύτταρα χωρίς αλληλομετατροπή των μορφών αυτών στην κυκλοφορία του αίματος [8].

Επίσης, στην κυκλοφορία του αίματος απαντάται σε χαμηλές συγκεντρώσεις η σφαιρική λιπονεκτίνη gAd η οποία αποτελείται από την περιοχή που ομοιάζει με το κολλαγόνο και η C-τελική περιοχή, απαραίτητες περιοχές προκειμένου να ασκεί βιολογική δράση η σφαιρική λιπονεκτίνη [10, 11] (Σχήμα 2).

Έχει υποστηριχθεί ότι η gAd παράγεται από πρωτεολυτική διάσπαση του μορίου της λιπονεκτίνης από τη λευκοκυτταρική ελαστάση η οποία εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και/ή τα ουδετερόφιλα. Εντούτοις, δεν έχει διευκρινισθεί η παθοφυσιολογική σπουδαιότητα της *in vivo* διάσπασης του μορίου της λιπονεκτίνης [12].

Η ανθρώπινη λιπονεκτίνη έχει μέσο χρόνο ζωής 14,3 ώρες, πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με άλλες ορμόνες. Η HMW μορφή μεταβολίζεται πιο γρήγορα από τη LMW μορφή ($T_{1/2}$ =13 ώρες και 17,5 ώρες αντίστοιχα) και αυτά τα πολυμερή είναι σταθερά σε διάφορες συνθήκες *in vivo* και *in vitro* [10, 13].

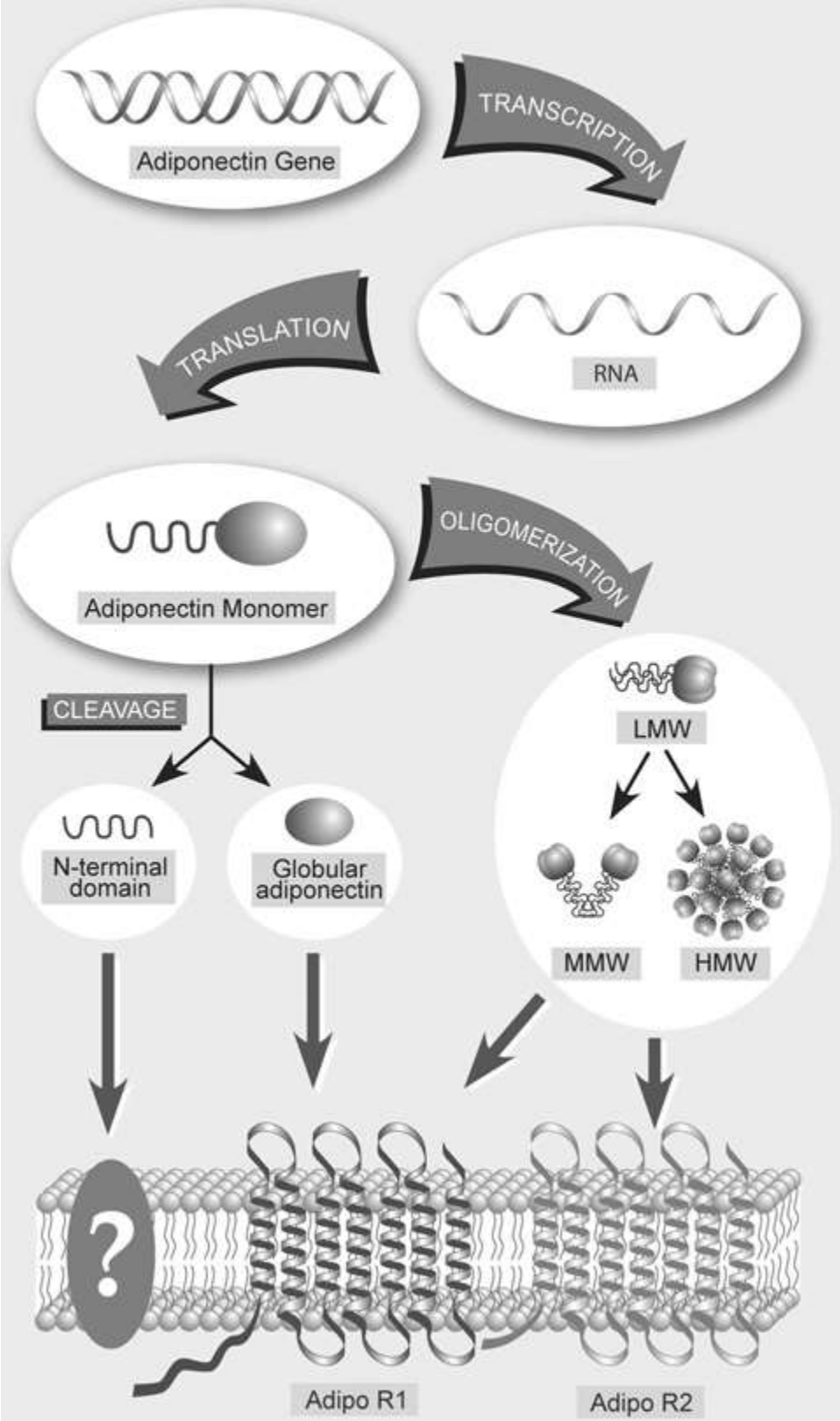
1.3 Υποδοχείς της λιπονεκτίνης

1.3.1 Δομή, ιστική κατανομή, έκφραση

Πριν από μερικά χρόνια κλωνοποιήθηκαν δύο υποδοχείς της λιπονεκτίνης, οι AdipoR1 και AdipoR2. Οι δύο υποδοχείς διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές και παρουσιάζουν δομική ομοιότητα σε ποσοστό 67,5% του μορίου τους [14]. Εκφράζονται κυρίως στους μύες, το ήπαρ [14] και στα ανθρώπινα λιπώδη κύτταρα [15]. Ο υποδοχέας AdipoR1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερο βαθμό στους σκελετικούς μύες [14], ενώ ο AdipoR2 εκφράζεται πρωταρχικά στο ήπαρ [14]. Σε *in vitro* μελέτες, διαπιστώθηκε ότι οι δύο τύποι υποδοχέων της λιπονεκτίνης ενεργοποιούν συγκεκριμένα μόρια κυτταρικής σηματοδότησης όπως είναι ο ενεργοποιημένος υποδοχέας του πολλαπλασιαστή του υπεροξεισώματος (PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor- α), η ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMPK), και η p38 μιτογόνο-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση (MAPK) [16] (Σχήμα 3).

Η δράση των υποδοχέων αυτών ρυθμίζεται επίσης από τους συνδέτες των ηπατικών X-υποδοχέων (Liver X receptor ligands) ενώ έχει προταθεί η ύπαρξη περισσότερων υποδοχέων της λιπονεκτίνης [10, 16, 17].

Ο Adipo R1 υποδοχέας παρουσιάζει υψηλή χημική συγγένεια πρόσδεσης με τη σφαιρική λιπονεκτίνη (τριμερή gAd) και χαμηλή χημική συγγένεια με ακέραιες, (fAd) μορφές λιπονεκτίνης (τριμερή, εξαμερή και υψηλότερου μοριακού βάρους πολυμερή). Αντίθετα ο Adipo R2 υποδοχέας παρουσιάζει ενδιάμεση χημική συγγένεια πρόσδεσης και για τις δύο μορφές λιπονεκτίνης, gAd και fAd [9] (Σχήμα2).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του γονιδίου, της σύνθεσης, του πολυμερισμού και του τρόπου δράσης της λιπονεκτίνης.

Οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στα β-παγκρεατικά κύτταρα [18], στα καρδιομυοκύτταρα [19], στους οστεοβλάστες [20], στα κύτταρα των παρακοιλιακών πυρήνων του υποθαλάμου [21, 22] και στα νεύρα των πλάγιων πυρήνων του υποθαλάμου (lateral hypothalamic nucleus) [21]. Η έκφραση των Adipo-R1 και -R2 είναι παρόμοια στον υποδόριο και επιπλοϊκό λιπώδη ιστό, και χαμηλότερη σε σχέση με το μυϊκό ιστό [23]. Οι Adipo-R1 και -R2 εκφράζονται στα μακροφάγα κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι AdipoR1 εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα μονοκύτταρα από τους AdipoR2, και η έκφραση των AdipoR1 μειώνεται με τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Αντίθετα, η έκφραση των AdipoR2 δεν μεταβάλλεται με τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων [24]. Οι υποδοχείς της λιπονεκτίνης εκφράζονται στο φυσιολογικό επιθήλιο και σε καρκινικά κύτταρα στο κόλον [25]. Επίσης, οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στα νεφρά [26]. Στα ποδοκύτταρα, η λιπονεκτίνη ασκεί άμεση δράση μέσω των υποδοχέων της AdipoR1 και AdipoR2. Το επίπεδο έκφρασης των AdipoR1 στα νεφρά και τα ποδοκύτταρα είναι συγκρίσιμο με αυτό στο ήπαρ. Αντίθετα, η έκφραση των AdipoR2 στα νεφρά και τα ποδοκύτταρα είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με την έκφραση των υποδοχέων αυτών στο ήπαρ [26]. Στον πλακούντα εκφράζονται οι AdipoR2 υποδοχείς της λιπονεκτίνης [27] ενώ στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων εκφράζονται μόνο οι Adipo-R1 [28]. Επίσης, οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στους όρχεις (σε αρουραίους και κοτόπουλα) [29,30], και στον σπλήνα (σε γουρούνια) [31].

Οι αλλαγές στην έκφραση των υποδοχέων λιπονεκτίνης στους σκελετικούς μύες σχετίζονται θετικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα επίπεδα της ινσουλίνης στα πλάσμα. Η έκφραση των υποδοχέων παρουσιάζεται μειωμένη στους σκελετικούς μύες ασθενών με οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη. Διαφορετική έκφραση των AdipoR1 υποδοχέων παρατηρήθηκε στα *ob/ob*, *db/db* και σε ποντίκια τα οποία έγιναν διαβητικά μετά χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης [32-34]. Η ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων σχετίζεται με αλλαγές στις διατροφικές συνθήκες, μεταβολικές αλλαγές και αντιδιαβητικούς παράγοντες. Ο Fang και οι συνεργάτες του, διεξήγαγαν σειρά *in vitro* πειραμάτων προκειμένου να μελετήσουν άμεσα τη ρύθμιση της έκφρασης των AdipoRs από την υπερινσουλιναιμία και την υπεργλυκαιμία [35]. Οι δύο αυτές συνθήκες μείωναν τα AdipoR1 mRNA επίπεδα και τις μεταβολικές δράσεις της gAd στους

σκελετικούς μύες προκαλώντας αντίσταση στην σφαιρική λιπονεκτίνη. Επίσης, η υπερινσουλιναμία αύξανε την ευαισθησία των μυϊκών κυττάρων στην fAd, ενισχύοντας την έκφραση AdipoR2. Οι μεταβολές αυτές που παρατηρούνται στην έκφραση των AdipoRs και συνεπώς στην λειτουργία των διαφορετικών μορφών λιπονεκτίνης υπό συνθήκες εξέλιξης σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, επιβεβαιώνουν την υπόθεση των ερευνητών για την αντίσταση στη σφαιρική λιπονεκτίνη η οποία καταλήγει σε ένα φαύλο κύκλο γεγονότων που οξύνουν την ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη [11].

Σε σειρά μελετών έκφρασης και κλωνοποίησης που διεξήχθησαν προκειμένου να ταυτοποιηθούν μόρια κυτταρικής επιφάνειας που δεσμεύουν τη λιπονεκτίνη, η T-κατχερίνη (T-cadherin) φαίνεται να δρα ως υποδοχέας της εξαμερούς αλλά και της HMW μορφής της λιπονεκτίνης σε πολλά είδη κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων. Η T-κατχερίνη δεν παρουσιάζει λειτουργία υποδοχέα για τη σφαιρική ή την τριμερή (χαμηλού μοριακού βάρους) μορφή της λιπονεκτίνης [9, 36].

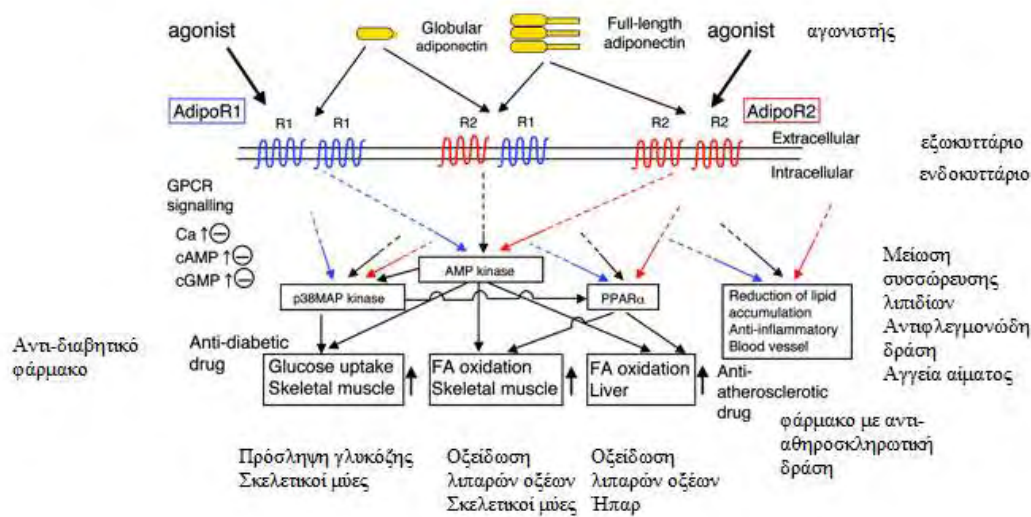
Η T-κατχερίνη ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας οι οποίες διαμεσολαβούν τις προκαλούμενες από το ασβέστιο αλληλεπιδράσεις και σηματοδοτήσεις των κυττάρων [37]. Αρχικά, η πρωτεΐνη αυτή περιγράφηκε στο νευρικό σύστημα αλλά αργότερα διαπιστώθηκε η έκφραση και κατανομή της και σε άλλους ιστούς με τα υψηλότερα επίπεδα στο καρδιαγγειακό σύστημα και τα χαμηλότερα στο μυϊκό. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στον εσωτερικό και μέσο χιτώνα των αρτηριών και φλεβών και εκφράζεται στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Παρατηρήθηκε επίσης η έκφραση της από το νεοσχηματιζόμενο χιτώνα μετά από τραυματισμό της καρωτιδικής αρτηρίας ποντικών [38, 39].

Ο Denzel και συν. παρατήρησαν σε *in vitro* (C2C12 μυοκύτταρα) και *in vivo* δοκιμές σε ποντίκια, ότι η HMW λιπονεκτίνη συνδέεται με την T-κατχερίνη και προστατεύει από καρδιακό στρες. Επίσης, παρατήρησαν εκτεταμένο συνεντοπισμό λιπονεκτίνης και T-κατχερίνης στα καρδιομυοκύτταρα *in vivo*. Σε μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας και ισχαιμίας-επαναγγείωσης, η παρουσία της T-κατχερίνης ήταν απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της AMPK από τη λιπονεκτίνη [40].

Οι υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 δεν φαίνεται να συνδέονται με τις πρωτεΐνες G, αφού η υπερέκφραση των AdipoR1/R2 έχει μικρή επίδραση στο cAMP, cGMP και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου [11] (Σχήμα 3).

1.4 Μηχανισμοί δράσης της λιπονεκτίνης

1.4.1 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης. Δράση της λιπονεκτίνης μέσω της AMPK, p38 MAPK και PPARα οδού



Σχήμα 3. Μοριακοί μηχανισμοί της δράσης της λιπονεκτίνης [16].

Συντομογραφίες: GPCR, G protein-coupled receptor= υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη; Ca, calcium=ασβέστιο; cAMP, cyclic adenosine monophosphate= κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη; cGMP, cyclic guanosine monophosphate= κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη.

Η λιπονεκτίνη ασκεί τις διάφορες δράσεις της μέσω της AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης, της p38 μιτογόνο-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), και του

ενεργοποιημένου υποδοχέα του πολλαπλασιαστή του υπεροξεισώματος (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , PPAR α) στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ, ενισχύοντας την πρόσληψη της γλυκόζης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων στους μύες και αναστέλλοντας τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης και λιπιδίων στην κυκλοφορία [14, 41]. Οι επιφανειακοί κυτταρικοί υποδοχείς AdipoR1 and AdipoR2 [42], διαμεσολαβούν τις δράσεις αυτές της λιπονεκτίνης, με άμεση αλληλεπίδραση της με το εξωκυτταρικό καρβοξυ-τελικό άκρο των υποδοχέων [14, 42] (Σχήμα 3).

Οι gAd και fAd μορφές λιπονεκτίνης ενεργοποιούν την AMPK στους σκελετικούς μύες [41]. Η πρωτεϊνική κινάση AMPK αποτελεί σημαντικό μεταβολικό ρυθμιστή, και ενεργοποιείται σε περιπτώσεις μειωμένης ενεργειακής βιοδιαθεσιμότητας (υψηλές κυτταρικές AMP/ATP αναλογίες) για να εμποδίσει αναβολικές διαδικασίες [41, 43]. Η AMPK ασκεί σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες, μέσω της φωσφορυλίωσης της καρβοξυλάσης του ακετυλο-συνενζύμου-A (ACC) στη Ser 221. Με αυτόν τον τρόπο, η AMPK απενεργοποιεί τη δράση της ACC, η οποία καταλύει το σχηματισμό του μαλόνυλο-συνενζύμου-A, η αύξηση του οποίου παρεμποδίζει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τη δράση της παλμιτόυλο-τρανσφεράσης -1 της καρνιτίνης (CPT1). Ως εκ τούτου, η αναστολή της δράσης της ACC προκαλεί μείωση στην ποσότητα του μαλόνυλο-συνενζύμου-A γεγονός που επιτρέπει την αυξημένη εισροή λιπαρών οξέων (μέσω της παλμιτόυλο-τρανσφεράσης-1 της καρνιτίνης) στα μιτοχόνδρια όπου οξειδώνονται [44, 45]. Η λιπονεκτίνη διεγείρει τη φωσφορυλίωση της 5'-AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση της καρβοξυλάσης του ακετυλοCoA και την οξείδωση των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ, με αποτέλεσμα τη μείωση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες και την αυξημένη ευαισθησία της ινσουλίνης *in vivo* [41] (Σχήμα 4). Σε *in vivo* και *in vitro* δοκιμές που έγιναν από τον Yamauchi και συν. σε ποντίκια, η σφαιρική και οι ακέραιες μορφές λιπονεκτίνης προκαλούσαν φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της 5'-AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης, οξείδωση των λιπαρών οξέων, πρόσληψη γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος στους σκελετικούς μύες και στα C2C12 μυοκύτταρα. Αντίστοιχα στο ήπαρ, μόνο οι ακέραιες μορφές λιπονεκτίνης ενεργοποιούσαν την AMPK [41].

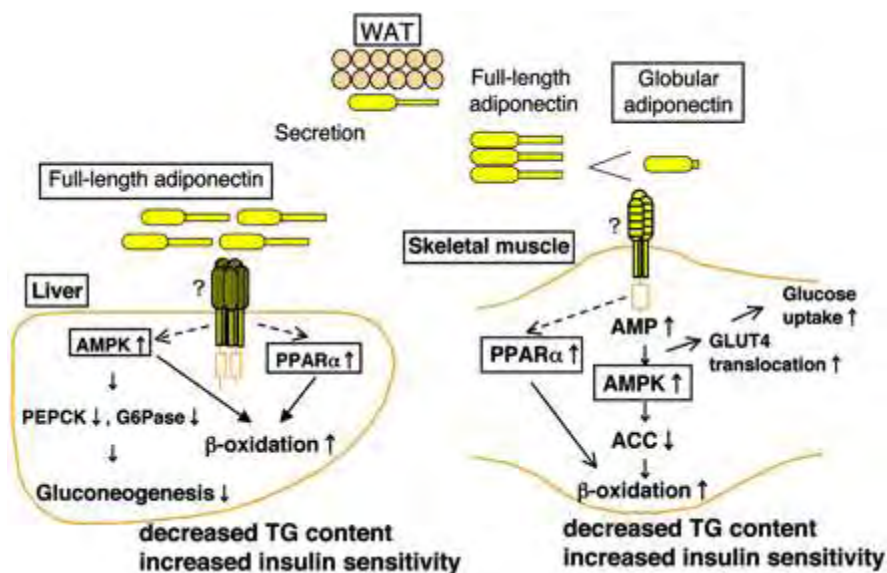
Η Tomas και συν. σε *in vitro* πειράματα που έγιναν στον εκτείνοντα μυ των δακτύλων αρουραίων και *in vivo* δοκιμές σε γαστροκνήμιους μύες ποντικών, ανέφεραν ότι η σφαιρική

μορφή λιπονεκτίνης προκαλούσε αρχικά παροδική ενεργοποίηση της AMPK, συνεχή φωσφορυλίωση της ACC και μείωση στη συγκέντρωση του μαλόνυλο-συνενζύμου-A. Σε αντίθεση με τη μελέτη των Yamauchi και συν. η χρήση εξαμερούς μορφής λιπονεκτίνης δεν προκαλούσε μεταβολή στην ενεργοποίηση της AMPK και στην φωσφορυλίωση της ACC. Οι ερευνητές απέδωσαν τα διαφορετικά αποτελέσματα των δύο μελετών σε διαφορές που αφορούσαν την έκφραση της πρωτεΐνης και τις μεθόδους προετοιμασίας [46].

Η p38 MAPK ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η φλεγμονή, η κυτταρική διαφοροποίηση, η κυτταρική αύξηση και ο κυτταρικός θάνατος. Η p38 MAPK ενεργοποιείται από διάφορους εξωκυτταρικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του μεταβολικού στρες [47].

Οι PPARs είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Ενεργοποιούνται από μόρια-σηματοδότες όπως είναι α) οι συνθετικοί σηματοδότες: υπολιπιδαιμικές φιμπράτες και οι αντιδιαβητικές γλιταζόνες (των PPAR-α και PPAR-γ αντίστοιχα) και β) οι φυσικοί σηματοδότες: τα λιπαρά οξέα και τα εικοσανοειδή. Οι PPARs ρυθμίζουν την ομοιόσταση της γλυκόζης και το μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών. Επιπλέον, επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και τη διαδικασία διαφοροποίησης και απόπτωσης των λιποκυττάρων [48]. Οι PPAR-α υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στο ήπαρ, τους μύες, τους νεφρούς και την καρδιά όπου ρυθμίζουν τη β-οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων, ενώ οι PPAR-γ υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στον εντερικό σωλήνα και το λιπώδη ιστό όπου προάγουν τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και την αποθήκευση των λιπιδίων [48].

Το 2006, ο Yoon και οι συνεργάτες του διατύπωσαν την άποψη ότι η οξείδωση των λιπαρών οξέων στα C₂C₁₂ μυοκύτταρα, είναι αποτέλεσμα της συνεχούς ενεργοποίησης των AMPK, p38 MAPK και PPARα, μετά από διαμεσολάβηση της λιπονεκτίνης [49]. Ο PPARα ρυθμίζει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και η p38 MAPK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον PPARα και τον PPARγ coactivator-1α [50]. Αντίθετα με την AMPK και p38 MAPK, ο PPARα προκαλεί μόνο οξείδωση λιπαρών οξέων και όχι πρόσληψη γλυκόζης μετά από ενεργοποίηση από τη λιπονεκτίνη [49] (Σχήμα 3).



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης της AMPK και του PPARα από τη λιπονεκτίνη στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες [16].

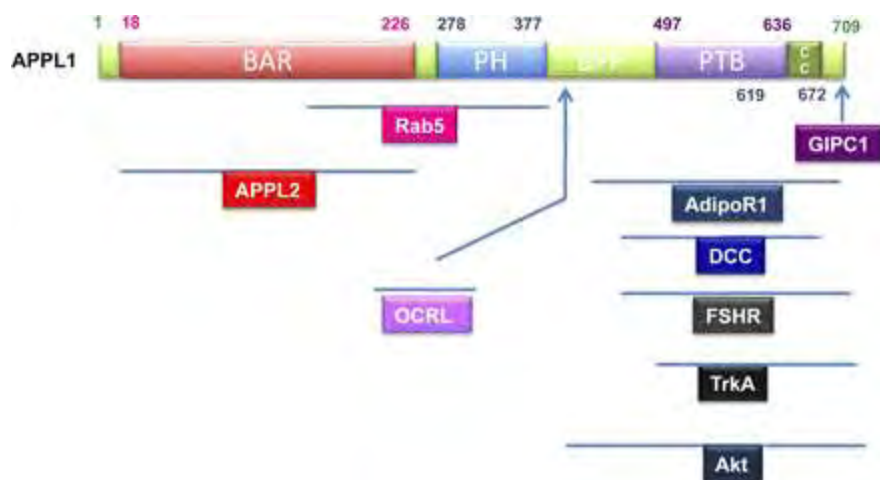
Συντομογραφίες: G6Pase, Glucose 6-phosphatase= γλυκοζο-6 φωσφατάση; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase= φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυ-κινάση; WAT, White Adipose Tissue= Λευκός λιπώδης ιστός; GLUT4 translocation= μετατόπιση των μεταφορέων της γλυκόζης GLUT4; Decreased TG content= μειωμένο περιεχόμενο τριγλυκεριδίων; Increased insulin sensitivity= αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη; Secretion= έκκριση.

1.4.2 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με άλλες πρωτεΐνες ή αυξητικούς παράγοντες

1.4.2.1 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με την πρωτεΐνη APPL1

Η πρωτεΐνη APPL1 (adaptor protein-containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif) είναι ο σύνδεσμος ανάμεσα στον καταρράκτη σηματοδότησης της λιπονεκτίνης και τα κύτταρα στόχους. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη APPL1 περιέχει 709 αμινοξέα, είναι πολύ υδρόφιλη και αποτελείται από τις περιοχές: BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), PH (Pleckstrin Homology domain), BPP (region between PH and PTB domains), PTB (PhosphoTyrosine-Binding domain), και CC (Coil-Coiled region) (Σχήμα 5). Η

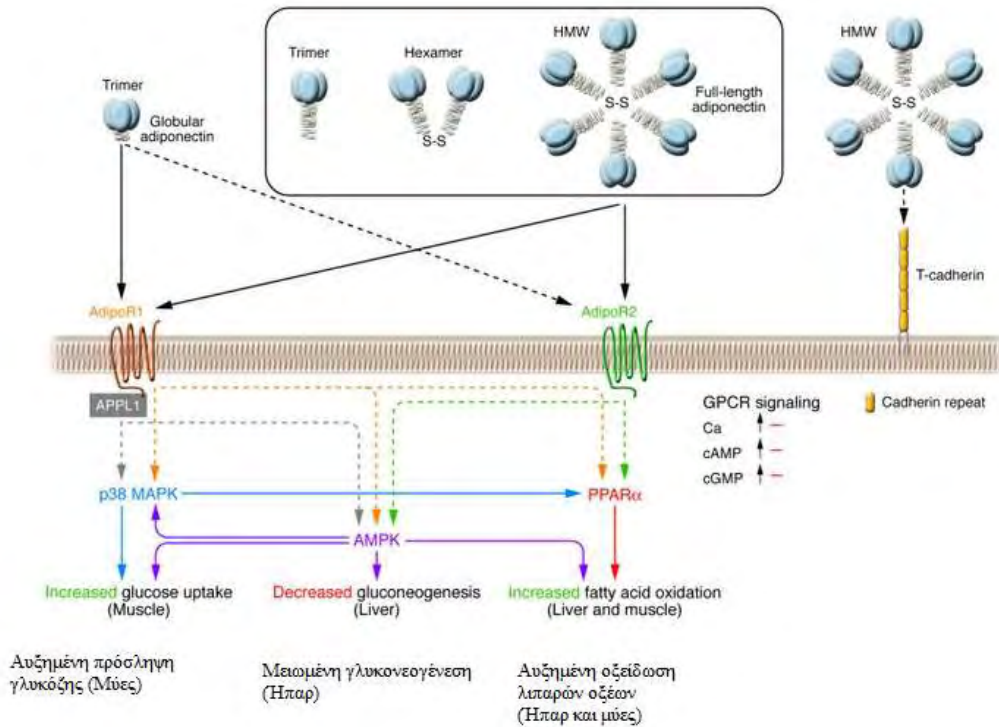
APPL1 μεταδίδει τα σήματα από τους υποδοχείς της ορμόνης στο εσωτερικό των κυττάρων στόχων, αλληλεπιδρώντας άμεσα με την NH₂-τελική ενδοκυτταρική περιοχή των AdipoR1 και AdipoR2 [42]. Στα C₂C₁₂ μυοκύτταρα, η APPL1 αλληλεπιδρά με τους Adipo-R1 μέσω της COOH-τελικής PTB περιοχής, μετά από ενεργοποίηση από τη λιπονεκτίνη [42]. Όμοια αλληλεπίδραση της APPL1 και των Adipo-R1 και -R2 προκαλεί η λιπονεκτίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα [51]. Στους σκελετικούς μύες εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό η APPL1 και ο AdipoR1 όπου η APPL1 ασκεί διαμεσολαβητικό ρόλο για τις δράσεις της λιπονεκτίνης. Επίσης, η APPL1 λειτουργεί σαν θετικός ρυθμιστής της σηματοδότησης της λιπονεκτίνης στα μυϊκά κύτταρα και η υπερέκφραση της αυξάνει αξιοσημείωτα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των AMPK και p38 MAPK (Σχήμα 6). Αντίθετα, η καταστολή της APPL1 στα C₂C₁₂ μυοκύτταρα εξασθενεί σημαντικά την ενεργοποιημένη από τη λιπονεκτίνη φωσφορυλίωση των AMPK, p38 MAPK, καρβοξυλάσης του ακέτυλο-συνενζύμου-A (ACC), και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, υποδηλώνοντας τον κρίσιμο ρόλο της APPL1 στη διαμεσολάβηση της δράσης της λιπονεκτίνης στο μεταβολισμό των λιπιδίων στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα [42].



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση του μορίου της ανθρώπινης APPL1 και των περιοχών της APPL1 που αλληλεπιδρούν με τα διάφορα είδη πρωτεϊνών [52].

Συνοτομογραφίες: Rab5= μικρή GTPάση που ρυθμίζει την τήξη μεταξύ ενδοκυτταρικών κυστιδίων και πρώιμων ενδοσωμάτων, και την ομοτυπική τήξη μεταξύ πρώιμων ενδοσωμάτων; APPL2= ισομορφή της APPL1; GIPC1= GAIP-interacting protein; OCRL, Lowe oculocerebrorenal syndrome protein= πρωτεΐνη του οφθαλμοεγκεφαλονεφρικού συνδρόμου του Lowe; ανοσοσφαιρίνη DCC, deleted in colorectal cancer= απαλείφεται στο καρκίνωμα του

παχέος εντέρου; TrkA, Tropomyosin receptor kinase A= κινάση A του υποδοχέα της τροπομυοσίνης; FSHR= FSH υποδοχέας.



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης της λιπονεκτίνης με τη διαμεσολάβηση της APPL1.

1.4.2.2 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με τους αυξητικούς παράγοντες PDGF-BB, b FGF και HB EGF

Η λιπονεκτίνη αλληλεπιδρά με τους αυξητικούς παράγοντες PDGF-BB (αυξητικό-παράγοντα προερχόμενο από τα αιμοπετάλια-BB, Platelet-Derived Growth Factor-BB), b-FGF (βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών, basic Fibroblast Growth Factor), HB EGF (τον ομοιάζοντα με τον συνδεόμενο με την ηπαρίνη επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like growth factor) και παρεμποδίζει τη μιτογόνο δράση που ασκούν οι παράγοντες αυτοί στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. Οι HMW και MMW μορφές της

λιπονεκτίνης αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα PDGF-BB. Η ΗΜW λιπονεκτίνη αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με το βασικό αυξητικό παράγοντα b FGF ενώ ο παράγοντας HB EGF αλληλεπιδρά και με τις τρεις ισομορφές της λιπονεκτίνης. Οι παράγοντες αυτοί δεν παρουσιάζουν ανταγωνισμό για την πρόσδεση τους στην λιπονεκτίνη πιθανότατα λόγω διαφορετικών περιοχών πρόσδεσης στο μόριο της λιπονεκτίνης [53].

Οι αυξητικοί παράγοντες PDGF-BB, b FGF και HB EGF είναι ισχυρά μιτογόνα, παράγονται τοπικά από τα περισσότερα κύτταρα στις αθηροσκληρωτικές βλάβες και θεωρούνται ως οι περισσότερο υπεύθυνοι παράγοντες για τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Η λιπονεκτίνη έχει την ικανότητα να αθροίζεται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο των τραυματισμένων αγγείων και να ασκεί προστατευτική δράση κατά της αθηροσκλήρωσης με την απομάκρυνση των αθηρογόνων αυξητικών παραγόντων [54]

Η λιπονεκτίνη αλληλεπιδρά με τους παράγοντες αυτούς και αποκλείει τη σύνδεση τους με τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς. Ως εκ τούτου προκαλείται μείωση στη σύνθεση του DNA και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα διάφορα ισομερή της λιπονεκτίνης ρυθμίζουν τις βιολογικές δράσεις αρκετών αυξητικών παραγόντων ελέγχοντας τη βιοδιαθεσιμότητα σε επίπεδο προγενέστερο της σύνδεσης τους με τους υποδοχείς [53].

Συγκεκριμένα, ο αυξητικός παράγοντας PDGF-BB εκκρίνεται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και αγγειακά αφρώδη κύτταρα και ασκεί σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Η υπερβολική μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ανθρώπινων αορτικών λείων μυϊκών κυττάρων οδηγούν στην πάχυνση των αγγειακών τοιχωμάτων και τελικά σε έμφραγμα των αρτηριών. Η λιπονεκτίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση του PDGF-BB στα ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα HASMCs (human aortic smooth muscle cells), αναστέλλοντας έτσι τη σηματοδότηση για μιτογόνο δράση μέσω του PDGF BB-υποδοχέα [55]

Επιπρόσθετα, οι αυξητικοί παράγοντες PDGF-BB, b FGF και HB EGF ρυθμίζουν σημαντικά την αγγειογένεση, την καρκινογένεση, τη μορφογένεση, τη χημειόσταση και τη φλεγμόνη. Η λιπονεκτίνη ρυθμίζει αυτές τις παθοφυσιολογικές διαδικασίες ελέγχοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των τριών αυτών παραγόντων [56-59].

1.4.2.3 Αλληλεπίδραση της λιπονεκτίνης με τον υποδοχέα GPVI (γλυκοπρωτεΐνη VI)

Σε μελέτη που έγινε σε αιμοπετάλια ανθρώπων και ποντικών, η σφαιρική λιπονεκτίνη συνδέεται με τον υποδοχέα GPVI (γλυκοπρωτεΐνη VI) και προκαλεί γρήγορη συσσώρευση και ενεργοποίηση αιμοπεταλίων μέσω φωσφορυλίωσης της Syk κινάσης της τυροσίνης (Spleen tyrosine kinase). Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η σφαιρική λιπονεκτίνη πιθανόν να προκαλεί ανεπιθύμητη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στα τραυματισμένα αγγεία [60].

1.4.2.4 Αλληλεπίδραση/αναστολή της έκφρασης των MSR-A

Η λιπονεκτίνη ασκεί ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, μειώνοντας τη συσσώρευση των λιπιδίων στα ανθρώπινα μονοκύτταρα-μακροφάγα μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης των MSR-A (Macrophage Scavenger Receptor, υποδοχέας-καθαριστής των μακροφάγων). Οι MSR υποδοχείς κλάσης A και B ασκούν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των λιπιδίων και τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων από τα μακροφάγα [61].

Στα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης, τα μονοκύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος προσκολλώνται στα τραυματισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και διεισδύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, με αποτέλεσμα την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Ακολούθως, τα μακροφάγα προσλαμβάνουν τροποποιημένες LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα συσσωρεύοντας ενδοκυτταρική χοληστερόλη. Η συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων (που φέρουν λιπίδια) και η συνέχιση της φλεγμονής (με την προσέλευση των μακροφάγων) αποτελούν κλειδιά-φιγούρες στις αρχόμενες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις [61]. Η λιπονεκτίνη φαίνεται να παρεμποδίζει την αγγειογένεση και να προάγει την ενδοθηλιακή απόπτωση, δράσεις οι οποίες πιθανότατα σχετίζονται με τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες της ορμόνης αφού η καταστολή της αγγειογένεσης εμποδίζει την ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας [62].

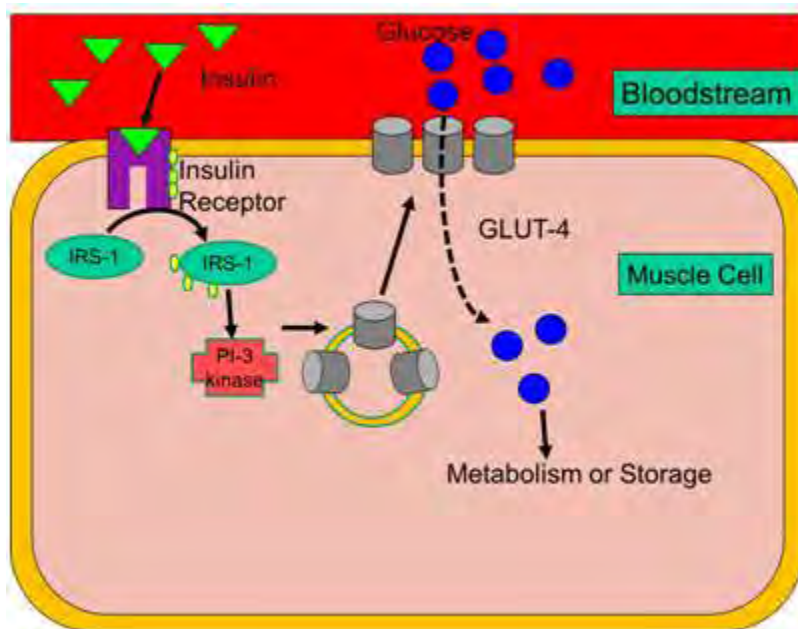
1.5. Βιολογικές δράσεις της λιπονεκτίνης

1.5.1 Επίδραση στο μεταβολισμό των υδατανθράκων

Η λιπονεκτίνη ενεργοποιεί την πρόσληψη της γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος στα μυϊκά κύτταρα, προκαλώντας μείωση των επιπέδων της γλυκόζης *in vivo* [41] (Σχήμα 4). Η ικανότητα της λιπονεκτίνης να μειώνει την γλυκόζη επιτυγχάνεται κυρίως με την αναστολή της

παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ [63] και με την αυξημένη πρόσληψη της γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες μετά από ενεργοποίηση της AMPK [41] και αύξηση της μετατόπισης του GLUT4 στην κυτταρική μεμβράνη [64] (Σχήμα 4). Η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της AMPK αναστέλλει τις ανωτέρω διαδικασίες [41].

Η γλυκόζη μεταφέρεται από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται γλυκομεταφορείς (GLUTs, Glucose Transporters). Οι γλυκομεταφορείς (GLUTs) αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζουν διαύλους στην κυτταρική μεμβράνη μέσα από τους οποίους εισέρχεται η γλυκόζη στα κύτταρα. Οι GLUTs διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζονται, τις κινητικές τους ιδιότητες και την ενδοκυτταρική τους θέση. Στα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα εκφράζονται οι τύπου 4 γλυκομεταφορείς. Η ινσουλίνη συνδεόμενη με τους υποδοχείς της, προκαλεί, μέσω σειράς αντιδράσεων, τη μετατόπιση ενδοκυτταρικών κυστιδίων που φέρουν τους GLUT-4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα κυστίδια συγχωνεύονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και απελευθερώνονται οι GLUT4 (Σχήμα 7). Η δυσλειτουργική πρόσληψη γλυκόζης στα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα συμβάλλει στην εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [65-68].



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού εισόδου της γλυκόζης στα μυοκύτταρα και λιπώδη κύτταρα υπό την επίδραση της ινσουλίνης.

Συντομογραφίες: PI-3 kinase, phosphatidylinositide 3-kinase= κινάση της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης; IRS-1, Insulin receptor substrate 1= Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης; Insulin= Ινσουλίνη; Glucose= Γλυκόζη; Bloodstream= κυκλοφορούν αίμα; Muscle cell= Μυϊκό κύτταρο; Metabolism or Storage= Μεταβολισμός ή Αποθήκευση.

Ο Ceddia και συν. παρατήρησαν ότι η σφαιρική λιπονεκτίνη αυξάνει τη μετατόπιση των GLUT-4 και την πρόσληψη γλυκόζης στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα αρουραίων, μειώνει το ρυθμό σύνθεσης γλυκογόνου και μετατοπίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης προς την κατεύθυνση παραγωγής γαλακτικού οξέος. Επίσης, η gAd ενισχύει τη φωσφορυλίωση της AMPK και της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-συνενζύμου-A (ACC) και την οξείδωση των λιπαρών οξέων στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα των αρουραίων [64]. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια, η σφαιρική λιπονεκτίνη μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος ενισχύοντας την πρόσληψη της γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες με ενεργοποίηση της AMPK [14].

Σε δοκιμές που έγιναν με τη χρήση L6 κυττάρων (μυϊκά κύτταρα αρουραίων) διαπιστώθηκε ότι, οι δύο μορφές fAd και gAd ενεργοποιούν τη μεμβρανική μετατόπιση των GLUT-4 μετά από αλληλεπίδραση με την APPL1. Η PTB περιοχή της APPL1 αλληλεπιδρά άμεσα με την ενδοκυτταρική περιοχή των υποδοχέων της λιπονεκτίνης και διαμεσολαβεί τη σηματοδότηση και τις δράσεις της λιπονεκτίνης στο μεταβολισμό (πρόσληψη γλυκόζης, οξείδωση λιπαρών οξέων). Η υπερέκφραση της APPL1 ενισχύει τη μεμβρανική μετατόπιση των GLUT-4, ενώ η καταστολή της APPL1 μειώνει σημαντικά τη μεμβρανική μετατόπιση των GLUT-4, και την πρόσληψη γλυκόζης την προκαλούμενη από τη λιπονεκτίνη στα L6 κύτταρα και τα C₂C₁₂ μυοκύτταρα. Η λιπονεκτίνη ενισχύει την αλληλεπίδραση μεταξύ APPL1 και Rab5 (μικρή GTPάση που ρυθμίζει την τήξη μεταξύ ενδοκυτταρικών κυστιδίων και πρώιμων ενδοσωμάτων, και την ομοτυπική τήξη μεταξύ πρώιμων ενδοσωμάτων) η οποία οδηγεί σε αυξημένη μεμβρανική μετατόπιση των GLUT4. Η ενεργοποίηση της p38 MAPK από τη λιπονεκτίνη, παρεμποδίζεται από την υπερέκφραση της κυρίαρχης Rab5 υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση της p38 MAPK από τη λιπονεκτίνη διενεργείται μερικώς μέσω της APPL1-Rab5 αλληλεπίδρασης [42]. Αντίθετα, η APPL2 ισομορφή της APPL1, λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης της λιπονεκτίνης [69].

Στο ήπαρ, η ενεργοποίηση της AMPK από τη λιπονεκτίνη, μειώνει τη γλυκονεογένεση μέσω της ελάττωσης της έκφρασης της φωσφοενολπυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης (phosphoenolpyruvate carboxykinase) και της γλυκοζο-6-φωσφατάσης [41]. Σε ήπαρ *db/db* ποντικών τα επίπεδα έκφρασης του mRNA (mRNA expression levels) των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 είναι μειωμένα, ενώ η υπερέκφραση τους βελτιώνει σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης και την αντίσταση στην ινσουλίνη [70]. Η υπερέκφραση των AdipoR1 ενεργοποιεί την AMPK, μειώνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Αντίθετα, η υπερέκφραση των AdipoR2 ενεργοποιεί το μονοπάτι του PPARα που ενισχύει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και εμποδίζει τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες [70].

Σε πειράματα που έγιναν σε AdipoR1 knockout ποντίκια, η έκφραση των ενζύμων γλυκονεογένεσης στο ήπαρ ήταν αυξημένη, με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη και αντίσταση στην ινσουλίνη. Τα AdipoR2 knockout ποντίκια είχαν κανονική ηπατική παραγωγή γλυκόζης και αυξημένα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης. Η απάλειψη των AdipoR2 υποδοχέων περιόρισε την δυσλιπιδαιμία την προκαλούμενη από διατροφή πλούσια σε λιπαρά και την αντίσταση στην ινσουλίνη, όμως επιδείνωσε την ομοιόσταση της γλυκόζης όταν συνεχίστηκε η πλούσια σε λιπαρά διατροφή των ποντικών, λόγω αδυναμίας των β παγκρεατικών κυττάρων να αντισταθμίσουν τη μέτρια αντίσταση στην ινσουλίνη. Μία ανωμαλία στο γονίδιο του AdipoR2 υποδοχέα ίσως να αποτελεί την αιτιολογία για την οποία συγκεκριμένες υπο-ομάδες ασθενών αναπτύσσουν τελικά έκδηλο διαβήτη ενώ άλλοι παχύσαρκοι ασθενείς όχι [70].

Η σηματοδότηση που προκαλούν οι AdipoR1 και AdipoR2 στο ήπαρ διαφέρει, χωρίς να είναι γνωστό αν η APPL1 διαμεσολαβεί για αυτές τις δράσεις της λιπονεκτίνης. Η υπερέκφραση της APPL1 στα ηπατικά κύτταρα ποντικού ενεργοποιεί την p38 MAPK και η χορήγηση λιπονεκτίνης ενισχύει αυτή τη δράση, υποδηλώνοντας ότι η APPL1 εμπλέκεται στη σηματοδότηση της λιπονεκτίνης και στο ήπαρ [42].

1.5.2 Επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων

Όπως προαναφέρθηκε, οι gAd και fAd μορφές της λιπονεκτίνης ενεργοποιούν την AMPK και τον υποδοχέα PPARα στους σκελετικούς μύες και προάγουν την οξείδωση των λιπαρών οξέων μειώνοντας την ενδομυϊκή συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων. Αντίστοιχες δράσεις ασκεί η fAd μορφή στο ήπαρ. Οι αλλαγές αυτές ενισχύουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη *in vivo* [71] (Σχήμα 4).

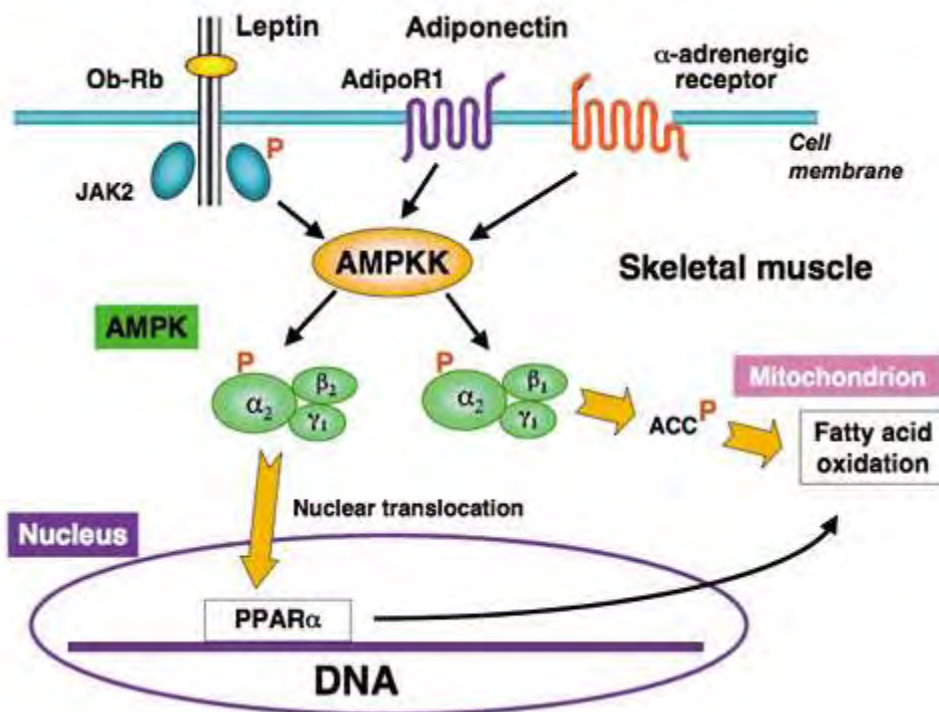
Η λιπονεκτίνη ενεργοποιεί την α2AMPK στους σκελετικούς μύες μέσω της AMPKK (κινάση της AMPK). Η ενεργοποιημένη α2AMPK που περιέχει τη β2 υπομονάδα, μετατοπίζεται ταχύτατα στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση του γονιδίου PPARα. Αντίθετα, η α2AMPK που περιέχει τη β1 υπομονάδα παραμένει στο κυτταρόπλασμα και φωσφορυλιώνει την καρβοξυλάση του ακέτυλο-συνενζύμου-A (ACC) ενεργοποιώντας την οξείδωση των λιπαρών οξέων [72] (Σχήμα 8).

Στους σκελετικούς μύες, η λιπονεκτίνη αυξάνει την έκφραση α) της παρεμβαλλόμενης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CD36 (Cluster of Differentiation 36) η οποία μεταφέρει τα λιπαρά οξέα στο εσωτερικό των κυττάρων, β) της οξειδάσης του ακέτυλο-συνενζύμου-A (acyl-coenzyme A oxidase) η οποία σχετίζεται με την καύση των λιπαρών οξέων και γ) της πρωτεΐνης αποσύζευξης-2 (UCP2, Uncoupling Protein 2) η οποία σχετίζεται με τη διαχείριση της ενέργειας [73]. Οι αλλαγές αυτές που προκαλεί η λιπονεκτίνη έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των τριγλυκεριδίων στους σκελετικούς μύες [73].

Οι UCPs πρωτεΐνες υποβοηθούν τη μεταφορά των ανιόντων από την εσωτερική προς την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την επιστροφή των πρωτονίων από την εξωτερική προς την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Επίσης, ελαττώνουν το μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό στα κύτταρα θηλαστικών. Οι UCPs εκφράζονται σε αρκετούς ιστούς και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη έκφραση στους σκελετικούς μύες. Η κυριότερη λειτουργία των UCP2 φαίνεται να είναι ο έλεγχος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια [74, 75].

Η αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στους ιστούς φαίνεται να παρεμβαίνει αρνητικά στην ενεργοποίηση της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) 3-κινάσης από την ινσουλίνη, στη επακόλουθη μετατόπιση των GLUT-4 και την πρόσληψη της γλυκόζης, οδηγώντας τελικά σε

αντίσταση στην ινσουλίνη [76]. Σε δοκιμές που έγιναν σε σκελετικούς μύες από λιποατροφικά ποντίκια, η χορήγηση λιπονεκτίνης ενίσχυσε την φωσφορυλίωση των υποδοχέων της ινσουλίνης και τη φωσφορυλίωση της Akt (πρωτεϊνική κινάση B, η οποία είναι πολύ σημαντική για το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και απαραίτητη για τη μεταφορά της γλυκόζης) [73].



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση του ρυθμιστικού ρόλου της AMPK στην οξείδωση των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες [72].

Συντομογραφίες: Leptin= λεπτίνη; Ob-Rb= υποδοχέας λεπτίνης; JAK2= Janus kinase 2; α-adrenergic receptor= α-αδρενεργικός υποδοχέας; Mitochondrion= μιτοχόνδριο; Nucleus= πυρήνας; Nuclear translocation= πυρηνική μετατόπιση.

1.5.3 Επίδραση στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών

Η λιπονεκτίνη ενισχύει τον καταρράκτη σηματοδότησης της ινσουλίνης στους ανθρώπινους σκελετικούς μύες, αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του υποστρώματος IRS-1 [77]. Η δράση αυτή ενεργοποιεί τον καταρράκτη σηματοδότησης της Akt (πρωτεϊνική κινάση B), η οποία φωσφορυλιώνει μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών FOXO (forkhead transcription factor family) [78, 79] με αποτέλεσμα την ελαττωμένη μεταγραφή των E3 λιγασών ουβικουιτίνης-ubiquitin (atrogin-1/MAFbx ή MuRF-1) [80-82]. Οι πρωτεΐνες FOXO αυξάνουν τη μεταγραφή των atrogin-1/MAFbx (muscle atrophy F-box) και MuRF-1 (muscle RING finger-1), οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη πρωτεϊνική αποικοδόμηση στους μύες [81].

Μετά από αξιολόγηση των πρωτεολυτικών διαδικασιών, οι ερευνητές συμπέραναν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη που σχετίζεται με την παχυσαρκία, συνδέεται με αυξημένη απώλεια πρωτεϊνών στους μύες λόγω κατιούσας ρύθμισης του μονοπατιού σηματοδότησης IRS-1/PI3K (φωσφατίδουλινοσιτόλης-3-κινάσης)/Akt [83], το οποίο ενεργοποιείται από την ινσουλίνη και ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση [84-86]. Στους σκελετικούς μύες, η αυξημένη σηματοδότηση των IRS-1/PI3K/Akt ενεργοποιεί την υπερτροφία των μυϊκών ινών (αύξηση της σύνθεσης πρωτεϊνών) και αντισταθμίζει την απώλεια μυϊκής μάζας (μείωση της αποικοδόμησης πρωτεϊνών) σε ζώα με καταβολικές δυσλειτουργίες. Ο μηχανισμός αυτός σχετίζεται με την φωσφορυλίωση της Akt [87-89]. Αντίθετα, η μείωση της φωσφορυλιωμένης Akt (p-Akt) προκαλεί ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία διασπά τη δομή του συμπλέγματος των μυϊκών ινών για να σχηματίσει υποστρώματα τα οποία αποικοδομούνται περαιτέρω από το σύστημα του πρωτεασώματος [87, 90, 91].

Η ελαττωμένη σηματοδότηση IRS-1/Akt λόγω μειωμένης φωσφορυλίωσης της Akt παρατηρήθηκε σε ποντίκια με διατροφή πλούσια σε λίπος και σε καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη απώλεια μυϊκών πρωτεϊνών και χαμηλά επίπεδα λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των ποντικών. Η μείωση της p-Akt είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των atrogin-1/MAFbx και MuRF-1 και την αυξημένη αποικοδόμηση πρωτεϊνών στα ποντίκια με πλούσια σε λίπος διατροφή, σε καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων [92] και σε παχύσαρκα db/db ποντίκια τα οποία παρουσίαζαν αντίσταση στην ινσουλίνη [83]. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η λιπονεκτίνη περιορίζει την

αυξημένη αποικοδόμηση πρωτεϊνών η οποία παρατηρείται μετά από χορήγηση ελεύθερων λιπαρών οξέων [92].

Η φλεγμονή που προκαλείται από τις κυτταροκίνες σχετίζεται με την απώλεια μυϊκών πρωτεϊνών [93]. Στις δοκιμές που διεξήγαγαν ο Zhou και συν. παρατήρησαν ότι τα ποντίκια με διατροφή υψηλή σε λίπος παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα λιπονεκτίνης και σημαντική αύξηση των επιπέδων οκτώ κυτταροκινών στο πλάσμα του αίματος: GMCSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), MCP (Monocyte Chemoattractant Protein), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IL-6 (Interleukin-6), IL-12, IL-13, TNF (Tumor Necrosis Factor) και INF (Interferon) [92] εκ των οποίων οι TNF, IL-6 και INF σχετίζονται με τον καταβολισμό των μυών [94-96]. Σε καλλιέργεια 3T3-L1 λιποκυττάρων παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων, η fAd ποντικίου προκάλεσε μείωση στην έκφραση TNF και IL-6 [92].

Όταν ο λιπώδης ιστός αυξάνεται, πολλά προϊόντα εκκρίνονται συμπεριλαμβανομένων των FFA, TNF, ILs, και παραγόντων του συμπληρώματος, τα οποία μειώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη [97]. Ο Zhou και συν. έδειξαν ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες οδηγούν σε αντίσταση στην ινσουλίνη και απώλεια μυϊκής μάζας. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύονται από συσσώρευση λίπους στις μυϊκές ίνες [92].

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι οι κυτταροκίνες TNF, IL-6 και INF επηρεάζουν τον καταβολισμό των μυϊκών πρωτεϊνών [94-96]. Ο TNF ενίσχυσε την έκφραση των E3 λιγασών ουβικουιτίνης atrogin-1/MAFbx στους σκελετικούς μύες [94], η μέτρια έγχυση IL-6 σε ζώα προκάλεσε σημαντική ατροφία μυών [95] και η χορήγηση ιντερφερόνης σε φυσιολογικά ζώα αύξησε την έκφραση του mRNA της ουβικουιτίνης [98] και συγκεκριμένων υπομονάδων του πρωτεοσώματος στους σκελετικούς μύες [99].

Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων προάγουν το φλεγμονώδες μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα TLR4 (Toll-Like Receptor 4) το οποίο συμβάλλει στην πρόκληση αντίστασης στην ινσουλίνη στην παχυσαρκία [100]. Η διέγερση του υποδοχέα TLR4 ενεργοποιεί προφλεγμονώδη μονοπάτια και επάγει την έκφραση κυτταροκινών σε διάφορους τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μυών [101]. Ο Shi και συν. έδειξαν ότι η αύξηση των λιπαρών οξέων στη διατροφή ενεργοποιεί τον TLR4 και επάγει φλεγμονώδη σηματοδότηση στα λιποκύτταρα και τα μακροφάγα [100]. Η ικανότητα των λιπαρών οξέων να

επάγουν φλεγμονώδη σηματοδότηση στα λιπώδη κύτταρα ή τον ιστό και τα μακροφάγα μειώνεται απουσία του TLR4. Υποστηρίζεται ότι πιθανόν η λιπονεκτίνη εμποδίζει την ενεργοποίηση του TLR4 που προκαλούν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και περιορισμό ή αναστροφή της απενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης IRS-1/Akt [92].

Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της AMPK καταστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών μέσω κατιούσας ρύθμισης της σηματοδότησης του mTOR (mammalian Target of Rapamycin, μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, την επιβίωση και τη σύνθεση και μεταγραφή πρωτεϊνών) [102]. Σύμφωνα με άλλες άλλη μελέτη η AMPK αυξάνεται μετά από άσκηση με αντιστάσεις και σχετίζεται με αυξημένη φωσφορυλίωση της p70S6K (πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, απαραίτητη για κυτταρική ανάπτυξη) [103]. Αντίθετα, σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση της AMPK από το AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) αυξάνει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών [104]. Ο Zhou και συν. δεν παρατήρησαν αλλαγή στη φωσφορυλίωση ή στα επίπεδα της AMPK στα ποντίκια με διατροφή πλούσια σε λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου και πρότειναν ότι η διατροφή υψηλή σε λιπαρά προκαλεί απώλεια μυϊκών πρωτεϊνών κατά εξαρτώμενο τρόπο από τη λιπονεκτίνη και ανεξάρτητο από την AMPK [92].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Ινσουλινοαντίσταση, φλεγμονή και λιποκίνες

2.1.1 Ορισμός ινσουλινοαντίστασης

Η ινσουλινοαντίσταση ορίζεται ως η κατάσταση στην οποία τα κύτταρα του σώματος παρουσιάζουν ελαττωμένη ευαισθησία στην δράση της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την πρόκληση υπεργλυκαιμίας. Τα β κύτταρα των νησιδίων langerhans του παγκρέατος αυξάνουν την παραγωγή ινσουλίνης προκειμένου να αντισταθμίσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την πρόκληση υπερινσουλιναϊμίας. [105]. Η ινσουλίνη συνδεόμενη με τους υποδοχείς της, προκαλεί, μέσω σειράς αντιδράσεων, μετατόπιση των μεταφορέων γλυκόζης-4 (GLUT-4) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω των οποίων αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης στους διάφορους ιστούς του σώματος (Σχήμα 7). Η δυσλειτουργική πρόσληψη γλυκόζης στα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα αποτελεί χαρακτηριστικό των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ-2) [106-109].

2.1.2 Παθοφυσιολογία των μηχανισμών που οδηγούν σε ινσουλινοαντίσταση

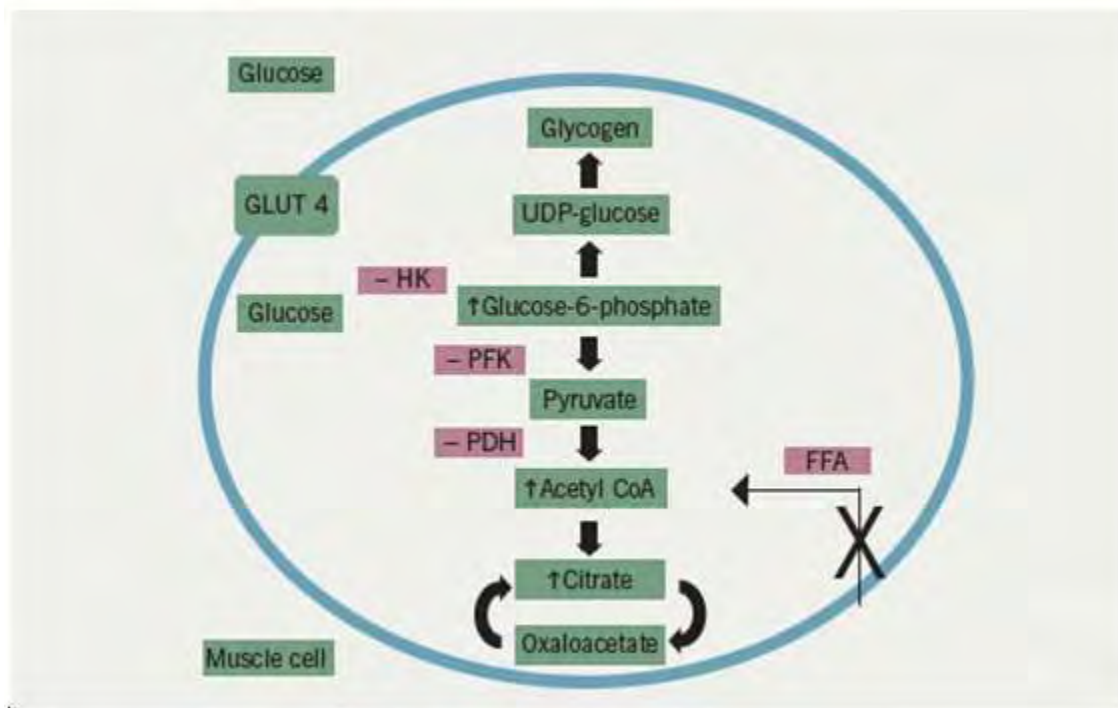
Η αντίσταση στην ινσουλίνη αντισταθμίζεται από την υπερινσουλιναϊμία, διατηρώντας φυσιολογική ανοχή γλυκόζης. Μειωμένη ανοχή γλυκόζης προκύπτει είτε από αύξηση της αντίστασης των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη, είτε από μείωση στην έκκριση της ινσουλίνης, ή συνήθως και από τους δύο αυτούς παράγοντες. Πολλές ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι η αρχική διαταραχή και ότι η δυσλειτουργία των β-κυττάρων είναι συνέπεια της παρατεταμένης αντιρροπιστικής αύξησης της έκκρισης ινσουλίνης [110]. Η αντίσταση στην ινσουλίνη συνήθως παρουσιάζεται αρκετά έτη πριν από τη διάγνωση του ΣΔ-2 σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού και είναι πολυπαραγοντική. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η υπολειτουργία των β-κυττάρων που εκδηλώνεται με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης αποτελεί τη βασική αιτία για την ανάπτυξη της υπεργλυκαιμίας [111].

Σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, όπως τα λιποκύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα, χρειάζεται η δράση της ινσουλίνης προκειμένου η γλυκόζη να μετακινηθεί από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου όπου θα χρησιμοποιηθεί ή θα αποθηκευθεί με τη μορφή τριγλυκεριδίων και γλυκογόνου αντίστοιχα. Η ινσουλινοαντίσταση στα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα, μειώνει την πρόσληψη της γλυκόζης. Αντίστοιχα, στο ήπαρ η αποθήκευση της γλυκόζης με τη μορφή του

γλυκογόνου είναι ελαττωμένη, με αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση και απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα [112].

2.1.2.1 Εκτοπική συσσώρευση λιπιδίων

Ο Randle και η ομάδα του (1963-1965), μετά από σειρά ερευνών, υποστήριξαν ότι η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση λιπαρών οξέων οδηγεί σε αύξηση των ενδομιτοχονδριακών αναλογιών ακέτυλοCoA/CoA, και NADH/NAD⁺, με επακόλουθη απενεργοποίηση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, μειωμένη οξείδωση της γλυκόζης και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος, η οποία οδηγεί σε παρεμπόδιση της δράσης της φωσφοφρουκτοκινάσης. Ως αποτέλεσμα, αυξάνονται οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της 6-φωσφορικής γλυκόζης και αναστέλλεται η δράση της εξοκινάσης 2, καταλήγοντας σε αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τους μύες [113-115] (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Ο κύκλος του Randle [113].

Συντομογραφίες: Glycogen= γλυκογόνο; UDP-glucose, uracil-diphosphate glucose= ουρακιλοδιφωσφορική γλυκόζη; HK= εξοκινάση; PFK= φωσφοφρουκτοκινάση; PHD= πυροσταφυλική αφυδρογονάση; Pyruvate= πυροσταφυλικό; Acetyl CoA= ακετυλοσυνένζυμο A; Citrate= κιτρικό; Oxaloacetate= οξαλοξεϊκό.

Ο ανωτέρω μηχανισμός αμφισβητήθηκε από πολλούς ερευνητές. Το 1999, οι Alan και Dresner, έδειξαν ότι οι διακυμάνσεις των επιπέδων των ελευθέρων λιπαρών οξέων του πλάσματος συνοδεύταν από ινσουλινοαντίσταση στους ανθρώπινους σκελετικούς μύες, μειώνοντας τη μεταφορά της γλυκόζης στα κύτταρα, ως αποτέλεσμα της αλλαγής της σηματοδότησης που προκαλεί η ινσουλίνη στη δράση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3 κινάσης (PI 3-kinase) του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης-1 (IRS-1) [116].

Σε αντίθεση με την υπόθεση του Randle, η οποία προβλέπει ότι η αυξημένη διάθεση ελευθέρων λιπαρών οξέων οδηγεί σε αυξημένη ενδομυϊκή συγκέντρωση 6-φωσφορικής γλυκόζης, οι νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι η έγχυση λίπους στους μύες υγιών ατόμων προκαλεί μείωση στη σύνθεση του γλυκογόνου, ακολουθούμενη από μείωση της ενδομυϊκής συγκέντρωσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης [117].

Ασθενείς με αρρυθμιστο ΣΔ2 οι οποίοι ακολούθησαν υποθερμιδική δίαιτα για 12 εβδομάδες, παρουσίασαν σημαντική μείωση του ηπατικού λίπους (85%), ομαλοποιημένη ηπατική ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώσεις στην υπεργλυκαιμία νηστείας και στην ηπατική παραγωγή γλυκόζης, χωρίς αλλαγές στη συγκέντρωση των ενδομυοκυτταρικών λιπιδίων και στη διάθεση γλυκόζης στο σώμα [118]. Αργότερα, ο Fabbrini και συν. έδειξαν ότι η ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται πρωταρχικά με το ενδοηπατικό περιεχόμενο λιπιδίων και όχι το σπλαχνικό λίπος [119]. Επίσης, η χειρουργική αφαίρεση σπλαχνικού λιπώδη ιστού δεν μετέβαλε την ομοιόσταση της γλυκόζης ή την ευαισθησία στην ινσουλίνη [120]. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι η εκτοπική συσσώρευση λιπιδίων εντός του ήπατος προκαλεί ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη.

Γενετικά μοντέλα τρωκτικών στα οποία μεταβάλλεται η έκφραση πρωτεϊνών μεταφοράς λιπιδίων παρέχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή της έκτοπης συσσώρευσης λιπιδίων στην παθογένεση της ινσουλινοαντίστασης. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LpL) αποτελεί το ένζυμο κλειδί το οποίο υδρολύει τα τριγλυκερίδια της κυκλοφορίας του αίματος, επιτρέποντας την πρόσληψη τους από τους ιστούς μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών μεταφοράς τους (FATPs, specific Fatty Acid Transport Proteins) και της μεμβρανικής πρωτεΐνης CD36 (Cluster of Differentiation 36). Η υπερέκφραση της LpL στους μύες προάγει την πρόσληψη λιπιδίων και την ινσουλινοαντίσταση στους μύες [121]. Αντίθετα, η απαλοιφή της LpL [122] ή άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταφορά των λιπιδίων όπως η CD36 [123, 124] ή η FATP1 [125] η οποία προστατεύει τα ποντίκια από τη συσσώρευση λιπιδίων στους μύες και την ινσουλινοαντίσταση μετά από διατροφή πλούσια σε λιπαρά. Όμοια, η ηπατική υπερέκφραση της LpL οδηγεί σε ηπατική στεάτωση και ηπατική ινσουλινοαντίσταση [121,126].

Το ήπαρ αποσύρει από την κυκλοφορία αλλά παράλληλα συνθέτει και εκκρίνει λιπίδια. Η σημασία της ισορροπίας μεταξύ ηπατικής πρόσληψης και έκκρισης λιπιδίων υποδηλώνεται σε ποντίκια στα οποία η υπερέκφραση της απολιποπρωτεΐνης CIII (ApoC3) παρεμποδίζει τη δράση της LpL και περιορίζει την περιφερική πρόσληψη των λιπιδίων με αποτέλεσμα την μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία. Σε ποντίκια με τροποποιημένο φαινότυπο, η υπερέκφραση ApoC3 συνοδεύεται από σημαντική υπερτριγλυκεριδαιμία, αλλά το περιεχόμενο των λιπιδίων στο ήπαρ παραμένει συγκρίσιμο με εκείνο των κανονικών ποντικών στα οποία

εφαρμόστηκε η ίδια διατροφή [127]. Ωστόσο τα ApoC3 ποντίκια παρουσίασαν ηπατική στεάτωση και συσσωρευση διακυλογλυκερόλης, ενεργοποίηση της PKCε και ηπατική ινσουλινοαντίσταση μετά από διατροφή πλούσια σε λίπος [127]. Επίσης, οι γενετικές ατέλειες όπως η έλλειψη της αφυδρογονάσης LCAD (Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) σε ποντίκια, προδιαθέτει για ηπατική στεάτωση και ηπατική ινσουλινοαντίσταση [128].

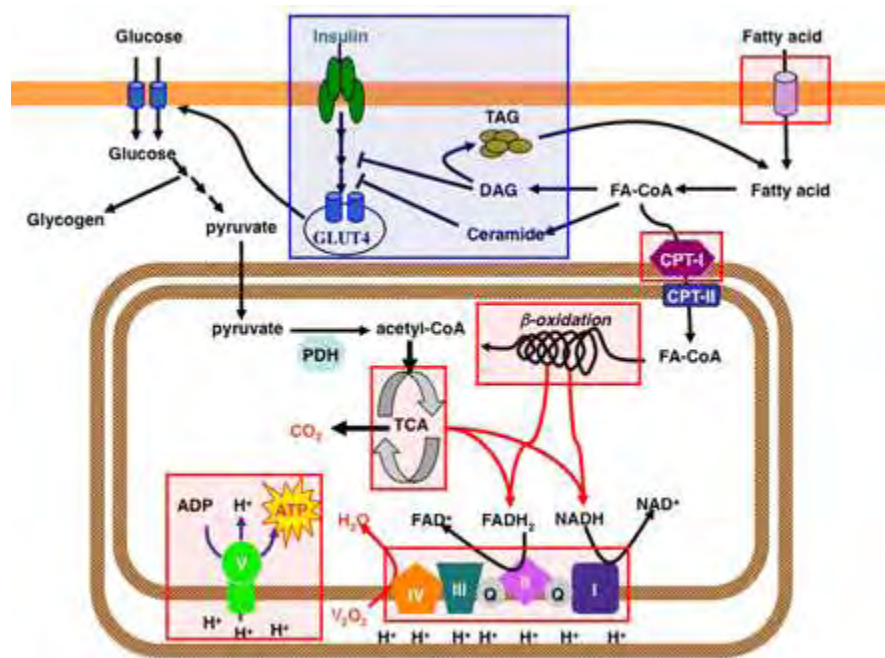
2.1.2.2 Λιπιδικοί διαμεσολαβητές της ινσουλινοαντίστασης

Στα λιπίδια, συμπεριλαμβάνονται ένας μεγάλος αριθμός μορίων ως διαμεσολαβητές σηματοδότησης με συγκεκριμένες λειτουργίες. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, εστεροποιούνται με το ακυλοσυνένζυμο Α σε λιπαρά acyl-CoAs. Στη συνέχεια σχηματίζουν με τη γλυκερόλη μόνο-, δι- και τρι-ακυλογλυκερόλες ή εστεροποιούνται με τη σφινγγοσίνη για να σχηματίσουν κεραμίδια (Σχήμα 10). Τα λιπίδια που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος όπως π.χ. οι ενδοτοξίνες (οι οποίες είναι συστατικά της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των gram-μικροβίων, που συντίθεται από υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, φωσφορικά, και συναφή μεταλλικά ιόντα. Είναι γνωστές ως λιποσακχαρίτες, και ποικίλλουν ανάλογα με τη συγκέντρωση των εξ υδατανθράκων και λιπών συστατικών τους) και οι προσταγλανδίνες ήταν τα πρώτα που αναγνωρίστηκαν ως λιπιδικοί σηματοδότες. Τα ενδοκυτταρικά λιπιδικά μόρια όπως οι διακυλογλυκερόλες, τα κεραμίδια και η τριφωσφορική φωσφατιδική ινσοσιτόλη (PIP3, Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, φωσφολιπίδιο το οποίο βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη) διαμεσολαβούν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Η τοπική παραγωγή των λιπιδικών μεταβολιτών εξηγεί σε κάποιο βαθμό την τοπική σηματοδότηση [129].

Οι συγκεντρώσεις της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα ανθρώπων και τρωκτικών έδειξαν ότι η ινσουλινοαντίσταση που προκαλείται από τα λιπίδια στους σκελετικούς μύες, οφείλεται σε ελαττωμένη σηματοδότηση της ινσουλίνης και κατ' επέκταση μειωμένη μεταφορά της γλυκόζης και όχι σε μειωμένη γλυκόλυση όπως έχει προταθεί από το Randle και συν [116, 117, 130, 131]. Παράλληλα, μοριακές μελέτες δείχνουν ότι η ινσουλινοαντίσταση οφείλεται σε ελαττωμένη μετατόπιση των GLUT4 μεταφορέων γλυκόζης λόγω ατελούς σηματοδότησης της ινσουλίνης [132,133]. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι το σύστημα μεταφοράς γλυκόζης, είναι το καθοριστικό πεδίο για την πρόκληση ινσουλινοαντίστασης από τα

λιπαρά οξέα, τα οποία προκαλούν μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης γλυκόζης (Σχήμα 10) [134]. Σε μοριακό επίπεδο, η έγχυση λιπαρών οξέων σε δείγματα μυϊκού ιστού, προκάλεσε μείωση στη φωσφορυλίωση της ινσουλινο-διεγερόμενης τυροσίνης του IRS-1 και μείωση στη δράση της IRS-1-σχετιζόμενης φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 κινάσης [116, 117, 135].

Μελέτες που διεξήχθησαν σε ενήλικα, φυσιολογικού βάρους, μη διαβητικά άτομα έδειξαν ότι η ενδομυοκυτταρική συγκέντρωση τριγλυκεριδίων αποτελεί ισχυρότερο δείκτη για εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης στους μύες, από ότι η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος [136]. Η εμπειρική αυτή παρατήρηση διερευνήθηκε πειραματικά σε αρουραίους και η ινσουλινοαντίσταση που προκλήθηκε ήταν ανεξάρτητη από τις αλλαγές στις συγκεντρώσεις των τριγλυκεριδίων στους μύες των τρωκτικών. Αντίθετα, η ινσουλινοαντίσταση που παρουσιάστηκε συνάδει με τη συσσώρευση ενδομυοκυτταρικής διακυλογλυκερόλης (DAG), την ελαττωμένη σηματοδότηση της ινσουλίνης και τη μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης (Σχήμα 10) [116, 137].



Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση της δράσης της ινσουλίνης και της διαχείρισης της ενέργειας στους σκελετικούς μύες. Η ισορροπία μεταξύ πρόσληψης και χρησιμοποίησης των λιπαρών οξέων καθορίζουν τη σπουδαιότητα της συσσώρευσης των λιπιδίων στα μυϊκά κύτταρα [138].

Συντομογραφίες: TCA= τρικαρβοξυλικό οξύ; complex I-IV= σύμπλοκα I-IV; electron transport chain complex V= σύμπλοκο V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων; ATP synthesis=σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης; Glucose= γλυκόζη; Pyruvate= πυροσταφυλικό οξύ; TAG= τριγλυκερίδια; DAG= διακυλ-γλυκερόλη; Ceramide= κεραμίδιο; FA-CoA, fatty-acyl- CoA= συνένζυμο A των λιπαρών οξέων; CPT-I= παλμιτυλο-τρανσφεράση της καρνιτίνης I; CPT-II= παλμιτυλο-τρανσφεράση της καρνιτίνης II; PDH= πυροσταφυλική αφυδρογονάση; Acetyl-CoA= ακετυλο-συνένζυμο A; β-oxidation= β-οξείδωση; TCA= τρικαρβοξυλικό οξύ; CO₂= διοξείδιο του άνθρακα; FAD= δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης; FADH₂= ανηγμένη μορφή δινουκλεοτιδίου αδενίνης φλαβίνης; NADH= ανηγμένη μορφή νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο; NAD= νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο; ADP= διφωσφορική αδενοσίνη; ATP= τριφωσφορική αδενοσίνη.

Σε αρουραίους, η χορήγηση ελεύθερων λιπαρών οξέων συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) [131] η οποία αποτελεί μία ανεξάρτητη από το ασβέστιο ισομορφή της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινάσων, και εκφράζεται συγκεκριμένα στους σκελετικούς μύες και στα T λεμφοκύτταρα [139, 140]. Χαρακτηριστικό της αντίστασης στην ινσουλίνη, η οποία προκαλείται από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, είναι ότι αυτά και οι μεταβολίτες τους (κεραμίδια, διακυλογλυκερόλη, λιπαρά ακυλοσυνένζυμα A) ενεργοποιούν την PKC, τις από τον NF- κ B ενεργοποιημένες κινάσες (NF- κ B -πυρηνικός παράγοντας B), την P38 μιτογόνο-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση, τις JNK/SAPK (Jun kinase/stress activated protein kinase) και άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση σερίνης/ θρεονίνης στους υποδοχείς ινσουλίνης ή στα υποστρώματα ινσουλίνης. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της σερίνης στα υποστρώματα της ινσουλίνης, ελαττώνει τη δράση της [131, 141-145] (Σχήμα 10).

Η σχέση μεταξύ DAG-ενεργοποίησης των nPKCs και ινσουλινοαντίστασης των μυών έχει διερευνηθεί σε μελέτες σε ανθρώπους [146]. Ο Samar Itani και συν. διεξήγαγαν σειρά μελετών σε βιοψίες σκελετικών μυών από υγιείς εθελοντές στους οποίους προκλήθηκε ινσουλινοαντίσταση μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ελευθέρων λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια δοκιμασίας ευγλυκαιμικής-υπερινσουλιναϊμικής δοκιμασίας (euglycemic-hyperinsulinemic clamp). Οι ερευνητές εξέτασαν την πιθανότητα να σχετίζεται η ινσουλινοαντίσταση, σε αυτά τα άτομα, με αλλαγές στο μονοπάτι σηματοδότησης της I κ B κινάσης (IKK)/I κ B (αναστολέας του NF κ B) [146], με δεδομένη την ενεργοποίηση του NF- κ B που προκαλεί η PKC [147, 148] και τη

συσχέτιση του NF-κB με την ελαττωμένη δράση της ινσουλίνης που προκαλείται από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στους μύες των τρωκτικών [149, 150]. Μετά από περίοδο περίπου 6 ωρών, από την έγχυση των λιπαρών οξέων, παρατηρήθηκε στους μύες 70% μείωση στη συγκέντρωση του IκB-α (αποικοδομείται μετά από φωσφορυλίωση του από την IκB κινάση). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ινσουλινοαντίσταση που παρατηρείται στους ανθρώπινους σκελετικούς μύες κατά τη διάρκεια της ευγλυκαιμικής-υπερινσουλιαιμικής δοκιμασίας, σχετίζεται με αυξημένες ποσότητες DAG και αυξημένη PKC δραστηριότητα, μετατόπιση των PKC-βII και -δ ισομορφών από το κυτοσόλιο στην κυτταρική μεμβράνη, και μειωμένη συγκέντρωση του IκB-α (αναστολέα του NFκB ο οποίος αποικοδομείται μετά από φωσφορυλίωση του από την IκB κινάση) [146]. Επιπρόσθετα, το εξωγενές παλμιτικό άλας φαίνεται να παρεμποδίζει την σύνθεση γλυκογόνου που προκαλεί η ινσουλίνη και την ενεργοποίηση της Akt στα C2C12 μυοκύτταρα με μηχανισμό εξαρτώμενο από την εξ αρχής (de novo) σύνθεση των κεραμιδίων [151]. Ο Itani και συν. δεν παρατήρησαν αλλαγή στη συγκέντρωση των κεραμιδίων στους σκελετικούς μύες των ανδρών μετά από την χορήγηση λιπιδίων και συμπέραναν ότι τα κεραμίδια δεν συμβάλλουν στην πρόκληση ινσουλινοαντίστασης [146]. Ωστόσο, η σύνθεση των κεραμιδίων δεν εκτιμήθηκε γι' αυτό δεν αποκλείεται να υπήρξε μικρή de novo σύνθεση [129].

Ο Itani και συν. υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση της PKC πιθανόν να προκαλεί ινσουλινοαντίσταση αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιώντας το IKK και/ή το NFκB μονοπάτι σηματοδότησης. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και η υπεργλυκαιμία αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιούν τον παράγοντα NFκB στο ενδοθήλιο και για τις ενέργειες αυτές διαμεσολαβεί η PKC [152-155]. Η ενεργοποίηση του NFκB επάγεται από τη φωσφορυλίωση του αναστολέα IκB και τη συνεπαγόμενη απελευθέρωση του από τον παράγοντα NFκB [156]. Η PKC φωσφορυλιώνει άμεσα τον αναστολέα IκB και προκαλεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου οι οποίες ενεργοποιούν την IκB-κινάση (IKK-β). Η φωσφορυλίωση από την IKK-β θεωρείται η κύρια οδός με την οποία ο IκB-α απελευθερώνεται από τον NFκB και υπόκειται σε πρωτεοσωματική αποδόμηση. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση της συγκέντρωσης του IκB-α και η μετακίνηση του NFκB από το κυτοσόλιο στον πυρήνα. Η σειρά των γεγονότων αυτών φαίνεται να συμβαίνει σε

αυτή τη μελέτη λόγω της αξιοσημείωτης μείωσης που παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση του IκB-α στα άτομα μετά από την έγχυση λιπιδίων [146].

Αυξημένα επίπεδα κεραμιδίων αναφέρθηκαν αρχικά σε μύες αρουραίων Zucker οι οποίοι παρουσίαζαν αντίσταση στην ινσουλίνη [157]. Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι το C2-κεραμίδιο παρεμποδίζει την ινσουλινοδιεγερόμενη μεταφορά γλυκόζης, τη σύνθεση γλυκογόνου και την ενεργοποίηση της Akt (PKB- πρωτεϊνικής κινάση Β) στα λιποκύτταρα [151]. Συγκεκριμένα, τα κεραμίδια ασκούν άμεση επίδραση στην ενεργοποίηση της Akt με διάφορους τρόπους: ενεργοποιούν την πρωτεϊνική φωσφατάση 2Α (PP2, protein phosphatase 2A, ένζυμο το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, τη μεταγωγή σήματος, την κυτταρική διαφοροποίηση και το μετασχηματισμό) σε φαιά λιποκύτταρα από μεσοπλάτιο φαιό λιπώδη ιστό εμβρύων αρουραίων Wistar [158]. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2Α αποφωσφορυλιώνει την Akt2 και εξασθενίζει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Επίσης, τα κεραμίδια ελαττώνουν τη δράση της ινσουλίνης μετά από ενεργοποίηση της PKCz σε L6 μυϊκά κύτταρα [159]. Η PKCz και η Akt2 αλληλεπιδρούν ενδοκυτταρικά. Η ενεργοποίηση της ινσουλίνης διακόπτει την αλληλεπίδραση των PKCz και Akt2. Τα κεραμίδια εξασθενίζουν τη διακοπή στη αλληλεπίδραση των PKCz και Akt2 που προκαλεί η ινσουλίνη και επιπρόσθετα μέσω PKCz φωσφορυλίωσης της Akt2, παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση της Akt2 [129].

Επίσης, τα κεραμίδια συσσωρεύονται στις μικροπεριοχές πλούσιες σε caveolin (διαμεμβρανική πρωτεΐνη) στα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίων (A7r5) [160]. Σε 3T3-L1 λιποκύτταρα και ινοβλάστες, τα κεραμίδια ενεργοποιούν την PKCz η οποία απομακρύνει την Akt2 και κατ' επέκταση την παρεμποδίζει από το να συμμετέχει στη σηματοδότηση της ινσουλίνης [161].

2.1.2.3 Υποδοχέας Toll-like Receptor-4 (TLR-4)

Οι TLRs είναι μη καταλυτικοί υποδοχείς, συνδεδεμένοι στη μεμβράνη των λιποκυττάρων, ανταποκρίνονται σε διάφορα μικροβιακά αντιγόνα και αποτελούν σημαντικό παράγοντα για τη φυσική ανοσία [162]. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται άμεσα από τα διατροφικά κορεσμένα λιπαρά οξέα, προάγοντας φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο και η αθηροσκλήρωση [163]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του TLR-4 φαίνεται να ενισχύει την

απελευθέρωση της IL-6 και της MCP-1 από το λιπώδη ιστό μέσω ενεργοποίησης του Erk οδού (extracellular-signal-regulated kinase). Ο υποδοχέας Toll-like Receptor (TLR)-4 αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην πρόκληση ινσουλινοαντίστασης από τα λιπαρά οξέα. Ο Lin και συν. παρατήρησαν ότι ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται στα 3T3-L1 λιποκύτταρα και ενεργοποιείται από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) [164]. Οι ερευνητές προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του TLR-4 στα λιποκύτταρα προάγει τη φλεγμονή και ενισχύει την ανάπτυξη του διαβήτη [165].

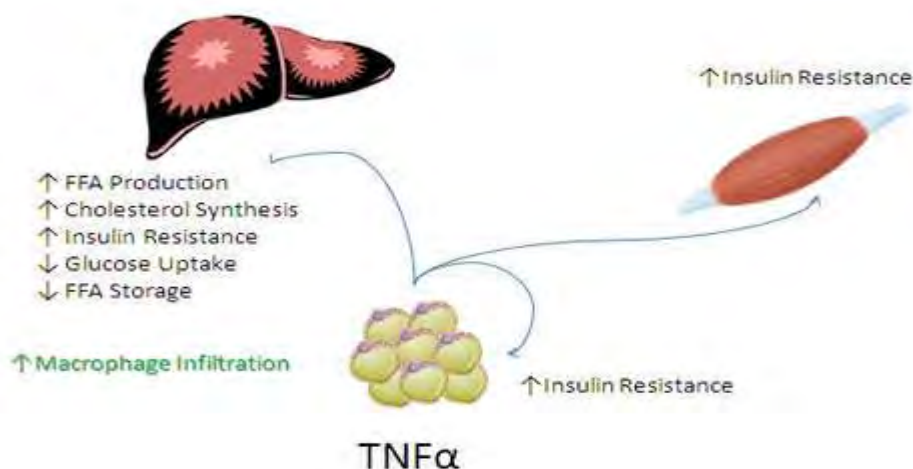
2.1.2.4 Ο ρόλος του TNF-α στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη

Ο TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκου-α) είναι μια πολυδύναμη κυτταροκίνη με διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες. Συντίθεται και εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος του λιπώδους ιστού. Ο TNF-α εκκρίνεται στη συστηματική κυκλοφορία κυρίως από τα μακροφάγα που συγκεντρώνονται στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων, ενώ τα λιποκύτταρα παράγουν κυρίως μια μη εκκρινόμενη μορφή του, η οποία συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη [166,167]. Ο TNF-α διεγείρει τη λιπόλυση, ενώ τα αυξημένα επίπεδα του σχετίζονται με αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερινσουλιναιμία και αρτηριακή υπέρταση [168]. Ο ρόλος του παράγοντα στην ενεργοποίηση του NF-κB των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων είναι σαφής και έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση μορίων προσκόλλησης στο αγγειακό ενδοθήλιο και κυτταροκινών, που προάγουν τη συσσώρευση φλεγμονωδών και αφρωδών κυττάρων. Η κύρια δράση του TNF-α στην πρόκληση αθηροσκλήρυνσης είναι έμμεση και αφορά στην εμπλοκή του στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και στην επακόλουθη υπεργλυκαιμία [169].

Σε πειραματικά μοντέλα, η εξουδετέρωση του TNF-α οδηγεί σε αξιοσημείωτη αύξηση της περιφερικής πρόσληψης της γλυκόζης υπό την επίδραση της ινσουλίνης. Η αρνητική επίδραση του TNF-α στην ιστική ευαισθησία στην ινσουλίνη, σχετίζεται με την παρεμπόδιση του σηματοδοτικού καταρράκτη της ινσουλίνης. Η εξουδετέρωση της δράσης του TNF-α, *in vivo*, οδηγεί σε αύξηση της αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα της ινσουλίνης και της φωσφορυλίωσης του υποστρώματος IRS-1 του ινσουλινοϋποδοχέα. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο TNF-α ασκεί δράση στη μεταγωγή του μηνύματος της ινσουλίνης δεν είναι πλήρως γνωστός. Έχει βρεθεί ότι ο TNF-α, *in vitro*, επάγει τη φωσφορυλίωση σερινών και όχι τυροσινών

του IRS-1. Επιπλέον, ο TNF-α μετατρέπει το IRS-1 σε αναστολέα της δράσης της τυροσινικής κινάσης που φυσιολογικά παρουσιάζει ο ινσουλινοϋποδοχέας, και με τον τρόπο αυτό ελαττώνει τη σηματοδότηση του μονοπατιού της ινσουλίνης. Η παραγωγή της τροποποιημένης μορφής του IRS-1 διαμεσολαβείται κυρίως από τη σύνδεση του TNF-α στους p55 υποδοχείς του και την ενεργοποίηση της μεμβρανικής πρωτεΐνης σφιγγομυελινάσης. Εκτός από την παρεμπόδιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης, έχει βρεθεί ότι ο TNF-α ελαττώνει την έκφραση του ινσουλινοεξαρτώμενου μεταφορέα γλυκόζης GLUT-4 σε καλλιέργειες λιποκυττάρων. Βέβαια, η συμμετοχή της συγκεκριμένης δράσης στην εκδήλωση, *in vivo*, της ινσουλινοαντίστασης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Είναι επίσης πιθανό, ο TNF-α να επάγει την ινσουλινοαντίσταση με έμμεσο τρόπο, ενεργοποιώντας τη λιπόλυση και οδηγώντας σε αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Ο TNF-α επάγει την ινσουλινοαντίσταση τόσο σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα, όσο και σε ηπατικά, πιθανώς μέσω διαφορετικών παθογενετικών μηχανισμών [170, 171] (Σχήμα 11).

Ο TNF-α επηρεάζει την έκφραση και άλλων λιποκινών. Συγκεκριμένα, αυξάνει την έκφραση λεπτίνης και IL-6 (ιντερλευκίνη-6), ενώ ελαττώνει την έκφραση και έκκριση της λιπονεκτίνης. Η αυξημένη έκφρασή του στην παχυσαρκία, σε συνδυασμό με την επακόλουθη ελαττωμένη έκφραση της λιπονεκτίνης, θεωρείται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου [172].



Σχήμα 11 . Επιδράσεις του TNF α στους γραμμωτούς μύες και τα ηπατικά κύτταρα. Ο TNF α προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη στους γραμμωτούς μύες, αυξάνει τη διήθηση των

μακροφάγων και προάγει την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων, τη σύνθεση χοληστερόλης, την αντίσταση στην ινσουλίνη και ελαττώνει την πρόσληψη γλυκόζης και την αποθήκευση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ [173].

2.1.2.5 Retinol-binding protein-4

Μία νέα λιποκίνη η RBP-4 (retinol-binding protein-4, συνδετική πρωτεΐνη της ρετινόλης) σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Συγκεκριμένα, η RBP-4 είναι αυξημένη στο λιπώδη ιστό πειραματοζώων όπου έχει απαλειφθεί ο GLUT-4. Τα επίπεδα της είναι αυξημένα στην κυκλοφορία πειραματοζώων ανθρώπων με παχυσαρκία ή διαβήτη τύπου 2. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης και του βαθμού της ινσουλινοαντίστασης σε άτομα με παχυσαρκία, ελαττωμένη ανοχή στη γλυκόζη ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, αλλά και σε μη παχύσαρκα, μη διαβητικά άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό διαβήτη τύπου 2 [174]. Η υπερέκφραση της RBP-4 προκαλεί ινσουλινοαντίσταση, ενώ η απαλοιφή του γονιδίου της βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα επίπεδα γλυκόζης σε παχύσαρκα πειραματοζώα με διατροφή πλούσια σε λιπαρά [175]. Καθώς τα επίπεδα της RBP-4 αυξάνουν πριν την έναρξη του διαβήτη, η πρωτεΐνη δύναται να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης στην πρόιμη διάγνωση της ινσουλινοαντίστασης, επιτρέποντας έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση [174].

2.2 Καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ινσουλινοαντίσταση

2.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (παλαιότερα αποκαλούμενος μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης) είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, λόγω ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος, που συνδυάζεται με αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης [176].

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια από τις κυριότερες απειλές του 21^{ου} αιώνα και σε συνδυασμό με την αύξηση της παχυσαρκίας λαμβάνει διαστάσεις επιδημίας. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτίμησε κατά το έτος 2003, ότι 194 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 20-79

ετών, είχαν διαγνωσμένο σακχαρώδη διαβήτη, ένας παγκόσμιος επιπολασμός της τάξεως του 5,1%. Μέχρι το τέλος του 2025 αναμένεται ο αριθμός των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη να ξεπεράσει τα 330 εκατομμύρια, ένας παγκόσμιος επιπολασμός της τάξεως του 6,3% [177, 178].

Στη διάρκεια του πρώτου σταδίου της πάθησης, η αντίσταση στην ινσουλίνη αντισταθμίζεται από την αυξημένη παραγωγή ινσουλίνης (υπερινσουλιναιμία), η οποία διατηρεί τη γλυκόζη αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Ακολουθεί διαταραχή της ομοιοστασίας της γλυκόζης είτε από αύξηση της αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης, είτε από μείωση στην έκκριση της ινσουλίνης, ή, συνήθως, από συνδυασμό και των δύο. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης προκαλούν οξειδωτικό στρες μέσω της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια [179]. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, με ή χωρίς Σ.Δ.2, έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν μεταβολικό σύνδρομο, το οποίο αποτελεί αιτία για στεφανιαία νόσο, υπέρταση και δυσλιπιδαιμία [180-182].

2.2.2 Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία είναι η κλινική κατάσταση στην οποία η υπερβολική αποθήκευση λίπους μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για την υγεία του ατόμου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) η παχυσαρκία ορίζεται ως η περίσσεια βάρους για ένα δεδομένο ύψος. Με βάση την τιμή , του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ, βάρος σε χιλιόγραμμα / ύψος σε μέτρα²) τα ενήλικα άτομα ταξινομούνται όπως ακολουθεί. Φυσιολογικά (ΔΜΣ 18,50- 24,99) υπέρβαροι (ΔΜΣ 25,00- 29,99) και παχύσαρκα (ΔΜΣ \geq 30) [183].

Στην παχυσαρκία, οι περισσότερες αποθήκες λίπους αποκτούν αισθητά μεγαλύτερο μέγεθος. Στον άνθρωπο αυτό εκδηλώνεται ως τάση αύξησης του λόγου της μικρότερης περιμέτρου της μέσης προς τη μεγαλύτερη περίμετρο των ισχίων (waist-to-hip ratio) και ερμηνεύεται ως αύξηση του μεγέθους του ήπατος και του σπλαχνικού λιπώδη ιστού.

2.2.2.1 Επιπολασμός της παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία έχει αυξηθεί περισσότερο από το διπλάσιο, από το 1980 μέχρι σήμερα, σε παγκόσμιο επίπεδο. Το έτος 2008, 1,4 δισεκατομμύριο ενήλικες ηλικίας 20 ετών και άνω, ήταν υπέρβαροι. Περισσότερο από 200 εκατομμύρια άνδρες και σχεδόν 300 εκατομμύρια γυναίκες ήταν παχύσαρκοι. Το 65% του ανθρώπινου πληθυσμού ζει σε χώρες όπου το αυξημένο βάρος

σώματος και η παχυσαρκία ευθύνονται για την πρόκληση θανάτου περισσότερο από ότι ο υποσιτισμός. Το έτος 2012 περισσότερο από 40 εκατομμύρια παιδιά ηλικίας μικρότερης των 5 ετών είχαν καταγραφεί ως παχύσαρκα. Η παχυσαρκία κατέχει την πέμπτη θέση ως αιτία θανάτου, παγκόσμια. Τουλάχιστον 2,8 εκατομμύρια υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα πεθαίνουν κάθε χρόνο [184].

2.2.2.2 Ιστολογικές αλλαγές και λειτουργικές μεταβολές στη νεύρωση του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία

Η παχυσαρκία συσχετίζεται με αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων και του μεγέθους αυτών, διήθηση των αποθηκών λίπους από μονοπύρηννα κύτταρα και σχετική αραιώση τόσο των αιμοφόρων αγγείων, όσο και των νευρικών δομών στο λιπώδη ιστό.

Στο λιπώδη ιστό των παχύσαρκων ατόμων, η πυκνότητα του νευρικού δικτύου ανά μονάδα μάζας ιστού είναι ελαττωμένη και φαίνεται πως συγκεκριμένες βλάβες των νευρικών δομών μπορούν να οδηγήσουν σε ατροφία των αποθηκών λίπους. Στο φαιό λιπώδη ιστό οι προσαγωγές νευρικές ίνες διεγείρουν τη θερμογένεση και τη λιπόλυση. Στο λευκό λιπώδη ιστό, τα συμπαθητικά νεύρα ρυθμίζουν την αιματική ροή και την έκκριση ουσιών, από τον ιστό, κατά ώσεις. Η νοραδρεναλίνη που εκκρίνεται μετά τη φάση απορρόφησης της τροφής είναι ελαττωμένη στην παχυσαρκία, γεγονός που υποδηλώνει μια ελαττωματική μεταγευματική απάντηση. Μεταβολές συμβαίνουν, επίσης, και στη λειτουργία των αδρενεργικών υποδοχέων του λιπώδους ιστού. Η έκφραση και η λειτουργία των β3-αδρενεργικών υποδοχέων είναι αυξημένη στην παχυσαρκία. Αντίθετα, η έκφραση και η λειτουργία των β2-αδρενεργικών υποδοχέων είναι ελαττωμένη. Οι υποδοχείς αυτοί διεγείρονται τόσο από την τοπική απελευθέρωση νοραδρεναλίνης, όσο και από τις κυκλοφορούσες κατεχολαμίνες [185, 186].

Αντίστοιχα, ελάττωση παρατηρείται και στην πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων, στο λιπώδη ιστό καθώς και στη διαπερατότητα των τριχοειδών για ουσίες που διαχέονται παθητικά. Επιπρόσθετα, η αύξηση στην αιματική ροή του λιπώδους ιστού ως απάντηση στη λήψη γεύματος που παρατηρείται φυσιολογικά σε λεπτά άτομα δεν παρατηρείται στους παχύσαρκους και πιθανόν αυτό να σχετίζεται και με την ελαττωμένη τοπική απελευθέρωση αδρεναλίνης [187, 188].

2.2.2.3 Παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας

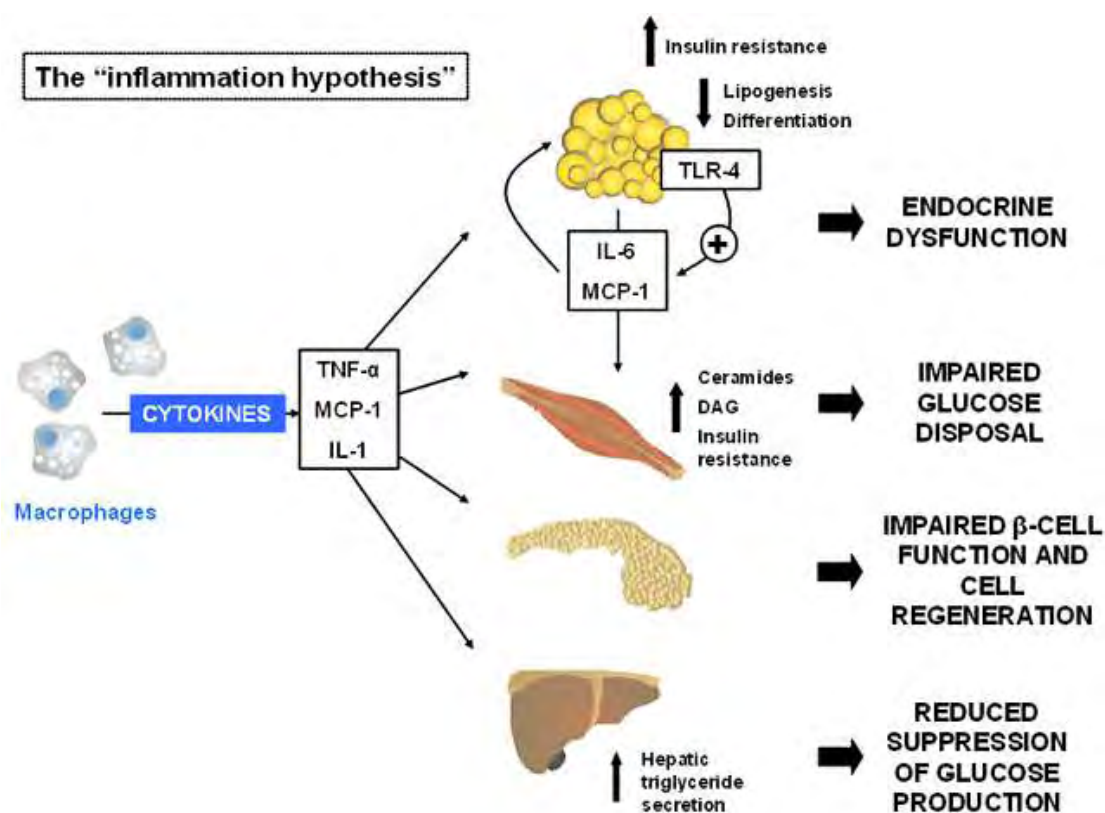
Το αποθηκευμένο λίπος είναι απαραίτητο για την επιβίωση του οργανισμού σε περιόδους ελαττωμένης πρόσληψης τροφής. Η αυξημένη όμως αποθήκευση λίπους οδηγεί σε παχυσαρκία [189]. Η αποθήκευση, στα λιποκύτταρα, λιπαρών οξέων υπό μορφή τριακυλογλυκερόλης προστατεύει από την τοξικότητα των τελευταίων τα οποία διαφορετικά θα κυκλοφορούσαν ελεύθερα στο αίμα και θα προκαλούσαν οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, αυτό τελικά δεν αποφεύγεται αφού η υπερβολική αποθήκευση λίπους τελικά οδηγεί σε απελευθέρωση λιπαρών οξέων λόγω αυξημένης λιπόλυσης, η οποία προκαλείται από την αλλαγή της δραστηριότητας του συμπαθητικού στην παχυσαρκία. Τα λιπίδια και οι μεταβολίτες τους προκαλούν οξειδωτικό στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια τόσο των κυττάρων του λιπώδους ιστού όσο και άλλων ιστών, ευθυνόμενα για ένα μέρος των επιπτώσεων της παχυσαρκίας [190, 191].

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από τον λιπώδη ιστό στα παχύσαρκα άτομα, εμποδίζουν τη λιπογένεση και την επαρκή κάθαρση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του αίματος, οδηγώντας μέσω της λιποτοξικότητας σε δυσλειτουργία των υποδοχέων της ινσουλίνης και συνεπώς ινσουλινοαντίσταση. Η αντίσταση στην ινσουλίνη προκαλεί υπεργλυκαιμία με αντισταθμιστική ηπατική γλυκονεογένεση και παροχή γλυκόζης στην κυκλοφορία. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επιτείνουν την ινσουλινοαντίσταση και μειώνουν την πρόσληψη της γλυκόζης από τα μυϊκά κύτταρα επιδεινώνοντας την υπεργλυκαιμία [192, 193]. Η λιποτοξικότητα μειώνει επίσης την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, η οποία οδηγεί σε εξάντληση [194].

Τα λιποκύτταρα αποτελούν περισσότερο από ένα δισεκατομμύριο κύτταρα στον οργανισμό και έχουν την ιδιότητα να αποθηκεύουν τριγλυκερίδια. Αποτελούν το μεγαλύτερο ενδοκρινή ιστό ο οποίος επικοινωνεί με τους άλλους ιστούς και όργανα, όπως είναι οι σκελετικοί μύες, ο φλοιός των επινεφριδίων, ο εγκέφαλος και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, με σκοπό τη ρύθμιση πληθώρας βιολογικών λειτουργιών του σώματος, συνθέτοντας και εκκρίνοντας μόρια που φέρονται με τον γενικό όρο λιποκίνες (πρωτεϊνικής φύσης μόρια που συντίθενται και εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα) [195].

Στις λιποκίνες περιλαμβάνονται κυτταροκίνες (όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF)- α , η ιντερλευκίνη (IL)-1 και η IL-6), χημειοκίνες (όπως η μονοκυτταρική χημειοελκτική πρωτεΐνη

1, MCP-1), πρωτεΐνες της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (όπως η αδιψίνη) και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αγγειακή αιμόσταση (όπως ο αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου-1, PAI-1), τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (όπως το αγγειοτενσινογόνο), την ομοιόσταση της γλυκόζης (όπως η RBP-4 και η λιπονεκτίνη), τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (όπως η λεπτίνη), την αγγειογένεση (όπως ο αγγειακός επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF) και νεότερα μόρια (όπως η βισφατίνη και η απελίνη) [196-198] Οι φλεγμονώδεις λιποκίνες: (TNF)-α, (IL)-1 και IL-6 προκαλούν τοπική στεατονέκρωση και διανέμονται με το αγγειακό σύστημα σε διάφορα μέρη του σώματος προκαλώντας φλεγμονή [199] (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. 'Η υπόθεση της φλεγμονής'. Σχηματική απεικόνιση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που συνδέουν την παχυσαρκία με τη χρόνια φλεγμονή και την ινσουλινοαντίσταση [200].

Συντομογραφίες: DAG= διακυλογλυκερόλες; TRL-4= Toll like receptor 4; Endocrine dysfunction= ενδοκρινική δυσλειτουργία; Impaired glucose disposal= μειωμένη διάθεση γλυκόζης; Impaired β-cell function and cell regeneration= μειωμένη λειτουργία των β-κυττάρων

και κυτταρική αναγέννηση; Reduced suppression of glucose production= μειωμένη καταστολή της παραγωγής γλυκόζης.

2.3.1 Λιπονεκτίνη και ινσουλινοαντίσταση

Σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ινσουλινοαντίσταση όπως η παχυσαρκία και ο ΣΔ-2, τα επίπεδα της λιπονεκτίνης είναι μειωμένα [73]. Επίσης, η διεγερτική δράση της gAd στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, παρουσιάζεται μειωμένη στα παχύσαρκα άτομα [201, 202]. Σε γενετικά παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια, η λιπονεκτίνη δεν έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί την AMPK στους σκελετικούς μύες [33].

Η ινσουλίνη έδειξε να ασκεί αρνητική ρύθμιση στην έκφραση των AdipoR1/R2 υποδοχέων (μείωση των επιπέδων του AdipoR1/R2 mRNA in vivo και in vitro) στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες των τροφτικών. Η παχυσαρκία-ινσουλινοαντίσταση και η υπερινσουλιναμία προκαλούν καταστολή της έκφρασης των υποδοχέων της λιπονεκτίνης και αντίσταση στη λιπονεκτίνη, μέσω της οδού σηματοδότησης PI3 κινάσης/Foxo1. Η ελαττωμένη έκφραση των AdipoR1/R2 σε *ob/ob* ποντίκια (μεταλλαγμένα ποντίκια με παχυσαρκία και διαβήτη τύπου2) σχετιζόταν άμεσα με ελαττωμένη ευαισθησία στη λιπονεκτίνη, η οποία δεν προκαλούσε ενεργοποίηση της AMPK στους σκελετικούς μύες των *ob/ob* ποντικίων. Η καταστροφή των β-κυττάρων με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης σε φυσιολογικά ποντίκια, συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων της ινσουλίνης στο πλάσμα, και σημαντική αύξηση των επιπέδων του AdipoR1/R2 mRNA in vivo. Η χορήγηση ινσουλίνης επανέφερε την έκφραση του AdipoR1/R2 mRNA σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα πειραματοζώων στα οποία δεν χορηγήθηκε STZ. Η μείωση στα επίπεδα του AdipoR1/R2 mRNA είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνδεση της λιπονεκτίνης στην κυτταρική μεμβράνη, την ελαττωμένη δράση της λιπονεκτίνης και τελικά την αντίσταση στη λιπονεκτίνη [33].

Σε καλλιέργειες ανθρώπινων σκελετικών μυοκυττάρων παρατηρήθηκε ότι η gAd ενεργοποιούσε την AMPK και την οξείδωση λιπαρών οξέων σε σημαντικά μικρότερο βαθμό όταν τα μυοκύτταρα προέρχονταν από παχύσαρκα άτομα με ΣΔ-2, σε σύγκριση με μυοκύτταρα από αδύνατα άτομα. Η αντίσταση στη λιπονεκτίνη, δεν αποδόθηκε σε μειωμένη έκφραση των

υποδοχέων AdipoR1/R2 ή σε μεταβολή της σηματοδότησης της AMPK, επειδή η φαρμακολογική ενεργοποίηση της AMPK ήταν εφικτή στα παχύσαρκα, διαβητικά τύπου 2 άτομα [202].

Ο Mullen και συν, παρατήρησαν ότι η αντίσταση στη λιπονεκτίνη εγκαθίσταται γρήγορα και προηγείται της συσσώρευσης των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες και της αντίστασης της στην ινσουλίνη, σε αρουραίους με διατροφή πλούσια σε λίπος (HF). Η διεγερτική δράση της λιπονεκτίνης στην οξείδωση των λιπαρών οξέων ελαττώθηκε πριν παρατηρηθεί αύξηση στη συγκέντρωση των μεταφορέων των λιπαρών οξέων (fatty acid translocase (FAT)/CD36, πρωτεΐνη FABPm, plasma membrane-bound fatty acid-binding protein) στην κυτταρική μεμβράνη και ενδομυϊκή συσσώρευση διακυλογλυκερόλης και κεραμιδίων, με επακόλουθη εξασθένιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και ελάττωση της μεταφοράς γλυκόζης στους σκελετικούς μύες. Η ταχύτατη πρόκληση αντίστασης στη λιπονεκτίνη, φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξης ινσουλινοαντίστασης. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η απώλεια της ικανότητας της λιπονεκτίνης να ενεργοποιεί την οξείδωση των λιπαρών οξέων σε ζώα με διατροφή πλούσια σε λίπος, πιθανόν να οφείλεται σε αδυναμία της λιπονεκτίνης να διεγείρει τη φωσφορυλίωση της ACC, και όχι σε αλλαγές στη φωσφορυλίωση της AMPK, γιατί στους υποκνημίδιους μύες όλων των ομάδων των τρωκτικών δεν παρατηρήθηκε επίδραση της gAd στην pAMPK (φωσφορυλιωμένη AMPK) μετά από 30 λεπτά έκθεσης, αλλά σημειώθηκε αυξημένη ενεργοποίηση της pACC (φωσφορυλιωμένη ACC) στην ομάδα ελέγχου μόνο. Στην ίδια μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην πυκνότητα των AdipoR1 στους μύες, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα η διαμόρφωση των AdipoR1 και η σχέση με την κυτταρική πλασματική μεμβράνη ή με άλλα αναγκαία μόρια και συνεπώς η ευαισθησία να μεταβάλλεται από την πλούσια σε λίπος διατροφή και να συμβάλει στην παρατηρηθείσα αντίσταση στη λιπονεκτίνη [203].

Το γεγονός ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης στο πλάσμα ευθύνονται έστω και μερικώς για την ελαττωμένη δράση της ινσουλίνης στα παχύσαρκα, διαβητικά τύπου 2 άτομα είναι γενικά αποδεκτό από όλους τους ερευνητές. Εντούτοις, τα ευρήματα στο ανθρώπινο είδος είναι σχετικά και δεν είναι τόσο άμεσα και συμπερασματικά όπως τα αποτελέσματα που παρέχονται από τις μελέτες σε τρωκτικά [204]. Επίσης, το συμπέρασμα ότι η μείωση των συγκεντρώσεων της λιπονεκτίνης είναι δευτερογενής και παρατηρείται μετά από

ανάπτυξη υπερινσουλιναιμίας είναι αμφισβητήσιμο, λόγω της ταχύτατης μείωσης που προκαλεί η χορήγηση ινσουλίνης στα επίπεδα της ΗΜW λιπονεκτίνης [205].

Τα αντιδιαβητικά φάρμακα θειαζολιδινεδιόνες (TZD) συνδέονται και ενεργοποιούν τους PPAR γ υποδοχείς [206] και διεγείρουν την έκκριση της ολικής [207] και ΗΜW λιπονεκτίνης [208] οι οποίες θεωρούνται απαραίτητες για την αντιδιαβητική δράση των TZDs σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε *ob/ob* ποντίκια στα οποία δεν εκφράζονταν η λιπονεκτίνη [209].

Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι η ΗΜW λιπονεκτίνη πιθανόν να αποτελεί τη δραστικότερη μορφή λιπονεκτίνης, αφού μετά από χορήγηση TZD παρατηρήθηκαν αλλαγές μόνο στις συγκεντρώσεις της ΗΜW λιπονεκτίνης στο αίμα και βελτίωση στην ηπατική ινσουλिनοευαισθησία [208, 210]. Επίσης, η σχετική αναλογία ή η απόλυτη συγκέντρωση (absolute concentration) των ΗΜW πολυμερών συσχετίζονται καλύτερα με την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε πληθυσμούς διαβητικών ατόμων τύπου 2 από ότι τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης [211]. Ας σημειωθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα λιπονεκτίνης, ιδιαίτερα της ΗΜW λιπονεκτίνης [211], αποτελούν ισχυρούς δείκτες κινδύνου για ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου και διαβήτη τύπου 2 [212, 213].

2.3.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της λιπονεκτίνης και ινσουλिनoαντίσταση

Στο γονίδιο της λιπονεκτίνης έχουν παρατηρηθεί αρκετές μεταλλάξεις, μερικές από τις οποίες σχετίζονται σε σημαντικό βαθμό με την ινσουλινoαντίσταση, το σακχαρώδη διαβήτη, την υπολιπονεκτιναιμία [6, 214-216] και το μειωμένο πολυμερισμό της λιπονεκτίνης [8]. Το χρωματόσωμα 3q27 όπου βρίσκεται το γονίδιο της λιπονεκτίνης, φαίνεται να σχετίζεται με το Σ.Δ.2 [217-219]. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός του νουκλεοτιδίου 276 του γονιδίου της λιπονεκτίνης σχετίζεται με την υπολιπονεκτιναιμία και το σακχαρώδη διαβήτη [214].

Όπως έχει αναφερθεί στο πρώτο κεφάλαιο, ο δισουλφιδικός δεσμός ανάμεσα στα μόρια των Ν-τελικών κυστεϊνών είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό πολυμερών μορφών μεγαλύτερων των τριμερών. Η παρουσία ενός μορίου σερίνης στο Ν-τελικό άκρο, αντί για κυστεΐνη Cys (αμινο-τελική Cys-Ser μετάλλαξη-C36S) εμποδίζει τον σχηματισμό μεσαίου και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών και καταργεί τη διεγερτική δράση της λιπονεκτίνης

στην AMPK στα ηπατοκύτταρα [8]. Σε άτομα που φέρουν τις G84R και G90S μεταλλάξεις, οι οποίες σχετίζονται με σακχαρώδη διαβήτη και υπολιπιδαιμία, διαταράσσεται ο σχηματισμός των HMW πολυμερών [216]. Αντίθετα, σε άτομα που φέρουν τις R112C και I164T μεταλλάξεις στο γονίδιο της λιπονεκτίνης, δεν συγκροτούνται τριμερείς μορφές, έχοντας ως συνέπεια τη μειωμένη έκκριση της ορμόνης από τα κύτταρα [8, 215]. Επίσης, οι G84R, G90S, Y111H, και I164T μεταλλάξεις της λιπονεκτίνης σχετίζονται με διαβητικό και υπολιπιδαιμικό φαινότυπο [8, 215, 216].

2.3.3 Δράση της λιπονεκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η λιπονεκτίνη συνδέεται ειδικά στα ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (HAECs) και αναστέλλει την έκφραση του mRNA των μορίων προσκόλλησης που επάγει ο TNF-α στα μονοκύτταρα. Η ανασταλτική δράση της λιπονεκτίνης διενεργείται μέσω της cAMP οδού, χωρίς να επηρεάζει την αλληλεπίδραση του TNF-α και των υποδοχέων του [220].

Η HMW λιπονεκτίνη ενεργοποιεί άμεσα την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω οδών σηματοδότησης της 3-κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης της ενδοθηλιακής συνθάσης (eNOS, endothelial Nitric-Oxide Synthase) στη Ser¹¹⁷⁹ από την AMPK [221]. Ο Hattori και συν. παρατήρησαν ότι η ανθρώπινη HMW λιπονεκτίνη προκαλεί αρχικά μέτρια ενεργοποίηση του NF-κB στα ενδοθηλιακά κύτταρα (προφλεγμονώδη δράση), η οποία αντισταθμίζεται από την ενεργοποίηση των AMPK/eNOS και οδηγεί τελικά σε καταστολή της ενεργοποίησης του NF-κB από τον TNF-α (αντιφλεγμονώδη δράση) [222].

2.3.4 Αλληλεπίδραση λιπονεκτίνης και Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων-άλφα

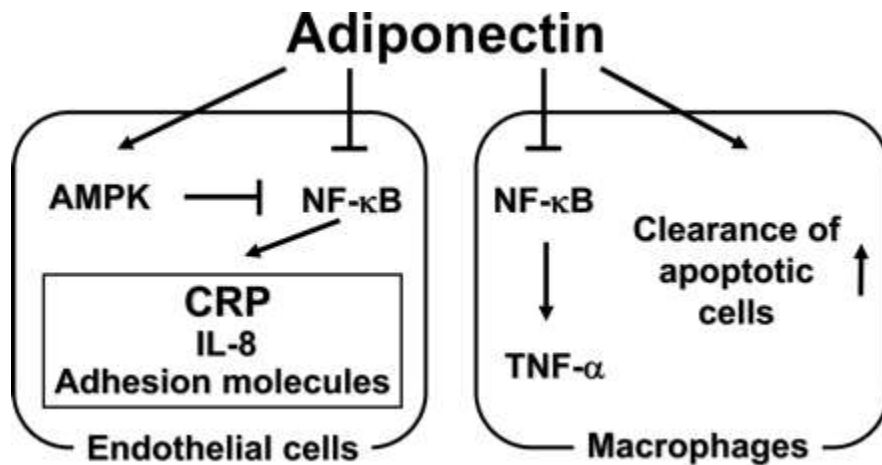
Ο TNF-α καταστέλλει την έκφραση και την έκκριση της λιπονεκτίνης στα 3T3-L1 λιποκύτταρα [207]. Η λιπονεκτίνη παρεμποδίζει το μονοπάτι σηματοδότησης του TNF-α στα ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα [220] και μειώνει την παραγωγή του TNF-α στα ανθρώπινα μακροφάγα κύτταρα *in vitro* [223] (Σχήμα 13).

Η κατασταλτική δράση που ασκεί ο TNF-α στην έκφραση και στην έκκριση της λιπονεκτίνης αναστέλλεται από τις θειαζολιδινεδιόνες (TZDs), οι οποίες ενισχύουν την έκφραση της λιπονεκτίνης με άμεση επίδραση στον υποκινητή του γονιδίου και έμμεσα καταστέλλοντας τη δράση του TNF-α [207].

Η αντίστροφη συσχέτιση που παρατηρείται ανάμεσα στη λιπονεκτίνη και τον TNF-α σε καλλιέργειες κυττάρων, δεν υφίσταται σε ανθρώπινες μελέτες. Μετά από πρόκληση ενδοτοξιναιμίας σε υγιείς εθελοντές, οι συγκεντρώσεις των TNF-α και IL-6 αυξήθηκαν χωρίς να σημειωθεί οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα της λιπονεκτίνης [224]. Σε παρόμοια μελέτη από τον Anderson και συν. μετά από ενέσιμη χορήγηση ενδοτοξίνης σε υγιή άτομα, παρατηρήθηκε αύξηση στα λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα του αίματος, και στις συγκεντρώσεις των TNF-α και IL-6 στο λιπώδη ιστό. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της [225].

2.3.5 Δράση λιπονεκτίνης μέσω του υποδοχέα καλρετικουλίνης

Η λιπονεκτίνη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση μέσω μηχανισμών οι οποίοι δεν απαιτούν ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Η λιπονεκτίνη συνδέεται με αποπτωτικά κύτταρα και προάγει την φαγοκύτωση τους από τα μακροφάγα μέσω της ικανότητας της να σχηματίζει γέφυρα μέσω των νεκρών κυττάρων και των μακροφάγων. Η ενέργεια αυτή της λιπονεκτίνης διενεργείται μέσω της καλρετικουλίνης, η οποία είναι υποδοχέας στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων, όπως διαπιστώθηκε μετά από *in vitro* και *in vivo* δοκιμές σε ποντίκια [226]. Επίσης, η λιπονεκτίνη ενεργοποιεί το κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης του συμπληρώματος με την ικανότητα της να συνδέεται με την πρωτεΐνη C1q [227].



Σχήμα 13. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις της λιπονεκτίνης [228]. *Συντομογραφίες:* Adhesion molecules= μόρια προσκόλλησης; Clearance of apoptotic cell= κάθαρση από αποπτωτικά κύτταρα.

2.4 Λιπονεκτίνη και φλεγμονή

2.4.1 Φλεγμονώδεις λιποκίνες και Δείκτες φλεγμονής

Η διαταραχή της ισορροπίας στην παραγωγή φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών λιποκινών από τα λιποκύτταρα, ευθύνεται για τη φλεγμονώδη κατάσταση που σχετίζεται με την παχυσαρκία, και ελαττώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη πολλών οργάνων στόχων, παρεμποδίζοντας την ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος της ινσουλίνης [131, 132]. Η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και η αθηρογένεση είναι συνυπάρχουσες καταστάσεις, επιπρόσθετα της αντίστασης στην ινσουλίνη, οι οποίες σχετίζονται με την παχυσαρκία και επηρεάζονται από την έκκριση των φλεγμονωδών λιποκινών από το σπλαχνικό λευκό λιπώδη ιστό [229].

Οι κυτοκίνες, TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα), IL-6, IL-1b και IFN-γ (ιντερφερόνη-γ), προκάλεσαν, *in vitro*, καταστολή της έκκρισης της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της από ανθρώπινα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, μετά από μακροχρόνια έκθεση σε αυτά (μεγαλύτερη των τριών ημερών). Η μονομερής προσθήκη IL-6 δεν προκάλεσε καμία επίδραση στην έκκριση της λιπονεκτίνης [230].

2.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης

Σε *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της CRP αυξάνονται σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας. Η παρουσία σφαιρικής και ολικής λιπονεκτίνης αντιστρέφει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο αυτή την αύξηση, στοιχείο ενδεικτικό της αντιφλεγμονώδους δράσης της λιπονεκτίνης [231].

2.4.2.1 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης στα μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα

Η λιπονεκτίνη ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση της μέσω των υποδοχέων AdipoR1/2 και T-κατχερίνης. Αρκετοί μηχανισμοί δράσης της λιπονεκτίνης έχουν προταθεί, περιλαμβανομένων της άμεσης δράσης της λιπονεκτίνης στα φλεγμονώδη κύτταρα, στον NF-κB και της αλληλεπίδρασης με τον TNF-α [232].

Τα μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος, μονοκύτταρα (σημαντικά κύτταρα στη φυσική ανοσία, τη φλεγμονή και τις καρδιαγγειακές παθήσεις), NK κύτταρα (natural killer-κύτταρα δολοφόνοι), T και B λεμφοκύτταρα, εκφράζουν AdipoRs [233]. Ως γνωστό, τα ανθρώπινα μονοκύτταρα/μακροφάγα συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων και στον υποενδοθηλιακό χώρο. Στο πρώιμο αθήρωμα και αποτελούν την κύρια πηγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [234, 235]. Η λιπονεκτίνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη των προγονικών μυελομονοκυττάρων και τη λειτουργία των ώριμων μακροφάγων [236], καταστέλλει τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα [61] και μειώνει την πρόσληψη και την αποθήκευση των λιπιδίων από τα μακροφάγα (φαγοκύτωση) [236, 237]. Επίσης, η λιπονεκτίνη μειώνει την έκφραση του MSR-A (macrophage scavenger receptor class-A- ειδικός υποδοχέας ο οποίος αναγνωρίζει τροποποιημένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και συμμετέχει στην απομάκρυνση ξένων και αχρήστων υλικών από το σώμα). Σε μοντέλο ποντικών στα οποία δεν εκφράζεται η απολιποπρωτεΐνη E, η λιπονεκτίνη μείωσε στα αφρώδη κύτταρα την έκφραση του MSR-A και τα επίπεδα του TNF-α [238, 239]. Επιπρόσθετα, η λιπονεκτίνη εμπόδισε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενεργοποίησε τη διαδικασία της απόπτωσης στα μυελομονοκυτταρικά προγονικά κύτταρα [236].

Η λιπονεκτίνη αυξάνει επιλεκτικά την έκφραση του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών των ιστών (TIMP-1, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) στα ανθρώπινα μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση της παραγωγής της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 από τα μακροφάγα [240]. Επίσης, η λιπονεκτίνη αναστέλλει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), E-σελεκτίνης E (E-selectin) και ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) και παρεμποδίζει την προσκόλληση των μονοκυττάρων που προκαλεί ο TNF- α στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [241].

Η gAd συνδεδεμένη με τον υποδοχέα AdipoR1 στα μακροφάγα κύτταρα, καταστέλλει την ενεργοποίηση του NF- κ B μέσω TLR σηματοδότησης [242]. Ο NF- κ B είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτοκινών σε μακροφάγα ενεργοποιημένα από τον λιποπολυσακχαρίτη LPS. Ο αναστολέας του NF- κ B, ο I κ B, παρεμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Η ικανότητα της λιπονεκτίνης να ελαττώνει την πυρηνική μετατόπιση της υπομονάδας NF- κ B p65 εξηγεί εν μέρει τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της [243].

Η λιπονεκτίνη ελαττώνει την απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, TNF, και ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα [236, 237, 243] και αυξάνει την έκκριση αντιφλεγμονωδών διαμεσολαβητών όπως είναι η IL-10 και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης IL-1 (IL-1 receptor antagonist) [237]. Ο Neumeier και συν. έδειξαν ότι η LMW λιπονεκτίνη ελαττώνει την επαγόμενη απελευθέρωση της IL-6 από το λιποπολυσακχαρίτη στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και THP-1 κύτταρα (ανθρώπινη σειρά μονοκυττάρων από ασθενείς με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία), σε αντίθεση με την HMW λιπονεκτίνη η οποία δεν προκαλεί ανάλογη ενέργεια. Επίσης, τα ισομερή LMW και HMW της λιπονεκτίνης προκαλούσαν απόπτωση στα μη διαφοροποιημένα THP-1 κύτταρα, μείωση στην έκφραση mRNA του MSR A [244]. Επίσης η ανθρώπινη fAd εμποδίζει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, πιθανόν μέσω ρύθμισης της NADPH οξειδάσης [245].

2.4.2.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της λιπονεκτίνης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα

Η σφαιρική λιπονεκτίνη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο και εμποδίζει την παραγωγή της CRP σε καλλιέργειες ανθρώπινων αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων, που προκαλείται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, μέσω αρνητικής ρύθμισης του NF-κB και θετικής ρύθμισης της AMPK [231]. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι η λιπονεκτίνη εξασθενεί την ενεργοποίηση NF-κB από τον TNF-α στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οδηγεί σε ελαττωμένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης και της IL-8 [220, 246] (Σχήμα 13).

Η επίδραση της λιπονεκτίνης στον NF-κB βρέθηκε ότι είναι σύνθετη: διεγερτική και ανασταλτική. Η HMW λιπονεκτίνη ασκεί μέτρια ενεργοποίηση του NF-κB σε σύγκριση με την gAd, η οποία προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του NF-κB, προάγοντας την έκφραση ποικίλων προφλεγμονωδών γονιδίων και των γονιδίων μορίων προσκόλλησης. Η gAd απαιτεί μεγαλύτερη περίοδο επώασης προκειμένου να ασκήσει τελικά ανασταλτική δράση στη διέγερση του NF-κB, σε σχέση με τη HMW λιπονεκτίνη. Το συμπέρασμα είναι ότι η HMW λιπονεκτίνη λειτουργεί προστατευτικά μετά από φλεγμονώδη ερεθίσματα σε αντίθεση με τη gAd, η οποία προκύπτει μετά από διάσπαση της λιπονεκτίνης στα σημεία φλεγμονής, και ενισχύει τη διαδικασία της φλεγμονής. Εντούτοις, δεν είναι σαφές κατά πόσο η παραγωγή gAd στα σημεία της φλεγμονής είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει τον NF-κB. Υπό κανονικές συνθήκες οι συγκεντρώσεις της HMW λιπονεκτίνης είναι υψηλές στα αγγεία του αίματος. Η HMW λιπονεκτίνη ως το μεγαλύτερο ποσοστό της λιπονεκτίνης, ασκεί προστατευτική δράση ενάντια στη φλεγμονή, και η gAd ως αποτέλεσμα της διάσπασης της λιπονεκτίνης ενισχύει τη διαδικασία της φλεγμονής στα αρχικό στάδιο [247].

Τα πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους της λιπονεκτίνης, ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB και στα μυοκύτταρα [248]. Στους ινοβλάστες, η ενεργοποίηση του NF-κB γίνεται μέσω του AdipoR1 /AMPK/p38/IKKαβ μονοπατιού σηματοδότησης [249]. Η λιπονεκτίνη ενεργοποιεί τον NF-κB στα αρχέγονα/πρωτογενή ηπατοκύτταρα, μέσω του AdipoR1 υποδοχέα και προκαλεί την έκκριση της χημειοκίνης CXCL8 η οποία ασκεί προστατευτική δράση [250].

2.4.3 Επίπεδα λιπονεκτίνης στη φλεγμονή

Σε ζωικά μοντέλα με σήψη, η ανεπάρκεια λιπονεκτίνης σχετίζεται με υψηλή συγκέντρωση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και αυξημένη ηπατική βλάβη [251, 252]. Σε μελέτη που έγινε σε ασθενείς με σήψη ή σηπτικό σοκ, παρατηρήθηκε παρόμοια συσχέτιση [253] και οι ερευνητές πρότειναν ότι η λιπονεκτίνη ίσως να αποτελεί θεραπευτικό μέσο αντιμετώπισης φλεγμονωδών καταστάσεων [232].

Αντίθετα, τα επίπεδα της λιπονεκτίνης παρουσιάζονται αυξημένα σε ποικιλία φλεγμονωδών ασθενειών όπως είναι ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος [254], η κυστική ίνωση [255], οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου [256] και η ρευματοειδής αρθρίτιδα [257]. Οι ερευνητές ερμηνεύουν τις αυξημένες συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης ως πιθανό προστατευτικό μηχανισμό του οργανισμού ενάντια στις φλεγμονώδεις παθήσεις [232].

2.5 Λιπονεκτίνη και αθηρογένεση

Στις μεταβολικές διαταραχές όπως είναι ο διαβήτης και η παχυσαρκία, η χρόνια υποκλινική φλεγμονή του αγγειακού ενδοθηλίου αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης. Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία, τα μειωμένα επίπεδα λιπονεκτίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου σε άτομα με παχυσαρκία με διαβήτη και υπεργλυκαιμία [258, 259]. Καλλίτερη συσχέτιση με τα καρδιοαγγειακά νοσήματα παρουσιάζει η ελάττωση της gAd ισομορφής η οποία εκφράζεται από τον λόγο HMW λιπονεκτίνης/ολική λιπονεκτίνη ο οποίος είναι ελαττωμένος σε άτομα με στεφανιαία νόσο και χρησιμεύει ως προγνωστικός παράγων για την εκτίμηση της στεφανιαίας αρτηριακής νόσου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 [260].

Είναι γνωστό ότι σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για καρδιοαγγειακές επιπλοκές οι συγκεντρώσεις διαφόρων κυτοκινών στην κυκλοφορία, όπως είναι ο TNF, είναι αυξημένες. Οι βλαπτικές επιδράσεις των κυτοκινών στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων [261, 262] φαίνεται ότι αντικρούονται από την λιπονεκτίνη. Στις περισσότερες κλινικές δοκιμές, όχι σε όλες [263-267] τα αυξημένα επίπεδα λιπονεκτίνης σχετίζονται με βελτιωμένη ενδοθηλιακή λειτουργία.

In vitro μελέτες έδειξαν ότι η λιπονεκτίνη αντιστρέφει τις βλαπτικές επιδράσεις του TNF και άλλων κυτοκινών, όπως επίσης και της υπεργλυκαιμίας [258, 259]. Η αγγειακή φλεγμονή που παρατηρήθηκε σε Adίροq^{-/-} ποντίκια [268], είναι ανάλογη με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών επιπλοκών σε άτομα με ελαττωμένα επίπεδα λιπονεκτίνης, όπως αναφέρεται σε διάφορες επιδημιολογικές μελέτες [258, 259]. Η χορήγηση σφαιρικής λιπονεκτίνης αντιστρέφει το φλεγμονώδη φαινότυπο του μικροαγγειακού ενδοθηλίου [268].

Φυσιολογικές συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης (3-30 μg/mL) ασκούν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων του μέσου χιτώνα των αρτηριών [55] που προκαλείται από τον αυξητικό παράγοντα PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB), ο οποίος εκκρίνεται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα αγγειακά αφρώδη κύτταρα συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (Σχήμα 14). Η λιπονεκτίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση του PDGF-BB στα λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης αορτής αναστέλλοντας έτσι τη μιτογόνο δράση του μέσω του PDGF BB-υποδοχέα [55].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται στην αθηροσκλήρωση οφείλεται στα αρχικά στάδια τουλάχιστον, σε ελάττωση της ενζυματικής δράσης της ενδοθηλιακής συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (eNOS) και μείωσης των επιπέδων του νιτρικού οξειδίου (NO) μέσω του οξειδωτικού στρες [269]. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του NO σχετίζεται με την έναρξη, την εξέλιξη και τις επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης [270, 271]. Το NO ανταγωνίζεται τη δράση των παραγόντων που προκαλούν αγγειόσπασμο και παρεμποδίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) [270].

Όπως προαναφέρθηκε η HMW λιπονεκτίνη ενεργοποιεί άμεσα την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης, και φωσφορυλίωσης της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO από την AMPK [221]. Η προκαλούμενη από την ανθρώπινη HMW λιπονεκτίνη μέτρια ενεργοποίηση του NF-κB στα ενδοθηλιακά κύτταρα (προφλεγμονώδη δράση), αντισταθμίζεται από την ενεργοποίηση των AMPK/eNOS και οδηγεί τελικά σε καταστολή της ενεργοποίησης του NF-κB (αντιφλεγμονώδη δράση) [222].

Η fAd λιπονεκτίνη ενεργοποιεί άμεσα την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω PI3-κινάσης/AMPK σηματοδότησης [221]. Στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικών

φλεβών, η λιπονεκτίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της eNOS στη Ser¹¹⁷⁷ και της AMPK στη Thr¹⁷² και την παραγωγή NO μέσω αλληλεπίδρασης των AdipoR1 και -R2 υποδοχέων με την πρωτεΐνη APPL1. Η καταστολή της έκφρασης της APPL1, συνοδεύεται από σημαντική μείωση της δράσης της λιπονεκτίνης και παραγωγή NO [52] (Σχήμα 14).

Οι ευνοϊκές επιδράσεις της λιπονεκτίνης στο καρδιαγγειακό σύστημα φαίνεται από παρατηρήσεις σε τρωκτικά:

α) Σε μηχανικά τραυματισμένες αρτηρίες ποντικών στα οποία δεν εκφράζεται το γονίδιο της λιπονεκτίνης (*Adipoq*^{-/-}), η χορήγηση λιπονεκτίνης ελάττωσε τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος [272]. Σε τριχοειδή που υπέστησαν κάκωση διαπιστώθηκε σύνδεση της λιπονεκτίνης με το κολλαγόνο του έσω χιτώνα των αγγείων και συσσώρευση στο σημείο της βλάβης [55].

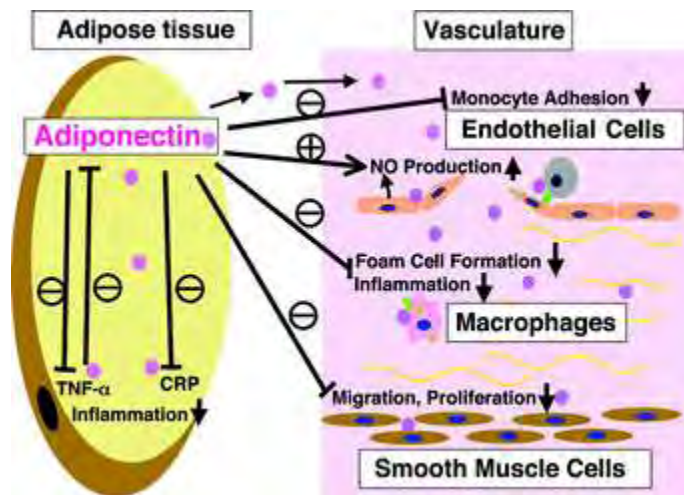
β) η χορήγηση λιπονεκτίνης βελτίωσε την υπέρταση σε παχύσαρκα ποντίκια [273].

γ) η λιπονεκτίνη μείωσε την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και βελτίωσε την ενδοθηλιακή λειτουργία στις αρτηρίες διαγονιδιακών ποντικών στα οποία δεν εκφράζεται η απολιποπρωτεΐνη E, γεγονός που προδιαθέτει σε αθηρωμάτωση [274]. Σε έλλειψη λιπονεκτίνης τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και κατ' ακολουθία την προσκόλληση και βλαπτική δράση ενεργών λευκοκυττάρων. Η δράση αυτή της λιπονεκτίνης φαίνεται ότι ασκείται μέσω της eNOS αφού αποκλεισμός της δραστηριότητας της συνθάσης καταργεί την προστατευτική δράση της σφαιρικής λιπονεκτίνης [268].

Ευεργετική φαίνεται ότι είναι η δράση της λιπονεκτίνης στη διαδικασία της απόπτωσης ενδοθηλιακών κυττάρων αφού σύμφωνα με τον Kobayashi και συν. [275] η HMW λιπονεκτίνη κατέστειλε, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, μέσω της AMPK σηματοδοτικής οδού, τη δράση της κασπάσης-3. Στην ίδια μελέτη, μετρήθηκαν τα επίπεδα των διαφόρων ισομερών της λιπονεκτίνης σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και σε παχύσαρκα άτομα τα οποία υποβλήθηκαν σε δίαιτα για απώλεια βάρους. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι μόνο τα επίπεδα της HMW ισομορφής της λιπονεκτίνης τα οποία ήταν ελαττωμένα σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο αυξήθηκαν μετά από την απώλεια βάρους [275].

Ακόμα έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση λιπονεκτίνης σε πειραματόζωα που είχαν όγκους, συνοδεύτηκε από καταστολή της ανάπτυξης των όγκων, μέσω ενεργοποίησης της caspase-8,

γεγονός που αποδόθηκε σε παρεμπόδιση της αγγειογένεσης και προαγωγή της ενδοθηλιακής απόπτωσης [62].



Σχήμα 14. Οι αντιφλεγμονώδεις και αντι-αθηρογόνες δράσεις της λιπονεκτίνης [276].
Συντομογραφίες: Adipose tissue= λιπώδης ιστός, Adiponectin= λιπονεκτίνη, Vasculature= αγγειακό δίκτυο, Monocyte Adhesion= προσκόλληση μονοκυττάρων, Endothelial Cells= ενδοθηλιακά κύτταρα, NO Production= παραγωγή νιτρικού οξειδίου, Foam Cell Formation= σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, Inflammation= φλεγμονή, Macrophages= μακροφάγα, Migration= μετανάστευση, Proliferation= πολλαπλασιασμός, Smooth Muscle Cells= λεία μυϊκά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παραγωγή και δράση των στεροειδών ορμονών των ωοθηκών

3.1.1 Φυσιολογία του καταμήνιου κύκλου

Η φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία της γυναίκας χαρακτηρίζεται από μηνιαίες ρυθμικές μεταβολές της έκκρισης των γοναδοτροφινών και των ωοθηκικών ορμονών και από αντίστοιχες μεταβολές στη λειτουργία των γεννητικών οργάνων. Η ρυθμική αυτή εικόνα ονομάζεται γυναικείος γενετήσιος ή καταμήνιος κύκλος, έχει διάρκεια συνήθως 28 ημέρες και αποτελείται από τρεις φάσεις: 1) την παραγωγική (υπερπλαστική ή οιστρογονική) φάση, 2) την ωορρηκτική φάση και 3) την εκκριτική φάση [277].

Οι δύο σημαντικές συνέπειες της κυκλικότητας είναι η απελευθέρωση από τις ωοθήκες συνήθως ενός ώριμου ωαρίου κάθε μήνα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη ενός εμβρύου κάθε φορά και η προετοιμασία του ενδομητρίου στον καθορισμένο χρόνο που απαιτείται κάθε μήνα για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου [277].

Στην αρχή κάθε καταμήνιου κύκλου το μεγαλύτερο μέρος του ενδομητρίου αποπίπτει με τη διαδικασία της εμμηνορρυσίας. Στο τέλος της εμμηνορρυσίας, από το αρχικό ενδομήτριο απομένει μόνο μία λεπτή στιβάδα στη βάση του. Υπό την επίδραση των οιστρογόνων, τα οποία εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες από τις ωοθήκες στη διάρκεια της πρώτης φάσης του ωοθηκικού κύκλου, τα συνδετικά και τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου πολλαπλασιάζονται γρήγορα με αποτέλεσμα την 3^η-7^η ημέρα από την έναρξη της εμμηνορρυσίας η επιφάνεια του ενδομητρίου να καλύπτεται και πάλι από επιθήλιο. Στη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων του κύκλου το πάχος του ενδομητρίου αυξάνει (μέχρι 12-13mm) εξαιτίας της αύξησης του αριθμού των κυττάρων του υποστρώματος (συνδετικού ιστού) και της προοδευτικής ανάπτυξης των αδένων και των αγγείων του ενδομητρίου, ως αποτέλεσμα της δράσης των οιστρογόνων. Την 14^η ημέρα περίπου, συμβαίνει ωορρηξία. Ακολουθεί η εκκριτική φάση, στη διάρκεια της οποίας το ωχρο σωματίο εκκρίνει μεγάλες ποσότητες προγεστερόνης και οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα προκαλούν πρόσθετη υπερπλασία των κυττάρων και η προγεστερόνη προκαλεί σημαντική διόγκωση και εκκριτική ανάπτυξη του ενδομητρίου. Οι αδένες γίνονται περισσότερο σπειροειδείς, στα επιθηλιακά τους κύτταρα συγκεντρώνονται εκκριτικά κοκκία και εκκρίνουν μικρές ποσότητες ορώδους υγρού. Επίσης, αυξάνει το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του στρώματος, στα οποία συγκεντρώνονται μεγάλες

ποσότητες λιποειδών και γλυκογόνου, ενώ η αιμάτωση γίνεται πιο πλούσια, ακολουθώντας την ανάπτυξη της εκκριτικής δραστηριότητας. Στη διάρκεια της εκκριτικής φάσης, το πάχος του ενδομητρίου διπλασιάζεται και προς το τέλος του καταμήνιου κύκλου φθάνει τα 14-16mm και είναι πλέον κατάλληλο για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Όταν δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση, η έκκριση των ωθητικών ορμονών ελαττώνεται απότομα σε μεγάλο βαθμό, το ενδομήτριο αποπίπτει και αρχίζει ένας νέος εμμηνορρυσιακός κύκλος [277].

Οι ωθητικές μεταβολές στη διάρκεια του γεννητικού κύκλου εξαρτώνται αποκλειστικά από τις γοναδοτρόπους ορμόνες (γοναδοτροπίνες) οι οποίες εκκρίνονται από την πρόσθια υπόφυση. Οι ωθήκες που δεν διεγείρονται από γοναδοτροπίνες παραμένουν τελείως αδρανείς όπως συμβαίνει σε ολόκληρη τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας. Στην ηλικία των 8 ετών περίπου, η υπόφυση αρχίζει να εκκρίνει γοναδοτροπίνες σε ποσότητες που προοδευτικά αυξάνουν και σε ηλικία μεταξύ 11 και 15 ετών η έκκριση αυτή προκαλεί την έναρξη των καταμήνιων κύκλων και της εφηβείας [277].

Η πρόσθια υπόφυση εκκρίνει δύο διαφορετικές ορμόνες, γνωστές για την ουσιαστική τους συμβολή στη φυσιολογική λειτουργία των ωθηκών: 1)την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και 2) την ωχρινοτρόπο ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH). Κατά τη διάρκεια του καταμήνιου γενετήσιου κύκλου της γυναίκας οι FSH και LH παρουσιάζουν κυκλική αύξηση και ελάττωση της έκκρισης τους [277].

Η αύξηση των συγκεντρώσεων των FSH και LH στην αρχή κάθε καταμήνιου κύκλου επιταχύνει την ανάπτυξη της θήκης και της κοκκώδους στιβάδας 20 περίπου ωοθυλακίων το μήνα, ένα εκ των οποίων θα μεγαλώσει περισσότερο και θα φθάσει στο στάδιο της ωορρηξίας. Για την τελική ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την ωορρηξία είναι αναγκαία η επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), χωρίς την οποία δεν θα προκληθεί ωορρηξία έστω και αν υπάρχουν μεγάλες ποσότητες ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης. Συγκεκριμένα, δύο περίπου ημέρες πριν από την ωορρηξία ο ρυθμός έκκρισης της LH από την πρόσθια υπόφυση αυξάνει σημαντικά (6-10 φορές) και φθάνει στη μέγιστη τιμή του 18 ώρες περίπου πριν από την ωορρηξία. Ταυτόχρονα διπλασιάζεται (σχεδόν) και η συγκέντρωση της FSH. Η συνεργική δράση των δύο ορμονών προκαλεί την εξαιρετικά απότομη διόγκωση του ωοθυλακίου που καταλήγει στην ωορρηξία. Την τελευταία ημέρα πριν από την ωορρηξία και για μία περίπου

ημέρα μετά από αυτή, τα κύτταρα της θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας παρουσιάζουν υπό την επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης, τεράστιες φυσικές και χημικές μεταβολές. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ανάπτυξη του ωχρού σωματίου (ωχρινοποίηση). Η μάζα των κυττάρων που απομένουν στη θέση του ωοθυλακίου που υπέστη ρήξη ονομάζεται ωχρό σωματίο και εκκρίνει προγεστερόνη (ωχρίνη) και οιστρογόνα. Τα κύτταρα αυτά αυξάνουν σε μέγεθος και αναπτύσσουν κυτταροπλασματικά λιποειδή έγκλειστα που τους δίνει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Το ωχρό σωματίο αυξάνει σε μέγεθος μέχρι την 7^η -8^η ημέρα μετά την ωορρηξία. Στη συνέχεια, το ωχρό σωματίο αρχίζει να παρουσιάζει εκφύλιση και απώλεια της εκκριτικής του λειτουργίας μέχρι που μετατρέπεται σε λευκό σωματίο το οποίο έπειτα εξαφανίζεται και αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό. Οι μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων και προγεστερόνης που εκκρίνονται από το ωχρό σωματίο στη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου προκαλούν με παλίνδρομο μηχανισμό την ελάττωση της έκκρισης FSH και LH. Ως εκ τούτου, στη διάρκεια αυτής της περιόδου κανένα νέο ωοθυλάκιο δεν αυξάνει σε μέγεθος. Αφού ολοκληρωθεί η εκφύλιση του ωχρού σωματίου (περίπου την 26^η ημέρα του καταμήνιου κύκλου), η παλίνδρομη καταστολή της πρόσθιας υπόφυσης σταματά με αποτέλεσμα την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων FSH και μικρότερων LH, οι οποίες πυροδοτούν την ανάπτυξη νέων ωοθυλακίων και την έναρξη ενός νέου ωοθηκικού κύκλου. Ταυτόχρονα η αναστολή της έκκρισης προγεστερόνης και οιστρογόνων οδηγεί σε εμμηνορρυσία [277].

3.1.2 Εμμηνόπαυση

Εμμηνόπαυση ορίζεται ως η μόνιμη διακοπή της εμμήνου ρύσεως που εμφανίζεται όταν οι ωοθήκες εξαντλήσουν τα ωάρια τους και δεν εκκρίνουν πλέον τις ορμόνες που εμπλέκονται στον καταμήνιο κύκλο (Οιστρογόνα- Προγεστερόνη). Πρόκειται για ένα φυσιολογικό και αναμενόμενο γεγονός στη ζωή της γυναίκας που σηματοδοτεί τη μετάβαση από την περίοδο που είναι ικανή για αναπαραγωγή στη μη αναπαραγωγική περίοδο. Θεωρείται ότι μια γυναίκα εισέρχεται στην εμμηνόπαυση, αφού παρέλθει ένα έτος από την τελευταία έμμηνο ρύση. Τα περιεμμηνοπαυσιακά χρόνια (πριν την εμμηνόπαυση), χαρακτηρίζονται από αλλαγές των φυσιολογικών ωοθυλακιορρηκτικών κύκλων (ανοωθυλακιορρηξία- αλλαγές στη διάρκεια του κύκλου) και συνήθως περιλαμβάνουν ηλικίες από 40-50 ετών [277].

Οι επιπτώσεις της έλλειψης των ορμονών κατατάσσονται σε βραχυχρόνιες (π.χ. αγγειοκινητικές εξάψεις, χρόνια κόπωση, ευερεθιστότητα, κατάθλιψη) και μακροχρόνιες στις οποίες εντάσσονται ο αυξημένος κίνδυνος οστεοπόρωσης, στεφανιαίας νόσου και πιθανώς νόσου Alzheimer. Η έλλειψη οιστρογόνων επιταχύνει τον ρυθμό οστικής απώλειας κατά 0,5-2% ανά έτος με συνέπεια τη μείωση της ανθεκτικότητας του σκελετού και την αύξηση του κινδύνου καταγμάτων. Η έλλειψη οιστρογόνων επηρεάζει τα λιπίδια του αίματος, οδηγώντας σε αύξηση της χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης του αίματος. Επίσης επηρεάζεται άμεσα το ενδοθήλιο των αγγείων καθώς και παράγοντες που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος. Αυτές οι αλλαγές πιθανόν να ερμηνεύουν την αύξηση της καρδιαγγειακής νόσου και της αθηροσκλήρυνσης της αορτής που παρατηρείται μετά την εμμηνόπαυση. Η δράση των οιστρογόνων στον εγκέφαλο είναι νευροτροφική και νευροπροστατευτική και πιθανότατα σύνδρομα που περιλαμβάνουν έκπτωση διανοητικών λειτουργιών (π.χ. νόσος Alzheimer) να σχετίζονται με την έλλειψη των οιστρογόνων [278, 279].

3.2 Στεροειδή των γονάδων

3.2.1 Σύνθεση

Η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη αποτελούν τα κυριότερα στεροειδή των γονάδων. Παρόλο που τα στεροειδή έχουν διαφορετικές δράσεις, συντίθενται από την ίδια βιοσυνθετική οδό στα αρχικά στάδια [280]. Το αρχικό στάδιο της στεροειδογένεσης είναι η μετατροπή της χοληστερόλης στο πρώτο στεροειδές την πρεγνενολόνη. Η μετατροπή αυτή γίνεται από το κυτόχρωμα P450_{sc} (ένζυμο διάσπασης πλευρικής αλυσίδας κυτόχρωμα P450 – cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme), το οποίο βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη των κυττάρων όπου γίνεται η στεροειδογένεση [281]. Η πρεγνενολόνη εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια και μετατρέπεται σε προγεστερόνη από την 3β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση (3β-HSD) στο χώρο των μικροσωματίων [282]. Στη συνέχεια, η προγεστερόνη μετατρέπεται σε ποικιλία στεροειδών ορμονών ανάλογα με τα ένζυμα που υπάρχουν στους διάφορους ιστούς. Τα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων συνθέτουν και εκκρίνουν τα ανδρογόνα, όπου η ανδροστεστενεδιόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη, με τη δράση του ενζύμου 17β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση μετατρέπονται σε τεστοστερόνη. Τα ωοθηκικά κοκκιώδη κύτταρα μετατρέπουν τα ανδρογόνα σε οιστραδιόλη με τη P450

αρωματάση. Το ωχρό σωματίο και ο πλακούντας συνθέτουν και εκκρίνουν προγεστερόνη. Τα κύτταρα του Leydig των όρχεων συνθέτουν και εκκρίνουν την τεστοστερόνη [283] (Σχήμα 15).

Η έλλειψη/ανεπάρκεια του ισοενζύμου 17 β -HSD τύπου 3, προκαλεί ανωμαλία στη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης από την ανδροστενεδιόνη στους εμβρυϊκούς όρχεις και εκδηλώνεται ως μία μορφή ανδρικού ψευδοερμαφροδιτισμού. Επίσης, έχει αναφερθεί η έλλειψη των ενζύμων 17 α -υδροξυλάσης και 17-20-λυάσης στους εμβρυϊκούς όρχεις. Σε άτομα που υπάρχει έλλειψη στο ένα από αυτά τα δύο ένζυμα, δεν παράγεται τεστοστερόνη και προκαλείται ατελής αρρενοποίηση [284].

Πολλοί ιστοί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν οιστρογόνα από ανδρογόνα. Το ένζυμο αρωματάση βρίσκεται σε αρκετούς ανθρώπινους ιστούς και κύτταρα, όπως είναι τα ωθηκικά κοκκιώδη κύτταρα και η τροφοβλάστη του πλακούντα, οι ινοβλάστες του λιπώδους ιστού και του δέρματος, τα οστά, ο εγκέφαλος και καταλύει τοπικά τη μετατροπή των C(19) στεροειδών σε οιστρογόνα. Ο περιφερικός σχηματισμός των οιστρογόνων γίνεται πρωταρχικά στο λιπώδη ιστό και στο δέρμα και αυξάνεται με το βάρος του σώματος και την ηλικία. Επαρκή επίπεδα οιστραδιόλης στην κυκλοφορία του αίματος, παράγονται από την εξωαδενική αρωματοποίηση της ανδροστενεδιόνης σε οιστρόνη, η οποία μετατρέπεται σε οιστραδιόλη στους περιφερικούς ιστούς [285].

Η εξωκρινής έκφραση της αρωματάσης στο λιπώδη ιστό και στο δέρμα (προκαλεί αύξηση επιπέδων οιστραδιόλης στην κυκλοφορία του αίματος) και στα οστά, (προκαλεί αύξηση τοπικών συγκεντρώσεων οιστρογόνων) είναι υψίστης σημασίας στην ελάττωση του ρυθμού οστικής απώλειας στις εμμηνόπαυσιακές γυναίκες. Επίσης, υπερβολική ή απρόσφορη έκφραση της αρωματάσης έχει παρατηρηθεί στους ινοβλάστες του λιπώδους ιστού που περιβάλλουν τα καρκινώματα των μαστών, στα στρωματικά κύτταρα στην ενδομητρίωση και στον καρκίνο του ενδομητρίου, όπου οι συγκεντρώσεις των τοπικών οιστρογόνων είναι αυξημένες [285].

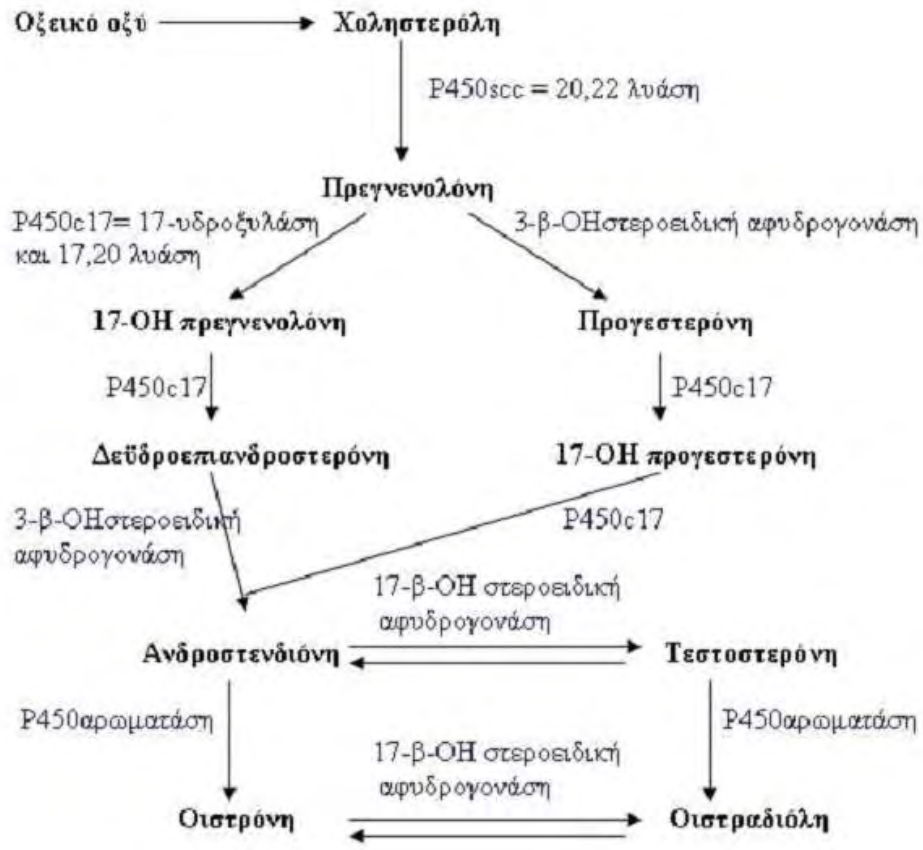
Η παραγωγή οιστρογόνων στον εγκέφαλο με τη δράση της αρωματάσης είναι σημαντική για τη ρύθμιση διαφόρων γνωστικών και υποθαλαμικών λειτουργιών [285].

Οι φυλετικές ορμόνες βρίσκονται σε αυστηρό βιοσυνθετικό έλεγχο με αρνητικούς παλίνδρομους μηχανισμούς οι οποίοι ρυθμίζουν την έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου και της

ωχρινοτρόπου ορμόνης από την υπόφυση και της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (GnRH) από τον υποθάλαμο. Χαμηλά επίπεδα φυλετικών ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος, μειώνουν την αναδραστική αναστολή στη σύνθεση της GnRH στον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα των FSH και LH, οι οποίες προσδένονται στους γοναδικούς ιστούς και ενεργοποιούν τη ενζυμική δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450_{ssc} και την επακόλουθη παραγωγή φυλετικών ορμονών μέσω cAMP and PKA ενδιάμεσων οδών [277, 286].

Το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο της σύνθεσης των στεροειδών ορμονών είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από την εξωτερική στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [287]. Η χοληστερόλη προέρχεται από χαμηλής ή υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, ή από de novo (εκ νέου) σύνθεση. Η αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη (ACTH), γνωστή και ως φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ή κορτικοτροπίνη, και οι γοναδοτροπίνες FSH και LH, αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της ελεύθερης χοληστερόλης στο κυτοσόλιο (αλυσίδα αντιδράσεων η οποία οδηγεί σε υδρόλυση των εστέρων της χοληστερόλης) και ενεργοποιούν τη μεταφορά της χοληστερόλης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [288].

Η χρονική ρύθμιση της στεροειδογένεσης γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου του ενζύμου P450_{ssc}, το οποίο αποτελεί το ενζυμικό ρυθμοκαθοριστικό στάδιο. Η οξεία ρύθμιση (acute regulation) διενεργείται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη StAR (steroidogenic acute regulatory protein) η οποία ενεργοποιεί τη μεταφορά της χοληστερόλης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μετά από πρόσδεση της χοληστερόλης στην περιοχή START της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη StAR εκφράζεται στους στεροειδοπαραγωγούς ιστούς, όταν ενεργοποιείται η διαδικασία της στεροειδογένεσης. Η ποιοτική ρύθμιση που καθορίζει την κατηγορία των στεροειδών που παράγονται, καθορίζεται από το ένζυμο P450_{c17} [289].



Σχήμα 15. Οδός βιοσύνθεσης των στεροειδών των γονάδων.

3.2.2 Τρόπος κυκλοφορίας των στεροειδών ορμονών

Τα φυλετικά στεροειδή εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και κυκλοφορούν ελεύθερα σε πολύ μικρό ποσοστό περίπου 1-3% και αποτελούν τη βιοδραστική μορφή των φυλετικών στεροειδών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των οιστρογόνων και των ανδρογόνων είναι συνδεδεμένα με τη σφαιρίνη SHBG (σφαιρίνη δεσμεύουσα τις φυλετικές ορμόνες - sex hormone-binding globulin) η οποία επηρεάζει την ιστική βιοδιαθεσιμότητα των στεροειδών ορμονών του φύλου. Η σφαιρίνη SHBG παρουσιάζει υψηλή χημική συγγένεια και χαμηλή χωρητικότητα για τη διϋδροτεστοστερόνη DHT (προέρχεται από την τεστοστερόνη με τη δράση του ενζύμου 5α-ρεδουκτάση), την τεστοστερόνη και την οιστραδιόλη. Η ικανότητα σύνδεσης της DHT με τη σφαιρίνη SHBG είναι 3,5 φορές μεγαλύτερη της ικανότητας σύνδεσης της τεστοστερόνης και οκτώ φορές μεγαλύτερη της ικανότητας σύνδεσης της οιστραδιόλης. Επίσης, όλα τα φυλετικά στεροειδή συνδέονται με την αλβουμίνη του ορού η οποία παρουσιάζει, χαμηλή χημική συγγένεια αλλά υψηλή χωρητικότητα. Η οιστραδιόλη συνδέεται με την αλβουμίνη σε υψηλότερο βαθμό από την τεστοστερόνη [290].

Επιπρόσθετα, η τεστοστερόνη συνδέεται με την τρανσκορτίνη (transcortin) ή αλλιώς σφαιρίνη που δεσμεύει κορτικοστεροειδή (CBG, Corticosteroid-binding globulin αλλά σε χαμηλό ποσοστό. Η οιστραδιόλη δεν φαίνεται να συνδέεται σημαντικά με τη σφαιρίνη CBG [291].

Η προγεστερόνη κυκλοφορεί ελεύθερη στο αίμα σε ποσοστό περίπου 2% και συνδεδεμένη με τη σφαιρίνη CBG σε ποσοστό περίπου 18% και την αλβουμίνη σε ποσοστό περίπου 80% [292]. Η σφαιρίνη CBG παρουσιάζει μεγάλη χημική συγγένεια σύνδεσης με την προγεστερόνη και την 17-υδροξυπρογεστερόνη αλλά έχει χαμηλή χωρητικότητα [290].

3.2.3 Μηχανισμοί δράσης των γοναδικών στεροειδών

3.2.3.1 Υποδοχείς

Οι φυλετικές ορμόνες συνδέονται με αντίστοιχους υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα των κυττάρων στόχων. Οι υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, είναι κυρίως ενδοκυτταρικοί και επάγουν τη μεταγωγή του σήματος και τις αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων [293-295].

3.2.3.1.1 Υποδοχείς προγεστερόνης

Η προγεστερόνη συνδέεται με τους ενδοκυτταρικούς ή πυρηνικούς υποδοχείς PR (PR-A (94 kDa), PR-B (116 kDa) και PR-C (60 kDa) προκειμένου να ασκήσει γονιδιακή δράση [296]. Οι πυρηνικοί υποδοχείς της προγεστερόνης αποτελούνται από τρεις λειτουργικές περιοχές, την N-τελική περιοχή, την περιοχή DBD (DNA-binding domain) η οποία συνδέεται με το DNA και την C-τελική περιοχή η οποία συνδέεται με το σηματοδότη (LBD, Ligand-binding domain). Η N-τελική περιοχή είναι απαραίτητη για την πλήρη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα και για άλλες κυτταρικές και γονιδιακές δράσεις. Η περιοχή LBD είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση προγεστερόνης και των heat shock πρωτεϊνών [297] και αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον παράγοντα NF-κB και την πρωτεΐνη AP-1 (activator protein-1) [298].

Οι πυρηνικοί υποδοχείς της προγεστερόνης εκφράζονται στη μήτρα, στις ωοθήκες, στον πλακούντα, στους μαστικούς αδένες, στον προστάτη, στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα, στην υπόφυση, στον υποθάλαμο και στα οστά [299].

Η προγεστερόνη ενεργοποιεί κυτταρικές αντιδράσεις χωρίς την εμπλοκή των μεταγραφικών ρυθμιστικών λειτουργιών των υποδοχέων της προγεστερόνης, είτε μέσω ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών καταρρακτών φωσφορυλίωσης [300, 301] ή με αλληλεπίδραση με υποδοχείς που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στην πλασματική μεμβράνη [302, 303]. Οι υποδοχείς της προγεστερόνης που είναι συνδεδεμένοι στην πλασματική μεμβράνη βρίσκονται στα ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα [304], στα ηπατοκύτταρα [305], στα εγκεφαλικά κύτταρα [306], στους μαστικούς αδένες [307], στις ωοθήκες [308], στα κοκκιώδη κύτταρα [309] και στα σπερματοζωάρια [310, 311].

Η αναλογία των PR-A και PR-B διαφέρει στους αναπαραγωγικούς ιστούς ως αποτέλεσμα της αναπτυξιακής και ορμονικής κατάστασης του ατόμου. Οι PR-A και PR-B παρουσιάζουν παρόμοια ικανότητα σύνδεσης με το DNA και τους σηματοδότες, αλλά διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες ενεργοποίησης [312]. Ο PR-A είναι λιγότερο δραστικός από τον PR-B όσον αφορά την ενεργοποίηση της μεταγραφής και είναι ο ισχυρότερος αναστολέας του PR-B [313]. Ο PR-C έχει σταθερά διάστασης (kDa) πέντε φορές υψηλότερη από τους PR-A και PR-B. Ο PR-A ενισχύει την μεταγραφική δραστηριότητα των μεγαλύτερων PR πρωτεϊνών [296].

3.2.3.1.2 Υποδοχείς οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα για την άσκηση της δράσης τους συνδέονται με τους υποδοχείς ERα και ERβ οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα των κυττάρων. Ο κλασικός μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει τη σύνδεση τους με τον υποδοχέα, το διμερισμό του υποδοχέα, τη μετακίνηση του συμπλόκου στον πυρήνα και την πρόσδεση του σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA οι οποίες ονομάζονται περιοχές απόκρισης οιστρογόνων (Estrogen Response Elements (EREs) και βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Οι ERs έχουν την ικανότητα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης χωρίς την άμεση σύνδεση στο DNA, μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης αλληλεπιδρώντας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται στο DNA [314]. Τα οιστρογόνα και κυρίως η 17β-οιστραδιόλη (E2) συνδέονται με τους ERα και ERβ, οι οποίοι εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό στους ίδιους ιστούς και σε διαφορετικούς ιστούς [315].

3.2.3.2 Μηχανισμοί σηματοδότησης της οιστραδιόλης (E2)

Οι βιολογικές δράσεις της οιστραδιόλης διενεργούνται μέσω τουλάχιστον τεσσάρων οδών σηματοδότησης (Σχήμα 16):

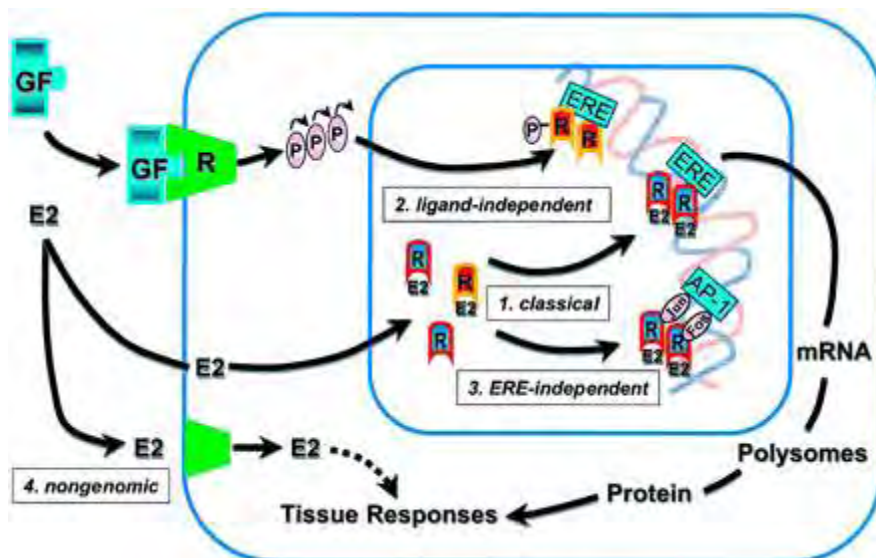
α) Εξαρτώμενες δράσεις από το συνδέτη. Τα σύμπλοκα E2-ER συνδέονται με τις περιοχές απόκρισης στα οιστρογόνα, στους υποκινητές στόχους, προκαλούν θετική και αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και ακολούθως την ιστική απάντηση [315].

β) Ανεξάρτητες δράσεις από το συνδέτη. Αυξητικοί παράγοντες ή η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ενεργοποιούν ενδοκυτταρικές κινάσες, οι οποίες οδηγούν σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των υποδοχέων οιστρογόνων οι οποίοι ακολούθως συνδέονται με τις περιοχές σύνδεσης των υποκινητών διαφόρων γονιδίων χωρίς την παρουσία του συνδέτη [315].

γ) Ανεξάρτητες δράσεις από τα EREs. Τα σύμπλοκα E2-ER μεταβάλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων που περιέχουν εναλλακτικές περιοχές σύνδεσης όπως στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (activator protein-1). Τα σύμπλοκα E2-ER συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες συνδεδεμένους με DNA (proto-oncogene Fos/ protein Jun). Οι

μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί, συνδέουν τον ενεργοποιημένο υποδοχέα οιστρογόνων με το DNA και ασκούν ανιούσα/θετική ρύθμιση στην έκφραση του γονιδίου [315].

δ) Σηματοδότηση μη γονιδιακή. Η οιστραδιόλη ενεργοποιεί ένα υποτιθέμενο σημείο πρόσδεσης/σύνδεσης στην κυτταρική μεμβράνη και ο υποδοχέας οιστρογόνων συνδέεται με ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και προκαλεί κυτταρικές ενέργειες [315]. Για παράδειγμα τα οιστρογόνα συνδέονται με τον υποδοχέα GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) ή GPR30 ο οποίος είναι ενδοκυτταρικός διαμεμβρανικός υποδοχέας και βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο [316]. Ο υποδοχέας GPER συνδέεται με τα οιστρογόνα και προκαλεί κινητοποίηση του ασβεστίου και σύνθεση της τριφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP_3). Ο υποδοχέας αυτός διαμεσολαβεί στη μη γονιδιακή σηματοδότηση και δράση των οιστρογόνων στους ιστούς [317]. Η έκφραση των ERα και ERβ στους διαφόρους ιστούς έχει μελετηθεί εκτενώς σε ανθρώπινους ιστούς από ενήλικα άτομα.



Σχήμα 16. Μηχανισμοί δράσης της οιστραδιόλης και των υποδοχέων οιστρογόνων [315].

Συνομογραφίες: Classical= κλασσική (οδός); Ligand independent= ανεξάρτητη συνδέτη (οδός); ERE-Independent= ανεξάρτητη (οδός) περιοχών απόκρισης οιστρογόνων; Non genomic= μη

γονιδιακή (οδός); Polysomes= πολυσώματα, πολυριβοσώματα; Protein= πρωτεΐνη; Tissue responses= αποκρίσεις ιστών.

3.2.3.3 Υποδοχέας Ανδρογόνων

Τα ανδρογόνα συνδέονται με τον υποδοχέα AR προκειμένου να ασκήσουν βιολογικές δράσεις. Οι υποδοχείς AR μετά τη σύνδεση τους με τα ανδρογόνα, διμερίζονται και ασκούν μεταγραφική γονιδιακή δράση [295]. Επιπρόσθετα, οι AR ασκούν μη γονιδιακή δράση συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του ελεύθερου ενδοκυτταρικού ασβεστίου, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και της μιτογόνο-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) [318].

Η ελεύθερη τεστοστερόνη μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου του ιστού στόχου, όπου συνδέεται με τον υποδοχέα ανδρογόνων ή μετατρέπεται σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη (DHT) από το ένζυμο 5α-αναγωγάση. Η DHT προσδένεται στον ίδιο υποδοχέα ανδρογόνων πολύ ισχυρότερα από την τεστοστερόνη. Μετά την πρόσδεση στους υποδοχείς, οι ορμόνες αυτές εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου και προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του χρωμοσωμικού DNA. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται περιοχές ορμονικής απόκρισης (HREs Hormone Response Elements) και ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων [319]. Για παράδειγμα, η τεστοστερόνη αφού εισέλθει στα κύτταρα του προστάτη (λίγα λεπτά μετά την έκκριση της), μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη και ενώνεται με τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα. Στη συνέχεια το σύμπλοκο μεταναστεύει στον πυρήνα, συνδέεται με τις HREs περιοχές και προκαλεί την πυροδότηση μηχανισμού έναρξης μεταγραφής DNA-RNA. Εντός του διαστήματος των τριάντα λεπτών, η συγκέντρωση RNA στα κύτταρα αρχίζει να αυξάνει και η αύξηση της ακολουθείται από προοδευτική αύξηση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Έπειτα από μερικές ημέρες παρατηρείται αύξηση στην ποσότητα του DNA του προστάτη καθώς και ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των κυττάρων του [277, 319]. Για τους παραπάνω λόγους θεωρείται ότι η τεστοστερόνη διεγείρει σημαντικά τη σύνθεση πρωτεϊνών γενικά, αν και πιο συγκεκριμένα αυξάνει τις πρωτεΐνες σε όργανα ή ιστούς-στόχους υπεύθυνους για την ανάπτυξη των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου [319].

Οι υποδοχείς ανδρογόνων υπάρχουν σε διάφορα συστήματα ιστών του σώματος και στα δύο φύλα. Τα διαφορετικά επίπεδα τεστοστερόνης που υπάρχουν προγεννητικά, στην εφηβεία και σε όλη τη διάρκεια της ζωής καθορίζουν τις βιολογικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών [319].

Οι υποδοχείς των ανδρογόνων εκφράζονται στον προστάτη, στην επιδιδυμίδα, στους όρχεις, στη μήτρα, στον κόλπο, στο μαστικό αδένα, στο δέρμα, στους σκελετικούς μύες, στο μυοκάρδιο, στους πνεύμονες (άνδρες), στον οισοφάγο, στο στομάχι, στο κόλον, στο ήπαρ, στα νεφρά, στους σιαλογόνους αδένες, στην ουροδόχο κύστη (άνδρες), στο θυρεοειδή αδένα (άνδρες), στα επινεφρίδια (άνδρες), στο θύμο αδένα και στο πάγκρεας (γυναίκες) [320].

3.3 Θέσεις παραγωγής και επίπεδα των ωοθηκικών ορμονών-Αναπαραγωγικό σύστημα

3.3.1 Προγεστερόνη

Η προγεστερόνη είναι στεροειδής ορμόνη και ασκεί σημαντική δράση στον γυναικείο καταμήνιο κύκλο, στην εγκυμοσύνη (υποβοηθά την κύηση) και στην εμβρυογένεση τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλα είδη. Επίσης, ανήκει στην κατηγορία των προγεσταγόνων και είναι το μείζων απαντώμενο προγεσταγόνο στον άνθρωπο. Η προγεστερόνη συντίθεται από την πρεγνενολόνη η οποία προέρχεται από τη χοληστερόλη [277] (Σχήμα 15).

Στις γυναικείο φύλο, όλη σχεδόν η προγεστερόνη της μη εγκύου γυναίκας εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο στη διάρκεια του δεύτερου μισού του ωοθηκικού κύκλου: τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι σχετικά χαμηλά κατά τη διάρκεια της προωορρηκτικής φάσης του γυναικείου καταμήνιου κύκλου (<2 ng/ml), αυξάνονται μετά την ωορρηξία (>5 ng/ml) και κορυφώνονται στην εκκριτική φάση. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η ορμόνη παράγεται αρχικά από το ωχρό σωματίο και μετά την όγδοη εβδομάδα παράγεται από τον πλακούντα σε ποσότητα περίπου 250mg την ημέρα. Μετά τον τοκετό και κατά τη διάρκεια της γαλουχίας τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι πολύ χαμηλά [277].

Σχετικά χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης υπάρχουν στα παιδιά και στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες [321]. Οι ενήλικοι άνδρες έχουν παρόμοια επίπεδα προγεστερόνης με τις γυναίκες κατά την παραγωγική φάση του καταμήνιου κύκλου (Πίνακας 1).

Η προγεστερόνη, εκτός από την πρωτογενή δράση της (μέσω των ενδοκυττάρων υποδοχέων προγεστερόνης) [296], ασκεί και ισχυρή ανταγωνιστική δράση στους υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών, στους οποίους προσδένεται/συνδέεται με μεγαλύτερη χημική συγγένεια από την αλδοστερόνη, την κορτιζόλη και την κορτικοστερόνη [322].

Οι φυσιολογικές δράσεις της προγεστερόνης ενισχύονται από την παρουσία οιστρογόνων τα οποία μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων της ορμόνης [323]. Αυξημένα επίπεδα προγεστερόνης μειώνουν την συγκράτηση νατρίου από την αλδοστερόνη οδηγώντας σε νατριούρηση και μείωση του όγκου του εξωκυττάρου υγρού. Αντίθετα, μειωμένα επίπεδα προγεστερόνης σχετίζονται με προσωρινή κατακράτηση νατρίου (μειωμένη νατριούρηση και αυξημένο όγκο εξωκυττάρου υγρού) λόγω της αντισταθμιστικής αύξησης στην παραγωγή αλδοστερόνης εξαιτίας του αποκλεισμού των υποδοχέων των αλατοκορτικοειδών από την προγεστερόνη [324].

Πίνακας 1.

Φυσιολογικά επίπεδα προγεστερόνης στο αίμα	
Γυναίκες: παραγωγική φάση	0,1-0,7 ng/ml
Γυναίκες: ωορρηξία	0,2-6,3 ng/ml
Γυναίκες: εκκριτική φάση	5-30 ng/ml
Γυναίκες: εμμηνόπαυση	0,12-0,25 ng/ml
Άνδρες:	0,2-1,4 ng/ml

3.3.2 Οιστρογόνα-Οιστραδιόλη

Τα οιστρογόνα βρίσκονται στο γυναικείο και ανδρικό φύλο, αλλά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες υπάρχουν στις γυναίκες κατά την αναπαραγωγική ηλικία.

Σε υγιείς μη έγκυες γυναίκες, οι μεγαλύτερες ποσότητες οιστρογόνων εκκρίνονται από τις ωοθήκες, κυρίως από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και το ωχρό σωματίο. Μικρές ποσότητες οιστρογόνων εκκρίνονται από το ήπαρ, το φλοιό των επινεφριδίων και τους μαστούς. Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης τεράστιες ποσότητες οιστρογόνων, έως 100 φορές μεγαλύτερες από τις ποσότητες που εκκρίνουν οι ωοθήκες στη διάρκεια του φυσιολογικού καταμήνιου κύκλου, εκκρίνονται από τον πλακούντα [277, 319]. Οιστρογόνα παράγονται επίσης από τα λιποκύτταρα [325] γεγονός που συνδέεται με τον αυξημένο κίνδυνο υπογονιμότητας στα παχύσαρκα και λιποβαρή άτομα [326].

Η βιοσύνθεση των οιστρογόνων αρχίζει στα κύτταρα του πρωτογενούς ωοθυλακίου κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τους, στο ωχρό σωματίο, και στον πλακούντα, με την σύνθεση ανδροστενεδιόνης από χοληστερόλη (Σχήμα 15). Η ανδροστενεδιόνη είναι ουσία με μέτρια ανδρογονική δραστηριότητα. Στην ωοθήκη, συντίθεται στα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου. Η ορμόνη αυτή διαπερνά το βασικό υμένα και εισέρχεται στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας, όπου μετατρέπεται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη είτε κατ' ευθείαν είτε μέσω μετατροπής της σε τεστοστερόνη. Η διεργασία αυτή εκτελείται από το ένζυμο αρωματάση (Σχήμα 15). Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) διεγείρει την παραγωγή οιστρογόνων στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών. Η παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη) στα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων απαιτεί διέγερση από την ωχρινότροπο ορμόνη (LH). Τα ανδρογόνα μετατρέπονται σε οιστρογόνα με την επίδραση του ενζύμου αρωματάση και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο ωοθυλακικό υγρό [277, 319].

Τουλάχιστον έξι διαφορετικά φυσικά οιστρογόνα έχουν απομονωθεί από το πλάσμα της γυναίκας, από τα οποία όμως μόνο τρία υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες: η β-οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη. Η οιστρογονική ισχύς της 17β-οιστραδιόλης είναι 12 φορές μεγαλύτερη της οιστρόνης και 80 φορές πιο μεγάλη της οιστριόλης. Επειδή η οιστρογονική

δράση της είναι πολλαπλάσια από τη δράση των δύο άλλων, ως κύριο οιστρογόνο θεωρείται η β-οιστραδιόλη [277, 319].

Η οιστραδιόλη (E₂) είναι η κυρίαρχη μορφή στις μη έγκυες γυναίκες, η οιστρόνη (E₁), παράγεται κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης και η οιστριόλη (E₃) είναι το πρωταρχικό οιστρογόνο στην εγκυμοσύνη. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με τα υψηλότερα επίπεδα πριν την ωορρηξία (Πίνακας 2). Από την εμμηναρχή μέχρι την εμμηνόπαυση το πρωταρχικό οιστρογόνο αποτελεί η 17β-οιστραδιόλη [277, 319].

Πίνακας 2.

Φυσιολογικά επίπεδα οιστραδιόλης στο αίμα	
Γυναίκες: παραγωγική φάση	30-100 pg/ml
Γυναίκες: ωορρηξία	100-500 pg/ml
Γυναίκες: εκκριτική φάση	50-250 pg/ml
Γυναίκες: εμμηνόπαυση	<55 pg/ml
Άνδρες:	13,5-59,5 pg /ml

3.3.2.1 Βιολογικές δράσεις των ωοθηκικών ορμονών

Οι δύο κατηγορίες των ωοθηκικών ορμονών είναι τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη (ωχρίνη). Τα οιστρογόνα διεγείρουν κυρίως τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση συγκεκριμένων κυττάρων του οργανισμού και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των περισσότερων από τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του γυναικείου φύλου. Αντίθετα, η προγεστερόνη σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με την τελική προετοιμασία της μήτρας για την εγκυμοσύνη και την προετοιμασία των μαστών για τη γαλουχία [277].

3.3.2.1.1 Επίδρασεις των οιστρογόνων στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

1) Επίδραση στα γεννητικά όργανα. Κατά την παιδική ηλικία εκκρίνονται ελάχιστες ποσότητες οιστρογόνων, αλλά από την εφηβεία και μετά η ποσότητα που εκκρίνεται υπό την επίδραση των γοναδοτροφινών της υπόφυσης είναι εικοσαπλάσια και μεγαλύτερη. Την περίοδο αυτή, τα γεννητικά όργανα μετατρέπονται από παιδικά σε γεννητικά όργανα ενήλικης γυναίκας. Επιπλέον προκαλούν υπερπλασία του ενδομητρίου και ανάπτυξη των αδένων του, που αργότερα θα βοηθήσουν στη θρέψη του ωαρίου μετά την εμφύτευση του στο ενδομήτριο [277].

2) Επίδραση στους μαστούς. Τα οιστρογόνα προκαλούν εναπόθεση λίπους στους μαστούς, ανάπτυξη των ιστών του υποστρώματος τους και αύξηση και επέκταση του συστήματος των πόρων τους. Τα αδενικά λοβία και οι αδενοκυψέλες αναπτύσσονται σε περιορισμένη έκταση, αφού η αποφασιστική αύξηση και οι λειτουργίες τους γίνονται κάτω από την επίδραση της προγεστερόνης και της προλακτίνης [277].

3) Επίδραση στο σκελετό. Τα οιστρογόνα αυξάνουν την οστεοβλαστική δραστηριότητα. Το ύψος των κοριτσιών όταν εισέρχονται στην αναπαραγωγική ηλικία, αυξάνει γρήγορα και τερματίζεται νωρίτερα από των ανδρών λόγω της πρόωμης σύγκλεισης των επιφύσεων των μακρών οστών που προκαλείται από τα οιστρογόνα [277].

4) Επίδραση στην εναπόθεση λίπους. Τα οιστρογόνα αυξάνουν την εναπόθεση λίπους στον υποδόριο ιστό, στους γλουτούς και στους μηρούς αυξάνοντας έτσι την απόσταση λεκάνης-ισχύων που χαρακτηρίζει το γυναικείο σώμα [277].

5) Επίδραση στο δέρμα. Η αγγείωση του δέρματος αυξάνεται περισσότερο υπό την επίδραση των οιστρογόνων με αποτέλεσμα οι τομές του δέρματος να αιμορραγούν περισσότερο στις γυναίκες από ότι στους άνδρες [277].

Τα οιστρογόνα στους άνδρες ρυθμίζουν συγκεκριμένες λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, σημαντικές για την ωρίμανση του σπέρματος [327-329] και είναι συνδεδεμένα με κανονική σεξουαλική επιθυμία [330-332].

Τα οιστρογόνα ασκούν προστασία στο αγγειακό τοίχωμα, ενάντια στο τραύμα και την αθηροσκλήρωση [332]. Μελέτες έχουν δείξει, ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν την αγγειοδιαστολή

και αναστέλλουν την φλεγμονώδη απόκριση του ενδοθηλίου και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, μέσω της συνθάσης της προστακυκλίνης και της συνθάσης του NO, ενεργοποιώντας την παραγωγή του ενδοθηλιακού NO μέσω του μονοπατιού της PI3K-Akt [333].

Ο υποδοχέας ERα έχει αναγνωριστεί στο ενδοθήλιο και στα λεία μυϊκά κύτταρα, καθώς και στο μυοκάρδιο ανδρών και γυναικών. Οι δράσεις των οιστρογόνων μέσω των υποδοχέων αυτών, περιλαμβάνουν κυρίως την επιτάχυνση της ανάκαμψης του ενδοθηλίου μετά από φλεγμονή και την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Επίσης, τα οιστρογόνα διαθέτουν αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, προκαλούν ευνοϊκές μεταβολές στα επίπεδα της χοληστερόλης και ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και την αντιοξειδωση [332]. Πρόσφατες παρατηρήσεις ερευνητών υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μέσω των ERα υποδοχέων αυξάνουν την θειο-ζυλίωση των πρωτεϊνών ασκώντας προστατευτική δράση στο αγγειακό τοίχωμα [334].

Μία από τις κυριότερες διαφορές μεταξύ οιστρογόνων και τεστοστερόνης είναι ότι οι επιδράσεις των πρώτων αφορούν σχεδόν αποκλειστικά ορισμένα όργανα στόχους όπως είναι η μήτρα, οι μαστοί, ο σκελετός και ορισμένες περιοχές με αυξημένη εναπόθεση λίπους, ενώ η τεστοστερόνη επιδρά πιο γενικευμένα, σε όλο τον οργανισμό.

3.3.2.1.2 Επίδραση της λιπονεκτίνης στην στεροειδογένεση από τα κύτταρα του ωοθυλακίου

Πειραματικές παρατηρήσεις σε ζώα δείχνουν ότι η λιπονεκτίνη δρώντας τοπικά στο ωοθυλάκιο επηρεάζει την στεροειδογένεση. Υποδοχείς λιπονεκτίνης εκφράζονται στα κύτταρα του ωοθυλακίου [335]. Στην μελέτη που διεξήχθη από τη Maleszka και συν. σε καλλιέργειες κυττάρων από χοίρους, η λιπονεκτίνη επηρέασε την βασική έκκριση της προγεστερόνης από κύτταρα του ωχρού σωματίου, της οιστραδιόλης από τα κοκκιώδη κύτταρα και της τεστοστερόνης από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα, η έκκριση της προγεστερόνης μειώθηκε μετά από επίδραση της λιπονεκτίνης στα κύτταρα του ωχρού σωματίου στο μέσο της εκκριτικής φάσης. Αυξημένη παραγωγή προγεστερόνης παρατηρήθηκε στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων και ελαττωμένη παραγωγή στα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων. Η λιπονεκτίνη ασκούσε παρεμποδιστική δράση στη βασική παραγωγή της

τεστοστερόνης και την επαγόμενη από την ινσουλίνη έκκριση της ανδροστενεδιόνης αλλά ενίσχυσε την απελευθέρωση ανδροστενεδιόνης παρουσία LH και ινσουλίνης [335].

Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη λιπονεκτίνη προκάλεσε αύξηση της προκαλούμενης από τον ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα I (IGF-I, insulin-like growth factor I) έκκρισης της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης σε *in vitro* δοκιμές σε ανθρώπινα αρχέγονα κοκκιώδη κύτταρα, χωρίς να επηρεάσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βασική στεροειδογένεση που επάγει ο IGF-I (μη IGF-1 ή FSH ενεργοποίηση). Η συγκεκριμένη δράση της λιπονεκτίνης σχετιζόταν με αυξημένα επίπεδα της p450 αρωματάσης. Επίσης, η λιπονεκτίνη προκάλεσε ταχύτατη ενεργοποίηση των MAPK, ERK1/2 και της p38 φωσφορυλίωσης στα ανθρώπινα αρχέγονα κοκκιώδη κύτταρα [336].

3.3.3 Τεστοστερόνη

Η τεστοστερόνη εκκρίνεται κυρίως από τους όρχεις στους άνδρες και τις ωοθήκες στις γυναίκες, όπου η ανδροστεστενεδιόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη με τη δράση του ενζύμου 17β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση μετατρέπονται σε τεστοστερόνη (Σχήμα 15). Μικρές ποσότητες της ορμόνης εκκρίνονται από τα επινεφρίδια των δύο φύλων και από τον πλακούντα. Η τεστοστερόνη λόγω της δραστηριότητάς της, αλλά και της μεγάλης συγκέντρωσής της θεωρείται η κυρίως υπεύθυνη ορμόνη για τις αρρενοποιητικές ορμονικές επιδράσεις (Πίνακας 3). Συγκεκριμένα, η τεστοστερόνη παράγεται από τα κύτταρα Leydig, τα οποία βρίσκονται στους διάμεσους χώρους των σπερματικών σωληναρίων των όρχεων [277].

Μεγάλο μέρος της ορμόνης στους ιστούς μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη η οποία αποτελεί τη μορφή με την οποία η τεστοστερόνη εκτελεί πολλές από τις ενδοκυττάρειες λειτουργίες της. Καταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, σε ανδροστερόνη και δεϋδροεπιανδροστερόνη που αποβάλλονται, συνδεδεμένες με γλυκουρονίδια και θειικές ενώσεις, στα κόπρανα (με τη χολή) ή στα ούρα [277].

Στους άνδρες η ωχρινότροπος ορμόνη διεγείρει την παραγωγή της τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig. Η τεστοστερόνη εκκρίνεται στο πλάσμα ή μεταφέρεται στα κύτταρα Sertoli [290] όπου ο Δ4 διπλός δεσμός του μορίου της ανάγεται και σχηματίζεται διϋδροτεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη και η διϋδροτεστοστερόνη μεταφέρονται στην κυκλοφορία συνδεδεμένες με

την δεσμευτική πρωτεΐνη του φύλου (SHBG). Επίσης, η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη, τοπικά, σε διάφορους ιστούς στόχους. Η διϋδροτεστοστερόνη είναι η περισσότερο ισχυρή ανδρική ορμόνη, 10 φορές ισχυρότερη από την τεστοστερόνη, για αυτό και από ορισμένους η τεστοστερόνη θεωρείται προορμόνη [319].

Πίνακας 3.

Φυσιολογικά επίπεδα τεστοστερόνης στο αίμα
Άνδρες: 2,8-8 ng/ml
Γυναίκες: 0,1-0,8 ng/ml

3.3.3.1 Επιδράσεις των ανδρογόνων στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου

Γενικά η τεστοστερόνη ευθύνεται για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του άνδρα. Κατά την εμβρυϊκή περίοδο οι όρχεις διεγείρονται από τη χοριακή γοναδοτροπίνη του πλακούντα και παράγουν μικρή ποσότητα τεστοστερόνης, ενώ κατά την παιδική ηλικία και μέχρι τα 10-13 έτη περίπου, δεν παράγεται ουσιαστικά καθόλου τεστοστερόνη. Με την έναρξη της εφηβείας, η παραγωγή τεστοστερόνης αυξάνει γρήγορα και διαρκεί περίπου μέχρι την ηλικία των 40 ετών, όπου αρχίζει να μειώνεται για να φτάσει ίσως στο 1/5 της μέγιστης τιμής της στην ηλικία των 80 ετών [277].

Τα ανδρογόνα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών του ανδρικού φύλου, στην οποία περιλαμβάνονται η ανάπτυξη πέους και όσχεου, του προστάτη, των σπερματοδόχων κύστεων και των γεννητικών πόρων του άνδρα. Επίσης, επιδρούν στην κάθοδο των όρχεων στο όσχεο κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων μηνών της κύησης [277].

Τα ανδρογόνα κατά την εφηβεία προκαλούν την αύξηση του μεγέθους των έξω γεννητικών οργάνων του άρρενος και την εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου [277].

Ειδικότερα οι επιδράσεις στους άρρενες είναι: 1) Κατανομή των τριχών του σώματος. Η τεστοστερόνη προκαλεί ανάπτυξη τριχοφυΐας στο εφηβιαίο, στο πρόσωπο, συνήθως στο θώρακα και λιγότερο συχνά σε άλλες περιοχές του σώματος (π.χ. ράχη) [277, 337]. Αντίθετα, η τεστοστερόνη μειώνει την ανάπτυξη της τριχοφυΐας της κεφαλής, προκαλώντας αλωπεκία [277].

2) Επίδραση στη φωνή. Η τεστοστερόνη προκαλεί υπερτροφία του λαρυγγικού βλεννογόνου και αύξηση του μεγέθους του λάρυγγα. Οι επιδράσεις αυτές προκαλούν την εμφάνιση μίας αρχικά τραχείας φωνής η οποία μεταβάλλεται βαθμιαία στην τυπική βαριά ανδρική φωνή [277].

3) Επίδραση στο δέρμα. Η τεστοστερόνη αυξάνει το πάχος του δέρματος όλου του σώματος και τη σκληρότητα των υποδόριων ιστών [277].

4) Επίδραση στη σύνθεση πρωτεϊνών και στη μυϊκή ανάπτυξη. Ένα από τα σημαντικότερα ανδρικά χαρακτηριστικά είναι η μεγάλη μυϊκή ανάπτυξη από την εφηβεία και μετά [277, 337]. Η ανάπτυξη αυτή συνοδεύεται από την αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Πολλές από τις μεταβολές που παρατηρούνται στο δέρμα οφείλονται στην εναπόθεση πρωτεϊνών, ενώ οι αλλαγές της φωνής είναι αποτέλεσμα κατά ένα μέρος τουλάχιστον της αναβολικής δράσης της τεστοστερόνης στις πρωτεΐνες [277].

5) Επίδραση στην αύξηση των οστών και την κατακράτηση ασβεστίου. Μετά από την εφηβεία ή μετά από μακροχρόνια χορήγηση τεστοστερόνης, το πάχος των οστών καθώς και η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου σε αυτά, αυξάνουν σημαντικά. Η τεστοστερόνη αυξάνει τη συνολική ποσότητα του οστικού υποστρώματος και προκαλεί κατακράτηση ασβεστίου. Υποστηρίζεται ότι η αύξηση του υποστρώματος των οστών οφείλεται στη γενική αναβολική επίδραση της τεστοστερόνης στις πρωτεΐνες. Σε παιδιά στα οποία εκκρίνονται μεγάλες ποσότητες τεστοστερόνης (ή άλλου ανδρογόνου), ο ρυθμός της αύξησης των οστών επιταχύνεται σημαντικά προκαλώντας μεγάλη ώθηση στη γενική αύξηση του σώματος. Η τεστοστερόνη προκαλεί έμμεσα, με τη μετατροπή της σε οιστραδιόλη, συνένωση των επιφύσεων των μακρών οστών, και τερματισμό της ανάπτυξης. Αυτό συμβαίνει βαθμιαία και αργότερα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες [277].

6) Επίδραση στα ερυθροκύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα του μέσου άνδρα είναι περίπου 700000/mm³ περισσότερα από της μέσης γυναίκας. Ωστόσο, η διαφορά αυτή είναι δυνατό να οφείλεται

κατά ένα μέρος στην αύξηση του ρυθμού του μεταβολισμού μετά τη χορήγηση τεστοστερόνης και όχι στην άμεση επίδραση της στην παραγωγή ερυθροκυττάρων [277].

Οι επιδράσεις της τεστοστερόνης στους ενήλικες είναι περισσότερο εμφανείς στους άνδρες από ότι στις γυναίκες. Είναι εξίσου σημαντικές για τα δύο φύλα και φθίνουν κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών της ζωής. Στις επιδράσεις αυτές περιλαμβάνονται: πνευματική και φυσική ενέργεια, διατήρηση της μυϊκής μάζας, σεξουαλική επιθυμία κτλ [277]. Η τεστοστερόνη επηρεάζει επίσης τον εγκέφαλο, όπου μετατρέπεται σε οιστραδιόλη και ασκεί αρρενοποιητική δράση στα αρσενικά έμβρυα. Ο εγκέφαλος στο αρσενικό φύλο έχει μεγαλύτερο όγκο, όμως το μεσολόβιο σωματίο είναι αναλογικά μεγαλύτερο στο θηλυκό φύλο[338].

Επειδή τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι συχνότερα στους άρρενες υπάρχει η αντίληψη ότι για αυτό ευθύνονται τα ανδρογόνα. Τα δεδομένα από παλαιότερες σχετικά με το ρόλο της τεστοστερόνης στην καρδιαγγειακή λειτουργία ήταν αντιφατικά. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι δεν ευθύνονται για την αυξημένη συχνότητα των καρδιαγγειακών νοσημάτων στους άνδρες. Αντίθετα η διατήρηση φυσιολογικών κανονικά επιπέδων της τεστοστερόνης σε ηλικιωμένους άνδρες συνδέεται με βελτίωση πολλών παραμέτρων όπως το ενδοκοιλιακό λίπος, τα επίπεδα της χοληστερόλης και τα επίπεδα γλυκόζης που συνοδεύονται από μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [339].

3.3.3.2 Σχέση επιπέδων τεστοστερόνης-ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη τύπου 2

Η συγκέντρωση της ολικής τεστοστερόνης σχετίζεται αρνητικά στους άνδρες και θετικά στις γυναίκες με την αντίσταση στην ινσουλίνη [340, 341]. Χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης στους άνδρες και υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης στις γυναίκες σχετίζονται με ινσουλινοαντίσταση. Επίσης, η συγκέντρωση της ολικής τεστοστερόνης σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση της ινσουλίνης στην κυκλοφορία στους άνδρες [342]. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης αποτελούν πρόδρομο παράγοντα για την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη τύπου 2 σε υγιείς άνδρες [341, 343, 344]. Χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης παρατηρούνται πιο συχνά σε διαβητικά άτομα [345-347] και ο κλινικός υπογοναδισμός φαίνεται να σχετίζεται με το διαβήτη τύπου 2 [348]. Η χορήγηση τεστοστερόνης σε υπογοναδικούς άνδρες με διαβήτη τύπου 2 βελτίωσε τα επίπεδα γλυκόζης στο

αίμα και μείωσε την αντίσταση στην ινσουλίνη [349, 350]. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η χορήγηση τεστοστερόνης μείωνε άμεσα το σπλαχνικό λίπος, αφού η μείωση της περιφέρειας της μέσης είχε άμεση επίδραση στη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία και στην ινσουλινοαντίσταση. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί είναι η ελαττωμένη πρόσληψη τριγλυκεριδίων από τα λιποκύτταρα λόγω της παρεμπόδισης που ασκεί η τεστοστερόνη στο ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση [351], και η αντιφλεγμονώδης δράση της τεστοστερόνης, η οποία καταστέλλει τις κυτταροκίνες που φαίνονται να εμπλέκονται στην ινσουλινοαντίσταση [352]. Χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης σχετίζονται με μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια των μυών [353].

Η υπόθεση της αλληλένδετης σχέσης -υπογοναδισμού-παχυσαρκίας [354] δέχεται ότι η τεστοστερόνη μεταβολίζεται σε 17β-οιστραδιόλη από το ένζυμο αρωματάση στα λιποκύτταρα. Στον υπογοναδισμό, τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης επιτρέπουν εντονότερη δραστηριότητα του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση με συνεπακόλουθο αυξημένη πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων και αποθήκευση τους με τη μορφή τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται μάζα του λιπώδους ιστού του σώματος, η οποία συνδέεται με αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη και μεγαλύτερο καταβολισμό της τεστοστερόνης. Είναι γνωστό ότι η τεστοστερόνη προάγει την προαγωγή των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε μυϊκά κύτταρα και εμποδίζει τη λιπογένεση. Αντίθετα, σε έλλειψη της τεστοστερόνης προάγεται ο πολλαπλασιασμός των λιποκυττάρων [355, 356].

Η υπόθεση της αλληλένδετης σχέσης υπογοναδισμού-παχυσαρκίας-λιποκυτταροκινών υποστηρίζει ότι η 17β-οιστραδιόλη και οι κυτταροκίνες: ιντερλευκίνη-6, παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNFα) και λεπτίνη, εμποδίζουν την υποθαλαμο-υποφυσιο-ορχική απόκριση στην υποτεστοστεροναιμία. Αυτό εξηγεί το ότι οι παχύσαρκοι άνδρες έχουν χαμηλά ή κανονικά επίπεδα γοναδοτροφινών παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης τεστοστερόνης στο αίμα [357].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Φυλετικός διμορφισμός της λιπονεκτίνης

Τα επίπεδα της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος παρουσιάζουν φυλετικό διμορφισμό, με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ολικής λιπονεκτίνης και ΗΜW λιπονεκτίνης στο γυναικείο φύλο σε σχέση με το ανδρικό, τόσο στο ανθρώπινο είδος [358, 359] όσο και στα τρωκτικά [360-362]. Αντίθετα, τα επίπεδα των ΜΜW και ΛΜW πολυμερών είναι συγκρίσιμα στα δύο φύλα [361]. Ο φυλετικός διμορφισμός της λιπονεκτίνης οδήγησε τους ερευνητές στην υπόθεση ότι η έκκριση και/ή ο μεταβολισμός της ορμόνης ρυθμίζεται από τα στεροειδή των γονάδων.

4.1 Επίδραση των γοναδικών στεροειδών στην έκκριση της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος

4.1.1 Επίδραση των οιστρογόνων

Σε αρκετές μελέτες [363-365] αλλά όχι όλες [358, 366], διαπιστώθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές και τις έγκυες γυναίκες. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της ολικής και ΗΜW λιπονεκτίνης ήταν υψηλότερες στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και χαμηλότερες στις έγκυες γυναίκες. Αντίθετα, τα ΜΜW και ΛΜW πολυμερή της λιπονεκτίνης παρουσίαζαν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις στις τρεις ομάδες των γυναικών (μετεμμηνοπαυσιακές, προεμμηνοπαυσιακές και έγκυες γυναίκες). Επίσης, η ολική λιπονεκτίνη, τα ΗΜW και τα ΜΜW πολυμερή, σχετίζονταν αρνητικά με την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη [365].

Τα δεδομένα που υπάρχουν όσον αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης και της οιστραδιόλης (E2) είναι αντικρουόμενα [366-369], και δείχνουν ότι εκτός από την οιστραδιόλη, άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία [363] και οι μεταβολές στην αναλογία ανδρογόνων/οιστρογόνων [359], πιθανόν να συμβάλλουν στις διαφορές των επιπέδων της λιπονεκτίνης.

Σε μελέτη που έγινε σε 121 προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, χωρίς ιστορικό διαβήτη, τα επίπεδα της οιστραδιόλης παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της λιπονεκτίνης

στο αίμα [370]. Σε συμφωνία με την ανωτέρω παρατήρηση η από του στόματος λήψη οιστραδιόλης, για περίοδο έξι μηνών, από ομάδα εμμηνοπαυσιακών γυναικών συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης στο αίμα [371]. Επίσης, η μεγαλύτερη των πέντε ετών θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης με οιστρογόνα και προγεστερόνη προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης στο αίμα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών σε σχέση με μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες χωρίς θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης [368]. Ωστόσο τα ανωτέρω ευρήματα είναι αντίθετα με τα αποτελέσματα άλλων μελετών όπου η διαδερμική χορήγηση οιστρογόνων, για χρονική περίοδο τριών μηνών σε συμπτωματικές εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν συνοδεύτηκε από μείωση αλλά από αύξηση των επιπέδων λιπονεκτίνης [372].

Το γεγονός ότι η θεραπεία με E2 στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση, καμία αλλαγή ή τη μείωση των επιπέδων της ολικής λιπονεκτίνης [366, 367, 371,372] πιθανόν να εξηγείται από τις διαφορές στο σχεδιασμό της κάθε μελέτης και την παρουσία αριθμού συγχυτικών παραγόντων όπως η ηλικία [363], τα ανδρογόνα [373, 374], η προλακτίνη [360], ο δείκτης HOMA-R (homeostatic model assessment for insulin resistance) [375], το βάρος του σώματος [16], η φυσική δραστηριότητα [376] και η κατανάλωση τροφής [360, 377].

Προηγούμενες μελέτες που εξετάζουν τις συγκεντρώσεις της ολικής λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου παρουσίασαν αντικρουόμενα στοιχεία. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι φυσιολογικές αλλαγές των συγκεντρώσεων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης [378-380]. Σε άλλη μελέτη μετρήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις λιπονεκτίνης στη μεταωορρηκτική φάση του καταμήνιου κύκλου, χωρίς να σημειωθεί συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης με τη 17β-οιστραδιόλη και την προγεστερόνη [381].

Αρνητική συσχέτιση μεταξύ οιστραδιόλης και HMW λιπονεκτίνης παρατηρήθηκε στην πρώτη φάση του γυναικείου καταμήνιου κύκλου σε μελέτη που έγινε σε τριάντα έξι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με κανονικό καταμήνιο κύκλο. Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της αναλογίας HMW λιπονεκτίνης/ολικής λιπονεκτίνης με την τεστοστερόνη, την ελεύθερη τεστοστερόνη και την ανδροστενεδιόνη και εκτιμήθηκε ότι η μεταβολή της ανωτέρω

σχέσης στο αίμα πιθανόν να αποτελεί τον μηχανισμό με τον οποίο τα φυλετικά στεροειδή επηρεάζουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο στις γυναίκες [382].

Αρνητική επίδραση στα επίπεδα της λιπονεκτίνης παρατηρήθηκε σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Η ωθηκεκτομή σε ενήλικους μύες συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης σε αντίθεση με τα νεογνά στα οποία δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε αλλαγή. Η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων σε μύες και σε 3T3-L1 λιποκύτταρα προκάλεσε μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης [360].

Αντίστοιχα, τα επίπεδα της λιπονεκτίνης μειώθηκαν αν κατά τη διάρκεια της δεύτερης και τρίτης εβδομάδας της κύησης μυών και παρέμεναν χαμηλά μέχρι και την περίοδο της γαλουχίας, άσχετα από την πτώση των επιπέδων των οιστρογόνων που παρατηρήθηκε στη γαλουχία. Η μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης συσχετίστηκε με την κατασταλτική δράση της προλακτίνης και τη διεγερτική δράση της βρωμοκρυπτίνης στις θηλάζουσες μητέρες μυών [360].

Επίδραση των οιστρογόνων διαπιστώθηκε και στην έκφραση των υποδοχέων της λιπονεκτίνης. Η χορήγηση E2 προκάλεσε αύξηση της έκφρασης των Adipo R1 υποδοχέων σε *in vivo* και *in vitro* δοκιμές σε σκελετικούς μύες αρουραίων και καλλιέργειες L6E9 μυοκυττάρων, σε αντίθεση με τη χορήγηση τεστοστερόνης η οποία προκάλεσε μείωση στην έκφραση των Adipo R1 υποδοχέων. Στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών των αρουραίων παρατηρήθηκε φυλετικός διμορφισμός, σύμφωνα με τον οποίο οι θηλυκοί αρουραίοι παρουσίαζαν μεγαλύτερη μάζα και λειτουργικότητα μιτοχονδρίων σε σχέση με τους αρσενικούς. Δεδομένου του φυλετικού διμορφισμού που παρουσιάζει η λιπονεκτίνη η οποία σχετίζεται με τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων και εκφράζεται επίσης στους σκελετικούς μύες, σειρά *in vitro* και *in vivo* μελετών διεξήχθησαν προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των φυλετικών ορμονών στη μιτοχονδριακή λειτουργία και την παραγωγή της λιπονεκτίνης στους σκελετικούς μύες [383].

Η χορήγηση E2 προκάλεσε θετική ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης και λειτουργίας, σε αρουραίους Wistar μετά από εκτομή ωοθηκών και σε καλλιέργειες L6E9 μυοκυττάρων και μερική ανάκτηση των ελαττωμένων επιπέδων της λιπονεκτίνης *in vivo*. Η ταυτόχρονη έκθεση σε E2 και προγεστερόνης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης στα L6E9 μυοκύτταρα

αρουραίων ενώ η *in vitro* χορήγηση τεστοστερόνης δεν προκάλεσε σημαντική επίδραση. Ως εκ τούτου, προτάθηκε η ύπαρξη ενός συνδετικού μορίου ανάμεσα στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και την έκφραση της λιπονεκτίνης στους σκελετικούς μύες, το οποίο ρυθμίζεται από τις φυλετικές ορμόνες [383].

Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση του γονιδίου της λιπονεκτίνης και της πρωτεΐνης στις ωοθήκες οικόσιτων χοίρων ήταν αυξημένη στα κύτταρα του ωχρού σωματίου των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης του καταμήνιου κύκλου. Η μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου της λιπονεκτίνης και της ίδιας της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης σε συνδυασμό με την μικρότερη έκφραση στην παραγωγική φάση πιθανόν να υποδεικνύουν διεγερτική δράση της προγεστερόνης και ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης στην παραγωγή της λιπονεκτίνης στις ωοθήκες [335]. Η αύξηση της συγκέντρωσης της λιπονεκτίνης στο υγρό των ωοθυλακίων γυναικών μετά από χορήγηση LH, στο πλαίσιο υποστηριζόμενης αναπαραγωγής, πιθανώς υποδηλώνει ορμονική επίδραση στη σύνθεση της λιπονεκτίνης στις ωοθήκες και την έκφραση των AdipoR1 και AdipoR2 [384], άποψη για την οποία συνηγορεί το γεγονός ότι τα επίπεδα της ολικής και HMW λιπονεκτίνης ήταν μειωμένα στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και υπερανδρογοναιμία σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες με ωορρηκτικούς κύκλους [385].

4.1.2 Επίδραση των ανδρογόνων

Τα ανδρογόνα ασκούν αρνητική επίδραση στα επίπεδα της λιπονεκτίνης. Οι άνδρες με υπογοναδισμό παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης στο αίμα σε σχέση με τους ευγοναδικούς άνδρες, τα οποία ελαττώθηκαν μετά από θεραπεία υποκατάστασης με τεστοστερόνη [373]. Παρόμοια, η φαρμακευτική πρόκληση υπογοναδισμού σε φυσιολογικούς άνδρες, προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης, αποτέλεσμα το οποίο αντιστράφηκε με την επάνοδο της τεστοστερόνης σε φυσιολογικά επίπεδα [374]. Αντίστροφα, η χορήγηση υψηλών δόσεων τεστοστερόνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης [374]. Σε άτομα με αλλαγή φύλου από θήλυ σε άρρεν, η χορήγηση τεστοστερόνης συνοδεύτηκε από μείωση της λιπονεκτίνης [386]. Ακόμα, σε αγόρια εφηβικής ηλικίας, τα ανδρογόνα συνδέονται με μια σταδιακή μείωση των επιπέδων λιπονεκτίνης σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα των κοριτσιών μετά την εφηβεία [387]. Τα επίπεδα της λιπονεκτίνης

παρουσιάζονται χαμηλά στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών πιθανόν λόγω των αυξημένων επιπέδων της τεστοστερόνης, χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή της συνυπάρχουσας παχυσαρκίας και/ή η αντίσταση στην ινσουλίνη [388-390].

Η εκτίμηση της επίδρασης των στεροειδών των γονάδων στην έκκριση της λιπονεκτίνης μελετήθηκε επίσης σε πειραματόζωα μετά από αφαίρεση των γονάδων τους. Η ορχεκτομή σε άρρενες αρουραίους συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων της ολικής λιπονεκτίνης πλάσματος η οποία ανεστράφη μετά από χορήγηση τεστοστερόνης και τρεμπολόνης με ταυτόχρονη διατήρηση σταθερών των επιπέδων ΗΜW. Η παρόμοια με την τεστοστερόνη δράση της τρεμπολόνης, συνθετικού ανδρογόνου που δεν μετατρέπεται σε οιστρογόνο από την αρωματάση, υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα δεν εμπλέκονται στην εν λόγω δράση [362].

Η ωοθηκεκτομή δεν επηρέασε τα επίπεδα της λιπονεκτίνης στο αίμα των θηλυκών μυών ενώ αντίθετα μετρήθηκαν υψηλά επίπεδα της ορμόνης στο πλάσμα ευνουχισμένων αρσενικών μυών, τα οποία μειώθηκαν μετά από χορήγηση τεστοστερόνης. Η αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των ευνουχισμένων μυών σχετιζόταν με σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη υποδηλώνοντας ότι η υπολιπονεκτιναιμία που προκαλείται από τα ανδρογόνα πιθανόν να σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης αντίστασης στην ινσουλίνη και αθηροσκλήρωσης στους άνδρες. Σε *in vitro* μελέτη σε 3T3-L1 λιποκύτταρα, η τεστοστερόνη και η διϋδροτεστοστερόνη ασκούσαν αρνητική ρύθμιση μειώνοντας την έκκριση της λιπονεκτίνης στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας [358].

Σε νεώτερη μελέτη, σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμές σε μύες, διαφάνηκε ότι η τεστοστερόνη ασκεί σε μεγάλο βαθμό αρνητική επίδραση στην έκκριση της ΗΜW λιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα, χωρίς να επηρεάζει την έκκριση των ΜΜW και ΛΜW μορφών. Αναλυτικά, τα επίπεδα των ΗΜW, ΜΜW και ΛΜW πολυμερών που εκκρίνονταν στο μέσο της καλλιέργειας ήταν 33.6%, 45.2% και 21.2% αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό της ΗΜW λιπονεκτίνης εντός των λιποκυττάρων αντιστοιχούσε στο 66.4% της συνολικής ποσότητας της ορμόνης. Τα λιποκύτταρα απέκκριναν τη ΗΜW μορφή με βραδύτερο ρυθμό αλλά και με δόσοεξαρτώμενο τρόπο παρουσία τεστοστερόνης, υποδηλώνοντας ότι η τεστοστερόνη ασκεί τη ρυθμιστική της δράση στη διανομή των διαφόρων πολυμερών της λιπονεκτίνης στο αίμα και όχι στην έκφραση της ορμόνης στα λιποκύτταρα. Η παρεμποδιστική δράση της τεστοστερόνης στην έκκριση της

HMW λιπονεκτίνης διενεργήθηκε με τη μεσολάβηση μεταγραφικής διαδικασίας και αντιστρεφόταν από το μεταγραφικό αναστολέα ακτινομυκίνη D [361].

Σε μοριακό επίπεδο, η προσθήκη ορού ανδρών και γυναικών σε καλλιέργειες SGBS κυττάρων και σε *in vitro*-διαφοροποιημένα ανθρώπινα αρχέγονα λιποκύτταρα, προκάλεσε αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της λιπονεκτίνης. Ο ορός των αρρένων προκάλεσε ισχυρότερη ανασταλτική δράση από ότι ο γυναικείος ορός. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τεστοστερόνης ή οιστραδιόλης δεν επηρέασε την έκφραση και την έκκριση του mRNA της λιπονεκτίνης ούτε την ενδοκυτταρική πρωτεϊνική έκφραση των HMW, MMW και LMW πολυμερών της λιπονεκτίνης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός παράγοντα στον ορό του αίματος, ο οποίος πιθανώς ρυθμίζεται από τα φυλετικά στεροειδή και προκαλεί το φυλετικό διμορφισμό στα επίπεδα της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος [391].

Η ρύθμιση της έκκρισης της λιπονεκτίνης από τις στεροειδείς ορμόνες του φύλου πιθανόν να τροποποιείται μερικώς σε μεταγραφικό επίπεδο αφού η ταυτόχρονη έκθεση ώριμων 3T3-L1 λιποκυττάρων σε πιογλιταζόνη και οιστραδιόλη, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του mRNA της λιπονεκτίνης και παράλληλα σημαντική αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση του PPAR γ με οιστρογονο-δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αντίστοιχα, η έκθεση των λιποκυττάρων μόνο στη δράση της E2 συνοδεύτηκε από δοσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του PPAR γ χωρίς επηρεασμό της έκφρασης της λιπονεκτίνης. Σε αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο, η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε DHT και πιογλιταζόνης συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων του mRNA της λιπονεκτίνης και της πρωτεϊνικής έκφρασης του PPAR γ καθώς επίσης και αρνητική ρύθμιση στη μεταγραφική δραστηριότητα του PPAR γ . Αντίστοιχα, η έκθεση των λιποκυττάρων μόνο στη δράση της DHT ή της T συνοδεύτηκε από μείωση των εκκρινόμενων επιπέδων της λιπονεκτίνης ενώ η έκφραση του PPAR γ δεν επηρεάστηκε. Αντίθετα, η έκθεση των κυττάρων σε πιογλιταζόνη συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της έκφρασης του PPAR γ . Οι ανωτέρω παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι πιθανώς οι φυλετικές ορμόνες επηρεάζουν την έκκριση της λιπονεκτίνης μέσω της δράσης τους στην έκφραση και τη λειτουργικότητα των PPAR γ υποδοχέων, γεγονός που μάλλον εξηγεί τη διαφορετική δράση της πιογλιταζόνης στα δύο φύλα [392].

Η διαμεσολάβηση του υποδοχέα PPAR γ στην έκκριση της λιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα διαφάνηκε και σε προηγούμενη μελέτη όπου η προσθήκη PPAR γ αγωνιστών προκάλεσε αύξηση στην έκκριση της λιπονεκτίνης, κυρίως της HMW ισομορφής και αυξημένες συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης στο πλάσμα μυών [393].

Παλαιότερη μελέτη έδειξε ότι ένα ποσοστό της λιπονεκτίνης αποθηκεύεται σε κυστίδια των οποίων η εξωκύττωση ρυθμίζεται από την ινσουλίνη μέσω φωσφατιδυλινοσιτόλης-3-κινάσης και το υπόλοιπο ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται σε κυστίδια τα οποία υποβάλλονται σε σταθερού ρυθμού εξωκύττωση [394]. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι μία σημαντική ποσότητα της συντιθέμενης λιπονεκτίνης παραμένει στα λιποκύτταρα, με διαδικασία σύνδεσης με σουλφιδικές ομάδες (thiol-mediated retention) και εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα μετά από επίδραση αναγωγικών παραγόντων. Εντός των λιποκυττάρων, η λιπονεκτίνη βρίσκεται συνδεδεμένη ομοιοπολικά με τους πρωτεϊνικούς συνοδούς (chaperones) του ενδοπλασματικού δικτύου ERp44 (endoplasmic reticulum protein), μέσω του τρίτου κατάλοιπου κυστεΐνης 39. Τα άλλα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης 39 στο μόριο της λιπονεκτίνης, σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό για τη δημιουργία της τριμερούς μορφής της λιπονεκτίνης. Ο πρωτεϊνικός συνοδός Ero1-La (οξειδοοδουκτάση της κοιλότητας του ενδοπλασματικού δικτύου -an oxidoreductase in the ER lumen), είναι υπεύθυνος για την απελευθέρωση της λιπονεκτίνης από τον ERp44. Τα επίπεδα των δύο αυτών πρωτεϊνικών συνοδών ρυθμίζονται από τα λιποκύτταρα και επηρεάζονται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Οι συγκεντρώσεις των ERp44 και Ero1-La αυξάνουν υπό την επίδραση των PPAR γ αγωνιστών. Η χορήγηση PPAR γ αγωνιστών προκάλεσε αύξηση στην έκκριση της λιπονεκτίνης, κυρίως της HMW ισομορφής και αυξημένες συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης στο πλάσμα μυών [393].

4.2 Ερευνητικό ερώτημα

Η ΗΜW λιπονεκτίνη αποτελεί το βιολογικά δραστικότερο ισομερές της λιπονεκτίνης και σχετίζεται με μειωμένο κοιλιακό λίπος και αυξημένη οξειδωση λιπαρών οξέων [395]. Τα επίπεδα της ΗΜW λιπονεκτίνης και η αναλογία ΗΜW λιπονεκτίνης/ολικής λιπονεκτίνης σχετίζονται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, τις αντιαθηρογόνες δράσεις, το μεταβολικό σύνδρομο και την πρόγνωση για στεφανιαία νόσο [396-398]. Ο φυλετικός διμορφισμός που παρουσιάζουν τα επίπεδα της λιπονεκτίνης αφορά στα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα των θήλεων ατόμων, σύμφωνα με μελέτες σε ανθρώπους [358, 359] και τρωκτικά [360-362], συγκριτικά με τα άρρενα άτομα. Κατά συνέπεια ετέθη το ερευνητικό ερώτημα αν η έκκριση και/ή ο μεταβολισμός της λιπονεκτίνης ρυθμίζονται από τα στεροειδή των γονάδων.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [363-365], αλλά όχι την πλειοψηφία αυτών [358,366], τα επίπεδα λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές και τις έγκυες γυναίκες. Οι συγκεντρώσεις της ολικής και ΗΜW λιπονεκτίνης βρέθηκαν υψηλότερες στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και χαμηλότερες στις έγκυες γυναίκες. Αντίθετα, τα ΜΜW και ΛΜW πολυμερή της λιπονεκτίνης παρουσίαζαν συγκρίσιμες συγκεντρώσεις στις τρεις ομάδες των γυναικών. Επίσης, η ολική λιπονεκτίνη, τα ΗΜW και τα ΜΜW πολυμερή, παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση με την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη [365]. Τα δεδομένα που υπάρχουν όσον αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης και της οιστραδιόλης (E2) είναι αντικρουόμενα [366-369], και δείχνουν ότι εκτός από την οιστραδιόλη, άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία και οι μεταβολές στην αναλογία ανδρογόνων/οιστρογόνων, πιθανόν να συμβάλλουν στις διαφορές των επιπέδων της λιπονεκτίνης [359, 363]. Οι παράγοντες αυτοί πιθανόν να ευθύνονται και για το γεγονός ότι οι γυναίκες με το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα λιπονεκτίνης στο αίμα και υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης, χωρίς να αποκλείεται η συνύπαρξη παχυσαρκίας και/ή αντίστασης στην ινσουλίνη [388-390]. Τα ανδρογόνα φαίνονται να επηρεάζουν τα επίπεδα της λιπονεκτίνης. οι υπογοναδικοί άνδρες σε σχέση με τους ευγοναδικούς παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης, τα οποία ελαττώνονται μετά από θεραπεία υποκατάστασης με τεστοστερόνη [373]. Παρόμοια, σε φυσιολογικούς άνδρες, η πειραματική πρόκληση ανεπάρκειας/ έλλειψης τεστοστερόνης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης. Η

επίδραση αυτή δεν σημειωνόταν όταν χορηγείτο θεραπεία υποκατάστασης τεστοστερόνης [374]. Εντούτοις, η υπερφυσιολογική χορήγηση τεστοστερόνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της λιπονεκτίνης [374].

Τα δεδομένα που υπάρχουν όσον αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης και της οιστραδιόλης (E2) είναι αντικρουόμενα [366-369], και δείχνουν ότι εκτός από την οιστραδιόλη, άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία [363] και οι μεταβολές στην αναλογία ανδρογόνων/οιστρογόνων [359], πιθανόν να συμβάλλουν στις διαφορές των επιπέδων της λιπονεκτίνης.

Αντικρουόμενα στοιχεία παρουσιάστηκαν όσον αφορά την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης E2 σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες η θεραπεία με E2 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση, καμία αλλαγή ή τη μείωση των επιπέδων της ολικής λιπονεκτίνης [366, 367, 371, 372]. Αντίστοιχα, η τεστοστερόνη βρέθηκε να επηρεάζει την έκκριση της HMW λιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα, *in vitro* και *in vivo*, σε μεγάλο βαθμό ενώ δεν ασκούσε οποιαδήποτε επίδραση στην έκκριση των MMW και LMW μορφών της λιπονεκτίνης [361].

Από την αναζήτηση στην προσιτή και πρόσφατη σε εμάς βιβλιογραφία, διαπιστώσαμε ότι προηγούμενες μελέτες εξετάζουν μόνο τις συγκεντρώσεις της ολικής λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου και όχι τις συγκεντρώσεις των διαφόρων ισομερών της λιπονεκτίνης. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι φυσιολογικές αλλαγές των συγκεντρώσεων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης [378-380] σε αντίθεση με άλλη μελέτη στην οποία παρατηρήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις λιπονεκτίνης στη μεταωορρηκτική φάση του καταμήνιου κύκλου [381]. Ωστόσο, η εικασία ότι μόνο η HMW ισομορφή της λιπονεκτίνης είναι ευαίσθητη στις αλλαγές των φυλετικών στεροειδών [367] δεν έχει περαιτέρω διερευνηθεί. Εξ όσων γνωρίζουμε, μόνο σε μία μελέτη μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην πρώτη φάση του καταμήνιου κύκλου, όπου παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ οιστραδιόλης και HMW λιπονεκτίνης, και μεταξύ τεστοστερόνης, ελεύθερης τεστοστερόνης και ανδροστενεδιόνης και της αναλογίας HMW λιπονεκτίνη/ολική λιπονεκτίνη [382].

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών στις οποίες παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση οιστραδιόλης και ΗΜW λιπονεκτίνης στην πρώτη φάση του γυναικείου καταμήνιου κύκλου [382], αρνητική επίδραση των οιστρογόνων στα επίπεδα της λιπονεκτίνης σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες σε πειραματόζωα [360], αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης στα L6E9 μυοκύτταρα αρουραίων μετά από ταυτόχρονη χορήγηση E2 και προγεστερόνης [383], υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της λιπονεκτίνης κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης και τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στην παραγωγική φάση στις ωοθήκες οικόσιτων χοίρων, τα οποία πιθανόν να υποδεικνύουν τη διεγερτική δράση της προγεστερόνης και την ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης στην παραγωγή της λιπονεκτίνης στις ωοθήκες [335] οδηγηθήκαμε στο ερώτημα κατά πόσον οι αλλαγές των φυλετικών ορμονών κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου θα μπορούσαν να μεταβάλουν τη συγκέντρωση των ολικών επιπέδων της λιπονεκτίνης αλλά και την ποσοστιαία αναλογία των ισομερών της, με μηχανισμούς οι οποίοι δεν έχουν πλήρως αποσαφηνισθεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση των μεταβολών των στεροειδών ορμονών (οιστρογόνων, προγεστερόνης, τεστοστερόνης) στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου (παραγωγική, προωορρηκτική και εκκριτική) στα συνολικά επίπεδα της λιπονεκτίνης και την αναλογία των ισομερών της στην κυκλοφορία. Επίσης μετρήθηκαν τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες.

5. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι εξής:

1. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της ολικής λιπονεκτίνης στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου.
2. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των διαφόρων ισομερών της λιπονεκτίνης στις τρεις φάσεις του κύκλου και η διερεύνηση της πιθανής μεταβολής των συγκεντρώσεων/αναλογιών των διαφόρων πολυμερών της λιπονεκτίνης ανάλογα με τις ορμονικές αλλαγές που παρατηρούνται στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου.
3. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της ολικής λιπονεκτίνης καθώς και των επιμέρους ισομερών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε άνδρες.

5.1 Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη συμπεριλαμβάνει 3 ομάδες ατόμων:

Ομάδα 1^η. Στην ομάδα αυτή εντάχθηκαν είκοσι τρεις (23) υγιείς γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 34 έτη (με εύρος 24-41 έτη), με κανονικό σωματικό βάρος (BMI 22.3 ± 2.15) και κανονικό καταμήνιο κύκλο, που δεν είχαν χρησιμοποιήσει οποιοδήποτε είδος ορμονικής θεραπείας τους τελευταίους 6 μήνες. Στις δέκα τρεις (13) από τις γυναίκες αυτής της ομάδας έγιναν αιμοληψίες στην αρχή της παραγωγικής φάσης (ημέρα κύκλου 4^η -5^η), στην προωορρηκτική φάση (ημέρα κύκλου 11^η -12^η) και στο μέσο της εκκριτικής φάσης (ημέρα κύκλου 21^η -22^η), σε κύκλους 28 ημερών ή σε αντίστοιχες ημερομηνίες σε μεγαλύτερους κύκλους. Στις υπόλοιπες δέκα (10) γυναίκες έγινε μία μόνο αιμοληψία την 4^η ή 5^η ημέρα του κύκλου τους.

Ομάδα 2^η. Στην 2^η ομάδα εντάχθηκαν είκοσι (20) υγιείς εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 56 έτη (με εύρος 51-63 έτη) και με απουσία εμμήνου ρύσης τουλάχιστον ενός έτους. Οι εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν ελάμβαναν οποιαδήποτε ορμονική αγωγή τους τελευταίους έξι μήνες πριν από την αιμοληψία.

Ομάδα 3^η. Στην 3^η ομάδα εντάχθηκαν είκοσι ένας (21) υγιείς άνδρες με μέσο όρο ηλικίας 37 έτη (με εύρος 32-44 έτη) και με κανονικό σωματικό βάρος.

Όλα τα άτομα που συμμετείχαν έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για την έρευνα. Το πρωτόκολλο της μελέτης θεωρήθηκε και εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

5.2 Υλικά και συσκευές

Η προμήθεια των υλικών έγινε από τις εταιρείες όπως αντίστοιχα αναγράφεται.

Amersham Hybond-P PVDF membrane (Amersham)

Biotinylated Anti-human Adiponectin/Acrp30 (R&D Systems)

HiMark™ Prestained Protein Standard (Novex®, Invitrogen)

Horseshoe peroxidase antibody -Dako Cytomation

KODAK® X-OMAT® Autoradiography Film, 13X18cm

Multimeric Adiponectin ELISA (Bühlmann Labs, Switzerland)

NuPAGE® Transfer Buffer (20X) (Invitrogen)

NuPAGE 7% Tris-acetate gel (Invitrogen)

NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (Invitrogen)

Ponceau S solution - Sigma-Aldrich

TTBS (Tris-buffered saline (TBS) + 0.05% Tween 20) (Sigma-Aldrich)

Western blot detection system -ECL Plus from GE Healthcare

Συσκευές

XCell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen)

XCell II™ Blot Module (Invitrogen)

HP photosmart express scanner

5.3 Υλοποίηση του πειραματικού μέρους

Όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε πλήρη κλινική εκτίμηση και ταυτόχρονα έγινε λήψη του ατομικού και κληρονομικού τους ιστορικού καθώς και των συνηθειών τους. Μετρήθηκαν το βάρος του σώματος, το ύψος, η περιφέρεια μέσης και η πίεση του αίματος. Η μέση αρτηριακή πίεση υπολογίστηκε ως εξής: διαστολική πίεση αίματος + (1/3 της συστολικής πίεσης αίματος). Η αιμοληψία έγινε το πρωί (μετά από ολονύκτια νηστεία) μεταξύ 9^{ης} και 10^{ης} ώρας. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 στροφές για εφτά λεπτά και ο ορός αίματος διατηρήθηκε

σε συνθήκες -80°C μέχρι την μέτρηση της συγκέντρωσης της λιπονεκτίνης και των προσδιορισμό των ισομερών της. Στα δείγματα αίματος μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των FSH (Follicle Stimulating Hormone, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη), LH (Luteinizing Hormone, ωχρινοτρόπος ορμόνη), E_2 , TSH (Thyroid, stimulating hormone, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη), FT_4 (Free thyroxine, ελεύθερη θυροξίνη), PRL (prolactin, προλακτίνη), PRG (progesterone, προγεστερόνη), τεστοστερόνη, SHBG (Sex hormone-binding globulin, σφαιρίνη δεσμεύουσα τις φυλετικές ορμόνες), αλβουμίνη, γλυκόζη, ινσουλίνη και HbA1c (Glycated hemoglobin A1c, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη) σε αυτόματο αναλυτή (Olympus 600, Medicon, Αθήνα), με τη χρήση συνηθισμένων τεχνικών. Η ελεύθερη τεστοστερόνη του ορού και η βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη (bio-T, bioavailable testosterone) υπολογίστηκαν από τις συνολικές συγκεντρώσεις της τεστοστερόνης του ορού, της SHBG και της αλβουμίνης σύμφωνα με υπάρχουσα μεθοδολογία [399].

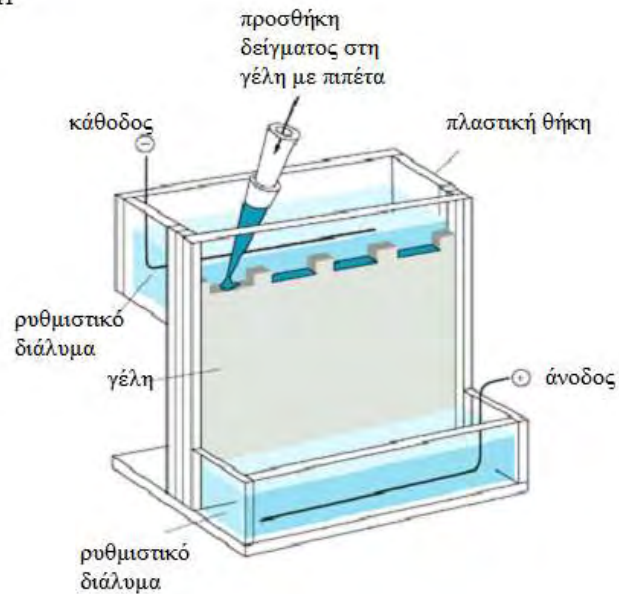
Ο δείκτης ελεύθερων ανδρογόνων (FAI, Free Androgen Index) υπολογίστηκε ως η αναλογία των συγκεντρώσεων της ολικής τεστοστερόνης (σε nmol/L) προς την SHBG (σε nmol/L). Ο δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-R, Homeostasis model assessment of insulin resistance) υπολογίστηκε ως ινσουλίνη πλάσματος (σε IU/mL) X γλυκόζη πλάσματος (σε mg/dL) διηρημένο με το συντελεστή 22.5×18 [400]. Τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης και των διαφόρων πολυμερών της, μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία ELISA) (Bühlmann Labs, Switzerland) και με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης Western Blot Analysis. Οι συγκεντρώσεις των HMW, MMW and LMW υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

5.3.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης με Western Blotting

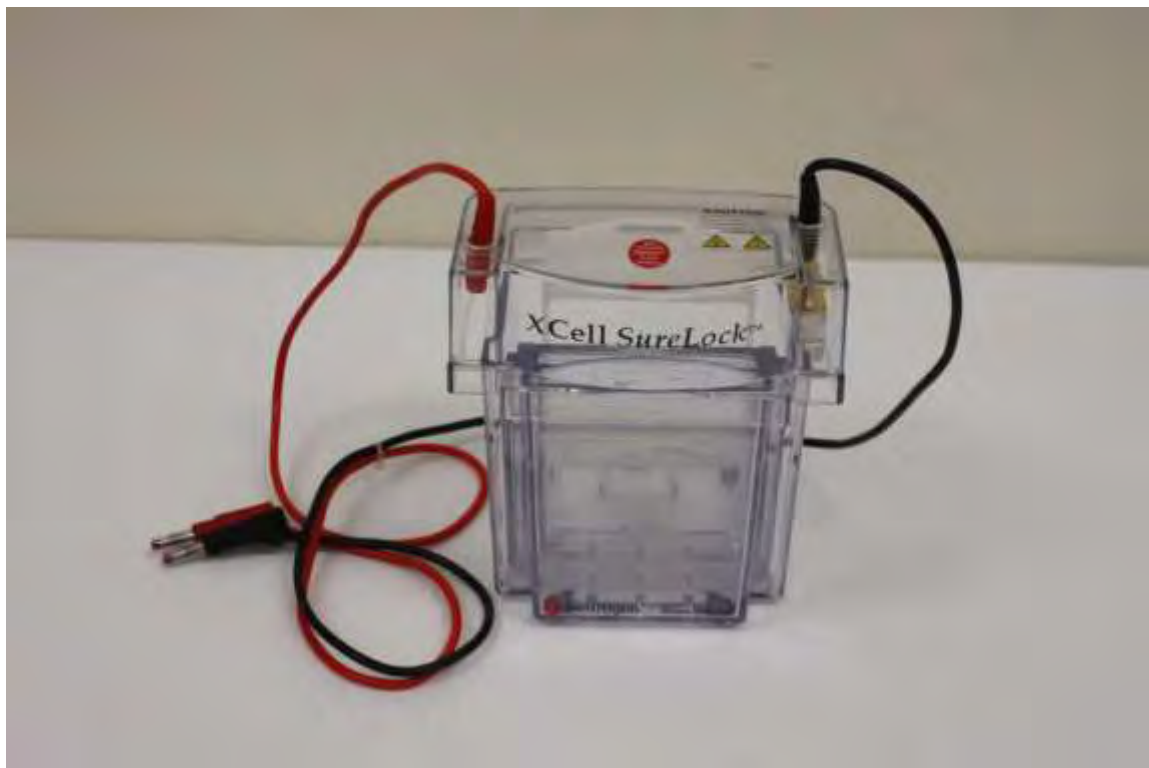
Τα δείγματα ορού αραιώθηκαν 10 φορές με δις αποσταγμένο νερό (ddH_2O). Από το κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν 2 μl στα οποία προστέθηκαν 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 3 μl ddH_2O . Τα ισομερή της λιπονεκτίνης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης (NuPAGE 7% Tris-acetate gel) με τη συσκευή XCell Sure Lock Mini-Cell (Σχήμα 17, Εικόνα 1). Στην ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε NuPAGE® Tris-Acetate SDS ρυθμιστικό διάλυμα (Running Buffer) και ως μάρτυρας η προ-σημασμένη πρωτεΐνη HiMark™ Prestained Protein Standard.

Στη συνέχεια, με τη μέθοδο Western Blotting (συσκευή XCell II™ Blot Module, Εικόνα 2) οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν με ολονύκτια ηλεκτροφόρηση σε πορώδη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Hybond-P PVDF, μέγεθος πόρων 0.45μm), σε θερμοκρασία 4°C. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα NuPAGE® Transfer Buffer (20X) σε αραιώση 228 ml ddH₂O και 12 ml ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και αποτύπωσης και 60 ml μεθανόλης. Ακολούθως, η μεμβράνη επώαστηκε με τη χρωστική ρonceau για δύο λεπτά, ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης με TTBS (Tris-buffered saline (TBS) με 0.05% Tween 20) τρεις φορές, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε διαδικασία, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα παρεμπόδισης (blocking solution, 5% άπαχο αφυδατωμένο γάλα σε διάλυμα TTBS) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως, έγινε έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα TTBS τρεις φορές, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε διαδικασία, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη (blocked membrane) επώαστηκε με ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα λιπονεκτίνης (Biotinylated Anti-human Adiponectin/Acrp30) σε αραιώση 1:2000 με 5% άπαχο αφυδατωμένο γάλα-διαλυμένο σε TTBS), για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε η διαδικασία έκπλυσης της μεμβράνης όπως προαναφέρεται. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με δεύτερο χρωμογόνο πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) (1:100 αραιώση με 5% άπαχο αφυδατωμένο γάλα διαλυμένο σε TTBS) για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε η διαδικασία έκπλυσης της μεμβράνης όπως προαναφέρθηκε. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έγινε με τη χρήση του συστήματος Western blot detection system. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο και ακολούθησε εμφάνιση του φιλμ (Εικόνες 3-5). Για την εμφάνιση των εικόνων από το φιλμ χρησιμοποιήθηκε σαρωτής (HP photosmart express scanner) και με τη μέθοδο της πυκνομετρίας υπολογίστηκαν οι διάφορες ζώνες (bands) που σχηματίστηκαν με το λογισμικό Image J software (Image Processing and Analysis in Java) και ακολούθως έγινε κανονικοποίηση ως προς τις συνολικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός των αναλογιών των HMW, MMW και LMW πρωτεϊνών ως προς το άθροισμα όλων των πολυ- και μονομερών.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ



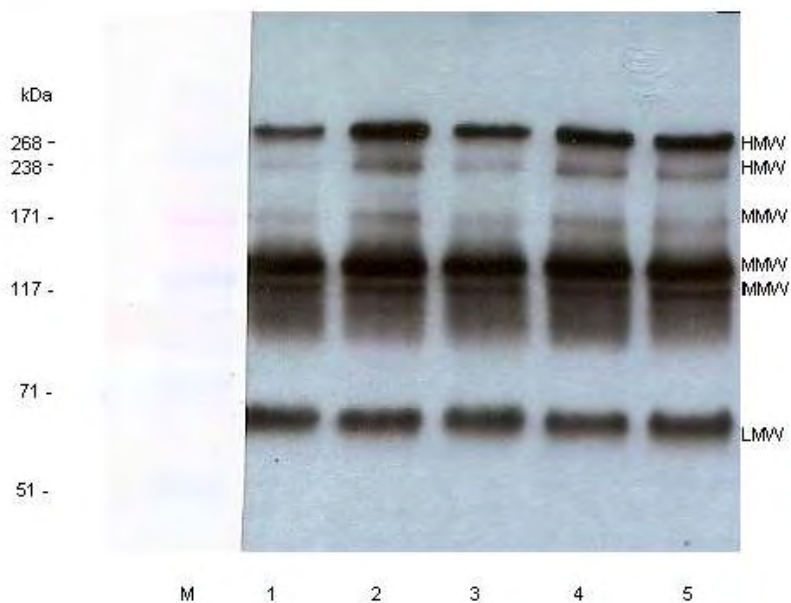
Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής ηλεκτροφόρησης σε γέλη (κίνηση χημικών πρωτεϊνών μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου). Η κίνηση των πρωτεϊνών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών [401].



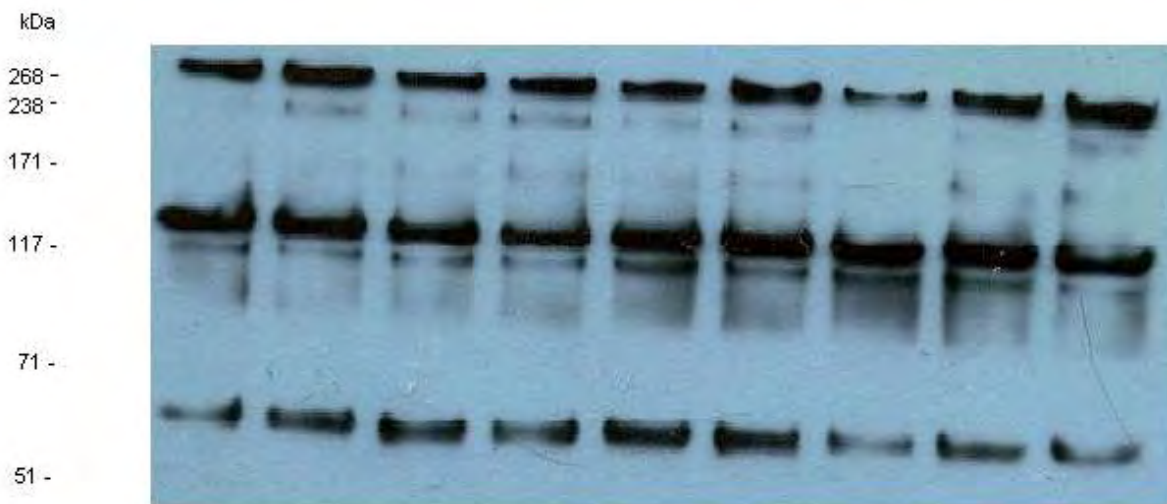
Εικόνα 1. Συσκευή XCell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen) η οποία χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ισομερών της λιπονεκτίνης με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης.



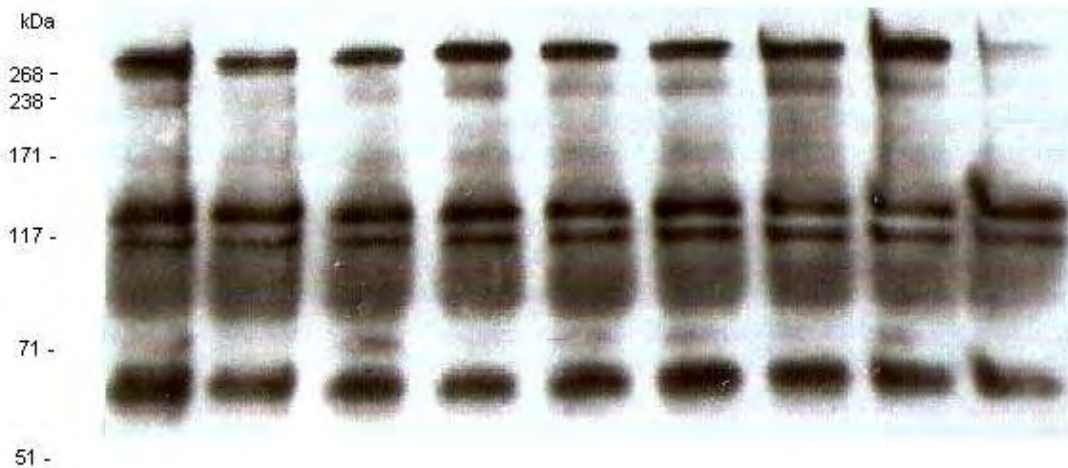
Εικόνα 2. Συσκευή XCell II™ Blot Module-Invitrogen η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε πορώδη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



Εικόνα 3. Φιλμ από την τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western Blot (WB4, Δείγματα αίματος από τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στη δεύτερη φάση του κύκλου).



Εικόνα 4. Φιλμ από την τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western Blot (WB9, δείγματα αίματος από την ομάδα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών).



Εικόνα 5. Φιλμ από την τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western Blot (WB8, δείγματα αίματος από την ομάδα των ανδρών).

Προσδιορισμός των ισομερών της λιπονεκτίνης με τη χρήση αντισωμάτων

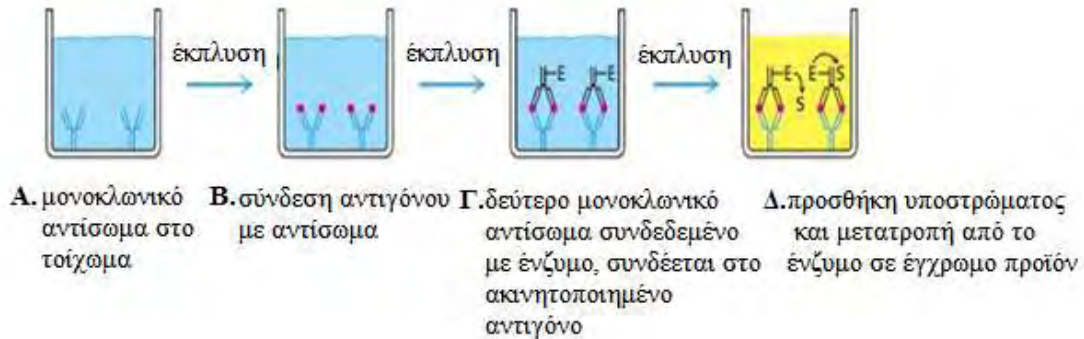
Κατά την αρχική φάση υλοποίησης της μελέτης η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western ήταν η μόνη διαθέσιμη μεθοδολογία προσδιορισμού των πολυμερών της λιπονεκτίνης. Υπήρχε μέθοδος Elisa για τον προσδιορισμό της ολικής λιπονεκτίνης στην ανθρώπινη κυκλοφορία αλλά στη συνέχεια δημοσιεύθηκε μεθοδολογία η οποία επέτρεπε, με τη χρήση αντισωμάτων, αναγνώριση των πολυμερών της λιπονεκτίνης με μεγαλύτερη ειδικότητα (μέθοδος Elisa επίσης). Έτσι, αποφασίστηκε να εφαρμοστεί στο υλικό μας και αυτή η μέθοδος η οποία περιγράφεται στη συνέχεια.

5.3.2 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία “sandwich” enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Τα δείγματα ορού όλων των συμμετεχόντων στη μελέτη μετρήθηκαν με ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο (Multimeric Adiponectin ELISA, Bühlmann Labs, Switzerland) [402] (Σχήμα 18), σε φωτόμετρο elisa-reader, σε μήκος κύματος 490 nm και με πρότυπη καμπύλη με εύρος τιμών 0.08 έως 4.8 ng/mL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι

συγκεντρώσεις της συνολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της υπολογίστηκαν ομοίως σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Sandwich ELISA



Σχήμα 18. Σχηματική απεικόνιση της Ενζυμικής ανοσοπροσοροφητικής δοκιμασίας “sandwich” enzyme-ELISA.

Ειδικότερα, η τεχνική “sandwich” enzyme-ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων πολυμερών της λιπονεκτίνης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Τα πολυμερή λιπονεκτίνης διασπώνται σε διμερή και μονομερή με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος και προσδιορίζεται η ολική συγκέντρωση λιπονεκτίνης.
2. Η πρωτεάση II διασπά επιλεκτικά τα LMW και MMW πολυμερή της λιπονεκτίνης. Στη συνέχεια τα HMW πολυμερή μετατρέπονται σε διμερή και μονομερή με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Η τεχνική ELISA μετρά την ποσότητα των διμερών και μονομερών που προέρχονται από τα HMW πολυμερή.
3. Η πρωτεάση I διασπά επιλεκτικά τα LMW πολυμερή. Στη συνέχεια τα HMW και MMW πολυμερή διασπώνται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Η τεχνική ELISA μετρά την ποσότητα των HMW και MMW πολυμερών.

Η συγκέντρωση των MMW προκύπτει από την αφαίρεση των συγκεντρώσεων των HMW και MMW μείον της ποσότητας των HMW όπως μετρήθηκαν στις δοκιμές 3 και 2.

Η ποσότητα των LMW πολυμερών προκύπτει από τη διαφορά της ποσότητας της ολικής λιπονεκτίνης μείον την ποσότητα των HMW και MMW πολυμερών σύμφωνα με τις δοκιμές 1 και 3 [402].

5.4 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα των ποσοτικών μεταβλητών με κανονική κατανομή εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD -standard deviation) ενώ εκείνων με μη κανονική κατανομή ως διάμεση τιμή \pm διατεταρτομοριακό εύρος (IQR). Τα δεδομένα των ποιοτικών μεταβλητών περιγράφονται ποσοτικά και με ποσοστιαία αναλογία. Οι δοκιμασίες Student t και Mann–Whitney U χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών, ανάλογα. Επιπλέον για την στατιστική επεξεργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος X^2 ή η δοκιμασία Fisher's exact.

Η μέθοδος One way ANOVA με τη διόρθωση Bonferonni, χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι τάσεις των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων στις δέκα τρεις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου και οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Με το συντελεστή Spearman's coefficient (rs) υπολογίστηκαν διμεταβλητές συσχετίσεις. Πολλαπλές λογιστικές αναγωγές χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί η συσχέτιση μεταξύ λιπονεκτίνης, HMW ή αναλογίας HMW/ολικής λιπονεκτίνης ως εξαρτώμενης μεταβλητής και της ηλικίας, του φύλου, της κοιλιακής παχυσαρκίας, της SHBG, της προγεστερόνης, και των επιπέδων FT ή TT ως ανεξάρτητων μεταβλητών. Εφαρμόστηκε ως στάθμη εμπιστοσύνης η τιμή 0.05 ($p < 0.05$). Οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού SPSS για την έκδοση του προγράμματος υπολογιστή windows 17.0 (SPSS Inc Chicago, IL).

5.5 Αποτελέσματα

Στοιχεία μελετηθέντων ατόμων

Για τη διεξαγωγή της μελέτης εξετάστηκαν και μετρήθηκαν ως προς τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά τους, το βιοχημικό και ορμονικό προφίλ τους 23 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, 20 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και 21 άνδρες των οποίων τα ανωτέρω χαρακτηριστικά αναγράφονται στον πίνακα 1 όπου παράλληλα αναγράφεται και η τυπική απόκλιση των αντίστοιχων μετρήσεων για κάθε παράμετρο και η τιμή p. Ο μέσος όρος ηλικίας των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών και των ανδρών ήταν 34 και 37 έτη, αντίστοιχα και των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών 56 έτη. Ο δείκτης μάζας σώματος των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών και των ανδρών κινήθηκε στα φυσιολογικά όρια (22.3 ± 2.15 και 24.9 ± 1.82 , αντίστοιχα), ενώ ο αντίστοιχος των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ήταν οριακά αυξημένος (27.3 ± 5.1). Οι υπόλοιποι μελετηθέντες δείκτες ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων για κάθε πληθυσμιακή ομάδα. Ως προς την συνήθεια του καπνίσματος, οι καπνίζοντες αποτέλεσαν την πλειοψηφία του ανδρικού πληθυσμού (9/12) ενώ στην ομάδα των προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ήταν η μειοψηφία (5/18 και 4/16, αντίστοιχα).

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των ατόμων (γυναικών και ανδρών) που συμμετείχαν στη μελέτη.

Μεταβλητή	Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες	Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες	Άνδρες	p Value
N (αριθμός)	23	20	21	
Ηλικία (εύρος) (έτη)	34 (24-41)	56 (51-63)	37 (32-44)	0.001
BMI (Kg/m ²)	22.3 ± 2.15	27.3 ± 5.1	24.9 ± 1.82	0.001
Περιφέρεια μέσης (cm)	78.4 ± 6.2	89.3 ± 10.2	94.6 ± 5.7	0.001

Μέση αρτηριακή πίεση (mmHg)	104.5 ± 10.8	107.8 ± 18.3	114.7 ± 8.1	0.037
Κάπνισμα (Ναι/Όχι)	5/18	4/16	9/12	NS
CRP (mg/dl)	0.30 ± 0.3	0.51 ± 0.5	0.25 ± 0.2	0.074
TSH (μIU/ml)	2.6 ± 1.8	1.3 ± 0.9	1.8 ± 0.7	0.005
FreeT4 (ng/dl)	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.21	1.3 ± 0.18	0.352
FSH (mIU/ml)	10.8 ± 9.8	70.2 ± 27.4	5.0 ± 3.2	0.001
LH (mIU/ml)	6.4 ± 2.7	32.1 ± 11.6	4.7 ± 2.3	0.001
Προλακτίνη (ng/ml)	19.0 ± 8.7	10.9 ± 5.0	13.4 ± 5.3	0.001
SHBG (nmol/L)	62.4 ± 26.5	64.3 ± 27.2	29.2 ± 11.5	0.003
HOMA-R	1.9 ± 1.6	2.1 ± 1.3	2.2 ± 1.0	0.820

5.5.1 Αποτελέσματα λιπονεκτίνης με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting)

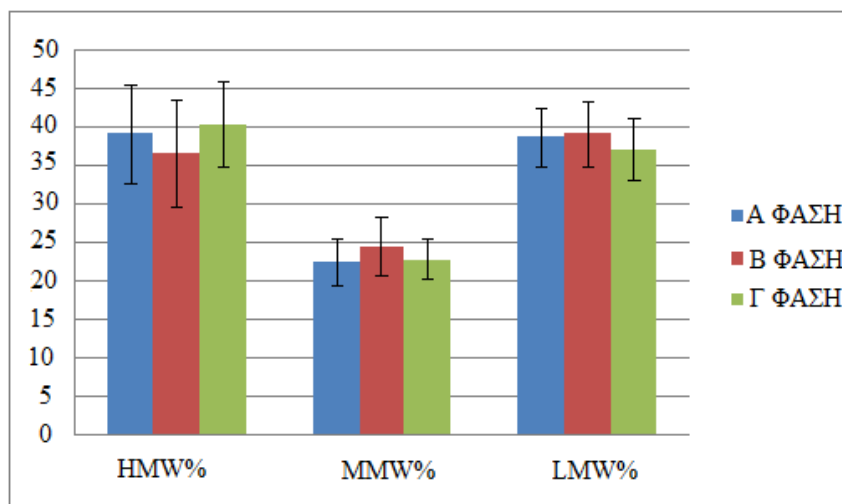
Στο **σχήμα 19** απεικονίζεται η ποσοστιαία παρουσία των επιπέδων των πολυμερών της λιπονεκτίνης στον ορό αίματος κατά τις τρεις φάσεις του κύκλου των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Είναι εμφανές πως τα ποσοστά των ισομερών της λιπονεκτίνης παραμένουν συγκρίσιμα στις τρεις φάσεις του καταμήνιου κύκλου.

Στον **πίνακα 5** παρατίθενται τα μέσα επίπεδα της ποσοστιαίας κατανομής των πολυμερών της λιπονεκτίνης, που επίσης απεικονίζονται στο **σχήμα 19**, των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών στις τρεις φάσεις ωορρηκτικών κύκλων. Ανάμεσα στις τρεις φάσεις του κύκλου δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά στα ποσοστά των HMW, MMW και LMW πολυμερών.

Πίνακας 5. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου με την τεχνική WESTERN BLOT.

Πολυμερή λιπονεκτίνης	Παραγωγική Φάση	Προωορρηκτική φάση	Εκκριτική φάση	P value
HMW (%)	39.64±6.66	36.58±7.18	40.28±5.69	0.318
MMW (%)	22.34±3.19	24.37±3.91	22.71±2.70	0.262
LMW (%)	38.02±3.98	39.03±4.40	37.01±4.01	0.461

Ποσοστιαία έκφραση πολυμερών λιπονεκτίνης στον ορό αίματος



Σχήμα 19. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με την τεχνική WESTERN BLOT. Οι τιμές εκφράζονται % της ολικής λιπονεκτίνης (μέσος όρος τιμών ± τυπική απόκλιση).

Στον πίνακα 6 παρατίθενται τα μέσα επίπεδα της ποσοστιαίας κατανομής των πολυμερών της λιπονεκτίνης, των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, στην παραγωγική φάση του κύκλου, των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και της ομάδας των ανδρών. Είναι φανερό ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην κατανομή των πολυμερών της λιπονεκτίνης στις τρεις ομάδες.

Πίνακας 6. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (πρώτη φάση του κύκλου), μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες, με την τεχνική WESTERN BLOT.

Πολυμερή λιπονεκτίνης	Προεμμηνοπαυ- σιακές γυναίκες	Μετεμμηνοπαυ- σιακές γυναίκες	Άνδρες	P Value
HMW (%)	39.04±6.59	38.41± 6.18	34.37±9.57	0.103
MMW (%)	22.41±3.07	23.54± 2.58	24.72±3.71	0.061
LMW (%)	38.55±4.01	38.05±4.29	40.90±7.16	0.195

Πίνακας 7. Συσχέτιση των δύο μεθόδων στον προσδιορισμό της κατανομής των πολυμερών της λιπονεκτίνης.

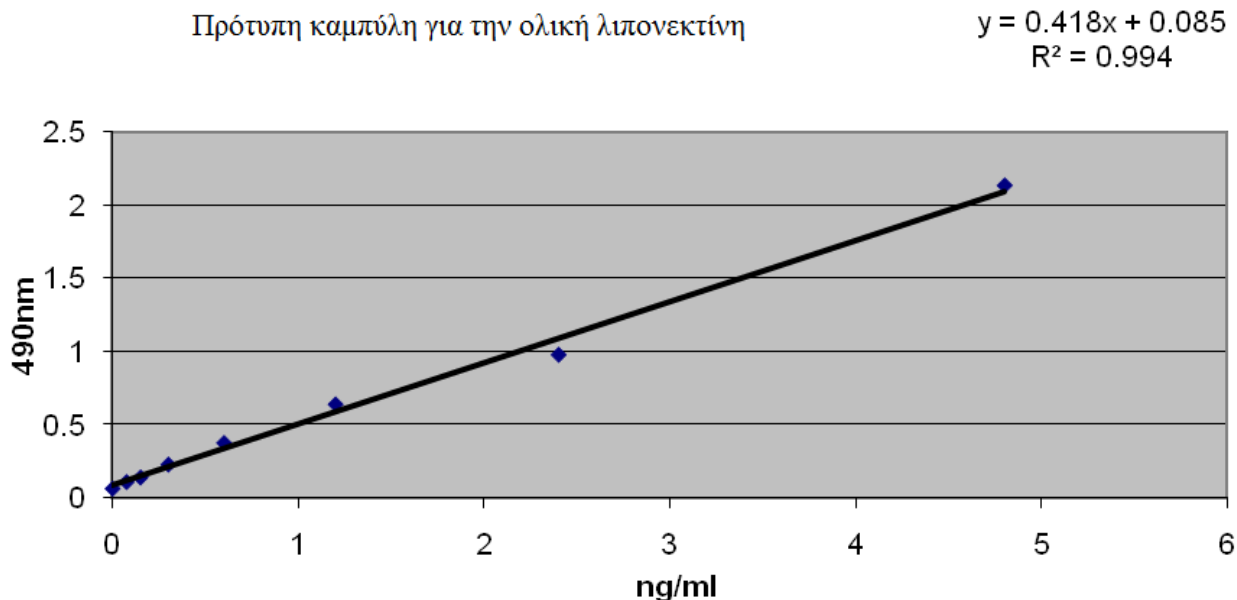
	HMW Elisa	MMW Elisa	LMW Elisa
HMW (WB)	r=0,693 p=0,0001		
MMW (WB)		r=0,395 p=0,006	
LMW (WB)			r=0,751 p=0,0001

Ανάμεσα στις δύο μεθόδους προσδιορισμού των πολυμερών της λιπονεκτίνης παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 7). Επειδή όμως η επαναληψιμότητα στη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης ήταν σχετικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την Elisa αποφασίσθηκε για την εκτίμηση σχέσης στεροειδών και λιπονεκτίνης να χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη δεύτερη μέθοδο.

5.5.2 Αποτελέσματα από Τεχνική ELISA

Πρότυπωση και έλεγχος ακρίβειας της μεθόδου ELISA.

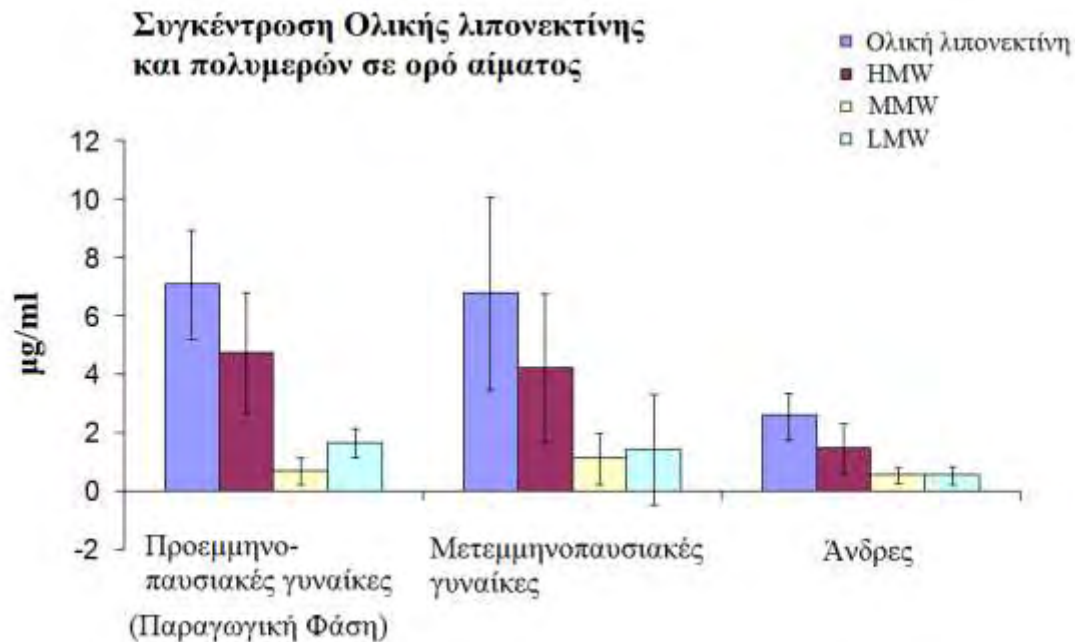
Σύμφωνα με τις μετρήσεις με τη μεθοδολογία ELISA, όπως αναλύεται στο τμήμα της μεθοδολογίας, σχεδιάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις λιπονεκτίνης και την προσδιορισθείσα οπτική πυκνότητα αυτών κατόπιν διεξαγωγής της μεθοδολογίας, ούτως ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των άγνωστων συγκεντρώσεων της λιπονεκτίνης στα μελετηθέντα δείγματα (Σχήμα 20). Η πρότυπη καμπύλη ελέγχθηκε για τη γραμμικότητα της και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 20. Πρότυπη καμπύλη για την τεχνική ELISA. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γνωστών πρότυπων συγκεντρώσεων λιπονεκτίνης που παρείχε ο κατασκευαστής, ούτως ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης λιπονεκτίνης στα προς μέτρηση δείγματα.

Η ολική λιπονεκτίνη του ορού είναι σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα των ανδρών.

Η συνολική συγκέντρωση της λιπονεκτίνης του ορού αίματος στο σύνολο των προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των ανδρών ($p < 0.05$), (Σχήμα 21). Η ολική λιπονεκτίνη ορού για τους άνδρες υπολογίσθηκε 2.59 ± 0.81 $\mu\text{g/ml}$, ενώ για τις προεμμηνοπαυσιακές και εμμηνοπαυσιακές γυναίκες 7.09 ± 1.87 $\mu\text{g/ml}$ και 6.78 ± 3.32 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Στον πίνακα 8 παρατίθενται τα μέσα επίπεδα της κατανομής των πολυμερών της λιπονεκτίνης των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (στην παραγωγική φάση του κύκλου), των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και της ομάδας των ανδρών.



Σχήμα 21. Μέσες τιμές συγκεντρώσεων ($\pm\text{SD}$) της ολικής λιπονεκτίνης ($\mu\text{g/ml}$) στην κυκλοφορία του αίματος των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (παραγωγική φάση), των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και των ανδρών, με την τεχνική ELISA.

Πίνακας 8. Επίπεδα των στεροειδών των γονάδων, της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της στην κυκλοφορία του αίματος στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες, με την τεχνική ELISA.

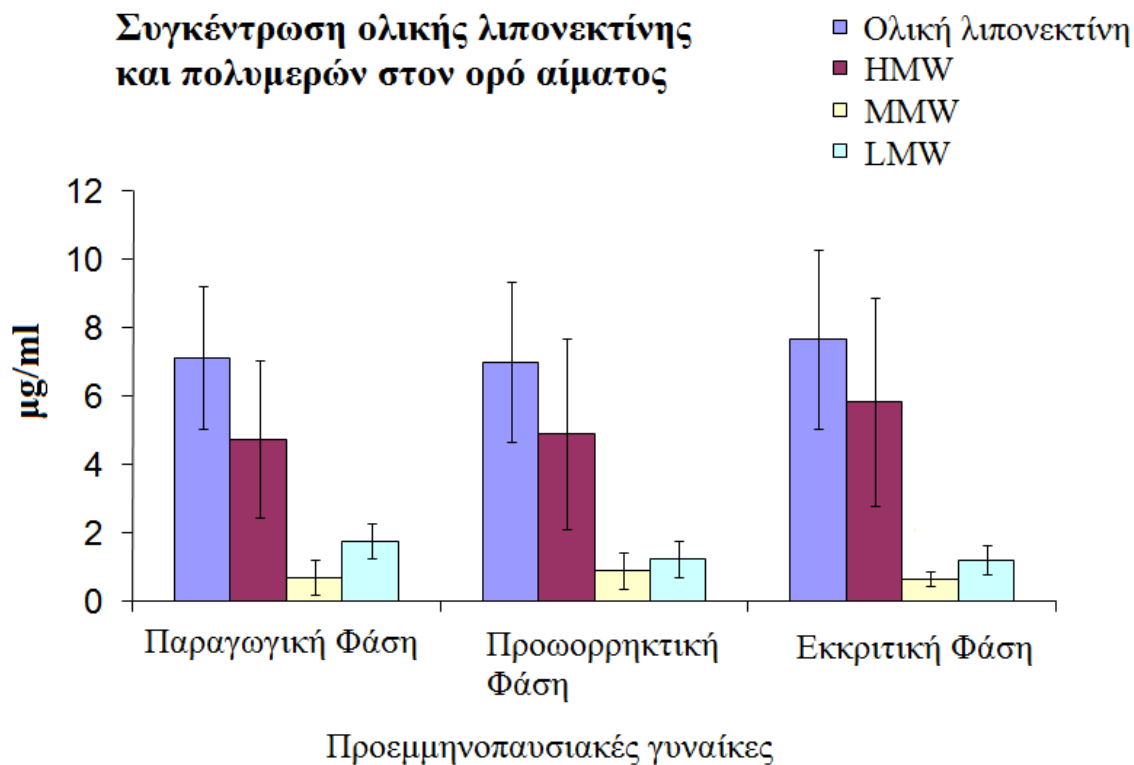
Μεταβλητή	Προεμμηνο- παυσιακές γυναίκες (πρώτη φάση)	Μετεμμηνοπαυ- σιακές γυναίκες	Άνδρες	p Value
Ολική λιπονεκτίνη (μg/ml)	7.09 ± 1.87	6.78 ± 3.32	2.59 ± 0.81	0.001
HMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	4.74 ± 2.06	4.22 ± 2.54	1.48 ± 0.85	0.001
MMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	0.71 ± 0.46	1.11 ± 0.88	0.56 ± 0.26	0.027
LMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	1.65 ± 0.51	1.45 ± 1.90	0.55 ± 0.32	0.056
Αναλογία HMW/ολική λιπονεκτίνη	0.64 ± 0.15	0.61 ± 0.19	0.54 ± 0.18	0.345
HMW λιπονεκτίνη (%)	63.5 ± 15.3	61.3 ± 19.1	54.0 ± 17.7	0.346
MMW λιπονεκτίνη (%)	11.2 ± 8.2	17.8 ± 12.1	23.6 ± 12.7	0.071
LMW λιπονεκτίνη (%)	25.2 ± 11.1	20.9 ± 15.1	22.4 ± 11.9	0.779
Ολική Τεστοστερόνη (ng/ml)	0.36 ± 0.16	0.27 ± 0.17	5.4 ± 1.7	0.001
Ελεύθερη Τεστοστερόνη (ng/dl)	0.47 ± 0.31	0.40 ± 0.28	11.7 ± 3.4	0.001
Βίο-Τεστοστερόνη (ng/dl)	12.2 ± 7.8	10.1 ± 7.1	308 ± 83	0.001
Δείκτης Ελεύθερων Ανδρογόνων	0.72 ± 0.57	0.61 ± 0.46	18.4 ± 4.8	0.001
Οιστραδιόλη (pg/ml)	56.7 ± 29.7	11.7 ± 10.6	24.9 ± 9.6	0.001

Τα στεροειδή των γονάδων κυμαίνονται σε φυσιολογικά πλαίσια για τη κάθε φάση του καταμήνιου κύκλου των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών και συνοδεύονται από όμοια επίπεδα λιπονεκτίνης και των ισομερών αυτής στις εν λόγω φάσεις.

Στον πίνακα 9 παρατίθενται οι μέσες συγκεντρώσεις και τα μέσα επίπεδα της ποσοστιαίας κατανομής των πολυμερών της λιπονεκτίνης των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών στις τρεις φάσεις ωορρηκτικών κύκλων, που επίσης απεικονίζονται στο σχήμα 22 και 23. Είναι εμφανές πως τα ισομερή της λιπονεκτίνης παραμένουν ποσοτικά σταθερά στις τρεις φάσεις του καταμήνιου κύκλου. Όπως παρατηρείται στο σχήμα 22, το κλάσμα HMW αποτελεί ποσοτικά τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα τρία ισομερή και έπονται με σημαντικά χαμηλότερες τιμές τα MMW και LMW ισομερή στις τρεις μελετηθείσες φάσεις.

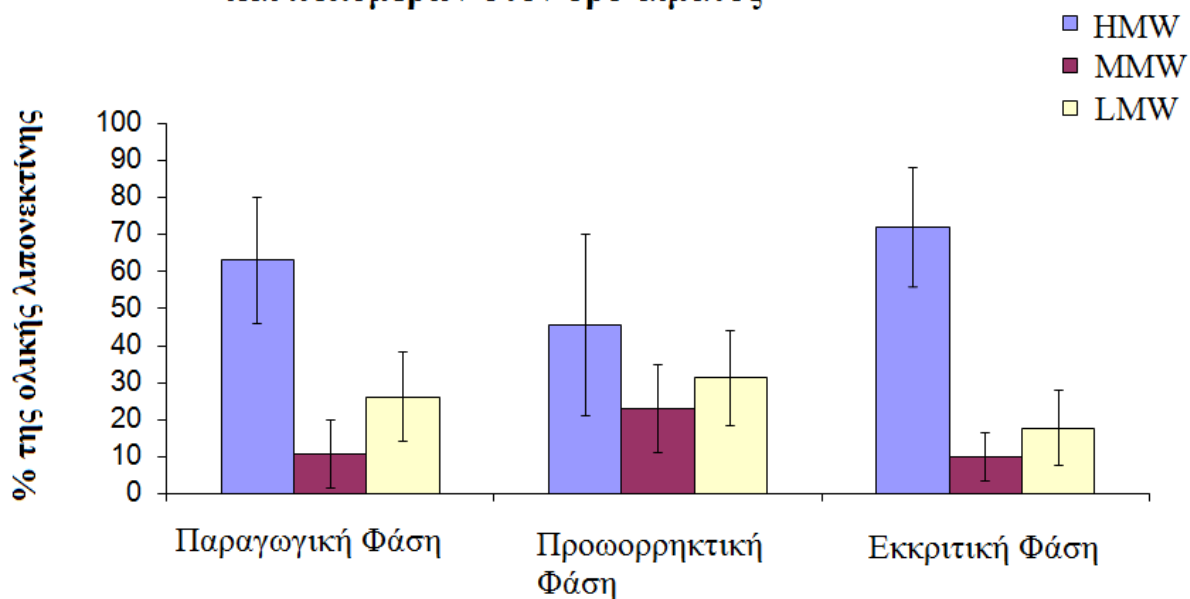
Κατά την ποσοστιαία απεικόνιση των ισομερών της λιπονεκτίνης ως προς την συνολική λιπονεκτίνη, παρατηρείται ομοίως ότι οι τιμές του ποσοστού HMW είναι σημαντικά υψηλότερες των υπόλοιπων ποσοστών MMW και LMW, τα οποία είναι έως και 5 φορές χαμηλότερα, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται σημαντική διακύμανση τιμών για το κάθε κλάσμα στις 3 φάσεις του κύκλου στην ομάδα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

Συγκέντρωση ολικής λιπονεκτίνης και πολυμερών στον ορό αίματος



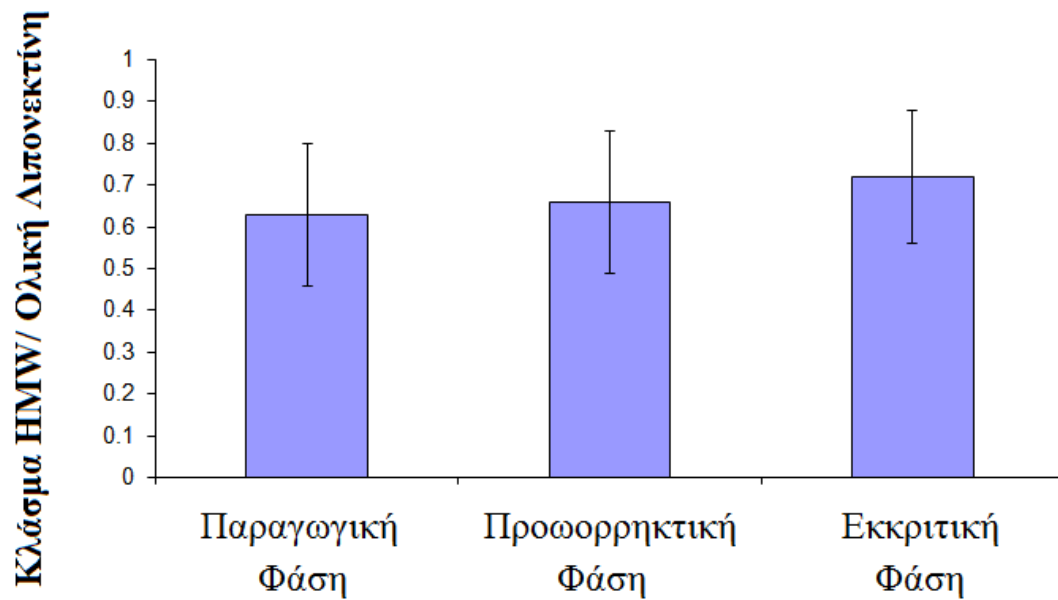
Σχήμα 22. Συγκεντρώσεις (µg/ml) των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με την τεχνική ELISA.

Ποσοστιαία έκφραση λιπονεκτίνης και πολυμερών στον ορό αίματος



Σχήμα 23. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με την τεχνική ELISA.

Η αναλογία ΗΜW λιπονεκτίνη προς ολική λιπονεκτίνη δεν παρουσίασε ουσιαστική διαφορά στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου (p value 0.681) Σχήμα 24.



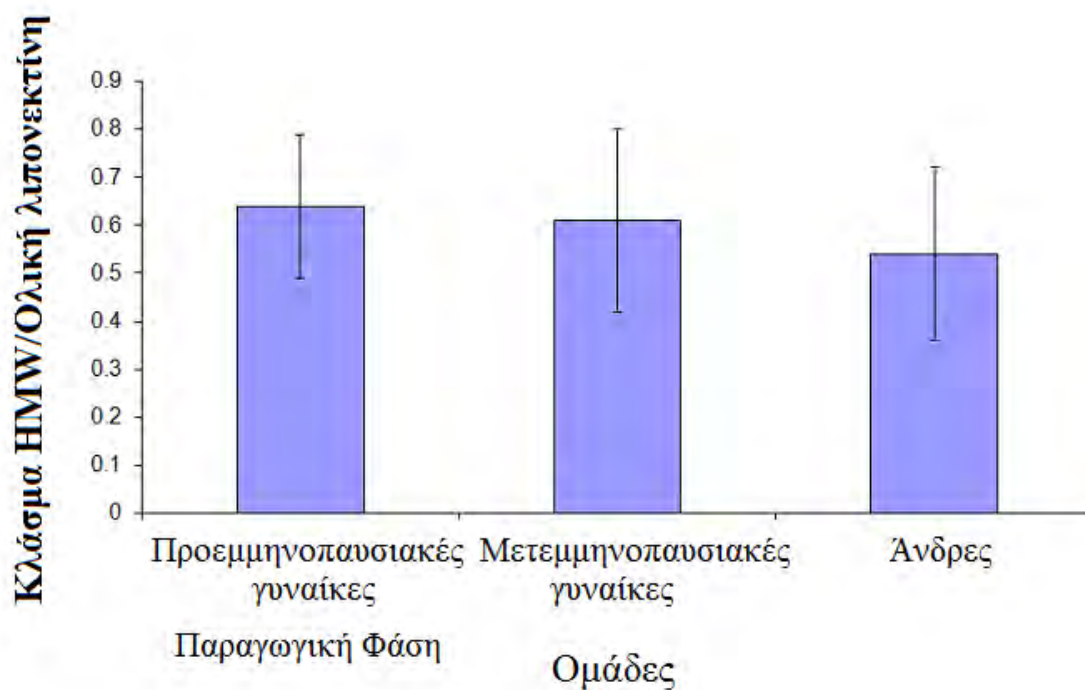
Σχήμα 24. Αναλογία ΗΜW λιπονεκτίνης προς ολική λιπονεκτίνη στις τρεις φάσεις του κύκλου, με την τεχνική ELISA.

Πίνακας 9. Επίπεδα στεροειδών των γονάδων, της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της στην κυκλοφορία του αίματος και δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με την τεχνική ELISA.

Μεταβλητή	Παραγωγική φάση	Προωορρηκτική φάση	Εκκριτική φάση	P value
Οιστραδιόλη (pg/ml)	55.6 ± 19.9	313 ± 144	162 ± 75	0.001
Προγεστερόνη (ng/ml)	0.51 ± 0.27	0.65 ± 0.40	16.9 ± 5.1	0.001
Ολική Τεστοστερόνη (ng/ml)	0.35 ± 0.21	0.39 ± 0.20	0.34 ± 0.25	0.841
Ελεύθερη Τεστοστερόνη (ng/dl)	0.47 ± 0.33	0.48 ± 0.33	0.35 ± 0.19	0.453
Βίο-Τεστοστερόνη (ng/dl)	12.0 ± 8.3	11.9 ± 8.0	8.2 ± 5.2	0.334
Δείκτης Ελεύθερων Ανδρογόνων	0.66 ± 0.61	1.08 ± 1.75	0.54 ± 0.60	0.445
Ολική λιπονεκτίνη (μg/ml)	7.12 ± 2.09	6.99 ± 2.34	7.65 ± 2.62	0.898
HMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	4.71 ± 2.30	4.89 ± 2.79	5.82 ± 3.05	0.791
MMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	0.67 ± 0.51	0.89 ± 0.53	0.64 ± 0.21	0.633
LMW λιπονεκτίνη (μg/ml)	1.74 ± 0.52	1.22 ± 0.54	1.19 ± 0.44	0.196
Αναλογία HMW/ολική λιπονεκτίνη	0.63 ± 0.17	0.66 ± 0.17	0.72 ± 0.16	0.681
HMW adiponectin (%)	63.1 ± 17.1	45.7 ± 24.5	72.2 ± 16.1	0.136
MMW adiponectin (%)	10.7 ± 9.1	23.1 ± 11.8	10.0 ± 6.4	0.083
LMW adiponectin (%)	26.2 ± 12.1	31.3 ± 12.9	17.8±10.0	0.227
HOMA-R	2.1 ± 2.0	1.6 ± 0.8	1.9 ± 0.7	0.664

Τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της ήταν παρόμοια στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (τρεις φάσεις) και τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (όπως αναγράφονται στους Πίνακες 8 και 9).

Η αναλογία HMW λιπονεκτίνη προς ολική λιπονεκτίνη ήταν παρόμοια για τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και τους άνδρες (p value 0.345, Σχήμα 25).

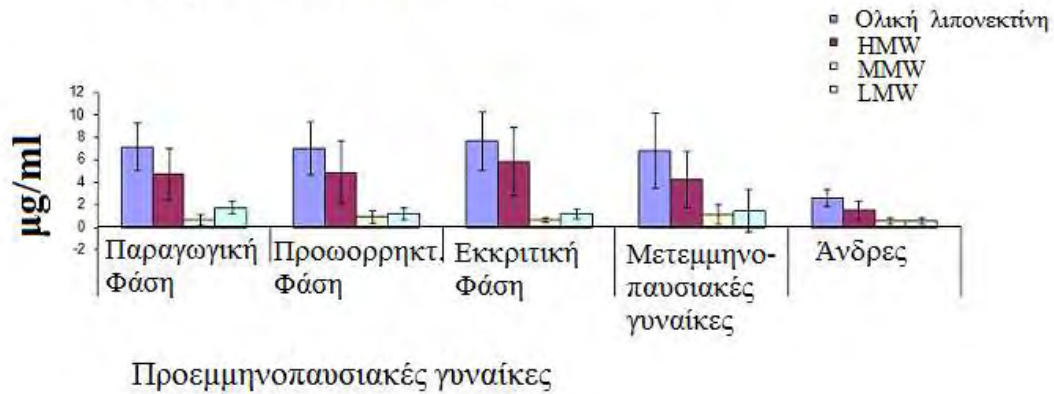


Σχήμα 25. Αναλογία HMW λιπονεκτίνης προς ολική λιπονεκτίνη στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (παραγωγική φάση), τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και τους άνδρες, με την τεχνική ELISA.

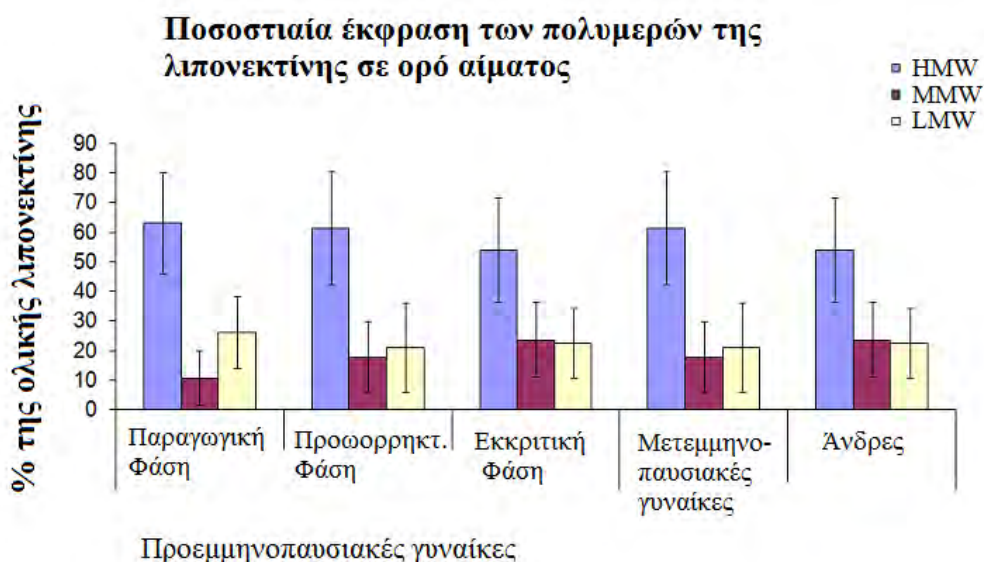
6. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην ομάδα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων της λιπονεκτίνης ή των ισομερών της με τα φυλετικά στεροειδή, την ινσουλίνη και τα επίπεδα γλυκόζης ή τη σύσταση του σώματος και το δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA-R. Αντίθετα, σύνολο των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη, τα επίπεδα της ολικής και HMW λιπονεκτίνης στο αίμα, σχετίζονταν θετικά με την ηλικία, και τα επίπεδα της SHBG και αρνητικά με τα επίπεδα των ανδρογόνων, τα επίπεδα της προγεστερόνης και το λόγο W/H (περιμέτρου μέσης προς γλουτούς). Στην ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης, μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, το φύλο και τα επίπεδα της SHBG και της προγεστερόνης, προγνωστικοί παράγοντες των επιπέδων της ολικής λιπονεκτίνης πλάσματος ήταν ο λόγος W/H και τα επίπεδα των ανδρογόνων ($p=0.016$). Ο λόγος W/H και τα επίπεδα της ελεύθερης τεστοστερόνης δικαιολογούσαν το 59,5% της διακύμανσης της ολικής λιπονεκτίνης με τον λόγο να προβλέπει το 52,1% της διακύμανσης. Όταν χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των HMW της λιπονεκτίνης ως ανεξάρτητη μεταβλητή, τα επίπεδα των ανδρογόνων ήταν ο μοναδικός παράγοντας πρόβλεψης ερμηνεύοντας το 31,1% της διακύμανσης των HMW πολυμερών της λιπονεκτίνης ($p=0,001$). Ο λόγος HMW/ολική λιπονεκτίνη δεν συσχετιζόταν με καμία από τις παραμέτρους που συμπεριλήφθηκαν στο μοντέλο της ανάλυσης.

Συγκέντρωση Ολικής λιπονεκτινής και πολυμερών σε ορό αίματος



Σχήμα 26. Συγκεντρώσεις (µg/ml) των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των ανδρών, μετεμηνόπαυσιακών γυναικών, και στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, με την τεχνική ELISA.



Σχήμα 27. Ποσοστιαίες συγκεντρώσεις των πολυμερών της λιπονεκτίνης στην κυκλοφορία του αίματος των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου), των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και των ανδρών, με την τεχνική ELISA.

Τα σχήματα 26 και 27 απεικονίζουν συγκεντρωτικά τις παρατηρήσεις της παρούσας διατριβής και αφορούν στην ποσοτική και ποσοστιαία απεικόνιση των τιμών της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της σε όλες τις μελετηθείσες ομάδες, με την τεχνική ELISA.

Συνεπώς, η ολική λιπονεκτίνη καθώς και το ισομερές HMW είναι σημαντικά μειωμένα στον ορό αίματος της ομάδας των ανδρών εν αντιθέσει με τα ισομερή MMW και LMW τα οποία βρίσκονται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε όλες τις ομάδες της μελέτης. Οι ομάδες των γυναικών, προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές, παρουσίασαν όμοια και υψηλά επίπεδα λιπονεκτίνης.

Στο σχήμα 26, όπου απεικονίζεται η ποσοτική συγκέντρωση των ισομερών της λιπονεκτίνης, παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένο το HMW ισομερές στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και στις 3 φάσεις και μάλιστα είναι σημαντικά (p value 0.001) διαφορετικό από το ανάλογο των ανδρών ($4.74 \pm 2.06 \mu\text{g/ml}$, $1.48 \pm 0.85 \mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα). Οι τιμές των χαμηλότερου μοριακού βάρους ισομερών της λιπονεκτίνης δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των ομάδων.

Στο σχήμα 27, όπου απεικονίζεται η ποσοστιαία αναλογία των ισομερών ως προς τη συνολική λιπονεκτίνη, παρατηρείται αυξημένο το ποσοστό ΗΜW στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και στις 3 φάσεις και στις μετεμμηνοπαυσιακές και μάλιστα είναι διαφορετικό από το ανάλογο των ανδρών. Οι ποσοστιαίες τιμές των χαμηλότερου μοριακού βάρους ισομερών της λιπονεκτίνης δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των ομάδων.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλλαγή του μεταβολικού προφίλ και της καρδιαγγειακής ομοιοστασίας του γυναικείου πληθυσμού μετά την εμμηνόπαυση καθώς και η αύξηση των ανάλογων νοσημάτων σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του ανδρικού πληθυσμού, έχουν θέσει πολλές φορές το ερώτημα για το αν υπάρχει συσχέτιση των στεροειδών των γονάδων με την προστασία του καρδιαγγειακού και την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού και την εμπλοκή του λιπώδους ιστού. Αν και οι επιστημονικές παρατηρήσεις είναι αρκετά πρώιμες και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, υπάρχει ένας ικανός αριθμός παρατηρήσεων και δεδομένων που έχει καθιερώσει τα οιστρογόνα ως καρδιοπροστατευτικούς παράγοντες και ευνοϊκούς ρυθμιστές του μεταβολισμού των γυναικών. Η λιπονεκτίνη αποτελεί ένα νεομελετηθέν βιομόριο, που συνδέεται με ένα υγιές εκκριτικό προφίλ του λιπώδους ιστού ανάλογα με τις τιμές που λαμβάνει καθώς και με τα ισομερή της που εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Στην μελέτη που διεξήχθη στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις τρεις φάσεις του καταμήνιου κύκλου, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες, ως προς τα ολικά επίπεδα λιπονεκτίνης αλλά και τα επιμέρους πολυμερή της, τα βιομετρικά χαρακτηριστικά τους και το βιοχημικό και ορμονικό προφίλ τους.

Σημαντικά χαμηλότερη ήταν η ολική ποσότητα λιπονεκτίνης και κατά συνέπεια και των κλασμάτων της, στην ομάδα των ανδρών συγκριτικά με την ομάδα των γυναικών και των δύο ομάδων, δηλαδή τις μετεμμηνοπαυσιακές και τις προ-εμμηνοπαυσιακές. Αντιθέτως οι γυναίκες δεν παρουσίασαν σημαντικά διαφορετικές τιμές στα ισομερή, στα οποία τα MMW και LMW μετρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την ολική λιπονεκτίνη και τα HMW, σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου ELISA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου Western Blot παρατηρήθηκε μια ομοιομορφία των τιμών στα ποσοστιαία κλάσματα HMW και LMW, εν αντιθέσει με τα MMW, τα οποία ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε όλες τις πληθυσμιακές μελετηθείσες ομάδες. Το γεγονός αυτό πιθανολογείται να αποδίδεται στο μη σωστό διαχωρισμό των μονομερών κατά την εκτέλεση των μετρήσεων που ακολούθως επέφερε μείωση της ευαισθησίας ακριβούς προσδιορισμού τους, παρ'όλες τις προσπάθειες που κατεβλήθησαν με τη χρήση διαφόρων αποδιατακτικών παραγόντων [403]. Για αυτό το λόγο ακολούθησε προσδιορισμός των ισομερών με την ειδικού τύπου

τεχνική ELISA όπου εφαρμόζεται σταδιακή μέτρηση των ισομερών με αρκετά μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα, σύμφωνα με τον κατασκευαστή αλλά και όπως παρατηρήθηκε κατά τη δοκιμαστική προτύπωση σε δείγματα της εν λόγω μελέτης.

Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν πως κατά τη διάρκεια των τριών φάσεων του καταμήνιου κύκλου τα ισομερή της λιπονεκτίνης δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη βιβλιογραφία [378-380], κατά την οποία τα φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου δεν επηρεάζουν τα επίπεδα λιπονεκτίνης. Επίσης η εξωγενώς χορηγούμενη οιστραδιόλη σε γυναίκες με εκτομή ωοθηκών δεν μεταβάλλει τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης [366]. Ακόμα και σε μοριακό επίπεδο, σε *in vitro* μελέτη προσθήκης οιστραδιόλης σε καλλιέργεια λιποκυττάρων, που αποτελούν τη κύρια θέση σύνθεσης λιπονεκτίνης [404], δεν μεταβλήθηκε το mRNA της λιπονεκτίνης ή η ενδοκυτταρική έκφραση και έκκριση των ισομερών της λιπονεκτίνης [391]. Ωστόσο, αν και στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των οιστρογόνων μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με την ολική λιπονεκτίνη και τα πολυμερή της, δεν παρατηρήθηκε κατασταλτική δράση των οιστρογόνων στις συνολικές συγκεντρώσεις λιπονεκτίνης, το οποίο παρατηρήθηκε από άλλους μελετητές σε τρωκτικά και σε λιποκύτταρα [360], όπως και σε μια ανεξάρτητη αρνητική συσχέτιση των οιστρογόνων με την ολική λιπονεκτίνη σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες χωρίς ιστορικό διαβήτη στη μελέτη των Ganjila και συν. [370]. Αν και ήταν εμφανής η διαφορά στις τιμές οιστραδιόλης στις προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν ακολούθησε αυτή την τάση και η συγκέντρωση της ολικής λιπονεκτίνης και των ισομερών της. Το γεγονός ότι η χορήγηση οιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συνοδεύεται από αύξηση, μείωση ή αμετάβλητες τιμές της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της [366, 367, 371, 372] πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό σχεδιασμό κάθε μελέτης καθώς και στην εμπλοκή παραγόντων όπως η ηλικία [363], τα ανδρογόνα [373, 374], η προλακτίνη [360], η ινσουλινοαντίσταση [375], το σωματικό βάρος [16], η φυσική δραστηριότητα [376] και η κατανάλωση τροφής [360, 377], τα οποία παρέμειναν σταθερά στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων της μελέτης μας με τη μελέτη των Leung και συν. όπου παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των HMW και MMW της λιπονεκτίνης και των επιπέδων οιστρογόνων και προγεστερόνης [365] πιθανόν να οφείλεται στον αποκλεισμό των εγκύων γυναικών που έχουν υψηλότερες τιμές οιστρογόνων και προγεστερόνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπους και σε τρωκτικά, κατά τις οποίες συγκρίνονταν οι τιμές λιπονεκτίνης σε άρρεν και θήλυ πληθυσμό με όμοιο BMI και ηλικία, παρατηρήθηκε ότι τα άρρενα άτομα έφεραν χαμηλότερα επίπεδα λιπονεκτίνης και το γεγονός αποδόθηκε στις διαφορετικές φυλετικές ορμόνες [358-362]. Ομοίως, και στην παρούσα μελέτη μετρήθηκε η λιπονεκτίνη του αίματος στον ανδρικό πληθυσμό να είναι σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με το γυναικείο πληθυσμό σε αμφότερες προ- και μετεμμηνοπαυσιακές φάσεις των γυναικών. Επιπλέον, στην ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης και στις τρεις πληθυσμιακές ομάδες, ο λόγος W/H (waist/hip, λόγος περιμέτρων μέσης προς γλουτούς) και τα επίπεδα τεστοστερόνης ήταν ανεξάρτητοι αρνητικοί δείκτες των συνολικών επιπέδων λιπονεκτίνης. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε η HMW λιπονεκτίνη ως ανεξάρτητη μεταβλητή, τα ανδρογόνα ήταν οι μοναδικοί δείκτες πρόβλεψης (predictors).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με δημοσιευμένες μελέτες κατά τις οποίες διαφαίνεται ο ανασταλτικός ρόλος των ανδρογόνων στα κυκλοφορούντα ολικά επίπεδα λιπονεκτίνης. Η στειρώση άρρενων ποντικών και η γοναδεκτομή σε αρουραίους αμφότερων φύλων, συνοδεύτηκε με αύξηση των επιπέδων λιπονεκτίνης στο πλάσμα η οποία ανεστράφη με τη χορήγηση τεστοστερόνης [358, 362] γεγονός που αποκαλύπτει τη διαφορετική συγκέντρωση της λιπονεκτίνης σε άρρενα και θήλεα άτομα με ταυτόχρονη διατήρηση σταθερών των επιπέδων HMW στα δύο φύλα [362]. Η ανασταλτική δράση των ανδρογόνων στα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης ήταν όμοια τόσο κατά την χρήση τεστοστερόνης εστεροποιημένης (enanthate) όσο και μη αρωματοποιημένων ανδρογόνων, οι οποίες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα δεν εμπλέκονται στην εν λόγω δράση [362]. Ομοίως, σε λιποκύτταρα της κυτταρικής σειράς 3T3-L1, η προσθήκη τεστοστερόνης και διϋδροτεστοστερόνης ελάττωσαν την έκκριση λιπονεκτίνης στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά [358], υποδηλώνοντας μια αρνητική συσχέτιση στα λιποκύτταρα η οποία παρατηρήθηκε και στους ανθρώπους. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι η πειραματικώς προκαλούμενη ανεπάρκεια τεστοστερόνης σε φυσιολογικούς άνδρες συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των επιπέδων της λιπονεκτίνης, εντός ολίγων ημερών, το οποίο αποτέλεσμα απετράπη από την αντικατάσταση της τεστοστερόνης χωρίς να μεταβληθεί το BMI [374] ενώ η αλλαγή φύλου από θήλυ σε άρρεν συνοδεύτηκε από μείωση της λιπονεκτίνης με ακόλουθη χορήγηση τεστοστερόνης [386]. Ακόμα, σε αγόρια εφηβικής ηλικίας, τα ανδρογόνα συνδέονται με μια σταδιακή μείωση των επιπέδων λιπονεκτίνης σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά των μετεφηβικών κοριτσιών [387].

Σύμφωνα με μελέτες σε ενήλικα άτομα, τα επίπεδα λιπονεκτίνης ελαττώνονται καθώς αυξάνεται ο βαθμός παχυσαρκίας και η εν λόγω ελάττωση φαίνεται να προηγείται της ανάπτυξης ινσουλινοαντίστασης, των μεταβολικών διαταραχών και του διαβήτη [370, 387, 405,406]. Ειδικότερα, σε επιδημιολογικές μελέτες, η κεντρική λιπώδης μάζα συνδέεται στενότερα με την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και καρδιαγγειακών νοσημάτων [407]. Ο λόγος W/H αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη κεντρικής παχυσαρκίας και στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο συγκεκριμένος λόγος είναι ένας ανεξάρτητος αρνητικός δείκτης της ολικής λιπονεκτίνης και βρίσκεται σε συμφωνία και με αρκετές μελέτες [367, 370, 408] αλλά όχι και το σύνολο αυτών [362, 409]. Η ελάττωση του λιπώδους ιστού και του συνολικού σωματικού λίπους μετά τη χορήγηση τεστοστερόνης σε νέους και μεγαλύτερους ηλικιακά άνδρες [386, 410] καθώς και η ελάττωση της λιπονεκτίνης στον υπογοναδισμό [361, 373, 411] και τον ευγοναδισμό [374] σε άνδρες πιθανόν να αποδεικνύει την επίδραση της τεστοστερόνης στην έκκριση και το μεταβολισμό της λιπονεκτίνης με τέτοιο τρόπο που συνδέεται άμεσα με τη παχυσαρκία.

Η παρατήρηση της παρούσας μελέτης σχετικά με τη χαμηλή συγκέντρωση της HMW λιπονεκτίνης στον άρρενα πληθυσμό συγκριτικά με τις προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες επιβεβαιώνει προηγούμενες αναφορές [358, 361] γεγονός που προσδίδει φυλετικό διμορφισμό στην έκφραση της λιπονεκτίνης. Ο Xu και συν. αναφέρει ότι η τεστοστερόνη αναστέλλει εκλεκτικά την έκκριση HMW λιπονεκτίνης [361] και αυτή η δράση είναι η κύρια αιτία για το φυλετικό διμορφισμό σε ανθρώπους και τρωκτικά και ερμηνεύει μερικώς την ευπάθεια των αρρένων ατόμων στην ινσουλινοαντίσταση και στην μειωμένη απόκριση σε πιογλιταζόνη.

Ο ρόλος των στεροειδών των γονάδων στην έκφραση της λιπονεκτίνης, στην κυτταρική μεταφορά και το μεταβολισμό των λιποκυττάρων δεν είναι γνωστός. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα σε συνδυασμό με πιογλιταζόνη αυξάνουν σημαντικά ή μειώνουν, αντίστοιχα, την έκφραση του PPAR γ σε 3T3-L1 λιποκύτταρα κατόπιν μακροπρόθεσμης έκθεσης [392]. Η συγκεκριμένη παρατήρηση συνδυαστικά με την μελέτη ότι οι αγωνιστές PPAR γ αυξάνουν τα ισομερή HMW στα λιποκύτταρα και ρυθμίζουν ένα ζεύγος πρωτεϊνών-συνοδών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, πιθανόν να δείχνει πως τα στεροειδή των γονάδων λειτουργούν ως έμμεσοι, αρνητικοί ρυθμιστές της έκκρισης των HMW και επηρεάζονται από αγωνιστές PPAR γ και άλλους παράγοντες [393]. Έχει επίσης διαπιστωθεί

πως η λιπονεκτίνη εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα μέσω δύο διακριτών μονοπατιών: ένα συνεχές και ένα ρυθμιζόμενο [394]. Τα συγκριτικά ελαφρώς διαφορετικά επίπεδα των ΗΜW στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου στη μελέτη μας, πιθανόν να δείχνουν την ανάγκη για μακροπρόθεσμη έκθεση στα οιστρογόνα. Η εις βάθος κατανόηση του μηχανισμού σύνδεσης των στεροειδών των γονάδων και της λιπονεκτίνης είναι ένα προς μελέτη πεδίο με πολλά ερωτηματικά που μπορούν να αποσαφηνισθούν.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι συγκεντρώσεις της ολικής λιπονεκτίνης και των πολυμερών της φαίνονται να παραμένουν σταθερές στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου με συγκεντρώσεις όμοιες με εκείνες των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και διαφορετικές από αυτές των ανδρών. Οι διαφορές αφορούν τις συγκεντρώσεις της ολικής λιπονεκτίνης καθώς και το ΗΜW πολυμερές. Τα αποτελέσματα μας ως προς τα επίπεδα της ολικής λιπονεκτίνης, είναι σύμφωνα με άλλες δημοσιεύσεις, και παρουσιάζουν εμφανή φυλετικό διμορφισμό της λιπονεκτίνης. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται ο φυλετικός διμορφισμός δεν έχει ακόμα/πλήρως διαλευκανθεί. Η επίδραση των ανδρογόνων μοιάζει να καθορίζει τον φυλετικό διμορφισμό.

9. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διατριβή εξέτασε τις ποσοτικές και ποσοστιαίες συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης και των πολυμερών της στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και τους άνδρες. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές των συγκεντρώσεων των πολυμερών της λιπονεκτίνης, ανάλογες με τις παρατηρηθείσες διακυμάνσεις των φυλετικών ορμονών κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου, χωρίς όμως να αποκλείουν το γεγονός ότι η μακροπρόθεσμη έκθεση σε οιστρογόνα θα προκαλούσε διαφορετική επίδραση στις συγκεντρώσεις αυτές. Επίσης, η μελέτη αφορούσε συγκεντρώσεις της λιπονεκτίνης στον ορό αίματος και όχι τοπικές συγκεντρώσεις λιπονεκτίνης στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στις ωοθήκες οικόσιτων χοίρων τα επίπεδα της λιπονεκτίνης μεταβάλλονταν από τα φυλετικά στεροειδή με υψηλότερα επίπεδα της λιπονεκτίνης κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης και τα χαμηλότερα επίπεδα στην παραγωγική φάση, υποδεικνύοντας τη διεγερτική δράση της προγεστερόνης και την ανασταλτική δράση της οιστραδιόλης στην παραγωγή της λιπονεκτίνης στις ωοθήκες, πιθανόν με άμεση επίδραση λόγω της ύπαρξης των υποδοχέων της λιπονεκτίνης στις ωοθήκες. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μέτρηση των πολυμερών της λιπονεκτίνης, όχι μόνο των ολικών

συγκεντρώσεων, γεγονός το οποίο θα διαλεύκανε την άμεση επίδραση των φυλετικών ορμονών στην έκφραση και έκκριση τόσο της λιπονεκτίνης όσο και των ισομερών της.

Επίσης, η μελέτη των συγκεντρώσεων της λιπονεκτίνης και των πολυμερών της στις τρεις φάσεις του γυναικείου καταμήνιου κύκλου σε μεγαλύτερη ομάδα γυναικών, συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων όπως η ηλικία, τα ανδρογόνα, η προλακτίνη, η ινσουλινοαντίσταση, το σωματικό βάρος, η φυσική δραστηριότητα και η κατανάλωση τροφής, τα οποία παρέμειναν σταθερά στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να έδινε διαφορετικά αποτελέσματα.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF “A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes“, *J Biol Chem* 1995; 270:26746-26749.
2. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazada T, Tomita M “Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma“, *J Biochem* 1996 :120:803–812.
3. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K “cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1) “, *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Apr 16; 221(2):286-9.
4. Shapiro, L and Scherer, P. E. (1998) “The crystal structure of a complement-1 q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor“, *Curr. Biol.* 8 335-338.
5. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al. “Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin“. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24: 861–868.
6. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoaka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. “Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity“. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 2;257(1):79-83.
7. Michael M. Swarbrick, Ph.D. and Peter J. Havel, D.V.M., Ph.D. *Physiological, Pharmacological, and Nutritional Regulation of Circulating Adiponectin Concentrations in Humans.* *Metab Syndr Relat Disord.* Jun 2008; 6(2): 87–102.
8. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. “Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin“. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10; 278(41):40352-63. Epub 2003 Jul 23.
9. Tsu-Shuen Tsao, Eva Tomas, Heather E. Murrey, Christopher Hug, David H. Lee, Neil B. Ruderman, John E. Heuser, Harvey F. “Lodish. *Role of Disulfide Bonds in Acrp30/Adiponectin*

Structure and Signaling Specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathway. December 12, 2003. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 50810-50817.

10. Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M., Scherer, P. E. (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity *J. Biol. Chem.* 278, 9073-9085.

11. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2005–2010, 2001.

12. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T 2005 Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146:790–796.

13. Philip W Peake, Adamandia D Kriketos, Lesley V Campbell, Yvonne Shen and John A Charlesworth. The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals. *European Journal of Endocrinology*, Vol 153, Issue 3, 409-417, 2005.

14. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara, K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* [Erratum (2004) 431:1123] 423:762–769.

15. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT: Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46:1369–1379, 2005.

16. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439–451, 2005.

17. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss T, Kirchner S, Laberer S, Schölmerich J, Buechler C. Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 2; 334(3):924-9.
18. Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1118–1122, 2003.
19. Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy *Eur Heart J*. 2008 May; 29(9):1168-80. Epub 2008 Apr 3.
20. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 35: 842–849, 2004.
21. Coope A, Milanski M, Araújo EP, Tambascia M, Saad MJ, Geloneze B, Velloso LA. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett* 582: 1471–1476, 2008.
22. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6: 55–68, 2007.
23. Matthias Blüher, Catherine J. Williams, Nora Klöting, Alex Hsi, Karen Ruschke, Andreas Oberbach, Mathias Fasshauer, Janin Berndt, Michael R. Schön, Alicja Wolk, Michael Stumvoll, and Christos S. Mantzoros. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care*. 2007 December; 30(12): 3110–3115.
24. Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPAR α , PPAR γ , and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 151–158, 2004.

25. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H, Uozaki H, Fukayama M, Nakajima A. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncol Rep.* 2008 Sep; 20(3):479-83.
26. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, Ouedraogo R, Hough K, McCue P, Chan L, Falkner B, Goldstein BJ. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118: 1645–1656, 2008.
27. J. Eduardo Caminos, Rubén Nogueiras, Rosalía Gallego, Susana Bravo, Sulay Tovar, Tomás García-Caballero, Felipe F. Casanueva and Carlos Diéguez. Expression and Regulation of Adiponectin and Receptor in Human and Rat Placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* July 1, 2005 vol. 90 no. 7 4276-4286.
28. Marina Miller, Jae Youn Cho, Alexa Pham, Joe Ramsdell and David H. Broide Adiponectin and Functional Adiponectin Receptor 1 Are Expressed by Airway Epithelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease¹. *The Journal of Immunology* January 1, 2009 vol. 182 no. 1 684-691.
29. Caminos JE, Nogueiras R, Gaytán F, Pineda R, González CR, Barreiro ML, Castaño JP, Malagón MM, Pinilla L, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M. Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology.* 2008 Jul; 149(7):3390-402. Epub 2008 Apr 10.
30. Ocón-Grove OM, Krzysik-Walker SM, Maddineni SR, Hendricks GL 3rd, Ramachandran R. Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken testis: influence of sexual maturation on testicular ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA abundance. *Reproduction.* 2008 Nov; 136(5):627-38. Epub 2008 Jul 25.
31. Ding ST, Liu BH, Ko YH. Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs. *J Anim Sci.* 2004 Nov; 82(11):3162-74.

32. Civitarese, A.E., Jenkinson, C.P., Richardson, D., Bajaj, M., Cusi, K., Kashyap, S., Berria, R., Belfort, R., DeFronzo, R.A., Mandarino, L.J. and Ravussin, E. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. (2004) *Diabetologia* 47, 816–820.
33. Tsuchida, A., Yamauchi, T., Ito, Y., Hada, Y., Maki, T., Takekawa, S.: Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity (2004) *J. Biol. Chem* 279, 30817–30822.
34. Inukai, K., Nakashima, Y., Watanabe, M., Takata, N., Sawa, T., Kurihara, S., Awata, T. and Katayama, S.: Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. (2005) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E876–E882.
35. Fang, X., Rengasamy, P., Zhou, X., Liu, Y., Xu, A., Wang, Y. and Sweeney, G. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. (2005) *J. Mol. Endocrinol.* 35, 465–476.
36. Christopher Hug, Jin Wang, Naina Shehzeen Ahmad, Jonathan S. Bogan, Tsu-Shuen Tsao, and Harvey F. Lodish: T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *PNAS* 2004; 101; 10308-10313.
37. Ranscht, B. & Dours-Zimmermann, M. T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. (1991) *Neuron* 7, 391–402.
38. Ivanov, D., Philippova, M., Antropova, J., Gubaeva, F., Iljinskaya, O., Tararak, E., Bochkov, V., Erne, P., Resink, T. & Tkachuk, V. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. (2001) *Histochem. Cell Biol.* 115, 231–242.
39. Kudrjashova, E., Bashtrikov, P., Bochkov, V., Parfyonova, Y., Tkachuk, V., Antropova, J., Iljinskaya, O., Tararak, E., Erne, P., Ivanov, D., et al. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis . (2002) *Histochem. Cell Biol.* 118, 281–290.

40. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B, 2010 T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* 120: 4342-4352.
41. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002 Nov; 8(11):1288-95.
42. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8: 516–523, 2006.
43. Hardie DG, Carling D, Carlson M: The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998, 67:821-855.
44. Winder WW, Hardie DG: The AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999, 277:E1-E 10.
45. Muoio D, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA 1999 AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 338:783–791.
46. Eva Tomas, Tsu-Shuen Tsao, Asish K. Saha, Heather E. Murrey, Cheng Cheng Zhang, Samar I. Itani, Harvey F. Lodish, and Neil B. Ruderman: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl–CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 December 10; 99(25): 16309–16313. Published online 2002 November 27. doi: 10.1073/pnas.222657499. PMID: PMC138607. *Physiology*.
47. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1–13, 2000.

48. Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferators-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control. *J Soc Biol* 196(1): 47-52 2002.
49. Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor. *Diabetes* 55: 2562–2570, 2006.
50. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8: 971–982, 2001.
51. Cheng KK, Lam KS, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C, Xu A. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 56: 1387–1394, 2007.
52. Sathyaseelan S. Deepa , Lily Q. Dong. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published 1 January 2009 Vol. 296 no. 1, E22-E36 DOI: 10.1152/ajpendo.90731.2008.
53. Yu Wang, Karen S. L. Lam, Jian Yu Xu, Gang Lu, Lance Yi Xu, Garth J. S. Cooper, Aimin Xu. Adiponectin Inhibits Cell Proliferation by Interacting with Several Growth Factors in an Oligomerization-dependent Manner. May 6, 2005 *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 18341-18347.
54. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res.* 2000 Feb; 32(2):47-50.
55. Y. Arita, MD, PhD; S. Kihara, MD, PhD; N. Ouchi, MD, PhD; K. Maeda, MD, PhD; H. Kuriyama, MD, PhD; Y. Okamoto, MD; M. Kumada, MD; K. Hotta, MD, PhD; M. Nishida, MD, PhD; M. Takahashi, MD, PhD; T. Nakamura, MD, PhD; I. Shimomura, MD, PhD; M.

Muraguchi, PhD; Y. Ohmoto, PhD; T. Funahashi, MD, PhD; Y. Matsuzawa, MD, PhD. Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin Acts as a Platelet-Derived Growth Factor-BB-Binding Protein and Regulates Growth Factor-Induced Common Postreceptor Signal in Vascular Smooth Muscle Cell. *Circulation*. 2002;105:2893.

56. Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Aug; 15(4):275-86.

57. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Dec; 11(4):335-44.

58. Wahl SM, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cell Biochem*. 1989 Jun; 40(2):193-9.

59. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev*. 2004 Aug; 5(3):153-65.

60. Riba R, Hughes CE, Graham A, Watson SP, Naseem KM. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost*. 2008 Jun; 6(6):1012-20. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02982.x. Epub 2008 Apr 16.

61. N. Ouchi, MD; S. Kihara, MD, PhD; Y. Arita, MD; M. Nishida, MD, PhD; A. Matsuyama, MD; Y. Okamoto, MD; M. Ishigami, MD, PhD; H. Kuriyama, MD, PhD; K. Kishida, MD; H. Nishizawa, MD; K. Hotta, MD, PhD; M. Muraguchi; Y. Ohmoto, PhD; S. Yamashita, MD, PhD; T. Funahashi, MD, PhD; Y. Matsuzawa, MD, PhD Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation*. 2001; 103:1057.

62. Ebba Bråkenhielm, Niina Veitonmäki, Renhai Cao, Shinji Kihara, Yuji Matsuzawa, Boris Zhivotovsky, Tohru Funahashi, and Yihai Cao. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *PNAS*, February 24, 2004; vol. 101: no.8: 2476-2481.

63. T.P. Combs, A.H. Berg, S. Obici, P.E. Scherer, L. Rossetti, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1875e1881.
64. R. B. Ceddia, R. Somwar, A. Maida, X. Fang, G. Bikopoulos, G. Sweeney. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* January 2005, Volume 48, Issue 1, pp 132-139.
65. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF (May 1988). "Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein". *Nature* 333 (6169): 183–5.
66. James DE, Strube M, Mueckler M (March 1989). "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter". *Nature* 338 (6210): 83–7.
67. Birnbaum MJ (April 1989). "Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein". *Cell* 57 (2): 305–15. doi: 10.1016/0092-8674(89)90968-9.
68. Bell GI, Murray JC, Nakamura Y, Kayano T, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB (August 1989). "Polymorphic human insulin-responsive glucose-transporter gene on chromosome 17p13". *Diabetes* 38 (8): 1072–5.
69. Changhua Wang, Xiaoban Xin, Ruihua Xiang, Fresnida J. Ramos, Meilian Liu, Hak Joo Lee, Hongzhi Chen, Xuming Mao, Chintan K. Kikani, Feng Liu and Lily Q. Dong. Yin-Yang Regulation of Adiponectin Signaling by APPL Isoforms in Muscle Cells. First Published on August 6, 2009, doi:10.1074/jbc.M109.010355 November 13, 2009 *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 31608-31615.
70. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13: 332–339, 2007.

71. Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T 2003 Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3:243–254.
72. National Institute for Physiological Science. Division of Endocrinology and Metabolism 2009 NIPS. Regulatory role of AMPK in fatty acid oxidation in skeletal muscle.
73. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941–946.
74. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (Jul 1997). "UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue". *Biochem Biophys Res Commun* 235 (1): 79–82.
75. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. (December 2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production". *Nat. Genet.* 26 (4): 435–9.
76. Shulman GI 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171–176.
77. Changhua Wang, Xuming Mao, Lixin Wang, Meilian Liu, Michael D. Wetzel, Kun-Liang Guan, Lily Q. Dong and Feng Liu. Adiponectin Sensitizes Insulin Signaling by Reducing p70 S6 Kinase-mediated Serine Phosphorylation of IRS-1. Received for publication, January 4, 2007, and in revised form, January 22, 2007 Published, JBC Papers in Press, January 22, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700098200.
78. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, ArdenKC, Blenis J, Greenberg ME 1999 Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857–868.

79. Fang CH, Li BG, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO 1998 Treatment of burned rats with insulin-like growth factor I inhibits the catabolic response in skeletal muscle. *Am J Physiol* 275:R1091–R 1098.
80. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ 2001 Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704–1708.
81. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL 2004 Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399–412.
82. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL 2001 Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440–14445.
83. Wang X, HuZ, HuJ, DuJ, MitchWE 2006 Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology* 147:4160–4168.
84. Fujio Y, Guo K, Mano T, Mitsuuchi Y, Testa JR, Walsh K 1999 Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol* 19:5073–5082.
85. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C 2003 PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22:8983–8998.
86. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ 2001 Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009–1013.
87. Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P 2005 Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest* 115:451–458.

88. Satchek JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL 2004 IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E591–E 601.
89. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N 2001 Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 27:195–200.
90. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE 2004 Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 113:115–123.
91. Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE 2004 Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol* 15:1537–1545.
92. Qiugen Zhou, Jie Du, Zhaoyong Hu, Kenneth Walsh, and Xiaonan H. Wang. Evidence for Adipose-Muscle Cross Talk: Opposing Regulation of Muscle Proteolysis by Adiponectin and Fatty Acids. 2007 *Endocrinology* 148(12):5696–5705.
93. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, Cruz I, Yanovski JA, Veis JH 1998 Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int* 54:236–244.
94. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB 2005 TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 19:362–370.
95. Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM, Adams GR 2005 IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 98:911–917.
96. Madhally SV, Toner M, Yarmush ML, Mitchell RN 2002 Interferon γ modulates trauma-induced muscle wasting and immune dysfunction. *Ann Surg* 236:649–657.

97. Helge JW, Kriketos AD, Storlien LH 1998 Insulin sensitivity, muscle fibre types, and membrane lipids. *Adv Exp Med Biol* 441:129–138.
98. Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano J, Garcia-Martinez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, Lopez-Soriano FJ, Celada A, Argiles JM 1998 Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett* 133:83–87.
99. Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K 2000 Hybrid proteasomes. Induction by interferon- γ and contribution to ATP dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275:14336–14345.
100. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015–3025.
101. Tschop M, Thomas G 2006 Fat fuels insulin resistance through Toll-like receptors. *Nat Med* 12:1359–1361.
102. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS 2002 AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through downregulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277:23977–23980.
103. Coffey VG, Zhong Z, Shield A, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JR, Hawley JA 2006 Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *FASEB J* 20:190–192.
104. Nakashima K, Yakabe Y 2007 AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1650–1656.
105. Goutham Rao, M.D., University of Pittsburgh Medical Center–St. Margaret, Pittsburgh, Pennsylvania. Insulin Resistance Syndrome. *Am Fam Physician*. 2001 Mar 15; 63(6):1159-1164.

106. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF (May 1988). "Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein". *Nature* 333 (6169): 183–5. doi: 10.1038/333183a0. PMID 3285221.
107. James DE, Strube M, Mueckler M (March 1989). "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter". *Nature* 338 (6210): 83–7. doi: 10.1038/338083a0. PMID 2645527.
108. Birnbaum MJ (April 1989). "Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein". *Cell* 57 (2): 305–15. doi: 10.1016/0092-8674(89)90968-9. PMID 2649253.
109. Bell GI, Murray JC, Nakamura Y, Kayano T, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB (August 1989). "Polymorphic human insulin-responsive glucose-transporter gene on chromosome 17p13". *Diabetes* 38 (8): 1072–5. doi: 10.2337/diabetes.38.8.1072. PMID 2568955.
110. Ralph A DeFronzo, MD and Eleuterio Ferrannini, MD. Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. doi: 10.2337/diacare.14.3.173 *Diabetes Care* 194 March 1991 vol. 14 no. 3 173-46.
111. Steven E. Kahn. The Importance of β -Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes. doi: 10.1210/jc.86.9.4047 *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* September 1, 2001 vol. 86 no. 9 4047-4058.
112. Stephen L. Aronoff, Kathy Berkowitz, Barb Shreiner, Laura Want. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* July 2004 vol. 17no. 3 183-190.
113. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. 1963. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963 Apr 13;1(7285):785-9.

114. Randle, P.J., Garland, P.B., Newsholme, E.A., and Hales, C.N. 1965. The glucose fatty-acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann. NY Acad. Sci.* 131:324-333.
115. Randle, P.J., Newsholme, E.A., and Garland, P.B. 1964. Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan, diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 93:652-665.
116. Alan Dresner, Didier Laurent, Melissa Marcucci, Margaret E. Griffin, Sylvie Dufour, Gary W. Cline, Lori A. Slezak, Dana K. Andersen, Ripudaman S. Hundal, Douglas L. Rothman, Kitt Falk Peterse and Gerald I. Shulman. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity *J Clin Invest*, January 1999, Volume 103, Number 2, 253-259.
117. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859–2865.
118. Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., and Shulman, G.I. (2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 603–608.
119. Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B.S., Pietka, T., Abumrad, N.A., Patterson, B.W., Okunade, A., and Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15430–15435.
120. Fabbrini, E., Tamboli, R.A., Magkos, F., Marks-Shulman, P.A., Eckhauser, A.W., Richards, W.O., Klein, S., and Abumrad, N.N. (2010). Surgical removal of omental fat does not improve insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in obese adults. *Gastroenterology* 139, 448–455.
121. Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., et al. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7522–7527.

122. Wang, H., Knaub, L.A., Jensen, D.R., Young Jung, D., Hong, E.G., Ko, H.J., Coates, A.M., Goldberg, I.J., de la Houssaye, B.A., Janssen, R.C., et al. (2009). Skeletal muscle-specific deletion of lipoprotein lipase enhances insulin signaling in skeletal muscle but causes insulin resistance in liver and other tissues. *Diabetes* 58, 116–124.
123. Goudriaan, J.R., Dahlmans, V.E.H., Teusink, B., Ouwens, D.M., Febbraio, M., Maassen, J.A., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Voshol, P.J. (2003). CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J. Lipid Res.* 44, 2270–2277.
124. Hajri, T., Han, X.X., Bonen, A., and Abumrad, N.A. (2002). Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J. Clin. Invest.* 109, 1381–1389.
125. Kim, J.K., Gimeno, R.E., Higashimori, T., Kim, H.J., Choi, H., Punreddy, S., Mozell, R.L., Tan, G., Stricker-Krongrad, A., Hirsch, D.J., et al. (2004b). Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 113, 756–763.
126. Merkel, M., Weinstock, P.H., Chajek-Shaul, T., Radner, H., Yin, B., Breslow, J.L., and Goldberg, I.J. (1998). Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J. Clin. Invest.* 102, 893–901.
127. Lee, H.Y., Birkenfeld, A.L., Jornayvaz, F.R., Jurczak, M.J., Kanda, S., Popov, V., Frederick, D.W., Zhang, D., Guigni, B., Bharadwaj, K.G., et al. (2011b). Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Hepatology* 54, 1650–1660.
128. Zhang, D., Liu, Z.-X., Choi, C.S., Tian, L., Kibbey, R., Dong, J., Cline, G.W., Wood, P.A., and Shulman, G.I. (2007). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 17075–17080.

129. Varman T. Samuel, and Gerald I. Shulman. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. DOI 10.1016/j.cell.2012.02.017.
130. Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., and Shulman, G.I. (1999). Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 341, 240–246.
131. Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., and Shulman, G.I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270–1274.
132. Ciaraldi, T.P., Abrams, L., Nikoulina, S., Mudaliar, S., and Henry, R.R. (1995). Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Invest.* 96, 2820–2827.
133. Garvey, W.T., Maianu, L., Zhu, J.H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., and Baron, A.D. (1998). Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 101, 2377–2386.
134. Shulman GI 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171–176.
135. Schmitz-Peiffer C 2000 Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* 12:583–594.
136. Krssak, M., Falk Petersen, K., Dresner, A., DiPietro, L., Vogel, S.M., Rothman, D.L., Roden, M., and Shulman, G.I. (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42, 113–116.
137. Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* 277, 50230–50236.

138. Edward W. Kraegen, Gregory J. Cooney, and Nigel Turner. Muscle insulin resistance: A case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction. *PNAS* June 3, 2008 vol. 105 no. 22.
139. Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S 1992 A new member of the protein kinase C family, nPKC, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 12:3930–3938.
140. Chang JD, Xu Y, Raychowdhury MK, Ware JA 1993 Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase C (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J Biol Chem* 268:14208–14214.
141. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/ threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911–29918.
142. Kellerer M, Mushack J, Seffer E, Mischak H, Ullrich A, Haring HU 1998 Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41:833–838.
143. Li J, DeFea K, Roth RA 1999 Modulation of insulin receptor substrate- 1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 274:9351–9356.
144. Qiao LY, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ 1999 Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J Biol Chem* 274:10625–10632.
145. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF 2000 The c-jun NH (2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser (307). *J Biol Chem* 275:9047–9054.
146. Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieler, F., and Boden, G. (2002). Lipid induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B-alpha. *Diabetes* 51, 2005–2011.

147. Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066–1071, 1997.
148. Luberto C, Yoo DS, Suidan HS, Bartoli GM, Hanun YA: Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF-kappa B in normal and SV40-transformed human fibroblasts. *J Biol Chem* 275:14760–14766, 2000.
149. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI: Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437–446, 2001.
150. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673–1677, 2001.
151. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ: Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274:24202–24210, 1999.
152. Pieper GM, Riaz ul H: Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:528–532, 1997.
153. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD (P) H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49:1939–1945, 2000.
154. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J: Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res* 84:1085–1094, 1999.
155. Coudronniere N, Villalba M, Englund N, Altman A: NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3394–3399, 2000.

156. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 344:678–682, 1990.
157. Turinsky J, O’Sullivan DM, Bayly BP: 1, 2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 265:16880–16885, 1990.
158. Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2001). Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50, 2563–2571.
159. Powell, D.J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7794–7808.
160. Fox, T.E., Houck, K.L., O’Neill, S.M., Nagarajan, M., Stover, T.C., Pomianowski, P.T., Unal, O., Yun, J.K., Naides, S.J., and Kester, M. (2007). Ceramide 866 Cell recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* 282, 12450–12457.
161. Blouin, C.M., Prado, C., Takane, K.K., Lasnier, F., Garcia-Ocana, A., Ferre’, P., Dugail, I., and Hajduch, E. (2010). Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* 59, 600–610.
162. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ 2004 Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 75:749-55.
163. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM 2009 Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 20:379-85.
164. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE 2000 The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275:24255-63.

165. Kopp A, Buechler C, Bala M, Neumeier M, Scholmerich J, Schaffler A 2010 Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology* 151:1097-108.
166. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(12):1796-808.
167. Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P, Hotamisligil GS: Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes* 2002; 51(6):1876-83.
168. Porter MH, Cutchins A, Fine JB, Bai Y, DiGirolamo M: Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat cell preparations. *J Lab Clin Med* 2002;139(3):140-6.
169. Hotamisligil GS: Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3:S53-5.
170. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996; 271(5249):665-8.
171. Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL: The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(1):8-17.
172. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, Klein R: Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 27:2540 - 2553, 2004.
173. Janet P. Wallace, PhD, FACSM. Overweight & Obesity 08-Apr-2011. URL: <http://www.indiana.edu/~k662>.

174. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB: Retinol binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006; 354(24):2552-63.
175. Qin Yang¹, Timothy E. Graham¹, Nimesh Mody¹, Frederic Preitner¹, Odile D. Peroni¹, Janice M. Zabolotny¹, Ko Kotani¹, Loredana Quadro² & Barbara B. Kahn¹. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Vol 436: 21 July 2005*|doi:10.1038/nature03711.
176. Human physiology and mechanisms of disease. Third edition. Arthur C. Guyton, M.D. Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi, School of Medicine. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Η. Κούβελας. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών. Σελ. 694,695.
177. Sarah Wild, Gojka Roglic, Anders Green, Richard Sicree and Hilary King. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. doi: 10.2337/diacare.27.5.1047 *Diabetes Care* May 2004 vol. 27 no. 5 1047-1053.
178. Mayor S. Diabetes affects nearly 6% of the world's adults. *BMJ* 2006; 333 doi:V10.1136/bmj.39055.608507.DB *BMJ* 2006; 333:1191.4.
179. Brownlee M 2001 Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820.
180. Reaven GM 2000 Insulin resistance and its consequences: type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 604–615.
181. Reaven GM 1988 Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595–1607.
182. Reaven GM 1993 Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121–131.
183. "BMI classification". World Health Organization. Retrieved 15 February 2014.

184. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Updated August 2014.
185. Shi H, Song CK, Giordano A, Cinti S, Bartness TJ: Sensory or sympathetic white adipose tissue denervation differentially affects depot growth and cellularity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288(4):R1028-37.
186. Patel JN, Coppack SW, Goldstein DS, Miles JM, Eisenhofer G: Norepinephrine spillover from human adipose tissue before and after a 72-hour fast. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7):3373-7.
187. Ardilouze JL, Sotorník R, Dennis LA, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F. Failure to increase postprandial blood flow in subcutaneous adipose tissue is associated with tissue resistance to adrenergic stimulation. *Diabetes Metab.* 2011 Aug 22. [Epub ahead of print].
188. Coppack SW, Chinkes DL, Miles JM, Patterson BW, Klein S: A multicompartamental model of in vivo adipose tissue glycerol kinetics and capillary permeability in lean and obese humans. *Diabetes* 2005; 54(7):1934-41.
189. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; 104:531-543.
190. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004; 10:355-361.
191. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005; 330:280-289.
192. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes.* 1997; 46:983-988.
193. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 1994; 93:2438-2446.

194. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995; 44:863-870.
195. Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3):347-55.
196. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(4):355-65.
197. Trayhurn P: Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184(4):285-93.
198. Trayhurn P, Bing C, Wood IS: Adipose tissue and adipokines energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 2006; 136(7 Suppl):1935S-1939S.
199. Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:119-146.
200. Alexandra Chadt, Ph.D., Stephan Scherneck, Ph.D., Hans-Georg Joost, M.D., ,Ph.D, Hadi Al-Hasani, Ph.D. Chapter 11 - Molecular links between Obesity and Diabetes: "Diabesity" German Institute for Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke , Department of Pharmacology, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal / Germany. Last Updated: 8 December 2010.
201. Bruce CR, Mertz VA, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. *Diabetes* 54: 3154–3160, 2005.
202. Michael B. Chen, Andrew J. McAinch, S. Lance Macaulay, Laura A. Castelli, Paul E. O'Brien, John B. Dixon, David Cameron-Smith, Bruce E. Kemp and Gregory R. Steinberg. Impaired Activation of AMP-Kinase and Fatty Acid Oxidation by Globular Adiponectin in Cultured Human Skeletal Muscle of Obese Type 2 Diabetics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* June 1, 2005 vol. 90 no. 6 3665-3672.
203. K.L. Mullen, J. Pritchard, I. Ritchie, L.A. Snook, A. Chabowski, A. Bonen, D. Wright, D.J. Dyck, Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and

insulin resistance in high-fat-fed rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296 (2009) R243eR251.

204. Justine M. Tishinsky, Lindsay E. Robinson, David J. Dyck. Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie* 94 (2012) 2131e2136.

205. R. Basu, U.B. Pajvani, R.A. Rizza, P.E. Scherer, Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects, *Diabetes* 56 (2007) 2174e2177.

206. J.M. Lehmann, L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, S.A. Kliewer, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12953e12956.

207. N. Maeda, M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, Y. Matsuzawa, PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein, *Diabetes* 50 (2001) 2094e2099.

208. U.B. Pajvani, M. Hawkins, T.P. Combs, M.W. Rajala, T. Doebber, J.P. Berger, J.A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A.H. Xiang, K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, J.M. Olefsky, T.A. Buchanan, P.E. Scherer, Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12152e12162.

209. A.R. Nawrocki, M.W. Rajala, E. Tomas, U.B. Pajvani, A.K. Saha, M.E. Trumbauer, Z. Pang, A.S. Chen, N.B. Ruderman, H. Chen, L. Rossetti, P.E. Scherer, Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2654e2660.

210. Tonelli J, Li W, Kishore P et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53: 1621-9.

211. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T: Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful

for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006, 29:1357-1362.

212. Hung J, McQuillan BM, Thompson PL, Beilby JP: Circulating adiponectin levels associate with inflammatory markers, insulin resistance and metabolic syndrome independent of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008, 32:772-779.

213. Kaser S, Tatarczyk T, Stadlmayr A, Ciardi C, Röss C, Tschoner A, Sandhofer A, Paulweber B, Ebenbichler CF, Patsch JR: Effect of obesity and insulin sensitivity on adiponectin isoform distribution. *Eur J Clin Invest* 2008, 38:827-834.

214. Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Eto, K., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Kimura, S., Tomita, M., Kimura, S., Ito, C., Froguel, P., and Kadowaki, T. Genetic Variation in the Gene Encoding Adiponectin Is Associated With an Increased Risk of Type 2 Diabetes in the Japanese Population. (2002) *Diabetes* 51, 536-540.

215. Kondo, H., Shimomura, I., Matsukawa, Y., Kumada, M., Takahashi, M., Matsuda, M., Ouchi, N., Kihara, S., Kawamoto, T., Sumitsuji, S., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. Association of Adiponectin Mutation With Type 2 Diabetes: A Candidate Gene for the Insulin Resistance Syndrome. (2002) *Diabetes* 51, 2325-2328.

216. Vasseur, F., Helbecque, N., Dina, C., Lobbens, S., Delannoy, V., Gaget, S., Boutin, P., Vaxillaire, M., Lepretre, F., Dupont, S., Hara, K., Clement, K., Bihain, B., Kadowaki, T., and Froguel, P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. (2002) *Hum. Mol. Genet.* 11, 2607-2614.

217. Mori, Y., Otabe, S., Dina, C., Yasuda, K., Populaire, C., Lecoq, C., Vatin, V., Durand, E., Hara, K., Okada, T., Tobe, K., Boutin, P., Kadowaki, T., and Froguel, P. Genome-Wide Search for Type 2 Diabetes in Japanese Affected Sib-Pairs Confirms Susceptibility Genes on 3q, 15q, and 20q and Identifies Two New Candidate Loci on 7p and 11p. (2002) *Diabetes* 51, 1247-1255.

218. Vionnet, N., Hani, E. H., Dupont, S., Gallina, S., Francke, S., Dotte, S., De Matos, F., Durand, E., Lepretre, F., Lecoœur, C., Gallina, P., Zekiri, L., Dina, C., and Froguel, P. Genomewide Search for Type 2 Diabetes–Susceptibility Genes in French Whites: Evidence for a Novel Susceptibility Locus for Early-Onset Diabetes on Chromosome 3q27–qter and Independent Replication of a Type 2–Diabetes Locus on Chromosome 1q21–q24. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1470-1480.
219. Kissebah, A. H., Sonnenberg, G. E., Myklebust, J., Goldstein, M., Broman, K., James, R. G., Marks, J. A., Krakower, G. R., Jacob, H. J., Weber, J., Martin, L., Blangero, J., and Comuzzie, A. G. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14478-14483.
220. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102: 1296–1301.
221. Hui Chen, Monica Montagnani, Tohru Funahashi, Iichiro Shimomura and Michael J. Quon. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* (2003) 278, 45021-45026.
222. Hattori Y, Nakano Y, Hattori S, Tomizawa A, Inukai K, Kasai K: High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 2008, 582:1719-1724.
223. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000, 96:1723-1732.
224. Keller P, Moller K, Krabbe KS, Pedersen BK: Circulating adiponectin levels during human endotoxaemia. *Clin Exp Immunol* 2003, 134:107-110.

225. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Ahima RS, Reilly MP: Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92:2272-2279.
226. Yukihiro Takemura, Noriyuki Ouchi, Rei Shibata, Tamar Aprahamian, Michael T. Kirber, Ross S. Summer, Shinji Kihara, and Kenneth Walsh. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies *J Clin Invest.* 2007 February 1; 117(2): 375–386.
227. Aprahamian T, et al. Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherogenesis and autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 2004; 199:1121–1131.
228. Noriyuki Ouchi, Kenneth Walsh. A Novel Role for Adiponectin in the Regulation of Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*2008;28:1219-1221.
229. Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci.* 2004; 82:935-941.
230. Peter J Simons, Petra S van den Pangaart¹, Johannes M F G Aerts² and Louis Boon. Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *Journal of Endocrinology* (2007) 192, 289–299.
231. Devaraj S, Torok N, Dasu MR, Samols D, Jialal I. Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis from endothelial cells. Evidence for an adipose tissue-vascular loop. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1368-1374.
232. Katherine Robinson, John Prins and Bala Venkatesh. Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Critical Care* 2011, 15:221.
233. Pang TTL, Narendran P: The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1150:143-145.
234. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W., Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue *J. Clin. Invest.* 112, 1796-1808.

235. Ross, R. (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease *N. Engl. J. Med.* 340,115-126.
236. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000, 96:1723-1732.
237. Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., Tilg, H. (2004) Adiponectin induces the antiinflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323,630-635.
238. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., Takata, M., Eto, K., Terauchi, Y., Komeda, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohnishi, Y., Naitoh, T., Yamamura, K., Ueyama, Y., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., Kadowaki, T. (2003) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis *J. Biol. Chem.* 278,2461-2468.
239. Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., Ohashi, K., Sakai, N., Shimomura, I., Kobayashi, H., Terasaka, N., Inaba, T., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2002) Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice *Circulation* 106, 2767-2770.
240. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004, 109:2046-2049.
241. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999, 100:2473-2476.

242. Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y: Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 2005, 579:6821-6826.
243. Wulster-Radcliffe, M. C., Ajuwon, K. M., Wang, J., Christian, J. A., Spurlock, M. E. (2004) Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316,924-929.
244. Markus Neumeier, Johanna Weigert, Andreas Schäffler, Gabriele Wehrwein, Ulf Müller-Ladner, Jürgen Schölmerich, Christian Wrede and Christa Buechler. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology* (2006) vol. 79 no. 4 803-808.
245. Magalang UJ, Rajappan R, Hunter MG, Kutala VK, Kuppasamy P, Wewers MD, Marsh CB, Parinandi NL: Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils. *Antioxid Redox Signal* 2006, 8:2179-2186.
246. Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, Kibayashi E, Kobayashi H, Kihara S, Funahashi T, Takata M, Temaru R, Sato A, Yamazaki K, Nakamura N, Kobayashi M. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circ Res.* 2005; 97:1245–1252.
247. Atsuko Tomizawa, Yoshiyuki Hattori, Kikuo Kasai and Yasuko Nakano. Adiponectin induces NF- κ B activation that leads to suppression of cytokine-induced NF- κ B activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2008 5: 123.
248. Tsao T-S, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF: Oligomerization state dependent activation of NF- κ B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 2002, **277**:29359-29362.
249. Tang C-H, Chiu Y-C, Tan T-W, Yang R-S, Fu W-M: Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF- κ B pathway. *J Immunol* 2007, 179:5483-5492.

250. Wanninger J, Neumeier M, Weigert J, Bauer S, Weiss TS, Schäffler A, Krempl C, Bleyl C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF- κ B, and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 297:G611-618.
251. Uji Y, Yamamoto H, Tsuchihashi H, Maeda K, Funahashi T, Shimomura I, Shimizu T, Endo Y, Tani T: Adiponectin deficiency is associated with severe polymicrobial sepsis, high inflammatory cytokine levels, and high mortality. *Surgery* 2009, 145:550-557.
252. Uji Y, Yamamoto H, Maeda K, Tsuchihashi H, Akabori H, Shimizu T, Endo Y, Shimomura I, Tani T: Adiponectin deficiency promotes the production of inflammatory mediators while severely exacerbating hepatic injury in mice with polymicrobial sepsis. *J Surg Res* 2010, 161:301-311.
253. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, Schrezenmeier H, Henne-Bruns D, Huber-Lang M, Wolf AM: Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg* 2010, 10:26.
254. Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, Yung Yu C, Nagaraja HN: Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2005, 68:1825-1833.
255. Moriconi N, Kraenzlin M, Muller B, Keller U, Nusbaumer CP, Stohr S, Tamm M, Puder JJ: Body composition and adiponectin serum concentrations in adult patients with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:1586-1590.
256. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA: Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12:100-105.
257. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006, 65:1198-1201.

258. Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007;7:25–33.
259. Zhu W, et al. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:361–374.
260. Yoshimasa Aso, Ruriko Yamamoto, Sadao Wakabayashi, Toshihiko Uchida, Kan Takayanagi, Kohzo Takebayashi, Takehiko Okuno, Teruo Inoue, Koichi Node, Takashi Tobe, Toshihiko Inukai and Yasuko Nakano. Comparison of Serum High–Molecular Weight (HMW) Adiponectin With Total Adiponectin Concentrations in Type 2 Diabetic Patients With Coronary Artery Disease Using a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect HMW Adiponectin. *Diabetes* July 2006 vol. 55 no. 7 1954-1960.
261. Jay D, et al. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:183–192.
262. Granger DN, et al. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension.* 2004;43:924–931.
263. Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension.* 2003;42:231–234.
264. Shimabukuro M, et al. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3236–3240.
265. Tan KC, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:765–769.
266. Fernandez-Real JM, et al. Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2004;27:739–745.
267. Halperin F, et al. The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2005;48:2147–2154.

268. Ouedraogo R, et al. Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117:1718–1726.
269. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res.*2006;4:53–65.
270. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27–III32.
271. Schächinger V, Zeiher AM. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 9:IX/70–74.
272. Matsuda M, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem.* 2002;277:37487–37491.
273. Ohashi K, et al. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension.* 2006;47:1108–1116.
274. Chen X, Zhang H, McAfee S, Zhang C. The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H605–H612.
275. Hideki Kobayashi, Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Kenneth Walsh, Masahiro Kumada, Yuki Abe, Tohru Funahashi, Yuji Matsuzawa. Selective Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by the High Molecular Weight Form of Adiponectin. *Circulation Research.*2004;94:e27-e31.
276. Yoshihisa Okamoto, Shinji Kihara, Tohru Funahashi, Yuji Matsuzawa and Peter Libby. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome *Clinical Science* (2006) 110, (267–278).
277. Human physiology and mechanisms of disease. Third edition. Arthur C. Guyton, M.D. Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi, School of Medicine.

Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Η. Κούβελας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών.

278. Massart F, Reginster, Brandi M.L. (2001). "Genetics of Menopause-Associated Diseases". *Maturitas* 40 (2): 103–116. doi:10.1016/S0378-5122(01)00283-3. PMID 11716989.

279. Yoles I, Yogev Y, Frenkel Y, Hirsch M, Nahum R, Kaplan B (2004). "menopausal symptoms". *Clin Exp Obstet Gynecol* 31 (2): 123–6. PMID 15266766. <http://www.menopause-symptoms-info.com>.

280. Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9:295–318.

281. Farkash Y, Timberg R, Orly J. 1986. Preparation of antiserum to rat cytochrome P- 450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118:1353–65.

282. Simard J., Ricketts M.L., Gingras S., Soucy P., Feltus F.A., Melner M.H. Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase gene family. *Endocr. Rev.* 2005; 4:525–582.

283. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Dec;43(8):779-804.

284. Geissler WM, Davis DL, Wu L, et al: Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature Genet* 7:34-39, 1994 (Production, Clearance, and Measurement of Steroid Hormones).

285. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001 Sep; 45(3 Suppl):S116-24.

286. Michael W. King, Ph.D / IU School of Medicine / miking at iupui.edu
themedicalbiochemistrypage.org Gonadal Steroid Hormones.

287. Black SM, Harikrishna JA, Szklarz GD, Miller WL. The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{scc}. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7247-51.
288. Colin R. Jefcoate, Brian C. McNamara, Irina Artemenko, Takeshi Yamazaki. Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 43, Issue 8, December 1992, Pages 751–767.
289. Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*. 2008;13:1-18. doi: 10.1159/000134751.
290. Westphal U. *Steroid-Protein Interactions*, p 259. Berlin, Springer-Verlag, 1986.
291. David C. Anderson. Sex -Hormone-Binding Globulin. *Clinical Endocrinology* (1974) 3, 69-96.
292. Negi (2009). *Introduction To Endocrinology*. PHI Learning Pvt. Ltd. p. 268. ISBN 978-81-203-3850-0. Retrieved 23 August 2012.
293. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (December 2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors". *Pharmacol. Rev.* 58 (4): 773–81.
294. Conneely O. M., B. Mulac-Jericevic & J. P. Lydon: Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68, 771-778 (2003).
295. Nick Z. Lu, Suzanne E. Wardell, Kerry L. Burnstein, Donald Defranco, Peter J. Fuller, Vincent Giguere, Richard B. Hochberg, Lorraine McKay, Jack-Michel Renoir, Nancy L. Weigel, Elizabeth M. Wilson, Donald P. McDonnell, and John A. Cidlowski. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacological Reviews* December 2006 vol. 58 no. 4782-797.

296. Wei L. L., B. M. Norris & C. J. Baker: An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR (C), forms heterodimers with PR (B) but interferes in PR (B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 287-297 (1997).
297. Leonhardt S. A., V. Boonyaratanakornkit & D. P. Edwards: Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids*, 68, 761-767 (2003).
298. Tao Y., C. Williams-Skipp & R. I. Scheinman: Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF- κ B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 2329-2332 (2001).
299. C Marc Luetjens, Aditya Didolkar, Sabine Kliesch, Werner Paulus, Astrid Jeibmann, Werner Böcker, Eberhard Nieschlag and Manuela Simoni. Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *Journal of Endocrinology* (2006) 189, 529–539.
300. Ballare C., M. Uhrig., T. Bechtold., T. Sancho., M. Di Domenico., A. Migliaccio., F. Auricchio & Beato M: Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23, 1994-2008 (2003).
301. Boonyaratanakornkit V., M. P. Scott., V. Ribon., L. Sherman., S. M. Anderson., J. L. Maller., W. T. Miller & D. P. Edwards: Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8, 269-280 (2001).
302. Boonyaratanakornkit V. & D. P. Edwards: Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays biochem* 40, 105-120 (2004).
303. Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125, 3-15 (2003).
304. Welter B.H., K. J. Saner., F. Zhang., E. Hansen., B. Dupont., Y. Wei & T. M. Price. Cloning and expression of a novel, truncated, progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinology* 28, 155-163 (2003).

305. Baker T. K., H. B. VanVooren., W. C. Smith & M. A. Carfagna: Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 137, 185-192 (2003).
306. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, StanczFront *Neuroendocrinol.* 2008 May;29(2):313-39. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.02.001. Epub 2008 Feb 23yk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: form and function in brain.
307. Richer J. K., B. M. Jacobsen., N. G. Manning., M. G. Abel., D. M. Wolf & K. B. Horwitz: Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277, 1520-1528 (2002).
308. Schreiber J. R. & J.W. Hsueh: Progesterone "receptor" in rat ovary. *Endocrinology* 105, 915-919 (1979).
309. Peluso J. J., D. P. Fernandez., A. Pappalardo & B. A. White: Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 65, 94-101 (2001)
310. Luconi M., Bonnacorsi., M. Maggi., P. Pecchioli., C. Krausz., G. Forti & E. Baldi: Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 877-885 (1998).
311. Shah C. A., D. Modi., S. Gadkar., G. Sachdeva & C. P. Puri: Progesterone Receptors on Human Spermatozoa. *Ind J Expt Biol* 41, 773-780 (2003).
312. Hanekamp E. E., S. C. Gielen, S. A. van Oosterhoud., C. W. Burger., J. A. Grootegoed., F. J. Huikeshoven & L. J. Blok: Progesterone receptors in endometrial cancer invasion and metastasis: development of a mouse model. *Steroids* 68, 795-800 (2003).
313. Kwai Wa Cheng., Chi-Keung Cheng & Peter C. K. Leung: Differential Role of PR-A and -B Isoforms in Transcription Regulation of Human GnRH Receptor Gene. *Mol Endocrinol* 15, 2078-2092 (2001).

314. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Apr;19(4):833-42. Epub 2005 Feb 3.
315. Hall, J. M., J. F. Couse, and K. S. Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276:36869-36872.
316. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling". *Science* 307 (5715): 1625–30.
317. Subhadeep Chakrabarti, Sandra T. Davidge. G-Protein Coupled Receptor 30 (GPR30): A Novel Regulator of Endothelial Inflammation. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52357.
318. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol.* 2002 Oct;16(10):2181-7.
319. Michael W. King, Ph.D / IU School of Medicine / miking at iupui.edu
themedicalbiochemistrypage.org Gonadal Steroid Hormones.
320. J A Ruizeveld de Winter, J Trapman, M Vermey, E Mulder, N D Zegers and T H van der Kwast. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991 39: 927.
321. NIH Clinical Center (2004-08-16). "Progesterone Historical Reference Ranges". United States National Institutes of Health. <http://cclnprod.cc.nih.gov/dlm/testguide.nsf/Index/CB26894E1EB28DEF85256BA5005B000E?OpenDocument>. Retrieved 2008-03-12.
322. Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Söder M, Berning B, Holsboer F, Damm K (1993). "Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands". *Eur J Pharmacol* 247 (2): 145–54. doi:10.1016/0922-4106(93)90072-H. PMID 8282004.
323. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally

different human progesterone receptor forms A and B". *EMBO J.* 9 (5): 1603–14. PMC 551856. PMID 2328727.

324. Landau RL, Bergenstal DM, Lugibihl K, Kascht ME. (1955). "The metabolic effects of progesterone in man". *J Clin Endocrinol Metab* 15 (10): 1194–215. doi:10.1210/jcem-15-10-1194. PMID 13263410.

325. Nelson LR, Bulun SE (September 2001). "Estrogen production and action". *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (3 Suppl): S116–24. doi:10.1067/mjd.2001.117432. PMID 11511861.

326. FERTILITY FACT > Female Risks By the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Retrieved on Jan 4, 2009.

327. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB (1997). "A role for estrogens in the male reproductive system". *Nature* 390 (6659): 447–8. doi:10.1038/37352. PMID 9393999.

328. J. Raloff (1997-12-06). "Science News Online (12/6/97): Estrogen's Emerging Manly Alter Ego". *Science News*. http://www.sciencenews.org/pages/sn_arc97/12_6_97/fob1.htm. Retrieved 2008-03-04.

329. "Science Blog. Estrogen Linked To Sperm Count, Male Fertility". *Science Blog*. <http://www.scienceblog.com/community/older/1997/B/199701564.html>. Retrieved 2008-03-04.

330. Hill RA, Pompolo S, Jones ME, Simpson ER, Boon WC (2004). "Estrogen deficiency leads to apoptosis in dopaminergic neurons in the medial preoptic area and arcuate nucleus of male mice". *Mol. Cell. Neurosci.* 27(4):466–76. doi:10.1016/j.mcn.2004.04.012. PMID 15555924.

331. Ian Muchamore (2004-07-19). "Prince Henry's Institute - Media Release - Male sex drive linked to estrogen". *Prince Henry's Institute*. <http://www.phimr.monash.edu.au/news/mediareleases/estrogenvitalformalesexdrive.htm>. Retrieved 2008-03-04.

332. Kim K.H., Bender J.R. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 308 (2009) 3-8.

333. Song J., Kim M., Jo H., Hwang S., Chae B., Chung J., Kwon D., Lew Y., Lim Y., Kim J., Kim J.H., Kim M.R., Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 117 (2009) 74-80.
334. Chakrabarti S., Lekontseva O., Peters A., Davidge S.T. 17 β -Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. *Cardiovascular research* (2010) 85, 796-805.
335. Anna Maleszka, Nina Smolinska, Anna Nitkiewicz, Marta Kiezun, Katarzyna Chojnowska, Kamil Dobrzyn, Hubert Szwaczek, and Tadeusz Kaminski. Adiponectin Expression in the Porcine Ovary during the Oestrous Cycle and Its Effect on Ovarian Steroidogenesis. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2014 (2014), Article ID 957076, 9 pages.
336. Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Author information. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2009 Dec;92(6):1988-96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.008. Epub 2008 Dec 10.
337. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG (February 1987). "Biological actions of androgens". *Endocr. Rev.* 8 (1): 1–28. doi:10.1210/edrv-8-1-1. PMID 3549275.
338. Haddad RM, Kennedy CC, Caples SM, Tracz MJ, Boloña ER, Sideras K, Uraga MV, Erwin PJ, Montori VM (January 2007). "Testosterone and cardiovascular risk in men: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials". *Mayo Clin. Proc.* 82 (1): 29–39. doi:10.4065/82.1.29.PMID 17285783.
339. Stanworth RD, Jones TH (2008). "Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice". *Clin Interv Aging* 3 (1): 25–44. PMC 2544367. PMID 18488876.
340. Haffner SM, Karhapää P, Mykkänen L, Laakso M. Insulin resistance, body fat distribution, and sex hormones in men. *Diabetes*.1994; 43:212–219.
341. Oh JY, Barrett-Connor E, Wedick NM, et al. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women. *Diabetes Care*. 2002; 25:55–60.

342. Simon D, Charles MA, Nahoul K, et al. Association between plasma total testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: The Telecom Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:682–685.
343. Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, et al. Testosterone, sex hormone binding globulin and the development of type 2 diabetes in middle aged men. *Diabetes Care.* 2000; 23:490–49.
344. Haffner SM, Shaten J, Stern MP, et al. Low levels of sex hormone binding globulin and testosterone predict the development of non insulin dependent diabetes mellitus in men. *Am J Epidemiol.* 1996; 143:889–897.
345. Barrett-Connor E. Lower endogenous androgen levels and dyslipidemia in men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Internal Med.* 1992; 117:807–811.
346. Fukui M, Ose H, Kitagawa Y, et al. Relationship between low serum endogenous androgen concentrations and arterial stiffness in men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2007; 56:1167–1173.
347. Grossmann M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, et al. Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:1834–1840.
348. Kapoor D, Aldred H, Clark S, et al. Clinical and biochemical assessment of hypogonadism in men with type 2 diabetes: correlations with bioavailable testosterone and visceral adiposity. *Diabetes Care.* 2007; 30:911–917.
349. Boyanov MA, Boneva Z, Christov VG. Testosterone supplementation in men with type 2 diabetes, visceral obesity and partial androgen deficiency. *Aging Male.* 2003; 6:1–7.
350. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, et al. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154:899–906.

351. Marin P, Oden B, Bjorntorp P. Assimilation and mobilization of triglycerides in subcutaneous abdominal and femoral adipose tissue in vivo in men: effects of androgens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:239–243.
352. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:447–452.
353. Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, et al. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care.* 2005; 28(7):1636–1642.
354. Cohen PG. The hypogonadal–obesity cycle. *Med Hypotheses.* 1999; 52:49–51.
355. De Pergola G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24(Suppl 2):S59–63.
356. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, et al. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology.* 2003; 144:5081–5088.
357. Jones TH. Testosterone associations with erectile dysfunction, diabetes and metabolic syndrome. *Eur Urol Suppl.* 2007; 6:847–857.
358. Nishizawa, H., Shimomura, I., Kishida, K., Maeda, N., Kuriyama, H., Nagaretani, H., Matsuda, M., Kondo, H., Furuyama, N., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. Androgens Decrease Plasma Adiponectin, an Insulin-Sensitizing Adipocyte-Derived Protein (2002) *Diabetes* 51, 2734-2741.
359. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S. Sex-specific association of the androgen to oestrogen ratio with adipocytokine levels in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 506–13.
360. Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., Patti, M. E., Klein, S. L., Weinstein, R. S., and Scherer, P. E. Sexual Differentiation, Pregnancy, Calorie Restriction, and Aging Affect the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin (2003) *Diabetes* 52, 268-276.

361. Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Scooper GJ et al. Testosterone Selectively Reduces the High Molecular Weight Form of Adiponectin by Inhibiting Its Secretion from Adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280:18073-18080.
362. Yarrow JF, Beggs LA, Conover CF, McCoy SC, Beck DT, Borst SE. Influence of androgens on circulating adiponectin in male and female rodents. *PLoS One* 2012; 7(10):e47315.
363. Jurimae J, Jurimae T. Plasma adiponectin concentration in healthy pre and postmenopausal women: relationship with body composition, bone mineral and metabolic variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:42–7.
364. Tamakoshi K, Yatsuya H, Wada K, Matsushita K, Otsuka R, Yang PO, et al. The transition to menopause reinforces adiponectin production and its contribution to improvement of insulin-resistant state. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 66:65–71.
365. Leung KC, Xu A, Craig ME, Martin A, Lam KS, O'Sullivan AJ. Adiponectin isoform distribution in women-relationship to female sex steroids and insulin sensitivity. *Metabolism*. 2009 Feb; 58(2):239-45.
366. Chalvatzas N, Dafopoulos K, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. *Fertil Steril*. Published online March 5, 2008.
367. Sieminska L, Wojciechowska C, Niedziolka D, Marek B, Kos-Kudla B, Kajdaniuk D, et al. Effect of postmenopause and hormone replacement therapy on serum adiponectin levels. *Metabolism* 2005; 54:1610–4.
368. Im JA, Lee JW, Lee HR, Lee DC. Plasma adiponectin levels in postmenopausal women with or without long-term hormone therapy. *Maturitas* 2006; 54:65–71.
369. Tworoger S, Mantzoros C, Hankinson S. Relationship of plasma adiponectin with sex hormone and insulin-like growth factor levels. *Obesity* 2007; 15:2217–24.

370. Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C et al. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4823–4831.
371. Kunnari A, Santaniemi M, Jokela M et al. Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. *Metabolism* 2008; 57:1509-1515.
372. Chu MC, Cosper P, Nakhuda GS, Lobo RA. A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril* 2006; 86:1669–75.
373. Lanfranco Fabio, Zitzmann Michael, Simoni Manuela, Niesclagl Eberhard Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clinical endocrinology* 2004, vol. 60, n^o4, pp. 500-507.
374. Page ST, Herbst KL, Amory JK, Coviello AD, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ. Testosterone Administration Suppresses Adiponectin Levels in Men. *Journal of Andrology* 2005; 26:85–92.
375. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1930–1935.
376. Blüher M, Bullen JW Jr, Lee JH, Kralisch S, Fasshauer M, Klötting N, Niebauer J, Schön MR, Williams CJ, Mantzoros CS. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2310–2316.
377. Bullen JW Jr, Blüher S, Kelesidis T, Mantzoros CS. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292:1079–1086.
378. Kleiblova P, Springer D, Haluzik M. The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiol Res*. 2006; 55:661–666.

379. Asimakopoulos B, Milousis A, Gioka T, Kabouromiti G, Gianisslis G, Troussa A, Simopoulou M, Katargari S, Tripsianis G, Nikolettos N. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocr J.* 2009; 56(3):425-433.
380. Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 2009; 92(4):1389-1394.
381. Galván RE, Basurto L, Saucedo R, Campos S, Hernández M, Zárate A. Adiponectin concentrations during menstrual cycle *Ginecol Obstet Mex.* 2007 Aug; 75(8):435-8.
382. Merki-Feld GS, Imthurn B, Rosselli M, Spanaus K. Serum concentrations of high-molecular weight adiponectin and their association with sex steroids in premenopausal women. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2011; 2:180-185.
383. Capllonch-Amer G, Sbert-Roig M, Galmés-Pascual BM, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M, García-Palmer FJ. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J Endocrinol.* 2014 Jun; 221(3):391-403. doi: 10.1530/JOE-14-0008. Epub 2014 Mar 28.
384. G. Gutman, V. Barak, S. Maslovitz, A. Amit, J. B. Lessing, and E. Geva, “Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity,” *Fertility and Sterility*, vol. 91, no. 5, pp. 1837–1841, 2009.
385. Tao Tao, Bing Xu and Wei Liu. Ovarian HMW adiponectin is associated with folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013, 11:99 doi:10.1186/1477-7827-11-99.
386. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:1172–1181.

387. Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, Bluher M, Kiess W. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4053–4061.
388. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Milan G, Mioni R, Pagano C, Zullo F, Colao A, Lombardi G, Vettor R. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88:2619–2623.
389. Spranger J, Mohlig M, Wegewitz U, Ristow M, Pfeiffer AF, Schill T, Schlosser HW, Brabant G, Schofl C. Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology* 2004; 61: 738–746.
390. Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D, Koliakos G. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2003; 18:1790–1796.
391. Horenburg S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, Wabitsch M. Influence of sex hormones on adiponectin expression in human adipocytes. *Horm Metab Res* 2008; 40:779-786.
392. Sato H, Sugai H, Kurosaki H, Ishikawa M, Funaki A, Kimura Y, Ueno K. The Effect of Sex Hormones on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Expression and Activity in Mature Adipocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 2013; 36:564–573.
393. Wang ZV, Schraw TD, Kim JY, Khan T, Rajala MW, Follenzi A, Scherer PE. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27:3716–3731.
394. Bogan, JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J. Cell Biol.* 1999; 146:609–620.
395. Cristina Lara-Castro, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin Multimeric Complexes and the Metabolic Syndrome Trait Cluster *Diabetes* 2006;55:249-259.
396. Aso Y, Yamamoto R, Wakabayashi S et al. Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with

coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes* 2006; 55:1954-60.

397. von Eynatten M, Humpert PM, Bluemm A et al. High-molecular weight adiponectin is independently associated with the extent of coronary artery disease in men. *Atherosclerosis* 2008; 199:123-8.

398. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006; 29:1357-62.

399. Goutou M, Sakka Ch, Stakias N, Stefanidis I, Koukoulis GN. AR CAG repeat length is not associated with serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *Int J Androl* 2009; 32:616-622.

400. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.

401. Καρκαλούσος Π. Αρχές Ηλεκτροφόρησης. Έκδοση Πρώτη, ΑΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα 2012.

402. Multimeric Adiponectin ELISA (Bühlmann Labs, Switzerland).

403. Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*. Sep 2012; 4(9): 429-434.

404. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 21:286-289.

405. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:79-83.

406. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360:57–58.
407. Lovejoy JC, Bray GA, Greeson CS, Klemperer M, Morris J, Partington C, Tulley R. Oral anabolic steroid treatment, but not parenteral androgen treatment, decreases abdominal fat in obese, older men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995; 19:614–624.
408. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord* 2008; 6:87–10.
409. Yanase T, Fan W, Kyoya K, Min L, Takayanagi R et al. Androgens and metabolic syndrome: lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109:254–257.
410. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP et al. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:678–688.
411. Frederiksen L, Hojlund K, Hougaard DM, Mosbeck TH, Larsen R, et al. Testosterone therapy decreased subcutaneous fat and adiponectin in ageing men. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(3):469-476.