

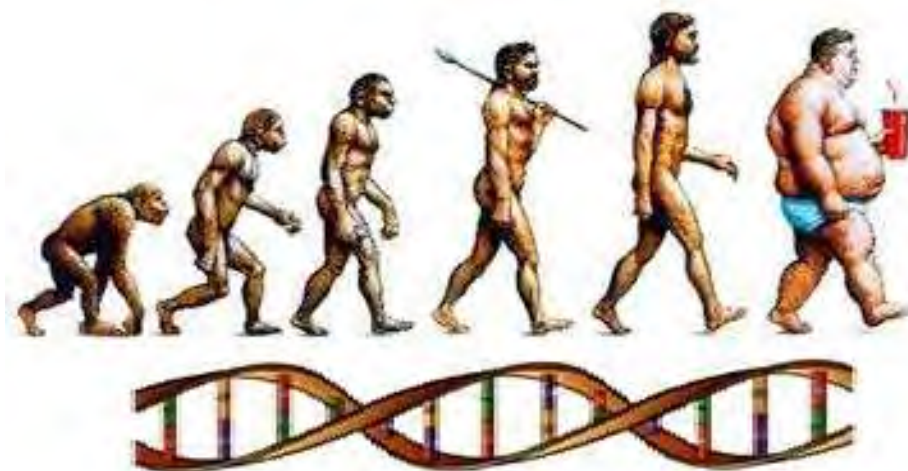


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

*Συσχέτιση πολυμορφισμών γονιδίων με
παχυσαρκία στον ελληνικό πληθυσμό*



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Καραβία Ουρανία

Λάρισα 2014

*Συσχέτιση πολυμορφισμών γονιδίων με παχυσαρκία
στον ελληνικό πληθυσμό*

*Association of gene polymorphism with obesity in Greek
population*

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θεολογία Σαραφείδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καλλιόπη Κώτσα, Επίκουρος Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας, Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτη και Μεταβολισμού, Α' Παθολογική Κλινική, Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Σεπτέμβριο του 2012 έως τον Φεβρουάριο του 2013. Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο κ. Ζήσης Μαμούρης.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή γενετικής κ. Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της έρευνας καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επίκουρο καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας κα. Θεολογία Σαραφείδου και τον Δρ. Ιωάννη Βασιλόπουλο, για την αμέριστη υπομονή, και καθοδήγηση που εξέλαβα κατά την διάρκεια και την ολοκλήρωση της εκπόνησης της εν λόγω διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Γκουτζέλα για την πολύ καλή συνεργασία μας. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον Κώστα Σταμάτη για όλα όσα μου δίδαξε καθώς και την ανεκτίμητη βοήθεια του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους όσους συνεργαστήκαμε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, που έκαναν αυτή την εμπειρία ακόμη πιο μοναδική.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	σελ.8
1. Παχυσαρκία.....	σελ.10
1.1. Νοσήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία.....	σελ.10
1.2. Συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας.....	σελ.12
1.3. Εκτίμηση της παχυσαρκίας.....	σελ.13
1.4. Μορφές της παχυσαρκίας.....	σελ.14
1.4.1. Μονογονιδιακή παχυσαρκία.....	σελ.15
1.4.2. Συνδρομική παχυσαρκία.....	σελ.18
1.4.3. Πολυπαραγοντική ή κοινή παχυσαρκία.....	σελ.20
1.5. Αιτιοπαθολογία της κοινής παχυσαρκίας.....	σελ.21
1.5.1. Θεωρία της ενεργειακής ισορροπίας.....	σελ.21
1.5.2. Θεωρία των λιποκυττάρων.....	σελ.21
1.5.3. Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου.....	σελ.22
1.5.4. Ο ρόλος του υποθαλάμου στην παχυσαρκία.....	σελ.23
1.5.5. Αδενοϊός και παχυσαρκία.....	σελ.23
1.6. Η βιταμίνη Δ.....	σελ.24
1.6.1. Ο μεταβολισμός της βιταμίνης Δ.....	σελ.25
1.6.2. Η λειτουργία της βιταμίνης Δ.....	σελ.26
1.6.3. Ο ρόλος της βιταμίνης Δ στην παχυσαρκία.....	σελ.27
1.7. Ο υποδοχέας της βιταμίνης Δ (VDR)	σελ.28
1.8. Γενετική της κοινής παχυσαρκίας.....	σελ.29
1.8.1. Το γονίδιο του υποδοχέα VDR.....	σελ.30
1.8.2. Πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR.....	σελ.31
1.8.3. Πολυμορφισμός Cdx2 του υποδοχέα VDR.....	σελ.32
Σκοπός της εργασίας.....	σελ.34
2. Υλικά και μέθοδοι.....	σελ.36
2.1. Απομόνωση DNA.....	σελ.36
2.2. Η τεχνική PCR.....	σελ.36
2.2.1. Αρχή μεθόδου.....	σελ.36

2.2.2. Πειραματικά.....	σελ.39
2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	σελ.40
2.4. Μέθοδος RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism.....	σελ.42
2.4.1. Αρχή μεθόδου.....	σελ.42
2.4.2. Πειραματικά.....	σελ.42
2.5. Ηλεκτροφόρηση.....	σελ.44
2.6. Χρώση Silver Stain.....	σελ.44
2.7. Στατιστική επεξεργασία.....	σελ.46
3. Αποτελέσματα.....	σελ.48
3.1. Εισαγωγή.....	σελ.48
3.1.2. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα.....	σελ.48
3.3. Αποτελέσματα PCR.....	σελ.48
3.4. Αποτελέσματα RFLP.....	σελ.49
4. Συζήτηση.....	σελ.54
Παράρτημα.....	σελ.54
Βιβλιογραφία.....	σελ.57

Περίληψη

Η παχυσαρκία είναι μια επικίνδυνη για την δημόσια υγεία νόσος η επικράτηση της οποίας αυξάνεται με ανησυχητικούς ρυθμούς παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική αύξηση του σωματικού βάρους καθώς και του σωματικού λιπώδους ιστού, αυτό όμως που την καθιστά ιδιαίτερος επικίνδυνη είναι ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης μιας πληθώρας νοσημάτων, τα οποία μειώνουν το προσδόκιμο ζωής των ατόμων που πάσχουν από αυτήν. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη διατροφική διαταραχή σε ολόκληρο τον ανεπτυγμένο κόσμο, ενώ στην Αμερική παρουσιάζεται σύμφωνα με το Διεθνές σύστημα υγείας ως 2^η αιτία θανάτου. Η ταχύτητα με την οποία αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από αυτήν είναι εξαιρετικά ανησυχητική καθώς μέχρι το 2008 περισσότεροι από 1 δισεκατομμύριο ενήλικες ήταν υπέρβαροι και τουλάχιστον 500 εκατομμύρια παχύσαρκοι, με τους αριθμούς αυτούς να αναμένεται να διπλασιαστούν μέχρι το 2015.

Η παχυσαρκία αποτελεί νόσο πολυπαραγοντική στην εμφάνιση της οποίας συντελούν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες όπως το περιβάλλον καθώς και διάφοροι γενετικοί παράγοντες. Διακρίνεται σε τρία είδη, την μονογονιδιακή παχυσαρκία, την συνδρομική παχυσαρκία και την πολυπαραγοντική ή κοινή παχυσαρκία.

Οι διάφορες γενετικές μεταλλαγές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της, έτσι οι έρευνες για την παχυσαρκία επικεντρώνονται στην διερεύνηση της αιτιολογίας του παχύσαρκου φαινοτύπου μέσω της μελέτης ύποπτων γονοτύπων.

Από παλαιότερες μελέτες έχει προκύψει ότι η βιταμίνη D έχει ενεργό ρόλο στην παχυσαρκία, αφού μειωμένα επίπεδα της βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με την νόσο. Στην εν λόγω έρευνα επικεντρωθήκαμε στην διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) στην παχυσαρκία στον Ελληνικό πληθυσμό και πιο συγκεκριμένα του πολυμορφισμού *Cdx2* ο οποίος εδράζεται στην 5' μη κωδική περιοχή του γονιδίου VDR. Ο πολυμορφισμός αυτός είναι μια θέση πρόσδεσης του εντεροειδικού παράγοντα *Cdx2* και αποτελεί μια αλλαγή μιας βάσης από G σε A.

Obesity is a hazardous for the public health disease, the prevalence of which is increasing at an alarming rate worldwide. The common traits of obesity is excessive weight gain as well as body fat, but what makes it particularly dangerous is that it poses a major risk of a number of diet-related morbid diseases, which reduce life expectancy of obese people. It consists the most prevalent nutritional disorder through the developed world, while in America it is presented as the second cause of death according to the international health system. The pace by which obese people are increasing is of great concern as, until 2008 more than 1 billion people were overweight and at least 500 million obese, with these numbers expected to be doubled until 2015.

Obesity is a multifactorial disease, the development of which, is a result of the action of many different factors, such as the environment and various genetic factors. It is divided into three types, the monogenic obesity, the syndromic obesity and the multifactorial or common obesity.

The various genetic mutations play a role in it's emerge, that's the reason why researches are focused on investigation of the etiology of the obese phenotype by examining suspicious genotypes.

Previous studies have shown an active role of vitamin D in obesity, as reduced levels of the vitamin have been associated with the disease. In the present research, we focused on investigating the role of the receptor for vitamin D (VDR) in obesity among Greek population and more specifically the Cdx2 polymorphism which is mounted in 5' non coding region of the VDR gene.

This polymorphism is a binding site of the intestinal factor Cdx2 and it consists a single base change G/A.

1. Παχυσαρκία

Με τον όρο παχυσαρκία, εννοούμε, μια κατάσταση κατά την οποία το άτομο έχει συσσωρευμένο σωματικό λιπώδη ιστό, το ποσοστό του οποίου υπερβαίνει των φυσιολογικών ορίων και λειτουργεί με τρόπο επιβαρυντικό για την υγεία του. Η παχυσαρκία είναι μια νόσος στην εμφάνιση της οποίας συντελούν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες, οι οποίοι εν τέλει οδηγούν σε παχύσαρκο φαινότυπο. Μερικοί από τους παράγοντες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν ώστε να εμφανιστεί παχυσαρκία είναι διάφοροι γενετικοί, μεταβολικοί, νευρολογικοί, περιβαλλοντικοί, ψυχολογικοί και πολιτισμικοί παράγοντες (*Zambelas A. 2007 Srinivas N. et al.2004*).

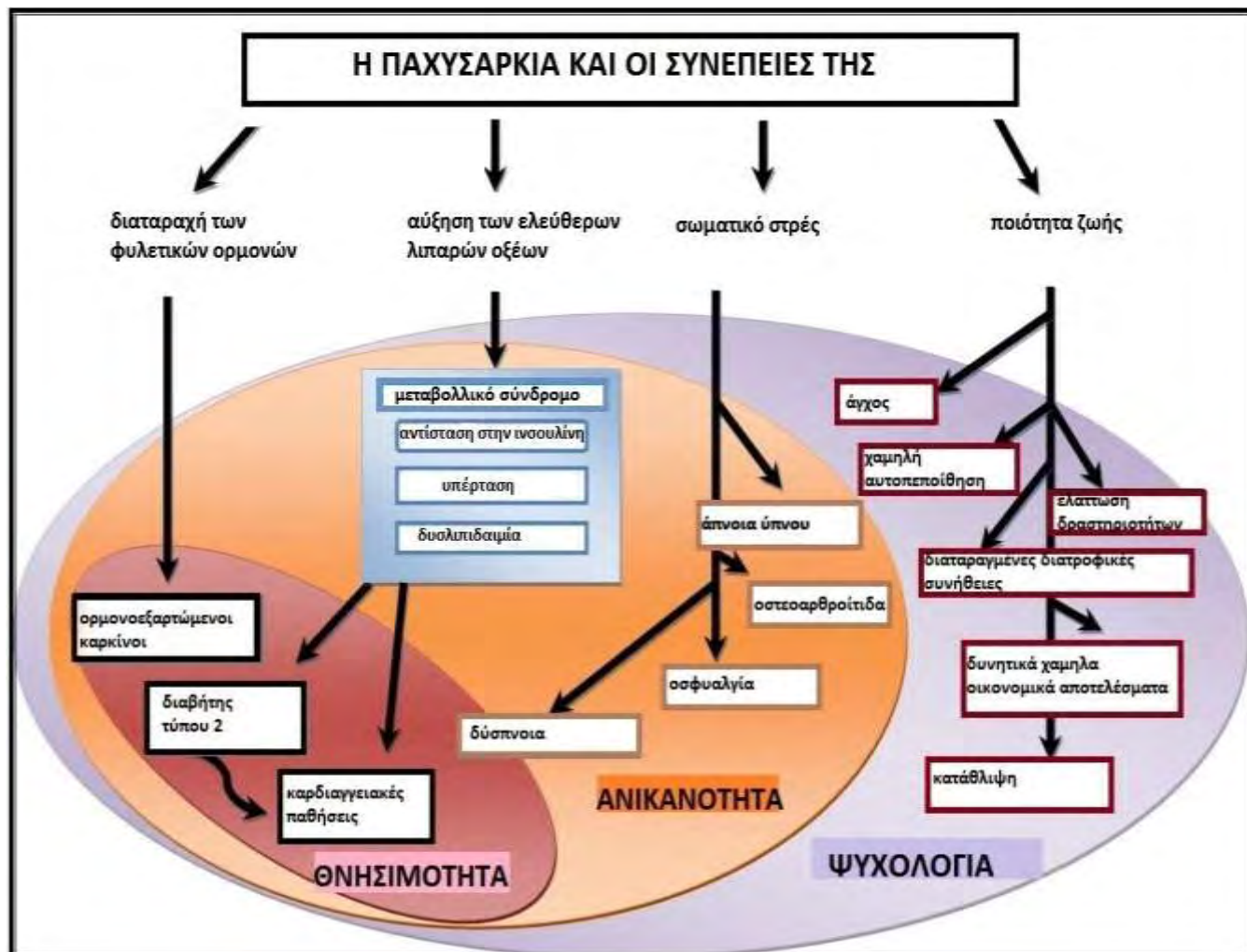
Βάση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας η παχυσαρκία αποτελεί μια χρόνια ασθένεια, πάρα πολύ διαδεδομένη τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, η οποία τείνει να αντικαταστήσει ακόμη και τα πιο παραδοσιακά για την δημόσια υγεία νοσήματα, όπως είναι οι μολυσματικές ασθένειες καθώς και ορισμένα κοινωνικά φαινόμενα όπως είναι ο υποσιτισμός (*Van S. Hubbard 2000*).

1.1 Νοσήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία

Η παχυσαρκία έχει αναδειχθεί σε μια τόσο επικίνδυνη νόσο, όχι απλώς για την υγεία αλλά ακόμη και για την ζωή του ασθενούς, λόγω του ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων νοσημάτων τα οποία μειώνουν το προσδόκιμο ζωής των παχύσαρκων ατόμων. Νοσήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία είναι η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος, ο διαβήτης τύπου 2, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, νόσοι της χοληδόχου κύστης, ορισμένοι τύποι καρκίνου (οι ορμονοεξαρτώμενοι), η οστεοαρθρίτιδα, η άπνοια ύπνου καθώς και άλλες διαταραχές (*Van S. Hubbard 2000*).

Ωστόσο, πέραν των πολύ σοβαρών βιολογικών προβλημάτων, η παχυσαρκία έχει σοβαρές συνέπειες και στην ψυχολογία των ατόμων που πάσχουν από αυτήν. Τα παχύσαρκα άτομα αντιμετωπίζονται με ρατσισμό και πολύ συχνά πέφτουν θύματα τόσο λεκτικής όσο και σωματικής βίας. Η αντιμετώπιση αυτή ένα πολύ συχνό φαινόμενο στην καθημερινότητα ενός παχύσαρκου ατόμου, και οδηγεί στην απομόνωση, την χαμηλή αυτοπεποίθηση και αυτοεκτίμηση, την κατάθλιψη αλλά και στην αποθάρρυνση του να αναζητήσει βοήθεια ή ακόμη και να εργαστεί (*A.R Sutin, A. Terracciano 2013*). Από διάφορες μελέτες προκύπτει, ότι μια σημαντική μερίδα παχύσαρκων ατόμων στον γενικό πληθυσμό έχει βιώσει μια μη επιθυμητή σωματική ή ψυχολογική

συνέπεια του βάρους του που μειώνει την ποιότητα της ζωής τους σε έναν ή παραπάνω τομείς (Thomas A. Et al 2002).



Εικόνα 1. (<http://www.smartliving2u.com/hydrotherapy-for-the-treatment-of-obesity>). Η παχυσαρκία και οι συνέπειες της στην υγεία των πασχόντων ατόμων.

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρήθηκε ότι δεν είναι λίγες οι γυναίκες οι οποίες ξεκινούν μια εγκυμοσύνη όντας ήδη υπέρβαρες ή παχύσαρκες το ποσοστό των οποίων προσεγγίζει το 18 - 25% ανάλογα με την χώρα. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι πολλές από τις ασθένειες που σχετίζονται με την παχυσαρκία κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης μπορεί να αυξήσουν την ευαισθησία του εμβρύου στις ασθένειες αυτές σε μεταγενέστερες ηλικίες. Η μητρική παχυσαρκία φαίνεται να σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης παιδικής παχυσαρκίας και με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και μεταβολικού συνδρόμου κατά την παιδική ή την πρώιμη ενήλικη ζωή. Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η υπερβολική αύξηση βάρους της μητέρας κατά την

διάρκεια της εγκυμοσύνης, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σχιζοφρένειας στους απογόνους (*Inmaculada Bautista-Castaño et al 2013*).

2. Συχνότητα εμφάνισης της Παχυσαρκίας

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), η παχυσαρκία από το 2008 μέχρι το 2012 έχει διπλασιαστεί παγκοσμίως. Το 2008 περισσότεροι από 1.4 δισεκατομμύρια ενήλικες από 20 ετών και πάνω ήταν παχύσαρκοι. Από αυτούς περισσότεροι από 200 εκατομμύρια ήταν άνδρες και σχεδόν 300 εκατομμύρια ήταν γυναίκες. Το 65% του παγκόσμιου πληθυσμού ζει σε χώρες όπου τα άτομα που είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα πεθαίνουν με μεγαλύτερη συχνότητα από τα λιποβαρή. Περισσότερα από 40 εκατομμύρια παιδιά, ηλικίας κάτω των 5 ετών, ήταν υπέρβαρα το 2010 (*W.H.O*).

Η πρώτη έρευνα για το ποσοστό της παχυσαρκίας στην Ελλάδα σε εθνική κλίμακα έγινε το 1990-1991 σε παιδιά ηλικίας 6-17 ετών και ανέφερε ότι το ποσοστό των υπέρβαρων ατόμων ανερχόταν σε 17.3% και στα δύο φύλα και το ποσοστό των παχύσαρκων ήταν 3.6% (*Tzotzas et al .2011*).

Η πρώτη μεγάλης κλίμακας επιδημιολογική έρευνα για την παχυσαρκία στην Ελλάδα έγινε από την Ελληνική Ιατρική Εταιρεία Παχυσαρκίας της Ελλάδας. Η έρευνα διεξήχθη σε 17, 341 άνδρες και γυναίκες ηλικίας από 20 έως 70 ετών. Από την έρευνα αυτή προέκυψε ότι το συνολικό ποσοστό των υπέρβαρων ήταν 35,2% και το συνολικό ποσοστό των παχύσαρκων ήταν 22.5%. Το μεγαλύτερο ποσοστό και στις δύο περιπτώσεις κατείχαν οι άντρες, η συχνότητα όμως της κοιλιακής παχυσαρκίας ήταν πιο συχνή στις γυναίκες . Ωστόσο σε αντίθεση με τους άντρες οι οποίοι είχαν παρόμοια ποσοστά παχυσαρκίας σε όλες τις ηλικίες στις γυναίκες τα ποσοστά αύξαναν με το πέρασμα της ηλικίας (*E. Kapantais et al. 2006*).

Όσον αφορά την παιδική παχυσαρκία, σε μελέτη που έγινε από τους M.Birbilis et al. το 2012 όπου ερευνήθηκαν 2294 παιδιά από 4 διαφορετικές πόλεις της Ελλάδας έδειξε ότι το ποσοστό των υπέρβαρων ανερχόταν σε 30.5% και των παχύσαρκων σε 11.6% και σε αντίθεση με την παραπάνω έρευνα η επικράτηση στα αγόρια ήταν μεγαλύτερη από αυτήν στα κορίτσια (13.7% vs 9.5%, $P<0.02$) (*M Birbilis et al 2012*).

Από τις παραπάνω ενδεικτικές μελέτες διαπιστώνεται η αύξηση του ποσοστού των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια. Τα ποσοστά αυτά είναι άκρως ανησυχητικά για μια χώρα σαν την Ελλάδα όπου χαρακτηρίζεται για την Μεσογειακή

διατροφή, και στρέφουν όλο και περισσότερους ερευνητές να ασχοληθούν με την διερεύνηση της σε γενετικό επίπεδο.

1.3 Εκτίμηση της Παχυσαρκίας

Η εκτίμηση της παχυσαρκίας γίνεται τα τελευταία χρόνια με τη μέτρηση του Δείκτη Μάζας Σώματος, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο οποίος ορίζεται ως το βάρος του σώματος σε χιλιογραμμάρια (Kg) διαιρούμενο από το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα m², και αποτελεί το πιο εύχρηστο εργαλείο κατάταξης των παχύσαρκων ατόμων. (*Florakis et al. 2009*)

$$\Delta.Μ.Σ = \frac{\text{Βάρος σε χιλιογραμμάρια (Kg)}}{(\text{Ύψος σε μέτρα})^2 (\text{m}^2)}$$

Πίνακας 1. Υπολογισμός Δείκτη Μάζας Σώματος

Οι τιμές του Δ.Μ.Σ είναι ανεξάρτητες από την ηλικία του ατόμου και είναι οι ίδιες και για τα δύο φύλα. Ωστόσο ο Δείκτης Μάζας Σώματος μπορεί να μην ανταποκρίνεται στον ίδιο βαθμό όσον αφορά το λίπος σε διαφορετικούς πληθυσμούς, αυτό οφείλεται, εν μέρη, στις διαφορετικές αναλογίες του σώματος ανάμεσα στα διάφορα άτομα. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε μια διαμάχη για το εάν υπάρχουν πιθανές ανάγκες για την ανάπτυξη διαφορετικών σημείων διαχωρισμού του Δείκτη Μάζας Σώματος για διαφορετικές εθνοτικές ομάδες. Λόγω της αύξησης των ενδείξεων ότι η σχέση του Δείκτη Μάζας σώματος, το ποσοστό του σωματικού λίπους, καθώς και η κατανομή του σωματικού λίπους διαφέρουν από πληθυσμό σε πληθυσμό, οι κίνδυνοι για την υγεία αυξάνουν κάτω από το σημείο αποκοπής του 25 Kg/m² που ορίζει το υπερβολικό βάρος (*WHO*).

Αφού λοιπόν η φύση της παχυσαρκίας και η κατανομή του λίπους από άτομο σε άτομο και από πληθυσμό σε πληθυσμό είναι διαφορετική θα ήταν συνετό τα αποτελέσματα του Δείκτη Μάζας Σώματος, να αξιολογούνται σε συνδυασμό με αποτελέσματα από άλλους δείκτες. Τέτοιοι δείκτες είναι η μικρότερη περιφέρεια της μέσης (Waist Circumference W.C) και η σχέση της μικρότερης περιμέτρου της μέσης προς την μεγαλύτερη περίμετρο των ισχύων (Waist to Hip Ratio WHR) (*S. Kuan Zhu et. al 2002*). Η μικρότερη περιφέρεια της μέσης είναι ένας απλός και συνάμα πολύ αξιόλογος τρόπος μέτρησης του κοιλιακού λιπώδη ιστού και δεν σχετίζεται με το ύψος ή το ολικό βάρος. Η μέτρηση της περιφέρειας της μέσης από μόνη της αποτελεί έναν καλύτερο δείκτη

μέτρησης του ολικού πάχους καθώς και της κεντρικής συσσώρευσης λίπους. Σύμφωνα με τον *Lean et al* η περιφέρεια μέσης 94cm στους άνδρες και 80cm στις γυναίκες θεωρούνται το καμπανάκι για ν' αρχίσει κάποιος να περιορίζει την αύξηση του βάρους του, και τιμές όπως 102cm για τους άνδρες και 88cm για τις γυναίκες είναι ένα σημείο στο οποίο θα πρέπει ν' αρχίσει να μειώνει το βάρος του, λόγω του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης νοσημάτων όπως τα καρδιαγγειακά και ο διαβήτης τύπου 2. (*Lean et al 1996*). Μέσω της μέτρησης της περιφέρειας της μέσης (Waist Circumference, W.C) μπορούμε με περισσότερη ακρίβεια να προβλέψουμε 4 στα 5 νοσήματα που προκαλούνται μέσω της παχυσαρκίας, όπως είναι τα καρδιαγγειακά επεισόδια και ο διαβήτης τύπου 2 (*S. Kuan Zhu et. al 2002*).

Με βάση τον Δ.Μ.Σ τα άτομα που πάσχουν από παχυσαρκία ταξινομούνται ως εξής

Ταξινόμηση του Αυξημένου Σωματικού Βάρους και της Παχυσαρκίας		
Κατηγορία Δ.Μ.Σ.	Κατάταξη	Κίνδυνος νοσηρότητας
< 18,5	Λιποβαρής	Χαμηλός
18,5 – 24,9	Φυσιολογικός	Φυσιολογικός
25 – 29,9	Υπέρβαρος	Αυξημένος
30 – 34,9	Παχύσαρκος 1 ^{ου} βαθμού	Πολύ Αυξημένος
35 – 39,9	Παχύσαρκος 2 ^{ου} βαθμού	Σοβαρά αυξημένος
>40	Θνησιγενής Παχυσαρκία	Πολύ Σοβαρά Αυξημένος

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των παχύσαρκων ατόμων με βάση τον δείκτη μάζας σώματος και κίνδυνος εμφάνισης σχετιζόμενων με την παχυσαρκία νοσημάτων. (*Florakis et al 2009*)

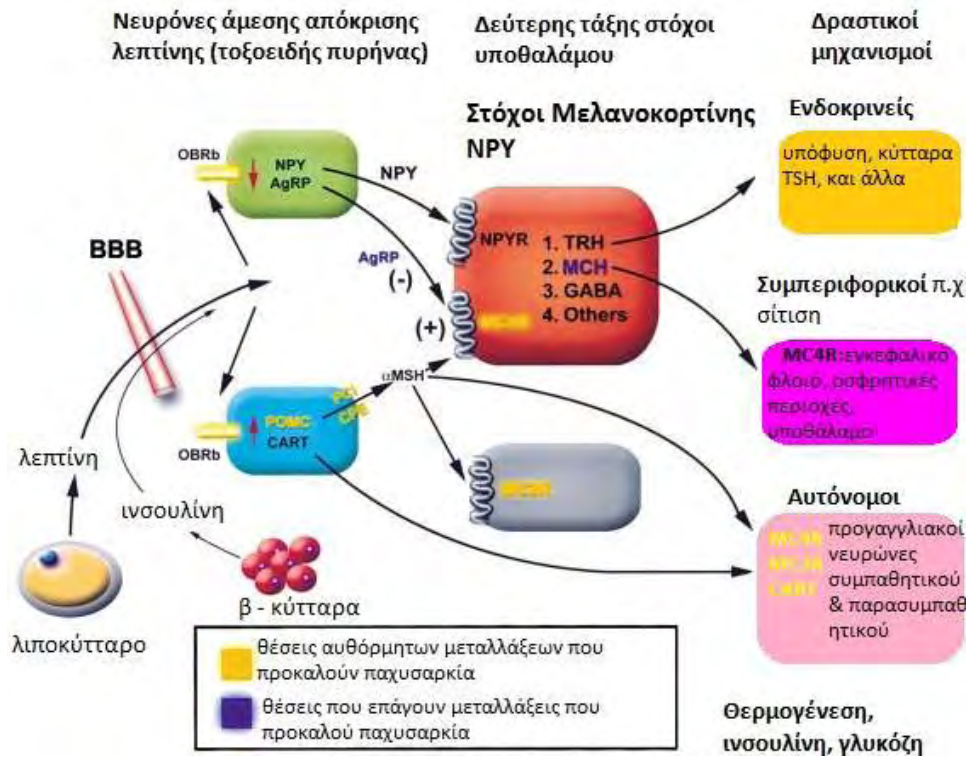
1.4 Μορφές της παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία ταξινομείται σε τρεις υποκατηγορίες, με βάση την εικαζόμενη αιτία. Έτσι έχουμε την μονογονιδιακή παχυσαρκία, τη συνδρομική παχυσαρκία και την πολυπαραγοντική ή κοινή παχυσαρκία.

1.4.1. Μονογονιδιακή παχυσαρκία

Η μονογονιδιακή παχυσαρκία είναι μια νόσος η οποία οφείλεται στην επίδραση ενός μόνο γονιδίου και χαρακτηρίζεται από πολύ σοβαρούς φαινοτύπους οι οποίοι κάνουν την εμφάνιση τους σε πολύ μικρή ηλικία. Οι γενετικές διαταραχές που οδηγούν σε σοβαρή μορφή παχυσαρκίας στον άνθρωπο βασίζονται σε διαταραχές στην ρύθμιση των μονοπατιών του υποθαλάμου τα οποία έχουν να κάνουν με την πρόσληψη τροφής και τον κορεσμό (*S. O'Rahilly, I.S. Farooqi 2006*).

Ο υποθάλαμος είναι ο κεντρικός ρυθμιστής της ενεργειακής ομοιόστασης. Διάφορες νευροπεπτιδικές ορμόνες παράγονται στους πυρήνες του υποθαλάμου και συμμετέχουν στην ρύθμιση της πρόσληψης τροφής μέσω της ορεξιογόνου και ανορεξιογόνου δράσης τους. Ο μεσοκοιλιακός πυρήνας θεωρείται το κέντρο του κορεσμού, ενώ η πλάγια υποθαλαμική περιοχή το κέντρο της πείνας. Ο τοξοειδής πυρήνας, βρίσκεται στην βάση του υποθαλάμου και περιέχει ένα πλούσιο δίκτυο νευρώνων που συνθέτουν ορεξιογόνα πεπτίδια, (νευροπεπτίδιο Υ (NPY)) και δίκτυο νευρώνων που συνθέτουν ανορεξιογόνα πεπτίδια, (η ομάδα α της μελανοκορτίνης (α-MSH), το πεπτίδιο agouti protein (AgPr) και το νευροπεπτίδιο cocaine and amphetamine related transcript (CART)). Ο τοξοειδής πυρήνας κατέχει σημαντικό ρόλο γιατί λόγω της απουσίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού βρίσκεται σε άμεση επικοινωνία με την συστηματική κυκλοφορία και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επίσης στην πλάγια υποθαλαμική περιοχή, η οποία θεωρείται το κέντρο της πείνας, παράγονται ορεξιογόνα πεπτίδια όπως το πεπτίδιο Melanin Concentrating Hormone (MCH) και οι ορεξίνες. Ο μεσοραχιαίος πυρήνας αποτελεί το κύριο σημείο αλληλοεπίδρασης μεταξύ του νευροπεπτιδίου Υ και της λεπτίνης (*H. Katsikis et al 2009*).



Εικόνα 2: Το μονοπάτι λεπτίνης μελανοκορτίνης επηρεάζει την ομοιόσταση της ενέργειας και το βάρος του σώματος. Η προερχόμενη από τον λιπώδη ιστό λεπτίνη περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δρά άπευθείας σε δύο πληθυσμούς νευρώνων στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου που εκφράζουν το NPY και την AgRP ή την POMC και την CART. Η λεπτίνη διεγείρει την παραγωγή της α-MSH και αναστέλλει την παραγωγή της AgRP (*Bruce M. Spiegelman/Jeffrey S. Flier*).

Η λεπτίνη η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob*, αρχικά εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα και συμμετέχει στην ορμονική σηματοδότηση του λιπώδους ιστού. Η λεπτίνη του πλάσματος είναι γενικά ανάλογη με την λιπώδη μάζα και τα επίπεδα της λεπτίνης, σε ένα μη παχύσαρκο άτομο κυμαίνονται από 5-15 ng/mL. Η απουσία της λεπτίνης οδηγεί σε αύξηση της λήψης τροφής και καταλήγει σε νοσηρή παχυσαρκία. Ο αρχικός φυσιολογικός ρόλος της είναι να επικοινωνεί με το κεντρικό νευρικό σύστημα και να δίνει σήμα ως προς την επάρκεια των διαθέσιμων αποθηκών ενέργειας, να περιορίσει την πρόσληψη τροφής και να προάγει την κατανάλωση ενέργειας (*M. D. Klok et al 2006, R. Yang, L.A Barouch 2007*). Ο υποδοχέας της λεπτίνης εντοπίζεται στην επιφάνεια των νευρώνων που παράγουν την agouti πρωτεΐνη και το πεπτίδιο γ και δέχονται ορεξιγόνα σήματα, και των νευρώνων που παράγουν την προοπιωμελανοκορτίνη (POMC) και την πρωτεΐνη CART (Cocain and Amfetamin Related Transcript) και δέχονται ανορεξιγόνα σήματα (*D.M Mutch, K. Clément 2006*).

Η λεπτίνη μετά την απελευθέρωση της από τον λιπώδη ιστό, περνά τον αιματοεγγεφαλικό φραγμό και συνδέεται με τον υποδοχέα της στον υποθάλαμο, στους νευρώνες που παράγουν την agouti πρωτεΐνη (AGRP) και στους νευρώνες που παράγουν την προοπιομελανοκορτίνη (POMC) στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Η πρόσδεση της λεπτίνης αναστέλλει την παραγωγή της AGRP και διεγείρει την παραγωγή της POMC η οποία υφίσταται, μετά-μεταφραστική τροποποίηση για την ενεργοποίηση ορισμένων πεπτιδίων όπως είναι η ορμόνη α -MSH. Η AGRP και η α -MSH συναγωνίζονται για την θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R). Η πρόσδεση της AGRP με τον MC4R αναστέλλει την δραστηριότητα του MC4R, ενώ η σύνδεση MC4R – MCH διεγείρει την δραστηριότητα του MC4R. Η μειωμένη δραστηριότητα ενεργοποιεί το ορεξιγόνο σήμα ενώ η αυξημένη δραστηριότητα ενεργοποιεί το ανορεξιγόνο σήμα. Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω γονίδια οδηγούν σε σπάνιες μορφές σοβαρής μονογονιδιακής παχυσαρκίας. (A.J. Walley 2009)

Ο ρόλος της λεπτίνης έγινε αντιληπτός από μελέτες σε ποντίκια με σοβαρή παχυσαρκία τα οποία παρατηρήθηκε ότι έφεραν τον γονότυπο ob/ob, το ob είναι το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την λεπτίνη. Τα ποντίκια αυτά έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο ob οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την παντελή απουσία της λεπτίνης και την εμφάνιση σοβαρής μορφής παχυσαρκίας. Χορήγηση ανασυνδιασμένης λεπτίνης μειώνει την λήψη τροφής και του σωματικού βάρους σε ποντίκια τα οποία εμφάνισαν ανεπάρκεια της λεπτίνης και διορθώνει όλες τις μεταβολικές ανεπάρκειες. Οι πρώτες και πιο χαρακτηριστικές συσχετίσεις μεταξύ της λεπτίνης και της σοβαρής παχυσαρκίας σε ανθρώπους έγιναν σε δύο ξαδέρφια πακιστανικής καταγωγής τα οποία είχαν μη ανιχνεύσιμα ποσοστά λεπτίνης και ήταν ομόζυγα για μια μετάλλαξη μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου στο γονίδιο ob κατά την οποία είχε γίνει διαγραφή μιας γουανίνης στο κωδικόνιο 133 του γονιδίου ob. Η ίδια μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε άλλα έξι άτομα με σοβαρή παχυσαρκία, επίσης πακιστανικής καταγωγής, τα οποία όμως δεν είχαν κάποιο συγγενικό δεσμό μεταξύ τους (S.O'Rahilly, I.SFarooqi 2006, C.T. Montague et al 1997).

Μια νέα παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στην λεπτίνη εντοπίστηκε σε ένα παχύσαρκο άτομο στην Κίνα, η μετάλλαξη αυτή αφορά την αλλαγή ενός αμινοξέος από Ιστιδίνη σε Λευκίνη. Το άτομο το οποίο έφερε την μετάλλαξη παρουσίαζε βαριάς μορφής παχυσαρκία (BMI=46,0kg/m²), συνοδευόμενη από διαταραχές όπως το μεταβολικό σύνδρομο, το σύνδρομο λιπώδους ήπατος και σύνδρομο άπνοιας ύπνου (Y. Zhao et al 2014).

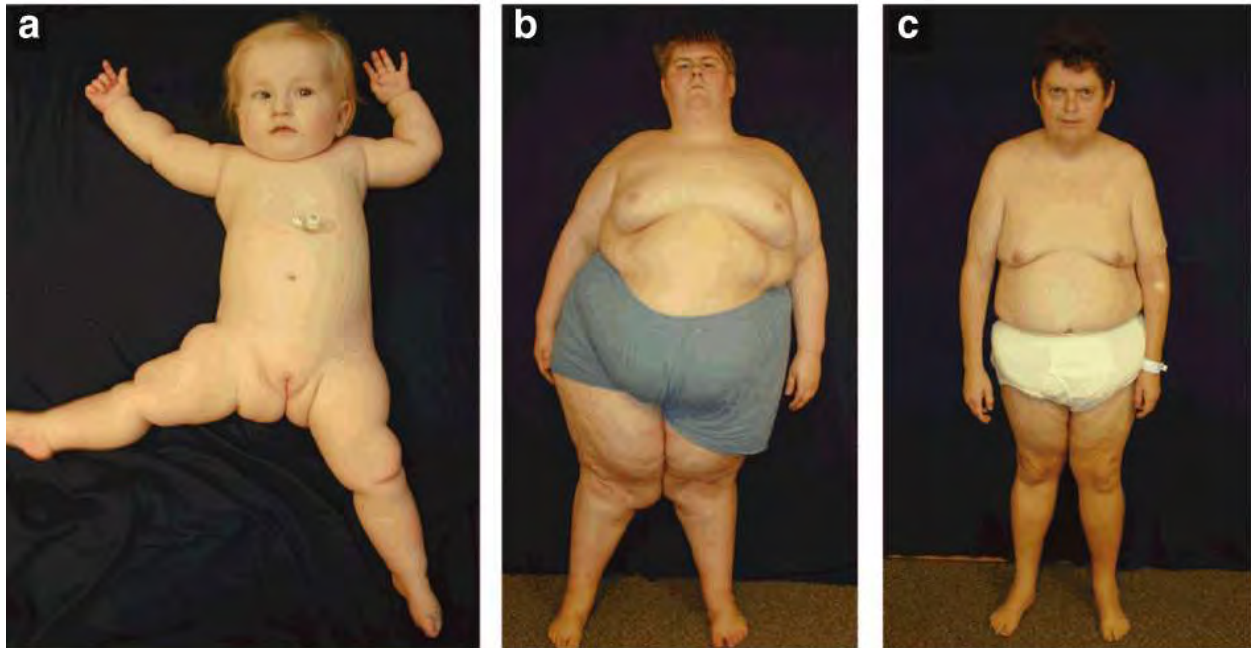
Η ανεπάρκεια του MC4R αποτελεί την πιο κοινή μορφή μονογονιδιακής παχυσαρκίας που είναι γνωστή μέχρι τώρα. Η ανεπάρκεια του MC4R χαρακτηρίζεται από σοβαρή παχυσαρκία και υπερφαγία. Το γονίδιο MC4R εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και παίζει ρόλο στην ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και στην ενεργειακή ομοιόσταση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του MC4R είναι οι πιο συχνές αιτίες της σοβαρής πρόωρης μονογονιδιακής παχυσαρκίας. Ορισμένες μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του MC4R μπορούν να προκαλέσουν μερικές λειτουργικές ανωμαλίες όπως ο μη φυσιολογικός εντοπισμός του MC4R στην μεμβράνη, ελάττωμα στην απόκριση του ανταγωνιστή και διαταραχή στην ενδοκυτταρική μεταφορά της πρωτεΐνης (*D.M Mutch, K. Clément 2006*). Ανεπάρκεια του MC4R προκαλεί σοβαρή παχυσαρκία, αύξηση της μυϊκής μάζας υπερφαγία από τον πρώτο χρόνο ζωής και σοβαρή υπερινσουλιναμία, παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζουν και τα knockout MC4R ποντίκια. Η πλειονότητα των ατόμων που παρουσιάζουν παχυσαρκία λόγω μεταλλάξεων του MC4R είναι ετερόζυγα. Από μια μελέτη σε 500 άτομα με βαριάς μορφής παχυσαρκία, προέκυψε ότι το 5% οφειλόταν σε μεταλλάξεις στον MC4R, γεγονός που τον κατατάσσει στην πιο συχνή μορφή μονογονιδιακής παχυσαρκίας. Πιο σπάνιες είναι οι περιπτώσεις των ατόμων που είναι ομόζυγα σε μεταλλάξεις του MC4R τα οποία εμφανίζουν πιο σοβαρούς φαινοτύπους (*S.O'Rahilly, I.SFarooqi 2006*).

1.4.2. Συνδρομική παχυσαρκία

Υπάρχουν περίπου 20-30 Μενδελικές διαταραχές στις οποίες οι ασθενείς χαρακτηρίζονται κλινικά ασθενείς και επίσης διακρίνονται από νοητική υστέρηση, δύσμορφα χαρακτηριστικά και όργανο-ειδικές αναπτυξιακές ανωμαλίες. Αυτές οι περιπτώσεις αναφέρονται ως συνδρομική παχυσαρκία. Αυτά τα σύνδρομα προκύπτουν από χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή διακριτά γενετικά ελαττώματα και μπορεί να είναι είτε αυτοσωμικές είτε φυλοσύνδετες διαταραχές. Η συνδρομική παχυσαρκία για αρκετά χρόνια θεωρούνταν ότι είναι μέρος της μονογονιδιακής παχυσαρκίας. Τελευταία όμως έχει διαχωριστεί από αυτήν και θεωρείται ότι αποτελεί ξεχωριστή περίπτωση παχυσαρκίας.

Το πιο γνωστό σύνδρομο που έχει μελετηθεί στην συνδρομική παχυσαρκία είναι το Prader-Willy Syndrome (PWS) με ποσοστό εμφάνισης 1 στις 25.000 γεννήσεις. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία, υπερφαγία, μειωμένη εμβρυική δραστηριότητα, νοητική υστέρηση και υπογοναδισμό. Είναι μια νόσος η οποία κληρονομείται από απώλεια ενός πατρικού

χρωμοσωμικού τμήματος του 15q11.2-q12. Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η υπερφαγία δεν είναι γνωστός, αλλά υπάρχει η υποψία ότι γίνεται μέσω της μεσολάβησης της γαστρικής ορμόνης της γρελίνης μέσω της ρύθμισης της πείνας και τη διέγερση της αυξητικής ορμόνης. Υπάρχουν θετικά ευρήματα που δείχνουν ότι συμπληρώματα της αυξητικής αυτής ορμόνης είναι ικανά για την αντιστροφή πολλών δυσλειτουργικών διαδικασιών που συνδέονται με το σύνδρομο PWS (*D. M Mutch and K. Clément 2006*).



Εικόνα 3. Άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Prader Whily. α) κοριτσάκι 8 μηνών, παρουσιάζει υποτονία, υπογοναδισμό και έχει ανάγκη απο υποβοηθούμενη σίτιση. β) άνδρας 19 χρονών, με Δ.Μ.Σ.= 67, εμφανίζει τυπικό σωματότυπο ατόμου με P.W.S με λίπος που κατανέμεται κυρίως στην κοιλιά, τους γοφούς και τους μηρούς. γ) άνδρας 34 χρονών, με Δ.Μ.Σ.=30, ο οποίος ζεί σε ίδρυμα για άτομα με PWS, το «κρέμασμα» του δέρματος οφείλεται στο ιστορικό νοσογόνου παχυσαρκίας. (Δόθηκε συγκατάθεση για την δημοσίευση των φωτογραφιών.) (*Suzanne B. Cassidy MD et al 2012*).

Ένα άλλο πολύ γνωστό σύνδρομο είναι το Bardet-Biedl syndrome (BBS). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία, δυστροφία κωνίων ράβδων, μορφολογικές ανωμαλίες των δακτύλων, μαθησιακές δυσκολίες νεφρικές παθήσεις. Το σύνδρομο αυτό έχει συσχετιστεί με τουλάχιστον 11 διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές (*D. M Mutch and K. Clément 2006*).

Το σύνδρομο Alström, χαρακτηρίζεται από παιδική παχυσαρκία η οποία σχετίζεται με υπερινσουλιναίμια, χρόνια υπεργλυκαιμία και νευροαισθητική έλλειψη, σταδιακή δυστροφία της

κωνικής ράβδου η οποία εν τέλει οδηγεί σε τύφλωση. Το γονίδιο που δρα στο σύνδρομο Alstrom αλληλοεπιδρά με γονίδια τροποποιητές για την εμφάνιση πρόσθετων χαρακτηριστικών όπως υποθυρεοειδισμό, ηπατική δυσλειτουργία, ανδρικό υπογοναδισμό, κοντό ανάστημα, μέτρια αναπτυξιακή καθυστέρηση, διαβήτη τύπου 2, υπερλιπιδαιμία και αθηροσκλήρωση. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το ALMS1. Θεωρείται ότι μια μετάλλαξη στο ALMS1 στον υποθάλαμο μπορεί να οδηγήσει σε υπερφαγία η οποία ακολουθείται από παχυσαρκία, στην συνέχεια η παχυσαρκία σε συνδυασμό με τις δυσλειτουργίες που προκαλεί το ALMS1 σε άλλα όργανα όπως το πάγκρεας μπορεί να οδηγήσει σε διαβήτη τύπου 2 (*Gayle B. Collin et al. 2002*). Η πιο κοινή μετάλλαξη στο γονίδιο ALMS1 είναι η c.10775delC, οι Xiaofang Liang et al εντόπισαν 7 νέες μεταλλάξεις οι στο γονίδιο ALMS στα εξόνια 8, 10 και 16 σε άτομα με σύνδρομο Alstrom (*X. Liang et al 2013*).

1.4.3. Πολυπαραγοντική ή κοινή παχυσαρκία

Η κοινή παχυσαρκία προκαλείται από την αλληλεπίδραση πολλών γονιδίων με το περιβάλλον (*Foss, 2009*), αποτελεί δηλαδή πολυπαραγοντική ασθένεια. Το περιβάλλον στο οποίο ζει και μεγαλώνει ένα άτομο το οποίο έχει την γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση παχυσαρκίας παίζει καθοριστικό ρόλο για τον εάν τελικά παρουσιαστεί ή όχι ο παχύσαρκος φαινότυπος (*Afridi and Khan 2004*). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν έναν αποδεδειγμένο ρόλο στην εμφάνιση της παχυσαρκίας, ωστόσο υπάρχει η υποψία ότι στο 40-90% συνεισφέρει η γενετική προδιάθεση. Αρχικά η γενετική της παχυσαρκίας περιοριζόταν στην ανίχνευση γονιδίων που προκαλούν την μονογονιδιακή παχυσαρκία. Σήμερα υπάρχει η υποψία για τουλάχιστον 20 γενετικούς τόπους στους οποίους εδράζουν γονίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση της λήψης τροφής, μέσω της δράσης τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή στον λιπώδη ιστό. Αν και η εξήγηση της κληρονομιάς της παχυσαρκίας από αυτά τα γονίδια είναι μικρή, δίνει πάτημα για περαιτέρω μελέτη (*B.M Herrera, C.M Lindgren 2010*).

Μελέτες σε ζεύγη διδύμων τα οποία μεγάλωσαν χωριστά σε διαφορετικό περιβάλλον μπορούν να επιβεβαιώσουν την γενετική προδιάθεση για την παχυσαρκία. Έρευνες σε μονοζυγωτικά δίδυμα τα οποία είχαν μεγαλώσει χωριστά επιβεβαίωσαν την ιδέα της κληρονομικότητας της παχυσαρκίας καθώς παρουσίασαν παρόμοιο Δ.Μ.Σ. Οι περιπτώσεις υιοθεσιών είναι επίσης ένας καλός τρόπος για να μελετήσουμε την κληρονομικότητα της παχυσαρκίας καθώς τα υιοθετημένα άτομα μοιράζονται μόνο το ίδιο περιβάλλον με τους γονείς χωρίς να υπάρχει γενετική σύνδεση. Μελέτες που έγιναν σε τέτοιες περιπτώσεις έδειξαν μια πολύ μεγάλη σχέση μεταξύ του ΔΜΣ των παιδιών με αυτόν των βιολογικών τους γονιών σε αντίθεση με

αυτόν των γονιών που τα είχαν υιοθετήσει. Από τα παραπάνω λοιπόν προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση των γονιδιακών παραγόντων και της παχυσαρκίας (*S.O'Rahilly, I.SFarooqi 2006*).

1.5 Αιτιοπαθολογία της κοινής παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία προκαλείται από αύξηση του λιπώδους ιστού. Ο λιπώδης ιστός αυξάνεται αρχικά μέσω της διαίρεσης των πρόδρομων λιποκυττάρων η οποία ακολουθείται από διαφοροποίηση σε ώριμα λιποκύτταρα. Η διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων περιλαμβάνει μια ή δύο διαιρέσεις μέσα σε 4-7 ημέρες. Στη συνέχεια ακολουθεί μια φάση κλωνικής μιτωτικής επέκτασης η οποία χαρακτηρίζεται από επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων C/EBP β και C/EBP σ και περιλαμβάνει μία με δύο διαιρέσεις, στην φάση αυτή είναι απαραίτητα τα γλυκοκορτικοειδή, η ινσουλίνη και ο αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης. Η επόμενη φάση χαρακτηρίζεται από μια αύξηση της έκφρασης C/EBP α και PPAR γ και την διέγερση της λιπογένεσης ως μέρος της τελικής διαφοροποίησης για να γίνουν ώριμα λιποκύτταρα. Εκτός από την συσσώρευση των τριγλυκεριδίων, τα ώριμα λιποκύτταρα εκφράζουν δείκτες της τελικής φάσης διαφοροποίησης (*Atif.B. Awad et al 2012*). Μέχρι σήμερα υπάρχουν πολλές πιθανές θεωρίες για την αιτιολογία της παχυσαρκίας.

1.5.1 Η θεωρία της ενεργειακής ισορροπίας

Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, ο οργανισμός υπό φυσιολογικές συνθήκες θα πρέπει να καταναλώνει ίση ενέργεια με αυτήν που λαμβάνει οπότε και θα βρίσκεται σε ενεργειακή ισορροπία. Έτσι λοιπόν ένα άτομο το οποίο λαμβάνει περισσότερη ενέργεια από αυτήν που καταναλώνει ή βρίσκεται σε ηρεμία ενεργειακής δαπάνης έχει αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσει παχυσαρκία (*B.M. Spiegelman, J.S. Flier 2001*).

1.5.2 Η θεωρία των λιποκυττάρων

Η παχυσαρκία είναι η αντανάκλαση της αύξησης των αποθεμάτων λίπους στις αποθήκες του υποδόριου λιπώδους ιστού καθώς και του σπλαχνικού λιπώδους ιστού. Ο λιπώδης ιστός αυξάνεται αρχικά λόγω της αύξησης του μεγέθους των λιποκυττάρων και έπειτα μέσω του σχηματισμού νέων λιποκυττάρων από πρόδρομα κύτταρα (στα παχύσαρκα άτομα παρατηρούνται υπερτροφικά ή διευρυμένα λιποκύτταρα). Η υπερβολική συσσώρευση λίπους οδηγεί τελικά στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων, λόγω αυξημένης λιπόλυσης, στην κυκλοφορία του αίματος και

κατά συνέπεια και σε άλλα όργανα οδηγώντας πιθανότατα στην παχυσαρκία. Τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων μέσω της λιποτοξικότητας οδηγούν σε δυσλειτουργία του υποδοχέα της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της λιπογένεσης στα λιποκύτταρα, επίσης αναστέλλει την λιπόλυση και εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (Richard N. Redinger 2007, G.A Bray).

1.5.3 Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου

Τα τελευταία χρόνια έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Το έντερο των θηλαστικών φιλοξενεί μια μεγάλη ποικιλία μικροβιακής χλωρίδας, η οποία φαίνεται να ενοχοποιείται για την εμφάνιση παχυσαρκίας καθώς και του μεταβολικού συνδρόμου. Οι κύριες βακτηριακές ομάδες που απαντώνται στο έντερο ανήκουν στα είδη των Bacteroidetes και των Firmicutes. Μια υπόθεση για τον τρόπο με τον οποίο η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε παχυσαρκία περιλαμβάνει τη συγκομιδή επιπλέον ενέργειας από τις φυτικές ίνες των τροφών τις οποίες μετατρέπει σε βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα τα οποία επηρεάζουν την παραγωγή ορμονών του εντέρου και αυξάνουν την εντερική διαπερατότητα προκαλώντας αυξημένα επίπεδα λιποπολυσακχαριτών (LPS). Αυτή η μεταβολική ενδοτοξαιμία θεωρείται ότι συμβάλλει σε μικρού βαθμού φλεγμονή, η οποία αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου. Επίσης, η μικροχλωρίδα του εντέρου φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την δαπάνη και την αποθήκευση ενέργειας στον οργανισμό ξενιστή. Έρευνες σε γενετικά τροποποιημένα παχύσαρκα ποντίκια και σε μη τροποποιημένα έδειξαν διαφορές ως προς τον βακτηριακό πληθυσμό του εντέρου. Τα γενετικώς τροποποιημένα παχύσαρκα ποντίκια είχαν αυξημένο αριθμό βακτηρίων του γένους Firmicutes και μειωμένο αριθμό του γένους Bacteroidetes σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Η διαφορά αυτή στον αριθμό των βακτηρίων θα μπορούσε να σχετίζεται με την παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία διασπούν πολυσακχαρίτες που δεν μπορούν να αφομοιωθούν από τον ξενιστή αυξάνοντας την παραγωγή μονοσακχαριτών βραχέων αλυσίδων λιπαρών οξέων (Short Chain Fatty Acid SCFA) και την μετατροπή αυτών των SCFA σε τριγλυκερίδια στο ήπαρ. Αυτές οι SCFA έχουν την δυνατότητα να δεσμεύουν και να ενεργοποιούν δύο G πρωτείνες συζευγμένων υποδοχέων τον GPR41 και τον GPR43 των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων επάγει την έκκριση του πεπτιδίου YY, το οποίο καταστέλλει την κινητικότητα του εντέρου και καθυστερεί την εντερική διέλευση. Μέσω αυτού του μηχανισμού η μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών

συστατικών και της εναπόθεσης τους συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη των μεταβολικών διαταραχών. Επιπλέον η μικροχλωρίδα του εντέρου έχει δειχθεί ότι μειώνει τον επαγόμενο από την νηστεία λιπώδη παράγοντα (Fasting – Induced adipose Factor FIAF) μια εκκρινόμενη από τα κύτταρα του εντέρου λιποπρωτεϊνική λιπάση η οποία αναστέλλει την δραστικότητα των LPL αυξάνοντας τα αποθέματα των τριγλυκεριδίων τα οποία προέρχονται από το ήπαρ (*Blaut M, Klaus S. 2012, I.M-Indias et al. 2014*).

1.5.4 Ο ρόλος του υποθαλάμου στην παχυσαρκία

Ο υποθάλαμος είναι μια περιοχή του εγκεφάλου κρίσιμη για πολλές λειτουργίες του οργανισμού, μερικές από τις λειτουργίες αυτές έχουν να κάνουν με την ρύθμιση της σίτισης. Ο υποθάλαμος δέχεται νευρικά, ενδοκρινή και μεταβολικά σήματα και απαντά σε αυτά. Η ρύθμιση της σίτισης σχετίζεται με τα ορεξιγόνα και μη ορεξιγόνα σήματα καθώς και τα σήματα για αποθήκευση ή κατανάλωση της ληφθήσας ενέργειας. Περιοχές του υποθαλάμου που εμπλέκονται στο ισοζύγιο της ενέργειας είναι ο μεσοκοιλιακός πυρήνας, ο τοξοειδής πυρήνας, ο παρακοιλιακός πυρήνας και ο πλάγιος υποθάλαμος. Ο μεσοκοιλιακός πυρήνας είναι κρίσιμος για την ρύθμιση της όρεξης και της ομοιόστασης του βάρους, ο τοξοειδής πυρήνας εμπλέκεται στην ρύθμιση της όρεξης μέσω της ενεργοποίησης ορεξιγόνων πεπτιδίων όπως η agouti πρωτεΐνη και το νευροπεπτίδιο Υ, το οποίο έχει αναγνωριστεί ως ένας νευροδιαβιβαστής κλειδί για την ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης και φέρεται να αυξάνει την λήψη τροφής μέσω αντίδρασης με έναν υποδοχέα του τον Υ5, καθώς και μέσω της έκκρισης ανορεξιγόνων πεπτιδίων όπως η προοπιομελανοκορτίνη (POMC) και το ρυθμιζόμενο από την κοκαΐνη και την αμφεταμίνη μετάγραφο, (cocaine and amphetamine - related transcript CART). Ο παρακοιλιακός πυρήνας εκκρίνει νευροπεπτίδια με ανορεξιγενή δράση όπως η οξιτοκίνη και η βαζοπροσίνη και εκφράζει τους υποδοχείς MC3R και MC4R οι οποίοι εμπλέκονται στην μονογονιδιακή παχυσαρκία. Ορισμένες βλάβες στους μηχανισμούς οι οποίοι ελέγχουν την όρεξη και την αίσθηση κορεσμού, όπως βλάβες λόγω αφαίρεσης όγκων του εγκεφάλου, γενετικά ελαττώματα του υποθαλάμου ή ακτινοθεραπείες μπορούν να οδηγήσουν σε παχυσαρκία (*J. H. Kim, J.H Choi 2013*).

1.5.5 Αδενοϊός 36 και παχυσαρκία

Οι αδενοϊοί είναι ιοί γνωστοί για την πρόκληση λοιμώξεων του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος και εντερίτιδων. Ωστόσο, θεωρείται ότι υπάρχει πιθανή συμμετοχή ενός ορότυπου αδενοϊού, του αδενοϊού 36(AD36), στην πρόκληση παχυσαρκίας. Η συμμετοχή του στην παχυσαρκία έχει διαπιστωθεί σε πειραματικά μοντέλα (ποντίκια και κοτόπουλα), μολυσμένα από

τον AD36, στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση του συνολικού σωματικού βάρους, ανεξάρτητη από την ενεργειακή πρόσληψη. Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους ο AD36 δρα σε σχέση με την παχυσαρκία στον άνθρωπο δεν έχουν γίνει ακόμη ξεκάθαροι, μελέτες έχουν προτείνει ότι ο AD36 ενισχύει την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων προκαλώντας αύξηση του σωματικού λίπους μέσω περιφερικών οδών, πιο συγκεκριμένα θεωρείται ότι ο AD36 επιταχύνει την διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα στα 3T3 – L1 κύτταρα και τον πολλαπλασιασμό τους, καθώς όταν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E4orf1 από τον ιό AD36 προστέθηκε σε 3T3 – L1 κύτταρα υπήρξε διέγερση στον C/EBP στον PPARγ-2 και στην γλυκερόλη 3 φωσφορική αφυδρογονάση σε σχέση με κύτταρα ελέγχου γεγονός που υποδηλώνει ότι το ιικό γονίδιο E4orf1 είναι υπεύθυνο για την διέγερση της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. (F. Greenway 2006) Σε μοντέλα τρωκτικών έχειδειχθεί ότι ο AD36 μειώνει τα επίπεδα της μονοαμίνης του υποθαλάμου και συνδέεται με μείωση στην έκκριση κορτικοστερόνης η οποία οδηγεί σε διαταραχή του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, μεταβολές τόσο στην έκφραση της λεπτίνης όσο και στον μεταβολισμό της γλυκόζης έχουν περιγραφεί και πιθανότατα συμμετέχουν σε αύξηση της συσσώρευσης λίπους σε μοντέλα προσβεβλημένα από τον AD36 (C. Gabbert et al 2010).

Πέραν των παραπάνω θεωριών, τα τελευταία χρόνια μελετάται ο ρόλος της βιταμίνης Δ στην εμφάνιση της παχυσαρκίας, έπειτα από την παρατήρηση χαμηλών επιπέδων της βιταμίνης σε παχύσαρκα άτομα. Η βιταμίνη Δ φαίνεται να συμμετέχει σημαντικά στην εμφάνιση παχυσαρκίας, μέσω του υποδοχέα της, του VDR (Vitamin D Receptor).

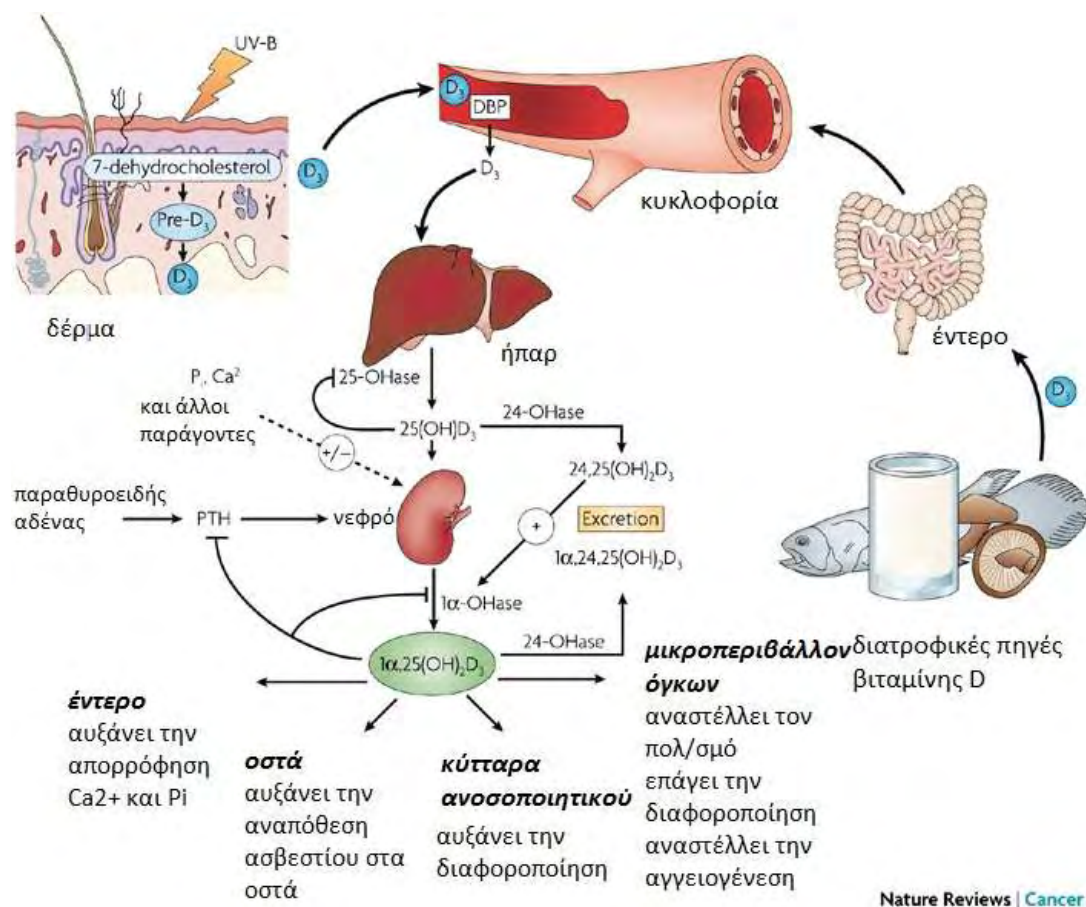
1.6 Η βιταμίνη Δ

Η βιταμίνη D ανήκει σε μια ομάδα λιποδιαλυτών στεροειδών ορμονών. Οι δύο κύριες μορφές της είναι η βιταμίνη D2 ή εργοκαλσιφερόλη η οποία είναι φυτικής προελεύσεως και η βιταμίνη D3 ή χολικαλσιφερόλη η οποία συντίθεται στα σπονδυλωτά. Ένα μικρό ποσοστό της βιταμίνης αυτής (περίπου το 30%), το προμηθευόμαστε από τις τροφές όπως είναι τα λιπαρά ψάρια και τα αυγά. Οι μεγαλύτερες όμως ανάγκες καλύπτονται μέσω του δέρματος από την ηλιακά προαγόμενη φωτοχημική μετατροπή της 7- διϋδροχοληστερόλης σε βιταμίνη D3.

Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής, το γήρας, η ποιότητα ζωής (διατροφή, ενδυμασία που επιτρέπει ή μη την έκθεση του σώματος στην ηλιακή ακτινοβολία) καθώς και διάφορες μεταβολικές διαταραχές, είναι οι κύριοι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια της βιταμίνης D. Ένα αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους καθώς και η παχυσαρκία έχουν τεκμηριωθεί για την μείωση της βιοδιαθεσιμότητας της χολικαλσιφερόλης, λόγω της προτίμησης της να συσσωρεύεται στον λιπώδη ιστό. Μια διαταραχή στην κατάσταση της βιταμίνης D μπορεί να αντανακλά αυξημένο κίνδυνο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στον γενικό πληθυσμό (*K.A. Khan et al. 2011, N. Kochupillai 2008*).

1.6.1. Μεταβολισμός της βιταμίνης Δ

Όποια και αν είναι η προέλευση της βιταμίνης D η μεταβολική οδός που ακολουθεί ώστε να μετατραπεί στην ενεργό μορφή της είναι η ίδια. Η οδός αυτή περιλαμβάνει δύο υδροξυλιώσεις, η πρώτη υδροξυλίωση γίνεται στο ήπαρ από την 25 υδροξυλάση σχηματίζοντας την 25 υδροξυβιταμίνη D₃ [25(OH)] και η δεύτερη γίνεται στα νεφρά από την 1-α υδροξυλάση σχηματίζοντας την 1,25 διυδροξύ-χοληκαλσιφερόλη [1,25 (OH)₂D₃], η οποία ονομάζεται και καλσιφερόλη και αποτελεί την ενεργό μορφή της βιταμίνης D που είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες βιολογικές λειτουργίες της βιταμίνης D. Οι 1-α υδροξυλάση και η 25-υδροξυλάση είναι υδροξυλάσες του κυτοχρώματος P450 (*X. Palomer et al. 2007*). Αν και η 25(OH)₂D₃ αποτελεί την βιολογικά ενεργό μορφή της βιταμίνης D, η διαθεσιμότητα της βιταμίνης D στους ιστούς καθορίζεται μέσω της 25(OH)D στο πλάσμα, αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι μετά την πρόσληψη της η βιταμίνη D₃ συνδέεται με μια πρωτεΐνη, την Vitamin D Binding Protein με την οποία εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και στην συνέχεια στο ήπαρ. Η σύνδεση της με την πρωτεΐνη αυτή την καθιστά πιο σταθερή στο αίμα, της προσδίδει μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (από 15 έως 50 μέρες) και είναι πιο ακριβής από την ενεργό μορφή της (*K.A. Khan et al. 2011, N. Kochupillai 2008, M. Bellan et al 2014*). Αν και δεν υπάρχει επίσημο φυσιολογικό όριο των επιπέδων της βιταμίνης D, θεωρείται ότι ποσά μέχρι 30ng/ml είναι επαρκή για την πρόληψη καταγμάτων στους ηλικιωμένους, ενώ άτομα με ποσό 20ng/ml θεωρούνται ότι έχουν ανεπάρκεια της βιταμίνης και απειλούνται από τις συνέπειες αυτής της κατάστασης (*M. Bellan et al 2014*).



Εικόνα 5 : Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D.

1.6.2. Η λειτουργία της βιταμίνης D.

Οι βιολογικές λειτουργίες της βιταμίνης D είναι πολλές μιας και ο υποδοχέας της απαντάται στα περισσότερα όργανα και ιστούς του σώματος. Η πρώτη και πιο γνωστή λειτουργία της βιταμίνης D που ανιχνεύτηκε ήταν η διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου στο πλάσμα. Η βιταμίνη D συνεργάζεται με την παραθυρεοειδή ορμόνη, αφ ενός στους οστεοβλάστες για την κινητοποίηση του ασβεστίου και του φωσφόρου από τα οστά στο πλάσμα και αφ ετέρου στα άπω νεφρικά σωληνάκια προς βελτίωση της επαναπορρόφησης του ασβεστίου από τα νεφρά (*H.F. DeLuca et al 1998*). Μερικές άλλες λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται είναι, η διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης, η διαφοροποίηση - πολλαπλασιασμός και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, η ρύθμιση ορισμένων ανοσολογικών λειτουργιών καθώς και η κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση των κυττάρων στόχων της βιταμίνης D (*K.A. Khan et al. 2011*). Ωστόσο, ολοένα και περισσότερες δράσεις της ανακαλύπτονται, όπως αυτή της αλλαγής της μεθυλίωσης του DNA στον υποκινητή ορισμένων γονιδίων (*I.S. Fetahu et al 2014*).

1.6.3. Ο ρόλος της βιταμίνης D στην παχυσαρκία

Μελέτες των τελευταίων ετών δείχνουν ότι η ανεπάρκεια ορισμένων θρεπτικών συστατικών όπως είναι η βιταμίνη D ενδέχεται να έχουν έναν ρόλο στην ανάπτυξη παχυσαρκίας. Η βιταμίνη D αποθηκεύεται στους μύες και στον λιπώδη ιστό. Η έκφραση τόσο της βιταμίνης D όσο και του υποδοχέα της έχουν βρεθεί σε λιποκύτταρα ποντικών και ανθρώπων όμως οι μηχανισμοί με τους οποίους η βιταμίνη D εμπλέκεται στην παχυσαρκία δεν είναι ξεκάθαροι. Έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη D μειώνει την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων μέσω του υποδοχέα της VDR καθώς αύξηση της βιταμίνης D οδηγεί σε υπερέκφραση του υποδοχέα της. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση στα αποθέματα λίπους αυξάνει την ικανότητα αποθήκευσης της βιταμίνης D οδηγώντας σε μειωμένη διαθεσιμότητα της στο σώμα. Σε κλινικές δοκιμές έχειδειχθεί ότι παχύσαρκα άτομα έχουν μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση του λευκού λιπώδους ιστού. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η βιταμίνη D επηρεάζει τον λιπώδη ιστό, αναστέλλοντας λιπογόνους παράγοντες μεταγραφής και την συσσώρευση λιπιδίων κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Η καλσιτριόλη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων και σε ορισμένες μελέτες έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη D₃ αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε χοίρους. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η αύξηση της βιταμίνης D μειώνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ, μειώνοντας την δραστηριότητα του, ενώ σταθεροποιεί τους υποδοχείς της. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μεταβολίτες της βιταμίνης D επηρεάζουν την παραγωγή λιποκινών και την φλεγμονώδη απόκριση στον λιπώδη ιστό. Μια άλλη εκδοχή είναι ότι η ανασταλτική δράση της βιταμίνης D μπορεί να στηρίζεται στην καταστολή της δράσης των υποδοχέων τριωδοθυρονίνης (T3) η οποία παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Υπάρχουν ωστόσο μελέτες από τις οποίες προκύπτει ότι η βιταμίνη D₃ διεγείρει την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η δράση της βιταμίνης D στην παχυσαρκία εξαρτάται από το στάδιο της διαφοροποίησης στην οποία βρίσκεται το κύτταρο, καθώς η ανασταλτική δράση της καλσιτριόλης εντοπίζεται μόνο στο στάδιο της κλωνικής μιτωτικής επέκτασης (Atif.B. Awad et al 2012. Ding C et al 2012).

1.7 Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR)

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) διαμεσολαβεί τις πλειοτροπικές βιολογικές δράσεις της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D₃ μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων. Ανήκει στην οικογένεια των τρανς δραστικών ρυθμιστικών παραγόντων μεταγραφής και παρουσιάζει ομοιότητα αλληλουχίας με τους στεροειδείς και θυρεοειδείς ορμονικούς υποδοχείς (www.pharmgkb.org). Ειδικότερα, ο υποδοχέας VDR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών μονοπατιών, όπως αυτό της απορρόφησης του ασβεστίου, του μεταβολισμού των οστών, της διαφοροποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και των κυτταρικών διαδικασιών της καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένου της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (*Ochs-Balcom et al 2008*).

Η ρύθμιση αυτού του κυτταρικού μεταγραφικού παράγοντα έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται τόσο σε μεταγραφικά όσο και σε μετά-μεταφραστικά επίπεδα. Ο υποδοχέας VDR μετά την σύνδεση του με την 1,25(OH)₂D₃, σχηματίζει ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς X (RXR), το σύμπλοκο VDR-RXR αναγνωρίζει ειδικές θέσεις πρόσδεσης στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων που ρυθμίζονται από την βιταμίνη D, οι οποίες ονομάζονται σημεία απόκρισης βιταμίνης D. Οι δύο κυριότερες λειτουργικές περιοχές του VDR είναι η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain LBD) ή περιοχή ετεροδιμερισμού και μια συντηρημένη περιοχή που συνίσταται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου η οποία αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain, DBD).

Όπως προαναφέρθηκε, οι βιολογικές δράσεις της ενεργού μορφής της βιταμίνης D διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα της βιταμίνης D. Ο υποδοχέας αυτός έχει την ικανότητα να επηρεάζει γονίδια, τα προϊόντα των οποίων ρυθμίζουν θεμελιώδεις διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Οι πολλές βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι ο υποδοχέας της βρίσκεται σε πληθώρα ιστών. Η γονιδιακή έκφραση του VDR ρυθμίζεται σε ινοβλάστες ποντικού θετικά μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης A, και αρνητικά μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης C. Και τα δύο αυτά μονοπάτια μεταγωγής σήματος διαμεσολαβούν στις δράσεις της PTH στα κύτταρα στόχους και κατ'αυτόν τον τρόπο μπορεί να αντιπροσωπεύουν ομοιοστατικούς μηχανισμούς οι οποίοι εν τέλει να ελέγχουν την κυτταρική ευαισθησία στην 1,25(OH)₂D₃. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου VDR πιθανό μέσω των παραπάνω οδών. Οιστρογόνα, η θυρεοειδής ορμόνη, και το ρετινοϊκό οξύ

είναι επίσης σε θέση να τροποποιήσουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του VDR. Τα επίπεδα του VDR κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να παίξουν έναν ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης από την βιταμίνη D σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων. Επιπλέον η ρύθμιση του mRNA του VDR από την βιταμίνη D έχει δειχθεί και πιστεύεται ότι συμβαίνει απ' ευθείας ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με ένα cis στοιχείο στην 5' του γονιδίου VDR (*K. Miyamoto et al 1997*).

1.8 Γενετική της κοινής παχυσαρκίας

Καθώς οι γενετικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν το 40-90% της διακύμανσης του Δ.Μ.Σ. του πληθυσμού (*Walley et al., 2009*) έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τον καθορισμό των γενετικών παραγόντων της παχυσαρκίας. Όσον αφορά τους Ευρωπαίους, περισσότεροι από 30 γενετικοί τόποι έχουν συνδεθεί με Δ.Μ.Σ. ≥ 30 (*Guo et al 2013*).

Το πρώτο γονίδιο που συσχετίστηκε με την πολυγονιδιακή παχυσαρκία ήταν το FTO (fat mass and obesity associated gene). Μετά από την συσχέτιση του με τον διαβήτη τύπου 2 έγινε αντιληπτό ότι η σχέση αυτή προέκυπτε από τον αυξημένο Δ.Μ.Σ. που είχαν τα άτομα αυτά σε σχέση με μη πάσχοντα άτομα. Το A – αλληλόμορφο του rs9939609 (C>A) έχει συσχετιστεί με 31% αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη παχυσαρκίας. Αν και ο τρόπος δράσης του δεν είναι ακόμη εξακριβωμένος, εικάζεται ότι η αύξηση του Δ.Μ.Σ. απορρέει μέσω της μεγαλύτερης λήψης τροφής. Σε έρευνα που έγινε σε παιδιά και ενήλικες που έφεραν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο επικινδυνότητας FTO παρατηρήθηκε απώλεια ελέγχου ως προς την κατανάλωση τροφής και επιλογή τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (*A.Hinney et al 2010, D. Corella et al 2012*).

Σημαντικό επιπλέον γονίδιο που εμπλέκεται στην πολυγονιδιακή παχυσαρκία είναι το MC4R. Το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs 17782313 (T>C) έχει συσχετιστεί με αύξηση του Δ.Μ.Σ, η σχέση τους όμως είναι μικρότερη από αυτήν του FTO. Στην πολυγονιδιακή παχυσαρκία δύο πολυμορφισμοί του MC4R φέρονται να εμπλέκονται, ο V103I και ο I251L. Μελέτες έδειξαν ότι άτομα που έφεραν το αλληλόμορφο I103 είχαν 20% μικρότερο κίνδυνο να αναπτύξουν παχυσαρκία από τους ομοζυγώτες που έφεραν το V103V αλληλόμορφο (*A.Hinney et al 2010*).

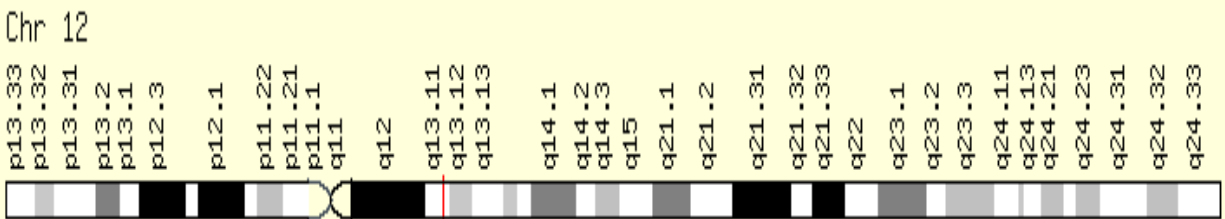
Ένα άλλο γονίδιο το οποίο έχει συσχετιστεί με την παχυσαρκία, είναι αυτό του $\beta 3$ αδρενεργικού υποδοχέα (Arg64Trp *ADRB3*). Το αδρενεργικό σύστημα παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας και στην κινητοποίηση των λιπιδίων στον λιπώδη

ιστό. Σε αρκετές μελέτες έχει γίνει συσχέτιση του ADRB3 Trp64Arg πολυμορφισμού, ο οποίος είναι το αποτέλεσμα μιας παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης στην πρώτη διαμεμβρανική περιοχή του β3 αδρενεργικού υποδοχέα (*N Kurokawa et al 2008*).

Στην πολυγονιδιακή παχυσαρκία φέρεται επίσης να εμπλέκονται 2 πολυμορφισμοί του γονιδίου της κονβερτάσης PSC1, ο N221D και το ζεύγος Q665E-S690T, οι οποίοι σχετίζονται με παχυσαρκία σε ενήλικες και παιδιά. Κάθε αλληλόμορφο του πολυμορφισμού N221D αυξάνει τον κίνδυνο για παχυσαρκία κατά 1,34 φορές και του Q665E-S690T κατά 1,22 (*K.S. Vimalaswaran, R.J.F. Loos 2010*). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί συσχέτιση του κοινού πολυμορφισμού T60N του γονιδίου της λεμφοτοξίνης-α, LTA, με το δείκτη της κοιλιακής παχυσαρκίας. Το γονίδιο αυτό συσχετίστηκε και με ασθένειες που προκαλούνται από την παχυσαρκία, όπως διαβήτης τύπου II, εγκεφαλικά επεισόδια, εμφράγματα, αλλά και με διάφορους φαινοτύπους του μεταβολικού συνδρόμου (*Hamid et al. 2005*). Ένας ακόμη πολυμορφισμός ο οποίος συσχετίστηκε με την πολυπαραγοντική παχυσαρκία είναι ο TaqI, που βρίσκεται στον υποδοχέα της βιταμίνης Δ (VDR), και δείχθηκε ότι η παρουσία του αλληλομόρφου T συνεισφέρει στην αύξηση του Δ.Μ.Σ κατά 3k/m² ανα αλληλόμορφο κινδύνου (*Vasillopoulos et al 2013*). Παράλληλα, πρόσφατα έχουν ακόμη αναγνωριστεί έξι γενετικοί τύποι που συνδέονται με την παχυσαρκία: *TMEM18*, *KCTD15*, *SH2B1*, *MTCH2*, *GNPDA2* και *NEGR1* (*Willer et al., 2009*).

1.8.1. Το γονίδιο του υποδοχέα VDR

Μία προσέγγιση που μπορεί να εφαρμοστεί για την αποσαφήνιση των υπεύθυνων γενετικών μεταλλαγών που επηρεάζουν τα φυσιολογικά μονοπάτια ρύθμισης του ενεργειακού ισοζυγίου και συνεπώς της παχυσαρκίας αποτελεί η 'αντίστροφη γενετική'. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη στρατηγική, η οποία μεταβαίνει από το φαινότυπο στο γενότυπο, ο υποδοχέας της βιταμίνης D, VDR, θεωρείται υποψήφιος, καθώς η στοχευμένη υπερέκφρασή του στα λιποκύτταρα οδηγεί σε μείωση της ενεργειακής δαπάνης και επαγωγή της παχυσαρκίας (*Wong et al 2013*). Παράλληλα, ποντίκια με απώλεια του γονιδίου του VDR παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα λιπώδους μάζας, τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (*Wong et al 2009*). Οι in vivo αυτές μελέτες υποδεικνύουν πως το γονίδιο του υποδοχέα VDR είναι ένα καλό υποψήφιο γονίδιο για την έκφραση της παχυσαρκίας.



Εικόνα 4. Η γενομική θέση του γονιδίου VDR (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDR>)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VDR υποδοχέα κλωνοποιήθηκε από τον Baker et al. το 1988 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 12q13.11. Το γονίδιο αυτό εκτείνεται σε περίπου 75kb γονιδιωματικού DNA, αποτελείται από 11 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 427 αμινοξέων. Τρία από τα εξόνια του γονιδίου VDR τα 1A, 1B και 1C συνθέτουν την 5'μη κωδικοποιούσα περιοχή και τα υπόλοιπα οκτώ (2-9) κωδικοποιούν το δομικό τμήμα του VDR. Ο υποκινητής του γονιδίου είναι πλούσιος σε GC κατάλοιπα και από αυτόν απουσιάζει το κουτί TATA, χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία πολλών θέσεων έναρξης της μεταγραφής. Κατευθύνει την μεταγραφή τουλάχιστον τριών μεταγράφων mRNA VDR στα νεφρά που φαίνεται ότι προκύπτουν από το διαφορικό μάτισμα των εξονίων 1B και 1C, όπου στο ένα εξαλείφεται το εξώνιο 1B και στο άλλο εξαλείφονται και το 1B αλλά και το 1C. Εικάζεται ότι υπάρχει ένα ακόμη mRNA το οποίο δεν περιλαμβάνει το εξώνιο 1C και πιθανότατα απαντάται σε ιστούς άλλους από το νεφρό. Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος δίνει πολλαπλές παραλλαγές μεταγραφής που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη VDR σε διαφορετικά μεγέθη. Οι δύο κυριότερες λειτουργικές μονάδες του VDR είναι μια N-τερματική δακτυλίου ψευδαργύρου θέση πρόσδεσης του DNA (DNA Binding Domain) και η C-τερματική θέση πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain LBD), η LBD του VDR έχει δομή όμοια με σάντουιτς αποτελούμενη από τουλάχιστον 12-α έλικες οι οποίες αποτελούν θέσεις ετεροδιμερισμού με τον RXR (*K. Miyamoto et al. 1997*).

1.8.2. Πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα VDR έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση και ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών. Συγκεκριμένα, υπάρχει σύνδεση των πολυμορφισμών του VDR με υψηλότερη προδιάθεση στην έλλειψη βιταμίνης D σε παιδιά και εφήβους (*Santos et al 2012*).

Σε όλο το μήκος του γονιδίου VDR έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα περισσότεροι από 60 πολυμορφισμοί. Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί του VDR έχουν ανιχνευθεί με την χρήση ενζύμων

περιορισμού. Οι πολυμορφισμοί αυτοί μελετώνται εδώ και χρόνια για την συσχέτισή τους με διάφορες ασθένειες όπως η οστεοαρθρίτιδα, η οστεοπόρωση, η ραχίτιδα, διάφοροι τύποι καρκίνου και ορισμένες ανοσολογικές ασθένειες, κάτι που αντανακλά την πλειοτροπική δράση της βιταμίνης Δ. Καθ' όλο το μήκος του γονιδίου συναντώνται πολλοί πολυμορφισμοί οι περισσότεροι από τους οποίους είναι ανώνυμοι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP) και η δράση τους δεν έχει προσδιοριστεί ή συσχετιστεί ακόμη. Οι περιοχές του γονιδίου στις οποίες εντοπίζονται οι περισσότεροι πολυμορφισμοί του VDR είναι η περιοχή του υποκινητή στο 5' άκρο και η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (Valdivielso J.M, Fernandez E. 2006, Kostner K. et al 2009). Αλλαγές στην κωδικοποιούσα περιοχή 5' μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στην έκφραση του mRNA, ενώ στην 3' αμετάφραστη περιοχή επηρεάζουν την σταθερότητα του mRNA και την απόδοση της μετάφρασης της πρωτεΐνης.

Από τους πολυμορφισμούς του VDR έχουν περιγραφεί οι BsmI, ApaI, EcoRV, TaqI, FokI, Cdx2 και Tru91. Οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν μελετηθεί και έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αρκετών ασθενειών. Ειδικότερα, ο ApaI έχει συσχετιστεί με οστεοαρθρίτιδα σε πληθυσμό στην Ασία (Zhu ZH et al 2014), οι ApaI και Bsm έχουν συσχετιστεί με πιθανή συμμετοχή τους στον καρκίνο του παχέως εντέρου σε πληθυσμό του Κασμίρ (Rasool S et al 2014) και ο πολυμορφισμός FokI έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (K. Zhang and L. Song 2014, Shan JL et al 2014). Πρόσφατα συσχετίστηκε και ο πολυμορφισμός TaqI με παχυσαρκία στον Ελληνικό πληθυσμό (Y.Vasilopoulos et al 2012), ενώ οι Bsm και FokI σχετίζονται με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 σε παιδιά στη Αίγυπτο (Abd-Allah SH et al 2014).

Αναλυτικότερα, οι πολυμορφισμοί BsmI(rs1544410), ApaI(rs7975232), EcoRV και Tru91 συναντώνται στο 3' άκρο του γονιδίου, ανάμεσα από τα εξόνια 8 και 9. Η λειτουργία της περιοχής αυτής δεν είναι γνωστή. Οι πολυμορφισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως σιωπηλοί καθώς δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του αμινοξέως αλλά την σταθερότητα του mRNA και κατά συνέπεια την έκφραση του γονιδίου. Οι BsmI και ApaI έχουν συσχετιστεί με την υπερβολική αύξηση βάρους και την παχυσαρκία (Binh et al 2011). Ο πολυμορφισμός TaqI(731236) βρίσκεται στο εξόνιο 9 του VDR και έχει συνδεθεί πρόσφατα με την παχυσαρκία (Vasilopoulos et al., 2013). Ο πολυμορφισμός FokI(rs2228570) συναντάται στο εξόνιο 2 του γονιδίου VDR και χαρακτηρίζεται από μια αλλαγή βάσης από T (θυμίνη) σε C (κυτοσίνη) σε ένα κωδικόνιο έναρξης με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 427 αμινοξέων, αντί για μια 424 αμινοξέων (Valdivielso J.M, Fernandez E. 2006). Παράλληλα έχει υποδειχθεί ότι τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν ότι μεταβολές στη λειτουργία του

VDR ίσως παίζουν ρόλο σε ασθενείς με παχυσαρκία (*Khanh vinh quốc Lương, Lan Thi Hoàng Nguyễn 2013*).

1.8.3. Ο πολυμορφισμός *Cdx2* του υποδοχέα VDR

Ο πολυμορφισμός *Cdx2* (rs11568820) απαντάται στην περιοχή του υποκινητή στο 5' άκρο του γονιδίου ανάμεσα από την 1a και 1e περιοχή. Η αλλαγή που συμβαίνει είναι μια 'Α' (αδενίνη) στην θέση μιας 'G' (γουανίνης). Πρώτη φορά ανιχνεύτηκε από τους *Arai et al* σε γυναίκες στην Ιαπωνία. Η μεταλλαγή αυτή ανιχνεύεται σε μια περιοχή η οποία είναι θέση πρόσδεσης του εντεροειδικού μεταγραφικού παράγοντα, *Cdx2*. Έχει δειχθεί ότι το αλληλόμορφο 'Α' παρέχει μια πιο ενεργή και πιο δυνατή πρόσδεση του *Cdx2* στη θέση πρόσδεσής του, εντείνει τη μεταγραφική δραστηριότητα και συνεπώς οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του VDR. Έτσι εικάζεται ότι, το αλληλόμορφο 'Α' μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση του VDR στο έντερο και επομένως σε αυξημένη οστική πυκνότητα (BMD) μέσω της καλύτερης εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου (*K.Kostner et al 2009*). Παράλληλα, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός μεταβάλλει την αποτελεσματικότητα πρόσδεσης του *Cdx2* και επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του VDR και σε ηπατικές κυτταρικές σειρές, όπου φαίνεται επίσης το 'Α' αλληλόμορφο να είναι πιο ενεργό από το 'G' στην πρόσδεση του *Cdx2*. Συνεπώς συνεισφέρει σε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του VDR καθώς και σε αυξημένη έκφρασή του σε πρωτεϊνικό επίπεδο (*Rodgers et al 2012*).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού *Cdx2* (rs 11568820, G/A) στο γονίδιο VDR με την παχυσαρκία και τα επίπεδα της βιταμίνης Δ στον Ελληνικό πληθυσμό.

Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε στο Διαβητολογικό Κέντρο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης. Όλα τα άτομα ασθενείς και μη ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν υψηλό μέσο όριο ηλικίας και προέρχονται από περιοχές της Βόρειας Ελλάδας.

Από τους ασθενείς και τους μη ασθενείς συλλέχθηκε αίμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ολικού DNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση βασίζεται στην επώαση με πρωτεϊνάση K, εκχυλίσαις με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η πρωτεϊνάση K διασπά τις πρωτεΐνες. Οι εκχυλίσαις με τη φαινόλη χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των φάσεων. Το SDS είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό το οποίο διασπά την πυρηνική μεμβράνη και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες – μεταξύ αυτών και τις νουκλεάσες που διασπούν το DNA.

Εκτός από την απομόνωση του DNA, το αίμα των ασθενών συλλέχθηκε και αναλύθηκε για την συλλογή κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων (HDL, LDL, Τριγλυκερίδια).

2.2 Η τεχνική PCR

2.2.1. Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική με την οποία μπορούμε να πάρουμε πολλαπλά αντίγραφα από ένα μόνο μικρό τμήμα DNA. Η τεχνική αυτή ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το 1983 και τιμήθηκε με το βραβείο Nobel. Ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργεί αυτή η μέθοδος μιμείται τον μηχανισμό που χρησιμοποιεί το ίδιο το κύτταρο *in vivo* για τον πολλαπλασιασμό του, μόνο που η PCR το καταφέρνει αυτό *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται μια μικρή ποσότητα DNA το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο για την δημιουργία πολλών αντιγράφων με την βοήθεια μιας πολυμεράσης. Η PCR αποτελεί μια γρήγορη απλή και αξιόπιστη μέθοδο η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία.

Τα συστατικά για μια αντίδραση PCR είναι :

Το DNA στόχος: χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την δημιουργία των μεταγενέστερων κλώνων θα πρέπει να είναι καθαρό από φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά και οτιδήποτε άλλο μπορεί

να επηρεάσει την αλληλουχία στόχο και θα πρέπει να μην είναι κατεστραμμένο διότι δεν θα μπορεί να γίνει η αντιγραφή.

Η Ταq πολυμεράση: επιτελεί επέκταση των εκκινητών και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πολυμεράση, έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermococcus Aquaticus* το οποίο ζει σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες και την καθιστά θερμοανθεκτική ως πολυμεράση. Οι ιδανικές θερμοκρασίες δράσης της είναι 55-75 °C και ο χρόνος ημιζωής της είναι οι 50 κύκλοι στους 90 °C. Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν η Klenow πολυμεράση η οποία δεν ήταν τόσο εύχρηστη αφού ανάμεσα στα άλλα μειονεκτήματά της, καταστρεφόταν σε υψηλές συνθήκες αποδιάταξης.

Εκκινητές: οι εκκινητές είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς την αλληλουχία στόχο. Χρησιμοποιούνται ένας άνωθεν και ένας εκατέρωθεν της αλληλουχίας. Οι εκκινητές δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους για να μην υβριδοποιούνται και πρέπει να είναι ειδικοί ως προς το DNA στόχο. Σημαντικό είναι επίσης και το σημείο τήξης (T_m) από το οποίο εξαρτάται και η θερμοκρασία υβριδισμού και η περιεκτικότητα των εκκινητών σε G-C βάσεις.

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer): Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCL (pH 8.8 στους 25°C, 0,1 Tween-20. (Bioline Buffer)

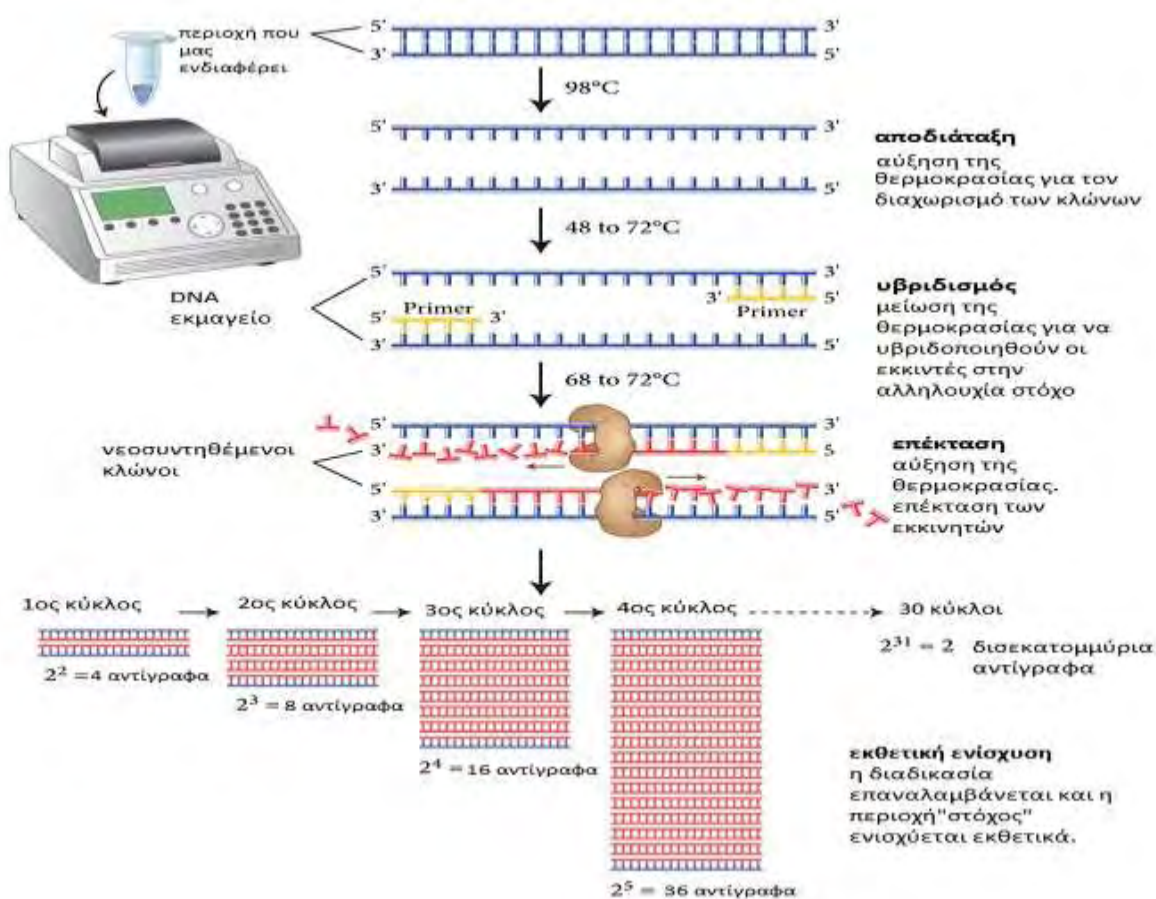
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl_2): τα ιόντα μαγνησίου επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την απόδοση της Ταq πολυμεράσης. Μικρή ποσότητα καθιστά την Ταq πολυμεράση ανενεργή, ενώ υψηλή ποσότητα μειώνουν την αξιοπιστία της.

dNTPs : τα dNTPs είναι διδεοξυριβονουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση για την σύνθεση των νέων κλώνων.

Η αντίδραση αποτελείται από *τρία στάδια*, το πρώτο στάδιο είναι αυτό της αποδιάταξης του δίκλωνου DNA το οποίο επιτυγχάνεται με την υποβολή των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες, 93-95°C. Στην θερμοκρασία αυτή οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται ο ένας από τον άλλο. Το δεύτερο στάδιο είναι αυτό της υβριδοποίησης των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους, η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό μειώνεται και είναι ειδική για κάθε ζεύγος εκκινητών και εξαρτάται από την σύνθεση και το μέγεθος των αλληλουχιών, συνήθως είναι 2 -10 βαθμούς χαμηλότερη από το T_m . Στο τρίτο στάδιο θέλουμε πάλι αυξημένη θερμοκρασία στους 72°C για να γίνει η επέκταση των κλώνων. Το ένζυμο DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί το υπάρχον DNA ως

εκμαγείο και συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια από το διάλυμα της αντίδρασης.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του στόχου DNA είναι τέσσερις, οι δύο αρχικοί και δύο νεοσυντιθέμενοι, στο τέλος του δεύτερου κύκλου είναι οκτώ και καθώς οι κύκλοι επαναλαμβάνονται ο αριθμός των κλώνων αυξάνεται εκθετικά διότι οι κλώνοι που συντίθενται χρησιμοποιούν ως πρότυπο αυτούς του προηγούμενου κύκλου. Έτσι επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA 2^n (όπου n ο αριθμός των κύκλων). Κάθε αντίδραση PCR περιλαμβάνει από 35 έως 40 κύκλους.



Εικόνα 6: (<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>). Σχηματική αναπαράσταση της PCR

2.2.2. πειραματικά

Υλικά για την PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	-	~100 – 200ng	1-2 µL
Primer Forward	50 pmole/µl	1pmole/ml	1µL
Primer Reverse	50 mM	1 pmole/ml	1µL
dNTPs	40 mM	0.8 mM	1µL
Buffer	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	100 mM	2mM	0,25µL
dH ₂ O	-	-	40-41µL
Taq πολυμεράση	5 U/µl	1 U	0,25µL

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τον rs11568820 πολυμορφισμό του γονιδίου VDR είναι:

Forward Primer: 5' - TCA GGA ACT TAT ATA TAT TCC TG – 3'

Reverse Primer: 3' - GTT AAG TTC AGA AAG ATT AAT TC – 5'

Το PCR kit που χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμορφισμό αυτό είναι της εταιρείας Bioline.

Τελικός όγκος αντιδραστηρίων και DNA σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα είναι τα 50mL.

Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε μια συσκευή PCR (Thermocycler), ρυθμίζονται οι επιθυμητές θερμοκρασίες και ξεκινά η αντίδραση.

Οι θερμοκρασίες για αυτόν τον πολυμορφισμό ήταν:

- 95°C για 5min
- 95°C για 45sec
- 52°C για 45sec
- 72°C για 45sec
- 72°C για 10min
- ❖ Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους.



Εικόνα 7: Θερμοκυκλοτής. Μηχάνημα στο οποίο επιτελείται η τεχνική της PCR.

2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να ελέγξουμε τα προϊόντα της PCR τα ηλεκτροφορούμε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Acetic acid- EDTA, pH 7.2 (TAE 1x). Τα μόρια κατευθύνονται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+) λόγω του αρνητικού φορτίου των φωσφοδιεστερικών ομάδων του DNA.

Η κινητικότητα στο πήκτωμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες :

- 1) Η συγκέντρωση της αγαρόζης (όσο πυκνότερο το πήκτωμα τόσο πιο αργή η μετακίνηση του DNA)
- 2) Η διαμόρφωση του DNA, η υπερελικωμένη και η γραμμική διαμόρφωση των μορίων του DNA μοριακού βάρους θα μετακινηθούν με διαφορετικό ρυθμό στην αγαρόζη
- 3) Η διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου
- 4) Η παρουσία χρωστικών, η παρουσία βρωμίουχου αιθηδίου έχει αποτέλεσμα την ελάττωση της κινητικότητας DNA έως και 10%
- 5) Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (η απουσία ιόντων μειώνει πολύ την κινητικότητα του DNA).

6) Το μέγεθος του τμήματος του DNA, τα μεγάλα τμήματα τρέχουν πιο αργά στο πήκτωμα

Για να γίνει ορατό το DNA στο πήκτωμα χρησιμοποιούμε βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο σχηματίζει σύμπλοκα παρεμβολής με το δίκλωνο DNA και όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (περίπου 300nm) εκπέμπει φθορισμό.

Προετοιμασία Πηκτώματος – Δειγμάτων

- Ζυγίζονται 0.6gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη
- Προστίθενται 40ml TAE 1x
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι την διάλυση της αγαρόζης (περίπου 1.5 min)
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 4μl βρωμιούχο αιθίδιο (αρχική συγκέντρωση 10mg/ml) και αναδεύεται.

Το διάλυμα αδειάζεται σε ένα ειδικό εκμαγείο όπου προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί ειδικά χτενάκια για τον σχηματισμό θέσεων (πηγαδάκια) στα οποία θα φορτωθούν τα PCR προϊόντα. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για περίπου 30 λεπτά. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αφαιρούμε προσεκτικά τα χτενάκια για να μην χαλάσουμε κάποιο από τα σχηματισμένα πηγαδάκια και το μεταφέρουμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x μέχρι να καλυφθούν εντελώς τα «πηγαδάκια».

Προετοιμασία pcr προϊόντων: Αναμιγνύουμε 3 μl Loading Buffer με 5 μl από κάθε pcr product και 3μl lader 100bp με 3μl Loading Buffer. Γίνεται φόρτωση των δειγμάτων και του ladder στο πήκτωμα και αφήνονται να τρέξουν για περίπου 30 λεπτά σε συνεχές ρεύμα 100V.

2.4. Μέθοδος RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

2.4.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένζυμα περιορισμού (ενδονουκλεάσες) που παράγονται από βακτήρια. Τα περιοριστικά ένζυμα πέπτουν την διπλή έλικα του DNA σε συγκεκριμένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης μήκους συνήθως τεσσάρων, πέντε ή έξι βάσεων. Έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί εκατοντάδες τέτοια ένζυμα τα οποία έχουν διαφορετικές αλληλουχίες αναγνώρισης από διάφορα βακτήρια. Τα ένζυμα αυτά τα χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να προστατευτούν από εισβολή ξένου DNA, ενώ προστατεύονται από αυτά μ' ένα ειδικό σύστημα μεθυλίωσης που διαθέτουν.

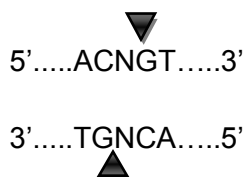
Μετά την κόψιμο του DNA με την χρήση ενδονουκλεασών, παρατηρούμε τον διαχωρισμός των τμημάτων που προκύπτουν, βάση του μοριακού τους βάρους, μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης μπορούμε να διαχωρήσουμε θραύσματα DNA από 10 – 1000bp.

2.4.2. Πειραματικά

Η αλληλουχία που ενισχύσαμε με την pcr είναι ένα τμήμα DNA 251 bp με την εξής αλληλουχία:

```
TCAGGAACT TATATATATT CCTGAGTAAA CTAGGTCACA
N
TAAAAACTTA TTTCTTATTA TGGGTTGCAG TTAAAAATTTT GAAAAAATACT GTCCTGGGAA
GACCCCTTGG TTTGCTTTCA TTGCTACAGC TTCTTACATT TATTCATTCT ATTTTTACCA
TCTGGAACAT AAATAAGGAG AGTCATCCCT GATCCTTTTT GTCTTAACTT GGGTTAGGAA
ATATAAATGA ATTAATCTTT CTGAACTTAA C
```

Για την πέψη του πολυμορφισμό *cdx2* χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *HpyCH4III* το οποίο προέρχεται από μετασχηματισμένο στέλεχος του E.Coli που φέρει ένα κλωνοποιημένο γονίδιο *HpyCH4III* του *Helicobacter Pylori* CH4.



Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα της εταιρείας New England BioLabs.

Ένζυμο *HpyCH4III*

Ρυθμιστικό διάλυμα 1x NEBuffer 4 (συγκέντρωση 1x: 50mM potassium acetate, 20mM Tris acetate, 10 mM Magnesium acetate, 1mM Dithiothreitol, pH 7.9, 25°C)

Μείγμα αντιδραστηρίων για την πέψη με το ένζυμο *HpyCH4III*.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer NEBA 10x	1μl
ddH ₂ O	6.8 – 3.7 μl
ένζυμο <i>HpyCH4III</i>	0.2 μl

Σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα τοποθετούνται 2 – 5 μl από το κάθε προϊόν PCR και 7.8 – 5 μl από το μείγμα των αντιδραστηρίων, έχοντας ως τελικό όγκο τα 10μl. Μετά την ετοιμασία των δειγμάτων με τα προϊόντα πέψης γίνεται ένα spin και αφήνονται για ολονύκτια επώαση στους 37°C.

Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 8%

Τα αποτελέσματα της πέψης παρατηρούνται ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8%. Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε είχε διαστάσεις 20cm x 20cm και γι αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα 62,5ml.

- Ζυγίζονται 8gr ουρίας και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως.
- Στο ίδιο ποτήρι προστίθενται 16.62 ml μητρικού διαλύματος ακρυλαμίδης
- Προστίθενται 8.25 ml TBE 10x
- Συμπλήρωση 30ml απιονισμένο H₂O
- Ακολουθεί ανάδευση μέχρι την διάλυση της ουσίας.
- Διήθηση του διαλύματος με διηθητικό χαρτί σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα
- Προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι να φτάσει ο τελικός όγκος στα 62,5ml.
- Προσθήκη 67 μL TEMED

- Προσθήκη 400 μl APS
- Γίνεται ταχύτατη ανάδευση του διαλύματος και άδειασμα του στα τζαμάκια που χρησιμοποιούνται ως καλούπι για το πήκτωμα. Τοποθετούμε τα χτενάκια από αριστερά προς τα δεξιά ή αντίστροφα προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων, για τον σχηματισμό των ειδικών θέσεων όπου θα φορτωθούν τα προϊόντα πέψης. Το διάλυμα αφήνεται να πολυμεριστεί περίπου 40 λεπτά.

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος αφαιρούνται τα χτενάκια και καθαρίζονται οι θέσεις που θα φορτωθούν τα δείγματα με μια καρφίτσα, από υπολείμματα τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την ηλεκτροφόρηση. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικές συσκευές ηλεκτροφόρησης οι οποίες γεμίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x μέχρι να καλυφθούν τα πηγαδάκια. Στην συνέχεια γίνεται ένα μικρό ξέπλυμα των πηγαδιών με το ρυθμιστικό διάλυμα για την καλύτερη καθαρότητα τους.

Ακολούθως γίνεται η προετοιμασία των προϊόντων πέψης, ενός ladder 100bp ο οποίος θα επιτρέψει την αναγνώριση του μεγέθους των τμημάτων του DNA και ενός μη τεμαχισμένου προϊόντος PCR το οποίο θα χρησιμεύσει σαν μάρτυρας για να εντοπίσουμε τα προϊόντα που δεν έχουν κοπεί.

Χρησιμοποιούμε 10μl από κάθε προϊόν πέψης και 3μl Loading Buffer, 3μl από τον ladder 100bp και 3μl Loading Buffer και 2μl από το μη τεμαχισμένο προϊόν PCR με 3μl Loading Buffer.

Τα παραπάνω δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτροφορούνται για 3 περίπου ώρες στα 220V.

2.6. Χρώση Silver Stain

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιούνται μέσω της χρώσης Silver Stain κατά την οποία χρησιμοποιούνται 3 διαφορετικά διαλύματα. Από τα διαλύματα αυτά ο νιτρικός άργυρος προσδένεται στο DNA και κατόπιν αντιδρά με την φορμαλδεΰδη σε αλκαλικό pH.

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης γίνεται αφαίρεση από τα πλακάκια στα οποία ήταν σταθεροποιημένο το πήκτωμα κατά την παρασκευή του και την ηλεκτροφόρηση και τοποθετείται σε πλαστική ζελατίνη, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε ένα μεταλλικό μπανάκι. Το μπανάκι με το πήκτωμα εναποτίθεται στην συσκευή ανακίνησης.

Παρασκευή πρώτου διαλύματος χρώσης

Σε έναν ογκομετρικό σωλήνα προσθέτουμε :

- ✓ 10 ml αιθανόλη 100%,
- ✓ 0.5 ml οξικό οξύ
- ✓ ddH₂O μέχρι τα 400ml

200ml από το 1^ο διάλυμα της χρώσης χύνονται στο μπανάκι με το πήκτωμα και αφήνεται να ανακινείται για 3 λεπτά. Με το πέρας των 3 λεπτών το διάλυμα αδιάζεται και αντικαθίσταται από τα εναπομείναντα 200ml του πρώτου διαλύματος και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Στην συνέχεια αφού έχει απομακρυνθεί το 1^ο διάλυμα ξεπλένουμε με ddH₂O το πήκτωμα για 1 λεπτό.

Η χρώση συνεχίζεται με το 2^ο διάλυμα

- ✓ 200ml διαλύματος νιτρικού αργύρου (AgNO₃ 0,1%)

Το πήκτωμα παραμένει στο διάλυμα του νιτρικού άργυρου για 8 με 10 λεπτά. Στην συνέχεια το διάλυμα χύνεται και ακολουθούν 2 πλύσεις με ddH₂O από 1 λεπτό η καθεμία.

3^ο διάλυμα

- ✓ 3 gr NaOH
- ✓ 0,01gr NaBH₄ (Sodium Borohydride)
- ✓ 1ml φορμαλδεΰδη
- ✓ ddH₂O μέχρι τα 200ml

Το τρίτο διάλυμα αδειάζεται στο πήκτωμα και παραμένει μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες (περίπου 15 λεπτά.) Μόλις οι ζώνες γίνουν ορατές πετιέται το τρίτο διάλυμα και το πήκτωμα ξεπλένεται για μια τελευταία φορά με ddH₂O για 1 λεπτό.

Μετά το τέλος της χρώσης το πήκτωμα εσωκλείεται σε ζελατίνη και αποθηκεύεται για περαιτέρω μελέτη.

2.7. Στατιστική επεξεργασία

Μετά την συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών.

Ο πολυμορφισμός *Cdx2* μελετήθηκε, μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας το Cochran – Armitage trend test καθώς και άλλα τεστ που τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατής δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact test και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14.

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1.Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός *rs11568820 (Cdx2)* του γονιδίου VDR. Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του VDR και στην αλληλουχία του DNA εντοπίζεται ως μια παραλλαγή από μια βάση γουανίνης (G) σε μια αδενίνη (A).

Οι μεταλλάξεις στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή επηρεάζουν την μεταγραφή του γονιδίου διότι στην περιοχή αυτή απαντώνται πλήθος θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Η περιοχή στην οποία εντοπίζεται ο *rs11568820* στην 5' UTR είναι μια θέση πρόσδεσης ενός εντεροειδικού μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος ονομάζεται *Cdx2*. Ο πολυμορφισμός *rs11568820* έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα.

3.1.2.Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα.

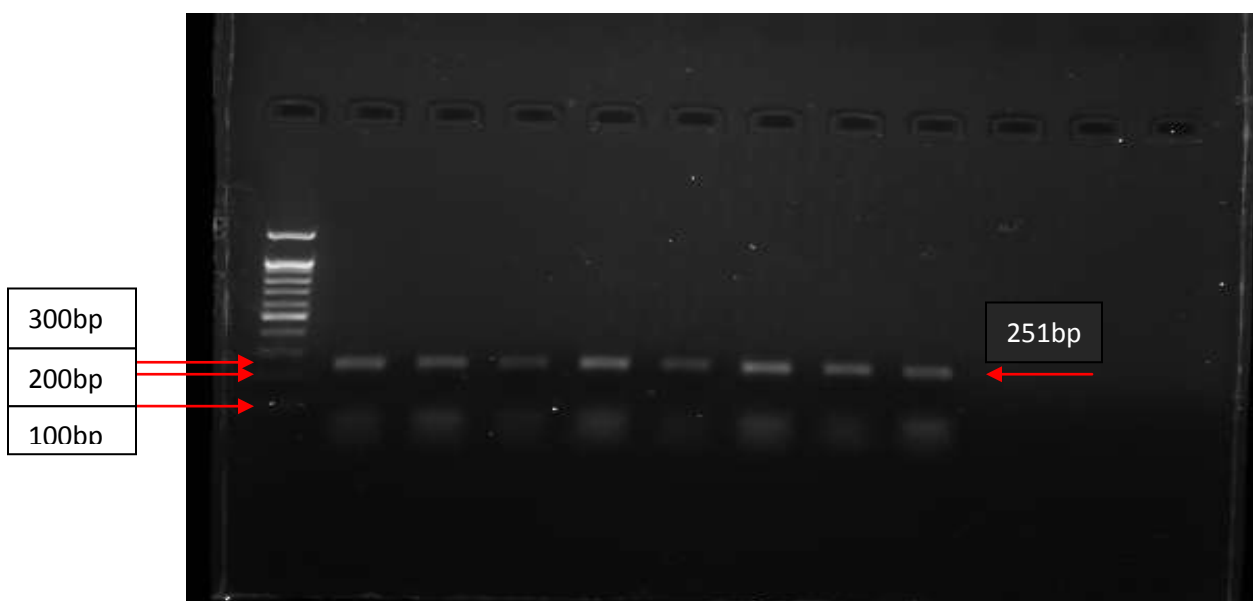
Η μελέτη έγινε σε 82 παχύσαρκα άτομα από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα και σε 102 μη παχύσαρκα άτομα. Τα άτομα αυτά είχαν υψηλό μέσο όρο ηλικίας και προσήλθαν για κλινικές εξετάσεις στο Διαβητολογικό Κέντρο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης. Έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς στην μελέτη, δείγματα αίματος συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν για την συλλογή κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων (HDL, LDL, Τριγλυκερίδια) και την κατάταξη των ατόμων σε δύο διακριτές ομάδες: άτομα με παχυσαρκία και άτομα χωρίς παχυσαρκία. Η αξιολόγηση και ο διαχωρισμός των ατόμων αυτών σε παχύσαρκα και μη άτομα, έγινε βάση υπολογισμού του Δείκτη Μάζας Σώματος (Body Mass Index, BMI) διαιρώντας το βάρος του (kg) με το τετράγωνο του ύψους (m²) και ορίζοντας ως σημείο αποκοπής για τα παχύσαρκα άτομα, τιμές BMI < 30 σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα.

3.3. Αποτελέσματα PCR

Στην παρούσα μελέτη η γονοτύπωση των υπό μελέτη δειγμάτων έγινε με την μέθοδο PCR – RFLP. Όπως προαναφέρθηκε, ο πολυμορφισμός *cdx2* του γονιδίου VDR είναι το αποτέλεσμα μιας αλλαγής από G/A. Με βάση την γνώση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR – RFLP για τον διαχωρισμό των ατόμων που φέρουν και των ατόμων που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό. Για τον

σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III το οποίο αναγνωρίζει τον γενετικό τόπο που βρίσκεται ο πολυμορφισμός και τέμνει το τμήμα του DNA όταν συναντά το κοινό αλληλόμορφο G.

Το τμήμα του DNA το οποίο ενισχύσαμε με την χρήση της PCR έχει μήκος 251bp. Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στην εικόνα απεικονίζονται αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση προϊόντων που ενισχύσαμε, όπου είναι ορατό και το μέγεθος του τμήματος DNA το οποίο έχει ενισχυθεί και βρίσκεται ανάμεσα από τις 200bp και τις 300bp.



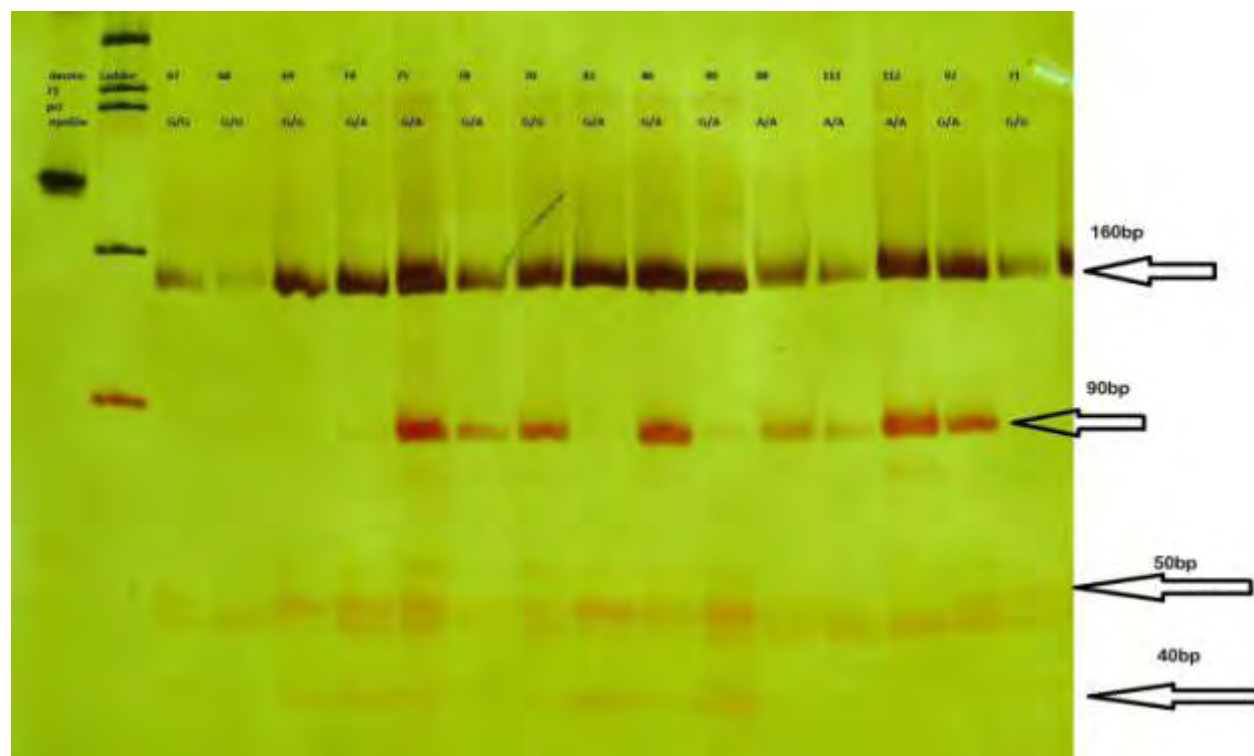
Εικόνα 8: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR. τα δείγματα 1 έως 8 της εικόνας ανήκουν στα άτομα 1-8 της μελέτης. Από τον μάρτυρα (ladder) στο αριστερό μέρος της εικόνας γίνεται αντιληπτό το μέγεθος του τμήματος, των 251 bp.

3.4. Αποτελέσματα RFLP

Μετά την ενίσχυση του τμήματος του πολυμορφισμού με την μέθοδο PCR έγινε πέψη των PCR προϊόντων με το ένζυμο περιορισμό HpyCH4III και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%

για να γίνει διάκριση ανάμεσα στα άτομα που φέρουν το σπάνιο αλληλόμορφο A και σε αυτά που φέρουν το κοινό αλληλόμορφο G.

Από την πέψη με το HpyCH4III και την ηλεκτροφόρηση προέκυψε η ταυτοποίηση ατόμων των οποίων ο γονότυπος ήταν G/G, (ομόζυγα ως προς το κοινό αλληλόμορφο G και ως προς την θέση περιορισμού) και G/A (ετερόζυγα). Στην εικόνα που ακολουθεί είναι εμφανή τα τμήματα που προκύπτουν



Εικόνα 9 : αποτελέσματα PCR – RFLP. Το πρώτο τμήμα που φαίνεται στα αριστερά της εικόνας είναι ένα από τα δείγματα της μελέτης που έχει ενισχυθεί με PCR, το οποίο όμως δεν έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για το που αναμένεται να συναντάται το τμήμα των 251bp στο τζελ, μέσω της χρήσης του Ladder που φαίνεται δεύτερος από αριστερά. Οι υπόλοιπες ζώνες που παρατηρούνται είναι τα τμήματα που έχουν προκύψει ύστερα από την πέψη και οι γονότυποι τους είναι καταγεγραμμένοι πάνω σε κάθε δείγμα.

Όπως φαίνεται και στην φωτογραφία τα άτομα 67, 68, 69, 70 και 71 είναι ομόζυγα για το κοινό αλληλόμορφο G το οποίο αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο και κόβει σε 2 σημεία δίνοντας 3 πρότυπα ζωνών μια 160bp, μια 50bp και μια 40bp. Τα άτομα 88, 111 και 112 είναι ομόζυγα ως προς το σπάνιο αλληλόμορφο A το οποίο δε αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού και έτσι κόβει μόνο μια φορά, δίνοντας δύο ζώνες, μια 160bp και μια 90bp, ενώ τα άτομα 74, 75, 78, 82, 86,

90 και 92, είναι ετερόζυγα και φέρουν και τα τέσσερα πρότυπα ζωνών δηλαδή ένα τμήμα 160bp, ένα 90bp, ένα 50bp και ένα 40bp

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα από την γονοτύπηση όλων των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη:

A/A	αποτελέσματα	A/A	αποτελέσματα	A/A	αποτελέσματα	A/A	αποτελέσματα	A/A	Αποτελέσματα
1	G/G	38	G/G	75	G/A	112	A/A	C5	G/G
2	G/A	39	Απροσδιόριστο	76	G/G	113	G/A	C6	G/G
3	G/G	40	G/G	77	G/G	114	G/G	C7	G/G
4	G/G	41	G/G	78	G/A	115	G/G	C8	G/A
5	G/G	42	A/A	79	G/G	116	G/G	C9	G/A
6	G/G	43	G/A	80	Απροσδιόριστο	117	G/G	C10	Απροσδιόριστο
7	G/G	44	G/G	81	Απροσδιόριστο	118	G/G	C11	G/G
8	G/G	45	G/G	82	G/A	119	G/G	C12	G/G
9	G/A	46	G/A	83	Απροσδιόριστο	120	G/G	C13	G/G
10	G/G	47	G/A	84	G/G	121	G/G	C14	G/G
11	A/A	48	Απροσδιόριστο	85	G/G	122	απροσδιόριστο	C15	G/G
12	G/A	49	G/G	86	G/A	123	G/G	C16	G/G
13	G/G	50	G/A	87	G/G	124	G/G	C17	G/A
14	G/G	51	G/A	88	A/A	125	G/G	C18	Απροσδιόριστο
15	G/G	52	G/G	89	G/G	126	Απροσδιόριστο	C19	Απροσδιόριστο
16	G/A	53	G/G	90	G/A	127	G/A	C20	G/G
17	G/G	54	A/A	91	G/G	128	G/G	C21	G/A
18	G/G	55	G/A	92	G/A	129	G/G	C22	G/A
19	G/G	56	G/A	93	G/A	130	G/G	C23	A/A
20	G/G	57	Απροσδιόριστο	94	G/A	131	G/G	C24	A/A
21	G/A	58	G/G	95	G/A	132	G/A	C25	G/A
22	G/G	59	G/A	96	G/G	133	G/G	C26	Απροσδιόριστο
23	G/G	60	G/G	97	G/A	134	G/G	C27	G/G
24	G/G	61	G/G	98	G/G	135	G/A	C28	G/A
25	G/G	62	G/A	99	Απροσδιόριστο	136	G/G	C29	G/G
26	A/A	63	A/A	100	Απροσδιόριστο	137	G/A	C30	G/A
27	G/G	64	Απροσδιόριστο	101	G/G	138	Απροσδιόριστο	C77	G/A
28	G/A	65	Απροσδιόριστο	102	G/G	139	G/A	C100	G/G
29	Απροσδιόριστο	66	A/A	103	G/A	140	G/A	C101	A/A
30	G/G	67	G/G	104	G/A	141	A/A	C102	G/A
31	G/G	68	G/G	105	G/A	142	G/A	C103	G/A
32	G/A	69	G/G	106	G/A	143	G/G	C104	G/A
33	Απροσδιόριστο	70	G/G	107	G/G	144	G/A	C105	G/G
34	A/A	71	G/G	108	G/A	C1	G/G	C106	G/G
35	G/A	72	Απροσδιόριστο	109	G/G	C2	G/G	C107	A/A
36	G/G	73	G/G	110	G/A	C3	G/G	C108	G/G
37	G/G	74	G/A	111	A/A	C4	G/G		

Βάση των παραπάνω γονοτύπων έγινε η στατιστική ανάλυση για να δειχθεί εάν τελικά υπάρχει ή όχι στατιστική συσχέτιση του πολυμορφισμού *Cdx2* με την παχυσαρκία. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν τα εξής:

Συσχέτιση του *Cdx2* του γονιδίου VDR με την παχυσαρκία.

Γονίδιο (πολυμορφισμός)	Τεστ	Μη παχύσαρκοι [BMI<30]	Παχύσαρκοι [BMI≥30]	P
VDR (<i>Cdx2</i>- rs11568820); G/A)	Cochran- Armitage (G/A)	76/26 (74.5/25.4)*	53/29 (64.63/35.36)*	0,19
	Genotypic (GG/GA/AA)	58/36/8	38/30/14	0,159
	Dominant ([GG+GA]/AA)	94/8	68/14	0,04
	Recessive (GG/[GA+AA])	58/44	38/44	0,019

Πίνακας 3 : η στατιστική συσχέτιση του πολυμορφισμού *Cdx2* με την παχυσαρκία.

Από τον παραπάνω πίνακα, με βάση το Cochran – Armitage test συμπεραίνουμε ότι η συχνότητα του αλληλομόρφου “A” είναι αυξημένη στα παχύσαρκα άτομα σε σχέση με τα μη παχύσαρκα, καθώς η συχνότητα του αλληλομόρφου A στα παχύσαρκα άτομα είναι 35.36 σε σχέση με τα μη παχύσαρκα στα οποία είναι 25.4. Επίσης από την γονοτύπηση για την επικράτηση των αλληλομόρφων (Dominant Test), η συχνότητα των ατόμων που είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο “A” είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στα παχύσαρκα άτομα σε σχέση με τα μη παχύσαρκα με **p=0.04**. Από το Odds Ratio (**OR= 1.89, 1.078-3.496**) προκύπτει ότι τα άτομα τα οποία φέρουν το αλληλόμορφο A είτε στην υπολειπόμενη (**p=0.019**) είτε στην επικρατούσα (**p=0.04**) μορφή κληρονομίσης, έχουν **x2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο** να εκδηλώσουν παχυσαρκία. Συμπερασματικά, βάση των αποτελεσμάτων, υπάρχει σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού *Cdx2* του γονιδίου VDR με την παχυσαρκία.

Ένα δεύτερο μέρος της μελέτης αυτής ήταν η συσχέτιση του πολυμορφισμού *Cdx2* του γονιδίου VDR με τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης D στα παχύσαρκα άτομα. Τα επίπεδα της βιταμίνης D μελετήθηκαν στο Διαβητολογικό Κέντρο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, της Θεσσαλονίκης με την ραδιοανοσολογική μέθοδο RIA. Η RIA είναι μία ραδιοανοσολογική μέθοδος η οποία στηρίζεται στην χρήση ενός σημασμένου με ραδιενεργό ισότοπο αντιγόνου το οποίο ανταγωνίζεται με το προς μέτρηση αντιγόνο για την πρόσδεση σε συγκεκριμένη ποσότητα του αντίστοιχου αντισώματος. Στην συνέχεια μετρώνται με μηχανήμα γ-counter οι κρούσεις των γνωστών και άγνωστων δειγμάτων της ουσίας που θέλουμε να μετρήσουμε (εν προκειμένω της βιταμίνης D), και με βάση την καμπύλη των πρότυπων ουσιών προσδιορίζεται με ακρίβεια η τιμή της άγνωστης ουσίας.

Συσχέτιση μεταξύ του VDR Cdx2 και επιπέδων βιταμίνης D

	VDR AA	VDR GA +GG	P
25(OH)D	11.43±8.36	19.86±10.48	0.04

Πίνακας 4 : οι τιμές των επιπέδων της βιταμίνης D σε ομόζυγα για το αλληλόμορφο “Α” παχύσαρκα άτομα και σε παχύσαρκα άτομα ετερόζυγα ή ομόζυγα ως προς το κοινό αλληλόμορφο “G”.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι τα παχύσαρκα άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο “Α” έχουν μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D σε σχέση με τα παχύσαρκα άτομα που είναι ομόζυγα για το κοινό αλληλόμορφο “G”, κάτι το οποίο συνάδει με την ευρέως γνωστή παρατήρηση ότι γενικά τα επίπεδα βιταμίνης Δ είναι μειωμένα στον ορό παχύσαρκων ατόμων. Συμπερασματικά, υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού *Cdx 2* του γονιδίου VDR με την παχυσαρκία.

4. Συζήτηση

Η παχυσαρκία αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα υγείας τεράστιας σημασίας (*Khanh vinh quóc Lương, Lan Thi Hoàng Nguyễn 2013*). Ο επιπολασμός της ασθένειας αυξάνεται παγκοσμίως και αγγίζει ήδη διαστάσεις επιδημίας (*Hedley et al. 2004*). Ήδη στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής θεωρείται δημόσιο ζήτημα και αφορά τόσο τα παιδιά όσο και τους ενήλικες (*Khanh vinh quóc Lương, Lan Thi Hoàng Nguyễn 2013*). Ταυτόχρονα, η συγκεκριμένη ασθένεια αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου για πολλές νόσους με υψηλή θνησιμότητα, όπως ο Διαβήτης Τύπου II, ο καρκίνος και οι καρδιοαναπνευστικές ασθένειες (*Ritchie et al 2007*).

Η παχυσαρκία είναι μια σύνθετη πολυπαραγοντική διαταραχή, όπου η απορρόθμιση σε διαφορετικά γονίδια επηρεάζει τη διαδικασία ενεργειακής πρόσληψης και, σε συνδυασμό με μεταβολές στον τρόπο ζωής, οδηγεί στον παχύσαρκο φαινότυπο (*Walley et al 2009*). Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την παχυσαρκία. Καθώς η συγκεκριμένη ασθένεια αναγνωρίζεται ως το μεγαλύτερο και ταχέως αναπτυσσόμενο πρόβλημα υγείας στον ανεπτυγμένο κόσμο, μεγάλη προσπάθεια έχει εστιαστεί στη διαλεύκανση των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στην ανισορροπία μεταξύ της ενεργειακής πρόσληψης και δαπάνης που παρατηρείται στην παχυσαρκία (*Ritchie et al 2007*).

Υποψήφιος για την ανάπτυξη παχυσαρκίας θεωρείται ο υποδοχέας της βιταμίνης D, VDR, καθώς in vivo μελέτες έχουν υποδείξει τη συμμετοχή του στην παθογένεια της ασθένειας (*Wong et al 2011, Wong et al 2009*). Συγκεκριμένα, η στοχευμένη υπερέκφρασή του σε λιποκύτταρα καταλήγει σε παχύσαρκο φαινότυπο, σε αντίθεση με την απουσία του που οδηγεί σε απώλεια βάρους (*Rodgers et al, 2012*). Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ο rs11568820 G/A πολυμορφισμός μεταβάλλει την αποτελεσματικότητα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Cdx2 στον υποδοχέα και επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του, με το αλληλόμορφο 'Α' να εμφανίζει πιο ενεργή πρόσδεση του Cdx2. Κατά συνέπεια, προκαλείται αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του VDR και υπερέκφραση σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποκάλυψαν αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου 'Α' σε πληθυσμό παχύσαρκων ατόμων, σε σύγκριση με το αλληλόμορφο 'Γ', με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το επίπεδο της παχυσαρκίας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως τα άτομα που φέρουν αυτό το αλληλόμορφο έχουν σχεδόν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν παχυσαρκία. Επιπρόσθετα, στα παχύσαρκα άτομα, όταν οι φορείς του αλληλομόρφου 'Α' ταξινομούνταν μαζί, παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα 25 (OH) D στον ορό, σε σύγκριση με τα

άτομα που είχαν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, 'G'. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με πολλές μελέτες οι οποίες υποδεικνύουν μια στενή σχέση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων της 25 (OH) D και της παχυσαρκίας (*Bell et al 1985, Arunabh et al 2003*).

Η αύξηση της έκφρασης του VDR ενοχοποιεί τον υποδοχέα για την εκδήλωση παχυσαρκίας. Ωστόσο, μπορεί η υπερέκφρασή του να είναι ένα μόνο από τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στον μετέπειτα καταρράκτη μεταγωγής σήματος. Για να διασαφηνιστεί αυτό πρέπει να εστιάσει κανείς στα χαμηλά επίπεδα της 25 (OH) D. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα υψηλά επίπεδα λιπώδους μάζας, που λειτουργούν ως αποθήκη για τη λιποδιαλυτή βιταμίνη D, οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στο πλάσμα και σε άτομα γενετικώς ευπαθή, πυροδοτώντας την υπερέκφραση του υποδοχέα VDR. Ωστόσο, η έμμεση λειτουργική συσχέτιση με τα επίπεδα της βιταμίνης D, που αποκαλύφθηκε από τη συγκεκριμένη εργασία, θα πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω με λειτουργικά πειράματα.

Μια πιθανή εξήγηση για τον ρόλο του *Cdx2* στην πρόκληση παχυσαρκίας μπορεί να αποδοθεί στην θέση στην οποία εντοπίζεται ο πολυμορφισμός αυτός. Η περιοχή αυτή είναι μια θέση πρόσδεσης ενός εντεροειδικού παράγοντα μεταγραφής, του *Cdx2*. Εικάζεται ότι παρουσία του αλληλομόρφου "A" του πολυμορφισμού *rs11568820* οδηγεί σε μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα και κατόπιν σε υπερέκφραση του VDR στο έντερο. Όπως έχει αναφερθεί, σε παλαιότερες μελέτες έχει δειχθεί ότι υπερέκφραση του VDR μπορεί να οδηγήσει σε παχυσαρκία.

Παλαιότερα, υπήρχε η αντίληψη ότι τα επίπεδα της παχυσαρκίας μπορούν να ελαττωθούν ή ακόμα και να αναστραφούν, βελτιώνοντας το επίπεδο της βιταμίνης D και ενεργοποιώντας την. Παρόλα αυτά, ενισχύοντας τη βιταμίνη D είτε αυξάνοντας το επίπεδό της είτε ενεργοποιώντας την μέσω του υποδοχέα VDR δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική και απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Αν και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι στατιστικώς σημαντικά, ο μικρός σχετικά αριθμός των δειγμάτων αποτελεί περιοριστικό παράγοντα ως προς την διεξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος. Για τον λόγο αυτό ένα επόμενο βήμα της μελέτης αυτής θα ήταν μια μεγαλύτερης κλίμακας έρευνα με την μελέτη περισσότερων δειγμάτων.

Παράρτημα

TAE 50x (500ml)

- Tris Base 121gr
- Acetic Acid 28,5ml
- EDTA 0,5ml
- ddH₂O ως 500ml

Βρωμιούχο Αιθήδιο (10mg/ml)

- 10mg EtBr
- 1ml ddH₂O

Loading Buffer 6x (10ml)

- Bromophenol blue 1% w/v 1ml
- Glycerol 100% 5ml
- TBE 10x 1ml
- ddH₂O μέχρι 100ml

TBE 10x (1lt)

- Tris base 108gr
- Boric Acid 55gr
- EDTA 0,5M 40ml
- ddH₂O μέχρι το 1lt

TBE 1x

- 1TBE 10x 100ml
- ddH₂O μέχρι 1lt

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμίδης 30%

- Ακρυλαμίδα 99% 29gr
- Δις Ακρυλαμίδα 1gr
- ddH₂O μέχρι τα 100ml

APS 20% w/v (10ml)

- Ammonium persulfate 2gr
- ddH₂O μέχρι τα 10ml

TEMED

Tetramethylethylenediamine) έτοιμο διάλυμα συγκέντρωσης 99%

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abd-Allah SH, Pasha HF, Hagrass HA, Alghobashy AA. Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. *Gene*. 2014 Feb 25;536(2):430-4. doi: 10.1016/j.gene.2013.12.032. Epub 2013 Dec 23.
2. Aien khan Afridi and Alam Khan, Prevalence and Etiology of Obesity - An Overview, *Pakistan Journal of Nutrition* 2004, Vol. 3, no 10.3923.
3. Arunabh, S., Pollack, S., Yeh, J. & Aloia, J.F. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 157-161 (2003).
4. Andrew J. Walley, Julian E. Asher & Philippe Froguel The genetic contribution to non-syndromic human obesity *Nature Reviews Genetics* 10, 431-442 (July 2009)doi:10.1038/nrg2594
5. Angelina R. Sutin ,Antonio Terracciano Perceived Weight Discrimination and Obesity July 24, 2013 *PLoS ONE* 8(7): e70048. doi:10.1371/journal.pone.0070048
6. Atif B. Awad , Lini Alappat & Michael Valerio Vitamin D and Metabolic Syndrome Risk Factors:Evidence and MechanismsCritical Reviews in Food Science and Nutrition, 52:103–112 (2012)Copyright C__ Taylor and Francis Group, LLCISSN: 1040-8398 / 1549-7852 online DOI: 10.1080/10408391003785458
7. Binh TQ, Nakahori Y, Hien VT, Khan NC, Lam NT, et al: Correlations between genetic variance and adiposity measures, and gene x gene interactions for obesity in postmenopausal Vietnamese women. *J Genet.* 2011, 90:1–9.
8. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(209):251-73. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_11.
9. Bell, N.H., Epstein, S., Greene, A., Shary, J., Oexmann, M.J. & Shaw, S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J. Clin. Invest.* 76, 370-373 (1985).
10. Bruce M. Spiegelman, Jeffrey S. Flier Obesity and the Regulation of Energy Balance *Cell*, Volume 104, Issue 4, 23 February 2001, Pages 531–543

11. Carl T. Montague, I. Sadaf Farooqi, Jonathan P. Whitehead, Maria A. Soos, Harald Rau, Nicholas J. Wareham, Ciaran P. Sewter, Janet E. Digby, Shehla N. Mohammed, Jane A. Hurst, Christopher H. Cheetham, Alison R. Earley, Anthony H. Barnett, Johannes B. Prins & Stephen Nature 1997, January 26, 387(6636):903
12. Dali Chen and Abhimanyu Garg Monogenic disorders of obesity and body fat distribution, *Journal of lipid Research*, October 1999, 40, 1735 -1746
13. David M Mutch and Karine Clément, Unraveling the Genetics of Human Obesity, *PLoS Genet.* 2006 December, vol 2, no12, . doi: 10.1371
14. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue *Br J Nutr.* 2012 Dec 14;108(11):1915-23. doi: 10.1017/S0007114512003285. Epub 2012 Oct 9.
15. Dolores Corella equal contributor mail, Carolina Ortega-Azorín equal contributor, Jose V. Sorlí equal contributor, M. Isabel Covas, Paula Carrasco, Jordi Salas-Salvadó, Miguel Ángel Martínez-González, Fernando Arós, José Lapetra, Lluís Serra-Majem, Rosa Lamuela-Raventós, Enrique Gómez-Gracia, Miquel Fiol, Xavier Pintó, Emilio Ros, Amelia Martí, Oscar Coltell, Jose M. Ordovás, Ramon Estruch Statistical and Biological Gene-Lifestyle Interactions of MC4R and FTO with Diet and Physical Activity on Obesity: New Effects on Alcohol Consumption, *PLoS ONE* vol.7, no12, December 2012, doi:10.1371
16. Frank Greenway Virus-induced obesity *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Published 1 January 2006 Vol. 290 no. R188-R189 DOI: 10.1152/ajpregu.00607.2005
17. Gayle B. Collin, Jan D. Marshall, Akihiro Ikeda, W. Venus So, Isabelle Russell-Eggitt, Pietro Maffei, Sebastian Beck, Cornelius F. Boerkoel, Nicola Siculo, Mitchell Martin, Patsy M. Nishina & Jürgen K. Naggert, Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alström syndrome, *Nature Genetics* April 2002, vol.31, doi:10.1038/ng867
18. George A. Bray, *Physiology and Consequences of Obesity*
19. Guo, Y., Lanktree, M.B., Taylor, K.C., Hakonarson, H., Lange, L.A., Keating, B.J. & IBC 50K SNP array BMI Consortium. Gene-centric meta-analyses of 108 912 individuals confirm known body mass index loci and reveal three novel signals. *Hum. Mol. Genet.* 22, 184-201 (2013).
20. Ha-Na Na and Jae-Hwan Nam Adenovirus 36 as an Obesity Agent Maintains the Obesity State by Increasing MCP-1 and Inducing Inflammation *J Infect Dis.* (2012) 205 (6): 914-922. doi: 10.1093/infdis/jir864 First published online: January 24, 2012
21. Hector F. DeLuca, and Claudia Zierold, Mechanisms and Functions of Vitamin D, *Nutrition Reviews*, Vol. 56, No. 2
22. Helen N Lyon and Joel N Hirschhorn, Genetics of common forms of obesity: a brief overview, *Am J Clin Nutr* July 2005, vol. 82, no. 1 215S-217S

23. Hedley, A. A., Ogden, C. L., Johnson, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., Flegal, K. M., 2004, Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999–2002, *The Journal of the American Medical Association*, 291, 2847–2850.
24. Hamid Y. H., Urhammer S. A., Glumer C., Borch-Johnsen K., Jørgensen T., Hansen T., et al., 2005, The common T60N polymorphism of the lymphotoxin-alpha gene is associated with type 2 diabetes and other phenotypes of the metabolic syndrome, *Diabetologia*, 48, 445–451.
25. Bautista-Castaño, Patricia Henriquez-Sanchez, Nestor Alemán-Perez, Jose J. Garcia-Salvador, Alicia Gonzalez-Quesada, Jose A. García-Hernández, Luis Serra-Majem. *Maternal Obesity in Early Pregnancy and Risk of Adverse Outcomes* Plos One, November 20, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0080410
26. Irfete S. Fetahu, Julia Höbaus and Enikő Kállay* Vitamin D and the epigenome Molecular vision Biology and Genetics Front. Physiol., 29 April 2014 | doi: 10.3389/fphys.2014.00164
27. Isabel Moreno-Indias, Fernando Cardona, Francisco J. Tinahones and María Isabel Queipo-Ortuño Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus Front. Microbiol., 29 April 2014 | doi: 10.3389/fmicb.2014.00190
28. Ja Hye Kim, MD and Jin-Ho Choi, Pathophysiology and clinical characteristics of hypothalamic obesity in children and adolescents *Annals of pediatric Endocrinology and Metabolism* December 2013 18(4):161-167
29. Jeffrey B. Schwimmer, *Adenovirus 36 and Obesity in Children and Adolescents* PEDIATRICS Vol. 126 No. 4 October 1, 2010 pp. 721 -726 (doi: 10.1542/peds.2009-3362)
30. Jose M. Valdivielso , Elvira Fernandez Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. ELSEVIER 9 September 2006, vol. 371,
31. Jwan Rkhzay-Jaf, Jacqueline F. O'Dowd, and Claire J. Stocker , Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome
32. Khanh vinh quốc Lương, Lan Thi Hoàng Nguyễn, The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. vinh quốc Lương and Nguyễn Nutrition Journal 2013, 12:89.
33. Kai Zhang and Lihua Song Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of 39 Studies PloS One April 25 2014 9(4):e96125.
34. Kapantais T. Tzotzas I. Ioannidis A. Mortoglou S. Bakatselos M. Kaklamanou L. Lanaras I. Kaklamanos First National Epidemiological Survey on the Prevalence of Obesity and Abdominal Fat Distribution in Greek Adults E. Ann Nutr Metab 2006;50:330–338 DOI: 10.1159/000094296 *Annals of Nutrition & Metabolism*

35. Karani S. Vimalleswarana and Ruth J.F. Loos, Progress in the genetics of common obesity and type 2 diabetes, Expert Reviews in Molecular Medicine February 2010 Vol. 12 doi 1017
36. Ken-ichi Miyamoto ¹, Robert A. Kesterson ^{1, 2}, Hironori Yamamoto, Yutaka Taketani, Eri Nishiwaki, Sawako Tatsumi, Yoshio Inoue, Kyoko Morita, Eiji Takeda and J. Wesley Pike Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter Molecular Endocrinology mend.endojournals.org doi: 10.1210/me.11.8.1165 Molecular Endocrinology July 1, 1997 vol. 11 no. 8 1165-1179
37. Khurshid Ahmad Khan, Professor Javed Akram, Mariam Fazal, Hormonal actions of vitamin D and its role beyond just being a vitamin: A review article, International Journal of Medicine and Medical Sciences Vol. 3(3), pp. 65-72, March 2011, ISSN 2006-9723
38. KIM KÖSTNER, NICOLE DENZER, CORNELIA S.L. MÜLLER, ROLF KLEIN WOLFGANG TILGEN, JÖRG REICHRATH The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature, Anticancer Research September 2009, vol. 29, no. 9, 3511-3536
39. Lean MEJ, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ 1995;311:158–61.
40. Lips P. Vitamin D physiology, Prog Biophys Mol Biol. September 2006 vol.92
41. M Birbilis, G Moschonis, V Mougios and Y Manios Obesity in adolescence is associated with perinatal risk factors, parental BMI and sociodemographic characteristics, European Journal of Clinical Nutrition (2013) vol.67 115–121; doi:10.1038 December 2012
42. M. D. Klok, S. Jakobsdottir, M. L. Drenthe the role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review Article first published online: 24 AUG 2006 DOI: 10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x
43. Mattia Bellan, Gabriele Guzzaloni, Maura Rinaldi, Elena Merlotti, Carlotta Ferrari, Antonella Tagliaferri, Mario Pirisi, Gianluca Aimaretti, Massimo Scacchi, and Paolo Marzullo Altered glucose metabolism rather than naive type 2 diabetes mellitus (T2DM) is related to vitamin D status in severe obesity Cardiovasc Diabetol. 2014; 13: 57. Published online Mar 11, 2014. doi: 10.1186/1475-2840-13-57 PMID: PMC3995712
44. Miyamoto K, Kesterson R A, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike J W in Molecular endocrinology, Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter (Baltimore, Md.) Mol Endocrinol. 1997 Jul;11(8):1165-79.

45. N Kurokawa, E H Young, Y Oka, H Satoh, N J Wareham, M S Sandhu The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals, R J F Loos, International Journal of Obesity June 2008 vol. 32, 1240–1249; doi:10.1038
46. N. Kochupillai, The physiology of vitamin D: Current concepts, Indian J Med Res 127, March 2008, Nature 387, 903-908 (26 June 1997) |; Received 4 March 1997; Accepted 30 May 1997 October 1999 The Journal of Lipid Research, 40, 1735-1746.
47. Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC, Elston RC, J Plummer S, Casey G, Li L. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. Carcinogenesis. 2008 Sep; 29(9):1788-93. Doi: 10.1093/carcin/bgn166.
48. Rasool S, Kadla SA, Rasool V, Qazi F, Khan T, Shah NA, Ganai BA. Richard N. Redinger, the Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations, Role of the VDR Bsm I and APA I Polymorphisms in the Risk of Colorectal Cancer in Kashmir. Oncology Research and Treatment **37, No. 6, 2014** June
49. Ritchie, S.A. & Connell, J.M. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 17, 319-326 (2007).
50. Rodgers, R.J., Tschöp, M.H. & Wilding, J.P. Anti-obesity drugs: past, present and future. Dis. Model. Mech. 5, 621-626 (2012).
51. Ronghua Yang, Lili A. Barouch Leptin Signaling and Obesity, Cardiovascular Consequences Circulation Research. 2007; 101: 545-559 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.156596
52. Ruth J F Loos, Recent progress in the genetics of common obesity, Br J Clin Pharmacol. 2009 December vol.68, no.6, 811–829.doi: 10.1111
53. Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, and Spritzer PM: Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. BMC Pediatr. 2012, 12:62.
54. Shan JL¹, Dai N, Yang XQ, Qian CY, Yang ZZ, Jin F, Li M, Wang D FokI polymorphism in vitamin D receptor gene and risk of breast cancer among Caucasian women. Tumor Biology April 2014, Volume 35, Issue 4, pp 3503-3508
55. ShanKuan Zhu, ZiMian Wang, Stanley Heshka, MoonSeong Heo, Myles S. Faith, Steven B. Heymsfield, Waist Circumference and obesity – associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey: Clinical action thresholds 1,2,3, The American journal of clinical nutrition, Am J Clin Nutr October 2002, vol. 76, no. 4, 743
56. Sriniva Nammi, Saisudha Koka, Krishna M Chinnala and Krishna M Boini, Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options, Nutrition Journal, vol.3 April 2004, 10.1186/1475-2891-3-3
57. Stephen O'Rahilly and I.Sadaf Farooqi* Genetics of obesity Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006 July 29; 361(1471): 1095–1105. Published online 2006 June 15. doi: 10.1098/rstb.2006.1850
58. Tzotzas T, Kapantais E, Tziomalos K, Ioannidis I, Mortoglou A, Bakatselos S, Kaklamanou M, Lanaras L, Kaklamanou D Prevalence of overweight and abdominal obesity in Greek

- children 6-12 years old: Results from the National Epidemiological Survey, Hippokratia. 2011 Jan-Mar; 15(1): 48-53.
59. Van S. Hubbard, Defining Overweight and Obesity : what are the issues?, The American Journal Of Clinical Nutrition, Am j Clin Nutr 2000, Volume 72, no. 5 , 1067-106
 60. Walley A. J., Asher J. E., Froguel P., 2009, The genetic contribution to non syndromic human obesity, Nat. Rev. Genet. 10 (7), 431-442.
 61. Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., et al., 2009, Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation, Nature Genetics, 41, 25-34.
 62. Wong, K.E., Szeto, F.L., Zhang, W., Ye, H., Kong, J., Zhang, Z., Sun, X.J. & Li, Y.C. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296, E820-828 (2009).
 63. Wong, K.E., Kong, J., Zhang, W., Szeto, F.L., Ye, H., Deb, D.K., Brady, M.J. & Li, Y.C. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. J. Biol. Chem. 30, 33804-33810 (2011).
 64. Xiaofang Liang, Hui Li, Huajin Li, Fei Xu, Fangtian Dong, and Ruifang Sui Novel ALMS1 mutations in Chinese patients with Alström syndrome Molecular Vision Research. 2013; 19: 1885-1891. Published online Sep 7, 2013.PMCID: PMC3774572
 65. Yiannis Vasilopoulos, Theologia Sarafidou, Kalliopi Kotsa, Maria Papadimitriou, Yiannis Goutzelas, Costas Stamatis, Vasilis Bagiatis, Xanthi Tsekmekidou, VDR TaqI is associated with Obesity in the Greek population. Elsevier Science 25 October 2012
 66. Yue Zhao, Nanchao Hong, Xiao Liu, Beibei Wu, Shanshan Tang, Jianjun Yang, Cheng Hu, and Weiping Jia A Novel Mutation in Leptin Gene Is Associated with Severe Obesity in Chinese Individuals BioMed Research International Volume 2014 (2014), Article ID 912052, 3 pages
 67. Zhu ZH, Jin XZ, Zhang W, Chen M, Ye DQ, Zhai Y, Dong FL, Shen CL, Ding C. Associations between vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: an updated meta- February 4, 2014

http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

<http://www.pharmgkb.org/gene/PA37301?tabType=tabVip>

H. Katsikis – D. Florakis-D. Panidis ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ, Αίτια, διαγνωστική προσέγγιση και θεραπευτική αντιμετώπιση εκδόσεις γάμμα Βαρθολομαίος Θεσσαλονίκη 2009 ISBN 978-960-98832-4-5

