

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF SCIENCES OF HEALTH
SCHOOL OF MEDICINE



Effect of Nerve Growth Factor and synthetic neurosteroids on the phenotype of adipocytes

ΠΜΣ

“Εγκέφαλος και Νους”

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιατρική Σχολή

Δεικτάκης Μιχαήλ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Βενυχάκη Μαρία

Χαραλαμπόπουλος Ιωάννης

Μαργιωρής Ανδρέας

Επιβλέπουσα Εργαστηρίου

Δερμιτζάκη Ειρήνη

Ηράκλειο, 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα μπορούσε να είχε πραγματοποιηθεί δίχως τη συμβολή της χημικού Δερμιτζάκη Ειρήνης (Ε.ΔΙ.Π., PhD), η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας και μου έδωσε την ευκαιρία να ανακαλύψω ένα νέο κόσμο γνώσης. Η εμπιστοσύνη που εμπνέει, η στήριξη που προσφέρει, οι πολύπλευρες γνώσεις που διαθέτει μαζί με μια ακόρεστη διάθεση για διδασκαλία και η θετική της στάση απέναντι στη ζωή είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά που την καθιστούν την επιβλέπουσα για την οποία είμαι ευγνώμων που είχα στη διάρκεια αυτού του ταξιδιού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Βενυχάκη Μαρία, για τον καθοριστικό της ρόλο στην υλοποίηση της διπλωματικής αυτής εργασίας, για το γεγονός ότι με δέχτηκε στην οικογένεια του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας, για τη στήριξη και τα πολύτιμα σχόλια καθ'όλη αυτή τη διάρκεια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας για την εγκάρδια υποδοχή και τη διαρκή προσφορά της εργαστηριακής τους εμπειρίας.

Ευχαριστώ πολύ τον Ομότιμο καθηγητή Μαργιωρή Ανδρέα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία, για την υποστήριξη κατά τη διάρκεια αυτής και για την ακόρεστη προσφορά του στη γνώση.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας και μέλος της Τριμελούς μου Επιτροπής, Χαραλαμπίδου Ιωάννη και τον καθηγητή Φαρμακολογίας Γραβάνη Αχιλλέα για τα πολύτιμα σχόλια και την εξειδικευμένη γνώση που προσέφεραν πάνω στο θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ανεξάντλητη στήριξη και πίστη τους σε εμένα.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	7
1.1 Λιπώδης ιστός	7
1.2 Λειτουργίες του λιπώδους ιστού που σχετίζονται με την ομοιοστασία της ενέργειας	8
1.3 Αλληλεπίδραση νευροστεροειδών στο μεταβολισμό	13
1.4 Λιπώδης ιστός και NGF	16
2. Σκοπός εργασίας.....	18
3. Υλικά και Μέθοδοι	19
4. Αποτελέσματα	28
4.1 Επίδραση του παράγοντα NGF στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων.....	28
4.2 Επίδραση του παράγοντα NGF στη μάζα των μιτοχονδρίων των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων	30
4.3 Επίδραση του παράγοντα NGF στις οξειδωτικές ρίζες των μιτοχονδρίων των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων	31
4.4 Επίδραση του παράγοντα NGF στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων	32
4.5 Επίδραση των νευροστεροειδών στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων.....	33
4.6 Επίδραση των νευροστεροειδών στον φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων	38
5. Συζήτηση	39
6. Συμπεράσματα.....	45
7. Βιβλιογραφία	47

Abstract

The adipose tissue is mainly responsible for energy homeostasis and secretes a variety of factors. Energy is stored by adipocytes in the form of lipids which are used in the event of energy demand. When caloric intake is greater than expenditure, adipocytes tend to become hypertrophic, which poses the threat of obesity and its co-morbidities. Cold exposure and exercise are some major positive regulators of metabolic function, contributing to the browning of white adipose tissue. Both the fact that neurotrophin receptors reside in the adipose tissue and the need for the development of a metabolically beneficial drug led us to test the effect of nerve growth factor (NGF) and a synthetic microneurotrophin devoid of steroid actions, BNN27, on the adipocyte function. Human white mature adipocytes and pre-adipocytes were isolated from tissue samples offered by volunteers undergoing surgery. In addition, when the aforementioned were not available, the 3T3L1 pre-adipocyte cell line was used. NGF increased mitochondrial respiration and glycolysis in 3T3L1 pre-adipocytes and reduced mitochondrial mass, ROS production and the number of intracellular lipids in human mature adipocytes whereas, BNN27 increased metabolic functions but had not any significant effect on the adipocyte lipids content. Overall, the above results indicate that these molecules may have a possible role on the regulation of the metabolic profile of adipocytes.

Key words: Adipocytes, nerve growth factor, neurosteroids, metabolic function, inflammatory phenotype.

Περίληψη

Ο λιπώδης ιστός έχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της ενεργειακής ομοιοστασίας. Στην βασική κυτταρική μονάδα του ιστού, τα λιποκύτταρα, αποθηκεύεται η μη χρησιμοποιούμενη ενέργεια σε μορφή λιπιδίων που απελευθερώνεται σε μεταγενέστερο χρόνο ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Πράγματι, στις περιπτώσεις που η θερμιδική πρόσληψη είναι μεγαλύτερη από την κατανάλωσή της, τα λευκά λιποκύτταρα τείνουν να γίνουν υπερτροφικά με αποτέλεσμα τη λήψη βάρους και την ανάπτυξη παχυσαρκίας και συνοδών διαταραχών. Η έκθεση στο ψύχος και η σωματική άσκηση είναι μερικοί από τους παράγοντες που έχουν θετική επίδραση στο μεταβολισμό ευνοώντας τη διαδικασία της φαιοποίησης του λευκού λιπώδους ιστού. Η παρατήρηση ότι υποδοχείς νευροτροφικών εντοπίζονται στο λιπώδη ιστό αλλά και η ανάγκη για τη σύνθεση ενός μορίου που θα βελτιώσει τη μεταβολική λειτουργία, οδήγησαν στην εξέταση της επίδρασης του παράγοντα NGF και της συνθετικής μικρονευροτροφίνης χωρίς στεροειδικές δράσεις, BDNF, στο μεταβολισμό. Απομονώθηκαν λευκά λιποκύτταρα και προ-λιποκύτταρα από δείγματα λιπώδους ιστού εθελοντών και χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά 3T3L1. Ο παράγοντας NGF αύξησε την μιτοχονδριακή αναπνοή και την γλυκόλυση στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 και μείωσε την μιτοχονδριακή μάζα, τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών και τον αριθμό των λιπιδίων στα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα, ενώ η μικρονευροτροφίνη BDNF αύξησε τη μεταβολική λειτουργία αλλά δεν επηρέασε τον αριθμό των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Συνολικά, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι τα προαναφερθέντα μόρια φαίνεται να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων.

Λέξεις-κλειδιά: Λιποκύτταρα, αυξητικός παράγοντας των νεύρων, νευροστεροειδή, μεταβολική λειτουργία, φλεγμονώδης φαινότυπος.

Σύντομογραφίες

ATP: Adenosine Triphosphate

BNN27: 17 α ,20R-epoxy pregn-5-ene-3 β ,21-diol

C/EBP: CCAAT-enhancer-binding protein

cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate

CREB: cAMP response element-binding protein

CT PET-SCAN: Positron Emission Tomography/ Computed Tomography

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DIO2: Type 2 iodothyronine deiodinase

GLUT-4: Glucose transporter 4

IL6: Interleukin 6

LPS: Lipopolysaccharide

NGF: Nerve Growth Factor

p38 MAP: p38 mitogen-activated protein kinase

p75: pan-neurotrophin receptor 75

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha

PKA: Protein kinase A

PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ

PRDM16: PR domain zinc finger protein 16

T3: Triiodothyronine

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A

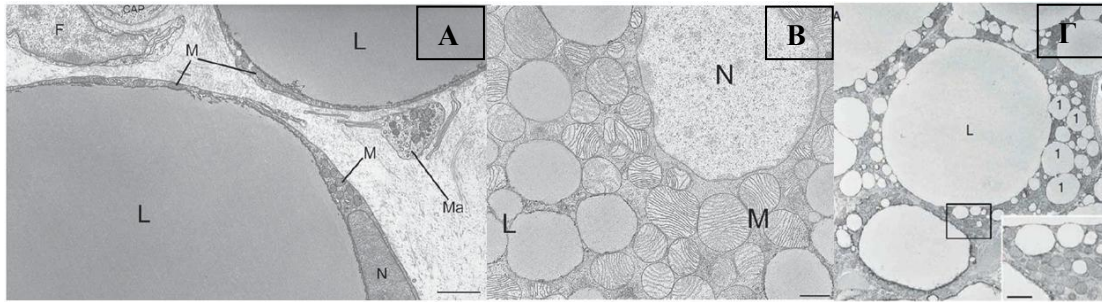
UCP1: Uncoupling protein 1

1. Εισαγωγή

1.1 Λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός είναι ο βασικός ρυθμιστής της ομοιοστασίας της ενέργειας αφού αποθηκεύει/απελευθερώνει ενέργεια ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού και εκκρίνει πληθώρα ουσιών ασκώντας άμεση επίδραση στο μεταβολισμό (Tsiloulis and Watt, 2015; Rajala and Scherer, 2003; Kershaw and Flier, 2004). Το όργανο αυτό εντοπίζεται σε υποδόριες και σε σπλαχνικές περιοχές του σώματος. Συσσώρευση λιπώδους ιστού παρατηρείται στην περιοχή του προσώπου, στους γλουτούς, στην ενδοκοιλιακή χώρα, γύρω από τα όργανα, στο περιτόνεο κ.α. (Cinti, 2001). Ο λιπώδης ιστός χαρακτηρίζεται από έντονη κυτταρική ετερογένεια καθώς εκτός από τη βασική του λειτουργική μονάδα, τα λιποκύτταρα, αποτελείται επίσης από προ-λιποκύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ινοβλάστες (Tchkonina et al., 2013; Ibrahim, 2010).

Ο λιπώδης ιστός χωρίζεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το είδος των λιποκυττάρων που περιέχει: τον λευκό λιπώδη ιστό και τον φαιό λιπώδη ιστό. Ανατομικά, ο λευκός λιπώδης ιστός εντοπίζεται κυρίως σε υποδόριες περιοχές και ενδοκοιλιακά και χαρακτηρίζεται από ελάχιστη νεύρωση και αιμάτωση (Giordano et al., 2014). Ο χαρακτηρισμός «λευκός λιπώδης ιστός» οφείλει το όνομα του στα λιποκύτταρα που τον απαρτίζουν, τα **λευκά λιποκύτταρα**. Μορφολογικά, τα κύτταρα αυτά περιέχουν μια μεγάλη σταγόνα λιπιδίου που καταλαμβάνει περισσότερο από το 90% του συνολικού τους όγκου. Επιπλέον, τα οργανίδια στο κυτταρόπλασμα τους εντοπίζονται συμπιεσμένα στην άκρη του κυττάρου ενώ χαρακτηρίζονται από ελάχιστα μιτοχόνδρια (Giordano et al., 2014; Cinti, 2001). Από την άλλη μεριά, ο φαιός λιπώδης ιστός εντοπίζεται σε αυχενικές, παρασπονδύλιες και υπερκλείδιες περιοχές και γύρω από τα νεφρά (Cypess et al., 2009). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του φαιού λιπώδους ιστού είναι πως στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, η παρουσία και η λειτουργία αυτού του είδους ιστού είναι έντονη στα νεογνά και στα παιδιά αλλά χάνεται με την αύξηση της ηλικίας. Ο φαιός λιπώδης ιστός απαρτίζεται από τα **φαιά λιποκύτταρα** τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα λευκά, διαθέτουν μικρές, διάχυτες σταγόνες λιπιδίων ενώ έχουν ένα πλήρως αναπτυγμένο κυτταρόπλασμα με χαρακτηριστική παρουσία πολλών μιτοχονδρίων. Επίσης, δέχεται έντονη αιμάτωση και νεύρωση από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα (Schoettl, Fischer and Ussar, 2018; Giordano et al., 2014; Cinti, 2001). Ένα σημαντικό εύρημα των τελευταίων χρόνων αφορά στην ανακάλυψη ενός τρίτου είδους λιποκυττάρων που εντοπίζεται σε διαμερίσματα του λευκού λιπώδους ιστού. Ανάλυση της μορφολογίας και της λειτουργίας αυτών των κυττάρων έχει δείξει ότι ενώ εντοπίζονται στο λευκό λιπώδη ιστό, μορφολογικά ομοιάζουν στα φαιά λιποκύτταρα καθώς είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα λευκά, έχουν διάχυτες σταγόνες λιπιδίων και εκφράζουν λειτουργικά μιτοχόνδρια. Τα κύτταρα αυτά έχουν ονομαστεί **μπεζ λιποκύτταρα** διότι εντοπίζονται στο λευκό λιπώδη ιστό αλλά η μορφολογία και οι ιδιότητές τους είναι χαρακτηριστικές των φαιών λιποκυττάρων (**Εικόνα 1**) (Cousin et al., 1992; Wu et al., 2012; Cinti, 2019).



Εικόνα 1: Μορφολογία λευκών, φαιών και μπεζ λιποκυττάρων. **A:** Λευκά λιποκύτταρα: L-Λιπίδιο, N-Πυρήνας, M-Μιτοχόνδρια, Ma-Μακροφάγα, F-Ινοβλάστες (Κλίμακα 2μm), **B:** Φαία λιποκύτταρα: N-Πυρήνας, L-Λιπίδιο, M-Μιτοχόνδρια (Κλίμακα 1μm) και **Γ:** Μπεζ λιποκύτταρα: L-Κεντρικό λιπίδιο, l-Διάχτυτα μικρού μεγέθους κυτταροπλασματικά λιπίδια. (Κλίμακα 5μm-ένθετο 0.5 μm). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αναπαραγωγή εικόνων **A** και **B** από *Fantuzzi, Mazzone, Goldberg and Fried, 2007*. Αναπαραγωγή εικόνας **Γ** από *Giordano et al., 2014*.

1.2 Λειτουργίες του λιπώδους ιστού που σχετίζονται με την ομοιοστασία της ενέργειας

Η ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου του σώματος είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση των οργανισμών. Η ποσότητα της ενέργειας που προσλαμβάνουμε από την τροφή, σε συνδυασμό με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που ζούμε, ασκούν σημαντική επίδραση στη ρύθμιση της ομοιοστασίας της ενέργειας.

A) Αναδιοργάνωση του λιπώδους ιστού με σκοπό την αποθήκευση ενέργειας

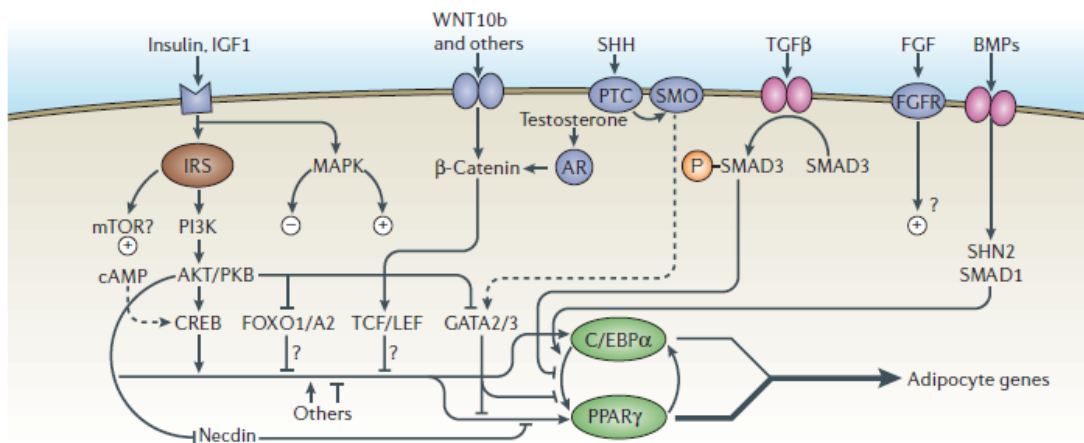
Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η θερμιδική πρόσληψη είναι μεγαλύτερη από την απαιτούμενη κατανάλωση ενέργειας, ενεργοποιούνται δύο διαφορετικές διαδικασίες στον λευκό λιπώδη ιστό που έχουν κοινό στόχο την αποθήκευση περισσότερης ενέργειας: η διαφοροποίηση προ-λιποκυττάρων με σκοπό την δημιουργία νέων λευκών λιποκυττάρων (**λιπογένεση**) και η περαιτέρω αύξηση μεγέθους των ήδη υπάρχοντων λευκών λιποκυττάρων (**υπερπλασία**).

Λιπογένεση

Κατά τη διαδικασία της λιπογένεσης, τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε λευκά λιποκύτταρα. Ποικίλα εξοκυττάρια σήματα μπορούν να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους ενδοκυττάριους μηχανισμούς που ευνοούν την ανάπτυξη των λευκών λιποκυττάρων από τα πρόδρομα κύτταρά τους. Κύριο ρόλο στην βιογένεση των λευκών λιποκυττάρων έχει η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) και peroxisome proliferator activated receptor- γ protein (PPAR γ) (**Εικόνα 2**) (Tang and Lane, 2012; Lefterova and Lazar, 2009). Στο τελικό στάδιο της λιπογένεσης, το λευκό λιποκύτταρο έχει αποκτήσει πλέον σφαιρικό σχήμα σε αντίθεση με το πρόδρομο κύτταρό του, το προ-λιποκύτταρο, που είχε μορφολογικά χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Το σφαιρικό σχήμα οφείλεται στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ώριμα λευκά λιποκύτταρα.

Σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αυτό κατέχει η ινσουλίνη που ενεργοποιεί την πρωτεΐνη glucose transporter 4 (GLUT-4) με αποτέλεσμα να προσληφθεί γλυκόζη και να αποθηκευτεί στα εν λόγω κύτταρα σε μορφή τριγλυκεριδίων (Sarjeant and Stephens, 2012).

Τα λευκά λιποκύτταρα συνθέτουν και απελευθερώνουν πληθώρα παραγόντων (λιποκίνες, κυτοκίνες, πεπτίδια κ.α.). Ανάμεσα στις πιο σημαντικές λιποκίνες είναι η λεπτίνη, που δρα κυρίως στον εγκέφαλο μειώνοντας την όρεξη για πρόσληψη τροφής και η συγκέντρωσή της συνδέεται θετικά με την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη αποτελεί μία εξίσου σημαντική λιποκίνη που χαρακτηρίζεται για την αντιφλεγμονώδη δράση της και τον προστατευτικό της ρόλο ενάντια στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II κ.α. Κατά την δημιουργία του λευκού λιποκυττάρου ενεργοποιείται η παραγωγή κυτοκινών με προ-φλεγμονώδη δράση όπως interleukin 6 (IL6) και tumor necrosis factor alpha (TNFα), η απελευθέρωση των οποίων αυξάνεται με την υπέρμετρη ανάπτυξη του λευκού λιπώδους ιστού και μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη φλεγμονής στο λιπώδη ιστό (Henry et al., 2012).



Εικόνα 2: Εξωκυττάρια σήματα που οδηγούν προς την ωρίμανση των λευκών λιποκυττάρων. Αναπαραγωγή εικόνας από Rosen and MacDougald, 2006.

Υπερπλασία λευκών λιποκυττάρων

Κατά τις περιόδους που υπάρχει αύξηση της πρόσληψης θερμίδων στον οργανισμό, ενεργοποιείται ο μηχανισμός όπου τα ήδη υπάρχοντα λευκά λιποκύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος με σκοπό την αποθήκευση περισσότερης ενέργειας ανά λευκό λιποκύτταρο. Τα λευκά λιποκύτταρα τείνουν να γίνονται υπερτροφικά με αποτέλεσμα την υπερπλασία του λιπώδους ιστού (Goossens, 2017).

Τα υπερπλαστικά λευκά λιποκυττάρω παράγουν πληθώρα προ-φλεγμονωδών παραγόντων και εκκρίνουν χημειοτακτικούς παράγοντες για την προσέλκυση μακροφάγων στον ιστό. Τελικά, δημιουργείται ένα προ-φλεγμονώδες μικρο-περιβάλλον που στη συνέχεια εξαπλώνεται σε όλο τον οργανισμό και αναπτύσσεται η χαμηλού βαθμού μεταβολική φλεγμονή (Dermitzaki et al., 2014; Goossens, 2017; Kumari, Heeren and Scheja, 2018). Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, αλλάζει η

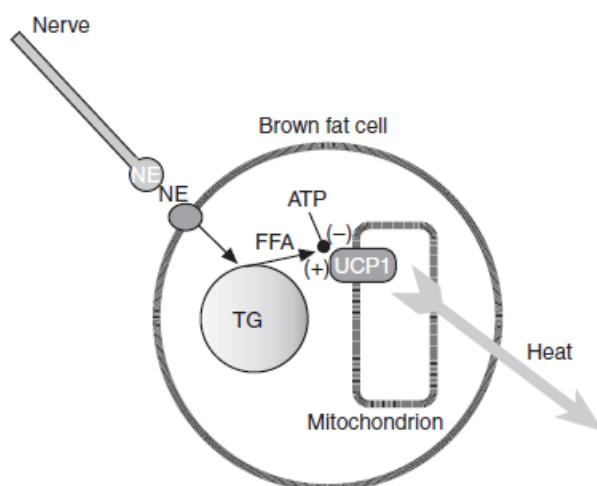
έκφραση των λιποκινών (κυρίως αυξάνεται η έκκριση της λεπτίνης και μειώνεται η έκκριση της αδιπονεκτίνης) στα λευκά λιποκύτταρα. Οι μεταβολές αυτές τελικά οδηγούν σε δυσλειτουργία του μεταβολισμού και αντίσταση των λιποκυττάρων στα σήματα ινσουλίνης, καταλήγοντας στη συσσώρευση λιπιδίων σε άλλα όργανα και στην κυκλοφορία και τελικά στην εκδήλωση των μεταβολικών νοσημάτων (Goossens, 2017; Goossens, 2008; Esser et al., 2014). Έχει βρεθεί ότι η μεταβολική φλεγμονή μπορεί να προϋπάρχει έως και δέκα χρόνια πριν γίνει η διάγνωση των μεταβολικών νοσημάτων.

B) Αναδιοργάνωση του λιπώδους ιστού με σκοπό την κατανάλωση ενέργειας

Τα θηλαστικά έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τα επίπεδα της θερμοκρασίας του σώματός τους. Πράγματι, ένας οργανισμός μπορεί να διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία του σώματος υπό φυσιολογικές συνθήκες ενώ σε περιπτώσεις που οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι αντίξοες, επιστρατεύει τον μηχανισμό της θερμογένεσης για να ανταπεξέλθει. Έτσι, η έκθεση σε συνθήκες ψύχους ενεργοποιεί απαγωγά νευρικά σήματα μέσω του υποθαλάμου και τελικά την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης προς τους μυς και τον λιπώδη ιστό. Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι γραμμωτοί μύες έχουν την ικανότητα να συσπώνται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση λίγων μορίων adenoside triphosphate (ATP) που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή θερμότητας προς αντιστάθμιση της χαμηλής θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Η κύρια όμως διαδικασία της θερμογένεσης επιτελείται στον φαιό λιπώδη ιστό.

Ενεργοποίηση φαιού λιπώδους ιστού

Όπως προαναφέρθηκε, ο φαιός λιπώδης ιστός είναι ένα όργανο με έντονη νεύρωση και αιμάτωση και τα φαιά λιποκύτταρα είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια και έχουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα. Στα φαιά λιποκύτταρα εκφράζεται ο β3 αδρενεργικός υποδοχέας που δεσμεύει την νοραδρεναλίνη και ενεργοποιεί ταχέως την διαδικασία της θερμογένεσης. Οι β3 αδρενεργικοί υποδοχείς συνδέονται με G πρωτεΐνες, ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση και εν τέλει την σύνθεση μορίων cyclic adenoside monophosphate (cAMP). Η ενδοκυττάρια αύξηση του cAMP οδηγεί στη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης A (protein kinase A, PKA). Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που στόχο έχουν είτε την αύξηση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων όπως του παράγοντα cAMP response element-binding protein (CREB) είτε την ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως αυτό της κινάσης p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). Και οι δύο περιπτώσεις μπορούν να αυξήσουν την έκφραση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης uncoupling protein 1 (UCP1) που ρυθμίζει το τελικό στάδιο της διαδικασίας της θερμογένεσης. Επιπλέον, ενεργοποιείται η διάσπαση των τριγλυκεριδίων από τα ενδοκυττάρια λιπίδια και η απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τελικά, η πρωτεΐνη UCP1 οδώνει την κινητοποίηση των πρωτονίων στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, την εκπόλωση του μιτοχονδριακού δυναμικού και την απελευθέρωση θερμότητας, ολοκληρώνοντας την διαδικασία της θερμογένεσης (Klingenspor, 2003; Cannon and Nedergaard, 2004; Morrison and Nakamura, 2019) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διαδικασία της θερμογένεσης στα φαιά λιποκύτταρα υπό συνθήκες ψύχους. Αναπαραγωγή εικόνας από Klingenspor, 2003.

Οι πρώτες απόψεις για το φαιό λιπώδη ιστό αφορούσαν στην ιδιότητά του που μόλις περιγράψαμε, να καταναλώνει ενέργεια προς παραγωγή θερμότητας, δηλαδή να προστατεύει τον οργανισμό από την υποθερμία. Υπήρχε η αντίληψη ότι φαιός λιπώδης ιστός υπάρχει μόνο στα νεογνά και εξαφανίζεται με την αύξηση της ηλικίας. Δεδομένα των τελευταίων ετών έχουν δείξει ότι φαιός λιπώδης ιστός εντοπίζεται σε ενήλικους ανθρώπους, με πλήρως διαφοροποιημένα φαιά λιποκύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη UCP1. Τα φαιά λιποκύτταρα είναι μεταβολικά ανενεργά σε φυσιολογικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος και μπορούν να εντοπιστούν λόγω του ταχέως αυξημένου μεταβολισμού τους με την απεικονιστική μέθοδο Positron Emission Tomography/ Computed Tomography (CT PET-SCAN) όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ελαττωθεί αισθητά, όπως φαίνεται από την αυξημένη απορρόφηση της δεοξυγλυκόζης στο όργανο αυτό (Nedergaard, Bengtsson and Cannon, 2007).

Με την πάροδο του χρόνου, όλο και περισσότερες μελέτες εστίασαν στην διατήρηση του ενεργειακού ισοζυγίου μελετώντας την ισορροπία ανάμεσα στην αύξηση του βάρους και την ενεργοποίηση του μεταβολισμού. Αυτό που αναδείχθηκε είναι ότι ο φαιός λιπώδης ιστός, μέσω της θερμορυθμιστικής του ικανότητας, έχει ευεργετική δράση στον μεταβολισμό. Τα φαιά λιποκύτταρα αξιοποιούν τα διάσπαρτα ενδοκυτταρικά λιπίδια ως υπόστρωμα για την απελευθέρωση θερμότητας. Η δράση αυτή έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στη λήψη βάρους, επομένως η διαδικασία της θερμογένεσης διαδραματίζει καθοριστική σημασία και στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και των διαταραχών που τη συνοδεύουν (Cannon and Nedergaard, 2011).

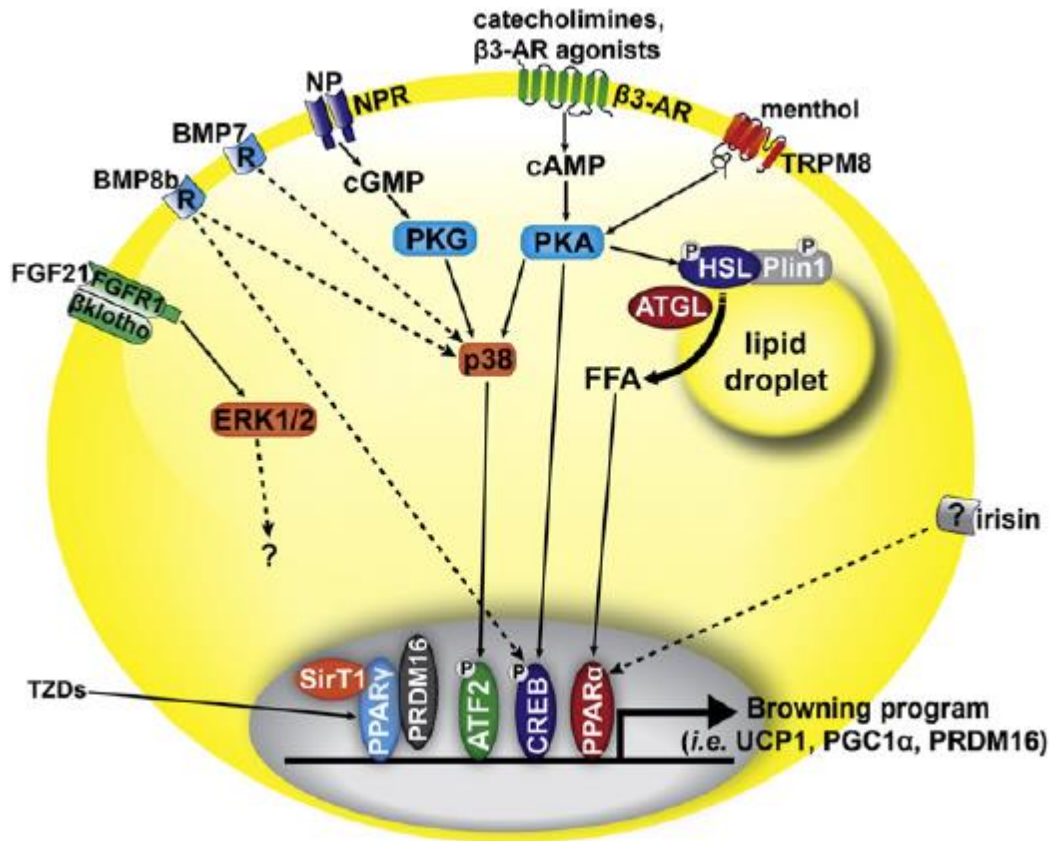
Διαφοροποίηση λευκών λιποκυττάρων προς μπεζ λιποκύτταρα

Τα μπεζ λιποκύτταρα είναι δυνατό να αναπτυχθούν στο λευκό λιπώδη ιστό πρωτίστως ως απόκριση του σώματος στη μακροχρόνια έκθεση σε ψύχος καθώς και σε μακροχρόνια έκθεση των κυττάρων σε β-αδρενεργικούς αγωνιστές (Sarjeant and Stephens, 2012; Brychta and Chen, 2017; Bonet, Mercader and Palou, 2017). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι ότι ενώ εντοπίζονται σε διαμερίσματα του λευκού λιπώδους ιστού, η λειτουργία τους ομοιάζει με αυτήν των φαιών λιποκυττάρων. Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει ότι τα μπεζ λιποκύτταρα μάλλον δεν μοιράζονται τα ίδια πρόδρομα κύτταρα με τα φαιά λιποκύτταρα (Wu et al., 2012). Αναλυτικότερα, τα μπεζ λιποκύτταρα χαρακτηρίζονται από αρκετά μιτοχόνδρια τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη UCP1 και είναι ικανά να οξειδώσουν τα λιπίδια με αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή ATP προς όφελος της απελευθέρωσης θερμότητας.

Αν και τα μπεζ λιποκύτταρα δεν έχουν τις ίδιες αναπτυξιακές καταβολές με τα φαιά, μοιράζονται παρόμοιες λειτουργίες. Η διαδικασία η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη μπεζ λιποκυττάρων στο λευκό λιπώδη ιστό ονομάζεται **φαιοποίηση** και εξαρτάται από την παρουσία ορισμένων συνθηκών (**Εικόνα 4**). Ο πιο σημαντικός οδωτής της φαιοποίησης του λευκού λιπώδους ιστού είναι η έκθεση του οργανισμού στο ψύχος με την επακόλουθη απελευθέρωση κατεχολαμινών και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης UCP1 στα μιτοχόνδρια (Cousin et al., 1992). Άλλες συνθήκες που καθιστούν δυνατή τη φαιοποίηση είναι η δράση θυρεοειδών ορμονών, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη μεταβολική λειτουργία του οργανισμού (Weiner, Hankir, Heiker, Fenske and Krause, 2017). Συγκεκριμένα, μελέτες σε πειραματικά μοντέλα υποθυροειδισμού σε ποντίκια έχουν δείξει μειωμένη ανοχή σε συνθήκες ψύχους (Bianco and Silva, 1987). Επιπλέον, η ορμόνη τριωδοθυρονίνη (Triiodothyronine, T3) φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης UCP1, υπό συνθήκες συμπαθητικής ενεργοποίησης στο φαιό λιπώδη ιστό (Silva, 1988). Ταυτόχρονα, έκθεση προ-λιποκυττάρων της κυτταρικής σειράς 3T3L1 σε T3 και ροζιγλιταζόνη ενισχύει τη διαδικασία της φαιοποίησης προς μπεζ λιποκύτταρα παρουσία ισοπροτερενόλης (Asano et al., 2014). Τέλος, η σωματική άσκηση οδηγεί στην απελευθέρωση ορμονών από τους μυς. Από αυτές περισσότερο έχει εξεταστεί η επίδραση της ορμόνης ιρισίνης, η οποία φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση θερμογενετικών γονιδίων στο λιπώδη ιστό (Herz and Kiefer, 2019).

Η επίδραση των παραπάνω ουσιών καθιστούν δυνατή την φαιοποίηση γιατί ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο παράγοντας peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1a), ο οποίος είναι σημαντικός παράγοντας βιογένεσης των μιτοχονδρίων και η type 2 iodothyronine deiodinase (DIO2) που συνεισφέρει στη μετατροπή της ορμόνης θυροξίνης (Thyroxine, T4) σε T3 και της επιτρέπει να ενισχύσει τη δράση των κατεχολαμινών στα λιποκύτταρα. Επιπλέον, η πρωτεΐνη PR domain zinc finger protein 16 (PRDM-16) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των φαιών λιποκυττάρων και όταν εκφράζεται στο φαιό λιπώδη ιστό ενισχύει την έκφραση των παραπάνω θερμογενετικών παραγόντων (Abdullahi and Jeschke, 2016; Bartelt and Heeren, 2014). Ένας στόχος δράσης ορισμένων από τους προαναφερθέντες παράγοντες είναι οι υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων peroxisome-proliferator

activated receptors (PPARs). Συγκεκριμένα, ο παράγοντας PPAR-α οδώνει τη διαδικασία της θερμογένεσης και της διαφοροποίησης προς μεξ λιποκύτταρα ευνοώντας την οξείδωση των λιπιδίων από την πρωτεΐνη UCP1 ενώ ο παράγοντας PPAR-γ ευνοεί την ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λειτουργικά λιποκύτταρα. Η σπουδαιότητα των σηματοδοτικών αυτών μορίων διαφαιίνεται από μελέτες που έχουν δείξει ότι γενετική έλλειψη των παραγόντων αυτών έχει επιβλαβείς συνέπειες στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου II (Korpen and Kalkhoven, 2010).



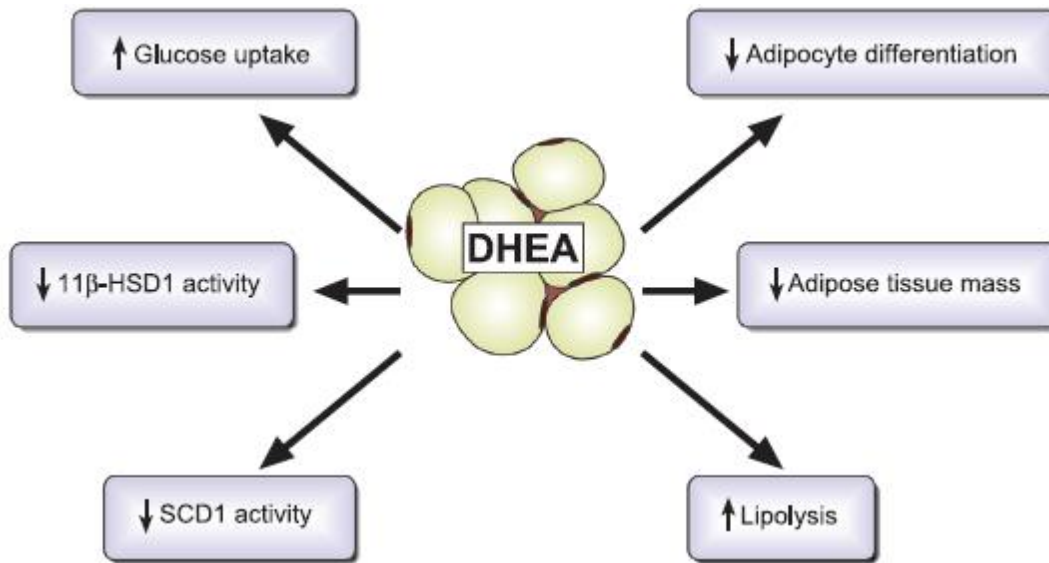
Εικόνα 4: Παράγοντες που οδηγούν στη φαειποίηση των λευκών λιποκυττάρων. Αναπαραγωγή εικόνας από Lee, Motillo and Granneman, 2014.

1.3 Αλληλεπίδραση νευροστεροειδών στο μεταβολισμό

Ένα από τα μόρια που ασκεί σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό είναι η στεροειδής ορμόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη (Dehydroepiandrosterone, DHEA). Η ορμόνη DHEA συντίθεται και εκκρίνεται κυρίως από το φλοιό των επινεφριδίων και αποτελεί πρόδρομο μόριο δύο βασικών στεροειδών ορμονών, της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης (Clark, Prough and Klinge, 2018). Η ορμόνη DHEA και οι μεταβολίτες της δρουν τυπικά μέσω των ανδρογονικών και οιστρογονικών υποδοχέων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι εκτός από στεροειδής ορμόνη, η DHEA χαρακτηρίζεται και ως νευροστεροειδές αφού συντίθεται και εκκρίνεται από

νευρώνες και κύτταρα της γλοίας. Μάλιστα, το μόριο αυτό έχει την ικανότητα να προσδένεται και να ενεργοποιεί τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGF), τον υποδοχέα τροπομυοσίνης με ενεργότητα κινάσης (Tropomyosin receptor kinase A, TrkA receptor) και τον υποδοχέα πανευροτροφινών 75 (pan-neurotrophin receptor 75, p75 receptor), με αποτέλεσμα να αποτρέπει τη διαδικασία της απόπτωσης σε νευρωνικούς πληθυσμούς (Lazaridis et al., 2011).

Λόγω της εξέχουσας θέσης του λιπώδους ιστού στην ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού, δέχεται την επίδραση πληθώρας ορμονών. Πράγματι, παρόλο που ο λιπώδης ιστός δεν είναι ικανός για τη de novo σύνθεση της ορμόνης DHEA, υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης αυτής εναποτίθενται στον λιπώδη ιστό που εν τέλει μεταβλίζονται σε ανδρογονικούς και οιστρογονικούς μεταβολίτες (Wang et al., 2011). Η παρουσία της DHEA και των μεταβολιτών της στον ιστό είναι πιθανό να έχει επιδράσεις στη λειτουργία των λιποκυττάρων και κατ'επέκταση στο μεταβολισμό. Έχει βρεθεί ότι η ορμόνη DHEA αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των προ-λιποκυττάρων 3T3L1 μέσω της δέσμευσής της σε ανδρογονικούς και οιστρογονικούς υποδοχείς (Fujioka et al., 2012). Σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών, εξωγενής χορήγηση του μορίου DHEA οδηγεί σε μείωση στον αριθμό των λιπιδίων στα ώριμα λιποκύτταρα, αύξηση της έκφρασης λιπολυτικών ενζύμων και μείωση της απελευθέρωσης λιποκινών (**Εικόνα 5**) (Karbowska and Kochan, 2013). Έχει παρατηρηθεί ότι με την αύξηση της ηλικίας, τα επίπεδα της ορμόνης DHEA μειώνονται ενώ σταδιακά αναπτύσσεται παχυσαρκία στα τρωκτικά. Συνολικά, η δράση της DHEA έχει συνδεθεί με θετικότερη μεταβολική λειτουργία σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών (Sánchez et al., 2008). Επιπλέον, σε κλινικές μελέτες έχει παρατηρηθεί αύξηση βάρους σε ασθενείς με μειωμένα επίπεδα DHEA. Δεν υπάρχουν όμως σαφείς μελέτες των άμεσων δράσεων του μορίου αυτού στο μεταβολισμό των ανθρώπινων λιποκυττάρων. Τέλος, το γεγονός ότι η DHEA μεταβολίζεται ταχέως σε ανδρογονικούς και οιστρογονικούς μεταβολίτες μειώνει την σημασία της αφού οι δράσεις που παρατηρούνται μπορεί να οφείλονται στους μεταβολίτες της .



Εικόνα 5: Επίδραση της DHEA στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών. Αναπαραγωγή εικόνας από *Karbowska and Kochan, 2013*.

Το γεγονός ότι η DHEA αλληλεπιδρά, μεταξύ άλλων, με τους υποδοχείς του παράγοντα NGF αποτέλεσε εφελτήριο για τη διερεύνηση του ρόλου του μορίου αυτού σε νευρωνικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, λόγω του ότι η DHEA ασκεί έντονη ορμονική δράση και προσδένεται σε πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς, έχει αναδειχθεί η ανάγκη για τη σύνθεση μορίων που θα μιμούνται τη δράση της DHEA παραλείποντας τις επιβλαβείς συνέπειες των μεταβολιτών της. Ένα τέτοιο μόριο είναι το (20R)-3β,21-διυδροξυ-17α,20-εποξυ-5-πρεγνένιο (17α,20R-εποξυπρεγν-5-ενε-3β,21-διόλ, BNN27), το οποίο είναι ένα συνθετικό παράγωγο της DHEA (**Εικόνα 6**) (Calogeropoulou et al., 2009).



Εικόνα 6: Η χημική ένωση του BNN27. Αναπαραγωγή από *Calogeropoulou et al., 2009*.

Το συνθετικό μόριο BNN27 είναι ικανό να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ η ικανότητά του να προσδένεται εκλεκτικά στους υποδοχείς του παράγοντα NGF αλλά όχι σε ανδρογονικούς ή οιστρογονικούς υποδοχείς σε νευρωνικούς πληθυσμούς, το διαφοροποιεί από τη DHEA (Calogeropoulou et al., 2009; Pediaditakis et al., 2016). Εξαιτίας του γεγονότος ότι συνδέεται, μεταξύ άλλων, με τους υποδοχείς TrkA και p75, το συνθετικό μόριο BNN27 έχει χαρακτηριστεί ως μία συνθετική νευροτροφήνη. Μελέτες έχουν δείξει ότι προστατεύει αισθητηριακά

κύτταρα και συμπαθητικούς νευρώνες από την απόπτωση (Pediaditakis et al., 2016; Pitsikas and Gravanis, 2017; Pediaditakis et al., 2016). Επίσης, φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία κυττάρων του αμφιβληστροειδή σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων (Ibán-Arias et al., 2018). Μέχρι στιγμής ωστόσο δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη σχετικά με την επίδραση του μορίου του BDNF στη λειτουργία των λιποκυττάρων.

1.4 Λιπώδης ιστός και NGF

Ο παράγοντας NGF είναι νευροπεπτίδιο και ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των αυξητικών παραγόντων του νευρικού συστήματος. Είναι η πρώτη νευροτροφίνη που απομονώθηκε ενώ οι πρώτες παρατηρήσεις που έγιναν για τη δράση της αφορούσαν στην ανάπτυξη και στην επιβίωση νευρικών κυττάρων του περιφερικού νευρικού συστήματος (Sofroniew, Howe and Mobley, 2001; Frade and Barde, 1998). Στο νευρικό σύστημα, ο παράγοντας NGF έχει υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα TrkA και χαμηλή συγγένεια με τον υποδοχέα p75. Έχει αναφερθεί ότι διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται μέσω των παραπάνω υποδοχέων από τον παράγοντα NGF (Ito and Enomoto, 2016).

Εκτός από το νευρικό ιστό, η έκφραση του παράγοντα NGF έχει αναφερθεί και στον λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα, λευκός λιπώδης ιστός και φαιός λιπώδης ιστός από πειραματόζωα θηλαστικών φαίνεται να εκφράζουν τον παράγοντα NGF χωρίς όμως να γίνεται σαφές σε ποια ειδικά κύτταρα εκφράζεται (Sornelli, Fiore, Chalidakon and Aloe, 2009; Colitti, Looor and Stefanon, 2015). Σε *in vitro* διαφοροποιημένα λευκά λιποκύτταρα της κυτταρικής σειράς 3T3L1 έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των επιπέδων mRNA του παράγοντα NGF αλλά και έκκριση της πρωτεΐνης αυτού. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης και απελευθέρωσης του παράγοντα NGF στα προαναφερθέντα λιποκύτταρα φαίνεται να επηρεάζονται από φλεγμονώδεις συνθήκες (Peeraully, Jenkins and Trayhurn, 2004; Wang, Jenkins and Trayhurn, 2005). Τέλος, πρωτεϊνικά επίπεδα του NGF έχουν εντοπιστεί σε υποδόριο και κοιλιακό λίπος σε ανθρώπινα δείγματα λιπώδους ιστού (Peeraully, Jenkins and Trayhurn, 2004).

Μέχρι στιγμής δεν έχει διαλευκανθεί η σχέση των υποδοχέων του NGF, του TrkA και του p75, με τον λιπώδη ιστό. Έχουν παρατηρηθεί επίπεδα mRNA του NGF και των υποδοχέων του σε δείγματα υποδόριου λίπους που έχουν ληφθεί από αγελάδες που βρίσκονται σε γαλουχία, χωρίς ωστόσο να γίνεται σαφές σε ποια ειδικά κύτταρα εκφράζονται (Colitti, Looor and Stefanon, 2015). Σε μία έρευνα των Cao, Wang and Zeng (2018), τονίζεται η σημασία των νευροτροφινών στην ανάπτυξη των συμπαθητικών απολήξεων του λιπώδους ιστού τρωκτικών. Τέλος, μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα p75 που τράφηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά, δεν παρουσίασαν αύξηση στο βάρος τους και δεν εμφάνισαν αντίσταση στην ινσουλίνη (Baeza-Raja et al., 2016). Γενικώς, από την υπάρχουσα βιβλιογραφία απουσιάζουν ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την απευθείας δράση του παράγοντα NGF στην μεταβολική λειτουργία και στον φαινότυπο των λιποκυττάρων.

2. Σκοπός εργασίας

Συνοψίζοντας, ο λευκός λιπώδης ιστός συνδέεται με μεταβολική δυσλειτουργία καθώς χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λιπιδίων, έχει προ-φλεγμονώδη φαινότυπο και μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλού βαθμού μεταβολική φλεγμονή. Τα μπεζ λιποκύτταρα από την άλλη μεριά είναι μεταβολικά ενεργά καθώς σχετίζονται με αυξημένη λιπόλυση και παραγωγή θερμότητας.

Με δεδομένο ότι η ορμόνη DHEA φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στον μεταβολισμό, εξετάστηκε η επίδρασή της στη μεταβολική λειτουργία και την συσσώρευση λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Επιπλέον, χορηγήθηκε η μικρονευροτροφίνη BNN27 που είναι συνθετικό παράγωγο της DHEA αλλά του λείπουν οι στεροειδικές δράσεις. Τέλος, δεδομένης της απουσίας σαφών ευρημάτων σχετικά με τη δράση του παράγοντα NGF και των υποδοχέων του στα λιποκύτταρα, ελέγχθηκε η επίδραση του στο μεταβολικό προφίλ και στον φαινότυπο των λιποκυττάρων.

Επιγραμματικά, οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι οι εξής:

1. Να διερευνηθεί αν ο παράγοντας NGF ασκεί επίδραση στη μεταβολική λειτουργία και στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα.
2. Να εξεταστεί εάν η ορμόνη DHEA και το συνθετικό της παράγωγο, BNN27, επιδρούν στη μεταβολική λειτουργία και στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση λιπιδίων στα λιποκύτταρα.

3. Υλικά και Μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς 3T3L1

Υλικά

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose 4.5g/l (DMEM) (GIBCO, ΗΠΑ)

Ορός εμβρύου βοός: Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, ΗΠΑ)

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (P/S) (GIBCO, ΗΠΑ)

Τρυψίνη: Trypsin (GIBCO, ΗΠΑ)

Η κυτταρική σειρά 3T3L1 προέρχεται από τα εμβρυικά κύτταρα ποντικού Swiss 3T3 (Green H. & Kehinde O. 1974). Τα κύτταρα 3T3L1 έχουν χαρακτηριστικά προ-λιποκυττάρων και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της μεταβολικής λειτουργίας των λιποκυττάρων και του φαινότυπου που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων.

Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε DMEM, 10% FBS και 1% P/S (**βασικό υλικό καλλιέργειας**). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστή με τις εξής ρυθμίσεις: ατμόσφαιρα 5% κ.ο. CO₂, θερμοκρασία 37°C και υγρασία 100%. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων ανανεωνόταν ανά δύο ή τρεις ημέρες.

Κατά την ανακαλλιέργεια, η οποία λάμβανε χώρα όταν τα κύτταρα καταλάμβαναν το 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας, τα κύτταρα επανακαλλιεργούνταν σε νέες φλάσκες με αραιώση 1:10 σε σχέση με την αρχική επιφάνεια καλλιέργειας. Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με το πλαστικό μέσο καλλιέργειας και για την ανακαλλιέργειά τους ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα τρυψίνης για 10 λεπτά στους 37 °C. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από το πλαστικό μέσο καλλιέργειας, προστέθηκε θρεπτικό υλικό σε όγκο 1/3 του διαλύματος των κυττάρων για την απενεργοποίηση της τρυψίνης. Κατόπιν, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε φρέσκο βασικό υλικό καλλιέργειας.

Πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων

Εκτός από την κυτταρική σειρά προ-λιποκυττάρων ποντικού 3T3L1, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων (ώριμων

λευκών λιποκυττάρων και προ-λιποκυττάρων) από δείγματα λιπώδους ιστού από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση.

Απομόνωση ανθρώπινων πρωτογενών λιποκυττάρων

Υλικά

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (GIBCO, ΗΠΑ)

Αλβουμίνη ορού βοός: Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)

Κολλαγενάση τύπου I: Type I Collagenase, Powder (GIBCO, ΗΠΑ)

150 cm² φλάσκες: 150 cm² flasks (CORNING, ΗΠΑ)

Δείγματα λιπώδους ιστού από την ενδοκοιλιακή χώρα παραχωρήθηκαν με την άδεια δοτών που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο. Μετά τη λήψη των δειγμάτων, οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε απαγωγό με συνεχόμενη ροή αέρα για την επεξεργασία τους κάτω από στείρες συνθήκες. Τα δείγματα του λιπώδους ιστού ξεπλύθηκαν μία φορά με προθερμασμένο D-PBS και αφαιρέθηκαν τα ορατά αιμοφόρα αγγεία και ο συνδετικός ιστός ενώ ακολούθησε άλλη μια πλύση με D-PBS. Στη συνέχεια, τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα που περιείχε D-PBS, 2% κ.ο. BSA και 0.5 mg/ml κολλαγενάση τύπου I και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο με κίνηση στους 37 °C για 45 λεπτά. Προστέθηκε θρεπτικό υλικό σε όγκο 1/3 του διαλύματος των κυττάρων για την απενεργοποίηση της κολλαγενάσης. Κατόπιν, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση, ήταν εμφανής ο διαχωρισμός ανάμεσα στα ώριμα λιποκύτταρα (αιωρούμενα στην επιφάνεια του διαλύματος) και στα κύτταρα του στρώματος (ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου).

Τα κύτταρα του στρώματος που βρίσκονταν σε μορφή ιζήματος επαναδιαλύθηκαν σε φρέσκο βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες επιφάνειας 150 cm². Έπειτα από δύο ή τρεις ανακαλλιέργειες, στη φλάσκα είχαν παραμείνει προ-λιποκύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τα προ-λιποκύτταρα σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με το πλαστικό μέσο καλλιέργειας και για την ανακαλλιέργειά τους επώαστηκαν με διάλυμα τρυψίνης ομοίως με την διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανακαλλιέργεια των προ-λιποκυττάρων 3T3L1.

Φαιοποίηση λευκών προ-λιποκυττάρων

Υλικά

Πιάτα κυτταροκαλλιέργειών 24 οπών: 24-well cell culture plates (CORNING, ΗΠΑ)

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

Νορεπινεφρίνη: Norepinephrine (NE) (DEMO S.A., GREECE)

Δεϋδροεπιανδροστερόνη: Dehydroepiandrosterone (DHEA) (MW: 288 g/mol)

C-14 spiroepoxy steroid derivative (BNN27) (MW: 332.48 g/mol)

Τριωδοθυρονίνη: Triiodothyronine (T3) (Sigma-Aldrich)(ΗΠΑ)

Ροζιγλιταζόνη: Rosiglitazone (CAYMAN CHEMICAL, ΗΠΑ)

3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma, ΗΠΑ)

Η φαιοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιούνται προς φαιά λιποκύτταρα τα οποία καταναλώνουν ενέργεια ενεργοποιώντας τον μηχανισμό της θερμογένεσης. Κύριο ρόλο στην θερμογένεση κατέχει η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη UCP1. Είναι γνωστό ότι όταν τα προ-λιποκύτταρα καλλιερηθούν παρουσία της θυρεοειδικής ορμόνης T3 σε συνδυασμό με τον αγωνιστή του παράγοντα PPAR γ , ροζιγλιταζόνη, και την ουσία IBMX ενισχύεται σημαντικά η έκφραση της πρωτεΐνης UCP1 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φαιοποίησης (Mena, Scanlan and Obregon, 2010; Lee et al., 2019; Asano et al., 2013). Επίσης, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η δράση της ορμόνης T3 στα μιτοχόνδρια των λιποκυττάρων γίνεται ιδιαίτερα εμφανής όταν χορηγείται ταυτόχρονα με αδρενεργικούς αγωνιστές.

Έτσι για να ενεργοποιηθεί η διαδικασία της φαιοποίησης, τα προ-λιποκύτταρα καλλιερηθήκαν παρουσία της ορμόνης T3 και των παραγόντων ροζιγλιταζόνη και IBMX. Πιο συγκεκριμένα, τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 ή τα ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα καλλιερηθήκαν σε πιάτα 24 οπών με φρέσκο βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (2.500 κύτταρα ανά πηγάδι). Μετά από 24 ώρες το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με **θερμογενετικό υλικό καλλιέργειας** που περιείχε DMEM με 10% FBS και 1% P/S καθώς και 50 nM T3, 1 μ M Rosiglitazone και 0.5 mM IBMX. Ως ημέρα 0 θεωρήθηκε η πρώτη ημέρα προσθήκης θερμογενετικού υλικού καλλιέργειας ενώ τα κύτταρα παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για 9 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με τους θερμογενετικούς παράγοντες ανανεωνόταν κάθε 2-3 ημέρες. Παράλληλα με την έκθεση στο θερμογενετικό μέσο καλλιέργειας, τα κύτταρα εκτέθηκαν στους εξής φαρμακολογικούς παράγοντες: 10^{-7} M NE, 10^{-8} M DHEA ή 10^{-8} M BNN27. Επίσης, καλλιερηθήκαν κύτταρα στο θερμογενετικό υλικό καλλιέργειας (κύτταρα αναφοράς).

Μέθοδοι μέτρησης του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου και του ρυθμού γλυκόλυσης στα λιποκύτταρα

Υλικά

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

Αυξητικός Παράγοντας των Νεύρων: Nerve Growth Factor (NGF) (MILLIPORE, ΗΠΑ)

Δεϋδροεπιανδροστερόνη: Dehydroepiandrosterone (DHEA) (MW:288 g/mol)

C-14 spiroepoxy steroid derivative (BNN27) (MW: 332.48 g/mol)

Πιάτα κυτταροκαλλιέργειών με πηγάδια ειδικά για χρήση στον αναλυτή Agilent Seahorse XFp Analyzer: Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplate (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Agilent Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test Kit (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Ολιγομυκίνη: Oligomycin (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Αναλυτής: Agilent Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Λογισμικό ανάλυσης δεδομένων: Seahorse Wave Desktop Software (Agilent Technologies, ΗΠΑ)

Το μεταβολικό προφίλ και η μιτοχονδριακή λειτουργία των λιποκυττάρων μετρήθηκαν στον αναλυτή Agilent Seahorse XFp. Με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε προσδιορίστηκε: (α) ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου στα μιτοχόνδρια των λιποκυττάρων ανά λεπτό (oxygen consumption rate, OCR; pmol/min), και (β) ο ρυθμός γλυκόλυσης ανά λεπτό. Για τον προσδιορισμό του ρυθμού γλυκόλυσης, μετρήθηκε ο εξωκυττάριος ρυθμός οξίνισης δηλ. η μεταβολή της συγκέντρωσης πρωτονίων (μεταβολή του pH) στο θρεπτικό υλικό της κυτταρικής καλλιέργειας (extracellular Acidification Rate, ECAR; mpH/min).

Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν σε ειδικά πηγάδια πιάτων κυτταροκαλλιέργειας μία ημέρα πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων (30,000 κύτταρα ανά οπή) σε βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Κατόπιν, εκτέθηκαν στον παράγοντα NGF (100 ng/ml) για 3.5 ώρες. Παράλληλα καλλιεργήθηκαν κύτταρα στο βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (κύτταρα αναφοράς). Στο τέλος της επώασης μετρήθηκαν τα βασικά επίπεδα του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου (Baseline levels-OCR) και του εξωκυττάριου ρυθμού οξίνισης (Baseline levels-ECAR). Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε συνθήκες stress με την ταυτόχρονη έγχυση δύο μορίων: της ολιγομυκίνης που αναστέλλει τη σύνθεση του ATP στα μιτοχόνδρια αναγκάζοντας τα κύτταρα να αυξήσουν τον ρυθμό γλυκόλυσης για να ανταπεξέλθουν στις ενεργειακές τους ανάγκες και του μορίου FCCP που επηρεάζει τη μιτοχονδριακή σύζευξη των πρωτονίων, οδηγώντας σε εκπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου στην προσπάθειά του να

επαναφέρει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατόπιν, μετρήθηκε ξανά ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου (Stressed levels-OCR) και ο ρυθμός γλυκόλυσης (Stressed levels-ECAR) ώστε να απεικονιστεί ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα ανταπεξέρχονται στις ενεργειακές τους ανάγκες όταν βρεθούν υπό συνθήκες stress. Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε για τα μόρια του στεροειδούς DHEA (10^{-8} M) και του συνθετικού μορίου BNN27 (10^{-8} M), με τη διαφορά ότι η έκθεση των προ-λιποκυττάρων στους παράγοντες αυτούς έγινε για 2 ώρες.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου (OCR; pmol/min) και ο εξωκυττάριος ρυθμός οξίνισης (ECAR; mpH/min) κανονικοποιημένα ως προς ολική πρωτεΐνη (μg of protein) και εκφράζονται ως προς το επί τοις εκατό (%) των βασικών επιπέδων OCR ή ECAR των κυττάρων αναφοράς, αντίστοιχα. Τελικά, σε κάθε δείγμα προκύπτουν δύο τιμές που αντιστοιχούν στα βασικά επίπεδα του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου (Baseline OCR) και στα επίπεδα πρόσληψης οξυγόνου μετά από stress (Stressed OCR) και αντίστοιχα δύο τιμές για τη μέτρηση της γλυκόλυσης δηλ. του εξωκυττάριου ρυθμού οξίνισης (Baseline ECAR, Stressed ECAR).

Τέλος, το μεταβολικό δυναμικό των κυττάρων, δηλαδή η ικανότητα των κυττάρων να ανταπεξέλθουν στις ενεργειακές τους ανάγκες μέσω κυτταρικής αναπνοής και γλυκόλυσης, εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τύποι σε κάθε δείγμα (Metabolic Potential Equations):

$$\text{Stressed OCR (\%)} = (\text{Stressed OCR})/(\text{Baseline OCR}) \times 100$$

$$\text{Baseline ECAR (\%)} = (\text{Stressed ECAR})/(\text{Baseline ECAR}) \times 100$$

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτή της εταιρίας, τα δεδομένα μεταφέρθηκαν από το λογισμικό της εταιρίας σε υπολογιστικό φύλλο της MS Excel, όπου και έγινε η απαραίτητη επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων.

Μέθοδος μέτρησης ολικών πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα

Διάλυμα RIPA: 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 25mM Tris (pH 7.4)

Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA) (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)

Αλβουμίνη ορού βοός: Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, ΗΠΑ)

Φασματοφωτόμετρο: Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad, ΗΠΑ)

Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στα πειράματα για την μέτρηση του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου και του ρυθμού γλυκόλυσης στα λιποκύτταρα.

Μετά το τέλος των πειραμάτων, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάλυμα RIPA για την λύση των κυττάρων. Οι ολικές πρωτεΐνες των κυτταρικών εκχυλισμάτων που

προέκυψαν, επώαστηκαν με διάλυμα ιόντων δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}). Η μέθοδος μέτρησης των ολικών πρωτεϊνών βασίζεται στην ικανότητα των ιόντων δισθενούς χαλκού να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος με αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού οξειδωσης του χαλκού (Cu^+), σε αλκαλικό περιβάλλον. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο μονοσθενούς χαλκού είναι έγχρωμο και η ένταση του χρώματος μετριέται σε μήκος κύματος 590 nm σε φασματοφωτόμετρο. Η ποσότητα των ολικών πρωτεϊνών είναι ευθέως ανάλογη με την ένταση της απορρόφησης. Παράλληλα, προετοιμάστηκε καμπύλη αναφοράς από πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA). Οι ποσότητες της αλβουμίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 0, 0.015625 μg, 0.03125 μg, 0.0625 μg, 0.125 μg, 0.25 μg, 0.5 μg, 1 μg BSA. Από τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς από την οποία υπολογίστηκαν οι ποσότητες των ολικών πρωτεϊνών των δειγμάτων (μg of protein).

Ποσοτική μέτρηση της μάζας των μιτοχονδρίων στα λιποκύτταρα

Υλικά

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

MitoTracker Green FM (Thermo, Fisher, ΗΠΑ)

Black Microplates for Fluorescence-based assays, 96-well (Thermo Fisher, ΗΠΑ)

Φθοριόμετρο: Multimode plate reader VICTOR X4 (PerkinElmer Inc, ΗΠΑ)

Για τη μέτρηση της μάζας των μιτοχονδρίων, τα λιποκύτταρα εκτέθηκαν στη χρωστική Mitotracker Green FM. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της εν λόγω χρωστικής ουσίας (καρβοκυανίνη) να διαχέεται μέσα από την πλασματική μεμβράνη και να συσσωρεύεται στα ενεργά μιτοχόνδρια. Λόγω του ότι η χρώση των μιτοχονδρίων εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων, τα κύτταρα πρέπει να είναι ζωντανά, μη μονιμοποιημένα πριν τη χρώση και όλη η διαδικασία της χρώσης να πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Το μήκος κύματος στο οποίο έγινε η μέτρηση της απορρόφησης ήταν 490nm/535nm. Η ένταση του φθορισμού που προέκυψε από τη μέτρηση είναι ευθέως ανάλογη με τη μάζα των μιτοχονδρίων των δειγμάτων.

Για τον σκοπό αυτό, ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειών 12 οπών (~250,000 κύτταρα ανά πηγάδι) σε φρέσκο βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Την επόμενη μέρα εκτέθηκαν στους φαρμακολογικούς παράγοντες για 3, 24, 30 ή 72 ώρες ανάλογα με την πειραματική συνθήκη και έπειτα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκαν για να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό. Μετά από μία πλύση σε προθερμασμένο D-PBS εμπλουτισμένο με 0.05% FBS, τα κύτταρα εκτέθηκαν στην χρωστική ουσία MitoTracker Green FM σε συγκέντρωση 200 nM σε διάλυμα με D-PBS με 0.05% FBS για 30 λεπτά σε επωαστή στους 37 °C. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 2,000 στροφές ανά λεπτό, ξεπλύθηκαν με D-PBS με 0.05% FBS και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl

διαλύματος D-PBS με 0.05% FBS και μεταφέρθηκαν σε ειδικά μαύρα πιάτα κυτταροκαλλιέργειών κατάλληλα για μέτρηση σε φθοριόμετρο. Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε αναλυτή φθοριομέτρησης (συνθήκες: απορρόφηση (490nm) και εκπομπή (535nm)).

Μέτρηση φθορισμού με μικροσκοπία

Υλικά

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

Πολύ-λυσίνη (Sigma, ΗΠΑ)

MitoTracker Green FM (Thermo, Fisher, ΗΠΑ)

Μικροσκόπιο Olympus με ενσωματωμένη κάμερα Leica (OLYMPUS Co, Ιαπωνία)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση φθορισμού με μικροσκοπία ήταν η ίδια με την ποσοτική μέτρηση των μιτοχονδρίων που αναφέρθηκε παραπάνω. Συνοπτικά, τα λευκά προ-λιποκύτταρα εκτέθηκαν στη χρωστική Mitotracker Green FM. Η διάχυση της χρωστικής στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης των κυττάρων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να απεικονιστούν τα μιτοχόνδρια υπό το μικροσκόπιο.

Ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με πολύ-λυσίνη. Για τη διερεύνηση της μάζας μιτοχονδρίων, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από τις καλυπτρίδες, η καλυπτρίδα ξεπλύθηκε με προθερμασμένο D-PBS με 0.05% FBS και τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 200nM Mitotracker Green FM για 30 λεπτά σε επωαστή στους 37 °C. Κατόπιν, η καλυπτρίδα ξεπλύθηκε με το διάλυμα D-PBS με 0.05% FBS και τοποθετήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο για την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από μικροσκόπιο Olympus με κάμερα Leica σε μεγέθυνση 40μm.

Μέθοδος μέτρησης μιτοχονδριακών οξειδωτικών ριζών

Υλικά

Βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM, 10% FBS, 1% P/S)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (GIBCO, ΗΠΑ)

MitoTracker Red CMXRos (Thermo, Fisher, ΗΠΑ)

Black Microplates for Fluorescence-based assays, 96-well (Thermo Fisher, ΗΠΑ).

Φθοριόμετρο: Multimode plate reader VICTOR X4 (PerkinElmer Inc, ΗΠΑ)

Για τη μέτρηση των μιτοχονδριακών οξειδωτικών ριζών χρησιμοποιήθηκε η χρωστική MitoTracker Red CMXRos. Η εν λόγω χρωστική είναι παράγωγο της Χ-ροζαμίνης και φθορίζει μόνο όταν εισαχθεί μέσω διάχυσης σε ζωντανά κύτταρα. Εισέρχεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και προσδένεται στις οξειδωτικές ρίζες που τυχόν υπάρχουν εκπέμποντας φθορισμό. Η ένταση φθορισμού που προκύπτει από τις μετρήσεις είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των μιτοχονδριακών οξειδωτικών ριζών στα κύτταρα.

Ωριμα λευκά ανθρώπινα λιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μέτρησης της μάζας των μιτοχονδρίων ενώ η χρωστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ουσία MitoTracker Red CMXRos (200nM). Αφού τα κύτταρα εκτέθηκαν στη χρωστική, μεταφέρθηκαν στα ειδικά μαύρα πιάτα κυτταροκαλλιέργειών και μετρήθηκε η ένταση του φθορισμού στη συσκευή μέτρησης φθορισμού. Η μέτρηση ήταν ευθέως ανάλογη με την μέτρηση των οξειδωτικών ριζών στα μιτοχόνδρια των λιποκυττάρων. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο μήκος κύματος 490nm και η εκπομπή στο μήκος κύματος 615nm.

Μέτρηση του αριθμού των λιπιδίων

Υλικά

Πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 οπών: 96-well plates for cell culture (Corning Costar, Sigma-Aldrich)

Φορμαλεΐδη: Formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)

Ισοπροπανόλη: 2-propanol (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)

Oil-Red-O powder (O-R-O) (Sigma – Aldrich, ΗΠΑ)

Φασματοφωτόμετρο: Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad, ΗΠΑ)

Για την ποσοτική μέτρηση των λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ουσία O-R-O. Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την ικανότητα της χρωστικής ουσίας O-R-O να ενσωματώνεται στα λιπίδια στο εσωτερικό των κυττάρων, σχηματίζοντας κρυστάλλους που προσδίδουν ένα χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στα κύτταρα. Με την προσθήκη της ισοπροπανόλης τα κύτταρα διαλυτοποιούνται και τα δείγματα μεταφέρονται σε Microplate Reader, όπου μετριέται η απορρόφηση στα 595nm. Η ένταση της απορρόφησης είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα των λιπιδίων στα κύτταρα. Από τις μετρήσεις που λήφθηκαν, έγινε σύγκριση των τιμών της ομάδας αναφοράς με τις ομάδες των δειγμάτων που είχαν υποστεί επίδραση με τους φαρμακολογικούς παράγοντες (NGF, DHEA, BDNF).

Ωριμα λευκά ανθρώπινα λιποκύτταρα και ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με τα παραπάνω πρωτόκολλα. Στο τέλος του πειράματος, ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 3.7% HCHO σε PBS για 10 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του μονιμοποιητικού διαλύματος, τα κύτταρα επώαστηκαν σε διάλυμα της χρωστικής ουσίας O-R-O (60% σε PBS) για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 2,000 στροφές, απομακρύνθηκε το διάλυμα της

χρωστικής ουσίας O-R-O και τα βαμμένα κύτταρα διαλύθηκαν σε 100μl ισοπροπανόλης. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε πιάτο 96 οπών και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm σε Microplate Reader.

Στατιστική ανάλυση

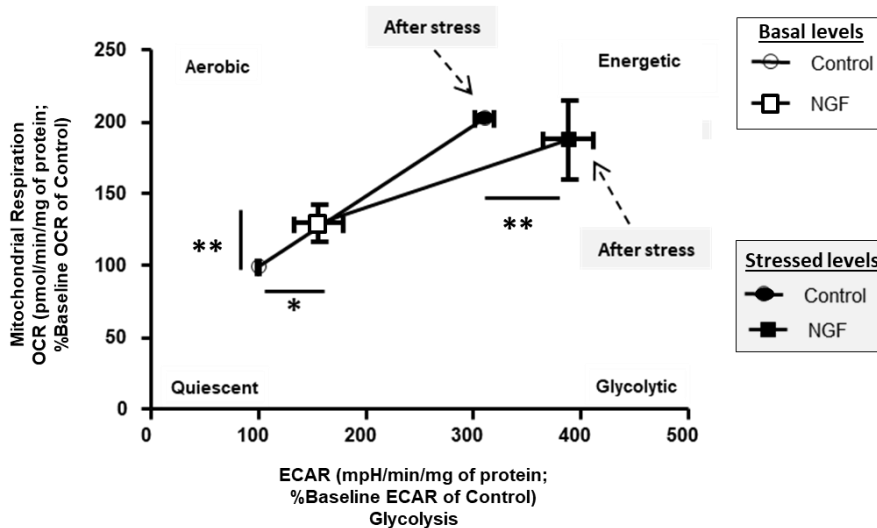
Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος (mean) +/- το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (Standard Error of mean, SE). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 2-3 φορές. Οι αναλύσεις των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό πρόγραμμα της MS Excel. Όπου συγκρίθηκαν διαφορετικές ομάδες δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το Student's T-Test ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για τα ανεξάρτητα πειράματα ορίστηκε < 0.05 .

4. Αποτελέσματα

4.1 Επίδραση του παράγοντα NGF στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων

Αρχικά, εξετάστηκε η δυνατότητα του παράγοντα NGF να επηρεάσει δύο μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων: τη μιτοχονδριακή αναπνοή και τη γλυκόλυση. Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν σε ειδικά πιάτα κυτταροκαλλιέργειών και επώαστηκαν με 100 ng/ml NGF για 3.5 ώρες. Παράλληλα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα στο βασικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας για το αντίστοιχο διάστημα (κύτταρα αναφοράς). Η ομάδα των κυττάρων που εκτέθηκαν στον παράγοντα NGF παρουσίασε αυξημένα βασικά επίπεδα ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου $129 \pm 12\%$ (mean \pm SE%, $p < 0.01$) και ρυθμού γλυκόλυσης $156 \pm 22\%$ ($p < 0.05$) σε σχέση με τις ομάδες αναφοράς ($100 \pm 1\%$ και $100 \pm 1\%$, αντίστοιχα) (**Σχήμα 1, Basal levels**).

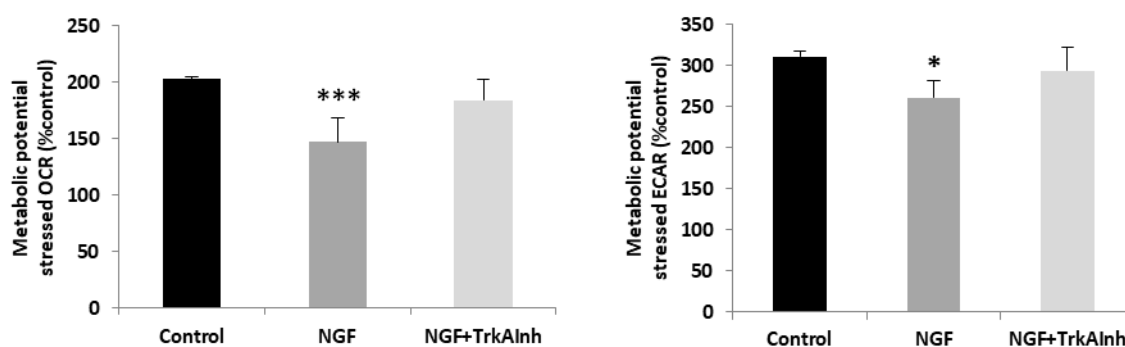
Για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε επαγωγή του stress με την προσθήκη ολιγομυκίνης και FCCP σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Χορηγήθηκε ολιγομυκίνη (1 μ M) που αναστέλλει την δράση ενζύμου της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση του ATP και FCCP (0.5 μ M) που εκπολώνει την μιτοχονδριακή μεμβράνη αναστέλλοντας την γλυκόλυση. Μετά την επαγωγή του stress, βρέθηκε ότι η επίδραση του παράγοντα NGF οδήγησε τα κύτταρα προς την κατεύθυνση της αύξησης του ρυθμού γλυκόλυσης ($388 \pm 23\%$, $p < 0.01$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($310 \pm 9\%$) (**Σχήμα 1, stressed levels**).



Σχήμα 1. Ο παράγοντας NGF επηρεάζει τη μεταβολική λειτουργία στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1. Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 επώαστηκαν σε βασικό θρεπτικό καλλιέργειας (Control) ή σε 100 ng/ml NGF (NGF) για 3.5 ώρες και μετρήθηκε ο ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου (OCR) και ο ρυθμός γλυκόλυσης (ECAR). 1^η μέτρηση: Βασικά επίπεδα (Basal levels), 2^η μέτρηση: Επίπεδα μετά από τη χορήγηση 1 μM ολιγομυκίνης και 0.5 μM FCCP (Stressed levels). Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE) των βασικών επιπέδων OCR ή ECAR των κυττάρων αναφοράς, αντίστοιχα. *p < 0.05, **p < 0.01 απεικονίζουν τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Ο παράγοντας NGF μείωσε το μεταβολικό δυναμικό των προ-λιποκυττάρων 3T3L1 μέσω του υποδοχέα TrkA

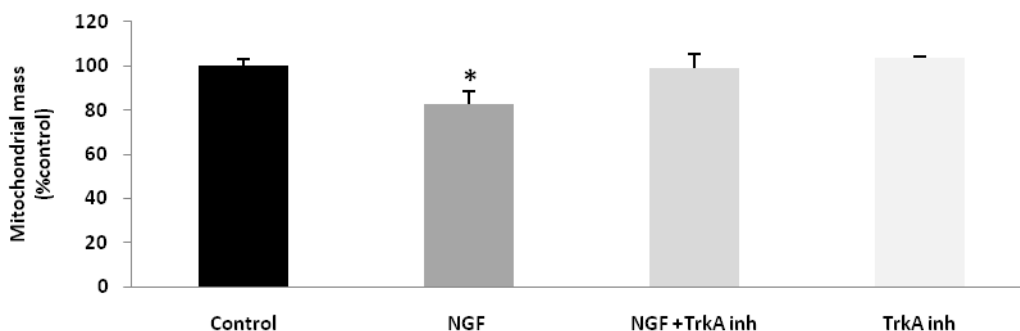
Μία παράμετρος επίσης που διερευνήθηκε είναι το μεταβολικό δυναμικό των κυττάρων. Το μεταβολικό δυναμικό αναφέρεται στην ικανότητα των κυττάρων για μιτοχονδριακή αναπνοή και γλυκόλυση, διαδικασίες που πρέπει να ενεργοποιηθεί ώστε να ανταπεξέλθει στις εκάστοτε ενεργειακές ανάγκες. Ο τύπος από τον οποίο προκύπτει το μεταβολικό δυναμικό είναι η τιμή του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου ή του ρυθμού γλυκόλυσης κατόπιν stress δια την τιμή των βασικών επιπέδων αυτών επί τους 100. Φάνηκε ότι προ-επώαση των προ-λιποκυττάρων 3T3L1 για 3.5 ώρες με 100 ng/ml NGF μείωσε τη δυναμικότητα των κυττάρων για αναπνοή όσο και τη γλυκολυτική τους ικανότητα ($147.2 \pm 21.2\%$, $p < 0.001$ και $261.1 \pm 21.5\%$, $p < 0.05$) σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις στην ομάδα αναφοράς ($202.7 \pm 2.2\%$ και $310.8 \pm 7.4\%$ αντίστοιχα) (Σχήμα 2). Η δράση αυτή διαμεσολαβήθηκε από τον υποδοχέα TrkA με τον οποίο έχει υψηλή συγγένεια ο παράγοντας NGF καθώς όταν χορηγήθηκε σε δείγματα ο παράγοντας NGF (100 ng/ml) μαζί με τον ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA (10^{-6} M), τα επίπεδα του μεταβολικού δυναμικού επανήλθαν σε αυτά της ομάδας αναφοράς ($184.3 \pm 18.1\%$ αναφορικά με την αναπνοή και $294.2 \pm 28.7\%$ αναφορικά με το ρυθμό γλυκόλυσης) (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Ο παράγοντας NGF μειώνει το μεταβολικό δυναμικό στην κυτταρική σειρά 3T3L1 μέσω του υποδοχέα TrkA. Η έκθεση των προ-λιποκυττάρων σε 100 ng/ml NGF (NGF) μείωσε το δυναμικό των κυττάρων για αερόβια αναπνοή και γλυκόλυση μετά την επαγωγή του stress σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Control). Η ταυτόχρονη χορήγηση του παράγοντα NGF (100 ng/ml) και του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA (10^{-6} M) (NGF+TrkAInh) επανέφερε τα επίπεδα του μεταβολικού δυναμικού σε αυτά της ομάδας αναφοράς. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ απεικονίζουν τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

4.2 Επίδραση του παράγοντα NGF στη μάζα των μιτοχονδρίων των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων

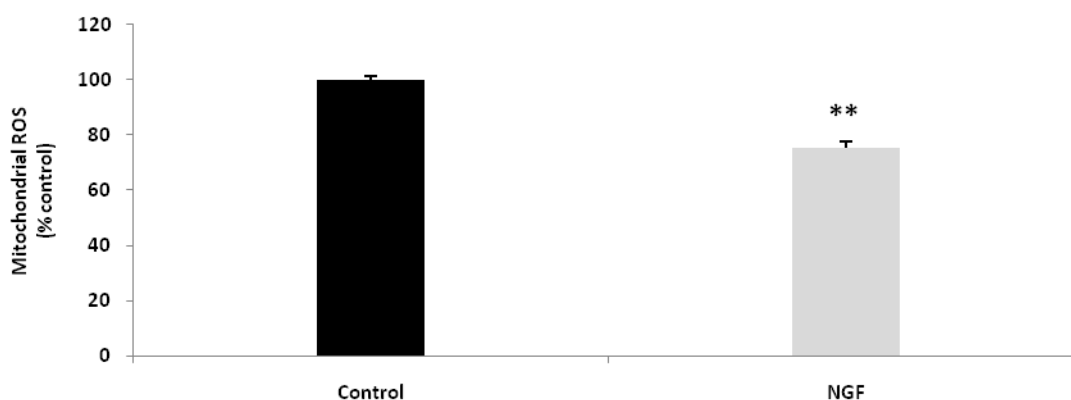
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγοντας NGF επηρεάζει μεταβολικές διεργασίες στα μιτοχόνδρια. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση του παράγοντα NGF στα μιτοχόνδρια λιποκυττάρων, ελέγχθηκε αν ο παράγοντας NGF είναι ικανός να μεταβάλλει τη μάζα των μιτοχονδρίων των λιποκυττάρων. Ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω. Η χορήγηση 100 ng/ml NGF σε ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα οδήγησε σε μείωση της μάζας των μιτοχονδρίων μετά από έκθεση στο μόριο αυτό για 24, 30 και 72 ώρες σε σχέση με τη μάζα των μιτοχονδρίων των κυττάρων αναφοράς. Ένα ενδεικτικό γράφημα που παρουσιάζει τις μετρήσεις της μάζας των μιτοχονδρίων μετά από έκθεση των λευκών ώριμων ανθρώπινων λιποκυττάρων σε 100 ng/ml NGF για 72 ώρες παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3**. Τα κύτταρα που εκτέθηκαν στον παράγοντα NGF (100 ng/ml) για 72 ώρες εμφάνισαν μειωμένη μάζα των μιτοχονδρίων ($76.9 \pm 2.9\%$, $p < 0.05$) σε σχέση με την αντίστοιχη μάζα των μιτοχονδρίων των κυττάρων αναφοράς. Η δράση του παράγοντα NGF στη μάζα των μιτοχονδρίων διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα TrkA. Πράγματι, όταν χορηγήθηκε ο παράγοντας NGF μαζί με τον ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA (10^{-6} M) για 72 ώρες ανεστάλη η δράση του παράγοντα NGF. Τέλος, μόνο η χορήγηση του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA (10^{-6} M) για 72 ώρες δεν μετέβαλλε την μάζα των μιτοχονδρίων σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (**Σχήμα 3**).



Σχήμα 3. Ο παράγοντας NGF μειώνει τη μάζα των μιτοχονδρίων στα ώριμα λευκά ανθρώπινα λιποκύτταρα μέσω του υποδοχέα TrkA. Τα ώριμα λευκά λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε NGF (100 ng/ml), NGF (100 ng/ml) + TrkA Inh (10^{-6} M) ή TrkA Inh (10^{-6} M) και μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Ο παράγοντας NGF μείωσε τη μάζα των μιτοχονδρίων, δράση που αναστάλθηκε με την ταυτόχρονη χορήγηση του παράγοντα NGF και του ανταγωνιστή του υποδοχέα TrkA. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως %mean (+/- SE). * $p < 0.05$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

4.3 Επίδραση του παράγοντα NGF στις οξειδωτικές ρίζες των μιτοχονδρίων των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων

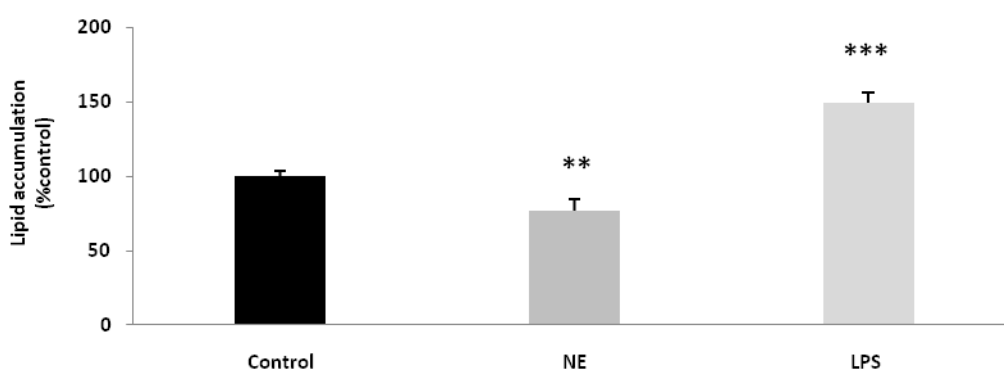
Αφού ελέγχθηκε ότι ο παράγοντας NGF επηρεάζει τόσο τη μεταβολική λειτουργία των κυττάρων όσο και τη μάζα των μιτοχονδρίων, εξετάστηκε η επίδραση του μορίου αυτού στην απελευθέρωση των οξειδωτικών ριζών. Τα πρώιμα δεδομένα του εργαστηρίου έδειξαν ότι ο παράγοντας NGF (100 ng/ml) μείωσε τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών σε ώριμα λευκά λιποκύτταρα μετά από 30 ώρες χορήγησης ($75.3 \pm 2.2\%$, $p < 0.01$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($100.0 \pm 1.2\%$) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Ο παράγοντας NGF μειώνει τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών σε ώριμα ανθρώπινα λευκά λιποκύτταρα. Τα λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε 100 ng/ml NGF για 30 ώρες με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των οξειδωτικών ριζών στα μιτοχόνδρια. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (control). ** $p < 0.01$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.

4.4 Επίδραση του παράγοντα NGF στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων

Είναι γνωστό ότι η νοραδρεναλίνη (NE) είναι ο κύριος ρυθμιστής του φαιού φαινοτύπου στα λιποκύτταρα και ο λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide, LPS) είναι μια ενδοτοξίνη που σχετίζεται με την ανάπτυξη φλεγμονής και οδώνει τον λευκό φαινότυπο στα λιποκύτταρα. Για να διερευνήσουμε την δράση τους στα ανθρώπινα λευκά λιποκύτταρα, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα: Ώριμα ανθρώπινα λευκά λιποκύτταρα εκτέθηκαν για 30 ώρες στην νοραδρεναλίνη ή στον λιποπολυσακχαρίτη LPS και μετρήθηκε ο αριθμός των λιπιδίων των κυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, η νορεπινεφρίνη (10^{-7} M) μείωσε τον αριθμό των λιπιδίων ($76.4 \pm 7.9\%$, $p < 0.01$), ενώ ο λιποπολυσακχαρίτης LPS (100 ng/ml) οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των λιπιδίων ($149.2 \pm 7.2\%$, $p < 0.001$), όλα συγκρινόμενα με τον αριθμό των λιπιδίων των κυττάρων αναφοράς (Σχήμα 5).

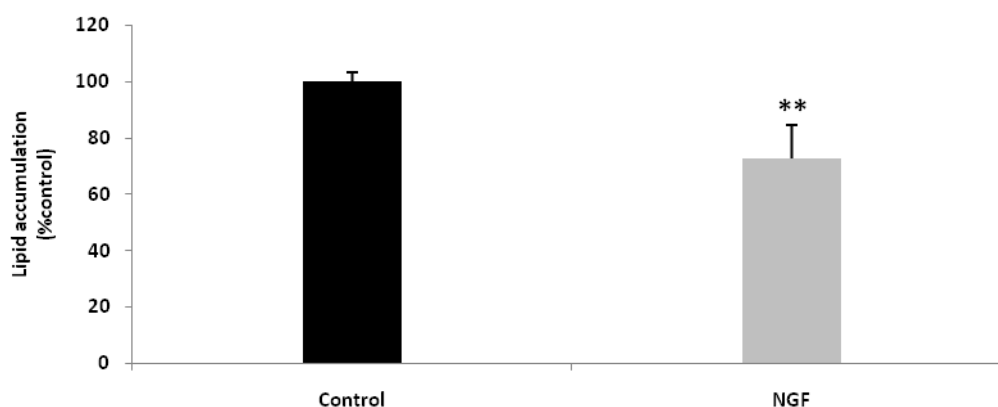


Σχήμα 5. Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS είναι θετικός ρυθμιστής του αριθμού των λιπιδίων σε ώριμα ανθρώπινα λευκά λιποκύτταρα μετά από 30 ώρες χορήγησης ενώ η NE οδηγεί σε μείωση των λιπιδίων. Τα λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε 100 ng/ml LPS για 30 ώρες με αποτέλεσμα την αύξηση των λιπιδίων. Η NE αντίθετα μείωσε σημαντικά τον αριθμό των λιπιδίων μετά από 30 ώρες έκθεσης των κυττάρων στο μόριο αυτό. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$ απεικονίζουν τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (control).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγοντας NGF επηρεάζει τις μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η μιτοχονδριακή αναπνοή και η γλυκόλυση, έχει επίδραση στη μάζα των μιτοχονδρίων των λιποκυττάρων και στην παρουσία των οξειδωτικών ριζών στα μιτοχόνδρια. Αυτές οι παράμετροι αφορούν το μεταβολικό προφίλ των λιποκυττάρων. Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την επίδραση του παράγοντα NGF στον αριθμό των λιπιδίων στα λιποκύτταρα.

Για την διερεύνηση της πιθανής επίδρασης του παράγοντα NGF στον αριθμό των λιπιδίων των λιποκυττάρων, χορηγήθηκε ο παράγοντας NGF σε διαφορετικές

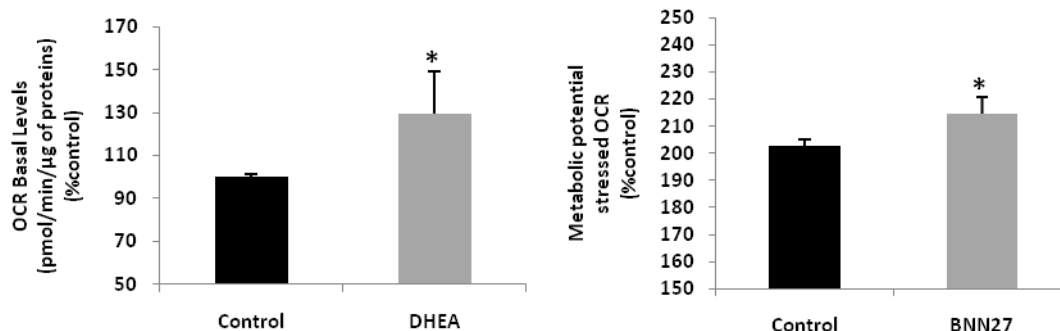
δόσεις στα κύτταρα για 30 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι το εύρος της δράσης του παράγοντα NGF κυμαινόταν από 1-10.000 ng/ml και επιλέχθηκε η δόση 1.000 ng/ml ως η δόση με την μεγαλύτερη επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Έτσι, τα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα μετά από χορήγηση 1.000 ng/ml NGF για 30 ώρες εμφάνισαν μειωμένο αριθμό λιπιδίων κατά $64.0 \pm 11.3\%$ ($p < 0.01$) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς ($100 \pm 6\%$) (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Επίδραση του παράγοντα NGF στον αριθμό των λιπιδίων των λιποκυττάρων. Ωριμα λευκά λιποκύτταρα εκτέθηκαν για 30 ώρες σε NGF (1.000 ng/ml) και κατόπιν μετρήθηκε ο αριθμός των λιπιδίων στα κύτταρα. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). * $p < 0.01$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (control).

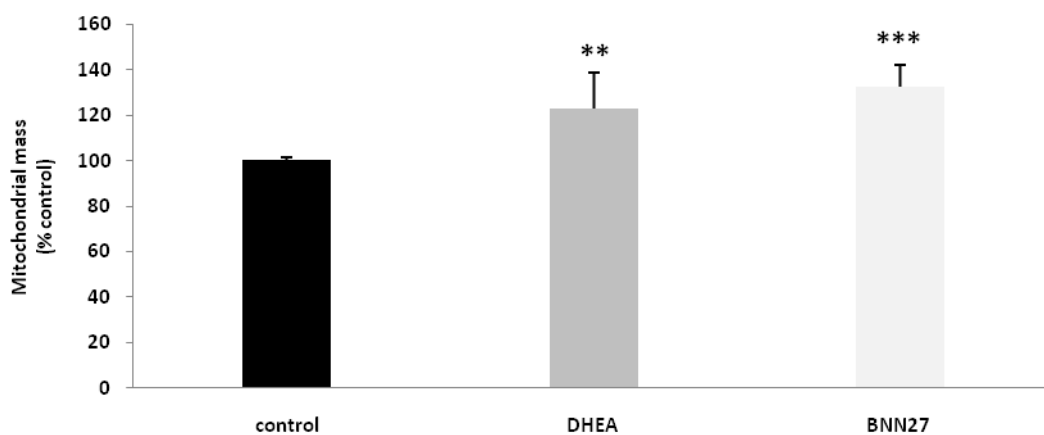
4.5 Επίδραση των νευροστεροειδών στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων

Αφού εξετάστηκε η ικανότητα του παράγοντα NGF να επηρεάσει το μεταβολικό προφίλ των λιποκυττάρων μία δράση που φαίνεται να μεσολαβείται από τον υποδοχέα TrkA, διερευνήθηκε αν τα νευροστεροειδή που έχουν χημική συγγένεια με τον υποδοχέα TrkA έχουν παρόμοιες επιδράσεις στη μεταβολική λειτουργία των κυττάρων αυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ενδογενές νευροστεροειδές DHEA και η συνθετική μικρονευροτροφίνη BNN27 επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1. Συγκεκριμένα, η δίωρη επώαση με το νευροστεροειδές DHEA ($10^{-8}M$) αύξησε τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου ($129.2 \pm 19.9\%$, $p < 0.05$) σε σχέση με τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου που μετρήθηκαν στα κύτταρα αναφοράς. Επιπρόσθετα, η δίωρη επώαση με την μικρονευροτροφίνη BNN27 ($10^{-8}M$) αύξησε ελαφρώς το μεταβολικό δυναμικό υπό συνθήκες stress αναφορικά με την κατανάλωση οξυγόνου ($214.7 \pm 5.7\%$, $p < 0.05$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($202.7 \pm 2.2\%$) (Σχήμα 7).



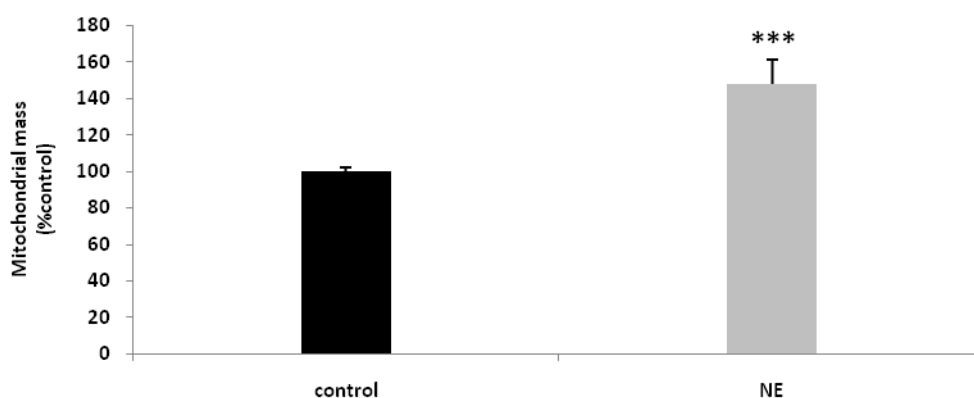
Σχήμα 7. DHEA και BNN27 επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1. Τα κύτταρα επωάστηκαν για δύο ώρες με DHEA (10^{-8} M) ή BNN27 (10^{-8} M) και κατόπιν έγινε μέτρηση της πρόσληψης οξυγόνου. Το νευροστεροειδές DHEA αύξησε τον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου των κυττάρων σε βασικό επίπεδο ενώ η μικρονευροτροφίνη BNN27 αύξησε το μεταβολικό δυναμικό των κυττάρων μετά την επαγωγή του stress αναφορικά με την κατανάλωση οξυγόνου (OCR). Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). * $p < 0.05$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (Control).

Κατόπιν ελέγχθηκε η ικανότητα των νευροστεροειδών να επηρεάσουν τη μάζα των μιτοχονδρίων των λιποκυττάρων. Ωριμα λευκά ανθρώπινα λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε DHEA (10^{-8} M) ή BNN27 (10^{-8} M) για 30 ώρες και κατόπιν μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Αναλυτικότερα, τόσο το νευροστεροειδές DHEA ($123.1 \pm 15.4\%$, $p < 0.01$) όσο και η μικρονευροτροφίνη BNN27 ($132.4 \pm 9.6\%$, $p < 0.001$) αύξησαν τη μάζα των μιτοχονδρίων στα κύτταρα αυτά σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (100.2 ± 1.3) (**Σχήμα 8**).

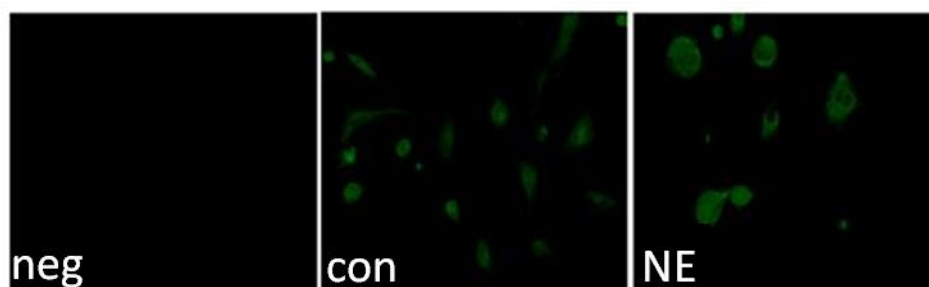


Σχήμα 8. Το νευροστεροειδές DHEA και η μικρονευροτροφίνη BNN27 αυξάνουν τη μάζα των μιτοχονδρίων στα λιποκύτταρα. Ωριμα λευκά λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε BNN27 (10^{-8} M) ή DHEA (10^{-8} M) για 30 ώρες και μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ απεικονίζουν τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Τα αποτελέσματα που παρατίθενται παρακάτω αφορούν καλλιέργειες κυτταρικής σειράς 3T3L1 και ανθρώπινων προ-λιποκυττάρων, οι οποίες εκτέθηκαν σε θρεπτικό υλικό με παράγοντες θερμογένεσης. Στα κύτταρα χορηγήθηκε NE, η οποία είναι γνωστό από τα βιβλιογραφικά δεδομένα ότι επάγει τη φαιοποίηση των λευκών λιποκυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, η NE (10^{-7} M) οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της μάζας των μιτοχονδρίων στα κύτταρα με την ταυτόχρονη επώαση σε θερμογενετικό υλικό. Πράγματι, προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες σε θερμογενετικό υλικό με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε NE (10^{-7} M). Η μάζα των μιτοχονδρίων στην ομάδα αυτή αυξήθηκε ($148.1 \pm 12.9\%$, $p < 0.005$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($100 \pm 2.3\%$) (Σχήμα 9). Αντίστοιχο πείραμα έγιναν σε ανθρώπινα προ-λιποκύτταρα από τον λευκό λιπώδη ιστό. Τα ανθρώπινα προ-λιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες παρουσία θερμογενετικού υλικού για 9 ημέρες και η χρώση με την χρωστική ουσία MitoTracker Green FM έδειξε ότι τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί στην NE (10^{-7} M) είχαν εντονότερη χρώση σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδα αναφοράς (control) (Εικόνα I).



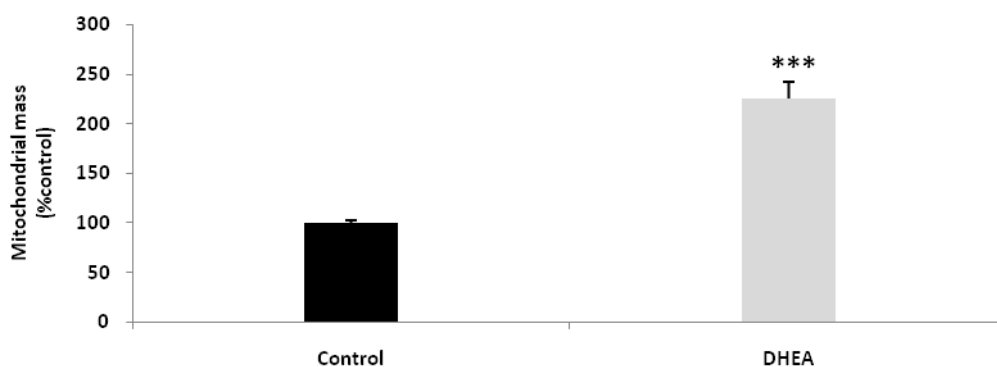
Σχήμα 9. Η NE αυξάνει τη μάζα των μιτοχονδρίων όταν χορηγείται ταυτόχρονα με θρεπτικό υλικό που περιέχει θερμογενετικούς παράγοντες. Προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες σε θερμογενετικό υλικό με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε NE (10^{-7} M) και μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). *** $p < 0.005$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.



Εικόνα I. Ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες παρουσία θερμογενετικού υλικού για 9 ημέρες. Κατόπιν, έγινε χρώση με την χρωστική ουσία

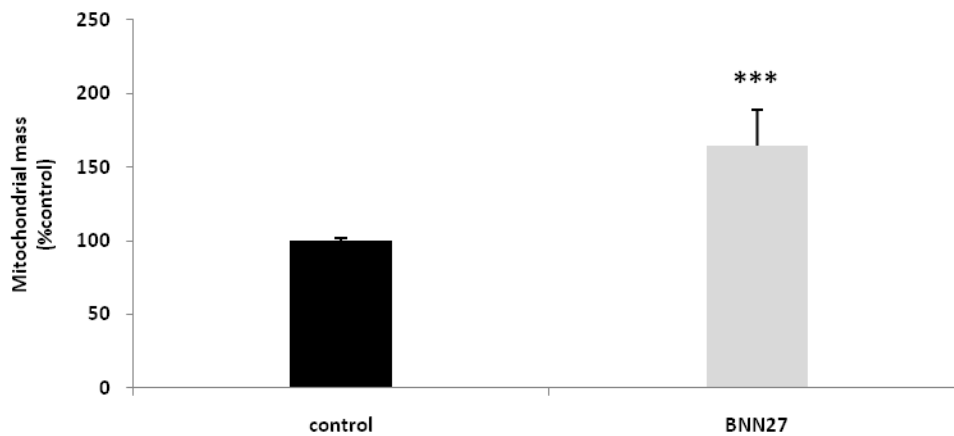
MitoTracker Green FM και τα κύτταρα εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση 40x). Η ομάδα των κυττάρων που είχε εκτεθεί στη NE (10^{-7} M) παρουσίασε εντονότερη χρώση στα μιτοχόνδρια σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (con). Κύτταρα αναφοράς που δεν εκτέθηκαν στην χρωστική ουσία (neg).

Προχωρώντας στην επίδραση των νευροστεροειδών, παρατηρήθηκε ότι το νευροστεροειδές DHEA (10^{-8} M) ήταν ικανό να αυξήσει τη μάζα των μιτοχονδρίων υπό θερμογενετικές συνθήκες στα 3T3L1 προ-λιποκύτταρα ($226.2 \pm 16.6\%$, $p < 0.001$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($100 \pm 2.3\%$) (**Σχήμα 10**). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν καλλιεργήθηκαν τα ανθρώπινα προ-λιποκύτταρα σε θερμογενετικό υλικό με ταυτόχρονη επώαση με DHEA (10^{-8} M) (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Σχήμα 10. Το νευροστεροειδές DHEA αυξάνει τη μάζα των μιτοχονδρίων υπό συνθήκες φαιοποίησης σε 3T3L1 προ-λιποκύτταρα. Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες σε θερμογενετικό υλικό με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε DHEA (10^{-8} M) και μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/-SE). * $p < 0.001$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

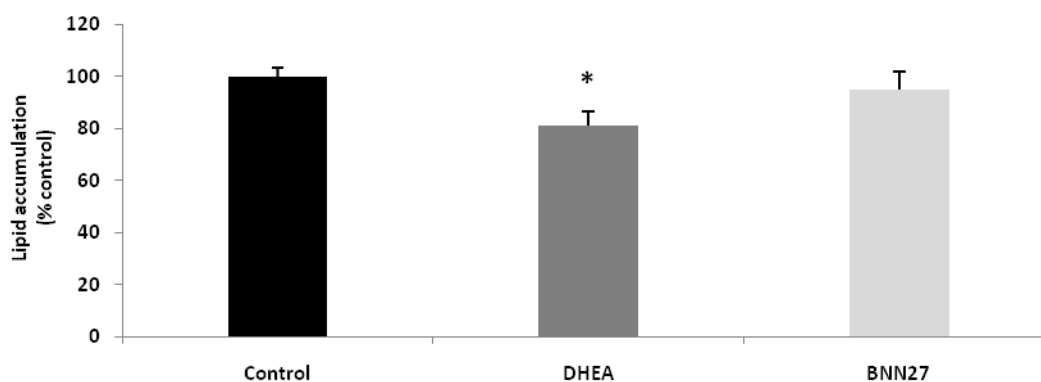
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της μικρονευροτροφίνης BNN27 στη μάζα των μιτοχονδρίων σε καλλιέργειες κυτταρικής σειράς προ-λιποκυττάρων 3T3L1 και σε ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα. Η μικρονευροτροφίνη BNN27 (10^{-8} M) αύξησε δραματικά τη μάζα των μιτοχονδρίων όταν τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες θερμογένεσης ($164.9 \pm 24.5\%$, $p < 0.001$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($100.0 \pm 2.3\%$) (**Σχήμα 11**). Η μικρονευροτροφίνη BNN27 δεν φάνηκε να είχε κάποια επίδραση στη μάζα των μιτοχονδρίων των ανθρώπινων λευκών προ-λιποκυττάρων όταν αυτά καλλιεργήθηκαν παρουσία θερμογενετικού υλικού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Σχήμα 11. Η μικρονευροτροφίνη BNN27 αυξάνει τη μάζα των μιτοχονδρίων σε 3T3L1 προ-λιποκύτταρα υπό συνθήκες θερμογένεσης. Τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες σε θερμογενετικό υλικό με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων στην μικρονευροτροφίνη BNN27 ($10^{-8}M$) και μετρήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). *** $p < 0.001$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

4.6 Επίδραση των νευροστεροειδών στον φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων

Μέχρι στιγμής, βρέθηκε ότι τόσο το νευροστεροειδές DHEA όσο και η μικρονευροτροφίνη BNN27 έχουν επίδραση στο μεταβολικό προφίλ των λιποκυττάρων με ποικίλους τρόπους. Στη συνέχεια, εξετάστηκε το ενδεχόμενο τα ανωτέρω μόρια να επηρεάζουν το φαινότυπο των λιποκυττάρων που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων. Ωριμα λευκά ανθρώπινα λιποκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν. Κατόπιν, εκτέθηκαν σε DHEA (10^{-8} M) ή BNN27 (10^{-8} M) για 30 ώρες, τα κύτταρα επώαστηκαν με την χρωστική ουσία Oil-Red-O και έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις για τον αριθμό των λιπιδίων. Βρέθηκε ότι το νευροστεροειδές DHEA μείωσε με στατιστικά σημαντική διαφορά τον αριθμό των λιπιδίων ($81.4 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$) σε σχέση με την ομάδα αναφοράς ($100.0 \pm 3.5\%$) αλλά η μικρονευροτροφίνη BNN27 δεν είχε επίδραση στα κύτταρα αυτά (Σχήμα 12).



Σχήμα 12. Το νευροστεροειδές DHEA μειώνει τον αριθμό των λιπιδίων σε ώριμα λευκά λιποκύτταρα μετά από 30 ώρες χορήγησης αλλά η μικρονευροτροφίνη BNN27 δεν ασκεί κάποια επίδραση. Ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό. Χορηγήθηκε DHEA (10^{-8} M) ή BNN27 (10^{-8} M) για 30 ώρες και μετρήθηκε ο αριθμός των λιπιδίων των κυττάρων. Τα δεδομένα είναι εκφρασμένα ως % mean (+/- SE). * $p < 0.05$ απεικονίζει τη διαφορά της στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

5. Συζήτηση

Η παθολογία της παχυσαρκίας οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υπερπλασία των λευκών λιποκυττάρων που έχουν μεταβολική δυσλειτουργία και προφλεγμονώδη φαινότυπο. Εν αντιθέσει με τα λευκά λιποκύτταρα, τα μπεζ λιποκύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά, εμφανίζουν αυξημένη λιπόλυση και αυξημένη κατανάλωση ενέργειας με την μορφή θερμότητας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος του παράγοντα NGF και του συνθετικού αναλόγου της DHEA, BNN27, στη μεταβολική λειτουργία και στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Για να διερευνήσουμε τις πιθανές επιδράσεις των παραπάνω παραγόντων στην ανάπτυξη των λιποκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων και η κυτταρική σειρά προ-λιποκυττάρων ποντικού 3T3L1. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο παράγοντας NGF αύξησε την μιτοχονδριακή αναπνοή και την γλυκόλυση στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 και μείωσε την μιτοχονδριακή μάζα, τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών και τον αριθμό των λιπιδίων στα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα ενώ η μικρονευροτροφίνη BNN27 αύξησε τη μεταβολική λειτουργία αλλά δεν επηρέασε τον αριθμό των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι τα προαναφερθέντα μόρια φαίνεται να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων.

Αρχικά διερευνήθηκε η δυνατότητα του παράγοντα NGF να επηρεάσει τη μεταβολική λειτουργία των προ-λιποκυττάρων 3T3L1. Τα ευρήματα έδειξαν ότι ο παράγοντας NGF αύξησε τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου και γλυκόλυσης. Η δράση αυτή φανερώνει ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας NGF οδηγεί τα προ-λιποκύτταρα σε ένα πιο μεταβολικά ενεργό προφίλ αυξάνοντας την κυτταρική αναπνοή και τη γλυκόλυση. Κατά την αερόβια αναπνοή, τα κύτταρα προσλαμβάνουν από το περιβάλλον τους οξυγόνο το οποίο χρησιμοποιείται από τα μιτοχόνδρια για την απελευθέρωση ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν μια ενζυμική αλυσίδα, η ενεργοποίηση της οποίας έχει ως τελικό προϊόν πολλά μόρια ATP. Η διαφοροποίηση προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα είναι μια διεργασία η οποία απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (Ducluzeau et al., 2011). Μελέτες σε προ-λιποκύτταρα έχουν δείξει ότι μειωμένη πρόσληψη οξυγόνου οδηγεί σε καθυστέρηση της διαφοροποίησής τους σε ώριμα λιποκύτταρα (Kim et al., 2005; Lin, Lee and Yun, 2006). Από την άλλη μεριά, γλυκόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία η γλυκόζη διασπάται για τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου. Γενικά, κατά την ανάπτυξη και την διαίρεση των κυττάρων, αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα καθώς και ο ρυθμός γλυκόλυσης (Lunt and Vander Heiden, 2011). Επιπλέον, η διέγερση με αδρενεργικούς αγωνιστές αυξάνει τον ρυθμό γλυκόλυσης σε φαιά καθώς και σε μπεζ λιποκύτταρα που έχουν προκύψει από την φαιοποίηση λευκών λιποκυττάρων. Η αύξηση της γλυκόλυσης στα κύτταρα αυτά έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας σε μορφή θερμότητας (Winther et al., 2017; Fujimoto et al., 2018). Δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία εστιάζουν στη δράση του παράγοντα NGF σε νευρωνικούς πληθυσμούς, η παρούσα έρευνα αποτελεί μια πρωτότυπη προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης του παράγοντα NGF στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων.

Το γεγονός ότι ο παράγοντας NGF αυξάνει τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου και γλυκόλυσης φανερώνει τον ενεργό ρόλο του παράγοντα NGF στην αναδιοργάνωση του λευκού λιπώδους ιστού και πιθανόν τον προστατευτικό ρόλο του μορίου αυτού για την επιβίωση και ανάπτυξη των προ-λιποκυττάρων.

Ο παράγοντας NGF αυξάνει τον ρυθμό γλυκόλυσης στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 όταν εκτεθούν σε συνθήκες stress. Οι συνθήκες stress δημιουργήθηκαν με την ταυτόχρονη έγχυση της ολιγομυκίνης που αναστέλλει τη σύνθεση του ATP στα μιτοχόνδρια αναγκάζοντας τα κύτταρα να αυξήσουν τον ρυθμό γλυκόλυσης για να ανταπεξέλθουν στις ενεργειακές τους ανάγκες και του μορίου FCCP. Το τελευταίο επηρεάζει τη μιτοχονδριακή σύζευξη των πρωτονίων, οδηγώντας σε εκπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου στην προσπάθεια του κυττάρου να επαναφέρει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το εύρημα της εκλεκτικής αύξησης του ρυθμού γλυκόλυσης από τον παράγοντα NGF σε συνθήκες stress δείχνει ότι ο παράγοντας NGF ωθεί τα κύτταρα να αξιοποιήσουν τα αποθέματα γλυκόζης για να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες ενεργειακές τους ανάγκες, οδηγώντας τα μιτοχόνδρια προς αναερόβια αναπνοή. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε νευρικά κύτταρα έχουν δείξει ότι ο παράγοντας NGF πράγματι επηρεάζει μεταβολικές διεργασίες. Οι Fodelianaki et al., 2019 έδειξαν ότι ταυτόχρονη χορήγηση μορίων NGF και LPS σε πρωτογενείς καλλιέργειες μικρογλοιακών κυττάρων ποντικού μειώνει σημαντικά το ρυθμό γλυκόλυσης, δράση που αντιστρέφει τη φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων αυτών λόγω του μορίου LPS. Αντίθετα, στη μελέτη των Martorana et al., (2018) τα νευρικά κύτταρα PC12-615 αύξησαν τα επίπεδα μιτοχονδριακής αναπνοής και γλυκόλυσης σε βασικό επίπεδο καθώς και μετά την επαγωγή του stress με αναστολείς των ενζύμων της μιτοχονδριακής αλυσίδας όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν στο μόριο του NGF. Στην παρούσα έρευνα φάνηκε για πρώτη φορά ότι ο παράγοντας NGF επηρεάζει άμεσα τη μεταβολική λειτουργία των προ-λιποκυττάρων καθώς αύξησε το ρυθμό κυτταρικής αναπνοής και γλυκόλυσης υπό βασικές συνθήκες και επιπλέον αύξησε το ρυθμό γλυκόλυσης υπό συνθήκες stress. Το γεγονός αυτό καθιστά σημαντική την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης του παράγοντα NGF με το μεταβολισμό στα λιποκύτταρα, εστιάζοντας στους πιθανούς μηχανισμούς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τις ανωτέρω διεργασίες.

Ο παράγοντας NGF μείωσε το μεταβολικό δυναμικό για αερόβια και αναερόβια αναπνοή στα προ-λιποκύτταρα της κυτταρικής σειράς 3T3L1. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο διότι τα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 προ-επώαστηκαν για βραχύ χρονικό διάστημα (3.5 ώρες) με τον παράγοντα NGF με αποτέλεσμα να μην έχει δοθεί ο απαραίτητος χρόνος στα κύτταρα να εμφανίσουν μόνιμες αλλαγές από την επίδραση του παράγοντα. Έτσι, η αύξηση της βασικής αερόβιας και αναερόβιας αναπνοής μετά την προ-επώαση για 3.5 ώρες με τον παράγοντα NGF οδήγησε σε συνολική μείωση του μεταβολικού δυναμικού της αναπνοής των κυττάρων. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι η χορήγηση του παράγοντα NGF ήταν βραχεία (3.5 ώρες), ίσως η μακρόχρονη έκθεση των λιποκυττάρων στο μόριο αυτό να προσέφερε μια διαφορετική εικόνα του μεταβολικού δυναμικού.

Ο παράγοντας NGF μείωσε το δυναμικό των προ-λιποκυττάρων 3T3L1 για αερόβια και αναερόβια αναπνοή μέσω του υποδοχέα TrkA και όχι του υποδοχέα p75. Ο υποδοχέας TrkA συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τον παράγοντα NGF, ενώ ο υποδοχέας p75 είναι χαμηλής συγγένειας υποδοχέας όλων των νευροτροφινών (Meeker and Williams, 2015). Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί άλλη μελέτη που να εμπλέκει την δράση του υποδοχέα TrkA στον κυτταρικό μεταβολισμό των λιποκυττάρων. Έχει αναφερθεί μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Baeza-Raja et al (2016) η οποία υπογραμμίζει το ρόλο που πιθανώς έχει ο υποδοχέας p75 στο μεταβολισμό, καθώς ποντίκια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί γενετική αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα p75 παρουσίασαν υψηλά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου και συνολικά βελτιωμένη μεταβολική εικόνα σε συνθήκες που ευνοούσαν την ανάπτυξη παχυσαρκίας και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Αξίζει να αναφερθεί πως, παρά το γεγονός ότι ο υποδοχέας p75 φάνηκε να έχει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό του λιπώδους ιστού των ποντικών, πλήρης αποσιώπηση από το σύστημα του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη άλλων παθοφυσιολογιών (Baeza-Raja et al., 2016). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι ο παράγοντας NGF δρα στον αναπνευστικό μηχανισμό των προ-λιποκυττάρων επιλεκτικά μέσω του υψηλής συγγένειας υποδοχέα TrkA και όχι μέσω του χαμηλής συγγένειας υποδοχέα p75. Ένας περιορισμός ωστόσο στο παραπάνω συμπέρασμα είναι ο χαμηλός αριθμός δειγμάτων του πειράματος.

Δεδομένου ότι ο παράγοντας NGF επηρέασε μεταβολικές λειτουργίες των προ-λιποκυττάρων 3T3L1, ελέγχθηκε στη συνέχεια, αν το μόριο αυτό επηρεάζει τη μάζα των μιτοχονδρίων σε ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Όταν χορηγήθηκε NGF σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων η μάζα των μιτοχονδρίων μειώθηκε. Η δράση του παράγοντα NGF διαμεσολαβήθηκε από τον υποδοχέα TrkA. Τα μιτοχόνδρια είναι ο σημαντικότερος δείκτης της φυσιολογίας των κυττάρων αφού η εύρυθμη λειτουργία τους δίνει στο κύτταρο την απαιτούμενη ενέργεια για την διατήρηση της ζωής, την διαίρεση, την διαφοροποίηση κ.α. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια που εμπλέκονται στην καύση των λιπιδίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση θερμότητας και η λειτουργικότητά τους συνδέεται αρνητικά με την παχυσαρκία και την ανάπτυξη νόσων που σχετίζονται με μεταβολικές δυσλειτουργίες (Fisher et al., 2012; Zhu et al., 2019). Έχουν διεξαχθεί μελέτες σχετικά με την επίδραση του παράγοντα NGF στα μιτοχόνδρια σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς. Οι Jiang et al (2017) έδειξαν ότι ο παράγοντας NGF είναι ικανός να αυξήσει τη μιτοχονδριακή λειτουργία των κυττάρων TM4 Sertoli και ειδικότερα την αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα PGC1-a, ενός σημαντικού δείκτη βιογένεσης μιτοχονδρίων. Επιπλέον, οι Martorana et al. (2018) πραγματοποίησαν πειράματα σε νευρικά κύτταρα PC12-615 χορηγώντας NGF και έδειξαν ότι αυξήθηκε η μάζα των μιτοχονδρίων, διεργασία που ευόδωσε τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας δείχνουν για πρώτη φορά ότι χορήγηση NGF απευθείας σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων οδηγεί σε μείωση της μάζας των μιτοχονδρίων. Η σημασία της χρήσης των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων τα οποία δεν διαφοροποιήθηκαν στο εργαστήριο αλλά χρησιμοποιήθηκαν απ'ευθείας μετά την απομόνωσή τους από τον ιστό, είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό. Μελλοντικές

μελέτες θα ήταν χρήσιμο να διερευνήσουν περαιτέρω τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται για την μείωση της μάζας των μιτοχονδρίων από τον παράγοντα NGF στα ώριμα λευκά λιποκύτταρα.

Ο παράγοντας NGF μείωσε τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών στα μιτοχόνδρια των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων. Η παρουσία των οξειδωτικών ριζών γενικά συνδέεται με την ανάπτυξη οξειδωτικού stress, διαδικασία που μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στη φυσιολογία των κυττάρων (Sun et al., 2017; Martorana et al., 2018; McManus, Murphy and Franklin, 2014). Μείωση των μιτοχονδριακών οξειδωτικών ριζών με την επίδραση του παράγοντα NGF έχει αναφερθεί σε άλλα είδη κυττάρων όπως στα κύτταρα TM4 Sertoli (Jiang et al (2017)) και σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων του φλοιού ποντικού (Sun et al (2017)). Από την άλλη μεριά, οι Martorana et al. (2018) υποστήριξαν ότι ο παράγοντας NGF αύξησε τον αριθμό των μιτοχονδριακών οξειδωτικών ριζών σε νευρικά κύτταρα PC12. Το γεγονός ότι ο παράγοντας NGF μειώνει τις οξειδωτικές ρίζες σε ώριμα λευκά λιποκύτταρα φανερώνει ίσως μια αντι-φλεγμονώδη δράση του παράγοντα αυτού, δεδομένου του φλεγμονώδους φαινοτύπου των λευκών λιποκυττάρων. Επιπλέον, η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνευτεί ως απλή συνέπεια της μείωσης της μάζας των μιτοχονδρίων μετά την έκθεση των ανθρώπινων λευκών λιποκυττάρων σε NGF. Ένα επόμενο βήμα στη διερεύνηση αυτής της επίδρασης θα μπορούσε να είναι κατά πόσον ο παράγοντας NGF επηρεάζει τη δράση αντι-οξειδωτικών ενζύμων και μορίων και τι σχέση έχει αυτό με τη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων.

Αφού διερευνήθηκε η σχέση του παράγοντα NGF με το μεταβολικό προφίλ των κυττάρων, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί αν ο παράγοντας NGF έχει επίδραση στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Τριάντα ώρες έκθεσης των ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων σε διαφορετικές δόσεις NGF μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των ενδοκυττάρων λιπιδίων. Η συσσώρευση λιπιδίων στον ενδοκυτταρικό χώρο είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα ωρίμανσης και υπερπλασίας των λευκών λιποκυττάρων (Cinti, 2002). Τα λιποκύτταρα προσλαμβάνουν την ενέργεια που παρέχεται από την τροφή και την αποθηκεύουν με τη μορφή λιπιδίων. Ωστόσο, η αυξανόμενη συσσώρευση λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφικά και υπερπλαστικά λιποκύτταρα με μεγάλες συνέπειες σε βάρος του μεταβολισμού, όπως παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, αθηροσκλήρυνση κ.α. (Longo et al., 2019). Το γεγονός ότι ο παράγοντας NGF μείωσε τον αριθμό των λιπιδίων σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ώριμων λευκών λιποκυττάρων υποδηλώνει ότι ο παράγοντας NGF είναι ικανός να μεταβάλλει το φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων προς ένα προφίλ που ευνοεί το μεταβολισμό των λιπιδίων και πιθανόν αποτρέπει τις αρνητικές συνέπειες της υπερτροφίας των λιποκυττάρων. Δεδομένου ότι είναι η πρώτη φορά που καταδεικνύεται η δράση του παράγοντα NGF στον αριθμό των λιπιδίων με ποσοτική μέτρηση στα παραπάνω κύτταρα, μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εξετάσουν αν ο παράγοντας NGF επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων στα κύτταρα αυτά.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η δυνατότητα της ορμόνης DHEA και του συνθετικού της αναλόγου, BNN27, να επηρεάσουν το μεταβολικό προφίλ των προ-λιποκυττάρων 3T3L1. Η ορμόνη DHEA αύξησε τα βασικά επίπεδα κυτταρικής αναπνοής στα προ-λιποκύτταρα το οποίο υποδηλώνει την ευεργετική δράση της. Αντίστοιχη δράση της ορμόνης DHEA έχει δείχθει στην εργασία των Tsui et al (2017) που φαίνεται ότι η ορμόνη DHEA αύξησε τη μεταβολική λειτουργία των ανθρώπινων κοκκιωδών κυττάρων HO-23 (human granulosa cells) υπό συνθήκες στέρησης ορού από το θρεπτικό υλικό, αυξάνοντας μεταξύ άλλων την κατανάλωση οξυγόνου. Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τη μικρονευροτροφίνη BNN27, έδειξαν ότι αυξήθηκε το δυναμικό αερόβιας αναπνοής στα προ-λιποκύτταρα μετά το stress. Αυτό το εύρημα είναι σημαντικό καθώς δείχνει ότι η νευροτροφίνη BNN27 δρα με θετικό τρόπο στα προ-λιποκύτταρα ενεργοποιώντας ταχέως (σε δύο ώρες) το δυναμικό αερόβιας αναπνοής. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι τόσο η ορμόνη DHEA όσο και η νευροτροφίνη BNN27 δεν παρουσιάζουν τις δράσεις αυτές μέσω των υποδοχέων TrkA και p75. Έτσι φαίνεται ότι η νευροτροφίνη BNN27 δρα με διαφορετικό τρόπο από τον παράγοντα NGF στα προ-λιποκύτταρα. Επομένως, μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εστιάσουν στο είδος των υποδοχέων που δεσμεύονται και δρουν αυτά τα μόρια για την ενεργοποίηση του μεταβολισμού στα προ-λιποκύτταρα.

Αναφορικά με τη μάζα των μιτοχονδρίων, φάνηκε ότι η επίδραση τόσο της ορμόνης DHEA όσο και του συνθετικού της αναλόγου, BNN27, λειτούργησαν αυξάνοντας τη μάζα των μιτοχονδρίων στα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Το γεγονός ότι η ορμόνη DHEA λειτουργεί προστατευτικά στην μεταβολική λειτουργία των ανθρώπινων κοκκιωδών κυττάρων HO-23 έχει δείχθει στην έρευνα των Lin et al (2017) όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η ορμόνη DHEA ήταν ικανή να διατηρήσει τη μάζα των μιτοχονδρίων, να αυξήσει το μιτοχονδριακό DNA καθώς και να βελτιώσει το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων κάτω από συνθήκες stress στα κύτταρα HO-23. Επιπρόσθετα, η μικρονευροτροφίνη BNN27 έχει παρουσιάσει ευεργετικές δράσεις σε νευρικά και άλλου είδους κύτταρα, για παράδειγμα προστατεύοντας τα κύτταρα από απόπτωση (Pediaditakis et al., 2016; Pitsikas and Gravanis, 2017; Tsoka et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η μικρονευροτροφίνη BNN27 έχει επίδραση στον μεταβολισμό των λιποκυττάρων αφού είναι ικανή να αυξήσει τη μάζα των μιτοχονδρίων. Αυτό συνιστά ένα σημαντικό εύρημα καθώς μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν αν η μικρονευροτροφίνη BNN27 συμβάλλει στη βιογένεση των μιτοχονδρίων οδώνοντας έτσι τον μπεζ φαινότυπο στα λιποκύτταρα.

Στις συνθήκες φαιοποίησης των προ-λιποκυττάρων προς μπεζ λιποκύτταρα, η ορμόνη DHEA αύξησε σημαντικά τη μάζα των μιτοχονδρίων στα πειράματα φαιοποίησης των κυττάρων 3T3L1. Είναι πλέον γνωστό ότι η ορμόνη T3 αυξάνει την έκφραση βιοσυνθετικών δεικτών των μιτοχονδρίων καθώς και τη μάζα των μιτοχονδρίων (Lee et al., 2019). Γι αυτό τον λόγο, η φαιοποίηση των προ-λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θερμογενετικό υλικό που περιείχε T3, ροζιγλιταζόνη και IBMX για την επαγωγή του μπεζ φαινοτύπου (Asano et al., 2013). Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η παρουσία της ορμόνης DHEA λειτούργησε θετικά, σε συνδυασμό με την δράση των παραπάνω παραγόντων, αυξάνοντας τη μάζα των

μιτοχονδρίων. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική καθώς επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα του μορίου της DHEA στην διατήρηση της ομοιόστασης του λιπώδους ιστού (Tagliaferro et al., 1995; Fujioka et al., 2019; McNelis et al., 2013). Αξίζει να αναφερθεί ότι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες που διερευνούν την αλληλεπίδραση άλλων μορίων όπως η ορμόνη DHEA με θερμογενετικούς παράγοντες στο φαινότυπο των λιποκυττάρων, όπως στην παρούσα εργασία.

Ανάλογα αποτελέσματα με την ορμόνη DHEA είχε και η επίδραση της μικρονευροτροφίνης BNN27 υπό συνθήκες φαιοποίησης στην μάζα των μιτοχονδρίων στα κύτταρα 3T3L1, ένα αποτέλεσμα που δεν επιβεβαιώθηκε στις ανθρώπινες καλλιέργειες λευκών προ-λιποκυττάρων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο αριθμός του δείγματος για τα πειράματα που περιλάμβαναν τα ανθρώπινα λευκά προ-λιποκύτταρα ήταν μικρός. Παρόλα αυτά, είναι η πρώτη φορά που εξετάζεται η επίδραση της συγκεκριμένης συνθετικής μικρονευροτροφίνης στη μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων. Μάλιστα, δεδομένης της θετικής της δράσης τόσο σε επίπεδο μεταβολικής λειτουργίας όσο και στην ανάπτυξη των μιτοχονδρίων, υποδεικνύεται ένας θετικός ρόλος του μορίου BNN27 στο μεταβολισμό των λιποκυττάρων. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να ρίξουν φως στη δράση του BNN27 στη γονιδιακή έκφραση σημαντικών θερμογενετικών γονιδίων αλλά και σε παράγοντες βιογένεσης μιτοχονδρίων στα κύτταρα αυτά.

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση των μορίων DHEA και BNN27 στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Η ορμόνη DHEA μείωσε σημαντικά τον αριθμό των λιπιδίων σε ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την επίδραση της ορμόνης DHEA στο λιπώδη ιστό (Karbowska and Kochan, 2013; Tagliaferro et al., 1995). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν είναι γνωστό μέσω ποιων υποδοχέων η ορμόνη DHEA ασκεί τη δράση αυτή στα συγκεκριμένα κύτταρα καθώς και το αν η δράση που καταγράφηκε συνολικά στα παραπάνω πειράματα οφείλεται καθαρά στο μόριο της DHEA ή σε κάποιο μεταβολίτη της. Από την άλλη μεριά, η μικρονευροτροφίνη BNN27 δεν μετέβαλε τον αριθμό των λιπιδίων στα ώριμα λευκά λιποκύτταρα.

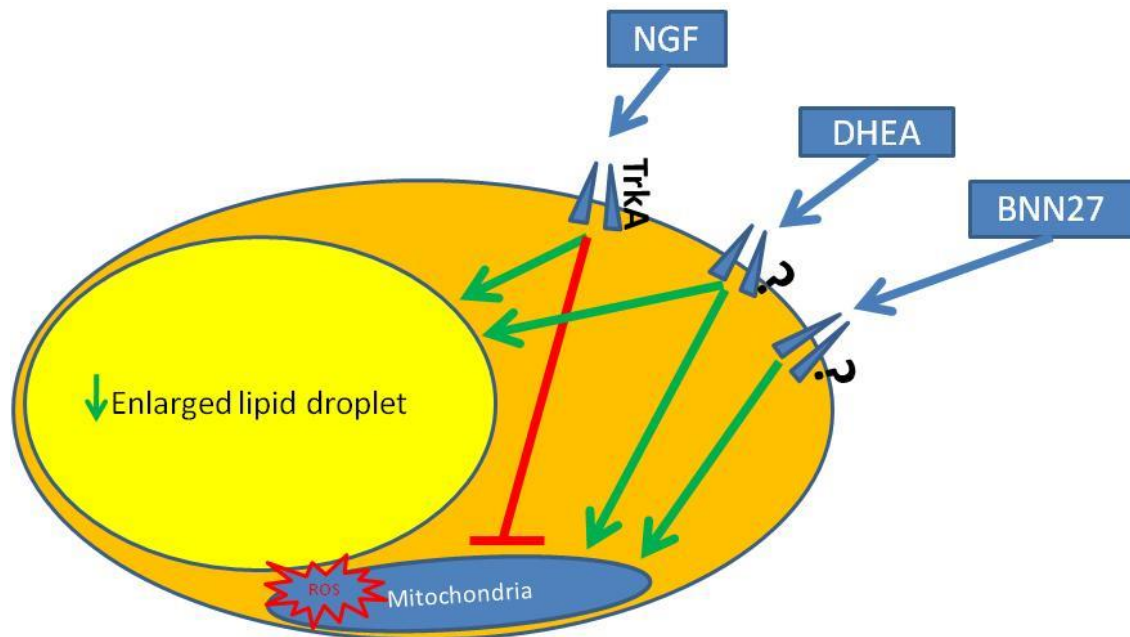
6. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη της παχυσαρκίας και των συνοδών μεταβολικών νοσημάτων συνδέεται με την υπέρμετρη ανάπτυξη του λευκού λιπώδους ιστού που χαρακτηρίζεται από την υπερτροφία των λευκών λιποκυττάρων και την μεταβολική τους δυσλειτουργία. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν ο παράγοντας NGF, η ορμόνη DHEA και η συνθετική μικρονευροτροφίνη BNN27 που έχει δείχθει να συνδέονται εκλεκτικά με τους υποδοχείς των νευροτροφινών, έχουν επίδραση στο μεταβολικό προφίλ και στο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα.

Ο παράγοντας NGF αύξησε την μιτοχονδριακή αναπνοή και την γλυκόλυση στα προ-λιποκύτταρα 3T3L1 και μείωσε την μιτοχονδριακή μάζα, τον αριθμό των οξειδωτικών ριζών και τον αριθμό των λιπιδίων στα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Όλες οι παραπάνω δράσεις φαίνεται να διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα TrkA. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας NGF έχει πιθανώς προστατευτική δράση κατά της υπέρμετρης ανάπτυξης του λευκού λιπώδους ιστού. Το γεγονός αυτό ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω έρευνες που θα ρίξουν φως στους μηχανισμούς με τους οποίους δρα ο παράγοντας NGF στα λιποκύτταρα, δηλαδή αν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων με λιπολυτική δράση και ποια θα μπορούσαν να είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενδέχεται να επηρεάζουν τη μεταβολική λειτουργία και το φαινότυπο των λιποκυττάρων.

Η ορμόνη DHEA αύξησε τα επίπεδα της κυτταρικής αναπνοής στα προ-λιποκύτταρα. Επιπλέον, μείωσε τον αριθμό των λιπιδίων και αύξησε τη μάζα των μιτοχονδρίων στα ανθρώπινα ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Σε συνθήκες φαιοποίησης των προ-λιποκυττάρων προς μεζ λιποκύτταρα, η ορμόνη DHEA αύξησε σημαντικά τη μάζα των μιτοχονδρίων. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τη θετική δράση της ορμόνης DHEA στον μεταβολισμό και προτείνουν έναν πιθανό ρόλο για την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων της ορμόνης αυτής στον λευκό λιπώδη ιστό. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι η ορμόνη DHEA μεταβολίζεται ταχέως σε ανδρογονικούς και οιστρογονικούς μεταβολίτες. Έτσι, οι παραπάνω δράσεις θα μπορούσαν να αποδοθούν στους μεταβολίτες της.

Η ανάγκη για τη σύνθεση μορίων που θα μιμούνται τη δράση της ορμόνης DHEA παραλείποντας τις δράσεις των μεταβολιτών της ώθησε στην σύνθεση του μορίου BNN27, το οποίο είναι ένα συνθετικό παράγωγο της DHEA που δεν δρα στους οιστρογονικούς ή στους ανδρογονικούς υποδοχείς αλλά συνδέεται εκλεκτικά με τους υποδοχείς των νευροτροφινών. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η μικρονευροτροφίνη BNN27 αύξησε τη μεταβολική λειτουργία αλλά δεν επηρέασε τον αριθμό των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Τόσο οι δράσεις της ορμόνης DHEA όσο και οι δράσεις της νευροτροφίνης BNN27 δεν φαίνεται να διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα TrkA. Από τα παραπάνω, είναι πιθανόν η ορμόνη DHEA να δρα άμεσα για να αυξήσει την μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων ενώ η δράση της DHEA στην μείωση του αριθμού των λιπιδίων να οφείλεται στους μεταβολίτες της.



Σχεδιάγραμμα 1. Συνοπτική απεικόνιση της δράσης του παράγοντα NGF, της ορμόνης DHEA και της μικρονευροτροφίνης BNN27 στα λιποκύτταρα.

Στο **σχεδιάγραμμα 1** απεικονίζονται συνοπτικά τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι ο παράγοντας NGF, η ορμόνη DHEA και η μικρονευροτροφίνη BNN27 φαίνεται να ρυθμίζουν ποικιλοτρόπως τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων και τα συμπεράσματα της μελέτης συνεισφέρουν στην κατανόηση της φυσιολογίας του ανθρώπινου λιπώδους ιστού.

7. Βιβλιογραφία

- Abdullahi, A., & Jeschke, M. G. (2016). White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 27(8), 542–552. doi:10.1016/j.tem.2016.06.006
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 92(6-7), 229–236. doi:10.1016/j.ejcb.2013.06.001
- Asano, H., Kanamori, Y., Higurashi, S., Nara, T., Kato, K., Matsui, T., & Funaba, M. (2014). Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *The Journal of veterinary medical science*, 76(1), 57–64. doi:10.1292/jvms.13-0359
- Baeza-Raja, B., Sachs, B. D., Li, P., Christian, F., Vagena, E., Davalos, D., ... Akassoglou, K. (2016). p75 Neurotrophin Receptor Regulates Energy Balance in Obesity. *Cell reports*, 14(2), 255–268. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.028
- Bartelt, A., & Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(1), 24–36. doi:10.1038/nrendo.2013.204
- Bianco, A. C., & Silva, J. E. (1987). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 79(1), 295–300. doi:10.1172/JCI112798
- Bonet, M. L., Mercader, J., & Palou, A. (2017). A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie*, 134, 99–117. doi:10.1016/j.biochi.2016.12.014
- Brychta, R. J., & Chen, K. Y. (2017). Cold-induced thermogenesis in humans. *European journal of clinical nutrition*, 71(3), 345–352. doi:10.1038/ejcn.2016.223
- Calogeropoulou, T., Avlonitis, N., Minas, V., Alexi, X., Pantzou, A., Charalampopoulos, I., ... Gravanis, A. (2009). Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), 6569–6587. doi:10.1021/jm900468p
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*, 84(1), 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *The Journal of experimental biology*, 214(Pt 2), 242–253. doi:10.1242/jeb.050989
- Cao, Y., Wang, H., & Zeng, W. (2018). Whole-tissue 3D imaging reveals intra-adipose sympathetic plasticity regulated by NGF-TrkA signal in cold-induced beiging. *Protein & cell*, 9(6), 527–539. doi:10.1007/s13238-018-0528-5
- Chu, D. T., & Gawronska-Kozak, B. (2017). Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response. *Biochimie*, 138, 102–105. doi:10.1016/j.biochi.2017.04.017

- Cinti S. (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 319–328. doi:10.1079/pns200192
- Cinti S. (2002). Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *Journal of endocrinological investigation*, 25(10), 823–835. <https://doi.org/10.1007/BF03344046>
- Cinti S. (2019). Anatomy and physiology of the nutritional system. *Molecular aspects of medicine*, 68, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.04.001>
- Clark, B. J., Prough, R. A., & Klinge, C. M. (2018). Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones*, 108, 29–73. doi:10.1016/bs.vh.2018.02.003
- Colitti, M., Loor, J. J., & Stefanon, B. (2015). Expression of NGF, BDNF and their receptors in subcutaneous adipose tissue of lactating cows. *Research in veterinary science*, 102, 196–199. doi:10.1016/j.rvsc.2015.08.016
- Cousin, B., Cinti, S., Morrioni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of cell science*, 103 (Pt 4), 931–942.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., ... Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*, 360(15), 1509–1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780
- Dermitzaki, E., Liapakis, G., Androulidaki, A., Venihaki, M., Melissas, J., Tsatsanis, C., & Margioris, A. N. (2014). Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) and the urocortins are potent regulators of the inflammatory phenotype of human and mouse white adipocytes and the differentiation of mouse 3T3L1 pre-adipocytes. *PloS one*, 9(5), e97060. doi:10.1371/journal.pone.0097060
- Ducluzeau, P. H., Priou, M., Weitheimer, M., Flamment, M., Duluc, L., Iacobazi, F., ... Malthièry, Y. (2011). Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. *Journal of physiology and biochemistry*, 67(3), 285–296. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0074-6>
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 105(2), 141–150. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
- Fantuzzi, G., Mazzone, T., Goldberg, A. P., & Fried, S. K. (2007). *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Fodelianaki, G., Lansing, F., Bhattarai, P., Troullinaki, M., Zeballos, M. A., Charalampopoulos, I., ... Alexaki, V. I. (2019). Nerve Growth Factor modulates LPS - induced microglial glycolysis and inflammatory responses. *Experimental cell research*, 377(1-2), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.023>

- Frade, J. M., & Barde, Y. A. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(2), 137–145. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<137::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q
- Fujimoto, Y., Hashimoto, O., Shindo, D., Sugiyama, M., Tomonaga, S., Murakami, M., Matsui, T., & Funaba, M. (2019). Metabolic changes in adipose tissues in response to β_3 -adrenergic receptor activation in mice. *Journal of cellular biochemistry*, 120(1), 821–835. https://doi.org/10.1002/jcb.27443
- Fujioka, K., Kajita, K., Wu, Z., Hanamoto, T., Ikeda, T., Mori, I., ... Ishizuka, T. (2012). Dehydroepiandrosterone reduces preadipocyte proliferation via androgen receptor. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 302(6), E694–E704. doi:10.1152/ajpendo.00112.2011
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European journal of endocrinology*, 170(5), R159–R171. doi:10.1530/EJE-13-0945
- Goossens G. H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*, 94(2), 206–218. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.010
- Goossens G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity facts*, 10(3), 207–215. doi:10.1159/000471488
- Green H. & Kehinde O. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1:113–116
- Henry, S. L., Bensley, J. G., Wood-Bradley, R. J., Cullen-McEwen, L. A., Bertram, J. F., & Armitage, J. A. (2012). White adipocytes: more than just fat depots. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(3), 435–440. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.011
- Herz, C. T., & Kiefer, F. W. (2019). Adipose tissue browning in mice and humans. *The Journal of endocrinology*, 241(3), R97–R109. doi:10.1530/JOE-18-0598
- Ibán-Arias, R., Lisa, S., Mastrodimou, N., Kokona, D., Koulakis, E., Iordanidou, P., ... Thermos, K. (2018). The Synthetic Microneurotrophin BNN27 Affects Retinal Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*, 67(2), 321–333. doi:10.2337/db17-0391
- Ibrahim M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), 11–18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x
- Inagaki, T., Sakai, J., & Kajimura, S. (2016). Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(8), 480–495. doi:10.1038/nrm.2016.62

- Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., & Genrikhs, E. E. (2017). Role of Nerve Growth Factor in Plasticity of Forebrain Cholinergic Neurons. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(3), 291–300. doi:10.1134/S0006297917030075
- Ito, K., & Enomoto, H. (2016). Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis. *Journal of biochemistry*, 160(2), 77–85. doi:10.1093/jb/mvw037
- Jiang, Y. W., Zhao, Y., Chen, S. X., Chen, L., Li, C. J., & Zhou, X. (2018). NGF promotes mitochondrial function by activating PGC-1 α in TM4 Sertoli cells. *Andrologia*, 50(1), 10.1111/and.12837. <https://doi.org/10.1111/and.12837>
- Karbowska, J., & Kochan, Z. (2013). Effects of DHEA on metabolic and endocrine functions of adipose tissue. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 14(2), 65–74. doi:10.1515/hmbci-2013-0009
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(6), 2548–2556. doi:10.1210/jc.2004-0395
- Klingenspor M. (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Experimental physiology*, 88(1), 141–148. doi:10.1113/eph8802508
- Koppen, A., & Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: the PPAR γ coregulator story. *FEBS letters*, 584(15), 3250–3259. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.035
- Kumari, M., Heeren, J., & Scheja, L. (2018). Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Seminars in immunopathology*, 40(2), 189–202. doi:10.1007/s00281-017-0668-3
- Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, V. I., Avlonitis, N., Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., ... Gravanis, A. (2011). Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS biology*, 9(4), e1001051. doi:10.1371/journal.pbio.1001051
- Lee, K. Y., Luong, Q., Sharma, R., Dreyfuss, J. M., Ussar, S., & Kahn, C. R. (2019). Developmental and functional heterogeneity of white adipocytes within a single fat depot. *The EMBO journal*, 38(3), e99291. doi:10.15252/embj.201899291
- Lee, Y. H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(3), 358–369. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.011
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(3), 107–114. doi:10.1016/j.tem.2008.11.005
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>

- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Martinez de Mena, R., Scanlan, T. S., & Obregon, M. J. (2010). The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology*, 151(10), 5074–5083. doi:10.1210/en.2010-0533
- Martorana, F., Gaglio, D., Bianco, M. R., Aprea, F., Virtuoso, A., Bonanomi, M., Alberghina, L., Papa, M., & Colangelo, A. M. (2018). Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. *Cell death & disease*, 9(3), 391. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0429-9>
- McManus, M. J., Murphy, M. P., & Franklin, J. L. (2014). Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and -independent neuronal deaths. *Molecular and cellular neurosciences*, 63, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.09.002>
- McNelis, J. C., Manolopoulos, K. N., Gathercole, L. L., Bujalska, I. J., Stewart, P. M., Tomlinson, J. W., & Arlt, W. (2013). Dehydroepiandrosterone exerts antigluco-corticoid action on human preadipocyte proliferation, differentiation, and glucose uptake. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 305(9), E1134–E1144. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00314.2012>
- Meeker, R. B., & Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural regeneration research*, 10(5), 721–725. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156967>
- Morrison, S. F., & Nakamura, K. (2019). Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annual review of physiology*, 81, 285–308. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114546
- Müller, M. J., & Bosy-Westphal, A. (2013). Adaptive thermogenesis with weight loss in humans. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(2), 218–228. doi:10.1002/oby.20027
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(2), E444–E452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006
- Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., Prousis, K. C., Zervou, M., Arévalo, J. C., Alexaki, V. I., ... Gravanis, A. (2016). Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation. *Neuropharmacology*, 111, 266–282. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.09.007
- Pediaditakis, I., Kourgiantaki, A., Prousis, K. C., Potamitis, C., Xanthopoulos, K. P., Zervou, M., ... Gravanis, A. (2016). BNN27, a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative, Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor, Rescuing Cerebellar

Granule Neurons from Apoptosis. *Frontiers in pharmacology*, 7, 512. doi:10.3389/fphar.2016.00512

Peeraully, M. R., Jenkins, J. R., & Trayhurn, P. (2004). NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 287(2), E331–E339. doi:10.1152/ajpendo.00076.2004

Pitsikas, N., & Gravanis, A. (2017). The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 140, 145–153. doi:10.1016/j.nlm.2017.03.004

Rajala, M. W., & Scherer, P. E. (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144(9), 3765–3773. doi:10.1210/en.2003-0580

Roh, H. C., Tsai, L., Shao, M., Tenen, D., Shen, Y., Kumari, M., ... Rosen, E. D. (2018). Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell metabolism*, 27(5), 1121–1137.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.005

Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(12), 885–896. doi:10.1038/nrm2066

Sánchez, J., Pérez-Heredia, F., Priego, T., Portillo, M. P., Zamora, S., Garaulet, M., & Palou, A. (2008). Dehydroepiandrosterone prevents age-associated alterations, increasing insulin sensitivity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(12), 809–818. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.10.005

Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a008417. doi:10.1101/cshperspect.a008417

Schoettl, T., Fischer, I. P., & Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *The Journal of experimental biology*, 221(Pt Suppl 1), jeb162958. doi:10.1242/jeb.162958

Silva J. E. (1988). Full expression of uncoupling protein gene requires the concurrence of norepinephrine and triiodothyronine. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 2(8), 706–713. doi:10.1210/mend-2-8-706

Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual review of neuroscience*, 24, 1217–1281. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1217

Sornelli, F., Fiore, M., Chaldakov, G. N., & Aloe, L. (2009). Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: results from experimental stress and diabetes. *General physiology and biophysics*, 28 Spec No, 179–183.

Sun, Z., Hu, W., Yin, S., Lu, X., Zuo, W., Ge, S., & Xu, Y. (2017). NGF protects against oxygen and glucose deprivation-induced oxidative stress and apoptosis by up-

regulation of HO-1 through MEK/ERK pathway. *Neuroscience letters*, 641, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.046>

Tagliaferro, A. R., Ronan, A. M., Payne, J., Meeker, L. D., & Tse, S. (1995). Increased lipolysis to beta-adrenergic stimulation after dehydroepiandrosterone treatment in rats. *The American journal of physiology*, 268(6 Pt 2), R1374–R1380. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.6.R1374>

Tang, Q. Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual review of biochemistry*, 81, 715–736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718

Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell metabolism*, 17(5), 644–656. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008

Tsiloulis, T., & Watt, M. J. (2015). Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Progress in molecular biology and translational science*, 135, 175–201. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.06.016

Tsoka, P., Matsumoto, H., Maidana, D. E., Kataoka, K., Naoumidi, I., Gravanis, A., Vavvas, D. G., & Tsilimbaris, M. K. (2018). Effects of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, on experimental retinal detachment-induced photoreceptor cell death. *Scientific reports*, 8(1), 10661. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28633-1>

Tsui, K. H., Wang, P. H., Lin, L. T., & Li, C. J. (2017). DHEA protects mitochondria against dual modes of apoptosis and necroptosis in human granulosa HO23 cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(2), 101–110. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0016>

von Essen, G., Lindsund, E., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 313(5), E515–E527. doi:10.1152/ajpendo.00097.2017

Wang, B., Jenkins, J. R., & Trayhurn, P. (2005). Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 288(4), E731–E740. doi:10.1152/ajpendo.00475.2004

Wang, F., Koskela, A., Hämäläinen, E., Turpeinen, U., Savolainen-Peltonen, H., Mikkola, T. S., ... Tikkanen, M. J. (2011). Quantitative determination of dehydroepiandrosterone fatty acyl esters in human female adipose tissue and serum using mass spectrometric methods. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 124(3-5), 93–98. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.01.014

Weiner, J., Hankir, M., Heiker, J. T., Fenske, W., & Krause, K. (2017). Thyroid hormones and browning of adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*, 458, 156–159. doi:10.1016/j.mce.2017.01.011

Winther, S., Isidor, M. S., Basse, A. L., Skjoldborg, N., Cheung, A., Quistorff, B., & Hansen, J. B. (2018). Restricting glycolysis impairs brown adipocyte glucose and oxygen consumption. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 314(3), E214–E223. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00218.2017>

Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016

Wu, J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?. *Genes & development*, 27(3), 234–250. doi:10.1101/gad.211649.112

Zhu, Q., Glazier, B. J., Hinkel, B. C., Cao, J., Liu, L., Liang, C., & Shi, H. (2019). Neuroendocrine Regulation of Energy Metabolism Involving Different Types of Adipose Tissues. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2707. <https://doi.org/10.3390/ijms20112707>