

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Μεταπτυχιακή διατριβή τίτλου ειδίκευσης

**Μελέτη της επίδρασης της Αδιπονεκτίνης στη διέγερση των
μακροφάγων**

Πραγματοποιήθηκε στο
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΖΑΧΑΡΙΟΥΔΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, του τομέα Εργαστηριακής Ιατρικής, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέποντες:

Μαργιωρής Ανδρέας, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής

Τσατσάνης Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Χρήστο Τσατσάνη, Επίκουρο Καθηγητή Κλινικής Χημείας, για την υπόδειξη του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για το ενδιαφέρον του, τη συνεχή παρακολούθηση, την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση και την πολύτιμη καθοδήγησή του, χωρίς την οποία δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ανδρέα Μαργιωρή, Καθηγητή Κλινικής Χημείας, για την εμπιστοσύνη του, το ενδιαφέρον του, τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε. Τον κ. Αχιλλέα Γραβάνη, Καθηγητή Φαρμακολογίας, ευχαριστώ πολύ για τις εύστοχες παρατηρήσεις του στο σχεδιασμό των πειραμάτων.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Αριάδνη Ανδρουλιδάκη και στη Ρένα Δερμιτζάκη, που ήταν πάντα δίπλα μου να με βοηθήσουν πρόθυμα σε όποια δυσκολία προέκυπτε, για την αμέριστη συμπαράστασή τους, για την ευχάριστη και άριστη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ πολύ τους συνεργάτες και φίλους Βασίλη Μηνά και Ιάκωβο Λαζαρίδη για τη βοήθειά τους στο τεχνικό κομμάτι της εργασίας αυτής.

Τέλος, θερμά ευχαριστώ τους γονείς και τις αδερφές μου για την απόλυτη κατανόηση και υποστήριξή τους, καθώς επίσης τους φίλους και φίλες για τη συμπαράσταση και τις όμορφες στιγμές που μου χαρίζουν· θα ήθελα να ξεχωρίσω το Δημήτρη, την Ειρήνη, την Ελένη, τη Λήδα, το Θανάση, το Νίκο και την Έφη.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	7
Abstract.....	9
Συντμήσεις.....	11
1. Εισαγωγή	13
1.1. Αδικοκίνες-Αδιπονεκτίνη.....	14
1.1.1. Αδικοκίνες-ορισμός.....	14
1.1.2. Ταυτοποίηση και μοριακή δομή της αδιπονεκτίνης.....	15
1.1.3. Συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο ανθρώπινο πλάσμα.....	17
1.1.4. Ρύθμιση της έκφρασης της αδιπονεκτίνης.....	18
1.1.5. Αδιπονεκτίνη και κλινικές παρατηρήσεις-Μελέτες σε ανθρώπινους πληθυσμούς.....	19
1.1.6. Μηχανισμός δράσης της αδιπονεκτίνης-Βιολογικός ρόλος.....	20
1.1.6.1. Ρόλος της αδιπονεκτίνης στην ενίσχυση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη.....	20
1.1.6.2. Η αδιπονεκτίνη σαν αντι-φλεγμονώδης παράγοντας.....	21
1.1.6.3. Η αδιπονεκτίνη σαν προ-φλεγμονώδης παράγοντας.....	23
1.2. Υποδοχείς της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2.....	23
1.2.1. Ταυτοποίηση, μοριακή δομή και κατανομή των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2.....	23
1.2.2. Ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα.....	24
1.3. Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH (CRH, Urocortins) και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης και στην επαγόμενη από αδιπονεκτίνη και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.....	25
2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.1. Αντιδραστήρια.....	28
2.2. Κυτταρικές σειρές-Πρωτογενή κύτταρα-Καλλιέργειες.....	28
2.2.1. Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1.....	28
2.2.2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς THP-1.....	28
2.2.3. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων μονοκυττάρων/ μακροφάγων από περιφερικό αίμα.....	29

2.2.4. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών μακροφάγων από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού (thioglycollate-elicited macrophages)	29
2.3. Απομόνωση ολικού RNA	30
2.4. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)	31
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).....	32
2.6. Μέτρηση κυτοκινών	33
2.6.1. Μέτρηση κυτοκινών εκκρινόμενων από ανθρώπινα κύτταρα (THP-1, περιφερικά μακροφάγα).....	33
2.6.2. Μέτρηση κυτοκινών που εκκρίθηκαν από τα πρωτογενή μακροφάγα ποντικού	33
2.7. Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis).....	34
2.8. Ανοσοφθορισμός	34
3. Αποτελέσματα	36
3.1. Η gAd επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα	37
3.2. Η gAd επάγει ανοχή των μακροφάγων σε ακόλουθη διέγερση με gAd.....	38
3.3. Η gAd ελάττωσε την ευαισθησία των μακροφάγων σε άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα (αγωνιστές των TLR3 και TLR4).....	40
3.4. Η επίδραση της gAd στην ευαισθησία των μακροφάγων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της	42
3.5. Επίδραση της gAd στη ρύθμιση των υποδοχέων TLR3 και TLR4-Μελέτη μηχανισμών απευαισθητοποίησης των μακροφάγων έναντι σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα	44
3.5.1. Η gAd ελαττώνει την έκφραση του υποδοχέα TLR3 ενδοκυτταρικά, αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα TLR4 στην επιφάνεια των THP-1 μακροφάγων.....	44
3.5.2. Η παρατεταμένη έκθεση των THP-1 μακροφάγων σε gAd εμποδίζει την επαγόμενη από gAd και LPS ενεργοποίηση του NFκB	45
3.6. Ρύθμιση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2.....	46
3.6.1. Η gAd δεν επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων της AdipoR1	

και AdipoR2 στα THP-1 μακροφάγα	46
3.6.2. Επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH (CRH, UCN2) στην έκφραση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2 στην κυτταρική σειρά THP-1	47
3.7. Επίδραση του CRH στην επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση προ- φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα	48
4. Συζήτηση	50
5. Βιβλιογραφία	58
6. Παράρτημα	65

Περίληψη

Ο λευκός λιπώδης ιστός εκκρίνει ένα μεγάλο αριθμό βιολογικά ενεργών μορίων, τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στην αλληλεπίδραση του λιπώδους ιστού και του ανοσοποιητικού συστήματος, ρυθμίζοντας τη φλεγμονώδη απόκριση. Η αδιπονεκτίνη εκφράζεται αποκλειστικά και σε πολύ υψηλά επίπεδα στα λιποκύτταρα και η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι η υψηλότερη, σε σύγκριση με οποιαδήποτε άλλη, γνωστή μέχρι σήμερα, ορμόνη. Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης ελαττώνονται σε καταστάσεις, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II και η στεφανιαία νόσος. Η αδιπονεκτίνη θεωρείται ότι ασκεί προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας και του μεταβολικού συνδρόμου, λόγω της αντι-φλεγμονώδους και αντι-διαβητικής δράσης της.

Η αντι-φλεγμονώδης δράση της αδιπονεκτίνης συνίσταται κυρίως στην καταστολή της δραστηριότητας των μακροφάγων, τα οποία είναι η κύρια πηγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Στην παρούσα μελέτη αναφέρουμε ότι η αδιπονεκτίνη επάγει ισχυρά την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα και πρωτογενή μακροφάγα ανθρώπου και ποντικού. Για να εξηγηθεί το πώς μια ορμόνη που φαίνεται να έχει ισχυρή προ-φλεγμονώδη δράση, καταλήγει να έχει προστατευτική δράση έναντι στη φλεγμονή, προτείνουμε ότι η παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε υψηλές δόσεις αδιπονεκτίνης είναι πιθανό να απευαισθητοποιεί τα μακροφάγα και να επάγει την ανοχή τους στην ίδια την ορμόνη και σε άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. Μάλιστα, προτείνεται ότι η επίδραση της αδιπονεκτίνης στην ευαισθησία των μακροφάγων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Πράγματι, η παρατεταμένη έκθεση μακροφάγων σε υψηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης (που αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση αδιπονεκτίνης στο πλάσμα ατόμων με φυσιολογικό BMI) είχε σαν αποτέλεσμα την απευαισθητοποίηση των κυττάρων σε επακόλουθη διέγερση με την ορμόνη και με άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. Αντίθετα, η έκθεση μακροφάγων σε χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης (που αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση της ορμόνης στο πλάσμα παχύσαρκων ατόμων) δεν απευαισθητοποιεί τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα η ακόλουθη έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης να προκαλεί την έκκριση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, αποκαλύπτοντας τη δυναμική της σε προ-φλεγμονώδη παράγοντα.

Επίσης, η αδιπονεκτίνη επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, ενώ η παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε αδιπονεκτίνη καταστέλλει την επαγόμενη από την ίδια και τον LPS ενεργοποίηση του NFκB. Προτείνουμε, λοιπόν, ότι η διατήρηση υψηλών επιπέδων αδιπονεκτίνης στο πλάσμα επάγει την ανοχή τους στη δράση της και στη δράση άλλων προ-φλεγμονωδών ερεθισμάτων, με αποτέλεσμα να δρα προστατευτικά.

Άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης είναι τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH. Τα νευροπεπτίδια αυτά απελευθερώνεται σε περιοχές φλεγμονής από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων, από επιθηλιακά κύτταρα και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ενεργοποιούν τα μακροφάγα, ασκώντας προ-φλεγμονώδη δράση. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στη ρύθμιση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 και στην επαγόμενη από αδιπονεκτίνη και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, από τα μακροφάγα. Βρέθηκε ότι τα νευροπεπτίδια CRH και UCN2 μειώνουν σημαντικά την έκφραση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 σε THP-1 μονοκύτταρα, ενώ φαίνεται να μην επηρεάζουν την επαγόμενη από αδιπονεκτίνη και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα.

Abstract

Adipose tissue acts as an endocrine organ producing a number of molecules with an important role in the regulation of metabolism and inflammation. Adiponectin is the most abundant gene product in adipose tissue and circulates at high concentrations in the blood. Adiponectin levels are decreased in obesity, in T1DM and in patients with CAD. It is believed that adiponectin has protective actions in the initiation and progression of atherosclerosis and the metabolic syndrome through anti-inflammatory and anti-diabetic effects.

The anti-inflammatory effects of adiponectin are believed to be exerted via macrophages, through suppression of the production of pro-inflammatory cytokines in response to LPS. In this report, we provide experimental evidence that globular adiponectin (gAd) is a powerful inducer of TNF α and IL6 secretion in the THP-1 macrophage cell line, in primary human peripheral macrophages and in primary mouse peritoneal macrophages. To explain how the apparent pro-inflammatory action of gAd ends up in an anti-inflammatory effect, we suggested that the anti-inflammatory effect of adiponectin is due to an induction of macrophage tolerance to pro-inflammatory stimuli, including its own. We also suggest that this effect of gAd on macrophage sensitivity to pro-inflammatory stimuli is dose-dependent. Indeed, pre-exposure of macrophages to high concentrations of gAd (that correspond to lean subjects) rendered them tolerant to further gAd exposure or to other pro-inflammatory stimuli, such as TLR3 ligand polyI:C and TLR4 ligand LPS. Pre-exposure to low concentrations of gAd (that correspond to obese subjects) and re-exposure to high levels of gAd unmasked its pro-inflammatory properties. Also, gAd induced NF κ B activation and tolerance to further gAd or LPS exposure. Our data suggest that constant presence of adiponectin in the circulation in high levels renders macrophages resistant to its own action and to other pro-inflammatory stimuli.

CRH and Urocortins are other major regulators of the inflammatory process. When released at the site of inflammation from nerve terminals, epithelial and immune cells, these peptides affect directly the immune system at the level of macrophage activation, exerting pro-inflammatory effects. In this report we examine the effect of CRH and UCN2 on the regulation of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 and on the adiponectin and LPS-induced production of pro-inflammatory

cytokines in macrophages. Expression levels of AdipoR1 and AdipoR2 were significantly downregulated by CRH and UCN2, in THP-1 monocytes, while pre-incubation of THP-1 macrophages with CRH and UCN2 did not affect the adiponectin and LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines.

Συντμήσεις

- AMPK:** AMP-activated Protein Kinase (ενεργοποιούμενη από AMP πρωτεϊνική κινάση)
- BMI:** Body Mass Index (δείκτης μάζας σώματος)
- BSA:** Bovine Serum Albumin (αλβουμίνη ορού βοός)
- CAD:** Coronary Artery Disease (στεφανιαία νόσος)
- cAMP:** cyclic AMP (κυκλικό AMP)
- CAMs:** Cell Adhesion Molecules (μόρια κυτταρικής προσκόλλησης)
- CRH:** Corticotropine Releasing Hormone (εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης)
- CRP:** C-Reactive Protein (πρωτεΐνη οξείας φάσης-C)
- FBS:** Foetal Bovine Serum (ορός εμβρύου βοός)
- gAd:** globular Adiponectin (καρβοξυτελική, σφαιρική περιοχή της αδιπονεκτίνης)
- HDL:** High-Density Lipoprotein (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας)
- HMW:** High Molecular Weight (υψηλού μοριακού βάρους)
- ICAM-1:** Intracellular Cell Adhesion Molecule-1
- IFN γ :** Interferon γ (ιντερφερόνη γ)
- IL-1RA:** IL1 Receptor Antagonist (ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1)
- IL1 β , IL6, IL8, IL10:** Interleukin 1 β , Interleukin 6, Interleukin 8, Interleukin 10 (ιντερλευκίνη 1 β , ιντερλευκίνη 6, ιντερλευκίνη 8, ιντερλευκίνη 10)
- IRS-1:** Insulin Receptor Substrate-1 (υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-1)
- LDL:** Low-Density Lipoprotein (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας)
- LMW:** Low Molecular Weight (χαμηλού μοριακού βάρους)
- LPS:** Lipopolysaccharide (λιποπολυσακχαρίτης)
- MMW:** Medium Molecular Weight (μεσαίου μοριακού βάρους)
- NF κ B:** Nuclear Factor-kappa B (μεταγραφικός παράγοντας-kB)
- NO:** Nitric Oxide (μονοξείδιο του αζώτου)
- PAI-1:** Plasminogen Activator Inhibitor-1 (αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1)
- PBS:** Phosphate Buffered Saline
- PGE2:** Prostaglandin E2 (προσταγλανδίνη E2)
- PKA:** Protein Kinase A (πρωτεϊνική κινάση A)

PKC: Protein Kinase C (πρωτεϊνική κινάση C)
PMA: Phorbol Myristate Acetate
Poly (I:C): polyinosine-polycytidylic acid
PPARs: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
P/S: Penicilline/Streptomycin (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη)
RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
rpm: rounds per minute (στροφές ανά λεπτό)
RT: Room Temperature (θερμοκρασία δωματίου)
TIIDM: Type II Diabetes Mellitus (σακχαρώδης διαβήτης τύπου II)
TGFβ: Transforming Growth Factor β (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β)
TLR3, TLR4: Toll-like Receptor 3, Toll-like Receptor 4
TNFα: Tumor Necrosis Factor α (παράγοντας νέκρωσης των όγκων α)
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
UCN2: Urocortin 2 (ουροκορτίνη 2)
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion molecule-1
WAT: White Adipose Tissue (λευκός λιπώδης ιστός)
WFI: water for injection (νερό για ενέσιμο διάλυμα)

1. Εισαγωγή

1.1. Αδιποκίνες-Αδιπονεκτίνη

1.1.1. Αδιποκίνες-ορισμός

Ο λευκός λιπώδης ιστός (white adipose tissue-WAT) αποτελεί τον κύριο ιστό αποθήκευσης ενέργειας στα θηλαστικά και στα πτηνά. Μέχρι και την τελευταία δεκαετία, θεωρούνταν ότι ο μοναδικός ρόλος του λευκού λιπώδους ιστού ήταν η αποθήκευση ενέργειας με τη μορφή τριγλυκεριδίων και η απελευθέρωσή της με τη μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης και θερμότητας, ως απόκριση στην αλλαγή των ενεργειακών απαιτήσεων του οργανισμού. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες πληροφορίες δημοσιεύονται για το ρόλο του λευκού λιπώδους ιστού σαν ενδοκρινές όργανο, το οποίο παίζει σπουδαίο ρόλο σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών λειτουργιών και κυρίως στον έλεγχο και στη ρύθμιση του μεταβολισμού (1-3).

Ο λευκός λιπώδης ιστός εκκρίνει ένα μεγάλο αριθμό ενεργών βιολογικά μορίων, τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία άλλων ιστών και ονομάζονται **αδιποκίνες** (3, 4). Αρχικά, για το χαρακτηρισμό των εκκρινόμενων προϊόντων του λιπώδους ιστού είχε προταθεί ο όρος «αδιποκυτοκίνες» (5), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ευρέως. Παρόλα αυτά, ο όρος «αδιποκυτοκίνες» είναι δυνατό να σταθεί παραπλανητικός, γιατί μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού είναι κυτοκίνες ή ότι μοιάζουν με κυτοκίνες. Ενώ το γεγονός αυτό είναι αλήθεια για πολλά εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού, όπως ο TNFα και η IL6, αυτό δεν ισχύει για την πλειοψηφία των μορίων. Προτείνεται, λοιπόν, ο όρος **αδιποκίνες**, για την περιγραφή των πρωτεϊνών, οι οποίες συνθέτονται και εκκρίνονται από τα **λιποκύτταρα** και ο οποίος υπονοεί ότι τα μόρια αυτά ανήκουν σε μια διακριτή λειτουργική ομάδα (3, 4).

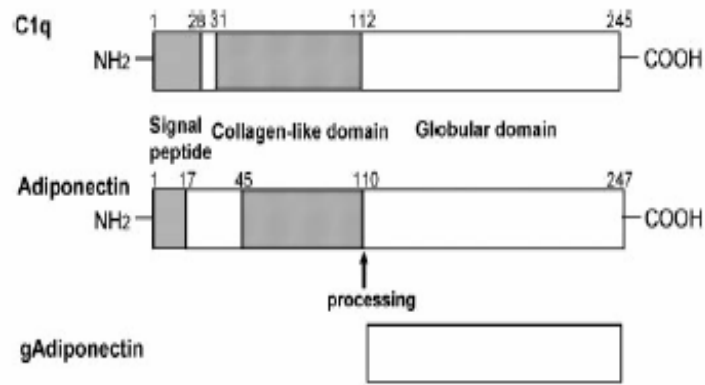
Ο αριθμός των, μέχρι σήμερα, χαρακτηρισμένων και υποψήφιων αδιποκινών ξεπερνάει τις πενήντα και ανάλογα με τη λειτουργία τους κατατάσσονται σε διαφορετικές ομάδες, όπως: κυτοκίνες (π.χ. TNFα, IL6, IL8), αυξητικοί παράγοντες (π.χ. TGFβ), πρωτεΐνες του συμπληρώματος (π.χ. αδιψίνη, παράγοντας C3), πρωτεΐνες οξειδίας φάσης (π.χ. PAI-1, πιθανόν η CRP) και ορμόνες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του λιπώδους ιστού και του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η λεπτίνη, η βισφατίνη, η ρεζιστίνη και η αδιπονεκτίνη (3, 6).

1.1.2. Ταυτοποίηση και μοριακή δομή της αδιπονεκτίνης

Η αδιπονεκτίνη ταυτοποιήθηκε ανεξάρτητα από τέσσερις ερευνητικές ομάδες, με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών και προσεγγίσεων. Το cDNA της ανθρώπινης αδιπονεκτίνης, απομονώθηκε με τυχαία αλληλούχιση μεγάλης κλίμακας μιας βιβλιοθήκης cDNA ανθρώπινου λιπώδους ιστού και ονομάστηκε *apM1* (AdiPose Most Abundant gene transcript 1) (7). Επίσης, κλωνοποιήθηκε το cDNA της αδιπονεκτίνης ποντικού και βρέθηκε ότι η αντίστοιχη πρωτεΐνη, η οποία ονομάστηκε *Acpr30* (Adipocyte complement-related protein of 30 kDa), επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα (8). Παρόμοια, η ίδια πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε σε ποντικούς και αρουραίους και ονομάστηκε *AdipoQ* (9). Τέλος, η ανθρώπινη αδιπονεκτίνη απομονώθηκε από το πλάσμα και ονομάστηκε *GBP28* (gelatin binding protein of 28 kDa) (10).

Το γονίδιο της ανθρώπινης αδιπονεκτίνης ονομάζεται *apM1*, καταλαμβάνει 17 kb στο χρωμόσωμα 3, στην περιοχή 3q27 και αποτελείται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια (11). Η αδιπονεκτίνη αποτελείται από 247 αμινοξέα, έχει μέγεθος 30 kDa και εκφράζεται αποκλειστικά και σε πολύ υψηλά επίπεδα στα λιποκύτταρα (7). Ανήκει στην υπερικογένεια των κολλαγόνων, καθώς παρουσιάζει ομολογία στην πρωτοταγή δομή της με τις πρωτεΐνες κολλαγόνο τύπου VIII και X και με τον παράγοντα του συμπληρώματος C1q (12), ενώ η τριτοταγής δομή της μοιάζει με αυτή του TNF α (9).

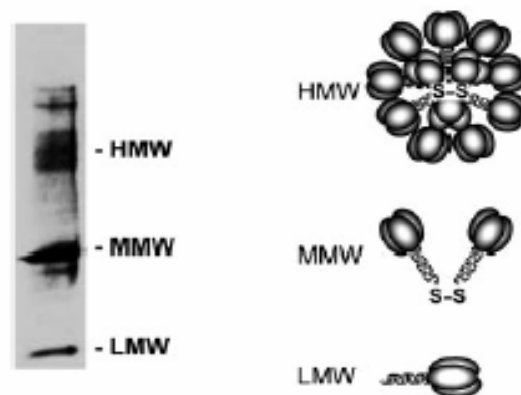
Η αδιπονεκτίνη έχει τέσσερις λειτουργικές περιοχές (Σχ. 1): μια αμινοτελική αλληλουχία σήματος, μια υπερμεταβλητή περιοχή, η οποία δεν παρουσιάζει ομολογία μεταξύ διαφορετικών ειδών, μια περιοχή παρόμοια με το κολλαγόνο (collagen-like domain) και μια καρβοξυτελική, σφαιρική περιοχή, παρόμοια με τον παράγοντα του συμπληρώματος C1q (C1q-like domain) (9). Στο πλάσμα η πρωτεΐνη υπάρχει σαν ολόκληρο μόριο, με τις τέσσερις λειτουργικές περιοχές ή σαν ένα μικρότερο θραύσμα, το οποίο αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική, σφαιρική περιοχή του μορίου (*gAd*) (13) (Σχ. 1).



Σχήμα 1. Δομή και λειτουργικές περιοχές της αδιπονεκτίνης (από Kadowaki et al. 2005).

Για το λόγο αυτό, έχει προταθεί ότι η αδιπονεκτίνη είναι πιθανό να κόβεται πρωτεολυτικά μετά την έκκρισή της. Πρόσφατα, μάλιστα, δημοσιεύτηκε ότι το ένζυμο ελαστάση, το οποίο εκκρίνεται από λευκά αιμοσφαίρια (κυρίως μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα), είναι υπεύθυνο για την πρωτεολυτική διάσπαση της αδιπονεκτίνης και τη δημιουργία του σφαιρικού θραύσματος του μορίου (gAd) (14). Επίσης, υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες αναφορές που δείχνουν ότι η βιολογική δράση της αδιπονεκτίνης οφείλεται, σε πολλές περιπτώσεις, στο σφαιρικό της θραύσμα (gAd) (14-18).

Επίσης, η αδιπονεκτίνη, που βρίσκεται στην κυκλοφορία, είναι δυνατό να σχηματίζει ομο-πολυμερή (19) με τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι μεσολαβούνται από το αμινοξύ κυστεΐνη στη θέση 39 (Cys-39) (20). Βρέθηκε ότι στο ανθρώπινο πλάσμα, η αδιπονεκτίνη υπάρχει σε χαμηλού μοριακού βάρους μονομερές (LMW), σε μεσαίου μοριακού βάρους διμερές (MMW) και σαν υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές (HMW) (19) (Σχ. 2).

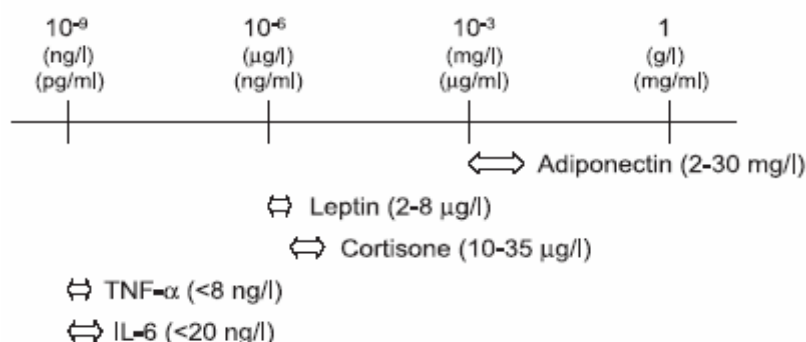


Σχήμα 2. Ομο-πολυμερή αδιπονεκτίνης στο ανθρώπινο πλάσμα. Έγινε ηλεκτροφόρηση πλάσματος σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και οι διαφορετικές πολυμερικές μορφές του μορίου ανιχνεύθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι στην αδιπονεκτίνη. S-S, δισουλφιδικός δεσμός (2, 19).

Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη στο πλάσμα ανθρώπου και ποντικού και η αδιπονεκτίνη που εκφράζεται σε NIH-3T3 λιποκύτταρα και σε *E.Coli*, σχηματίζει ένα μεγάλο εύρος ομο-πολυμερών, όπως τριμερή, εξαμερή και άλλα ΗΜW πολυμερή, όπως 12μερή και 18μερή (21, 22). Μάλιστα, τα ομο-πολυμερή αυτά φαίνεται να έχουν διακριτή βιολογική δράση, καθώς σύμφωνα με τους Tsao et al. (2002, 2003), μόνο τα εξαμερή και τα ΗΜW πολυμερή αδιπονεκτίνης ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα NFκB, στα C2C12 μυοκύτταρα, ενώ τα τριμερή αδιπονεκτίνης επάγουν την ενεργοποίηση της κινάσης AMPK, προτείνοντας ότι ο σχηματισμός των ομο-πολυμερών πιθανό να είναι απαραίτητος για κάποιες από τις βιολογικές δράσεις της αδιπονεκτίνης (21, 22).

1.1.3. Συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο ανθρώπινο πλάσμα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη, η οποία συνθέτεται και εκκρίνεται αποκλειστικά από τα λιποκύτταρα. Τα επίπεδά της στο πλάσμα ανθρώπων με φυσιολογικό BMI είναι τα υψηλότερα, σε σύγκριση με οποιαδήποτε άλλη ορμόνη (7-10, 23, 24). Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα κυμαίνεται από 2 έως 30 $\mu\text{g/ml}$, η οποία είναι 10^3 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση άλλων εξαιρετικά σημαντικών ορμονών, όπως η κορτιζόλη και η λεπτίνη, και 10^6 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση των περισσότερων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF α και η IL6 (Σχ. 3) (23). Η εκκρινόμενη αδιπονεκτίνη αντιστοιχεί στο 0,01% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος (23).



Σχήμα 3. Τάξη μεγέθους της συγκέντρωσης αδιπονεκτίνης στο ανθρώπινο πλάσμα (από Shimada et al. (24)).

Η αδιπονεκτίνη παρουσιάζει κερκάρδιο ρυθμό έκκρισης, με σημαντική ελάττωση της έκκρισης το βράδυ, η οποία φτάνει στο ελάχιστο τις πρώτες πρωινές ώρες (25). Οι διακυμάνσεις αυτές στη συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης κατά τη διάρκεια του 24ωρου είναι πανομοιότυπες με αυτές της κορτιζόλης και της πρωτεΐνης που δεσμεύει τη λεπτίνη, προτείνοντας ότι είναι πιθανό οι τελευταίες να επηρεάζουν την έκκριση της αδιπονεκτίνης (25).

1.1.4. Ρύθμιση της έκφρασης της αδιπονεκτίνης

Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι επάγουν τη σύνθεση και έκκριση της αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες αναφορές που αφορούν στη ρύθμιση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης από ορμονικούς παράγοντες, σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα.

Σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης φαίνεται να είναι η ινσουλίνη, η οποία είναι πιθανό να επηρεάζει την έκφραση της αδιπονεκτίνης με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη διάρκεια δράσης της. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι μικρής διάρκειας έκθεση 3T3-L1 λιποκυττάρων σε ινσουλίνη είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της αδιπονεκτίνης (8), ενώ μεγαλύτερης διάρκειας έκθεση είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της (26). Επίσης, στη ρύθμιση της σύνθεσης της αδιπονεκτίνης εμπλέκονται οι PPARs, οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών και ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο την έκφραση του γονιδίου, σε διαφορετικά μοντέλα (27-30). Ένας παράγοντας που ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης είναι ο TNFα. Η έκκριση του TNFα από τα λιποκύτταρα επάγεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε καταστάσεις παχυσαρκίας και έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την έκφραση της αδιπονεκτίνης (29), ενώ παράλληλα συμβάλλει στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη (31). Επίσης, οι αγωνιστές των β-αδρενεργικών υποδοχέων ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης (26).

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι πολλές από τις ορμονικές επιδράσεις στη ρύθμιση της έκφρασης της αδιπονεκτίνης, που περιγράφηκαν παραπάνω, μελετήθηκαν σε *in vitro* συστήματα και είναι πιθανό να μην ανταποκρίνονται ακριβώς στην πραγματική *in vivo* κατάσταση.

1.1.5. Αδιπονεκτίνη και κλινικές παρατηρήσεις-Μελέτες σε ανθρώπινους πληθυσμούς

Ένας αριθμός κλινικών μελετών έχει δείξει ότι η έκφραση και η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο πλάσμα ελαττώνονται σημαντικά σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, σε αντίθεση με όλα τα γνωστά μέχρι σήμερα εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού, των οποίων η έκφραση και η συγκέντρωση στο πλάσμα αυξάνονται σημαντικά (23, 32, 33). Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση αδιπονεκτίνης στο πλάσμα σχετίζεται αρνητικά με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) σε Ιάπωνες άνδρες και γυναίκες (23). Μάλιστα, η μέση συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο πλάσμα των παχύσαρκων ατόμων ήταν $3,7 \pm 3.2$ $\mu\text{g/ml}$, ενώ σε μη παχύσαρκα άτομα ήταν 8.9 ± 5.4 $\mu\text{g/ml}$ (23). Αρνητική συσχέτιση του BMI και των επιπέδων αδιπονεκτίνης στο πλάσμα έδειξαν, επίσης, μελέτες σε καυκάσιους πληθυσμούς και σε πληθυσμούς Ινδιάνων Pima (33).

Αντίθετα με τα ελαττωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης σε παχύσαρκα άτομα, βρέθηκε ότι η απώλεια βάρους ενισχύει την έκκριση αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα (32, 34). Μάλιστα, μια μελέτη που έγινε σε λιπόσαρκους ασθενείς που πάσχουν από νευρική ανορεξία έδειξε ότι τα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερα, σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (35).

Σε μια άλλη κλινική μελέτη, έγινε σύγκριση των επιπέδων αδιπονεκτίνης σε τρεις διαφορετικές ομάδες ατόμων: σε υγιή άτομα, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (T2DM) και σε ασθενείς με T2DM και με στεφανιαία νόσο (CAD) (34). Οι συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στους ασθενείς με T2DM, συγκριτικά με την ομάδα των υγιών ατόμων, ενώ η ελάττωση των επιπέδων αδιπονεκτίνης ήταν ακόμα μεγαλύτερη στους ασθενείς με T2DM και CAD. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα αδιπονεκτίνης σχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα ινσουλίνης, γλυκόζης και τριγλυκεριδίων του πλάσματος, ενώ σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι μελέτες των Yamamoto et al. (36) και Matsubara et al. (37), οι οποίοι έδειξαν ότι η συγκέντρωση αδιπονεκτίνης στο πλάσμα σχετίζεται αρνητικά, εκτός από τα παραπάνω, με τα επίπεδα ολικής και LDL-χοληστερόλης, καθώς επίσης, με την πίεση του αίματος και τον αθηρωματικό δείκτη (atherogenic index). Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης σχετίζονται με αρκετούς καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες κινδύνου για το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας,

ενώ φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ χαμηλών συγκεντρώσεων αδιπονεκτίνης και ανάπτυξης του μεταβολικού συνδρόμου, στο οποίο περιλαμβάνονται η αντίσταση στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία, η υπερτριγλυκεριδαμία, η υπέρταση, η αθηρωμάτωση και τα χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης (33, 34, 38, 39). Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν μελέτες σε πειραματικά μοντέλα παχυσαρκίας και T1DM (9, 13).

Τέλος, πρόσφατες μελέτες είχαν σαν αποτέλεσμα τη χαρτογράφηση μιας περιοχής, η οποία φαίνεται να δίνει προδιάθεση για T1DM, στο χρωμόσωμα 3q27, όπου χαρτογραφείται και το γονίδιο της αδιπονεκτίνης (11, 40). Η παρουσία πολυμορφισμών στον υποκινητή και στο εξόνιο 3 του γονιδίου της αδιπονεκτίνης αναφέρθηκαν να έχουν σχέση με την ανάπτυξη T1DM (41, 42), ενώ μεταλλάξεις στη σφαιρική περιοχή της αδιπονεκτίνης σχετίζονται, επίσης, με χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα και T1DM (43).

1.1.6. Μηχανισμός δράσης της αδιπονεκτίνης-Βιολογικός ρόλος

Αρκετές δημοσιευμένες μελέτες αναφέρουν ότι η αδιπονεκτίνη δρα ενισχύοντας τη δράση της ινσουλίνης στους ιστούς, σε πειραματικά μοντέλα T1DM (13, 27, 44), ενώ πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη με αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες, η οποία δρα προστατευτικά έναντι της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας (5, 18, 45-51).

1.1.6.1. Ρόλος της αδιπονεκτίνης στην ενίσχυση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη

Η επίδραση της αδιπονεκτίνης στον περιορισμό της αντίστασης στην ινσουλίνη, σχετίζεται με την ικανότητά της να ελαττώνει τα επίπεδα των λιπαρών οξέων του πλάσματος και των αποθηκευμένων στους μύες και στο ήπαρ τριγλυκεριδίων (13, 27). Αυτό επιτυγχάνεται με την επαγωγή της έκφρασης μορίων που συμμετέχουν στη μεταφορά και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, όπως η πρωτεΐνη CD36 και η οξειδάση του ακετύλο-συνενζύμου A, αντίστοιχα (27). Ένας τρόπος με τον οποίο η αδιπονεκτίνη ενισχύει την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη, με το να ελαττώνει τα επίπεδα των λιπαρών οξέων και των τριγλυκεριδίων, είναι η ενεργοποίηση της κινάσης AMPK, στους μύες και στο ήπαρ

(52). Η κινάση AMPK επάγει τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και την πρόσληψη της γλυκόζης, καθώς επίσης καταστέλλει την έκφραση μορίων, τα οποία παίρνουν μέρος στη γλυκονεογένεση (52). Τέλος, η αδιπονεκτίνη ενισχύει την επαγόμενη από ινσουλίνη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της και του IRS-1 (27), προάγοντας τη δράση της ινσουλίνης.

1.1.6.2. Η αδιπονεκτίνη σαν αντι-φλεγμονώδης παράγοντας

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν στην αντι-φλεγμονώδη δράση της αδιπονεκτίνης υποστηρίζουν ότι η αδιπονεκτίνη δρα προστατευτικά, κυρίως, μέσω της καταστολής της δραστηριότητας των μακροφάγων, τα οποία είναι η κύρια πηγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (5, 18, 45-51). Η έκκριση των κυτοκινών αυτών δίνει το σήμα για την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης και κατ' επέκταση της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η παχυσαρκία (53). Είναι γνωστό ότι στα πρώτα στάδια της αθηρωμάτωσης τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και χυμοκίνες, που έχουν σαν αποτέλεσμα την επιστράτευση λευκοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και την επαγωγή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης (CAMs) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα μακροφάγα προσκολλούνται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο, όπου προσλαμβάνουν οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα.

Έχει δημοσιευτεί, λοιπόν, ότι η αδιπονεκτίνη καταστέλλει την έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1, E-σελεκτίνη) και την προσκόλληση THP-1 μακροφάγων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της (46). Επίσης, η αδιπονεκτίνη ελαττώνει την περιεκτικότητα των μακροφάγων σε εστέρες χοληστερόλης, κατά 50%, και τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα με το να καταστέλλει την έκφραση των υποδοχέων της οξειδωμένης χοληστερόλης (scavenger receptors class A type I) και πάλι, θετικά σε σχέση με τη συγκέντρωσή της (54). Μια άλλη μελέτη δείχνει ότι η αδιπονεκτίνη, σε υψηλή συγκέντρωση, ρυθμίζει αρνητικά την αύξηση και διαφοροποίηση των πρόδρομων μονοκυττάρων και τις λειτουργίες των μακροφάγων (49). Επίσης, η έκθεση πρωτογενών ανθρώπινων μονοκυττάρων, πρωτογενών μακροφάγων χοίρου και δενδριτικών κυττάρων σε αδιπονεκτίνη είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκκρισης των αντι-φλεγμονωδών παραγόντων IL10 και IL-1RA (51,

55, 56). Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη επάγει την έκφραση του PPAR γ 2, στα μακροφάγα, ο οποίος είναι γνωστό ότι ανταγωνίζεται τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF κ B (57). Ακόλουθα, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η προ-επώαση των μακροφάγων, με υψηλές δόσεις αδιπονεκτίνης, καταστέλλει την επαγόμενη από LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (TNF α και IL6) από αυτά (49, 55). Επίσης, η αδιπονεκτίνη καταστέλλει την έκκριση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IFN γ από ανθρώπινα μακροφάγα (56). Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η προ-επώαση πρωτογενών μακροφάγων με αδιπονεκτίνη καταστέλλει την επαγόμενη από LPS ενεργοποίηση του NF κ B (55).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφος 1.1.2.) η αδιπονεκτίνη κόβεται πρωτεολυτικά από το ένζυμο ελαστάση, το οποίο εκκρίνεται από THP-1 μονοκύτταρα/μακροφάγα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του σφαιρικού θραύσματος του μορίου (gAd) (14). Πολλά από τα πειράματα που αφορούν στις δράσεις που έχει η αδιπονεκτίνη στα μακροφάγα έγιναν στην κυτταρική σειρά THP-1 (46, 49), επομένως, είναι πιθανό οι παραπάνω επιδράσεις της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα να μεσολαβούνται από τη gAd.

Εκτός από τις παραπάνω μελέτες που αφορούν στην αντι-φλεγμονώδη δράση της αδιπονεκτίνης, μέσω καταστολής των δραστηριοτήτων των μακροφάγων, υπάρχουν αναφορές για την προστατευτική δράση της ορμόνης σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα, η προ-επώαση με αδιπονεκτίνη δρα προστατευτικά στην επαγόμενη από LPS νέκρωση των ηπατοκυττάρων, μέσω καταστολής της έκκρισης του TNF α (48). Επίσης, η αδιπονεκτίνη καταστέλλει την επαγόμενη από LPS ενεργοποίηση του NF κ B σε λιποκύτταρα και σε ενδοθηλιακά κύτταρα (45, 57). Στο σημείο αυτό χρειάζεται να αναφερθεί ότι τα λιποκύτταρα και τα μακροφάγα προέρχονται από τα ίδια πρόδρομα κύτταρα και έχουν κάποιες κοινές λειτουργίες, όπως η απόκριση στο λιποπολυσακχαρίτη, μέσω του υποδοχέα TLR4, και η έκκριση κυτοκινών (38, 53).

Σύμφωνα με όλες τις παραπάνω μελέτες έχει προταθεί ο ρόλος της αδιπονεκτίνης σε σημαντικός αντι-διαβητικός και αντι-φλεγμονώδης παράγοντας, του οποίου η καταστολή και τα χαμηλά επίπεδα στην κυκλοφορία έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη ρύθμιση της φλεγμονής και οδηγούν στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και στην εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου. Μάλιστα, η αδιπονεκτίνη και οι υποδοχείς της (παράγραφος 1.2.) έχουν προταθεί σε θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση του T1DM και της αθηρωμάτωσης (2, 12).

1.1.6.3. Η αδιπονεκτίνη σαν προ-φλεγμονώδης παράγοντας

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι η gAd επάγει ισχυρά την έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών TNFα και IL6 από τα μακροφάγα (58). Στο ίδιο συμπέρασμα συνηγορούν αναφορές που δείχνουν ότι η gAd αυξάνει την παραγωγή των κυτοκινών IL1β, IL6, TNFα και της προσταγλανδίνης PGE2 από κύτταρα του πλακούντα και του μητρικού λιπώδους ιστού (59), ενώ η gAd επάγει την παραγωγή NO από ενδοθηλιακά κύτταρα (16), γεγονός που πιθανό να στηρίζει το ρόλο της gAd σα προ-φλεγμονώδη παράγοντα.

Αρχικός σκοπός, λοιπόν, της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της gAd σε μακροφάγα και να εξηγηθεί το παράδοξο του πώς μια ορμόνη που φαίνεται να έχει ισχυρή προ-φλεγμονώδη δράση, καταλήγει να έχει προστατευτική δράση έναντι στη φλεγμονή και να θεωρείται σημαντικός αντι-φλεγμονώδης παράγοντας. Προτείνεται, λοιπόν, ότι η παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε υψηλές δόσεις gAd είναι πιθανό να απευαισθητοποιεί τα μακροφάγα και να επάγει την ανοχή τους στην ίδια την ορμόνη και σε άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα.

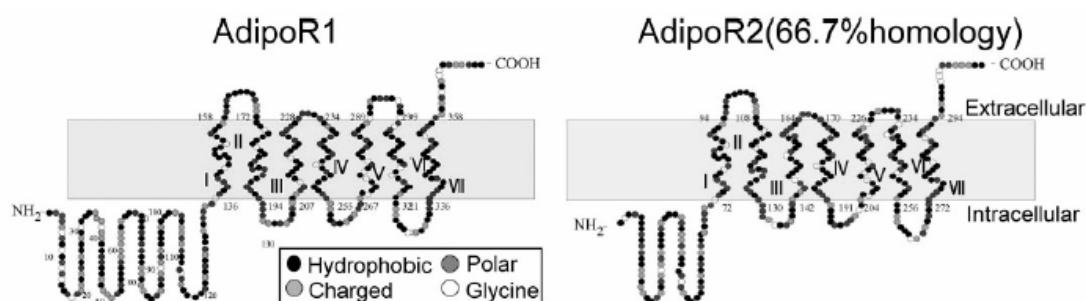
1.2. Υποδοχείς της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2

1.2.1. Ταυτοποίηση, μοριακή δομή και κατανομή των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2

Οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης κλωνοποιήθηκαν το 2003 από τους Yamauchi et al. (60). Αρχικά, απομονώθηκε το cDNA του ενός υποδοχέα από μια βιβλιοθήκη ανθρώπινου σκελετικού μυ και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ονομάστηκε AdipoR1. Στη συνέχεια έγινε έρευνα για την ανεύρεση ομόλογου γονιδίου σε γονιδιακές βάσεις δεδομένων ανθρώπου και ποντικού και ανακαλύφθηκε ένα γονίδιο, το οποίο ήταν σημαντικά ομόλογο (67% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων) και ονομάστηκε AdipoR2 (60).

Τα γονίδια για τους υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 χαρτογραφούνται στα χρωμοσώματα 1p36.13-q41 και 12p13.31, και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν αποτελούνται από 375 και 311 αμινοξέα, αντίστοιχα (60). Φαίνεται ότι οι AdipoR1 και AdipoR2 είναι μεμβρανικοί υποδοχείς, με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, όπως οι

υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες, με τη διαφορά ότι το αμινοτελικό άκρο των AdipoR1 και AdipoR2 είναι ενδοκυτταρικό, ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο είναι εξωκυτταρικό (Σχ. 4) (60).



Σχήμα 4. Προτεινόμενη δομή των υποδοχών αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2 (από Kadowaki et al. 2005).

Σύμφωνα με τους Yamauchi et al. (60), ο AdipoR1 είναι ο υποδοχέας για το σφαιρικό θραύσμα της αδιπονεκτίνης (gAd), ενώ ο AdipoR2 είναι ο υποδοχέας για το πλήρες μόριο της ορμόνης.

Ο AdipoR1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, με μεγαλύτερη αφθονία στο σκελετικό μυ, ενώ ο AdipoR2 βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο ήπαρ (2). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης εκφράζονται στα κύτταρα των β-νησιδίων του παγκρέατος και ότι τα λιπαρά οξέα ρυθμίζουν την έκφρασή τους στα κύτταρα αυτά (61). Επίσης, οι υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται σε αθηρωματικές πλάκες και σε μονοκύτταρα/μακροφάγα (62). Μάλιστα, ο υποδοχέας AdipoR1 βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στα μονοκύτταρα, συγκριτικά με τον AdipoR2, ενώ κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα τα επίπεδα του AdipoR1 ελαττώνονται, ενώ η έκφραση του AdipoR2 παραμένει σταθερή (62).

1.2.2. Ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχών AdipoR1 και AdipoR2 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα

Έχει αναφερθεί ότι οι αγωνιστές των υποδοχών PPAR α και PPAR γ επάγουν την έκφραση του AdipoR2 υποδοχέα σε πρωτογενή και THP-1 μακροφάγα (62). Επίσης, η επώαση με τον αγωνιστή T0901317 του πυρηνικού υποδοχέα LXR, ο οποίος επάγεται από τους PPARs, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης και των δύο υποδοχών αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα (62). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι

η ταυτόχρονη επώαση με τον αγωνιστή GW647 του PPAR α υποδοχέα και αδιπονεκτίνη έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχομένου των μακροφάγων σε εστέρες χοληστερόλης, υπονοώντας ότι η αντι-αθηρωματική δράση των PPARs και LXR υποδοχέων ασκείται μέσω της επαγωγής των υποδοχέων αδιπονεκτίνης.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της αδιπονεκτίνης στη ρύθμιση των υποδοχέων της AdipoR1 και AdipoR2.

1.3. Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH (CRH, Urocortins) και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης και στην επαγόμενη από αδιπονεκτίνη και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRH) ανήκει στην κατηγορία των υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων. Απομονώθηκε το 1981 από τους Vale et al. (63), ενώ υποθέσεις για την ύπαρξη του παράγοντα αυτού είχαν ήδη διατυπωθεί από το 1951 (64). Η ανθρώπινη ουροκορτίνη (UCN) και ουροκορτίνη 2 κλωνοποιήθηκαν το 1996 και 2001, αντίστοιχα, και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με τον CRH, για αυτό και θεωρούνται μέλη της ίδιας οικογένειας νευροπεπτιδίων (65, 66).

Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH (CRH, Urocortins) εντοπίζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης. Ο CRH ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα το 1990 (67). Επίσης, το mRNA του CRH εντοπίστηκε στο ήπαρ, στο σπλήνα και στο θύμο αδένα αρουραίου (68), καθώς επίσης, στο σπλήνα και στον αρθρικό θύλακα αρουραίων Lewis με φλεγμονώδη αρθρίτιδα (69). Η ουροκορτίνη ανιχνεύεται σε κύτταρα και ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης στο θύμο και στο σπλήνα ποντικών (70, 71).

Τα επίπεδα του CRH, που εντοπίζεται περιφερικά, είναι πολύ χαμηλά σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι διεγερμένο (72), ενώ έχει βρεθεί ότι σε περιοχές φλεγμονής επάγεται η σύνθεση και η έκκριση CRH και ουροκορτίνης, ενισχύοντας το φαινόμενο. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η τοπική παραγωγή του CRH, αυξήθηκε σε πειραματικά επαγόμενη φλεγμονή, σε αρουραίους (73). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι σε ιστούς, στους οποίους είχε γίνει επαγωγή φλεγμονής με χημικό τρόπο, ανιχνεύτηκε CRH, παράλο που το πεπτίδιο δεν ήταν ανιχνεύσιμο στην κυκλοφορία (74). Επίσης, μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι η επώαση λεμφοκυττάρων με CRH διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους, γεγονός που είναι πολύ

σημαντικό για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη φλεγμονώδη απόκριση (75).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα CRH νευροπεπτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης. Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας CRH επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα με δύο τρόπους: έμμεσα και άμεσα. Η έμμεση επίδραση του CRH στο ανοσοποιητικό σύστημα γίνεται μέσω της διέγερσης, σε καταστάσεις stress, του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού (ΥΥΕ) άξονα και της παραγωγής κορτιζόλης, η οποία έχει αντι-φλεγμονώδη δράση (76). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο CRH μπορεί να επηρεάσει άμεσα το ανοσοποιητικό σύστημα με αυτοκρινή ή/και με παρακρινή τρόπο, αφού απελευθερώνεται σε περιοχές φλεγμονής από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων, από επιθηλιακά κύτταρα και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ασκώντας προ-φλεγμονώδη δράση (76, 77). Τα CRH πεπτίδια επηρεάζουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν επιστρατευτεί στις περιοχές φλεγμονής (76, 77), καθώς τα κύτταρα αυτά (ιστιοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα) εκφράζουν τους υποδοχείς των πεπτιδίων CRHR1 και CRHR2 (72). Ο παράγοντας CRH προσδέεται κυρίως στον CRHR1 και από τις ουροκορτίνες, η UCN2 προσδέεται αποκλειστικά στον CRHR2, ενώ η UCN προσδέεται και στους δύο υποδοχείς (78, 79). Τα μακροφάγα, λοιπόν, διεγείρονται από τα νευροπεπτίδια και σαν απόκριση εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (72, 80). Συγκεκριμένα, έχει δημοσιευθεί από το εργαστήριό μας ότι ο CRH ενισχύει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από πρωτογενή μακροφάγα ποντικού και σε ποντίκια, στα οποία επάγεται σοκ από ισχυρή δόση LPS (80).

Από τη στιγμή, λοιπόν, που τα CRH πεπτίδια και η αδιπονεκτίνη αποτελούν μόρια τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, επηρεάζοντας τη λειτουργία των μακροφάγων, μελετήθηκε η επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στη ρύθμιση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 και στην επαγόμενη από αδιπονεκτίνη και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, από τα μακροφάγα.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Αντιδραστήρια

(α) PMA (Sigma, USA)

(β) Ανθρώπινη ανασυνδυασμένη αδιπονεκτίνη-Adiponectin-Human (Recombinant), Code ADI-01 (Phoenix Pharmaceuticals, Germany)

(γ) LPS (serotype 0111:B4, Sigma, USA)

(δ) Poly (I:C) (Sigma, USA)

(ε) CRH (human, mouse) (Tocris, UK)

(στ) UCN2 (Sigma, USA)

(ζ) Polymyxin B sulfate (Sigma, USA)

2.2. Κυτταρικές σειρές-Πρωτογενή κύτταρα-Καλλιέργειες

2.2.1. Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1

Η κυτταρική σειρά THP-1 είναι μια μονοκυτταρική σειρά που απομονώθηκε από το αίμα άρρενα ασθενούς με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία (81). Στην επιφάνειά τους εκφράζονται ο υποδοχέας του Fc θραύσματος της ανοσοσφαιρίνης και ο υποδοχέας του C3b συστατικού του συμπληρώματος (81). Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την ATCC (Αρ. Καταλόγου TIB-202). Η διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα μπορεί να επιτευχθεί με επώαση με τους φορβολικούς εστέρες TPA και PMA, για 24 hrs (81).

2.2.2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς THP-1

Τα THP-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο καλλιέργειας RPMI 1640, 2 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES (Invitrogen), το οποίο περιείχε 10% FBS (Invitrogen) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα P/S (Invitrogen), με τελική συγκέντρωση 100 U/ml πενικιλίνης και 0,1 mg/ml στρεπτομυκίνης. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ και 95% υγρασία. Το θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών ανανεώνονταν κάθε 48 hrs.

Τα THP-1 κύτταρα είναι κατά κύριο λόγο αιωρούμενα, οπότε η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν με φυγοκέντρηση (1600 rpm, 10 min, RT). Στη συνέχεια μικρός όγκος του κυτταρικού διαλύματος αναμιγνύονταν με Trypan Blue, σε

αραίωση 1:10, για προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού. Ο προσδιορισμός πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο αιματοκυτταρομετρίας (με πλάκα Neubauer) και με τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός (Olympus, Japan), σε μεγέθυνση 40x. Για το κάθε πείραμα τα κύτταρα τοποθετούνταν σε κατάλληλη συγκέντρωση στα αντίστοιχα δοχεία καλλιέργειών σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Για τη διαφοροποίηση των THP-1 μονοκυττάρων σε μακροφάγα γινόταν επώαση των κυττάρων με PMA, σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml, για 24 hrs (14, 62) και στη συνέχεια ακολουθούσε η πειραματική διαδικασία.

2.2.3. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων μονοκυττάρων/μακροφάγων από περιφερικό αίμα

Πρωτογενή ανθρώπινα μονοκύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα περιφερικού αίματος, τα οποία προέρχονταν από υγιείς, μη-παχύσαρκους δότες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA-K₃) και διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Norway), όπως έχει ήδη περιγραφεί (82).

Στη συνέχεια, τα κύτταρα που απομονώθηκαν πλύθηκαν δύο φορές με 0,01 M PBS, pH=7,4 (Sigma, USA), επαναδιαλύθηκαν σε μέσο καλλιέργειας DMEM (Invitrogen), το οποίο περιείχε 10% FBS και τοποθετήθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας διαμέτρου 10 cm. Μετά από επώαση δύο ωρών, τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί στα δοχεία καλλιέργειας συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε 96-well plates, σε συγκέντρωση 2×10^6 /ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε η πειραματική διαδικασία. Το κλάσμα των προσκολλημένων κυττάρων αποτελείται από περιφερικά μονοκύτταρα και μακροφάγα.

2.2.4. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών μακροφάγων από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού (thioglycollate-elicited macrophages)

Για την απομόνωση πρωτογενών μακροφάγων, από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού, χρειάζεται η παρασκευή ενός 4% thioglycollate διαλύματος (LAB M Thioglycollate Medium (Breuer), England), από το οποίο 1,5 ml χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε C57BL/6 ποντικούς. Μετά από τρεις μέρες, έγινε πλύσιμο της περιτοναϊκής κοιλότητας με 10 ml θρεπτικού υλικού DMEM, που

περιείχε 10% FBS και 1% αντιβιοτικό διάλυμα P/S. Η συλλογή των κυττάρων από την περιτοναϊκή κοιλότητα έγινε όπως έχει ήδη περιγραφεί (80).

Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν φυγοκεντρήθηκαν (1600 rpm, 10 min, RT) και επαναδιαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, 10 mM L-γλουταμίνη, 10% FBS, 1% P/S (100 U/ml πενικιλίνη και 0,1 mg/ml στρεπτομυκίνη). Ακολούθησε η μέτρηση και η τοποθέτηση των κυττάρων σε 96-well plates, σε συγκέντρωση 5×10^5 /ml. Μετά από 24 hrs αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό με νέο και τα κύτταρα έμειναν για ακόμα ένα 24ωρο στον επωαστικό κλίβανο, πριν ακολουθήσει η πειραματική διαδικασία.

2.3. Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου των Chomczynski και Sacchi (83). Στη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε, για τη λύση των κυττάρων, το αντιδραστήριο θειοκυανική γουανιδίνη (Trizol, Tri reagentTM, Sigma, USA). Προστέθηκε 1 ml Trizol/ 10^6 κύτταρα και ακολούθησε ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα δείγματα παρέμειναν σε RT για 5 min, ώστε να επιτευχθεί πλήρης αποσύζευξη των νουκλεοπρωτεϊνών. Ακολούθως, προστέθηκαν 0,2 ml χλωροφορμίου (Sigma, USA)/ml Trizol, το μείγμα αναδεύτηκε έντονα για 15 sec και παρέμεινε σε RT για 2-15 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000 rpm, για 15 min, στους 4 °C. Με τη φυγοκέντρωση το δείγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: μια ερυθρή φάση στην οποία περιέχεται η πρωτεΐνη, μία διάμεση φάση στην οποία περιέχεται το DNA και μία υδατική φάση στην οποία περιέχεται το RNA. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και αναμείχθηκε με 0,5 ml ισοπροπανόλης (Merck, Germany)/ml Trizol. Μετά από έντονη ανάδευση, το μείγμα παρέμεινε σε RT για 5-10 min και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε σε 12.000 rpm, για 10 min, στους 4 °C. Με τη διαδικασία αυτή το RNA κατακρημνίζεται σχηματίζοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml 75% αιθανόλης. Μετά από έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση (12.000 rpm, 10 min, 4 °C) ακολουθεί άλλο ένα πλύσιμο του RNA με 1 ml 75% αιθανόλης. Κατόπιν, γίνεται φυγοκέντρωση και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα (RNA) αφήνεται να στεγνώσει σε RT και επαναδιαλύεται σε 50 μl WFI. Η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε φωτομετρικά (260/280 nm).

2.4. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA προς συμπληρωματικό DNA πραγματοποιείται με το ThermoscriptTM RT-PCR System (Invitrogen). Για το σκοπό αυτό 1 µg ολικού RNA, από κάθε δείγμα, χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση του cDNA.

Αρχικά, προετοιμάζεται σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf, απαλλαγμένο από DNAάσες, ένα μείγμα αντίδρασης που περιέχει: 1 µg ολικού RNA, 1 µl εκκινητή (primer), όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή (Random Hexamers, 50 ng/µl), τα οποία προσδένονται στο mRNA, και WFI, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 10 µl. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή με την επώαση του μείγματος για 5 min, στους 65°C, σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research) και στη συνέχεια με ψύξη του στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές, που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA.

Ακόλουθα, προετοιμάζεται το κύριο μείγμα της αντίδρασης από το οποίο υπολογίζουμε ότι αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα όγκος 10 µl. Για ένα δείγμα το κύριο μείγμα της αντίδρασης περιέχει:

- 4 µl ρυθμιστικού διαλύματος 5x cDNA synthesis buffer
- 1 µl 0,1 M DTT (διθειοθρεϊτόλης)
- 1 µl διαλύματος αναστολέων RNAασών, RNaseOUTTM 40 U/µl
- 1 µl WFI
- 2 µl μείγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών, 10 mM dNTP mix
- 1 µl ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης, ThermoscriptTM RT (Reverse Transcriptase) 15 U/µl

Το παραπάνω μείγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 10 min, στους 25°C, ακόλουθα για 50 min, στους 50 °C, οπότε υβριδοποιείται ο εκκινητής και δρα η ανάστροφη μεταγραφάση και για 5 min, στους 85°C, όπου αποδιάσσονται τα υβρίδια και απενεργοποιείται η ανάστροφη μεταγραφάση. Το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή φυλάσσεται στους -20°C.

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Για την *in vitro* ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA εφαρμόζουμε τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Μία παραλλαγή της κλασικής μεθόδου αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR). Πρόκειται για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης, καθώς σε ένα μόνο στάδιο γίνεται ο πολυμερισμός του DNA και η ανίχνευση των προϊόντων, ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται από το software του μηχανήματος.

Το σύστημα πολυμερισμού και ανίχνευσης της αλληλουχίας είναι το ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, UK). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του DNA είναι η SYBR Green 1. Η συγκεκριμένη χρωστική δεσμεύεται μη ειδικά σε δίκλωνο DNA (dsDNA), οπότε εκπέμπει ακτινοβολία, ενώ η μη δεσμευμένη χρωστική δεν εκπέμπει. Η ποσότητα της ενισχυμένης αλληλουχίας αυξάνεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης εκθετικά, συνεπώς η ακτινοβολία που θα εκπέμπεται στο τέλος κάθε κύκλου θα αυξάνεται, επίσης, με εκθετικό ρυθμό.

Το ABI PRISM 7000 περιέχει ένα θερμικό κυκλοποιητή 96 θέσεων. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, φως από λάμπα αλογόνου πέφτει πάνω στην πλάκα όπου βρίσκονται τα δείγματα, το φως τα διαπερνά και διεγείρει την προσδεδεμένη χρωστική SYBR Green 1, οπότε εκπέμπεται ακτινοβολία στην περιοχή των 500-660 nm. Η ακτινοβολία αυτή μεταφέρεται με ένα σύστημα φακών και φίλτρων στην ειδική κάμερα, όπου και καταγράφεται. Το software του ABI PRISM 7000 συγκεντρώνει τα σήματα από την ακτινοβολία και τα μετατρέπει με αλγόριθμους, παρέχοντας μας τα τελικά ποσοτικά αποτελέσματα.

Για κάθε δείγμα παρασκευάσθηκε το κύριο μείγμα της αντίδρασης, το οποίο περιείχε:

- 10 μl SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)
- 1 μl forward primer (περιέχει 10 pmole του εκκινητή)
- 1 μl reverse primer (περιέχει 10 pmole του εκκινητή)
- 8 μl WFI

Από το μείγμα αυτό τα 19 μl τοποθετήθηκαν στο σωληνάριο της αντίδρασης και προστέθηκε 1 μl cDNA, από κάθε δείγμα.

Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στην ειδική θέση του θερμικού κυκλοποιητή και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

(α) 95°C, για 10 min

(β) (i) 95°C, για 30 sec

(ii) 58°C, για 40 sec

(iii) 72°C, για 45 sec

Το βήμα (β) επαναλήφθηκε 45 φορές (45 κύκλοι).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν:

Για τον υποδοχέα **R1 της αδιπονεκτίνης (AdipoR1)**:

Forward primer: 5'-T A T G C T G C T C G A A T T C C T G A-3'

Reverse primer: 5'-C C A C C A G G A C A T G G A A A A T C-3'

Για τον υποδοχέα **R2 της αδιπονεκτίνης (AdipoR2)**:

Forward primer: 5'-A C A G G C A A C A T T T G G A C A C A-3'

Reverse primer: 5'-T A A A A G A T C C C C A G G C A C A-3'

Για την **ανθρώπινη β-ακτίνη**:

Forward primer: 5'-C C G G C C A G C C A G G T C C A G A-3'

Reverse primer: 5'-C A A G G C C A A C C G C G A G A A G A T G-3'

2.6. Μέτρηση κυτοκινών

2.6.1. Μέτρηση κυτοκινών εκκρινόμενων από ανθρώπινα κύτταρα (THP-1, περιφερικά μακροφάγα)

Οι κυτοκίνες IL6 και TNFα μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών, μετά τις πειραματικές επιδράσεις, με τη μέθοδο χημειοφωταύγειας, στον αναλυτή Immulite 1000 (DPC) (84).

2.6.2. Μέτρηση κυτοκινών που εκκρίθηκαν από τα πρωτογενή μακροφάγα ποντικού

Οι κυτοκίνες IL6 και TNFα μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών, μετά τις πειραματικές επιδράσεις, με ELISA (Quantikine[®],

R&D systems, UK) (80). Στη συνέχεια, η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στο μηχάνημα Dynatech MicroElisa Reader (Chantilly, VA), σε μήκος κύματος 405 nm.

2.7. Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis)

Η έκφραση των υποδοχέων TLR3 και TLR4 στην κυτταρική σειρά THP-1, μετά τις πειραματικές επιδράσεις, μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής στο μηχάνημα FACScan (Becton-Dickinson, USA). Στα συγκεκριμένα πειράματα, ο αριθμός των κυττάρων για κάθε επίδραση που μελετήθηκε ήταν 2×10^5 .

Ο υποδοχέας TLR3 είναι ενδοκυτταρικός, επομένως είναι απαραίτητο, πριν από τη χρώση, τα κύτταρα να γίνουν διαπερατά για το anti-TLR3 αντίσωμα. Για το λόγο αυτό, αμέσως μετά τη συλλογή των κυττάρων από την καλλιέργεια, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 0,3 ml του διαλύματος FACS permeabilizing solution (Becton-Dickinson, USA), το οποίο είχε αραιωθεί 1:10 με WFI. Ακολούθησε επώαση 10 min, σε RT, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, έγινε πλύσιμο των κυττάρων με 0,01 M PBS, περιεκτικότητας 1% σε BSA (fraction V, Sigma, USA) και φυγοκέντρηση (4500 rpm, 1 min, RT). Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με αντλία κενού και προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1,6 μl anti-human TLR3-PE-conjugated αντισώματος (eBioscience, USA). Τα δείγματα επώασθηκαν για 30 min, στους 4°C, στο σκοτάδι. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με 0,01 M PBS, 1% BSA και τέλος τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 0,2% παραφορμαλδεύδης.

Ο υποδοχέας TLR4 είναι επιφανειακός, οπότε η προσθήκη του αντισώματος γίνεται αμέσως μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 4 μl anti-human TLR4-PE-conjugated αντισώματος (eBioscience, USA) και ακολούθησε επώαση για 20 min, στους 4°C, στο σκοτάδι. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με 0,01 M PBS, 1% BSA και τέλος τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 0,2% παραφορμαλδεύδης.

2.8. Ανοσοφθορισμός

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για τη μελέτη της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, με χρήση αντισώματος έναντι στην υπομονάδα p65 (RelA) του μορίου. Για την εφαρμογή της μεθόδου, THP-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ειδικές αντιμενοφόρους (8-well chamber slides) (Costar, UK).

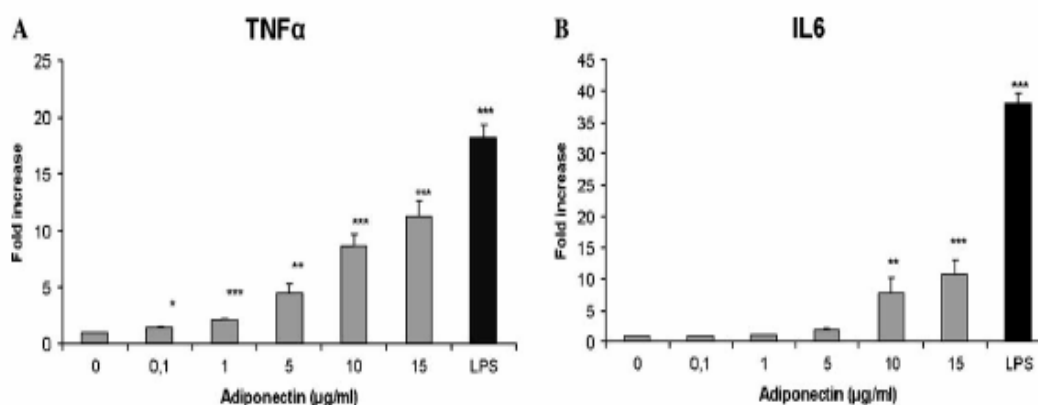
Μετά τις επιδράσεις, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 3,7% φορμαλδεΰδης για 10 min, σε RT. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με 0,01 M PBS και κατόπιν, επώστηκαν με διάλυμα 0,2% Triton για 10 min, σε RT, ώστε οι κυτταρικές μεμβράνες να γίνουν διαπερατές για το αντίσωμα. Ακολούθησαν δύο πλυσίματα με 0,01 M PBS και μετά τα κύτταρα επώστηκαν για 15 min, σε RT, με διάλυμα 0,01 M PBS-0,1% FBS, ώστε να γίνει πρόσδεση των πρωτεϊνών του ορού σε θέσεις μη ειδικές για το αντίσωμα. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το διάλυμα του ορού και προστέθηκε στα κύτταρα anti-p65 πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο δημιουργήθηκε με ανοσοποίηση κουνελιών (Santa Cruz Biotechnology, USA). Η επώαση με το anti-p65 πολυκλωνικό αντίσωμα έγινε για 24 hrs, στους 4°C. Ακόλουθα, έγιναν δύο πλυσίματα με 0,01 M PBS και τα κύτταρα επώστηκαν με anti-rabbit αντίσωμα, για 1 hr, στο σκοτάδι, το οποίο αναγνωρίζει το anti-p65 και φέρει το φθοριόχρωμα FITC (πράσινο χρώμα) (Sigma, USA).

Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με μικροσκόπιο συνεστίασης (confocal laser-scanning module, Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany), το οποίο είναι ένα μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιεί ακτίνες laser για την εστίαση. Με τις ακτίνες laser είναι δυνατή η εστίαση σε ένα σημείο του κυττάρου, οπότε με διαδοχικές εστιάσεις σε διάφορα επίπεδα συγκροτείται η τρισδιάστατη δομή του κυττάρου. Η παρατήρηση των κυτταρικών δομών γίνεται με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού 63/1.25 (85, 86).

3. Αποτελέσματα

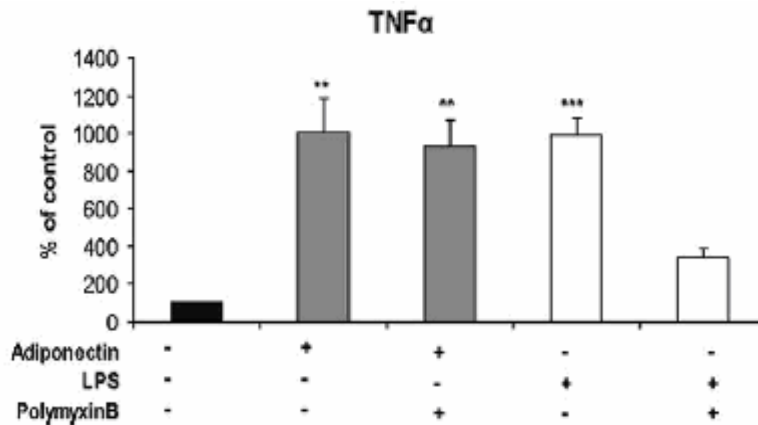
3.1. Η gAd επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα

Για τη μελέτη της επίδρασης της gAd σε μακροφάγα χρησιμοποιήθηκε αρχικά η κυτταρική σειρά THP-1. THP-1 μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα μετά από επώαση με PMA, όπως έχει ήδη περιγραφεί (14, 62). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις gAd (0, 0,1, 1, 5, 10, 15 $\mu\text{l/ml}$) και με LPS (100 ng/ml), για 24 hrs και οι κυτοκίνες TNF α και IL6 μετρήθηκαν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 (Εικ. 1A και 1B), η gAd επάγει την έκκριση των κυτοκινών TNF α και IL6, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωσή της.



Εικ. 1. Η gAd επάγει την έκκριση TNF α (A) και IL6 (B) από **THP-1 μακροφάγα**, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωσή της. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ και *** $p<0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με το μάρτυρα).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η επαγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα THP-1 μακροφάγα δεν οφειλόταν σε επιμόλυνση της ανασυνδυασμένης gAd με LPS, λόγω του τρόπου παρασκευής της, THP-1 κύτταρα, διαφοροποιημένα σε μακροφάγα, επωάστηκαν με gAd (10 $\mu\text{g/ml}$) και LPS (100 ng/ml), παρουσία ή όχι Polymyxin B sulfate (100 $\mu\text{g/ml}$). Η χημική ουσία Polymyxin B sulfate αναστέλλει τη δράση του λιποπολυσακχαρίτη δεσμευοντάς τον. Η επώαση των THP-1 μακροφάγων με Polymyxin B sulfate δεν επηρέασε την επαγόμενη από gAd έκκριση κυτοκινών, αλλά εμπόδιζε τελείως, όπως ήταν αναμενόμενο, την επαγόμενη από LPS έκκριση κυτοκινών (Εικ. 2), επιβεβαιώνοντας ότι η gAd δεν είχε επιμολυνθεί με LPS, λόγω του τρόπου παρασκευής της.



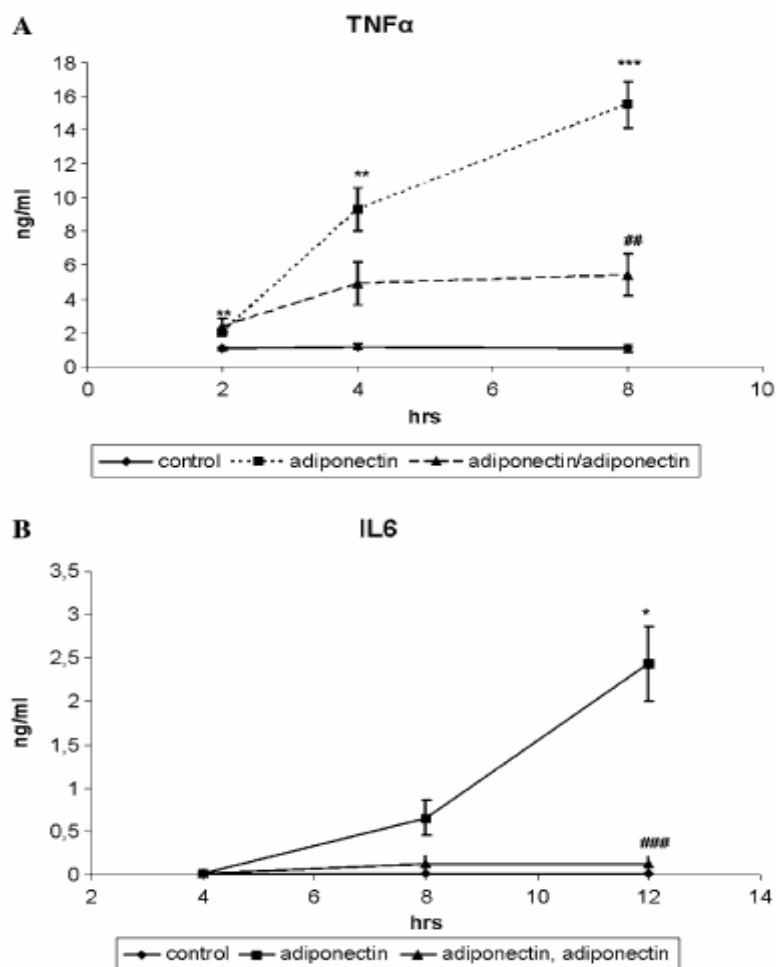
Εικ. 2. Η επαγωγή της έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από **THP-1 μακροφάγα** δεν οφείλεται σε επιμόλυνση της gAd με LPS. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με το μάρτυρα).

3.2. Η gAd επάγει ανοχή των μακροφάγων σε ακόλουθη διέγερση με gAd

Σύμφωνα με δημοσιευμένες αναφορές, η αδιπονεκτίνη ρυθμίζει αρνητικά τη δράση των μακροφάγων (49) και καταστέλλει την επαγόμενη από LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά (49, 55), με αποτέλεσμα να θεωρείται ορμόνη με αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Ωστόσο, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η αδιπονεκτίνη επάγει ισχυρά την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα. Για να εξηγήσουμε το παράδοξο αυτό, λαμβάνοντας υπόψη ότι στις παραπάνω δημοσιευμένες αναφορές οι προ-φλεγμονώδεις επιδράσεις γίνονται μετά από 24ωρη επώαση των μακροφάγων με αδιπονεκτίνη (48, 49, 55) και ότι η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη η οποία βρίσκεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα (7-10, 32, 87), υποθέσαμε ότι η αδιπονεκτίνη επάγει την ανοχή των μακροφάγων στην ίδια της την επίδραση, ώστε αυτά να διατηρούνται αδρανή σε συνεχή έκθεση στην ορμόνη.

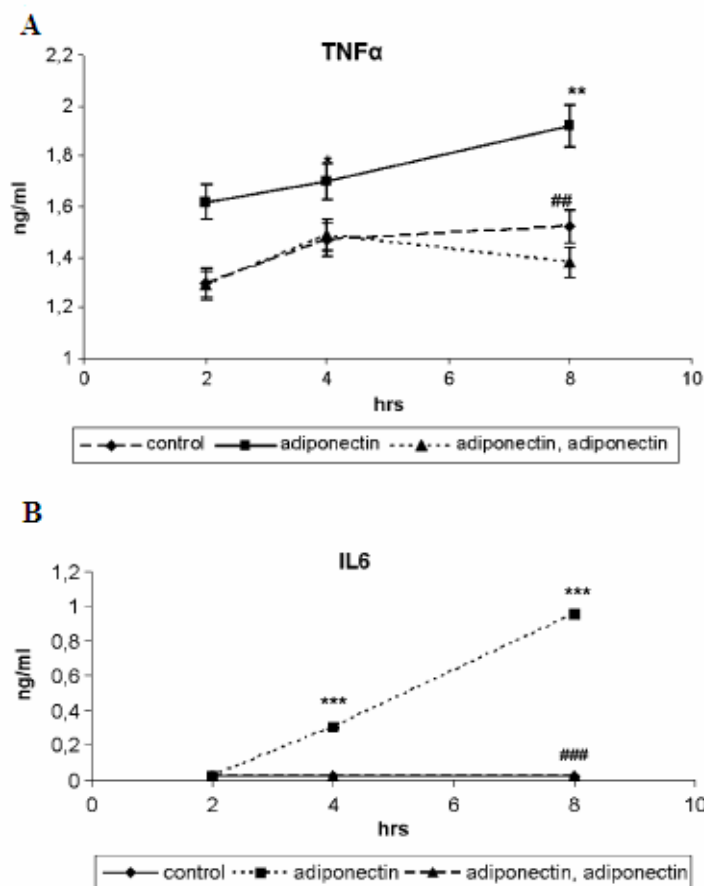
Για το λόγο αυτό, THP-1 μακροφάγα επώασθηκαν με gAd (10 $\mu\text{g/ml}$), για 24 hrs, στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και έγινε ξανά επίδραση με την ίδια συγκέντρωση gAd στα κύτταρα. Οι κυτοκίνες TNF α και IL6 μετρήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, μετά τη δεύτερη επώαση με gAd. Τα κύτταρα που είχαν προ-επωασθεί με gAd έδειξαν ανοχή στη μετέπειτα διέγερση με την ορμόνη, αφού η έκκριση TNF α και IL6 από αυτά ήταν σημαντικά χαμηλότερη, σε σύγκριση

με την έκκριση TNF α και IL6 από κύτταρα που δεν είχαν προ-επωασθεί με gAd (Εικ. 3A και 3B).



Εικ. 3. Η gAd επάγει ανοχή των **THP-1 μακροφάγων** σε ακόλουθη διέγερση με gAd. Οι κυτοκίνες TNF α (A) και IL6 (B) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργιών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ ## $p < 0,01$ και ### $p < 0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν προ-επωασθεί με gAd).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα αποτελέσματά μας δεν οφείλονται σε κάποια ιδιαιτερότητα της κυτταρικής σειράς THP-1, απομονώσαμε ανθρώπινα, περιφερικά μονοκύτταρα/μακροφάγα και επαναλάβαμε το ίδιο πείραμα. Όπως και τα THP-1 μακροφάγα, τα πρωτογενή μακροφάγα που είχαν προ-επωασθεί με gAd έδειξαν ανοχή στη μετέπειτα διέγερση με την ορμόνη, αφού η έκκριση TNF α και IL6 από αυτά ήταν σημαντικά χαμηλότερη, σε σύγκριση με την έκκριση TNF α και IL6 από κύτταρα που δεν είχαν προ-επωασθεί με gAd (Εικ. 4A και 4B).

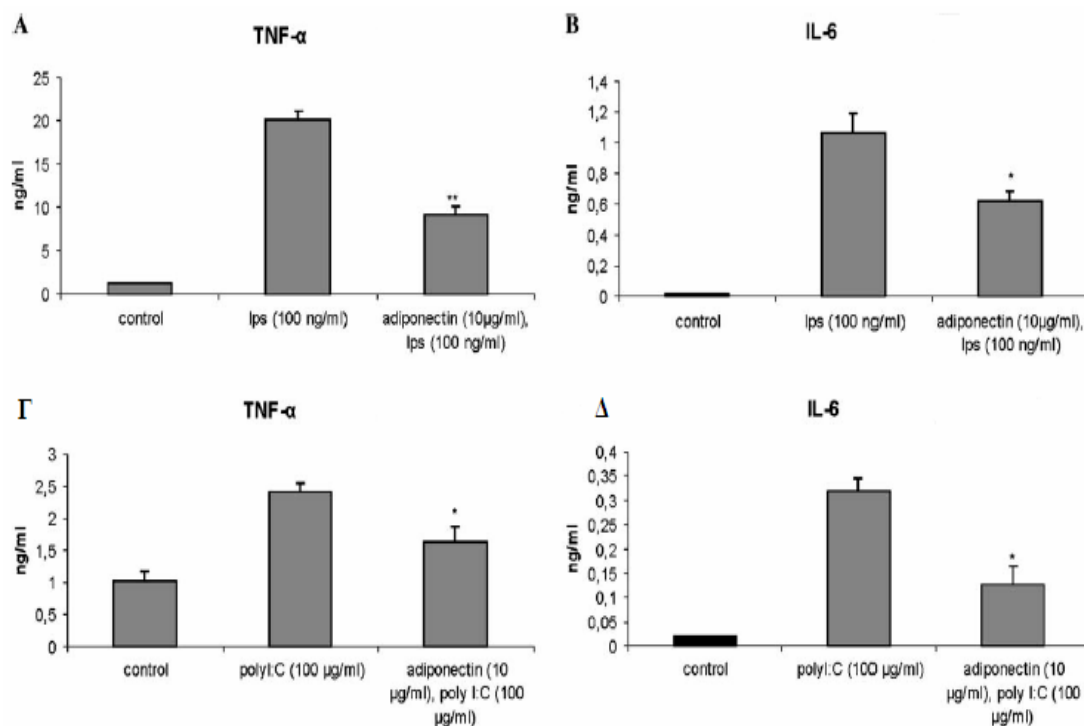


Εικ. 4. Η gAd επάγει την ανοχή πρωτογενών ανθρώπινων μακροφάγων σε ακόλουθη διέγερση με gAd. Οι κυτοκίνες TNFα (A) και IL6 (B) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιέργειών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($*p<0,05$, $**p<0,01$ και $***p<0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ $##p<0,01$ και $###p<0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν προ-επωασθεί με gAd).

3.3. Η gAd ελάττωσε την ευαισθησία των μακροφάγων σε άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα (αγωνιστές των TLR3 και TLR4)

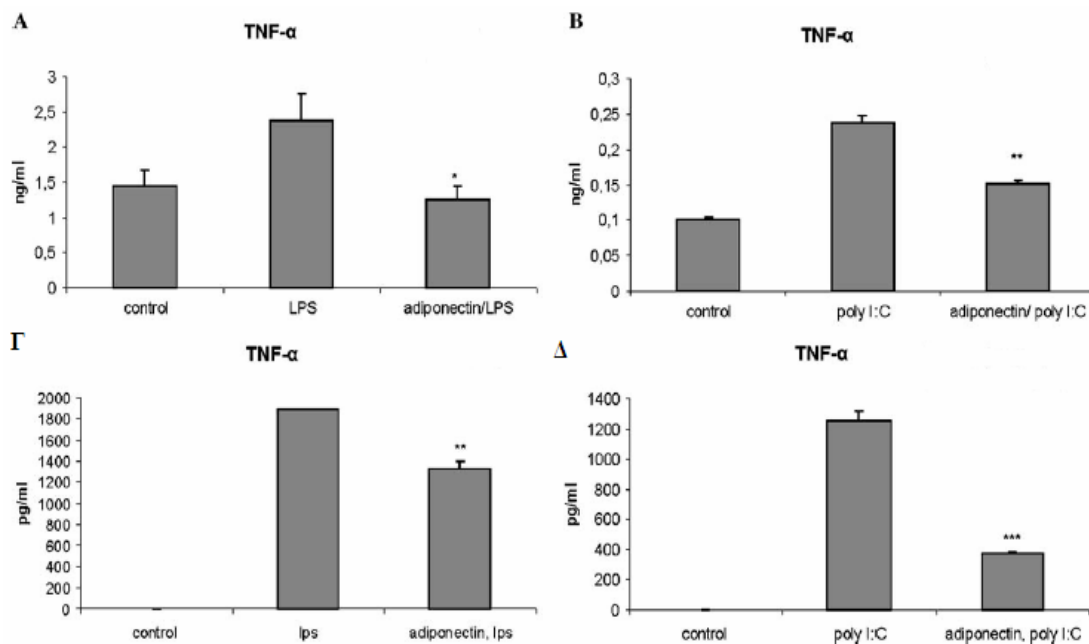
Σύμφωνα με δημοσιευμένες αναφορές, η αδιπονεκτίνη ελαττώνει την ευαισθησία πρωτογενών, περιφερικών μακροφάγων χοίρου και των THP-1 μακροφάγων στην επαγόμενη από LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (49, 55). Για να μελετήσουμε αν η gAd επάγει ανοχή των μακροφάγων σε διαφορετικά προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως το Poly (I:C) και το LPS, έγινε επώαση THP-1 μακροφάγων με gAd (10 $\mu\text{g/ml}$), για 24 hrs, στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και έγινε επίδραση με Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) και LPS (100 ng/ml), για άλλες 24 hrs. Οι κυτοκίνες TNFα και IL6 μετρήθηκαν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά τις επιδράσεις. Η gAd

προκάλεσε ανοχή των κυττάρων στη μετέπειτα διέγερση με LPS (Εικ. 5Α και 5Β) και Poly (I:C) (Εικ. 5Γ και 5Δ), αφού η έκκριση TNFα και IL6 ήταν σημαντικά χαμηλότερη, σε σύγκριση με την έκκριση TNFα και IL6 από κύτταρα που δεν είχαν προ-επωασθεί με gAd. Προκαλώντας, λοιπόν, την ανοχή των μακροφάγων, η αδιπονεκτίνη προστατεύει από την έκθεση σε ισχυρά προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως είναι το Poly(I:C) και ο λιποπολυσακχαρίτης.



Εικ. 5. Η gAd επάγει ανοχή των **THP-1 μακροφάγων** σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. **THP-1 μακροφάγα** προ-επωάσθησαν με gAd για 24 hrs, διεγέρθηκαν με LPS για ακόμα 24 hrs και οι κυτοκίνες TNFα (Α) και IL6 (Β) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. **THP-1 μακροφάγα** προ-επωάσθησαν με gAd για 24 hrs, διεγέρθηκαν με Poly (I:C) για ακόμα 24 hrs και οι κυτοκίνες TNFα (Γ) και IL6 (Δ) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν προ-επωασθεί με gAd).

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε σε πρωτογενή ανθρώπινα μακροφάγα (Εικ. 6Α και 6Β) και σε πρωτογενή μακροφάγα από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού (Εικ. 6Γ και 6Δ), όπου η gAd είχε την ίδια δράση.



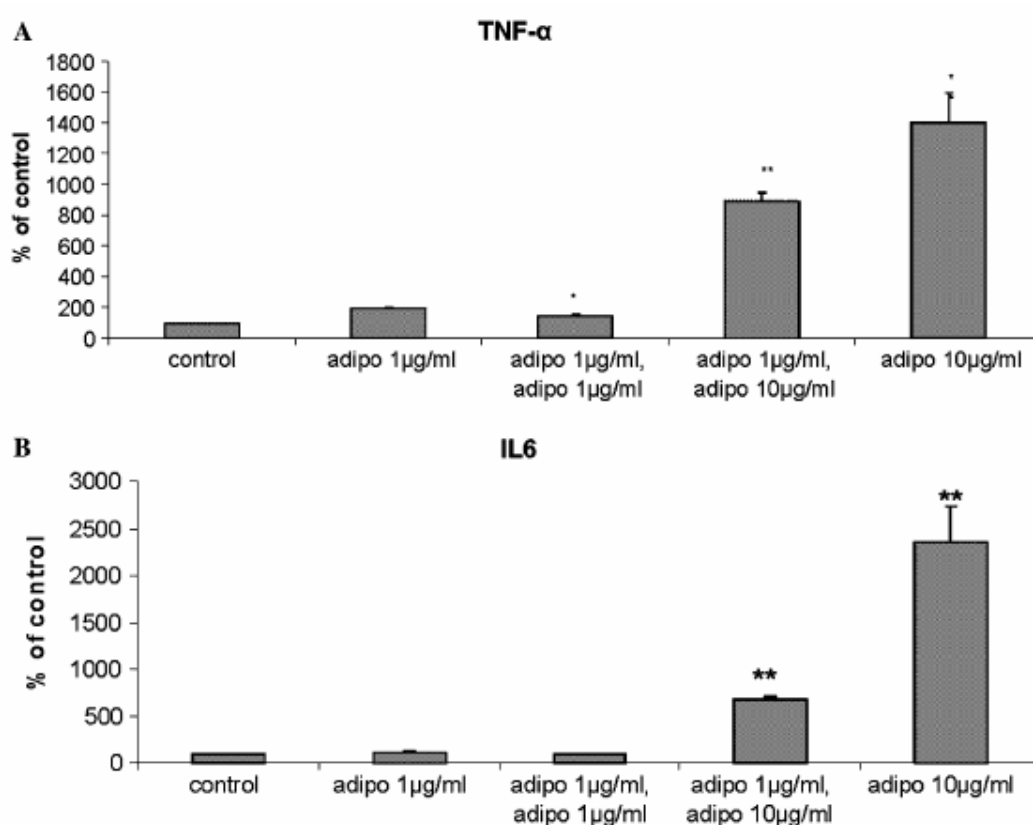
Εικ. 6. Ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα/μακροφάγα (6A, 6B) προ-επώασθησαν με gAd για 24 hrs, διεγέρθηκαν με LPS (A) ή Poly (I:C) (B) για ακόμα 24 hrs και ο TNFα μετρήθηκε στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. **Πρωτογενή μακροφάγα από την περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικού (6Γ, 6Δ)** προ-επώασθησαν με gAd για 24 hrs, διεγέρθηκαν με LPS (Γ) ή Poly (I:C) (Δ) για ακόμα 24 hrs και ο TNFα μετρήθηκε στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν προ-επωασθεί με gAd).

3.4. Η επίδραση της gAd στην ευαισθησία των μακροφάγων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της

Σε αντίθεση με όλα τα γνωστά μέχρι σήμερα εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού, των οποίων η έκφραση και η συγκέντρωση στο πλάσμα αυξάνονται σημαντικά σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, η έκφραση και η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο πλάσμα ελαττώνονται σημαντικά (23, 32, 33). Επίσης, έχει δημοσιευτεί ότι η προ-επώαση μακροφάγων με χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης (1 $\mu\text{g/ml}$), που ανταποκρίνονται στα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα παχύσαρκων ατόμων (23), δεν επηρεάζει την επαγόμενη από LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (55).

Υποθέσαμε, λοιπόν, ότι η έκθεση των μακροφάγων σε χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης δε θα επάγει την ανοχή τους στον ίδιο βαθμό με τα υψηλά επίπεδα της ορμόνης, έναντι στην ίδια την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων αδιπονεκτίνης και άλλων προ-φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Για το λόγο αυτό, THP-1 μακροφάγα προ-επώασθησαν με 1 $\mu\text{g/ml}$ gAd, για 24 hrs και ακόλουθα εκτέθηκαν σε

10 µg/ml gAd και σε 1 µg/ml gAd, σα μάρτυρα, για ακόμα 24 hrs. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ενώ η επίδραση με 1 µg/ml gAd δεν επάγει την έκκριση κυτοκινών από τα μακροφάγα, η επίδραση με 10 µg/ml gAd επάγει σημαντικά την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, δηλώνοντας ότι η προ-επώαση με χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης (1 µg/ml) δεν απευαισθητοποιεί τα μακροφάγα, όπως η προ-επώαση με υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης (10 µg/ml) (Εικ. 3, 4, 5, 6), αποκαλύπτοντας με τον τρόπο αυτό τη δυναμική της σαν προ-φλεγμονώδη παράγοντα (Εικ. 7A και 7B).



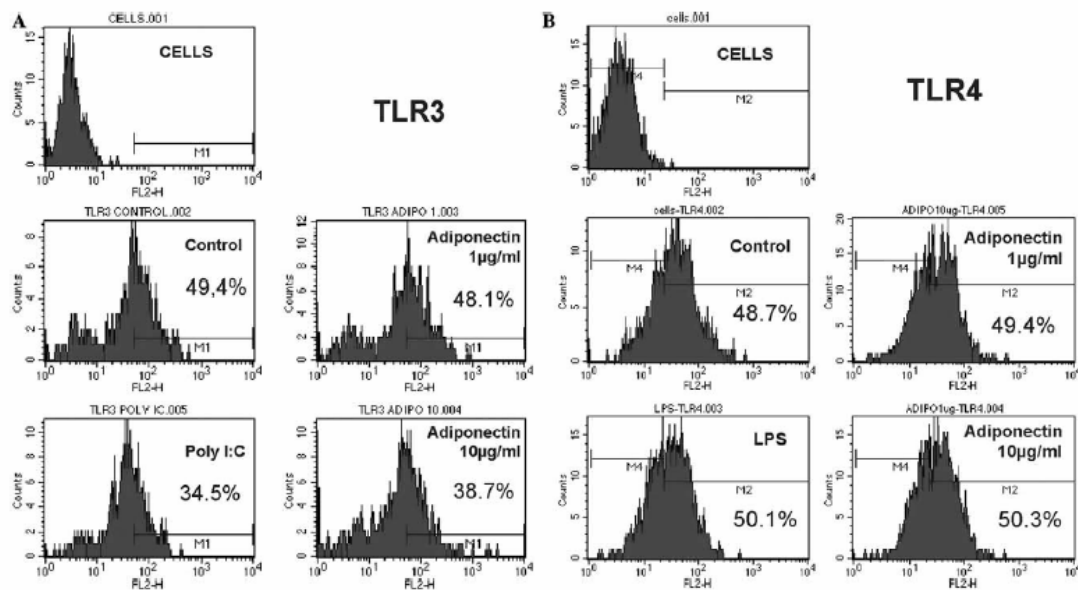
Εικ. 7. Προ-επώαση **THP-1 μακροφάγων** με χαμηλά επίπεδα gAd αποκαλύπτει τη δυναμική της σαν προ-φλεγμονώδη παράγοντα. Οι κυτοκίνες TNFα (A) και IL6 (B) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με κύτταρα που έχουν προ-επωασθεί με 1 µg/ml gAd και εκτέθηκαν ακόλουθα σε 1 µg/ml gAd).

3.5. Επίδραση της gAd στη ρύθμιση των υποδοχέων TLR3 και TLR4-Μελέτη μηχανισμών απευαισθητοποίησης των μακροφάγων έναντι σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα

Η απευαισθητοποίηση των μακροφάγων και η επαγωγή ανοχής έναντι σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα είναι δυνατό να γίνει με διάφορους μηχανισμούς, ανάλογα με το ερέθισμα και την προέλευση των μακροφάγων. Έχει δημοσιευτεί ότι ο λιποπολυσακχαρίτης επάγει την ανοχή πρωτογενών μακροφάγων ποντικού, σε ακόλουθη έκθεση στο ίδιο ερέθισμα, προκαλώντας τη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα TLR4 στην επιφάνεια των κυττάρων (88). Επίσης, η έκθεση πρωτογενών μακροφάγων ποντικού σε λιποπολυσακχαρίτη προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργοποίησης των κινασών ERK1/2, p38, JNK 1/2, καθώς επίσης σημαντική μείωση της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και της γονιδιακής έκφρασης των υποδοχέων TLR2 και TLR4 (89). Επίσης, η παρατεταμένη έκθεση πρωτογενών μακροφάγων χοίρου και κυττάρων λιπώδους ιστού σε υψηλά επίπεδα αδιπνονεκτίνης εμποδίζει την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτη ενεργοποίηση του NFκB (55, 57). Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι διάφορα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα επάγουν την ανοχή των μακροφάγων είτε στο επίπεδο των υποδοχέων τους, είτε επηρεάζουν μόρια που βρίσκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που αυτά πυροδοτούν.

3.5.1. Η gAd ελαττώνει την έκφραση του υποδοχέα TLR3 ενδοκυτταρικά, αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα TLR4 στην επιφάνεια των THP-1 μακροφάγων

Για να μελετήσουμε την επίδραση της gAd στην έκφραση των υποδοχέων TLR3 και TLR4 επώασαμε THP-1 μακροφάγα με gAd (1 µg/ml και 10 µg/ml), Poly (I:C) (100 µg/ml) και LPS (100 ng/ml), για 24 hrs. Στη συνέχεια, έγινε χρώση των κυττάρων με anti-human TLR3-PE-conjugated και anti-human TLR4-PE-conjugated αντισώματα και η έκφραση των υποδοχέων TLR3 και TLR4 μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8A, η gAd ελάττωσε την έκφραση του υποδοχέα TLR3 στα THP-1 μακροφάγα, ενώ στην εικόνα 8B φαίνεται ότι η gAd δεν επηρέασε την έκφραση του υποδοχέα TLR4.



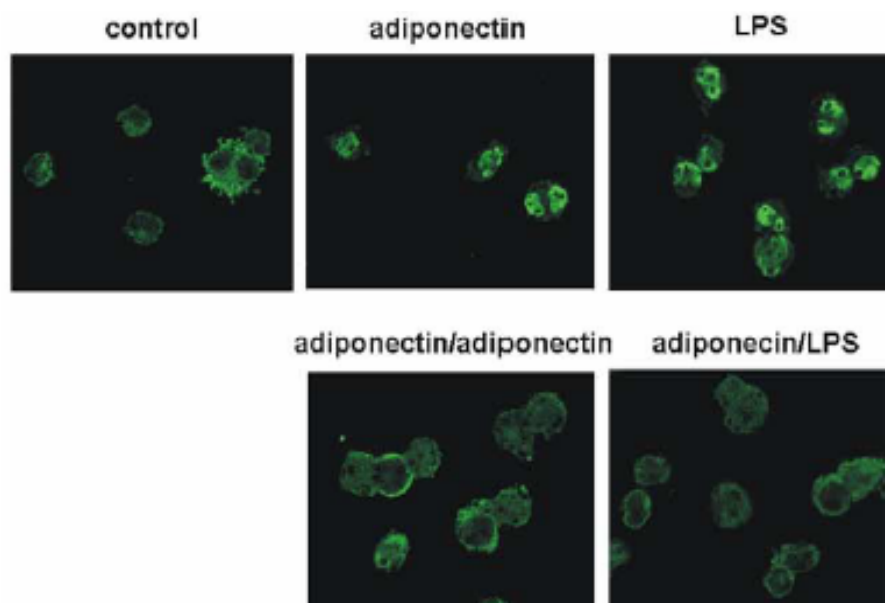
Εικ. 8. (Α) Η gAd ελαττώνει την έκφραση του υποδοχέα **TLR3** στα **THP-1** μακροφάγα. THP-1 μακροφάγα επώασθησαν με gAd (1 µg/ml και 10 µg/ml) και Poly (I:C) (100 µg/ml), για 24 hrs. Έγινε χρώση με anti-human TLR3-PE-conjugated αντίσωμα και η έκφραση του TLR3 μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. **(Β)** Η gAd δεν επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα **TLR4** στα **THP-1** μακροφάγα. THP-1 μακροφάγα επώασθησαν με gAd (1 µg/ml και 10 µg/ml) και LPS (100 ng/ml), για 24 hrs. Έγινε χρώση με anti-human TLR4-PE-conjugated αντίσωμα και η έκφραση του TLR4 μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα.

3.5.2. Η παρατεταμένη έκθεση των THP-1 μακροφάγων σε gAd εμποδίζει την επαγόμενη από gAd και LPS ενεργοποίηση του NFκB

Σύμφωνα με δημοσιευμένες αναφορές, διαφορετικές ολιγομερικές μορφές της αδιπονεκτίνης, όπως είναι τα HMW ολιγομερή και τα εξαμερή αδιπονεκτίνης, επάγουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, σε C2C12 μυοκύτταρα (21, 22). Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και προσταγλανδίνων από κύτταρα ανθρώπινου πλακούντα και κύτταρα του μητρικού λιπώδους ιστού, μέσω της ενεργοποίησης του NFκB (59). Ενώ η αδιπονεκτίνη επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα κύτταρα αυτά, μέσω ενεργοποίησης του NFκB, η παρατεταμένη έκθεση πρωτογενών μακροφάγων χοίρου και κυττάρων λιπώδους ιστού σε υψηλά επίπεδα της ορμόνης εμποδίζει την επαγόμενη από LPS ενεργοποίηση του NFκB (55, 57).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, αναφέρουμε ότι και στα THP-1 μακροφάγα η gAd επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (Εικ. 9, πάνω σειρά φωτογραφιών) και κατ' επέκταση την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από

αυτά. Επιπλέον, η προ-επώαση των κυττάρων με 10 µg/ml gAd, για 24 hrs εμπόδισε την επαγόμενη από gAd και LPS ενεργοποίηση του NFκB (Εικ. 9, κάτω σειρά φωτογραφιών).



Εικ. 9. Η παρατεταμένη έκθεση των **THP-1 μακροφάγων** σε gAd εμποδίζει την επαγόμενη από gAd και LPS ενεργοποίηση του NFκB. (**Πάνω σειρά**) THP-1 μακροφάγα επώασθησαν με 10 µg/ml gAd και 100 ng/ml LPS, για 45 min. (**Κάτω σειρά**) THP-1 μακροφάγα, αφού προ-επώασθησαν με 10 µg/ml gAd, για 24 hrs, εκτέθηκαν σε 10 µg/ml gAd και 100 ng/ml LPS, για 45 min. Η ενεργοποίηση της υπομονάδας p65 (RelA) του NFκB μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα.

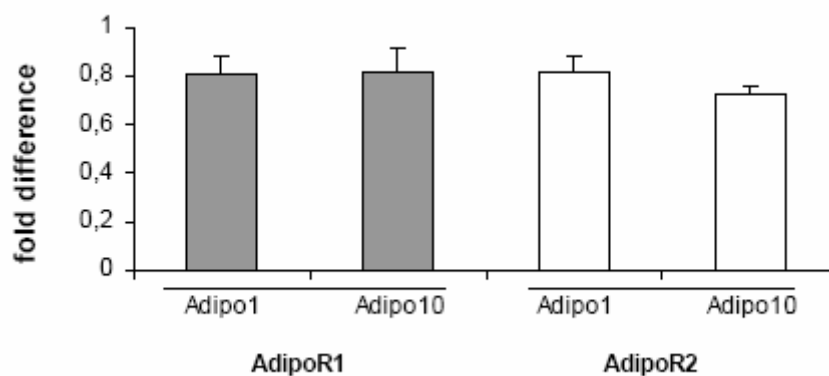
Φαίνεται, λοιπόν, από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η απευαισθητοποίηση των μακροφάγων και η επαγωγή ανοχής σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα μετά από παρατεταμένη έκθεση σε gAd προκαλείται από αλλαγές στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος, που πυροδοτείται από την gAd και καταλήγει στην ενεργοποίηση του NFκB, και όχι από αλλαγές στο επίπεδο των υποδοχέων.

3.6. Ρύθμιση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2

3.6.1. Η gAd δεν επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων της AdipoR1 και AdipoR2 στα THP-1 μακροφάγα

Για να μελετήσουμε την επίδραση της gAd στην έκφραση των υποδοχέων της AdipoR1 και AdipoR2, επώασαμε THP-1 μακροφάγα με 1 µg/ml gAd και 10 µg/ml

gAd, για 24 hrs. Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση ολικού RNA και Real time-PCR για την ενίσχυση των AdipoR1 και AdipoR2 αλληλουχιών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, η αδιπονεκτίνη δεν επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων της στα THP-1 μακροφάγα, όταν αυτά εκθέτονται είτε σε χαμηλές, είτε σε υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης.



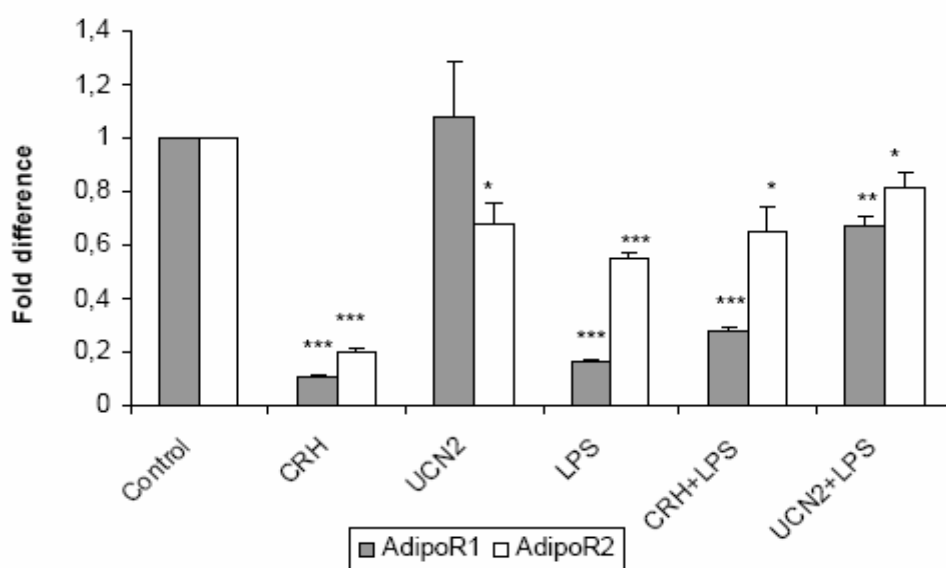
Εικ. 10. Η gAd δεν επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων της στα **THP-1 μακροφάγα**. THP-1 μακροφάγα επώασθησαν με 1 $\mu\text{g/ml}$ gAd και 10 $\mu\text{g/ml}$ gAd, για 24 hrs. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα.

3.6.2. Επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH (CRH, UCN2) στην έκφραση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2 στην κυτταρική σειρά THP-1

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH (CRH, Urocortins) εκκρίνονται περιφερικά από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων και από επιθηλιακά κύτταρα σε περιοχές φλεγμονής, επηρεάζοντας κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που έχουν επιστρατευτεί στις περιοχές αυτές (76, 77). Τα CRH πεπτίδια που εκκρίνονται περιφερικά έχουν προ-φλεγμονώδη δράση (76, 77), καθώς επάγουν την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (72, 80).

Από τη στιγμή που τα CRH πεπτίδια και η αδιπονεκτίνη αποτελούν μόρια τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, επηρεάζοντας τη λειτουργία των μακροφάγων, μελετήσαμε την επίδραση των νευροπεπτιδίων CRH και UCN2 στη ρύθμιση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 στην κυτταρική σειρά THP-1. THP-1 μονοκύτταρα επώασθησαν με CRH (10^{-4} M), UCN2 (10^{-4} M) και LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), για 24 hrs και ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA και Real time-PCR για την ενίσχυση των AdipoR1 και AdipoR2 αλληλουχιών.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, ο CRH, ο LPS και οι συνδυασμοί των νευροπεπτιδίων με LPS ελάττωσαν σημαντικά τα επίπεδα των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης, ενώ η UCN2 επηρέασε σημαντικά μόνο την έκφραση του AdipoR2. Τα παρακάτω αποτελέσματα αφορούν σε ένα αρχικό πείραμα, οπότε είναι απαραίτητη η επανάληψή του σε THP-1 μονοκύτταρα, καθώς και σε διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα και η περαιτέρω διερεύνηση, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



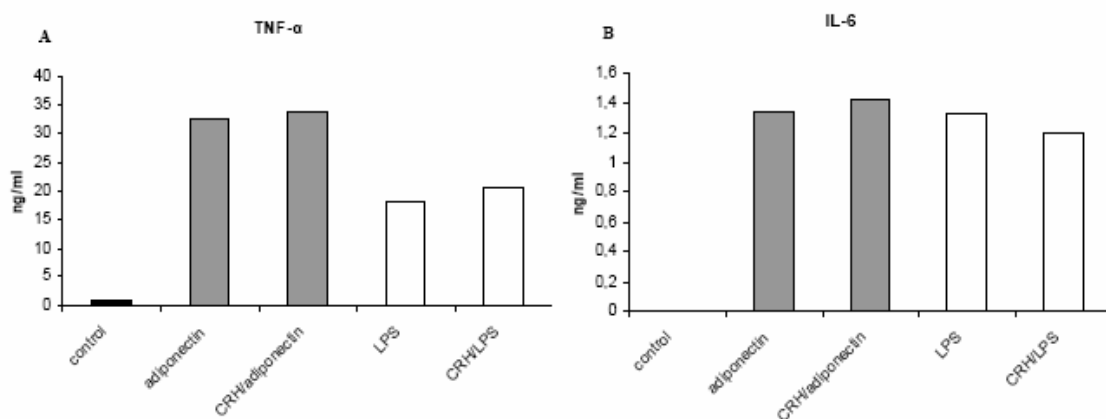
Εικ. 11. Επίδραση των νευροπεπτιδίων CRH, UCN2 και του LPS στην έκφραση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2 σε **THP-1 μονοκύτταρα**. Τα αποτελέσματα αφορούν σε ένα πείραμα (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$ δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σύγκριση με το μάρτυρα).

3.7. Επίδραση του CRH στην επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα

Φαίνεται ότι τα CRH πεπτίδια επηρεάζουν την έκφραση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης, συνεπώς είναι πιθανό να επηρεάζουν την επαγόμενη από την gAd έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα. Αναμένουμε ότι η έκκριση TNF α και IL6 από τα THP-1 μακροφάγα θα είναι σημαντικά μειωμένη, από τη στιγμή που έχουμε ενδείξεις ότι ο CRH ελαττώνει την έκφραση των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 (Εικ. 11).

Για να μελετήσουμε την επίδραση του CRH στην επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από THP-1 μακροφάγα, κύτταρα

επωάστηκαν αρχικά με CRH (10^{-4} M), για 24 hrs και στη συνέχεια έγινε επίδραση με gAd (10 μ g/ml) και LPS (100 ng/ml), για ακόμα 24 hrs. Οι κυτοκίνες TNF α και IL6 μετρήθηκαν στο υπερκείμενο της καλλιέργειας μετά τις επιδράσεις (Εικ. 12A και 12B).



Εικ. 12. Επίδραση του CRH στην επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από **THP-1 μακροφάγα**. Οι κυτοκίνες TNF α (A) και IL6 (B) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα αφορούν σε ένα πείραμα.

Παρατηρούμε ότι η προ-επώαση με CRH για 24 hrs δεν επηρέασε την επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση TNF α και IL6, παρόλο που αναμενόταν ότι τα επίπεδα των κυτοκινών θα ήταν χαμηλότερα, σε σύγκριση με τα επίπεδα κυτοκινών που επάγουν τα gAd και LPS μόνα τους. Τα αποτελέσματα αυτά απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της ορμόνης των λιποκυττάρων αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα. Η αδιπονεκτίνη απαντάται στο πλάσμα ανθρώπων με φυσιολογικό BMI στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με οποιαδήποτε άλλη ορμόνη (7-10, 23, 24). Σε αντίθεση με όλα τα γνωστά μέχρι σήμερα εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού, των οποίων η έκφραση και η συγκέντρωση στο πλάσμα αυξάνονται σημαντικά στην παχυσαρκία, η έκφραση και η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης ελαττώνονται σημαντικά (23, 32, 33). Παρόλο που τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι χαμηλά σε παχύσαρκα άτομα, βρέθηκε ότι η απώλεια βάρους ενισχύει την έκκριση της αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα (32, 34).

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης σχετίζονται με αρκετούς καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες κινδύνου για το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, όπως είναι τα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, ολικής και LDL-χοληστερόλης, η υπέρταση και ο αθηρωματικός δείκτης (34, 36, 37). Επίσης, φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ χαμηλών συγκεντρώσεων αδιπονεκτίνης και ανάπτυξης του μεταβολικού συνδρόμου, στο οποίο περιλαμβάνονται η αντίσταση στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία, η υπερτριγλυκεριδαίμια, η υπέρταση, η αθηρωμάτωση και τα χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης (33, 34, 38, 39). Επιπλέον, η χρόνια, χαμηλού βαθμού, συστηματική φλεγμονή, που αναπτύσσεται στην παχυσαρκία και δημιουργεί τις προϋποθέσεις για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, φαίνεται να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης (6, 90). Στο γεγονός αυτό συνηγορούν και άλλες μελέτες, στις οποίες αναφέρεται ότι, σε παχύσαρκα άτομα, η συγκέντρωση αδιπονεκτίνης σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση δεικτών συστηματικής φλεγμονής (91-94).

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες, που αφορούν στην προστατευτική αντι-φλεγμονώδη και αντι-αθηρωματική δράση των υψηλών επιπέδων αδιπονεκτίνης, υποστηρίζουν ότι η αδιπονεκτίνη δρα προστατευτικά, κυρίως, μέσω της καταστολής της δραστηριότητας των μακροφάγων, τα οποία είναι η κύρια πηγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (5, 18, 45-51). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η αδιπονεκτίνη καταστέλλει την επαγόμενη από LPS έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών TNF α και IL6 από τα μακροφάγα, ενώ επάγει την έκκριση αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL10 (49, 55, 56).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι, στις παραπάνω μελέτες, η καταστολή που προκαλεί η αδιπονεκτίνη στην έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών

από τα μακροφάγα και συνιστά την αντι-φλεγμονώδη δράση της, λαμβάνει χώρα μετά από παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε υψηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις της ορμόνης που απαντώνται στο πλάσμα των ατόμων με φυσιολογικό BMI. Ακόλουθα, τα μακροφάγα διεγείρονται με προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα και γίνεται η εκτίμηση της έκκρισης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (49, 55). Όταν τα μακροφάγα προ-επωάζονται με χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις της ορμόνης, που απαντώνται στο πλάσμα παχύσαρκων ατόμων, και ακόλουθα διεγείρονται με προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, η αδιπονεκτίνη δε δρα προστατευτικά, αφού δεν καταστέλλεται η έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα (55). Στις μέχρι σήμερα δημοσιευμένες αναφορές δεν υπήρχαν πληροφορίες για την άμεση επίδραση της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα και για την επαγωγή της έκκρισης TNFα και IL6 από αυτά.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι φαίνεται να υπάρχει αμφίδρομη σχέση μεταξύ της αδιπονεκτίνης και των μακροφάγων. Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι το ένζυμο ελαστάση, που εκκρίνεται από μονοκύτταρα και μακροφάγα, είναι υπεύθυνο για την πρωτεολυτική διάσπαση της αδιπονεκτίνης και τη δημιουργία του σφαιρικού θραύσματος του μορίου (gAd) (14). Προτείνεται, λοιπόν, ότι σε περιοχές φλεγμονής, όπου γίνεται επιστράτευση μονοκυττάρων και μακροφάγων, γίνεται πρωτεολυτική διάσπαση της αδιπονεκτίνης του πλάσματος, από την ελαστάση που εκκρίνεται στο μικροπεριβάλλον της φλεγμονής, και δημιουργία του σφαιρικού θραύσματος της αδιπονεκτίνης (gAd). Στη συνέχεια, η gAd επιδρά στα μακροφάγα, ασκώντας αντι-φλεγμονώδη δράση (14). Επομένως, είναι πιθανό οι επιδράσεις της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα, που αναφέρθηκαν παραπάνω, να μεσολαβούνται από τη gAd (46, 49). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σφαιρικό θραύσμα του μορίου της αδιπονεκτίνης (gAd), για τη μελέτη της επίδρασής της στα μακροφάγα.

Στη συγκεκριμένη εργασία δείξαμε ότι η gAd επάγει ισχυρά την έκκριση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών TNFα και IL6, από THP-1 μακροφάγα και από πρωτογενή μακροφάγα ανθρώπου (Εικ. 1, 3, 4). Η επίδραση αυτή δεν οφειλόταν σε επιμόλυνση της gAd, που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας, με LPS, καθώς η επώαση THP-1 μακροφάγων με Polymyxin B sulfate, που δεσμεύει το λιποπολυσακχαρίτη, δεν επηρέασε την επαγόμενη από αδιπονεκτίνη έκκριση κυτοκινών, αλλά εμπόδισε τελείως την επαγόμενη από LPS έκκριση κυτοκινών (Εικ. 2). Η gAd που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανασυνδυασμένη και επομένως

παρασκευάστηκε σε βακτήρια (*E. coli*), από τα οποία υπήρχε η πιθανότητα να μεταφερθεί βακτηριακό LPS, παρά τις διαβεβαιώσεις της εταιρίας παρασκευής για το αντίθετο. Με το παραπάνω πείραμα επιβεβαιώνεται ότι η gAd δεν είχε επιμολυνθεί με LPS, λόγω του τρόπου παρασκευής της. Εκτός από τα αποτελέσματά μας, που δείχνουν την προ-φλεγμονώδη επίδραση της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα, σε μια πρόσφατη δημοσίευση αναφέρεται ότι η αδιπονεκτίνη επάγει την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL1 β , IL6, TNF α και της προσταγλανδίνης PGE2 από κύτταρα του πλακούντα και του μητρικού λιπώδους ιστού (59).

Για να εξηγηθεί το παράδοξο του πώς μια ορμόνη που φαίνεται να έχει ισχυρή προ-φλεγμονώδη δράση, καταλήγει να έχει προστατευτική δράση έναντι στη φλεγμονή και να θεωρείται σημαντικός αντι-φλεγμονώδης παράγοντας, προτείναμε ότι η παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε υψηλές δόσεις αδιπονεκτίνης είναι πιθανό να απευαισθητοποιεί τα μακροφάγα και να επάγει την ανοχή τους στην ίδια την ορμόνη και σε άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η αδιπονεκτίνη βρίσκεται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα από οποιαδήποτε άλλη, γνωστή μέχρι σήμερα, ορμόνη (7-10, 23, 24) και ότι η προ-επώαση μακροφάγων με χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης δεν έδρασε προστατευτικά στην επίδραση προ-φλεγμονωδών ερεθισμάτων (55), υποθέσαμε ότι η διατήρηση υψηλών επιπέδων αδιπονεκτίνης στο πλάσμα είναι πολύ σημαντική για την απευαισθητοποίηση των μακροφάγων και την προστατευτική της δράση, ενώ τα χαμηλά της επίπεδα στην παχυσαρκία δεν επάγουν την ανοχή των μακροφάγων, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα.

Πράγματι, η παρατεταμένη έκθεση THP-1 μακροφάγων και πρωτογενών μακροφάγων ανθρώπου και ποντικού σε 10 $\mu\text{g/ml}$ gAd και η ακόλουθη διέγερση με gAd και άλλα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως τα Poly (I:C) και LPS, οδήγησε στην απευαισθητοποίηση των μακροφάγων, η οποία μεταφράζεται σε σημαντικά ελαττωμένη έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά (Εικ. 3, 4, 5, 6). Αντίθετα, η προ-επώαση THP-1 μακροφάγων με 1 $\mu\text{g/ml}$ gAd και η ακόλουθη έκθεση των κυττάρων σε 10 $\mu\text{g/ml}$ της ορμόνης οδήγησε σε σημαντική έκκριση TNF α και IL6, σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν προ-επώαστεί με υψηλή συγκέντρωση gAd, αποκαλύπτοντας τη δυναμική της σαν προ-φλεγμονώδη παράγοντα (Εικ. 7). Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης, σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, δεν επάγουν την ανοχή των μακροφάγων, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό

των παχύσαρκων ατόμων (31, 38, 53), με αποτέλεσμα τη χαρακτηριστική χρόνια, χαμηλού βαθμού, συστηματική φλεγμονή που αναπτύσσεται στην κατάσταση αυτή (6, 90).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η παρατεταμένη έκθεση των μακροφάγων σε υψηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης επάγει την ανοχή τους στη δράση της ίδιας και στη δράση άλλων προ-φλεγμονωδών παραγόντων, ενώ αυτό δε συμβαίνει όταν τα μακροφάγα εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης. Η πρώτη περίπτωση αντιστοιχεί στην επίδραση της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα των ατόμων με φυσιολογικό BMI, οι οποίοι έχουν υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα, ενώ η δεύτερη περίπτωση αντιστοιχεί στην επίδραση της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα των παχύσαρκων ατόμων, οι οποίοι έχουν χαμηλά επίπεδα της ορμόνης. Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι η απώλεια βάρους ενισχύει την έκκριση αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα (32, 34). Επομένως, είναι πιθανό η απότομη απώλεια βάρους, από ένα παχύσαρκο άτομο, να οδηγήσει σε αυξημένες συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης, εκθέτοντας τα μη απευαισθητοποιημένα μακροφάγα του οργανισμού αυτού στην επιβλαβή προ-φλεγμονώδη δράση της. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να μελετηθεί η επίδραση που είναι πιθανό να έχουν οι αυστηρές δίαιτες στα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και των πρωτεϊνών οξείας φάσης στο πλάσμα των ατόμων που τις ακολουθούν.

Επίσης, έχει προταθεί η χορήγηση αδιπονεκτίνης ή η επαγωγή της έκφρασής της για την αποκατάσταση των υψηλών επιπέδων της στο πλάσμα, σε παχύσαρκα άτομα, σα στρατηγική για την αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου (2, 12). Μάλιστα, έχει δημοσιευτεί ένας αριθμός εργασιών, στις οποίες αναφέρεται ότι η χορήγηση αδιπονεκτίνης σε πειραματικά μοντέλα παχυσαρκίας και T1DM βελτίωσε σημαντικά την αντίσταση στην ινσουλίνη (13, 27, 44). Η δράση αυτή της αδιπονεκτίνης φαίνεται να μεσολαβείται από τους υποδοχείς της ορμόνης AdipoR1 και AdipoR2 στο ήπαρ και στο σκελετικό μυ (2), όπου η αδιπονεκτίνη ενεργοποιεί την κινάση AMPK και επάγει τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και την πρόσληψη της γλυκόζης, ασκώντας αντι-διαβητική δράση (2, 27, 52). Αναφέρεται ότι στο ήπαρ επιδρά μόνο το πλήρες μόριο της αδιπονεκτίνης, ενώ ότι στο μυ επιδρούν το σφαιρικό θραύσμα και το πλήρες μόριο της ορμόνης, επάγοντας την ενεργοποίηση της κινάσης AMPK (2). Επίσης, οι Tsao et al (2002, 2003) έδειξαν ότι τα τριμερή αδιπονεκτίνης και όχι άλλες ομο-πολυμερικές μορφές της ορμόνης, επάγουν την ενεργοποίηση της

κινάσης AMPK, στα C2C12 μυοκύτταρα (21, 22) και κατ' επέκταση την αντι-διαβητική της δράση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η χορήγηση αδιπονεκτίνης ή η επαγωγή της έκφρασής της σε παχύσαρκα άτομα, σε στρατηγική για την αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου, είναι πιθανό να θέσει σε κίνδυνο την υγεία των ατόμων μια και η χορηγούμενη αδιπονεκτίνη όταν βρεθεί στο μικροπεριβάλλον των μακροφάγων θα κοπεί πρωτεολυτικά και θα μετατραπεί σε gAd, οπότε είναι δυνατό να επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μη απευαισθητοποιημένα μακροφάγα, με όλες τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει μια έντονη φλεγμονώδης απόκριση. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η μελέτη της χορήγησης αδιπονεκτίνης σε πειραματικά μοντέλα παχυσαρκίας, καθώς και σε ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο της αδιπονεκτίνης (adiponectin $-/-$ mice) και η εκτίμηση της απόκρισης των μακροφάγων στην ορμόνη. Στην πρώτη περίπτωση, τα μακροφάγα των πειραματόζωων έχουν εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης, ενώ στη δεύτερη τα μακροφάγα δεν έχουν εκτεθεί ποτέ στην ορμόνη. Επομένως, η χορήγηση υψηλών δόσεων αδιπονεκτίνης στα παραπάνω μοντέλα και η εκτίμηση της φλεγμονώδους απόκρισης, θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη χρήση της αδιπονεκτίνης σε θεραπευτική προσέγγιση του μεταβολικού συνδρόμου.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφος 3.5.), η απευαισθητοποίηση των μακροφάγων και η επαγωγή ανοχής έναντι σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα είναι δυνατό να γίνει με διάφορους μηχανισμούς, ανάλογα με το ερέθισμα και την προέλευση των μακροφάγων. Διάφορα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα επάγουν την ανοχή των μακροφάγων είτε στο επίπεδο των υποδοχέων τους, είτε επηρεάζουν μόρια που βρίσκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που αυτά πυροδοτούν (55, 57, 88, 89).

Προκειμένου να μελετήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους η αδιπονεκτίνη επάγει την ανοχή των μακροφάγων στη δράση της ίδιας και στη δράση του Poly (I:C) και του LPS, επώασαμε THP-1 μακροφάγα με gAd και μετρήσαμε την έκφραση των υποδοχέων TLR3 και TLR4. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η gAd ελαττώνει σημαντικά την έκφραση του TLR3 υποδοχέα, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση του TLR4 (Εικ. 8). Είναι, λοιπόν, πιθανό η απευαισθητοποίηση των μακροφάγων στον αγωνιστή Poly (I:C), του υποδοχέα TLR3, να οφείλεται στην επαγόμενη από αδιπονεκτίνη ελάττωση της έκφρασής του.

Επιπρόσθετα, η βραχύχρονη επίδραση της gAd σε THP-1 μακροφάγα ενεργοποίησε το μεταγραφικό παράγοντα NFκB και κατ' επέκταση την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από αυτά, ενώ η παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων σε gAd και η ακόλουθη διέγερση με την ορμόνη και LPS αναίρεσε την ικανότητά της να ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα (Εικ. 9).

Επίσης, η gAd δεν επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων της στα THP-1 μακροφάγα, όταν αυτά εκθέτονται είτε σε χαμηλές, είτε σε υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης (Εικ. 10).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η απευαισθητοποίηση των μακροφάγων και η επαγωγή ανοχής σε προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, μετά από παρατεταμένη έκθεση σε gAd, προκαλείται από αλλαγές στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος, που πυροδοτείται από την ορμόνη και καταλήγει στην ενεργοποίηση του NFκB, και όχι από αλλαγές στο επίπεδο των υποδοχέων. Φυσικά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για το χαρακτηρισμό των μορίων που είναι πιθανό να συνδέονται με τους υποδοχείς της αδιπονεκτίνης και των μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος και να μελετηθούν αλλαγές στην κατάσταση ενεργοποίησής τους, που είναι πιθανό να προκαλούνται από την παρατεταμένη έκθεση στην ορμόνη. Έχει δημοσιευθεί ότι η προ-επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με αδιπονεκτίνη, οδήγησε στη σύνθεση cAMP, το οποίο εμπόδισε την επαγόμενη από TNFα ενεργοποίηση του NFκB (45). Το γεγονός ότι η αδιπονεκτίνη οδηγεί στη σύνθεση cAMP μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι οι υποδοχείς της AdipoR1 και AdipoR2 είναι πιθανό να συνδέονται με G πρωτεΐνες. Επίσης, άλλα μόρια, εκτός το cAMP, που είναι πιθανό να συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος της αδιπονεκτίνης στα μακροφάγα, με βάση την πληροφορία αυτή, είναι οι κινάσες PKA και PKC.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, επίσης, η επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στη ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2 στα μακροφάγα και στην επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH (CRH, Urocortins) εντοπίζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης (67-71). Τα επίπεδα του CRH, που εντοπίζεται περιφερικά, είναι πολύ χαμηλά σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι διεγερμένο (72), ενώ έχει βρεθεί ότι σε περιοχές φλεγμονής επάγεται η σύνθεση και η έκκριση CRH και ουροκορτίνης, ενισχύοντας το φαινόμενο

(73-75). Κατά τη φλεγμονώδη απόκριση, λοιπόν, τα νευροπεπτίδια απελευθερώνονται τοπικά από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων, από επιθηλιακά κύτταρα και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, επάγοντας την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα (72, 80).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι παράγοντες CRH και UCN2, καθώς και άλλα ισχυρά προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως ο LPS, ελάττωσαν σημαντικά την έκφραση των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης, σε THP-1 μονοκύτταρα (Εικ. 11). Η πιο σημαντική μείωση της έκφρασης των υποδοχέων προκλήθηκε από τον παράγοντες CRH και LPS. Είναι, λοιπόν, πιθανό σε περιοχές φλεγμονής, όπου έχουμε επαγωγή της έκκρισης των CRH νευροπεπτιδίων, οι παράγοντες αυτοί να ελαττώνουν την απόκριση των μονοκυττάρων/μακροφάγων στην αδιπονεκτίνη, προάγοντας την ανοχή των κυττάρων αυτών στη δράση της ορμόνης. Ακόλουθα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, είναι αναμενόμενο ότι η προ-επώαση μακροφάγων με CRH θα προκαλέσει μείωση της έκφρασης των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης, άρα και την καταστολή της επαγόμενης από gAd έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, από τα μακροφάγα. Παρόλα αυτά, η προ-επώαση THP-1 μακροφάγων με CRH δεν επηρέασε την επαγόμενη από gAd και LPS έκκριση TNF α και IL6 (Εικ. 12), ενώ αναμενόταν ότι τα επίπεδα των κυτοκινών θα ήταν χαμηλότερα, σε σύγκριση με αυτά που επάγουν η gAd και ο LPS μόνα τους. Τα αποτελέσματα αυτά, λοιπόν, απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη, η οποία επάγει ισχυρά την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα. Οι αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες του μορίου φαίνεται να οφείλονται στην επαγωγή ανοχής των μακροφάγων, μετά από παρατεταμένη έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης, οπότε η ορμόνη δρα προστατευτικά έναντι στη διέγερση των μακροφάγων με την ίδια και με άλλα ισχυρά προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. Χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης δεν απευαισθητοποιούν τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα η ακόλουθη έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης να επάγει την έκκριση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, αποκαλύπτοντας τη δυναμική της σα προ-φλεγμονώδη παράγοντα.

5. Βιβλιογραφία

1. **Beltowski J** 2003 Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 9:RA55-61
2. **Kadowaki T, Yamauchi T** 2005 Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-51
3. **Trayhurn P, Wood IS** 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-55
4. **Trayhurn P, Beattie JH** 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-39
5. **Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, et al.** 1999 Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 38:202-6
6. **Fantuzzi G** 2005 Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911-9; quiz 920
7. **Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K** 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286-9
8. **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF** 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-9
9. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM** 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-703
10. **Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M** 1996 Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120:803-12
11. **Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al.** 2000 Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:861-8
12. **Diez JJ, Iglesias P** 2003 The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300
13. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al.** 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-10
14. **Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al.** 2005 Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146:790-6
15. **Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, Iwamoto Y** 2005 Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochem Biophys Res Commun* 333:79-87
16. **Xi W, Satoh H, Kase H, Suzuki K, Hattori Y** 2005 Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun* 332:200-5
17. **Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ** 2004 Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 315:264-71
18. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al.** 2003 Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278:2461-8

19. **Waki H, Yamauchi T, Kamon J, et al.** 2003 Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278:40352-63
20. **Pajvani UB, Du X, Combs TP, et al.** 2003 Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278:9073-85
21. **Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF** 2002 Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 277:29359-62
22. **Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, et al.** 2003 Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 278:50810-7
23. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al.** 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
24. **Shimada K, Miyazaki T, Daida H** 2004 Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta* 344:1-12
25. **Gavrila A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS** 2003 Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2838-43
26. **Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** 2002 Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1084-9
27. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al.** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-6
28. **Moore GB, Chapman H, Holder JC, et al.** 2001 Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 286:735-41
29. **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al.** 2001 PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094-9
30. **Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, et al.** 2003 Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655-63
31. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91
32. **Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, et al.** 2001 Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-9
33. **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al.** 2001 Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-5
34. **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al.** 2000 Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-9

35. **Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM** 2002 Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J* 367:677-85
36. **Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, et al.** 2002 Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103:137-42
37. **Matsubara M, Maruoka S, Katayose S** 2002 Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2764-9
38. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al.** 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-30
39. **Trujillo ME, Scherer PE** 2005 Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257:167-75
40. **Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, et al.** 2000 Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14478-83
41. **Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, et al.** 2002 A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51:2306-12
42. **Vasseur F, Helbecque N, Dina C, et al.** 2002 Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 11:2607-14
43. **Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, et al.** 2002 Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51:2325-8
44. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE** 2001 The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947-53
45. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al.** 2000 Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296-301
46. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al.** 1999 Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-6
47. **Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al.** 2002 Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106:2767-70
48. **Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al.** 2004 Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 40:177-84
49. **Yokota T, Oritani K, Takahashi I, et al.** 2000 Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96:1723-32
50. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al.** 2002 Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and

- regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105:2893-8
51. **Kumada M, Kihara S, Ouchi N, et al.** 2004 Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109:2046-9
 52. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al.** 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-95
 53. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-808
 54. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al.** 2001 Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-63
 55. **Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME** 2004 Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 316:924-9
 56. **Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H** 2004 Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 323:630-5
 57. **Ajuwon KM, Spurlock ME** 2005 Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1220-5
 58. **Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, et al.** 2005 Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1254-63
 59. **Lappas M, Permezel M, Rice GE** 2005 Leptin and Adiponectin Stimulate the Release of Pro-Inflammatory Cytokines and Prostaglandins from Human Placenta and Maternal Adipose Tissue via NF- κ B, PPAR- γ and ERK 1/2. *Endocrinology*
 60. **Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al.** 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-9
 61. **Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M** 2003 Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1118-22
 62. **Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B** 2004 Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 314:151-8
 63. **Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J** 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-7
 64. **Harris GW** 1951 Neural control of the pituitary gland. II. The adenohypophysis, with special reference to the secretion of A.C.T.H. *Br Med J* 4732:627-34
 65. **Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, et al.** 1996 Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 137:3896

66. **Lewis K, Li C, Perrin MH, et al.** 2001 Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7570-5
67. **Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL** 1990 Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun* 4:67-73
68. **Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E** 1993 Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7104-8
69. **Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al.** 1995 Local expression of corticotropin-releasing hormone in inflammatory arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 771:459-71
70. **Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergun S, Beil FU, Schulte HM** 1998 Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 83:708-11
71. **Baigent SM, Lowry PJ** 2000 mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 25:43-52
72. **Baigent SM** 2001 Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809-20
73. **van Tol EA, Petrusz P, Lund PK, Yamauchi M, Sartor RB** 1996 Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 39:385-92
74. **Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP** 1991 Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421-3
75. **McGillis JP, Park A, Rubin-Fletcher P, Turck C, Dallman MF, Payan DG** 1989 Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci Res* 23:346-52
76. **Elenkov IJ, Chrousos GP** 1999 Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* 10:359-368
77. **Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP** 1998 Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840:21-32
78. **Chen C, Dagnino R, Jr., De Souza EB, et al.** 1996 Design and synthesis of a series of non-peptide high-affinity human corticotropin-releasing factor1 receptor antagonists. *J Med Chem* 39:4358-60
79. **Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW** 2002 Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22:991-1001
80. **Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN** 2002 Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 70:6068-74
81. **Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K** 1980 Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171-6
82. **Christoforidou AV, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C** 2004 Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. *Mol Cancer* 3:34

83. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
84. **Berthier F, Lambert C, Genin C, Bienvenu J** 1999 Evaluation of an automated immunoassay method for cytokine measurement using the Immulite Immunoassay system. *Clin Chem Lab Med* 37:593-9
85. **Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN** 2002 Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:12280-7
86. **Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, et al.** 2004 Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8209-14
87. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-56
88. **Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al.** 2000 Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164:3476-9
89. **Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN** 2000 Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 164:5564-74
90. **Berg AH, Scherer PE** 2005 Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939-49
91. **Goldstein BJ, Scalia R** 2004 Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2563-8
92. **Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, et al.** 2005 Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation* 111:747-53
93. **Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al.** 2003 Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 107:671-4
94. **Xydakis AM, Case CC, Jones PH, et al.** 2004 Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2697-703

6. Παράρτημα