Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής

Διδακτορική Διατριβή

«Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην ανάπτυξη λιπώδους διήθησης του ήπατος εξαιτίας υπερθερμιδικής δίαιτας»

> Ελισάβετ Κοδέλα Βιολόγος

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας

Η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) Ερευνητική ομάδα Ερευνήτριας Α΄, Αικατερίνης Καραλή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Μαρία Βενυχάκη

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Μαρία Βενυχάκη Ερευνήτρια Α΄, Υπεύθυνη τομέα Αναπτυξιακής Βιολογίας, Αικατερίνη Καραλή Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Διευθυντής Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας, Ανδρέας Μαργιωρής

Μέλη επταμελούς επιτροπής αξιολόγησης:

Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Μαρία Βενυχάκη Ερευνήτρια Α΄, Υπεύθυνη τομέα Αναπτυξιακής Βιολογίας, Αικατερίνη Καραλή Καθηγητής Φαρμακολογίας, Αχιλλέας Γραβάνης Καθηγητής Βιοχημείας, Δημήτρης Καρδάσης Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Χρήστος Τσατσάνης Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας, Γεώργιος Νότας

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών και πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το τμήμα Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ερευνήτρια του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών Αικατερίνη Καραλή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δέχοντάς με ως μέλος της εργαστηριακής της ομάδας, την παραίνεσή της για το αντικείμενο έρευνας, τη συνεχή επιστημονική της επίβλεψη και καθοδήγηση καθ΄όλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής, τις πολύτιμες συμβουλές και τη στήριξή της.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Ανδρέα Μαργιωρή και την Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Μαρία Βενυχάκη για το ενδιαφέρον και το χρόνο τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους συνεργάτες της Ερευνήτριας Αικατερίνης Καραλή: Τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Σταμάτιο Θεοχάρη, για όλη τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε σχετικά με τις ιστολογικές μελέτες και αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν τη διδακτορική διατριβή. Τον υπεύθυνο TOU Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής TOU Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών Νίκο Κωστομητσόπουλο για τη συνεργασία του όσον αφορά στα πειραματικά πρωτόκολλα που περιλάμβαναν τη χρήση μυών και τη βοήθειά του στη δημοσίευση της μελέτης σε επιστημονικό περιοδικό. Τους Ερευνητές του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών Ηλία Μανωλάκο, Τόνια Βλάχου, Παναγιώτη Τσακανίκα και Ευγενία Γιαννοπούλου για τη συνεργασία και τη βοήθεια στην ανάλυση των πειραμάτων πρωτεομικής. Το Δημήτρη Σκόκο της εταιρίας Regeneron Pharmaceuticals Inc για τις συμβουλές και τη βοήθεια κατά τις πειραματικές διεργασίες των θετών μεταφορών συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών σε κατάλληλους μύες καθώς και τους Marc Sleeman και Kihwa Kang, της ίδιας

εταιρίας, για τη διεξαγωγή μελέτης έκφρασης γονιδίων με τη χρήση μικροσυστοιχιών. Τον Καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών Κυριάκο Κυπραίο και την Ελένη Καραβία για τις μετρήσεις τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης και ηπατικών τριγλυκεριδίων, που διεξήχθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Ερευνητή του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών Δημήτρη Μπέη για τη συνεργασία μας στο πλαίσιο πειραμάτων πρόκλησης παχυσαρκίας στο πειραματικό μοντέλο zebrafish (*Danio rerio*), καθώς και τις συμβουλές του για την εκπόνηση πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Γιασεμή Κουτμάνη που μου δίδαξε τις περισσότερες μεθοδολογίες και τεχνικές, και μου προσέφερε το ενδιαφέρον της, τη φιλία της και τη συμπαράστασή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Μαρία Μωυσίδου, Σέβη Καραλιώτα, Χριστίνα Κουσκούτη, Στέλλα Ουραϊλίδου και Κωστάντια Κοδέλα για τη στενή συνεργασία τους σε όλες τις επιστημονικές μελέτες με θέμα την παχυσαρκία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και φίλους του εργαστηρίου Αναπτυξιακής Βιολογίας, και ειδικότερα τους Χριστίνα Χανδρά, Θάλεια Τέλη, Ζωή Χανιώτου, Παναγιώτη Γιαννόγκωνα, Μαρίλια Ιωάννου και Θεοδώρα Τζαναβάρη για τη συνεργασία τους, τη βοήθειά τους και το πολύ ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος	ii
Πίνακας Συντομογραφιών	vi
Α. Περίληψη	ix
B. Summary	.xii
1. Εισαγωγή	1
1.1 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος	1
1.2 Διάγνωση ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος	1
1.2.1 Κλινική εικόνα	1
1.2.2 Βιοχημικές αναλύσεις – Βιοδείκτες	1
1.2.3 Απεικονιστικές μέθοδοι	2
1.2.4 Βιοψία ήπατος	2
1.3 Παθογένεση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος	5
1.3.1 Αυξημενή εναποθεσή λιπαρων οξεων στο ηπαρ	6
1.3.2 Μειωμενη οζειοωση/εκκριση λιπαρων οζεων	ð
1.3.3 Εζελίζη στεατωσής	10
1.4 1 Αυτώδης ιστός	. 10
1.4.2 Ήπαο	. 11
1.4.3 Κύτταρα μιελικής σειράς	14
1 4 4 Κύτταρα λευφικής σειράς	17
1.4.5 Φλενμονή και Ινσουλινοαντίσταση	
1.5 Παχυσαρκία και λιπώδης ιστός: φαιοποιημένος λιπώδης ιστός	
1.6 Γενετικά υπόβαθρα μυών στην πρόκληση παχυσαρκίας	26
2 Σκοπός	28
2. Σκοπός 3. Υλικά και μέθοδοι	28 29
2. Σκοπός 3. Υλικά και μέθοδοι	28 29
 2. Σκοπός 3. Υλικά και μέθοδοι	28 29 29
 2. Σκοπός 3. Υλικά και μέθοδοι	28 29 29 λή
 Σκοπός	28 29 29 λή 29
 Σκοπός	28 29 29 λή 29 29
 Σκοπός	28 29 29 λή 29 31
 Σκοπός	28 29 29 29 31 32
 Σκοπός	28 29 29 29 31 32 32
 Σκοπός	28 29 λή 29 31 ς 32 33 33
 Σκοπός	29 29 λή 29 31 5 32 33 33 34
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 33
 Σκοπός	28 29 λή 29 31 5 32 33 33 33 34 37 37
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 37 37 37
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 33 37 37
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 33 33 37 37 38 39
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 33 33 37 37 37 38 39 40
 Σκοπός	28 29 31 32 33 33 33 33 33 33 37 37 37 37 37 37 37 37 39 40
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 34 33 33 34 33 34 33 34 33 34 33 34 33 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34 34
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 34 33 33 34 33 34 33 34 33 34 33 34 33 34
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 33 33 33 33 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37 31 31 37 34 37 37 37 40
 Σκοπός	28 29 29 31 32 33 34 33 33 34 33 33 34 33 34 33 34 34 37 37 37 34

	3.20 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες	53
	3.21 Έγκλειση ιστών σε παραφίνη και λήψη τομών σε μικροτόμο	54
	3.22 Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών	55
	3.23 Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης (H&E)	56
	3.24 Αφυδάτωση των ιστών και επικόλληση επικαλυπτρίδων	56
	3.25 Χρώση κρυοτομών με Oil Red Ο	57
	3.26 Ανοσοϊστοχημεία φθορισμού	59
	3.27 Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς Φάσης Με Σύνδεση Ενζύμου	61
	3.28 Μικροσκοπία	62
	3.29 Στατιστική Ανάλυση	63
4.	Αποτελέσματα	64
	4.1 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD σε μύες με τροποποιημένο	
	ανοσολονικό σύστημα – Απουσία λεμφοκυττάρων	64
	4.1.1 Μετρήσεις σωματικού βάρους και κατανάλωσης τροφής	64
	4.1.2 Δοκιμασίες ανοχής στη γλυκόζη (GTT), αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT) και μέτρησι	1
	επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων	66
	4.1.3 Μελέτη μεταβολικών παραμέτρων με έμμεση θερμιδομετρία	67
	4.1.4 Μελέτη ηπατικού ιστού	70
	4.1.5 Μελέτη επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού	75
	4.1.6 Μελέτη υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού	80
	4.1.7 Έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη φλεγμονή που συνοδεύει την ανάπτυξη	
	παχυσαρκίας	84
	4.1.8 Διαφορές στην απόκριση σε πρόκληση παχυσαρκίας μυών με διαφορετικό γενετικό	
	υπόβαθρο	89
	4.2 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης NAFLD σε μύες με τροποποιημένο ανοσολογικό σύστημ Απενερνοποίηση NKT κυττάρων	α – 98
	4.3 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης NASH σε μύες με τροποποιημένο ανοσολογικό σύστημα	- I
	Θετή μεταφορά κυτταροτοξικών CD8⁺ T λεμφοκυττάρων	104
5.	Συζήτηση	110
6.	Βιβλιογραφία	123
7.	Δημοσιεύσεις	130
	III	

	δεστισμοτραφίωτ		
ACAA1a	Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase 1a	JNK1	c-Jun N-terminal Kinase 1
ACAA1b	Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase 1b	Lipe	Hormone Sensitive Lipase
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase	LPL	Lipoprotein Lipase
ACOX1	Acyl-Coenzyme A Oxidase 1	LXRα	Liver X Receptor Alpha
ACS	Acyl-CoA Synthetase	MCAD	Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
Adipoq	Adiponectin	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
ADP	Adenosine Diphosphate	MetEnk	Methionine-Enkephalin
Adr1a	α-adrenergic receptor subtype 1	METRNL	Meteorin-like
AdRβ3	Adrenergic Receptor β3	Mgl	Macrophage Galactose- type Lectin
ALT	alanine aminotransferase	Mgl1	Macrophage Galactose- type Lectin 1
AMPK	AMP-Dependent Protein Kinase	MgI2	Macrophage Galactose- type Lectin 2
AP	alkaline phosphatase	MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
AP-1	Activator Protein 1	МРО	Myeloperoxidase
apoB-100	Apolipoprotein B-100	MR	Metabolic Rate
Arg1	Arginase 1	Mrc	Mannose receptor
AST	aspartate transaminase	Mrc1	Mannose receptor 1
ATP	Adenosine Triphosphate	Mrc2	Mannose receptor 2
CASP1	Caspase 1	МТР	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2	MYF5	Myogenic Factor 5
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5	NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
cDC	classical Dendritic cell	NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
ChREBP	Carbohydrate Responsive Element Binding Protein	NASH	Non Alcoholic Steatohepatitis
Cidea	Cell Death-Inducing DFFA-like Effector a	NF-ĸB	Nuclear factor-Kb
CLAMS	Comprehensive Lab Animal Monitoring System	NKT	Natural Killer T
Clec7a	Dectin-1	NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
Сох	Cytochrome C Oxidase	NO	Nitric Oxide
CPT-1	Carnitine Palmitoyltransferase- 1	Nos2	Nitric Oxide Synthase 2

Πίνακας Συντομογραφιών

DAP	Dihydroxy Acetone Phosphate	Otop1	Otopetrin 1
DC	Dendritic cell	PAI1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
DGAT	Diglyceride Acyltransferase	PAX7	Paired Box 7
Dio2	iodothyronine deiodinase 2	pDC	plasmacytoid Dendritic cell
DNA	Deoxyribonucleic acid	PDGFR-A	Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha
ECH	Enoyl CoA Hydratase	PEPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
EHHADH	Enoyl-CoA, Hydratase/3- Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase	PGC1α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha
ESPA	N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m- anisidine sodium	PGC-1β	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1-beta
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	РІЗК	Phosphoinositide-3 Kinase
FASN	Fatty Acid Synthase	РКА	Protein Kinase A
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21	РКВ	protein kinase B
fndc5	Fibronectin type III Domain Containing 5	POD	Peroxidase
FOXO1	Forkhead box protein O1	PP2A	Protein Phosphatase 2A
G-1-P	Glycerol 1-phosphate	ΡΡΑRα	Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha
G6Pase	Glucose 6-Phosphatase	Pparγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor	PPARδ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor delta
GK	Glycerol Kinase	PRDM16	PR Domain Containing 16
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	RAG	Recombination-Activating Gene
GPO	Glycerol Phosphate Oxidase	RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
GTT	Glucose Tolerance Test	RBP4	Retinol Binding Protein 4
Hadha	Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-Ketoacyl- CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase (Trifunctional Protein), Alpha Subunit	RER	Respiratory Exchange Ratio
HFD	High Fat Diet	RNA	Ribonucleic acid
HMG- CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	ROS	Reactive Oxygen Species
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance	SAA3	Serum Amyloid A-3

Πίνακας Συντομογραφιών

HSL	Hormone Sensitive Lipase	SCAP	SREBP Cleavage-Activated Protein
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule-1	SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
ld2	Inhibitor of DNA binding 2	socs	Suppressor of Cytokine Signalling
IFNγ	Interferon gamma	SOCS1	Suppressor of Cytokine Signalling 1
ІКК	Inhibitor of KB kinase	SOCS3	Suppressor of Cytokine Signalling 3
ικκβ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	SREBP1c	Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c
IL-1	Interleukin 1	STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
IL-10	Interleukin 10	STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
IL-12	Interleukin 12	STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
IL-13	Interleukin 13	SVF	Stromal Vascular Fraction
IL-18	Interleukin 18	TCR	T Cell Receptor
IL-18	Interleukin 18	TEE	Total Energy Expenditure
IL-1Ra	Interleukin-1 Receptor antagonist	Tgfb1	Transforming Growth Factor beta 1
IL-1β	Interleukin 1β	тн	Tyrosine Hydroxylase
IL-23	Interleukin 23	TLR	Toll Like Receptor
IL-3	Interleukin 3	TLR2	Toll Like Receptor 2
IL-33	Interleukin 33	TLR4	Toll Like Receptor 4
IL-4	Interleukin 4	TNFSF14	Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 14
IL-5	Interleukin 5	TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
IL-6	Interleukin 6	Treg	T regulatory
ILC2	Innate Lymphoid 2	Ucp1	uncoupling protein 1
iNKT	invariant NKT	VLDL	Very Low Density Lipoprotein
INSIG	Insulin Induced Gene	vNKT	variant NKT
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1	γ-GT	gamma-glutamyl transpeptidase
ITT	Insulin Tolerance Test	ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος
ΙκΒ	Inhibitor of Kb	ЕΔ	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
JNK	c-Jun N-terminal Kinase		

Πίνακας Συντομογραφιών

Α. Περίληψη

Η «μη αλκοολικής αιτιολογίας» λιπώδης νόσος του ήπατος (nonalcoholic fatty liver disease-NAFLD) χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ και περιλαμβάνει ένα φάσμα, όσον αφορά στη βαρύτητα της νόσου, που εκτείνεται από απλή στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα (nonalcoholic steatohepatitis-NASH) μέχρι τις πλέον σοβαρές μορφές της νόσου, την ηπατική κίρρωση και τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Η παθογένεση της NAFLD οφείλεται σε μεταβολικές διαταραχές συνυφασμένες με ανάπτυξη παχυσαρκίας και της συνεπακόλουθης εμφάνισης αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης. Η παχυσαρκία οδηγεί σε συστηματική φλεγμονή, η οποία συνδράμει στη δυσμενή εξέλιξη της στεάτωσης προς στεατοηπατίτιδα, και περαιτέρω συνδράμει η συνακόλουθη ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης, που οδηγεί στην επιβάρυνση της λειτουργίας του λιπώδους ήπατος από διάφορες ταυτόχρονες διαδικασίες όπως αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και αδιποκινών στη συστηματική κυκλοφορία, δυσβιωτική βακτηριακών ενδοτοξινών. εντερική χλωρίδα και έκλυση στρες TOU ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και πιθανά μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η παχυσαρκία οδηγεί σε συστηματική φλεγμονή λόγω των αυξημένων λευκοκυττάρων στους ιστούς. Αν και ο ρόλος των μακροφάγων στις επιπτώσεις της παχυσαρκίας στο μεταβολισμό έχει εξεταστεί και επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες, η ακριβής συμβολή των λεμφοκυττάρων και ειδικά των διαφόρων τύπων των Τ λεμφοκυττάρων παραμένει αντικείμενο μελέτης. Γι' αυτό το λόγο, αποφασίσαμε να μελετήσουμε το ρόλο των Τ λεμφοκυττάρων στις μεταβολικές διαταραχές που συνδέονται με την παχυσαρκία χρησιμοποιώντας μύες με πλήρη έλλειψη λεμφοκυττάρων, δεδομένου ÓΤΙ μπορούμε πειραματικά να υποκαταστήσουμε τα υπό έλλειψη λεμφοκύτταρα και να συγκρίνουμε τις απαντήσεις των διαφορετικών ομάδων μεταξύ τους. Έτσι, σιτίσαμε με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (high fat diet - HFD) Rag1-/- και αγρίου τύπου μύες σε γενετικό υπόβαθρο C57BL/6 και BALB/c για 15 εβδομάδες και επικεντρωθήκαμε στο ρόλο των natural killer T (NKT) κυττάρων και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στα αποτελέσματα της διατροφής σε συγκεκριμένες μεταβολικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων δεικτών ανάπτυξης NAFLD.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι Rag1^{-/-} μύες ήταν περισσότερο προστατευμένοι από την ανάπτυξη παχυσαρκίας και NAFLD καθώς, παρόλη την παρόμοια κατανάλωση τροφής, παρουσίασαν μικρότερη αύξηση σωματικού βάρους, είχαν μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία και το ήπαρ τους δεν παρουσίαζε σημεία διήθησης από λίπος. Ταυτόχρονα, οι Rag1^{-/-} μύες είχαν αυξημένο μεταβολικό ρυθμό και καταβόλιζαν τα λιπίδια αποτελεσματικότερα. Πιο συγκεκριμένα, στο ήπαρ των μυών που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη λιπογένεση ή στην οξείδωση των λιπιδίων. Απεναντίας, ο επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός των Rag1^{-/-} μυών παρουσίασε αυξημένη έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην οξείδωση των λιπιδίων. Επιπλέον, ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός εμφάνιζε φαιοποιημένεςμπεζ περιοχές και αυξημένη έκφραση του γονιδίου Ucp1 και άλλων δεικτών φαιοποίησης. Ο φαιός λιπώδης ιστός εμφάνιζε επίσης αυξημένη ικανότητα θερμογένεσης. Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν ενεργή φλεγμονή, ο επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός των Rag1^{-/-} μυών παρουσίασε μειωμένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξημένη έκφραση αδιπονεκτίνης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μύες με γενετικό υπόβαθρο BALB/c. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι οι μύες αγρίου τύπου BALB/c δεν είχαν αντίστοιχη αύξηση σωματικού βάρους με αυτήν των μυών αγρίου τύπου C57BL/6. Στη συνέχεια εξετάσαμε αν η επιλεκτική απενεργοποίηση των ΝΚΤ κυττάρων με χορήγηση του ειδικού CD1d αντισώματος, μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη της νόσου. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η απενεργοποίηση των ΝΚΤ κυττάρων δεν οδήγησε σε κάποια διαφορά στην αύξηση σωματικού βάρους, στη λιπώδη διήθηση του ήπατος, στην εμφάνιση παχυσαρκίας ή στην έκφραση γονιδίων που υποστηρίζουν την ενεργότητα μεταβολικών μονοπατιών, σε σχέση με τους αντίστοιχους μύες που δεν έλαβαν CD1d αντίσωμα. Αντίθετα, η θετή μεταφορά CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε Rag1^{-/-} μύες αύξησε την παχυσαρκία και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο των Τ λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και NAFLD αλλά και στο μεταβολισμό γενικότερα. Πλέον σημαντικό είναι ότι τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φαιοποίηση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού. Επίσης, παρά τις διαφορές τους, φάνηκε ότι και μύες με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, C57BL/6 και BALB/c, χρησιμοποιούν τους ίδιους μηχανισμούς αντίστασης στην ανάπτυξη της νόσου. Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με τη δράση των Τ λεμφοκυττάρων και των σχετικών διαφορών στη μεταβολική δραστηριότητα *Rag1^{-/-}* μυών υποδεικνύουν νέους τρόπους για την ερμηνεία αποτελεσμάτων πειραμάτων που χρησιμοποιούν υποκατάσταση στους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων μυών, με στόχο την κατανόηση των μεταβολικών διαταραχών και το ρόλο τους στην εξέλιξη νόσων όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, η καρδιακή ανεπάρκεια κ.λπ. Επιπλέον, η εφαρμογή των ευρημάτων μας σε κλινικές μελέτες μπορεί να καταλήξει σε νέα θεραπευτικά σχήματα επικεντρωμένα στην ανοσοθεραπεία και στην καλύτερη κατηγοριοποίηση των ασθενών.

B. Summary

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by lipid deposition in the liver and includes a range of conditions from benign steatosis to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. NAFLD is due to dysregulated metabolism primarily associated with obesity and the corresponding insulin resistance. Obesity, a major epidemic with prevalence rates rising steadily among adults and children worldwide, is characterized by excessive accumulation of white adipose tissue (WAT). Obesity is normally associated with the development of a low-grade systemic inflammatory response that contributes to the progress of steatosis to steatohepatitis. The resulting increased inflammatory cytokines and adipokines in the systemic circulation, dysbiosis and the associated release of bacterial endotoxins, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction further support the worsening of the liver disease. Obesity is also hallmarked by increased leukocyte recruitment in the involved tissues, such as the adipose tissue and the liver. Although the role of macrophages in obesity and insulin resistance and their polarization towards a proinflammatory profile have been established, emerging evidence indicates a critical role of lymphocytes in this process. To further understand the particular role of T lymphocytes in diet-induced obesity, hepatic steatosis and insulin resistance, we used Rag1^{-/-} mice that lack lymphocytes. This model allows for reconstitution experiments where the role of selective lymphocyte subpopulations can be assessed following their adoptive transfer from wild type to Rag1^{-/-} mice. Further, to confirm the genetic background-independent effects, we studied this question in mice of both C57BL/6 and BALB/c backgrounds, two widely used genetic backgrounds used in metabolic and immunology centred studies respectively. Thus, we administered high fat diet to Rag1^{-/-} and WT mice of both C57BL/6 and BALB/c backgrounds for 15 weeks and examined the development of NAFLD, obesity and associated metabolic parameters. Further, we assessed the possible modifying role of natural killer T (NKT) cells and CD8⁺ T lymphocytes on the above. We found that Rag1^{-/-} mice were more protected from the development of obesity, insulin resistance and hepatic steatosis in comparison to the WT group, despite their similar food intake. We showed that Rag1-/- mice had

increased metabolic rate and utilized lipids more efficiently than WT mice. More specifically, although the liver was protected from lipid deposition, no significant changes in lipid metabolism were observed within the tissue itself. However, the epididymal white adipose tissue (eWAT) showed increased lipid oxidation and the subcutaneous white adipose tissue (scWAT) showed increased abundance of beige adipocytes and induction of the corresponding thermogenic capacity as assessed by the expression of specific genes. This was also observed in the brown adipose tissue (BAT). Moreover, there was decreased expression of proinflammatory cytokines and increased expression of adiponectin in the eWAT of *Rag1^{-/-}* mice as compared with the WT tissues. Similar results were obtained in mice of the BALB/c strain, despite their decreased susceptibility to the development of obesity as compared to their C57BL/6 counterparts. Next, the effect of NKT cells on the development of obesity and NAFLD was assessed following neutralization by administration of a CD1d antibody. We could not detect any significant changes in body weight, hepatic steatosis or expression of genes involved in the carbohydrate and lipid metabolism in mice that received CD1d treatment or PBS. On the other hand, adoptive transfer of CD8⁺ T lymphocytes in *Rag1^{-/-}* mice fed a high fat diet resulted in increased adiposity and hepatic steatosis.

Our findings unmask a crucial role for lymphocytes in the development of obesity, insulin resistance, NAFLD and metabolism. More importantly, our results show that lymphocytes exert specific effects on the scWAT by inducing the development of beige adipocytes resulting in increased energy dissipation and protection from NAFLD. Interestingly, despite the aforementioned strain differences, Rag1^{-/-} mice of either strains responded in a similar way in the hypercaloric challenge. The differences in the metabolic activity of Rag1-- mice provide useful insights for experimental disease modeling and drug testing in studies employing lymphocyte deficient mouse models. Last but not least, the findings on the role of T lymphocytes in energy homeostasis may contribute in combinatorial, therapeutic the design of new, approaches, including immunomodulatory interventions, for the spectrum of serious diseases involving liver steatosis, such as obesity or wasting of chronic diseases such as cancer and systemic infections.

1. Εισαγωγή

1.1 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ και είναι σήμερα μία από τις συχνότερες αιτίες ηπατοπάθειας. Πρωτοχαρακτηρίσθηκε από τον Ludwig J το 1980 σε 20 ασθενείς της κλινικής Mayo¹. Προσβάλλει το 6-35% του γενικού πληθυσμού, όλες τις ηλικίες, συμπεριλαμβανομένων και παιδιών, χωρίς διάκριση μεταξύ ανδρών και γυναικών και σχετίζεται με την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο². Στην Ελλάδα, το ποσοστό αυτό αγγίζει το 31.3%³. Θεωρείται ότι το 70-90% των ασθενών με παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο ή διαβήτη τύπου ΙΙ έχουν NAFLD⁴. Η NAFLD χαρακτηρίζεται από ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων TOU ήπατος, με κύριο χαρακτηριστικό τη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα και στη συνέχεια την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής. Η παχυσαρκία και η κατανάλωση τροφής υψηλής σε λιπαρά δεν είναι η μόνη αιτία της συσσώρευσης λιπιδίων στο ήπαρ. Άλλες αιτίες συμπεριλαμβάνουν κατανάλωση αλκοόλ, έκθεση σε τοξίνες, παθογόνους οργανισμούς, φάρμακα αλλά και γενετικά νοσήματα⁵.

1.2 Διάγνωση ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος

1.2.1 Κλινική εικόνα

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με διαγνωσμένη νόσο είναι ασυμπτωματικοί. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών αισθάνονται κόπωση και επιγαστρική δυσφορία. Κατά την κλινική εξέταση, ενδείξεις για νόσο αποτελούν η ευαισθησία στο δεξιό υποχόνδριο και η ηπατομεγαλία⁶⁻⁸. Τα χαρακτηριστικά που συνυπάρχουν και σχετίζονται συχνότερα με την ασθένεια είναι η παχυσαρκία, η ηλικία, ο διαβήτης και η υπέρταση⁵.

1.2.2 Βιοχημικές αναλύσεις – Βιοδείκτες

Βιοχημικά ευρήματα που υποδεικνύουν ότι ο ασθενής πάσχει από τη νόσο είναι τα αυξημένα επίπεδα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) και της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT). Ο λόγος AST/ALT χρησιμοποιείται επίσης ως δείκτης της νόσου (τιμές > 0.8)⁹, καθώς και η γ-γλουταμινική τρανσπεπτιδάση (γ-GT) και η αλκαλική φωσφατάση (AP)¹⁰. Τα επίπεδα της χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων μπορεί να είναι επίσης αυξημένα, καθώς χαρακτηρίζουν και το μεταβολικό σύνδρομο¹⁰. Να σημειωθεί ότι πολλοί ασθενείς εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα αυτών των ενζύμων ^{6, 11}.

1.2.3 Απεικονιστικές μέθοδοι

Ενδείξεις για ηπατική στεάτωση μπορούν να βρεθούν μέσω απεικονιστικών εξετάσεων, όπως το υπερηχογράφημα με ευαισθησία 60– 94% και ειδικότητα 88– 95%, καθώς και η μαγνητική φασματοσκοπία, που μπορεί να δώσει δεδομένα για την ποσότητα των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ⁶. Το υπερηχογράφημα απεικονίζει τη λιπώδη διήθηση ως μια διάχυτη αύξηση της ηχογένειας του ήπατος σε σύγκριση με την ηχογένεια των νεφρών. Αυτές οι μέθοδοι δεν μπορούν να υποδείξουν αν ο ασθενής βρίσκεται σε αρχικό στάδιο της νόσου ή αν έχει αναπτύξει φλεγμονή ή ίνωση¹².

1.2.4 Βιοψία ήπατος

Για να γίνει αξιόπιστα η διάγνωση και να βρεθεί το στάδιο εξέλιξης της νόσου του ασθενούς, καθώς και να αποφασισθεί η πρόγνωση και να επιλεγεί η θεραπεία, απαιτείται βιοψία ήπατος¹³. Κατά την αξιολόγηση της βιοψίας μελετώνται τέσσερεις παράγοντες: στεάτωση, φλεγμονή, εκφύλιση των ηπατικών κυττάρων και ίνωση του ήπατος¹⁴.

Η ονομασία NAFLD αναφέρεται σε ένα φάσμα νόσων που εκτείνεται από την απλή στεάτωση και στεατοηπατίτιδα (NASH) μέχρι τις πιο σοβαρές μορφές της, την ηπατική κίρρωση και τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (*Εικόνα 1.1*).



Εικόνα 1.1: Φάσμα νόσων της NAFLD¹⁵



Εικόνα 1.2: Στον κεντρικό λοβό του ήπατος βρίσκεται η κεντρική φλέβα και στην περιφέρεια οι πυλαίες τριάδες. Η περιοχή γύρω από την κεντρική φλέβα ονομάζεται ζώνη 3, η περιοχή γύρω από την πυλαία τριάδα ζώνη 1 και η περιοχή ενδιάμεσα, ζώνη 2.

Η διήθηση των ηπατοκυττάρων από λιπίδια αρχίζει στην περιοχή γύρω από τις ηπατικές φλέβες, στη ζώνη 3, όπου η οξυγόνωση είναι φτωχή σε αντίθεση με τη ζώνη 1, γύρω από την πυλαία τριάδα όπου το αίμα είναι πλούσιο σε οξυγόνο (*Εικόνα 1.2*)¹⁶.

Στην εξέλιξη της νόσου παρατηρείται αρχικά μικροφυσαλιδώδης λιπώδης διήθηση, δηλαδή συγκέντρωση πολλών σταγονιδίων λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα, και με τον πυρήνα να καταλαμβάνει κεντρική θέση.



Εικόνα 1.3: Χρώση Η&Ε που απεικονίζει τη μικροφυσαλιδώδη και τη μακροφυσαλιδώδη λίπωση¹⁷.

Στο επόμενο στάδιο παρατηρείται μακροφυσαλιδώδης λίπωση, όπου όλο το κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων καταλαμβάνεται από ένα μεγάλο λιποσταγονίδιο ενώ ο πυρήνας και τα υπόλοιπα οργανίδια παραμερίζονται στην περιφέρεια του κυττάρου (*Εικόνα 1.3*)¹⁷. Όσο η κατάσταση επιδεινώνεται, τόσο η στεάτωση εξαπλώνεται και στις υπόλοιπες ζώνες. Η απλή στεάτωση (*Εικόνα 1.4*)

είναι η πιο καλοήθης μορφή της NAFLD, καθώς σε αυτό το στάδιο η νόσος δεν παρουσιάζει συμπτώματα, και ανιχνεύεται μόνο από ιστολογικά ευρήματα, όπως η απλή συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα περισσότερων από το 5% των ηπατοκυττάρων¹⁵.



Εικόνα 1.4: Ιστολογική εικόνα απλής ηπατικής στεάτωσης¹⁵

Σε αυτό το στάδιο, εάν η αιτία για την ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης εξαλειφθεί, τότε η ιστολογική κατάσταση βελτιώνεται και μπορεί να αναστραφεί. Αν όχι, τότε η στεάτωση προχωρά στο επόμενο, πιο σοβαρό στάδιο, τη στεατοηπατίτιδα (*Εικόνα 1.5*), που χαρακτηρίζεται από παρουσία χρόνιας φλεγμονής στο ήπαρ. Αυτό γίνεται με τη διήθηση του ήπατος από λεμφοκύτταρα, μονοπύρηνα, κύτταρα Kupffer και ουδετερόφιλα¹⁸.



Εικόνα 1.5: Ιστολογική εικόνα στεατοηπατίτιδας¹⁵

Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία μακροφυσαλιδώδους λίπωσης, ηπατοκυτταρικής βλάβης, διόγκωσης, νέκρωσης και σωματίων Mallory. Παρατηρείται επίσης και ίνωση στο χώρο του Disse. Η παραγωγή του κολλαγόνου που προκαλεί την ίνωση γίνεται από τα κύτταρα Ito, γνωστά και ως αστεροειδή κύτταρα^{15, 19}.

Η πιο σοβαρή μορφή της NAFLD είναι η κίρρωση του ήπατος (*Εικόνα 1.6*). Σε περίπου 10-15% των ασθενών η στεατοηπατίτιδα θα εξελιχθεί στο μέλλον σε ηπατική κίρρωση με αυξημένη πιθανότητα να ακολουθήσει ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου^{18, 20}. Η στεατοηπατίτιδα διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου και τη συνεπακόλουθη δημιουργία ουλώδους ιστού. Σε αυτήν την

κατάσταση, τα ιστολογικά στοιχεία της στεατοηπατίτιδας αρχίζουν να αλλοιώνονται και στη συνέχεια χάνονται. Γι' αυτό το λόγο η μορφή αυτή της νόσου ονομάζεται κρυψιγενής κίρρωση⁷.



Εικόνα 1.6: Ιστολογική εικόνα ηπατικής κίρρωσης¹⁵

Από τις διαγνωστικές μεθόδους που περιγράφηκαν παραπάνω φαίνεται ότι η βιοψία ήπατος είναι η πλέον αξιόπιστη μέθοδος για να διαγνωσθεί η νόσος και να προσδιοριστεί το στάδιό της, καθώς και να διαπιστωθεί η ύπαρξη ίνωσης. Παρόλα τα πλεονεκτήματά της, η βιοψία ήπατος είναι μια επίπονη επεμβατική μέθοδος, που ενδέχεται να συνοδεύεται από επιπλοκές, καθώς και αδυναμία να οδηγήσει σε τελική διάγνωση εξαιτίας λαθών κατά τη λήψη δείγματος. Για το λόγο αυτό, έχουν σχεδιαστεί υπολογιστικά μοντέλα που βασίζονται σε συνυπολογισμό των κλινικών χαρακτηριστικών (π.χ. ηλικία, ΔΜΣ) του ασθενούς με τα αποτελέσματα των βιοχημικών εξετάσεων (π.χ. αλβουμίνη, λόγος AST/ALT), ώστε να δώσουν έναν δείκτη, που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου και της ύπαρξης ίνωσης. Παραδείγματα και το ΑPRI²¹.

1.3 Παθογένεση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος

Το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των βασικών θρεπτικών ουσιών (υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών). Η ηπατική στεάτωση είναι αποτέλεσμα διαταραγμένης ισορροπίας μεταξύ της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών και των μεταβολικών τους προϊόντων και της χρησιμοποίησής τους στην παραγωγή ενέργειας από τον οργανισμό, ειδικότερα σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς όπως το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός και οι μύες²². Η στεάτωση αναπτύσσεται όταν υπάρχει αυξημένη εναπόθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ, που προέρχονται από την κυκλοφορία (δίαιτα πλούσια σε λιπαρά) και τη λιπόλυση από τον επιβαρυμένο λιπώδη ιστό, όταν αυξάνεται η *de novo* λιπογένεση στο ήπαρ και, τέλος, όταν το ήπαρ δεν μπορεί να οξειδώσει ή να εξάγει τα λιπαρά οξέα με

μορφή λιποπρωτεΐνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins-VLDL) (*Εικόνα 1.7*). Η διαταραγμένη ισορροπία των μεταβολικών διεργασιών συχνά συνοδεύεται από αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης²³.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα οι μηχανισμοί που ενέχονται στην παθογένεση της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος.



Εικόνα 1.7: Αναπαράσταση των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη λιπώδους διήθησης του ήπατος²³.

1.3.1 Αυξημένη εναπόθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ

Σε ασθενείς που πάσχουν από NAFLD, το 15% του ηπατικού λίπους προέρχεται από τα διατροφικά λίπη, το 30% από *de novo* λιπογένεση και το 60% από λιπόλυση στο λιπώδη ιστό²⁴.

1.3.1.1 Διατροφικά λίπη

Τα διατροφικά λιπίδια απορροφώνται από τον εντερικό ιστό και μεταφέρονται ως χυλομικρά στην κυκλοφορία. Από αυτά, το μεγαλύτερο ποσοστό υδρολύεται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) για να παραχθούν λιπαρά οξέα, τα οποία απορροφώνται από όργανα της περιφέρειας, και τα υπόλοιπα απορροφώνται από το ήπαρ μέσω λιποπρωτεϊνών^{15, 25}. Σε παχύσαρκα άτομα με υπερινσουλιναιμία, η έκφραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης αυξάνεται και έτσι παράγονται περισσότερα λιπαρά οξέα²⁶.

1.3.1.2 Αυξημένη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό

Σε υγιή άτομα η περίσσεια των λιπαρών οξέων αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό. Μετά τη λήψη τροφής, τα επίπεδα ινσουλίνης αυξάνονται και δρουν κατασταλτικά στη λιπόλυση. Πιο συγκεκριμένα, υπό τον έλεγχο της ινσουλίνης βρίσκεται ένα κύριο ένζυμο της λιπόλυσης, η hormone sensitive lipase (HSL) το οποίο καταλύει το δεύτερο βήμα στη διαδικασία της λιπόλυσης. Σε κατάσταση παχυσαρκίας και όταν έχει αναπτυχθεί αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, η λιπόλυση δεν αναστέλλεται²⁷. Έτσι στα παχύσαρκα άτομα, ο λιπώδης ιστός απελευθερώνει συνεχώς μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα στην κυκλοφορία, τα οποία μεταφέρονται στο ήπαρ²⁸.

1.3.1.3 De novo λιπογένεση

Ένας άλλος μηχανισμός που συνδράμει στην αυξημένη αποθήκευση λίπους στο ήπαρ είναι η de novo λιπογένεση. Όταν ένας οργανισμός λαμβάνει υπερθερμιδική δίαιτα, το ήπαρ μετατρέπει την περίσσεια γλυκόζης σε γλυκογόνο. Η γλυκόζη που δεν μετατρέπεται σε γλυκογόνο διασπάται μέσω της γλυκόλυσης σε πυρουβικό οξύ. Στη συνέχεια, μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος, παράγονται μόρια ακέτυλου-CoA από τα οποία, με τη δράση των ενζύμων fatty acid synthase (FASN) και acetyl-CoA carboxylase (ACC) αλλά και stearoyl-CoA desaturase (SCD) και diglyceride acyltransferase (DGAT), μπορούν να παραχθούν λιπαρά οξέα τα οποία ενσωματώνονται σε τριγλυκερίδια, μέσω του μονοπατιού της *de novo* λιπογένεσης²⁹. Το μονοπάτι ελέγχεται κυρίως από τους μεταγραφικούς παράγοντες sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c) και τον carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP), οι οποίοι ενεργοποιούνται από την ινσουλίνη και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης αντίστοιχα. Η έκφραση του SREBP1c στην παχυσαρκία και NAFLD είναι αυξημένη, αλλά ο μηχανισμός ενεργοποίησής του δεν έχει χαρακτηρισθεί πλήρως³⁰. Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την ενεργοποίησή του, ο SREBP1c ωριμάζει με τη δράση των SREBP cleavage-activated protein (SCAP) και insulininduced gene (INSIG) και εισέρχεται στον πυρήνα. Η ενεργοποίησή του φαίνεται

να γίνεται μέσω του μονοπατιού phosphoinositide-3 kinase (PI3K) / protein kinase B (PKB), το οποίο οδηγεί σε φωσφορυλίωση του SREBP1c και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα liver X receptor alpha (LXRα). Στον πυρήνα, ο SREBP1c επάγει τη μεταγραφή γονιδίων της λιπογένεσης³¹. Ο ChREBP ενεργοποιείται μετά από αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο ήπαρ. Η ενεργοποίησή του καθορίζεται από την αποφωσφοριλίωση από τις protein phosphatase 2A (PP2A), protein kinase A (PKA) και AMP-dependent protein kinase (AMPK), που οδηγεί στην απόσπασή του από την πρωτεΐνη 14-3-3. Στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στη λιπογένεση³². Τέλος, ένα ενδιάμεσο προϊόν της *de novo* λιπογένεσης, το malonyl-coA, δρα ως αναστολέας του ενζύμου carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) που καταλύει την είσοδο των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια για να οξειδωθούν³³, συμβάλλοντας έμμεσα στον ελαττωμένο

1.3.2 Μειωμένη οξείδωση/έκκριση λιπαρών οξέων

1.3.2.1 Μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα καταβολίζονται στο ήπαρ μέσω της β-οξείδωσης στα μιτοχόνδρια και, σε μικρότερο βαθμό, μέσω της ω-οξείδωσης και της β-οξείδωσης των υπεροξειδιοσωμάτων³⁴.

Κατά τη β-οξείδωση, ενεργοποιημένες μορφές λιπαρών οξέων από το ένζυμο Acyl-CoA synthetase (ACS) εισέρχονται στα μιτοχόνδρια υπό τον έλεγχο των ενζύμων CPT1 και CPT2. Ακολούθως, τα λιπαρά οξέα καταβολίζονται από ένζυμα όπως τα medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) και enoyl CoA hydratase (ECH) για να εισέρθουν στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, όπου παράγονται τα συνένζυμα nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) και flavin adenine dinucleotide (FADH₂) για τη σύνθεση ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας²⁹. Η β-οξείδωση μπορεί να γίνει και στα υπεροξειδιοσώματα με τη δράση των ενζύμων acyl-Coenzyme A oxidase 1 (ACOX1), enoyl-CoA, Hydratase/3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase (EHHADH), acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1a (ACAA1a) και acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1b (ACAA1b) (*Εικόνα 1.8*)³⁶. Κύριοι ρυθμιστές της οξείδωσης είναι ο peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα) και ο συνεργοποιητής του peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1α), που επάγουν πληθώρα γονιδίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια της οξείδωσης^{37, 38}. Επίσης, ο παράγοντας PGC1α έχει δειχθεί ότι ευνοεί τη βιογένεση των μιτοχονδρίων³⁹. Στην περίπτωση που το προϊόν της β-οξείδωσης, ακέτυλο-CoA, συσσωρευθεί αντί να συνεισφέρει στη διαδικασία του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, επακολουθεί μετατροπή σε κετόνες, μέσω της δράσης του ενζύμου 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)²⁹.

Σε καταστάσεις υπερινσουλιναιμίας όπου ενισχύεται το μονοπάτι της λιπογένεσης, η δράση του μαλονυλο-CoA αναστέλλει την είσοδο των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια, παρεμποδίζοντας έτσι την απομάκρυνσή τους μέσω μηχανισμών οξείδωσης³³.





1.3.2.2 Μειωμένη έκκριση ελεύθερων λιπαρών οξέων

Το ήπαρ εκκρίνει τριγλυκερίδια στην κυκλοφορία, με τη μορφή VLDLs, που μεταφέρονται στον καρδιακό και στους σκελετικούς μυς, καθώς και στο λιπώδη ιστό. Η επαναφορά τους σε μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων καταλύεται από το ένζυμο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL). Το κάθε VLDL σωματίδιο σταθεροποιείται από ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης B-100 (apoB-100) στο ενδοπλασματικό δίκτυο, υπό τη δράση του ενζύμου microsomal triglyceride transfer protein (MTP)²⁹. Ο ρυθμός έκκρισης των VLDL εξαρτάται από την

ποσότητα τριγλυκεριδίων αλλά και από το ένζυμο ΜΤΡ⁴⁰. Η υπερινσουλιναιμία δρα ανασταλτικά στη σύνθεση της ApoB-100 και επάγει την εναπόθεση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ⁵.

1.3.3 Εξέλιξη στεάτωσης

Η απλή λιπώδης διήθηση του ήπατος σε μερικούς ασθενείς μπορεί να παρουσιάσει στοιχεία φλεγμονής και να εξελιχθεί σε στεατοηπατίτιδα. Για την εξέλιξη αυτή, το 1998 προτάθηκε η θεωρία των δύο χτυπημάτων (two hit hypothesis), που πλέον έχει ξεπεραστεί και μετονομαστεί σε θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων (multiple hit)⁴¹. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η λιπώδης διήθηση αποτελεί το πρώτο χτύπημα, ενώ το δεύτερο ή πολλαπλό χτύπημα μπορεί να προκαλείται από τα ακόλουθα: κυτοκίνες, αδιποκίνες, βακτηριακές ενδοτοξίνες και δυσβιωτική εντερική χλωρίδα, στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) ή δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων⁴².

1.4 Παχυσαρκία και φλεγμονή

Η παχυσαρκία προκαλεί χρόνια φλεγμονή. Η πρώτη απόδειξη για την παρουσία φλεγμονής κατά την παχυσαρκία έγινε όταν μελέτη έδειξε ότι ο λιπώδης ιστός παχύσαρκων μυών εκφράζει αυξημένα επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης tumor necrosis factor alpha (TNF- α)⁴³. Στη συνέχεια, αποκαλύφθηκε στην παχυσαρκία αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ιντερλευκίνη-6 (IL-6), TNFα και ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), και χημειοτακτικοί παράγοντες, όπως C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2)⁴⁴, σε ιστούς που συμμετέχουν στο μεταβολισμό. Επίσης έχει δειχθεί ότι αυτοί οι φλεγμονώδεις παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης^{45, 46}. Άλλη ένδειξη για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην παχυσαρκία είναι η μεταβολή του αριθμού πολλών τύπων ανοσοποιητικών κυττάρων, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, natural killer T (NKT) κύτταρα, CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, Τ ρυθμιστικά κύτταρα (Treg), αλλά και αλλαγή στην πόλωση των μακροφάγων από αντι-φλεγμονώδη (M2) σε προ-φλεγμονώδη (M1) στους μεταβολικά ενεργούς ιστούς⁴⁷.

Παρακάτω θα αναλυθούν με περισσότερη λεπτομέρεια η φλεγμονή στο λιπώδη ιστό και στον ηπατικό ιστό και ακολούθως η δράση του κάθε υποπληθυσμού ξεχωριστά.

1.4.1 Λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός, λόγω της ιδιότητάς του να αποθηκεύει λίπος, είναι ο πρώτος ιστός που επηρεάζεται στην παχυσαρκία. Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι η μοναδική ιδιότητα του λιπώδους ιστού είναι η αποθήκευση λίπους. Η ανακάλυψη της λεπτίνης, ορμόνης που παράγεται στο λιπώδη ιστό, άλλαξε αυτή τη θεώρηση και βρέθηκε ότι αυτός ο ιστός παράγει ορμόνες (αδιποκίνες) και κυτοκίνες, που μπορούν να δρουν με ενδοκρινή και παρακρινή δράση και η ισορροπία αυτών επηρεάζει σημαντικά τη φλεγμονή και την αντίσταση στην ινσουλίνη που συνοδεύουν την παχυσαρκία⁴⁸. Παραδείγματα αδιποκινών είναι η αδιπονεκτίνη, λ επτίνη, ρεσιστίνη, retinol binding protein 4 (RBP4), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1). Αδιποκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή και την ινσουλινοαντοχή είναι οι ρεσιστίνη, RBP4, lipocalin 2, visfatin, ενώ αντίθετα τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης μειώνονται σε κατάσταση παχυσαρκίας⁴⁹. Η φλεγμονή υποστηρίζεται από την υπερτροφία των κυττάρων που οδηγεί σε υποξία, μηχανικό στρες και τελικά στο θάνατο των κυττάρων. Επιπλέον, το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται και από προϊόντα των βακτηρίων της δυσβιωτικής εντερικής χλωρίδας αλλά και από τα ανεβασμένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία⁵⁰. Αυτά ενεργοποιούν τους toll like receptor (TLR) TLR2 και TLR4 υποδοχείς και το μονοπάτι του nuclear factor-κB (NF-κB), που διεγείρουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1β, TNFα, IL-6, αλλά και χημειοτακτικών παραγόντων CCL2, CCL5, που ευοδώνουν τη διατήρηση της φλεγμονής⁵¹. Αυτά τα σήματα κινδύνου για το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιούν επίσης το NALP3 inflammasome, το οποίο, μέσω της κασπάσης-1 (CASP1), ενεργοποιεί την παραγωγή IL-1β και IL-18⁵², συντηρώντας το φαύλο κύκλο και την επιδείνωση της ινσουλινοαντίστασης.

Έτσι κατά την εξέλιξη της παχυσαρκίας οι αριθμοί των ανοσοποιητικών κυττάρων αλλάζουν δραματικά (*Εικόνα 1.9*).



Εικόνα 1.9: Γραφική αναπαράσταση της φλεγμονής κατά την ανάπτυξη παχυσαρκίας⁵³

Μελέτες έχουν δείξει ότι ενώ σε φυσιολογική κατάσταση το ποσοστό των μακροφάγων στο λιπώδη ιστό είναι περίπου το 10% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του ιστού, στην παχυσαρκία μπορεί να φτάσει και το 30%⁵⁴. Τα περισσότερα από αυτά τα μακροφάγα στρατολογούνται στο λιπώδη ιστό από τη συστηματική κυκλοφορία, αλλά και τα ήδη υπάρχοντα ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται. Επιπλέον η πόλωσή τους αλλάζει δραματικά και τα περισσότερα μακροφάγα γίνονται Μ1 από M2⁵⁵. Άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί του λιπώδους ιστού που αυξάνονται κατά την παχυσαρκία είναι τα ουδετερόφιλα αλλά και τα Β και Τ λεμφοκύτταρα (ειδικότερα στα Τ λεμφοκύτταρα τα κυτταροτοξικά CD8⁺ και CD4⁺ T_H1 κύτταρα). Απεναντίας, τα ηωσινόφιλα, τα innate lymphoid (ILC2) κύτταρα και τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα μειώνονται. Τα μαστοκύτταρα και τα ΝΚΤ κύτταρα φαίνεται να επηρεάζονται, όμως οι μελέτες για τη δράση αυτών των κυττάρων είναι αντικρουόμενες και δεν έχουν καταλήξει σε κάποιο αποδεκτό συμπέρασμα^{50, 53}.

1.4.2 Ήπαρ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για να εξελιχθεί η απλή λιπώδης διήθηση του ήπατος σε στεατοηπατίτιδα χρειάζονται τα «πολλαπλά» χτυπήματα που περιγράφηκαν στο υποκεφάλαιο 1.3.3. Όπως και στο λιπώδη ιστό, οι διαταραχές στο μεταβολισμό, που επιφέρει η υπερθερμιδική δίαιτα στους διάφορους ιστούς

αλλά και ειδικά στο ήπαρ, οδηγούν και στην ενεργοποίηση του ηπατικού ανοσοποιητικού συστήματος και στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων.

Όπως και στο λιπώδη ιστό, στρατολογούνται επιπλέον μακροφάγα από την κυκλοφορία και το προφίλ τους αλλάζει από M2 σε M1⁵⁷. Όσο για τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς του ήπατος (*Εικόνα 1.10*), εκείνοι που φαίνεται να προωθούν την εξέλιξη της απλής στεάτωσης σε στεατοηπατίτιδα, είναι τα ουδετερόφιλα, τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα με T_H1 και T_H17 πόλωση και τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Επίσης τα αστεροειδή κύτταρα ενεργοποιούνται και προωθούν την ανάπτυξη ίνωσης του ήπατος. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα, που έχουν ανοσοκατασταλτική δράση, μειώνονται, ενώ για τα δενδριτικά κύτταρα και τα NKT κύτταρα, οι μελέτες δεν έχουν καταλήξει με σαφήνεια στη δράση τους⁵⁶.



Εικόνα 1.10: Γραφική αναπαράσταση της φλεγμονής κατά την ανάπτυξη NASH⁵⁶

1.4.3 Κύτταρα μυελικής σειράς

1.4.3.1 Μακροφάγα

Υπό κανονικές συνθήκες τα μακροφάγα των ιστών είναι πολωμένα προς το M2 προφίλ, ή είναι "alternatively activated" και εκκρίνουν αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως οι IL-10 και IL-1Ra, και παράγουν αργινάση. Η διαφοροποίησή τους εξαρτάται και ενισχύεται από τα επίπεδα των IL-4 και IL-13 και την ενεργοποίηση του signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)⁵⁸. Τα κύτταρα αυτά ταυτοποιούνται από την έκφραση στην κυτταρική τους μεμβράνη των CD11b, F4/80, CD301 και CD206. Σε κατάσταση παχυσαρκίας, τα μακροφάγα είναι πολωμένα προς το M1 προφίλ ή είναι "classically activated", εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως οι TNFα, IL-6, IL-1β, και παράγουν νιτρικό οξύ (NO) (*Εικόνα 1.11*). Τα κύτταρα αυτά ταυτοποιούνται από την έκφραση των CD11b, F4/80 και CD11c στην κυτταρική μεμβράνη. Η διαφοροποίησή τους εξαρτάται και ενισχύεται από τα επίπεδα της ιντερφερόνης-γ (IFNγ) και της ενεργοποίησης του TLR4⁵⁹.



Εικόνα 1.11: Αναπαράσταση της Μ1 και Μ2 πόλωσης των μακροφάγων και των προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών που παράγουν⁶⁰.

Παράγοντες που συσχετίζονται με την πόλωση των μακροφάγων προς το M1 προφίλ δρουν μέσω του signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) και της ενεργοποίησης των suppressor of cytokine signalling (SOCS) SOCS1 και SOCS3⁶¹. Ενδιαφέρον είναι ότι η διαφοροποίηση των μακροφάγων προς την M2 πόλωση συσχετίζεται με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων STAT3, STAT6 και PGC-1β, που συμμετέχουν στο μονοπάτι της β-οξείδωσης λιπαρών οξέων⁵⁸. Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας που οδηγεί την πόλωση των μακροφάγων προς το M2 προφίλ, είναι ο PPARδ. Μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του PPARδ οδηγεί στην έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών του M2 προφίλ macrophage galactose-type lectin-1 (Mgl) *Mgl1, Mgl2*, arginase 1 (*Arg1*), mannose receptor (Mrc) *Mrc1, Mrc2*, dectin-1 (*Clec7a*), transforming growth factor beta 1 (*Tgfb1*), ενώ σε μακροφάγα με μη λειτουργικό PPARδ παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και δεικτών M1 πόλωσης. Σε μύες με μακροφάγα με μη λειτουργικό PPARδ, που σιτίστηκαν με υπερθερμιδική τροφή, παρατηρήθηκαν ινσουλινοαντίσταση, λιπώδης διήθηση του ήπατος και υπερλειτουργία της διαδικασίας της λιπογένεσης, καθώς και μείωση της οξείδωσης^{62, 63}. Τέλος, άλλη μελέτη έδειξε ότι η IL-1β δρα κατασταλτικά στον PPARα, που είναι γνωστό ότι επάγει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση λιπαρών οξέων⁶⁴.

1.4.3.2 Μαστοκύτταρα

Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στο συνδετικό και στο βλεννογόνο ιστό και είναι από τα αρχικά κύτταρα που ενεργοποιούνται σε μια ανοσολογική αντίδραση. Χαρακτηρίζονται από πολλαπλά κυτταροπλασματικά κοκκία, που περιέχουν μεσολαβητές, όπως η ισταμίνη, σεροτονίνη, αλλά και κυτοκίνες, όπως οι TNFα και IL-1β. Με την ενεργοποίησή τους, τα μαστοκύτταρα απελευθερώνουν τους μεσολαβητές και ενισχύουν τη στρατολόγηση και άλλων ανοσοποιητικών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι ο αριθμός των μαστοκυττάρων σε παχύσαρκους μύες και ανθρώπους αυξάνεται. Επίσης γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο *Kit*, που οδηγεί σε ανεπάρκεια των μαστοκυττάρων, οδήγησε σε μειωμένη στρατολόγηση των ανοσοποιητικών κυττάρων και μειωμένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι IL-6 και IFNγ^{59, 65}. Αντίθετα, δύο μελέτες που χρησιμοποίησαν δύο διαφορετικά μοντέλα μυών με έλλειψη μαστοκυττάρων, τα Cpa3Cre/* και Mcpt5-Cre R-DTA, δεν βρήκαν διαφορές στην παχυσαρκία και την ινσουλινοαντίσταση^{66. 67}.

1.4.3.3 Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα δρουν και αυτά στα αρχικά στάδια μιας φλεγμονώδους αντίδρασης, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και συμμετέχουν στη στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων. Η δράση τους βασίζεται στη δράση του ενζύμου myeloperoxidase (MPO), το οποίο βρίσκεται στα κοκκία των ουδετερόφιλων και μπορεί να οξειδώσει την phosphatidylcholine, η οποία ενεργοποιεί μονοπάτια που προωθούν την ίνωση του ήπατος. Κατά την ενεργοποίησή τους, απελευθερώνονται ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες προκαλούν κυτταρική βλάβη και προωθούν τη φλεγμονή. Επιπλέον άλλο ένα ένζυμο των ουδετερόφιλων, η ελαστάση, καταστρέφει τον insulin receptor substrate 1 (IRS1) προκαλώντας έτσι ινσουλινοαντίσταση⁶⁸. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των ουδετερόφιλων αρχικά στάδια παχυσαρκίας, αυξάνεται στα πολύ καθώς και στη στεατοηπατίτιδα^{68, 69}.

1.4.3.4 Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα βρίσκονται στην κυκλοφορία σε μη ώριμο στάδιο και σε ώριμο στάδιο και εντοπίζονται και σε μερικούς ιστούς. Η διαφοροποίησή τους πραγματοποιείται μέσω των IL-3, IL-5 και του παράγοντα διέγερσης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (GM-CSF). Τα ηωσινόφιλα παράγουν IL-4 και IL-13, που, όπως προαναφέρθηκε οδηγούν τα μακροφάγα προς την M2 πόλωση^{59, 70}. Σε μελέτη που εστίασε στα ηωσινόφιλα σε κατάσταση παχυσαρκίας, παρατηρήθηκε πως η μεγαλύτερη ποσότητα IL-4 στο λιπώδη ιστό παράχθηκε από τα ηωσινόφιλα και πως η εξέλιξη της παχυσαρκίας και ο αριθμός των ηωσινόφιλων στο λιπώδη ιστό είναι αντιστρόφως ανάλογα. Επίσης μύες που δεν είχαν λειτουργικά ηωσινόφιλα και σιτίστηκαν με υπερθερμιδική τροφή είχαν μεγαλύτερη αύξηση του λιπώδους ιστού και μεγαλύτερη ινσουλινοαντίσταση από τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου⁷¹. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ηωσινόφιλα επηρεάζουν τη φαιοποίηση του υποδόριου λιπώδους ιστού⁷², σε συνάφεια με τις παρατηρήσεις για τον αρνητικό ρόλο τους στην εξέλιξη της παχυσαρκίας.

1.4.3.5 Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των κυττάρων παρουσίασης αντιγόνων και χωρίζονται σε classical/myeloid DCs (cDCs) και plasmacytoid DCs (pDCs)⁷³. Μετά από ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος εκκρίνουν ιντερφερόνη τύπου Ι ή προκαλούν αντιγονική διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων. Ο ρόλος τους στην παχυσαρκία και εξέλιξη της NASH δεν έχει διασαφηνιστεί καθώς τα ευρήματα παραμένουν αντικρουόμενα. Μία μελέτη έδειξε ότι ο αριθμός των δενδριτικών κυττάρων στην παχυσαρκία αυξάνεται παράλληλα, προωθώντας την Τ_H17 πόλωση της ανοσοαπάντησης⁷⁴. Σε μοντέλα στεατοηπατίτιδας και ίνωσης του ήπατος, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι τα CD11c⁺ DCs αυξάνονται και εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNFα και IL-6⁷⁵. Απεναντίας, άλλη μελέτη έδειξε ότι τα δενδριτικά κύτταρα εμποδίζουν την αύξηση του αριθμού των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων και τη συνεπακόλουθη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών⁷⁶.

1.4.3.6 Group 2 Innate lymphoid cells (ILC2s)

Тα ILC2 κύτταρα αποτελούν μία πρόσφατα χαρακτηρισμένη ομάδα που ταυτοποιούνται από ανοσολογικών κυττάρων την έκφραση TOU μεταγραφικού παράγοντα inhibitor of DNA binding 2 (Id2) και της κοινής αλυσίδας γ (γc) του υποδοχέα των κυτοκινών. Μετά από πρόσδεση των IL-25 και IL-33, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-13 και IL-577. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η IL-5 προωθεί τη διαφοροποίηση των ηωσινόφιλων και η IL-13 ενισχύει την πόλωση των μακροφάγων προς το M2 προφίλ. Σε μελέτη που χρησιμοποίησε μύες που σιτίστηκαν με υπερθερμιδική τροφή παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των ILC2s στο λιπώδη ιστό μειώνεται όσο αυξάνεται η παχυσαρκία τους. Επίσης ο αριθμός τους συσχετιζόταν με τον αριθμό των ηωσινόφιλων, των Μ2 πολωμένων μακροφάγων και με την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης^{59, 78, 79}.

1.4.4 Κύτταρα λεμφικής σειράς

1.4.4.1 Τ λεμφοκύτταρα

Φυσιολογικά, τα Τ λεμφοκύτταρα απαρτίζουν περίπου το 10% των κυττάρων του στρώματος (stromal vascular fraction-SVF) του λιπώδους ιστού, με αναλογία 1:3

μεταξύ CD8⁺ και CD4⁺ κυττάρων⁸⁰. Σε κατάσταση παχυσαρκίας οι απόλυτοι αριθμοί αλλά και η αναλογία αυτή αλλάζουν. Ο αριθμός των Τ λεμφοκυττάρων αυξάνεται και τα κύτταρα ωριμάζουν αυξάνοντας τη δράση τους⁸¹⁻⁸³. Αύξηση στον αριθμό των CD8⁺ και CD4⁺ T κυττάρων παρατηρείται και στο ήπαρ⁸⁴. Αναλογικά, τα CD8⁺ Τ κύτταρα αυξάνονται, ενώ τα CD4⁺ Τ κύτταρα και τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα μειώνονται^{81, 82, 85, 86}. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο αριθμός των CD8⁺ T κυττάρων αυξάνεται αρκετά νωρίς στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και πριν από τη στρατολόγηση των μακροφάγων, υποδεικνύοντας έτσι τον πιθανό ρόλο των κυττάρων αυτών στη στρατολόγηση των μακροφάγων⁸¹. Ενισχύοντας την υπόθεση για αλληλεπίδραση των CD8⁺ Τ κυττάρων και των μακροφάγων, ανοσοϊστοχημική απεικόνιση του λιπώδους ιστού σε κατάσταση παχυσαρκίας έδειξε ότι τα CD8⁺ Τ κύτταρα συναθροίζονται με τα M1 πολωμένα μακροφάγα γύρω από νεκρωτικά λιπώδη κύτταρα⁸¹. Τα CD8⁺ Τ κύτταρα, επίσης σε κατάσταση παχυσαρκίας, εκκρίνουν περισσότερες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (RANTES) και granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) και εκφράζουν περισσότερο granzyme B, μία προτεάση που αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης των κυττάρων και εντοπίζεται στα λυτικά κοκκία των κυτταροτοξικών CD8+ T κύτταρων⁸⁶. Για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος των CD8⁺ Τ κυττάρων στην παχυσαρκία σε μία μελέτη χορήγησαν σε παχύσαρκους μύες CD8 αντισώματα, έτσι ώστε να εξουδετερώσουν τη δραστικότητα αυτών των κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πρώτον ότι η στρατολόγηση CD8⁺ T κυττάρων και M1 μακροφάγων μειώθηκε και δεύτερον ότι η έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι IL-1, IL-6 και TNFα, μειώθηκε επίσης, όπως μειώθηκαν και η έκφραση των intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) και matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). Χρήση CD8a^{-/-} μυών που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα⁸¹. Τέλος, πειράματα συν-καλλιέργειας, με χρήση CD8⁺ Τ κυττάρων και μακροφάγων, έδειξαν ότι τα πρώτα μπορούν να επάγουν τη διαφοροποίηση και μετανάστευση των δεύτερων. Επίσης συν-καλλιέργεια CD8⁺ Τ κυττάρων και λιποκυττάρων από παχύσαρκους ή κανονικούς μύες έδειξε ότι τα λιποκύτταρα παχύσαρκων μυών ενεργοποιούν αποτελεσματικότερα τα CD8⁺ Τ κύτταρα⁸¹. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και στην παχυσαρκία σε ανθρώπους⁸². Άλλη μελέτη, η οποία εστίασε το ενδιαφέρον της στο ήπαρ σε κατάσταση παχυσαρκίας, έδειξε ότι εξουδετέρωση των CD8⁺ T κυττάρων με χρήση αντισωμάτων είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του βιοχημικού δείκτη ηπατικής βλάβης ALT⁸⁴.

Τα CD4⁺ κύτταρα χωρίζονται σε υποομάδες με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Τα ΤΗ1 και ΤΗ17 έχουν προφλεγμονώδη χαρακτηριστικά και ενεργοποιούνται από την IL-12 και IL-23 αντίστοιχα, ενώ τα TH2 ενεργοποιούνται από την IL-4 και παράγουν IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13^{82, 87}. Τα Τ_H1 κύτταρα παράγουν IFN-γ, όπως τα CD8⁺ Τ κύτταρα, ενώ τα Τ ρυθμιστικά παράγουν IL-10⁸⁵. Σε κατάσταση παχυσαρκίας, ο αριθμός των ΤΗ1 κυττάρων αυξάνεται εις βάρος των ΤΗ17, ΤΗ2 και Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Ειδικότερα, η αναλογία των ΤΗ1 προς Τ ρυθμιστικών κυττάρων αυξάνεται από 1,5:1 σε κανονική κατάσταση σε 6,5:1 σε κατάσταση παχυσαρκίας. Ο αριθμός των Τ ρυθμιστικών κυττάρων υπολογίζεται ότι μειώνεται κατά 70%, υποστηρίζοντας έτσι το προφλεγμονώδες περιβάλλον. Σε πείραμα για να μελετηθεί ο ρόλος των CD4⁺ Τ κυττάρων στην παχυσαρκία, σε Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά, έγινε μεταμόσχευση CD4⁺ Τ κυττάρων. Οι μύες αυτοί παρουσίασαν μικρότερη αύξηση βάρους, είχαν λιποκύτταρα μικρότερου μεγέθους καθώς και χαμηλότερα επίπεδα λεπτίνης, resistin και monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) στην κυκλοφορία σε σχέση με αντίστοιχους μύες στους οποίους έγινε μεταμόσχευση CD8⁺ T κυττάρων. Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η μεταμόσχευση Τ ρυθμιστικών κυττάρων⁸². Σε άλλη μελέτη όπου καταστράφηκε μεγάλο ποσοστό των Τ ρυθμιστικών κυττάρων, δείχθηκε μειωμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης, καθώς και επαγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNFα, IL-6, RANTES και serum amyloid A-3 (SAA3). Αντίθετα, αύξηση του αριθμού των Τ ρυθμιστικών κυττάρων έδειξε ότι οι μύες αυτοί είχαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη και αυτό οφειλόταν στην παρουσία IL-10⁸⁵. Τέλος, όσον αφορά στα Τ_H17 πολωμένα CD4⁺ Τ κύτταρα, μία μελέτη έδειξε ότι η IL-17 προωθεί την ίνωση στο ήπαρ⁸⁸.

1.4.4.2 ΝΚΤ λεμφοκύτταρα

Τα ΝΚΤ λεμφοκύτταρα είναι μία ξεχωριστή ομάδα κυττάρων, καθώς διαθέτουν χαρακτηριστικά και των κυττάρων της μυελικής σειράς (εκφράζουν το μεμβρανικό δείκτη ΝΚ1.1) και της λεμφικής σειράς (εκφράζουν τους χαρακτηριστικούς υποδοχείς αντιγόνων των Τ κυττάρων)⁸⁹. Τα κύτταρα αυτά παράγονται στο θύμο αδένα και κατά κύριο λόγο συσσωρεύονται στο ήπαρ^{90, 91} και στο λιπώδη ιστό^{92,} ⁹³. Δύο ομάδες αυτών των κυττάρων έχουν χαρακτηρισθεί ανάλογα με τους υποδοχείς Τ κυττάρων (TCR) που εκφράζουν. Τα τύπου 1 ΝΚΤ κύτταρα ή invariant NKT (iNKT) εκφράζουν μία αμετάβλητη α-αλυσίδα (Vα14-Jα18 στους μύες και Vα24-Jα18 στον άνθρωπο), ενώ τα τύπου 2 NKT κύτταρα ή variant NKT (vNKT) εκφράζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία υποδοχέων TCR⁹⁴. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν γλυκολιπίδια, τα οποία παρουσιάζονται από τετραμερή σύμπλοκα CD1d. Κατά την ενεργοποίησή τους μπορούν να παράγουν κυτοκίνες τύπου Τ_H1, όπως IFNγ και TNFα, καθώς και κυτοκίνες τύπου Τ_H2, όπως IL-4 και IL-13⁹⁵. Η παρατήρηση ότι τα ΝΚΤ λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται όταν υπάρχει περίσσεια λιπιδίων οδήγησε πολλούς ερευνητές να ασχοληθούν με το ρόλο των ΝΚΤ κυττάρων, και ιδιαίτερα το ρόλο των iNKT κυττάρων, στην παχυσαρκία. Αν και τα αποτελέσματα των μελετών δεν είναι πάντα σύμφωνα, το σίγουρο είναι ότι τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη φλεγμονή και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Μελέτες σε μύες που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά δείχνουν ότι ο αριθμός των ηπατικών ΝΚΤ κυττάρων μειώνεται⁹⁶⁻⁹⁹. Το ίδιο παρατηρείται και στους παχύσαρκους ob/ob μύες¹⁰⁰. Μελέτη σε Jα18^{-/-} μύες (απουσία iNKT) που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά είχε ως αποτέλεσμα την υπερτροφία του λιπώδους ιστού, τη λιπώδη διήθηση του ήπατος και ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης. Επίσης, μεταφορά iNKT κυττάρων σε αυτούς τους μύες έδειξε βελτίωση στην αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και περισσότερη παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10. Στην ίδια μελέτη, τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε Cd1d1^{-/-} παχύσαρκους μύες⁹³. Σε διαφορετική μελέτη, που ενισχύει τον ευεργετικό ρόλο των ΝΚΤ κυττάρων, Cd1d1^{-/-} μύες, που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά, έδειξαν χαμηλότερη ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης. Επιπλέον, τα ήπατα των μυών αυτών ανέπτυξαν περισσότερο εκτεταμένη στεάτωση, παρόλο ότι οι υπόλοιποι μεταβολικοί παράγοντες, όπως η αύξηση βάρους και ο μεταβολικός ρυθμός, δεν έδειξαν καμία διαφορά μεταξύ αυτών των μυών και των αντίστοιχων μυών αγρίου τύπου⁹⁹. Αντίθετα, άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα iNKT κύτταρα προάγουν τη φλεγμονή, ινσουλινοαντίσταση και στεάτωση. Μία από αυτές έδειξε ότι, σε κατάσταση παχυσαρκίας, τα iNKT κύτταρα ενεργοποιούνται και εκφράζουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η ίδια μελέτη χρησιμοποίησε Jα18^{-/-} μύες σε κατάσταση παχυσαρκίας και βρέθηκε ότι οι μύες αυτοί είχαν μεγαλύτερη

ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειωμένη λιπώδη διήθηση στο ήπαρ¹⁰¹. Ενισχύοντας τον αρνητικό ρόλο των ΝΚΤ κυττάρων στην παχυσαρκία, μία άλλη μελέτη, που χρησιμοποίησε μύες που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά και με έλλειψη χολίνης, έδειξε ότι ο αριθμός των ΝΚΤ κυττάρων αυξήθηκε. Οι μύες αυτοί ανέπτυξαν τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου και στοιχεία ηπατικής βλάβης και στεατοηπατίτιδας. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι συνκαλλιέργεια ηπατοκυττάρων με ΝΚΤ κύτταρα από αυτούς τους μύες ευόδωσε την απορρόφηση λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα μέσω μιας κυτοκίνης που εκφράζεται από τα ΝΚΤ κύτταρα, τη LIGHT (tumor necrosis factor superfamily member 14 - TNFSF14)⁸⁴. Οι προαναφερθείσες μελέτες, καθώς και πληθώρα άλλων, έχουν υποδείξει πως τα ΝΚΤ κύτταρα διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση του μεταβολικού συνδρόμου, χωρίς όμως να καταλήγουν σε ασφαλές συμπέρασμα.

1.4.5 Φλεγμονή και Ινσουλινοαντίσταση

Η ινσουλινοαντίσταση αναπτύσσεται στους ενεργά μεταβολικούς ιστούς - ήπαρ, μυς, λιπώδης ιστός - σε οργανισμούς με μεταβολικό σύνδρομο. Τα πρώτα ευρήματα για τη συναναπτυσσόμενη φλεγμονή με την ινσουλινοαντίσταση αφορούν στο λιπώδη ιστό, όπου φάνηκε ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που κυριαρχούν στην παχυσαρκία προωθούν τη φωσφορυλίωση του IRS-1 σε θέση σερίνης και έτσι απενεργοποιούν τη δράση της ινσουλίνης^{102, 103}. Πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης παίζουν τα μακροφάγα, που σε κατάσταση παχυσαρκίας στρατολογούνται στους ιστούς και εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Πειράματα με Cc/2-/- μύες έδειξαν ότι μετά από πρόκληση παχυσαρκίας είχαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη⁵⁴. Τρία σηματοδοτικά μονοπάτια φαίνεται κυρίως να οδηγούν στην ινσουλινοαντίσταση: το IKK β /NF- κ B, τη c-Jun N-terminal kinase (JNK) και το inflammasome. Σε μη ενεργοποιημένη μορφή, ο NF-κB είναι συνδεδεμένος με τον inhibitor of κB (IκB) στο κυτταρόπλασμα. Με την ενεργοποίησή του, το σύμπλοκο της κινάσης του inhibitor of κB kinase (IKK) καταστρέφει τον inhibitor of κB και ο NF-κB μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου επάγει τη μεταγραφή προφλεγμονωδών κυτοκινών¹⁰⁴. Κατά την παχυσαρκία, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και ελεύθερα λιπαρά οξέα ενεργοποιούν την JNK, κυρίως την JNK1, η οποία φωσφορυλιώνει τον IRS-1 σε θέση σερίνης. Jnk1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με υπερθερμιδική δίαιτα
είχαν μειωμένη έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μειωμένη ινσουλινοαντίσταση¹⁰⁵. Η JNK ενεργοποιεί επίσης και το μεταγραφικό παράγοντα activator protein 1 (AP-1), ο οποίος, με τη μεταφορά του στον πυρήνα, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων προφλεγμονωδών παραγόντων¹⁰⁶. Τέλος, όπως ειπώθηκε παραπάνω, ενεργοποίηση του inflammasome οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή IL-18 και IL-1β. Η IL-1β, μέσω του υποδοχέα της, ενεργοποιεί τον NF-κB, προκαλώντας περαιτέρω αύξηση της μεταγραφής των προφλεγμονωδών κυτοκινών¹⁰⁷. Αντίστοιχα, *NIrp3^{-/-}* μύες, που σιτίστηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά, φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης⁵².

1.5 Παχυσαρκία και λιπώδης ιστός: φαιοποιημένος λιπώδης ιστός

Το μεγαλύτερο ποσοστό λιπώδους ιστού απαρτίζεται από λευκό λιπώδη ιστό, ένα μικρό ποσοστό από φαιό λιπώδη ιστό, ενώ πρόσφατα προστέθηκε και ο φαιοποιημένος λευκός λιπώδης ιστός (μπεζ)¹⁰⁸. Τα δύο τελευταία είδη λιπώδους ιστού, σε αντίθεση με το λευκό, έχουν θερμογενετική ικανότητα και άρα φέρουν τη δυνατότητα να καταβολίζουν το λίπος και γι' αυτό το λόγο έχουν γίνει φαρμακευτικοί στόχοι για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και των συνεπακόλουθων - σακχαρώδη διαβήτη και μεταβολικού συνδρόμου¹⁰⁹.

Στο φαιοποιημένο λευκό λιπώδη ιστό, τα τριγλυκερίδια αποθηκεύονται σε μικρά λιποσταγονίδια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα από τα πολλά μιτοχόνδρια που περιέχονται στο κύτταρο για παραγωγή θερμότητας, μέσω της αποσύνδεσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, με τη βοήθεια της uncoupling protein 1 (UCP1)¹¹⁰. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται στους ανθρώπους μετά τη γέννησή τους για τη θερμορρύθμιση του σώματος. Στους ενήλικες, η παρουσία του φαιού λίπους είνα σημαντικά ελαττωμένη¹¹¹ και φαίνεται ότι είναι φαιοποιημένος λευκός λιπώδης ιστός και όχι ο φαιός που έχουν τα βρέφη. Ο φαιός λιπώδης ιστός απεικονιστικά εμφανίζεται στις παρακάτω περιοχές: θυρεοειδής/τραχεία, μεσοθωράκιο, παρα-αυχενικά και υπερκλείδια, παραθωρακικά, υπερνεφρικά και περινεφρικά (**Εικόνα 1.12**)^{112, 113}.



Εικόνα 1.12: Περιοχές με παρουσία φαιού λιπώδους ιστού στον ενήλικο και στον νεογέννητο ανθρώπινο οργανισμό¹¹³

Ομάδες κυττάρων που παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των φαιών κυττάρων, δηλαδή μικρά πολλαπλά λιποσταγονίδια, πολλά μιτοχόνδρια και έκφραση γονιδίων που ενέχονται στη θερμογένεση (Ucp1, cell death-inducing DFFA-like effector a (*Cidea*)) και στη βιογένεση μιτοχονδρίων, *Pgc1α*, μπορούν να παρατηρηθούν σε σημεία του σώματος που έχουν υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό ¹¹⁴. Αυτά τα κύτταρα είναι τα αποκαλούμενα φαιοποιημένα λιπώδη κύτταρα ή μπεζ, καθώς πρόκειται για διαφορετικά κύτταρα από αυτά του φαιού ιστού και με προέλευση από διαφορετικά είδη πρώιμων κυττάρων¹⁰⁹. Τα φαιά κύτταρα προέρχονται από myogenic factor 5 (MYF5⁺) και paired box 7 (PAX7⁺) προγόνους και έχουν κοινή προέλευση με τα μυϊκά κύτταρα, ενώ τα φαιοποιημένα κύτταρα, όπως και τα κύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού, προέρχονται από MYF5⁻ προγόνους^{115, 116}. Μερικά κύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού προέρχονται και αυτά από MYF5⁺ και PAX7⁺ προγόνους¹¹⁷. Όσο για την προέλευση των φαιοποιημένων κυττάρων στο λευκό λιπώδη ιστό, τα δεδομένα είναι ακόμα διττά. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα φαιοποιημένα κύτταρα προέρχονται από τη δια-διαφοροποίηση ωρίμων λευκών κυττάρων^{118, 119}, ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι αυτά προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα θετικά για το δείκτη CD137^{116, 120}. Άλλες πάλι έχουν παρατηρήσει ότι λευκά και φαιοποιημένα λιπώδη κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν από platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFR-A⁺) κύτταρα¹²¹. Κυρίαρχο ρόλο στην επαγωγή δημιουργίας αυτών των κυττάρων, αλλά και ενεργοποίησης του θερμογόνου γονιδιακού προγράμματος στο λιπώδη ιστό, έχει η πρωτεΐνη PR domain containing 16 (PRDM16). Μελέτη σε μύες στους οποίους έχει διαγραφεί το

γονίδιο *Prdm16* από τον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό έδειξε ότι αυτά είχαν μειωμένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη θερμογένεση (iodothyronine deiodinase 2 (*Dio2*), *Ucp1*), καθώς και χαρακτηριστικών του φαιού ιστού (*Cidea*, otopetrin 1 (*Otop1*), *Ppara*) και γονιδίων της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (cytochrome C Oxidase (Cox) - *Coxiii, Cox5b, Cox8b*).

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 1.13*), έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί παράγοντες που μπορούν να επάγουν τη φαιοποίηση του λευκού λιπώδους ιστού.



Εικόνα 1.13: Παράγοντες που ενισχύουν την ανάπτυξη και λειτουργικότητα του φαιού ιστού ή τη φαιοποίηση του λευκού λιπώδους ιστού¹⁰⁹.

Ο πιο γνωστός, φυσιολογικός ενεργοποιητής της φαιοποίησης των λιποκυττάρων είναι το κρύο. Το κρύο ενεργοποιεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, το οποίο εκλύει νορεπινεφρίνη, η οποία ενεργοποιεί το φαιοποιητικό πρόγραμμα μέσω των β3-αδρενεργικών υποδοχέων (AdRβ3)¹²². Ένας άλλος παράγοντας είναι ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 21 (FGF21). Ο FGF21 έχει αυτοκρινή και παρακρινή δράση και, μέσω της πρόσδεσής του στον FGF υποδοχέα και στο συν-υποδοχέα β-klotho, επάγει γονίδια που συμμετέχουν στη θερμογένεση¹²³. Το 2012, μελέτη έδειξε ότι η άσκηση προκαλεί αύξηση στα επίπεδα της PGC1α στους σκελετικούς μυς και έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του fibronectin type III domain containing 5 (*fndc5*). Μετά από μοριακές τροποποιήσεις, η FNDC5 εκκρίνεται στην κυκλοφορία ως ώριμη πρωτεΐνη, που ονομάσθηκε IRISIN, η οποία φαίνεται ότι δρα στον υποδόριο λιπώδη ιστό και επάγει τη φαιοποίησή

του¹²⁴. Άλλος ένας παράγοντας ο οποίος προωθεί τη φαιοποίηση του λευκού λιπώδους ιστού είναι τα νατριουρητικά πεπτίδια, που εκκρίνονται από την καρδιά και δρουν μέσω των νατριουρητικών υποδοχέων, που εκφράζονται και στο λιπώδη ιστό. Με την ενεργοποίησή τους, όπως έχει δειχθεί, προωθούν τη λιπόλυση όπως και οι κατεχολαμίνες. Πρόσφατη *in vitro* μελέτη σε ανθρώπινα λιποκύτταρα έδειξε ότι διέγερση των νατριουρητικών υποδοχέων σε αυτά τα κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των Ucp1, Pgc1a, Cytochrome c και Prdm16¹²⁵.

Είναι πολύ ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) και τα ηωσινόφιλα, συμμετέχουν στους μηχανισμούς που προωθούν τη φαιοποίηση του λευκού λιπώδους ιστού. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι τα ILC2 κύτταρα υποστηρίζονται και ενεργοποιούνται από την IL-33 και παράγουν τις IL-5 και IL-13, που, όπως ειπώθηκε παραπάνω, ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα και προωθούν την Μ2 πόλωση των μακροφάγων. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε επίσης ότι ο υποδόριος λιπώδης ιστός των //-33^{-/-} μυών είχε πολύ λιγότερα φαιοποιημένα κύτταρα και χαμηλότερη έκφραση Ucp1 από ότι των αντίστοιχων μυών αγρίου τύπου. Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης ότι τα ILC2s παράγουν το πεπτίδιο methionine-enkephalin (MetEnk) μετά από ενεργοποίηση από την IL-33, η οποία προκάλεσε σε μύες αγρίου τύπου φαιοποίηση των λιποκυττάρων, αύξηση της έκφρασης του Ucp1 και αύξηση στην κατανάλωση οξυγόνου⁷⁹. Άλλη μία μελέτη έδειξε επίσης ότι η IL-33 προκαλεί παραγωγή IL-5 από τα ILC2 κύτταρα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στον αριθμό των ηωσινόφιλων αλλά και στον πολλαπλασιασμό των PDGFRa⁺ πρόδρομων κυττάρων, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λευκά ή φαιοποιημένα λιποκύτταρα. Η IL-33 φαίνεται ότι αυξάνει τον αριθμό των PDGFRa⁺ πρόδρομων κυττάρων, που διαφοροποιούνται προς φαιοποιημένα κύτταρα. Αυτό αποδείχθηκε ότι γίνεται μέσω του IL-4/13 μονοπατιού και ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τον IL4Ra υποδοχέα. Επίσης, πειράματα με μύες που στερούνται ILC2 κύτταρα, έδειξαν ότι τα τελευταία είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των PDGFRa⁺ πρόδρομων κυττάρων¹²⁶. Άλλα κύτταρα που εμπλέκονται στη φαιοποίηση του λιπώδους ιστού είναι τα ηωσινόφιλα. Μία μελέτη έδειξε ότι μετά από άσκηση ή έκθεση σε κρύο, παράγεται μία πρωτεΐνη, η meteorin-like (METRNL), που επάγει την παραγωγή ενέργειας και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που ενέχονται

στη θερμογένεση και αυξάνει τα φαιοποιημένα λιποκύτταρα. Επίσης, οδήγησε σε αύξηση των ηωσινόφιλων στο λιπώδη ιστό, που είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή IL-4 και IL-13¹²⁷. Από αυτές τις μελέτες είναι φανερό ότι τα ILC2 κύτταρα και τα ηωσινόφιλα προωθούν τη φαιοποίηση λιποκυττάρων αλλά και την M2 πόλωση των μακροφάγων. Μερικές μελέτες υποστήριξαν ότι τα M2 μακροφάγα εκφράζουν την tyrosine hydroxylase (TH), που είναι το κύριο ένζυμο στη βιοσύνθεση της νορεπινεφρίνης, και παράγουν κατεχολαμίνες, που οδηγούν στη φαιοποίηση του λευκού λιπώδους ιστού⁷², εύρημα που αμβισβητείται από μία πρόσφατη μελέτη, που απέδειξε ότι τα M2 μακροφάγα δεν συνθέτουν κατεχολαμίνες¹²⁸.

1.6 Γενετικά υπόβαθρα μυών στην πρόκληση παχυσαρκίας

Οι μελέτες που περιλαμβάνονται σε αυτήν τη διατριβή εστιάζουν στην επίδραση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο μεταβολισμό του λίπους σε καταστάσεις παχυσαρκίας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μύες δύο γενετικών υπόβαθρων (C57BL/6 και BALB/c), καθώς στη βιβλιογραφία οι περισσότερες μελέτες που εστιάζουν στο μεταβολισμό χρησιμοποιούν μύες με γενετικό υπόβαθρο C57BL/6, ενώ οι ανοσολογικές μελέτες χρησιμοποιούν μύες BALB/c γενετικού υπόβαθρου. Οι BALB/c μύες είναι επιρρεπείς σε λοιμώξεις, και η ανοσολογική τους απάντηση είναι τύπου TH2, σε αντίθεση με τους C57BL/6 μύες στους οποίους κυριαρχεί η TH1 ανοσολογική απάντηση¹²⁹. Όσον αφορά στο μεταβολισμό και στην ανάπτυξη παχυσαρκίας, οι C57BL/6 μύες είναι περισσότερο επιρρεπείς με αποτέλεσμα να αυξάνουν το βάρος τους περισσότερο και να εμφανίζουν τις παθογένειες του μεταβολικού συνδρόμου, μεταξύ άλλων ινσουλινοαντίσταση και λιπώδη διήθηση του ήπατος, ευκολότερα από τους BALB/c μύες^{130, 131}. Συχνά, ίδιες προκλήσεις σε μύες διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα και μάλιστα όταν τα χρησιμοποιούμενα ερεθίσματα επιδρούν και στο ανοσολογικό σύστημα¹³¹. Είναι συνεπώς πολύ σημαντικό να επιλέγεται η καταλληλότητα του κάθε γενετικού υπόβαθρου σε σχέση με το υπό μελέτη ερώτημα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν Rag1-/- μύες και μύες αγρίου τύπου σε γενετικό υπόβαθρο C57BL/6 και συγκρίθηκαν με

αντίστοιχους μύες BALB/c γενετικού υπόβαθρου, όσον αφορά στο μεταβολισμό, στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και στην αντίσταση στην ινσουλίνη.

2. Σκοπός

Η παχυσαρκία είναι μία επιδημική νόσος της εποχής μας με σοβαρές επιπλοκές και θνητότητα. Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εξέλιξη και στις επιπλοκές της παχυσαρκίας, μεταξύ των οποίων η πολύ κοινή, και συχνά σοβαρή, ανάπτυξη της λιπώδους διήθησης του ήπατος^{56, 59, 87}. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες εστίασαν και τεκμηρίωσαν το ρόλο των κυττάρων της μυελικής σειράς στη λιπώδη διήθηση του ήπατος, νέα δεδομένα υποδεικνύουν το ρόλο των κυττάρων της λολο των κυττάρων της λεμφικής σειράς στην ανάπτυξη της νόσου^{81, 82, 84}.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να αξιολογηθεί και να μελετηθεί ο ρόλος των λεμφοκυττάρων στο μεταβολισμό, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της παχυσαρκίας και της λιπώδους διήθησης του ήπατος, καθώς και να χαρακτηρισθεί η πιθανή υποομάδα των λεμφοκυττάρων που ενέχεται.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο της επαγόμενης παχυσαρκίας και λιπώδους διήθησης του ήπατος, μέσω διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη, σε μύες με γενετικής αιτιολογίας έλλειψη Τ και Β λεμφοκυττάρων (*Rag1*^{-/-}). Πιο συγκεκριμένα, σκοπεύουμε να αξιολογήσουμε τις επιπτώσεις της απουσίας αυτών των κυττάρων στις μεταβολικές διεργασίες που διαμεσολαβούν την ανάπτυξη της νόσου. Για το λόγο αυτό θα μελετηθεί η ενεργειακή κατανάλωση καθώς και ο μεταβολισμός στους ιστούς που κατεξοχήν μεταβολίζουν τα λιπίδια, όπως το ήπαρ και οι διαφορετικοί τύποι λιπώδους ιστού. Προκειμένου να διαλευκάνουμε αν κάποια υποομάδα των κυττάρων της λεμφικής σειράς επηρεάζει την ανάπτυξη της νόσου, θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της θετής μεταφοράς κυττάρων σε *Rag1*^{-/-} μύες που θα σιτιστούν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, ή η φαρμακολογική παρεμπόδιση της λειτουργίας συγκεκριμένων κυττάρων σε μύες αγρίου τύπου με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Η σημασία της παρούσας μελέτης έγκειται στην ταυτοποίηση των μεταβολικών μονοπατιών που επηρεάζονται από τα λεμφοκύτταρα σε καταστάσεις περίσσειας θερμίδων, και στη συνεισφορά πιθανών νέων φαρμακευτικών στόχων για τη θεραπεία της ινσουλινοαντίστασης και της συνεπακόλουθης στεατοηπατίτιδας.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Εργαστηριακά Ζώα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν:

α) μύες αγρίου τύπου, γενετικό υπόβαθρο C57BL/6J, BALB/c.

β) μύες με μετάλλαξη στο γονίδιο *Rag1* (*Rag1^{-/-}*), με αποτέλεσμα οι μύες αυτοί να μη διαθέτουν ώριμα Τ και Β λεμφοκύτταρα, γενετικό υπόβαθρο C57BL/6, BALB/c.

Οι μύες στεγάζονταν σε κλωβούς σε κατάλληλα διαμορφωμένους χώρους στο Ιατροβιολογικό Ίδρυμα Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στους οποίους επικρατούσαν ελεγχόμενες συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας (θερμοκρασία 22°C, 12:12 ώρες κύκλος φωτός/σκότους, με τα φώτα να ανάβουν στις 7 π.μ.). Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (*ad libitum*). Προσεκτική παρακολούθηση των κλωβών για πιθανές απώλειες πραγματοποιείτο καθημερινά. Στα πειραματικά πρωτόκολλα, που περιγράφονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί μύες ηλικίας 12 εβδομάδων. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ζωϊκών Πειραματικών Πρωτοκόλλων του ΙΙΒΕΑΑ και από τη διεύθυνση Κτηνιατρικής, Γενική Διεύθυνση Περιφέρειας Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Αττικής, σύμφωνα με εθνική καταχώρηση (Προεδρικό διάταγμα 56/2013) σε εναρμόνηση με το Ευρωπαϊκό διάταγμα 63/2010.

3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο επαγωγής παχυσαρκίας σε μύες με χορήγηση τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος (HFD)

Υλικά

Τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος (Research Diets, New Jersey, USA, κωδικός: D12451)
 Η αναλυτική θερμιδική σύσταση της τροφής είναι:

Πρωτεΐνη → 20% kcal

Υδατάνθρακες → 35% kcal

 Λ ίπος \rightarrow 45% kcal

Κανονική τροφή για εργαστηριακά ζώα (Mucedola, IT, κωδικός: 4RF22)

Μέθοδος

Ενήλικοι αρσενικοί μύες αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}* σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος ή με κανονική εργαστηριακή τροφή για 10-16 εβδομάδες (*Εικόνα 3.1*). Κάθε εβδομάδα μετριόταν το βάρος των μυών. Στη μέση του πειράματος, μετριόταν καθημερινά η κατανάλωση τροφής για μία εβδομάδα.



Εικόνα 3.1: Απεικόνιση του πειράματος επαγωγής παχυσαρκίας σε μύες με χορήγηση τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων εβδομάδων του πειράματος, πραγματοποιούντο μία δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (Glucose Tolerance Test – GTT) και μία δοκιμασία ανοχής ινσουλίνης (Insulin Tolerance Test – ITT). Συλλεγόταν επίσης αίμα για την απομόνωση ορού. Η μεθοδολογία των παραπάνω μετρήσεων περιγράφεται παρακάτω.

3.3 Χορήγηση αντισώματος CD1d σε μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για να παρεμποδιστεί η ενεργοποίηση των ΝΚΤ κυττάρων

Υλικά

- Τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος (Research Diets, New Jersey, USA, κωδικός: D12451)
- Αντι-CD1d μυός Functional Grade Purified 4000μg (eBioscience κωδικός: 16-0011-85)
- Σύριγγα ινσουλίνης 1ml G29x12,7mm Microfine (BD, κωδικός: 324827)

Μέθοδος

Ενήλικοι αρσενικοί μύες αγρίου τύπου σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για 6 εβδομάδες (*Εικόνα 3.2*). Κάθε εβδομάδα μετριόταν το βάρος των μυών.



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση του πειράματος χορήγησης αντισώματος CD1d σε μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για να παρεμποδιστεί η ενεργοποίηση των ΝΚΤ κυττάρων.

Στην αρχή της 4^{ης} εβδομάδας και κάθε 2 ημέρες χορηγείτο ενδοπεριτοναϊκά αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CD1d, όπως φαίνεται στο παραπάνω σχεδιάγραμμα. Η συνολική ποσότητα αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1000 μg για κάθε μυ, και χορηγήθηκε σε πέντε δόσεις των 250 μg, 200 μg, 250 μg, 150 μg και 150 μg. Μετά από 11 ημέρες από τη χορήγηση της πρώτης δόσης, οι μύες θυσιάστηκαν.

3.4 Θετή μεταφορά CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος

Υλικά

- Τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος (Research Diets, New Jersey, USA, κωδικός: D12451)
- Εμπλουτισμένος CD8⁺ Τ κυτταρικός πληθυσμός
- Σύριγγα ινσουλινης 1ml G29x12,7mm Microfine (BD, κωδικός: 324827)

Μέθοδος

Ενήλικοι αρσενικοί μύες αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}* σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος για 4 εβδομάδες (*Εικόνα 3.3*). Κάθε εβδομάδα μετριόταν το βάρος των μυών.



Εικόνα 3.3: Απεικόνιση του πειράματος θετής μεταφοράς CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος.

Στην αρχή της 3^{ης} εβδομάδας σίτισης με τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος έγινε έγχυση κυτταρικού πληθυσμού εμπλουτισμένου με CD8⁺ T κύτταρα (1x10⁷ κύτταρα), μέσω της οπίσθιο-οφθαλμικής φλέβας. Στο τέλος του πειράματος έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση του ηπατικού ιστού των μυών που έλαβαν τα κύτταρα με αντίσωμα αντι-CD8 προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της μεταφοράς.

3.5 Απομόνωση κυττάρων από το σπλήνα

Υλικά

- Αντικειμενοφόροι πλάκες Super Frost θετικά φορτισμένες (Fisher Scientific, κωδικός: J1800AMNZ)
- Σπλήνες από μύες αγρίου τύπου
- Φίλτρο (cell strainer) 70 μm (BD falcon, κωδικός: 352350)
- PBS

Μέθοδος

Για την προετοιμασία εναιωρήματος κυττάρων, πραγματοποιήθηκε ευθανασία σε μύες αγρίου τύπου και απομονώθηκε ο σπλήνας. Σε στείρες συνθήκες, σε τριβλίο τύπου Petri, με PBS, συνθλίφτηκαν οι σπλήνες με το άσπρο τραχύ τμήμα αντικειμενοφόρου πλάκας έως ότου σχηματιστούν μεμονωμένα κύτταρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και φυγοκεντρήθηκαν σε 1200 rpm για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml PBS και πέρασαν από φίλτρο 70 μm. Στη συνέχεια ακολούθησε λύση των ερυθροκυττάρων.

3.6 Καταμέτρηση κυττάρων

Υλικά και συσκευές

- Trypan blue (Sigma-aldrich, USA, κωδικός: T8154)
- Αιματοκυτταρόμετρο τύπου Nebauer
- Εναιώρημα κυττάρων
- Οπτικό Μικροσκόπιο (LEICA DMIL)

Σε σωληνάριο τύπου eppendorf, αραιώθηκαν κύτταρα σε trypan blue. Το μίγμα τοποθετήθηκε στο αιματοκυτταρόμετρο και τα κύτταρα των τεσσάρων γονιακών τεταρτημορίων μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 3.4*).



Εικόνα 3.4: Απεικόνηση αιματοκυτταρόμετρου^{132, 133}

Η συγκέντρωση των κυττάρων (C) στο εναιώρημα υπολογίσθηκε ως εξής:

C (κύτταρα/ml) = (Μέσος όρος αριθμού κυττάρων σε κάθε τετράγωνο) x (Αραίωση) x (10⁴)

Ο συνολικός αριθμός κυττάρων στο εναιώρημα υπολογίσθηκε με τον παρακάτω τύπο.

Συνολικός αριθμός κυττάρων = C x όγκο του εναιωρήματος

3.7 Εμπλουτισμός κυτταρικού πληθυσμού με CD8⁺ Τ κύτταρα με μαγνητικό διαχωρισμό

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ταυτοποίηση όλων των κυτταρικών υποπληθυσμών εκτός των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων με βιοτυνιλιωμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα (*Πίνακας 3.1*):

Πίνακας 3.1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον εμπλουτισμό κυτταρικού πληθυσμού με CD8⁺ Τ κύτταρα με μαγνητικό διαχωρισμό.

Αντίσωμα	Κυτταρικός πληθυσμός
Αντι - CD4 μυός, κλώνος GK1.5	CD4+ Τ λεμφοκύτταρα
Αντι - CD11b μυός, κλώνος M1/70	Λευκοκύτταρα (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ΝΚ κύτταρα)
Αντι - CD45R/B220 μυός, κλώνος RA3- 6B2	Β λεμφοκύτταρα
Αντι - CD49b μυός, κλώνος: ΗΜα2	ΝΚ, ΝΚΤ CD4+ Τ κύτταρα, αιμοπετάλια
Αντι - TER-119/Erythroid Cells μυός, κλώνος TER-119	Ερυθροκύτταρα

Στη συνέχεια, τα μαγνητικά σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με στρεπταβιδίνη προστίθενται στο μίγμα και συνδέονται με τα βιοτυνιλιωμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Κατά την τοποθέτηση του μίγματος στο μαγνήτη, τα κύτταρα που εκφράζουν αυτούς τους δείκτες προσκολλώνται στο μαγνήτη και έτσι στο εναιώρημα παραμένουν τα CD8⁺ T λευκοκύτταρα.

Υλικά και συσκευές

- Εναιώρημα κυττάρων
- BD IMag[™] Mouse CD8⁺ T Lymphocyte Enrichment Set DM (BD Biosciences, κωδικός: 558471)
- Μαγνήτης διαχωρισμού κυττάρων BD IMagnet™ (BD Biosciences, κωδικός: 552311)
- Σωλήνες πολυστυρενίου 12 x 75mm (BD Falcon™, κωδικός: 352058)
- Σωλήνες πολυστυρενίου 17 x 100mm (BD Falcon™, κωδικός: 352057)
- Θρεπτικό υλικό κυττάρων DMEM, 10% FBS, 1% pen/strep (DMEM, Gibco, κωδικός: 11966-025, FBS, Gibco, κωδικός: 10270, Pen/Strep, Gibco, κωδικός: 15070-063)

Αρχικά, το εναιώρημα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε συγκεκριμένο όγκο θρεπτικού υλικού κυττάρων, ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι από 10 x 10⁶ έως 20 x 10⁶ κύτταρα/ ml. Στη συνέχεια, για κάθε 1 x 10⁶ κυττάρων προστέθηκαν 5 μl του βιοτυνιλιωμένου κοκτέιλ αντισωμάτων για εμπλουτισμό CD8⁺ T λευκοκυττάρων μυός. Το μίγμα επωάστηκε σε πάγο για 15 λεπτά. Έπειτα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 10χ όγκο θρεπτικού υλικού κυττάρων και φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 rpm για 7 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνθηκε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο. Ακολούθως, αφού αναδεύτηκαν πολύ καλά τα μαγνητικά σφαιρίδια (BD IMag Streptavidin Particles Plus – DM), προστέθηκαν 5 μ l για κάθε 1 x 10⁶ κυττάρων. Το μ ίγμα αναδεύτηκε και επωάστηκε σε θερμοκρασία 6°C - 12°C για 30 λεπτά. Έπειτα προστέθηκε όγκος θρεπτικού υλικού κυττάρων έτσι ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι από 20 έως 80 x 10⁶ κύτταρα/ ml. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωλήνες πολυστυρενίου 12 x 75 mm για όγκους που δεν ξεπερνούσαν το 1 ml ή σε σωλήνες 17 x 100 mm για όγκους έως και 3 ml. Οι σωλήνες τοποθετούντο στο μαγνήτη BD IMagnet για 8 λεπτά. Στη συνέχεια, το εμπλουτισμένο για CD8⁺ Τ λευκοκύτταρα εναιώρημα, μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα πολυστυρενίου. Στο αρχικό σωληνάριο, μετά τον πρώτο μαγνητικό διαχωρισμό, προστέθηκε ίδιος όγκος θρεπτικού υλικού κυττάρων και έγινε ανάδευση με πιπέττα 10-15 φορές. Το σωληνάριο αυτό τοποθετήθηκε εκ νέου στο μαγνήτη για 8 λεπτά. Το νέο εναιώρημα απομονώθηκε και προστέθηκε στο πρώτο, εμπλουτισμένο για CD8⁺ Τ λευκοκύτταρα, εναιώρημα. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε συγκέντρωση 10 x 10⁷ κύτταρα/ml. Από αυτό το διάλυμα 100 μl, δηλαδή 1 x 10⁷ κύτταρα, ενέθηκαν σε κάθε μυ μέσω της οπισθιο-οφθαλμικής φλέβας (*Εικόνα 3.5*).



Εικόνα 3.5: Απεικόνηση έγχυσης εναιωρήματος κυττάρων μέσω της οπίσθιο-οφθαλμικής φλέβας¹³⁴

3.8 Μέτρηση σωματικού βάρους

Συσκευές

- Ηλεκτρονικός ζυγός (Delmac Instruments, κωδικός: DS 302 F12)
- Κυτίο ζυγίσματος

Μέθοδος

Το κυτίο ζυγίσματος τοποθετείτο στο ζυγό και μηδενιζόταν. Το πειραματόζωο τοποθετείτο στο κυτίο και το βάρος του καταγραφόταν.

3.9 Αδρή μέτρηση κατανάλωσης τροφής

Συσκευές

Ηλεκτρονικός ζυγός (Delmac Instruments, κωδικός: DS 302 F12)

Μέθοδος

Την πρώτη μέρα, σε καθορισμένη ώρα, μετριόταν η τροφή που υπήρχε σε κάθε κλωβό. Μετά από 24 ώρες ζυγιζόταν η τροφή που είχε παραμείνει στον κλωβό. Η διαφορά στο βάρος της τροφής μεταξύ δύο συνεχόμενων ημερών ήταν η ημερήσια κατανάλωση. Η μέση κατανάλωση τροφής ήταν ο μέσος όρος για τη διάρκεια των επτά ημερών. Η κατανάλωση τροφής εξετάστηκε και με τη χρήση μεταβολικών κλωβών και θα περιγραφεί παρακάτω.

3.10 Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (GTT)

Η δοκιμασία ανοχής γλυκόζης χρησιμοποιείται για να εξεταστεί η ταχύτητα με την οποία η χορηγούμενη γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα. Η απορρόφηση της γλυκόζης από το αίμα ελέγχεται από την ινσουλίνη. Σε μη φυσιολογικές συνθήκες, όταν η γλυκόζη δεν μεταβολίζεται από τον οργανισμό ή υπάρχει αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, τότε ο ρυθμός με τον οποίο απορροφάται η γλυκόζη από το αίμα μειώνεται. Στους διαβητικούς οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό της χορηγηθείσας γλυκόζης δεν απορροφάται.

Υλικά και συσκευές

- Γλυκόζη (D-glucose, Sigma-aldrich, USA, κωδικός: G6152)
- Αποστειρωμένο PBS (Gibco, κωδικός: 100010-015)
- Σύριγγα ινσουλίνης 1 ml G29x12,7mm Microfine (BD, κωδικός: 324827)
- Γλυκόμετρο Accu-Check Aviva (Roche, Indianapolis, IN, USA)
- Ταινίες μέτρησης σακχάρου για μετρητή γλυκόζης ACCU-CHEK Aviva (Roche, Indianapolis, IN, USA)

Μέθοδος

Μετά από ολονύκτια νηστεία, οι μύες ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με διάλυμα γλυκόζης σε PBS έτσι ώστε να λαμβάνουν δόση 2 g/kg σωματικού βάρους. Μετά την έγχυση γλυκόζης, σταγόνες αίματος συνελέγησαν από την ουρά στους χρόνους 0, 30, 60, 90 και 120 λεπτά. Η σταγόνα τοποθετείτο στη δοκιμαστική ταινία μέτρησης γλυκόζης και η μέτρηση γινόταν με χρήση του μετρητή γλυκόζης.

3.11 Δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT)

Η δοκιμασία ανοχής στην ινσουλίνη εξετάζει την ευαισθησία του οργανισμού στην ινσουλίνη. Έτσι, μετά από ολιγόωρη νηστεία, χορηγείται ινσουλίνη και εξετάζεται η ταχύτητα με την οποία τα επίπεδα της γλυκόζης μειώνονται στο αίμα, καθώς και σε πόσο χρόνο το επίπεδο της γλυκόζης επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε μη φυσιολογικές καταστάσεις, η χορήγηση ινσουλίνης δεν έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση της γλυκόζης από το αίμα στα κύτταρα.

Υλικά και συσκευές

- Ινσουλίνη (Humulin,Lilly, Indianapolis, IN, κωδικός: ΗΙ 0319)
- Αποστειρωμένο PBS (Gibco, κωδικός: 100010-015)
- Σύριγγα ινσουλίνης 1 ml G29x12,7mm Microfine (BD, κωδικός: 324827)
- Γλυκόμετρο ACCU-CHEK Aviva (Roche, Indianapolis, IN, USA)
- Ταινίες μέτρησης σακχάρου για γλυκόμετρο ACCU-CHEK Aviva (Roche, Indianapolis, IN, USA)

Μέθοδος

Μετά από νηστεία 5 ωρών, οι μύες ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με διάλυμα ινσουλίνης σε PBS, έτσι ώστε να λαμβάνουν δόση 1 U/kg σωματικού βάρους. Μετά την έγχυση ινσουλίνης, σταγόνες αίματος συνελέγησαν από την ουρά στους χρόνους 0, 30, 60, 90 και 120 λεπτά. Η σταγόνα τοποθετείτο στη δοκιμαστική ταινία μέτρησης γλυκόζης και η μέτρηση γινόταν με χρήση του μετρητή γλυκόζης.

3.12 Συλλογή αίματος και απομόνωση ορού

Υλικά και συσκευές

- Ηπαρινισμένοι τριχοειδείς σωλήνες (Fisherbrand[™] Microhematocrit Capillary Tubes, κωδικός 22-362-566)
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf, Centrifuge 5804)

Μέθοδος

Για τη συλλογή αίματος επιλέχθηκε η μέθοδος λήψης μέσω της οπίσθιοοφθαλμικής φλέβας, καθώς, συγκριτικά με άλλες μεθόδους, μπορεί να γίνει συλλογή μεγαλύτερης ποσότητας αίματος και σε ταχύτερο χρόνο, προκαλώντας έτσι στρες για μικρότερο χρονικό διάστημα. Έτσι ο μυς ακινητοποιείτο και το αίμα συλλεγόταν με ηπαρινισμένους τριχοειδείς σωλήνες. Το αίμα φυγοκεντρείτο στις 7000 rpm για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο (ορός) φυλασσόταν στον καταψύκτη -80 °C μέχρι να γίνει ανάλυση.

3.13 Μελέτη μεταβολικών παραμέτρων με έμμεση θερμιδομετρία

Η μέτρηση του μεταβολισμού των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε με τον πιο σύγχρονο, εξελιγμένο και μη επεμβατικό εξοπλισμό, το ολοκληρωμένο σύστημα καταγραφής μεταβολισμού πειραματόζωων (Comprehensive Lab Animal Monitoring System, CLAMS) (Columbus Instruments, OH 43204, U.S.A). H μέτρηση του μεταβολισμού με το CLAMS πραγματοποιείται με βάση τη μέθοδο της έμμεσης θερμιδομετρίας. Η έμμεση θερμιδομετρία αποτελεί τη χρυσή σταθερά καθορισμού των ενεργειακών αναγκών των ζωικών οργανισμών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το σώμα του ζώου, όπως και του ανθρώπου, μεταβολίζει (καίει) τα παρεχόμενα σε αυτό θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιώντας οξυγόνο (O2) και παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα (CO2), νερό και άζωτο. Το CLAMS μετρά την ανταλλαγή των αερίων (VO2 και VCO2) και γίνεται επεξεργασία των τιμών που συλλέγονται κατά την πειραματική διαδικασία σε ειδικό υπολογιστικό πρόγραμμα (Oxymax 4.73), που, με τη χρήση ειδικών εξισώσεων, υπολογίζει τη συνολική ενεργειακή δαπάνη (Total Energy Expenditure, TEE) του πειραματόζωου. Με βάση αυτό και με μέτρηση του σωματικού βάρους του πειραματόζωου υπολογίσθηκε ο μεταβολικός ρυθμός (Metabolic Rate, MR). Επίσης υπολογίσθηκε το αναπνευστικό πηλίκο (Respiratory Exchange Ratio, RER), που αποτελεί κλασικό μεταβολικό δείκτη. Το RER ορίζεται ως ο όγκος CO2 που ελευθερώνεται δια του όγκου O2 που καταναλώνεται σε μία καύση και εκφράζει την αναλογία των χρησιμοποιούμενων για ενέργεια θρεπτικών υποστρωμάτων. Επίσης εκτιμήθηκαν η κατανάλωση τροφής και η φυσική δραστηριότητα των πειραματόζωων.

Υλικά και Συσκευές

 Comprehensive Lab Animal Monitoring System, CLAMS (Columbus Instruments, OH 43204, U.S.A)

Μέθοδος

Όλες οι κατηγορίες μυών υποβλήθηκαν σε έμμεσες θερμιδομετρικές μελέτες χρησιμοποιώντας το σύστημα Oxymax indirect calorimetry system της εταιρίας Columbus Instruments, Columbus, OH. Αρχικά μετρήθηκε το σωματικό βάρος των μυών και στη συνέχεια ο κάθε μυς ξεχωριστά τοποθετήθηκε σε ειδικό κλωβό του συστήματος για 72 ώρες, έτσι ώστε οι μύες να εγκλιματιστούν στο νέο περιβάλλον, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (*ad libitum*). Ο κύκλος σκότους/φωτός και η θερμοκρασία παρέμειναν ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.1.

Οι ρυθμοί κατανάλωσης όγκου O₂ (VO₂) και παραγωγής όγκου CO₂ (VCO₂) καθορίστηκαν υπό τις ακόλουθες ρυθμίσεις στο σύστημα Oxymax:

- Ροή αέρα: 0.6 l/min
- Ροή δείγματος: 0.5 l/min

Η βαθμονόμηση του συστήματος για να μετρηθούν η κατανάλωση όγκου O₂ (VO₂, ml/kg/h) και η παραγωγή όγκου CO₂ (VCO₂, ml/kg/h) έγινε με χρήση αερίου γνωστών συγκεντρώσεων. Ο μεταβολικός ρυθμός και το αναπνευστικό πηλίκο (πηλίκο VCO₂/VO₂, RER) αξιολογήθηκαν για 48 ώρες. Η συνολική ενεργειακή δαπάνη (TEE) υπολογίσθηκε με τον παρακάτω τύπο:

TEE = Θερμιδική αξία του οξυγόνου (3.815+1.232 x αναπνευστικό πηλίκο) + όγκος του O₂ (VO₂) που καταναλώθηκε

3.14 Θυσία και λήψη ιστών από τα πειραματόζωα

Υλικά

- Ισοφλουράνη (Abbott, κωδικός: B506)
- 70% αιθανόλη (Absolute Ethanol, VWR Chemicals, κωδικός: 20821.365)
- Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS (Paraformaldehyde, Sigma Aldrich, κωδικός: P6148)
- Διάλυμα φορμόλης 10% (Sigma Aldrich, κωδικός: HT50-1-128)
- OCT (VWR CHEMICALS, κωδικός: 361603E)
- Καταψύκτης -80°C (KALTIS)

Στο τέλος του πειράματος, την ημέρα της θυσίας των μυών, μετριόταν το σωματικό βάρος. Οι μύες αναισθητοποιούνταν σε κλειστό δοχείο, που περιείχε απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με ισοφλουράνη, και στη συνέχεια θυσιάζονταν με ακαριαία διαρραγή του νωτιαίου μυελού και απομονώνονταν οι παρακάτω ιστοί:

Α. Υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός

Απομόνωση ολόκληρου του ιστού της δεξιάς πλευράς για φύλαξη στον καταψύκτη -80°C για απομόνωση RNA και ολόκληρου του ιστού της αριστερής πλευράς, το οποίο τοποθετείτο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS για διάστημα δύο ωρών, ώστε να διασφαλιστεί η μονιμοποίησή του, με σκοπό να εγκλειστεί σε παραφίνη και να ακολουθήσουν ιστολογικές μελέτες.

<u>Β. Επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός</u>

Απομόνωση ολόκληρου του ιστού της δεξιάς πλευράς για φύλαξη στον καταψύκτη -80°C για απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Απομόνωση ολόκληρου του ιστού της αριστερής πλευράς και μέτρηση του βάρους του, στη συνέχεια ο ιστός μοιραζόταν σε δύο κομμάτια. Το ένα τοποθετείτο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS για διάστημα δύο ωρών ώστε να διασφαλιστεί η μονιμοποίηση του, με σκοπό να εγκλειστεί σε παραφίνη, ενώ το δεύτερο κομμάτι τοποθετείτο σε διάλυμα φορμόλης 10% για 16 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείτο σε ΟCT και κατευθείαν στον καταψύκτη -80°C μέχρι να κοπούν τομές στον κρυοστάτη και να ακολουθήσουν ιστολογικές μελέτες.

<u>Γ. Ήπαρ</u>

Απομόνωση του μεγάλου λοβίου για φύλαξη στον καταψύκτη -80°C για απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Απομόνωση ενός τμήματος το οποίο τοποθετείτο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS για διάστημα τεσσάρων ωρών ώστε να διασφαλιστεί η μονιμοποίηση του, με σκοπό να εγκλειστεί σε παραφίνη. Απομόνωση ενός τμήματος, το οποίο τοποθετείτο σε OCT και κατευθείαν στον καταψύκτη -80°C μέχρι να κοπούν τομές στον κρυοστάτη και να ακολουθήσουν ιστολογικές μελέτες. Απομόνωση ενός τμήματος, μέτρηση του βάρους του και φύλαξη στον καταψύκτη -80°C μέχρι να γίνει μέτρηση εναπόθεσης τριγλυκεριδίων στο ήπαρ.

<u>Δ. Φαιός λιπώδης ιστός</u>

Απομόνωση ολόκληρου του ιστού, ένα κομμάτι για φύλαξη στον καταψύκτη -80°C για απομόνωση RNA και ένα κομμάτι τοποθετείτο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS για διάστημα μίας ώρας, ώστε να διασφαλιστεί η μονιμοποίηση του, με σκοπό να εγκλειστεί σε παραφίνη και να ακολουθήσουν ιστολογικές μελέτες.

3.15 Προσδιορισμός επιπέδων ηπατικών τριγλυκεριδίων

Για να προσδιοριστούν τα επίπεδα των ηπατικών τριγλυκεριδίων, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Lpl) σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη που παράγεται μετριέται με ενζυματική μέθοδο.

Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, η γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται με δράση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και ως αποτέλεσμα, και με τη δράση της κινάσης της γλυκερόλης (GK), παράγονται η 1-φωσφορική γλυκερόλη (G-1-P) και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Στη συνέχεια, η G-1-P οξειδώνεται από την οξειδάση της φωσφορικής γλυκερόλης (GPO) σε φωσφορική διυδροξυακετόνη (DAP), ενώ ταυτόχρονα παράγεται και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Τέλος, με δράση της υπεροξειδάσης (POD), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) συνδέεται με την 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) και τη νατριϊκή Ν-αιθυλο-Ν-(3-θειοπροπυλο)-m- ανισιδίνη (ESPA), έτσι ώστε να παραχθεί η χρωστική κινονιμίνη, η οποία μετριέται σε φωτόμετρο στα 540nm.

Υλικά

- Serum Triglyceride Determination Kit-Free glycerol reagent A (Sigma Aldrich, Missouri, USA, κωδικός: TR0100)
- PBS
- Διάλυμα HB (διαλύουμε 5.611 g KOH σε 10 ml dd H₂O και προσθέτουμε 10 ml αιθανόλης 100%)
- HCL 37% (Sigma-Ahdrich, κωδικός: 30721)

- Πιάτο 96 πηγαδιών (microwell plate, 112106 Thermo Fisher Scientific Nunc, Denmark)
- Φωτόμετρο (Beckman BioMek, μοντέλο: MD SPECTRAmax, PE Victor 3)

Αρχικά, το κομμάτι ήπατος που είχε συλλεχθεί και ζυγιστεί κατά τη συλλογή οργάνων από τους θυσιασμένους μύες τοποθετήθηκε σε διάλυμα HB και επωάστηκε στους 65°C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε, με προσθήκη HCl 37% σε pH=7 και μετρήθηκε ο τελικός όγκος του διαλύματος. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε αναλογία 1:20 με PBS. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν τα διαδοχικά αραιωμένα διαλύματα βαθμονόμησης έτσι ώστε να παρασκευασθεί μια καμπύλη απόκρισης-δόσης. Σε πιάτο 96 πηγαδιών τοποθετήθηκαν 7.5 μl από τα διαλύματα και τα δείγματα, καθώς και σκέτο PBS, που ενεργούσε ως αρνητικός μάρτυρας. Έπειτα προστέθηκαν 100 μl από το αντιδραστήριο A και το πιάτο ανακινήθηκε για 10 λεπτά. Ακολούθησε μέτρηση των δειγματα προκύπτει από την απορρόφησή τους με βάση την πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται από τις απορροφήσεις των αραιώσεων του πρότυπου διαλύματος. Τέλος, έγινε αναγωγή των τιμών προς το βάρος του κομματιού του ήπατος που εξετάστηκε.

3.16 Απομόνωση ολικού ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) από ιστούς

Υλικά και συσκευές

- Αντιδραστήριο TRI (Sigma Aldrich, USA κωδικός: T9424).
- RNaseZap® (Ambion, κωδικός: AM9780)
- Χλωροφόρμιο (Sigma Aldrich, USA, κωδικός: 32211)
- Ισοπροπανόλη (Fisher Chemical, κωδικός: P/7500/17)
- Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H20)
 (DEPC, PanReac AppliChem, κωδικός: A0881)
- Ομογενοποιητής T8 ultra-turrax (IKA WERKE GmbH & Co, Germany) με άξονα τύπου S8N-5G

- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf, Centrifuge 5804)
- Φωτόμετρο (BIOMATE3)

Τα δείγματα ολικού RNA απομονώθηκαν με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης. Πριν αρχίσει η απομόνωση, η περιοχή εργασίας και οι πιπέτες καθαρίζονταν σχολαστικά με 70% αιθανόλη και με διάλυμα RNaseZap®, έτσι ώστε να καταστραφούν οι RNάσες. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα. Μικρά κομμάτια του ιστού, περίπου 50 mg, που είχαν φυλαχθεί στους -80°C μετά το τέλος του πειράματος, μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου eppendorf σε πάγο και σε αυτά προστέθηκε 1 ml αντιδραστηρίου TRI. Στη συνέχεια, ο ιστός ομογενοποιήθηκε και αφέθηκε στον πάγο για τουλάχιστον 15 λεπτά, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 0,2 ml χλωροφορμίου και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 15 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα αφέθηκαν στον πάγο για διάστημα 5 λεπτών και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Μετά από αυτήν τη φυγοκέντρηση, διακρίνονται η υδατική φάση, που περιέχει το RNA, και η οργανική φάση, που περιέχει τις πρωτεΐνες. Μεταξύ των δύο φάσεων διακρίνεται μια ζώνη που περιέχει το DNA. Πολύ προσεκτικά μεταφερόταν η υδατική φάση σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf, που περιείχε 0,5 ml ισοπροπανόλης έτσι ώστε να γίνει η καταβύθιση του RNA. Το μίγμα αναδευόταν και αποθηκευόταν στους -80°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείτο σε 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτονταν και το ίζημα πλενόταν με 1 ml διαλύματος κρύας αιθανόλης 75% σε DEPC-H₂0. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείτο δύο φορές σε 8000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Τέλος, το ίζημα «στέγνωνε» σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 λεπτά και επαναδιαλυόταν σε 50 μl DEPC-H₂0. Τα απομονωμένα δείγματα ολικού RNA φυλάσσονταν στον καταψύκτη -80°C μέχρι να γίνει ανάλυση.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος γινόταν με φωτομέτρηση του δείγματος στα 260 nm και βάσει της σχέσης:

RNA (mg/ml) = O.D. 260nm x Συντελεστής αραίωσης x 40 mg/ml

Επίσης ελεγχόταν η καθαρότητα του δείγματος από προσμίξεις πρωτεϊνών με φωτομέτρηση στα 280 nm. Τα «καθαρά» RNA έχουν λόγο αποροφήσεων O.D.260 nm /O.D. 280nm = 1,8 – 2.

3.17 Καθαρισμός του RNA από γενωμικό DNA με χρήση DNάσης

Τα δείγματα RNA ενδέχεται να περιέχουν γενωμικό DNA, το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει τη μελέτη έκφρασης γονιδίων κατά την αντίδραση PCR. Για το λόγο αυτό, έγινε επεξεργασία των απομονωμένων δειγμάτων RNA με το ένζυμο της DNάσης, που αποδομεί το DNA. Στο τέλος της αντίδρασης η DNάση απομακρύνθηκε από το διάλυμα.

Υλικά και συσκευές

- Όλικό RNA
- DNA-free kit, (Ambion, κωδικός 1906)

Μέθοδος

Αρχικά 2 μg RNA διαλύονταν σε 15,5 μl H₂O και σε αυτό προστίθεντο 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 0,5 μl ενζύμου. Μετά από ανάδευση, το διάλυμα επωαζόταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια, προστίθεντο 2 μl διαλύματος παύσης και, μετά από ανάδευση, το δείγμα επωαζόταν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείτο σε 9000 rpm και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο σωληνάριο τύπου eppendorf και φυλασσόταν σε καταψύκτη -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

3.18 Μέθοδος σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA) από ολικό RNA -Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Υλικά και συσκευές

- Όλικό RNA (καθαρό από γενωμικό DNA)
- Τυχαίοι εκκινητές (Invitrogen, κωδικός: 48190-011)
- Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H20)

- M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen, κωδικός: 28025)
- 5x Ρυθμιστικό διάλυμα για την αντίδραση (5X buffer)
- Διθειοθρειτόλη (DTT) 0.1Μ
- Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 5mM
- Διάλυμα αναστολέων Rνασών (40 units/μl) (RNaseOUT) (Invitrogen, κωδικός: 10777-019)
- Θερμικός κυκλοποιητής (συσκευή PCR) της εταιρείας MJ Research (μοντέλο PTC)
- Καταψύκτης -20°C (Electronic)

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μία τεχνική κατά την οποία το RNA μεταγράφεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

Αρχικά, σε σωληνάρια χωρητικότητας 0,5 ml αναμειγνύονταν 2 μg RNA σε όγκο 7 μl και 2 μl εξαμερή ολιγονουκλεοτιδίων (αραίωση 1:20). Αυτά αποτελούν τα αρχικά τμήματα τα οποία προσδένονται στο 3' άκρο των μορίων και το ένζυμο M-MLV δρα για να συνθέσει το συμπληρωματικό DNA. Το μίγμα αυτό τοποθετείτο στο θερμικό κυκλοποιητή και επωαζόταν για 5 λεπτά στους 75°C, για να αποδιαταχθεί το RNA και τα ολιγονουκλεοτίδια. Στη συνέχεια τοποθετείτο το δείγμα σε πάγο. Στα δείγματα προστίθονταν: 4 μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος για την αντίδραση, 2 μl 0.1M DTT, 4 μl dNTP mix 5 mM και 1 μl RNaseOUT. Το δείγμα τοποθετείτο πάλι στο θερμικό κυκλοποιητή και ακολουθούσε επώαση στους 23°C για 10 λεπτά, έπειτα στους 42°C για 45 λεπτά και η αντίδραση τερματιζόταν με επώαση του δείγματος στους 95 °C για 10 λεπτά. Ως αντίδραση μάρτυρας χρησιμοποιείτο ένα δείγμα με όλα τα υπόλοιπα συστατικά πλην του RNA. Το cDNA φυλασσόταν στον καταψύκτη -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

3.19 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Η Real-Time PCR αποτελεί εξέλιξη της συμβατικής PCR. Σε αυτήν τη διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στις ίδιες αρχές με τη συμβατική PCR με την κύρια διαφορά ότι η Real-Time PCR ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί την επιλεγμένη αλληλουχία προς μελέτη σε πραγματικό χρόνο, καθώς η ποσότητα του πολλαπλασιαζόμενου DNA παρακολουθείται σε κάθε στάδιο. Κατά τη χρήση της συμβατικής PCR, η ποσότητα του προϊόντος μετριέται με τη λιγότερο ευαίσθητη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μόνο μετά το πέρας της αντίδρασης. Στην παρούσα διατριβή η προεπιλεγμένη αλληλουχία προς μελέτη ανιχνεύθηκε με τη χρωστική SYBR Green. Η χρωστική αυτή προστίθεται στην αντίδραση και δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Όταν η χρωστική αυτή βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα έχει χαμηλό φθορισμό. Αντιθέτως, όταν η SYBR Green προσκολλάται σε δίκλωνο DNA, ο φθορισμός ενισχύεται δραματικά (*Εικόνα 3.6*).



Εικόνα 3.6: Απεικόνηση της εκπομπής φθορισμού κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο¹³⁵

Έτσι, μετά από κάθε κύκλο PCR, η SYBR Green προσδένεται στο προϊόν και η ένταση φθορισμού αντανακλά τη συγκέντρωσή του. Στο τέλος της αντίδρασης η ποσότητα του προϊόντος εκφράζεται ως ένα διάγραμμα στο οποίο στον άξονα ψ μετριέται σε λογαριθμική κλίμακα ο φθορισμός και στον άξονα χ αντιστοιχεί ο χρόνος, ο οποίος εκφράζεται ως κύκλος της αντίδρασης. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 3.7*), το κατώφλι τοποθετείται στο μέσο της εκθετικής φάσης της καμπύλης. Σε εκείνο το σημείο ορίζεται και ο κύκλος μέτρησης Ct. Έτσι, τα αποτελέσματα δείχνουν σε ποιον κύκλο (Ct) κάθε δείγμα εκπέμπει φθορισμό σε μια συγκεκριμένη ένταση. Οι τιμές Ct εξαρτώνται από την αρχική

ποσότητα της επιλεγμένης αλληλουχίας σημαίνει ότι μια συγκεκριμένη ένταση φθορισμού θα εκπεμφθεί σε πιο αρχικό κύκλο της αντίδρασης από ένα δείγμα που περιέχει λιγότερη ποσότητα της επιλεγμένης αλληλουχίας.



Εικόνα 3.7: Απεικόνιση της γραφικής παράστασης που προκύπτει από μια αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η χρωστική SYBR Green προσδένεται σε δίκλωνο DNA άρα δύναται να προστεθεί στο προϊόν αλλά και σε διμερή εκκινητών ή μη ειδικά προϊόντα. Για το λόγο αυτό, παράλληλα με αυτά τα δεδομένα, γίνεται και έλεγχος καμπύλης τήξης (*Εικόνα 3.8*).



Εικόνα 3.8: Απεικόνιση της γραφικής παράστασης που προκύπτει από την καμπύλη τήξης μιας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Τέλος όπως και στη συμβατική PCR, για κάθε δείγμα που εξετάζεται, περιλαμβάνεται πάντα και μια αντίδραση με εκκινητές γονιδίου αναφοράς. Έτσι, η τιμή του Ct που χρησιμοποιείται για την ανάλυση προκύπτει από την αφαίρεση του Ct του γονιδίου αναφοράς από το Ct του γονιδίου που μελετάται. Αυτή η τιμή ορίζεται ΔCt.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση της έκφρασης του εξεταζόμενου γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

ΔΔCt = 2^-(ΔCt δείγμα 1- ΔCt δείγμα μάρτυρα)

Υλικά και συσκευές

- cDNA
- RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mix (SA biosciences, Qiagen, κωδικός: 330520)
- Εκκινητές (Πίνακας 3.3) (Macrogen, USA)
- Αποστειρωμένο Η₂Ο
- Πιάτο 96 πηγαδιών για RT-PCR (Applied Biosystems, κωδικός: 4306737)
- Μεμβράνες επικάλυψης του πιάτου (MicroAmp[™], Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, κωδικός: 4360954)
- Μηχάνημα ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Μέθοδος

Αρχικά προετοιμάστηκε το διάλυμα του cDNA. Έτσι, 1 μl cDNA αραιώθηκε σε 4 μl αποστειρωμένο H₂O. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το μίγμα της αντίδρασης που περιείχε 10 μl RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mix, 1 μl από μίγμα πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή και 5 μl αποστειρωμένο H₂O. Από το μίγμα αυτό, 15 μl τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι του πιάτου και ύστερα προστέθηκαν και τα 5 μl του μίγματος cDNA. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl. Αυτά αναδεύτηκαν και το πιάτο φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 3 λεπτά, έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες, που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τη

λήψη δεδομένων της έντασης φθορισμού από το μηχάνημα. Το πιάτο τοποθετήθηκε στο μηχάνημα και το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το παρακάτω (*Πίνακας 3.2*):

Πίνακας 3.2: Πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια (λεπτά)	Επανάληψη
1	50	2:00	1
2	95	10:00	1
3	95	0:15	40
	60	1:00	

Πίνακας 3.3: Αλληλουχίες πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών για τη μελέτη γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Γονίδιο	Αλληλουχίες εκκινητών
Actin	5'-CCCAGGCATTGCTGACAGG- 3'
	5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGGC-3'
Pgc1α	5'-TCACCCTCTGGCCTGACAAATCTT- 3'
	5'-TTTGATGGGCTACCCACAGTGTCT- 3'
Pgc1β	5'-ATTGAACAAAGCTGCTTCCGTCCG-3'
	5'-GTGGCAGTGGAACATCAACAGCAT-3'
Pparα	5'-AAGAACCTGAGGAAGCCGTTCTGT- 3'
	5'-GCAGCCACAAACAGGGAAATGTCA-3'
Cpt1a	5'-GTCAAGCCAGACGAAGAACA- 3'
	5'-CGAGAAGACCTTGACCATAG-3'
Hadha	5'-AGCAAGTGTTCAAAGGGCTGAACG- 3'
	5'-TGTGCTTTACACCGAGGTCCTCAA- 3'
Adipoq	5'-GGAGATGCAGGTCTTCTTG-3'
	5'-TTCTCCAGGCTCTCCTTT-3'
Ucp1	5'-TCTTCTCAGCCGGAGTTTCAGCTT-3'
	5'-ACCTTGGATCTGAAGGCGGACTTT-3'

Γονίδιο	Αλληλουχίες εκκινητών
Cidea	5'-ATCACAACTGGCCTGGTTACG-3'
	5'-TACTACCCGGTGTCCATTTCT-3'
Prdm16	5'-CAGCACGGTGAAGCCATTC-3'
	5'-GCGTGCATCCGCTTGTG-3'
Fndc5	5'-ATGAAGGAGATGGGGAGGAA-3'
	5'-GCGGCAGAAGAGAGCTATAACA-3'
Fgf21	5'-TACACAGATGACGACCAAGA-3'
	5'-GGCTTCAGACTGGTACACAT-3'
Mrc1	5'-TGATTACGAGCAGTGGAAGC-3'
	5'-GTTCACCGTAAGCCCAATTT-3'
Arg1	5'-AGACCACAGTCTGGCAGTTG-3'
	5'-CCACCCAAATGACACATAGG-3'
Tnfα	5'-TCTCATGCACCACCATCAAGGACT-3'
	5'-ACCACTCTCCCTTTGCAGAACTCA-3'
Nos2	5'-CAGAGGACCCAGAGACAAGC-3'
	5'-CCTGGCCAGATGTTCCTCTA-3'
II-6	5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
	5'-TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT3'
Adr1a	5'-GGGTCCTTCTTCCCGAATTT-3'
	5'-GCTGGAGCATGGGTATATGATAG-3'
Adr3b	5'-TGAAACAGCAGACAGGGACA-3'
	5'-TCT TGA CAC TCC CTC AGC AC-3'
Fasn	5'-CTCCGTGGACCTTATCACTA-3'
	5'-CTGGGAGAGGTTGTAGTCAG-3'
Pparγ	5'CAGGCTTGCTGAACGTGAAG3'
	5'GGAGCACCTTGGCGAACA3'
Acc1	5'-TAACAGAATCGACACTGGCTGGCT-3'
	5'-ATGCTGTTCCTCAGGCTCACATCT-3'
Srebp1c	5'-TGGCTTGGTGATGCTATGTT-3'
	5'-TAAGGGGTTGGGAGTAGAGG-3'
Dgat	5'-TCATGGGTGTCTGTGGGTTA-3'
	5'-CAGAGTGAAACCAGCCAACA-3'

3.20 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες

Η χρήση μικροσυστοιχιών είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη σύγκριση του μεταγραφικού προφίλ διαφορετικών δειγμάτων, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη έκφρασης χιλιάδων γονιδίων. Η τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκατίας 1990 από τους Patrick O Brown, Joseph DeRisi και David Botstein και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων καρκινικών κυττάρων¹³⁶.

Or DNA μικροσυστοιχίες αποτελούνται διάταξη από μια πληθώρας συγκεκριμένων αλληλουχιών ολιγονουκλετιδίων οι οποίες έχουν ακινητοποιηθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς σε ειδικά επεξαργασμένη επιφάνεια και σε συγκεκριμένες θέσεις. Αυτές οι αλληλουχίες ολιγονουκλετιδίων αποτελούν τους ανιχνευτές για κάθε συγκεκριμένο γονίδιο, το οποίο δύναται να υβριδοποιηθεί μαζί του λόγω της συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών τους. Τα δείγματα υπό μελέτη έχουν σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική. Η εικόνα των αποτελεσμάτων αποτελείται από χιλιάδες κουκίδες, μία για κάθε γονίδιο. Έτσι, με την υβριδοποίηση των δειγμάτων και μετά από διέγερση με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, εκπέμπεται φθορισμός ο οποίος και μετριέται. Κατ' αυτόν τον τρόπο ταυτοποιούνται τα συγκεκριμένα γονίδια καθώς και τα επίπεδα έκφρασής τους.

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 3.9*), απομονώνεται mRNA από το δείγμα και μετατρέπεται σε DNA, το οποίο σημαίνεται με χρωστική. Ακολουθεί υβριδοποίηση του σημασμένου δείγματος με τα ολιγονουκλεοτίδιαανιχνευτές και ακολουθεί σάρωση του πλακιδίου μικροσυστοιχίας προκειμένου να μετρηθεί ο φθορισμός. Η τιμή της έντασης του φθορισμού για κάθε θέση αντιπροσωπεύει την ποσότητα του κάθε γονιδίου στο δείγμα.



Εικόνα 3.9: Απεικόνιση της αρχής της ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες

Η μελέτη έκφρασης γονιδίων με χρήση μικροσυστοιχιών στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Regeneron Pharmaceuticals, Inc., NY, USA. Αρχικά, απομονώθηκε RNA με χρήση αντιδραστηρίου TRI. Στη συνέχεια έγινε ενίσχυση 500 ng RNA χρησιμοποιώντας то QuickAmp RNA Amplification Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Ακολούθησε σήμανση του δείγματος με χρωστική Cy3-CTP. Το σημασμένο δείγμα υβριδιοποίηθηκε σε ειδικώς σχεδιασμένο πλακίδιο μικροσυστοιχιών, το οποίο αποτελείτο από 43538 60-μερή ολιγονουκλεοτίδια που κάλυπταν το μεταγραφικό προφίλ του μυ. Ο υβριδισμός και τα ξεπλύματα του πλακιδίου μικροσυστοιχιών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σάρωση έγινε με το σαρωτή μικροσυστοιχιών Agilent. Τα δεδομένα εξήχθηκαν από τις εικόνες που προέκυψαν από τη σάρωση του πλακιδίου χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα της Agilent Feature Extraction Software 9.5. Τέλος, επιλεγμένα γονίδια ποσοτικοποιήθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα. Θεωρήθηκε ότι τα γονίδια εκφράζονταν διαφορετικά όταν ο λόγος έκφρασής τους στα δείγματα που συγκρίνονταν ήταν μεγαλύτερος από 1.5 και παρουσίαζαν στατιστική σημαντικότητα Ρ < 0.05.

3.21 Έγκλειση ιστών σε παραφίνη και λήψη τομών σε μικροτόμο

Υλικά και συσκευές

- Διάλυμα 10% φορμόλης (Sigma Aldrich, USA, κωδικός: HT50-1-128)
- Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS (Paraformaldehyde, Sigma Aldrich, κωδικός: P6148)
- Μικροτόμος (Leica, Germany, μοντέλο: RM 2265)
- Υδατόλουτρο
- Αντικειμενοφόροι πλάκες πολυσίνης (Fisher Scientific, κωδικός: J2800AMN2)

Μετά τη λήψη ιστών από το πειραματόζωο, ο ιστός μονιμοποιείτο σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS ή 10% φορμόλης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, έτσι ώστε να διατηρηθεί η δομή του ιστού και των κυττάρων. Μετά τη μονιμοποίηση, οι ιστοί τοποθετούνταν σε καλούπια και φυλάσσονταν στους 4°C σε 70% αιθανόλη. Στη συνέχεια γινόταν επεξεργασία αυτών (περαιτέρω αφυδάτωση, σκήνωση σε λιωμένη παραφίνη και τοποθέτηση σε ειδικές κασέτες έγκλεισης) από τη μονάδα ιστολογίας του IIBEAA. Τέλος, κόβονταν τομές πάχους 5 μm από τους κύβους παραφίνης, τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 42°C και πάνω, σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι τομές αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου σε στατώ προκειμένου να στεγνώσουν καλά.

3.22 Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των ιστών

Υλικά

- Ξυλόλη (Xylene, VWR chemicals, κωδικός: 28975.325)
- Αιθανόλη (Ethanol Absolute, VWR chemicals, κωδικός: 20821.365)

Μέθοδος

Για την αποπαραφινοποίηση των ιστών οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις τομές του ιστού επωάστηκαν στους 58°C για 30 λεπτά και αμέσως εμβαπτίστηκαν σε δύο διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης για 6 λεπτά. Για τη σταδιακή ενυδάτωση των ιστών, οι αντικειμενοφόροι πλάκες εμβαπτίστηκαν σταδιακά σε μια σειρά από διαδοχικές ελαττούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), όπως φαίνεται παρακάτω:

- 1) 100 % ΕtOΗ για 5 λεπτά (x 3 φορές)
- 95 % EtOH για 3 λεπτά
- 3) 75 % EtOH για 3 λεπτά
- 50 % EtOH για 3 λεπτά
- 5) Έκπλυση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 5 λεπτά

3.23 Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης (H&E)

Η χρώση αιματοξυλίνης & ηωσίνης είναι από τις κυριότερες χρώσεις και χρησιμοποιείται για μορφολογική ιστολογική εξέταση των ιστών. Η αιματοξυλίνη προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και βάφει τους πυρήνες και τα ριβοσώματα με μπλε χρώμα και η ηωσίνη Υ βάφει εοσινοφυλικές δομές, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (πρωτεΐνες με ροζ, ερυθροκύτταρα με κόκκινο χρώμα).

Υλικά

- Αιματοξυλίνη (HAEMATOXYLIN HARRIS, VWR BDH Prolabo, κωδικός: 351946T)
- Ηωσίνη (Orcein synthetic Gurr 'Certistain'[®], VWR BDH Prolabo, κωδικός: 342102F)
- Διηθητικό χαρτί

Μέθοδος

Πριν αρχίσει η χρώση των τομών, η αιματοξυλίνη διηθείτο με τη χρήση διηθητικού χαρτιού. Οι τομές που είχαν προηγουμένως ενυδατωθεί, εμβαπτίζοντο στην αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ακολουθούσαν τρία πλυσίματα σε νερό βρύσης. Στη συνέχεια, οι τομές εμβαπτίζοντο σε ηωσίνη για 30 δευτερόλεπτα κάλλα τρία πλυσίματα σε νερό βρύσης.

3.24 Αφυδάτωση των ιστών και επικόλληση επικαλυπτρίδων

Υλικά

- Ξυλόλη (Xylene, VWR chemicals, κωδικός: 28975.325)
- Αιθανόλη (Ethanol Absolute, VWR chemicals, κωδικός: 20821.365)
- DPX (DPX mounting medium, VWR chemicals, κωδικός: 360294H)
- Επικαλυπτρίδες (CarlROTH, Germany, κωδικός: H878)

Μετά τη χρώση των ιστών, ακολουθούσε η αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα βαθμίδωση αλκοολών. Οι τομές εμβαπτίζοντο για 30 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 80% αιθανόλης και στη συνέχεια για 1 λεπτό σε δύο διαλύματα 100% αιθανόλης. Ακολουθούσε εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για 9 λεπτά. Τέλος τοποθετείτο στην αντικειμενοφόρο πλάκα μία σταγόνα DPX, το οποίο διατηρεί τη μορφολογία του ιστού και τα χρωμάτα για μεγάλο χρονικό διάστημα, και γινόταν επικόλληση της επικαλυπτρίδας.

3.25 Χρώση κρυοτομών με Oil Red O

Η χρώση με Oil red O χρησιμοποιείται για την αναγνώριση σταγονιδίων ουδέτερου λίπους στον ιστό. Η χρώση αυτή είναι επιτυχής μόνο σε κρυοτομές, καθώς οι ιστοί που έχουν εγκλεισθεί σε παραφίνη χάνουν τα λιπίδιά τους κατά την επεξεργασία με αιθανόλη. Η χρώση Oil red O έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στα ουδέτερα λίπη παρά στο διάλυμα στο οποίο φτιάχνεται. Έτσι, κατά τη χρώση η Oil red O χρωστική "μετακινείται" από το διάλυμα στα λιπίδια του ιστού. Η επικόλληση της επικαλυπτρίδας γίνεται με διάλυμα γλυκερόλης έτσι ώστε να μη χαθούν τα λιπίδια.

Υλικά

- Αντικειμενοφόροι πλάκες Super Frost θετικά φορτισμένες (Fisher Scientific, κωδικός: J1800AMNZ)
- Κρυοτόμος (Leica, μοντέλο: CM3050 S)
- Διάλυμα 10% φορμόλης (Sigma Aldrich, USA, κωδικός: HT50-1-128)
- 70% ισοπροπανόλη (Ισοπροπανόλη, Fisher Chemical, κωδικός: P/7500/17)
- Αιματοξυλίνη (HAEMATOXYLIN HARRIS, BDH, κωδικός: 351946T)
- Oil Red O (Sigma Aldrich, USA, κωδικός: 00625)
Μέθοδος

Σε κρυοτόμο κόπηκαν τομές ηπατικού ιστού εγκλεισμένου σε OCT πάχους 10 μm και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες Super Frost θετικά φορτισμένες. Οι τομές στέγνωναν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εμβαπτίζονταν 2 φορές για 5 λεπτά σε PBS. Οι τομές του ιστού μονιμοποιούντο με διάλυμα 10% φορμόλης για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλένονταν με PBS 2 φορές για 5 λεπτά και εμβαπτίζοντο μερικές φορές σε διάλυμα 60% ισοπροπανόλης έτσι ώστε να απομακρυνθεί το νερό. Στη συνέχεια οι τομές εμβαπτίστηκαν σε Oil red O διάλυμα (30 ml διαλυμένης χρωστικής και 20 ml αποσταγμένο νερό).

Το διάλυμα πέρασε από φίλτρο με διηθητικό χαρτί για 30 λεπτά και ακολούθως οι τομές εμβαπτίστηκαν και πάλι μερικές φορές σε διάλυμα 60% ισοπροπανόλης για να απομακρυνθεί η περισσευούμενη χρωστική. Ακολούθησε χρώση των πυρήνων με αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα και ξέπλυμα των τομών με νερό. Για την επικάλυψη των τομών με επικαλυπτρίδα τοποθετήθηκε μια σταγόνα 50% γλυκερόλης.

Διαλύσαμε 0.5 g χρωστικής Oil red O, σε 100 ml ισοπροπανόλης. Για την παρασκευή της χρωστικής προσθέταμε 4 μέρη απεσταγμένο νερό και 6 μέρη χρώσης Oil red O. Το διάλυμα αφέθηκε να ισορροπήσει για 10 λεπτά και πέρασε από φίλτρο πριν τη χρήση.

3.26 Ανοσοϊστοχημεία φθορισμού

Η ανοσοϊστοχημεία φθορισμού χρησιμοποιείται για να ανιχνευτεί και να εντοπιστεί μια πρωτεΐνη στην παραγματική της θέση στον ιστό. Ο εντοπισμός γίνεται χάρη στην αναγνώριση του αντιγόνου από το κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο με τη σειρά του αναγνωρίζεται από αντίσωμα προσδεδεμένο σε φθορίζον χρώμα. Η παρατήρηση της χρώσης γίνεται με φωτονικό μικροσκόπιο. Τέλος, σε όλες τις χρώσεις που έγιναν συμπεριελήφθη και μια τομή αρνητικός μάρτυρας, η οποία υπεβλήθη σε όλα τα στάδια της χρώσης εκτός από την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα. Αυτό γίνεται για να αποδειχθεί ότι η χρώση είναι αληθής και δεν οφείλεται σε μη ειδική δέσμευση του δεύτερου αντισώματος.

Υλικά

- Πρωτοταγή αντισώματα:
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύ έναντι της πρωτεΐνης CD4 [RM4-5]
 (eBioscience, κωδικός: 14-0042-82)
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύ έναντι της πρωτεΐνης CD8b [H35-17.2] (eBioscience, κωδικός: 14-0083-81)
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύ έναντι της πρωτεΐνης F4/80 [A3-1]
 (Abcam, κωδικός: ab6640)
 - Μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της πρωτεΐνης UCP1 (Abcam, κωδικός: ab10983)
- Δευτεροταγές αντίσωμα: αντι-αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG (H+L) κονίκλου, συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία AlexaFluor 488 (Molecular Probes, κωδικός: A11001)
- Δευτεροταγές αντίσωμα: αντι-αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgG (H+L) επιμύ, συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία AlexaFluor 488 (Thermo Fischer Scientific, κωδικός: A-21206)
- 10% NGS σε PBS (Normal Goat Serum, Sigma Aldrich, USA κωδικός: G6767)
- 10% NGS, 0.1% Triton σε PBS (Triton X100, Sigma Aldrich, USA, κωδικός: T8787)

- PBS
- Pronase (Sigma-Aldrich, κωδικός: P8811)
- Vectashield DAPI (Vector Laboratories, κωδικός: H-1200)

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών CD4, CD8b και F4/80 κόπηκαν σε κρυοτόμο τομές ηπατικού ή λιπώδους ιστού εγκλεισμένου σε ΟCT πάχους 10 μm και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες Super Frost θετικά φορτισμένες. Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης UCP1 κόπηκαν τομές παραφίνης υποδόριου λιπώδους ιστού 5 μm σε μικροτόμο. Οι κρυοτομές αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε ξέπλυμα με PBS. Στη συνέχεια, οι κρυοτομές μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA για 15 λεπτά και ύστερα ξεπλύθηκαν 3 φορές για 10 λεπτά με PBS. Μόνο στην περίπτωση της ανίχνευσης της πρωτεΐνης UCP1, οι τομές επωάστηκαν με 0.1% w/v προνάση στους 37°C για 8 λεπτά. Έπειτα από ξέπλυμα με PBS, τα δείγματα επωάστηκαν για 20 λεπτά με διάλυμα 10% NGS σε PBS για τη χρώση με τα αντισώματα CD4 και CD8b και με διάλυμα 10% NGS, 0.1% Triton σε PBS για το αντίσωμα F4/80 και UCP1 για 20 λεπτά. Η χρήση διαφορετικού διαλύματος οφείλεται στη θέση των πρωτεϊνών αυτών. Η θέση των CD4 και CD8b είναι στην κυτταρική μεμβράνη ενώ η θέση του F4/80 είναι στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία του Triton βοηθά στο να καταστεί η κυτταρική μεμβράνη διαπερατή για να μπορέσει το αντίσωμα να εισχωρήσει στο κυτταρόπλασμα και να εντοπίσει το αντιγόνο. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση με πρωτοταγές αντίσωμα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4), στους 4°C.

Αντίσωμα	Διάλυμα	Αραίωση
F4/80	10% NGS, 0.1% Triton σε PBS	1:50
UCP1	10% NGS, 0.1% Triton σε PBS	1:50
CD4	10% NGS σε PBS	1:100
CD8b	10% NGS σε PBS	1:100

Πίνακας 3.4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό διαφόρων πρωτεϊνών.

Την επόμενη ημέρα, οι τομές ξεπλύθηκαν 3 φορές για 10 λεπτά με PBS και στη συνέχεια οι τομές επωάστηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα σε αραίωση 1:500, στο ίδιο διάλυμα με το πρωτοταγές αντίσωμα, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές ξεπλύθηκαν με PBS 3 φορές για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε μία σταγόνα DAPI και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Σε όλες τις χρώσεις συμπεριελήφθηκε και αρνητικός μάρτυρας στον οποίο η τομή δεν επωάστηκε με πρωτοταγές αντίσωμα. Οι τομές παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

3.27 Ανοσοπροσροφητική Ανάλυση Στερεάς Φάσης Με Σύνδεση Ενζύμου

Η μέθοδος αυτή είναι μία βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Σε αυτήν τη διδακτορική διατριβή η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθούν τα επίπεδα της ινσουλίνης στην κυκλοφορία του αίματος μετά από νηστεία. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ινσουλίνης, που αναγνώριζαν δύο διαφορετικά αντιγόνα. Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισωμάτων σε μορφή σάντουιτς. Στη συγκεκριμένη διαδικασία, το ένα αντίσωμα ήταν προσδεδεμένο στο πηγάδι που γινόταν η αντίδραση και το άλλο βρισκόταν ελεύθερο στο μίγμα της αντίδρασης και ήταν συνδεδεμένο με το έζυμο υπεροξειδάση. Ακολούθως το πηγάδι ξεπλενόταν έτσι ώστε να απομακρυνθεί το περίσσιο αντίσωμα συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση. Έτσι, στο κάθε πηγάδι παρέμεναν σύμπλοκα αποτελούμενα από το πρώτο αντίσωμα που ήταν προσδεδεμένο στο πηγάδι, την ινσουλίνη που προσδέθηκε σε αυτό το αντίσωμα, καθώς και το αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο και προσκολλήθηκε στην ινσουλίνη. Στη συνέχεια, προστέθηκε η ουσία 3,3',5,5'-Τετραμεθυλβενζιδίνη, υπόστρωμα που, με τη δράση του ενζύμου, παρήγαγε χρώμα. Τέλος, προστέθηκε το διάλυμα παύσης, το οποίο σταματά την αντίδραση, και η ένταση του χρώματος, που είναι αντίστοιχη της ποσότητας του αντισώματος, μετρήθηκε σε ειδικό φωτόμετρο.

Υλικά και Συσκευές

- Ορός αίματος
- Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kit (Mercodia, Sweden, κωδικός: 10-1249-01)
- Φωτόμετρο (Beckman BioMek, μοντέλο: MD SPECTRAmax, PE Victor 3)

Μέθοδος

Κάθε φορά που γινόταν μέτρηση ποσότητας της ινσουλίνης σε ορό αίματος συμπεριλαμβάνονταν και μια καμπύλη απόκρισης-δόσης. Έτσι, σε κάθε πηγάδι τοποθετούντο 25 μl ορού ή διαλύματος βαθμονόμησης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl του διαλύματος του αντισώματος που είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο. Το πιάτο επωάστηκε σε συνεχόμενη κίνηση για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, τα πηγάδια ξεπλύθηκαν 6 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Μετά το τελευταίο πλύσιμο, το πιάτο στυπώθηκε με απορροφητικό χαρτί, έτσι ώστε να απορριφθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl υποστρώματος TMB και η αντίδραση επωάστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταμάτησε με πρόσθεση 50 μl διαλύματος παύσης σε κάθε πηγάδι και ελαφρά ανάδευση. Η κάθε αντίδραση μετρήθηκε με σάρωση του πιάτου στην οπτική πυκνότητα 450 nm. Τα αποτελέσματα υπολογίσθηκαν βάσει της πρότυπης καμπύλης, η οποία παράχθηκε από τη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων.

3.28 Μικροσκοπία

Οι χρώσεις αιματοξυλίνης & ηωσίνης και Oil red Ο αναλύθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο LEICA DMLS2, εξοπλισμένο με την ψηφιακή κάμερα Leica DFC-500, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LAS AF της εταιρίας LEICA.

Οι χρώσεις ανοσοφθορισμού αναλύθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο LEICA DM IRE2, εξοπλισμένο με την ψηφιακή κάμερα Leica DFC-350FX, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LAS AF της εταιρίας LEICA.

3.29 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με *two-tailed, unpaired, t-test, one-way ANOVA με post hoc Bonferroni test ή repeated measures ANOVA,* με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA).

<u>Α. Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% (PF) σε PBS</u>

Σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα και μέσα σε απαγωγό, αναμιγνύεται 4% κ.β. PF σε PBS. Το διάλυμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 60°C. Προστίθενται λίγες σταγόνες NaOH, ώστε το διάλυμα να γίνει διαυγές και, αφού ογκομετρηθεί, φιλτράρεται από διηθητικό χαρτί Wattman 1 M. Χωρίζεται ανά 10 ml και φυλάσσεται σε καταψύκτη -20°C.

B. PBS 10x (pH7.4)

- NaCl 140 mM
- Na₂HP0₄x(12H₂0) 8 mM
- KCI 3 mM
- KH₂P0₄ 1,5 mM

Σε μαγνητικό αναδευτήρα αναδεύονται τα παραπάνω συστατικά σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού.

4. Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD σε μύες με τροποποιημένο ανοσολογικό σύστημα – Απουσία λεμφοκυττάρων

4.1.1 Μετρήσεις σωματικού βάρους και κατανάλωσης τροφής

Για να χαρακτηρίσουμε το ρόλο των λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD, έγινε πειραματική πρόκληση παχυσαρκίας σε C57BL/6 αρσενικούς μύες αγρίου τύπου και *Rag1*-/- (απουσία λεμφοκυττάρων), ηλικίας 12 εβδομάδων, μέσω της σίτισής τους με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά – 45% kcal (HFD) για διάστημα 15 εβδομάδων. Ταυτόχρονα, δύο ομάδες μυών, αγρίου τύπου και *Rag1*-/-, σιτίστηκαν με τη συνήθη κανονική εργαστηριακή δίαιτα (ND). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, διεξήγαμε εβδομαδιαίες μετρήσεις του σωματικού βάρους των ζώων. Προς το τέλος του πειράματος η αύξηση του σωματικού βάρους των μυών αγρίου τύπου ήταν αρκετή, έτσι ώστε να αναμένουμε την ύπαρξη επιπλοκών της παχυσαρκίας. Έτσι, ακολούθησαν μεταβολικές μελέτες συμπεριλαμβανομένης της εξέτασης των μυών ως προς την ευαισθησία τους στη δράση της ινσουλίνης.

Στο τέλος του πειράματος, οι μύες αγρίου τύπου και *Rag1*-/- που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην αύξηση βάρους τους (*Εικόνες 4.1, 4.2*). Στους αντίστοιχους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, υπήρξε μεγαλύτερη αύξηση του σωματικού βάρους των μυών αγρίου τύπου σε σχέση με των *Rag1*-/- μυών, διαφορά που έγινε στατιστικά σημαντική από την ενδέκατη εβδομάδα (*Εικόνες 4.1, 4.2*).



Εικόνα 4.1: Καταγραφή της μεταβολής του σωματικού βάρους των μυών αγρίου τύπου και Rag1-/- που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.



Εικόνα 4.2: Καταγραφή της μεταβολής αύξησης σωματικού βάρους των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Παράλληλα, έγιναν μετρήσεις στην τροφή που κατανάλωσε κάθε πειραματική ομάδα προκειμένου να διαπιστωθεί η συσχέτιση της διαφοράς της αύξησης του σωματικού βάρους με διαφορές στην κατανάλωση τροφής.



Εικόνα 4.3: Καταναλούμενη τροφή στους μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (A) ή πλούσια σε λιπαρά (B) δίαιτα.

Οι μετρήσεις της κατανάλωσης τροφής δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (*Εικόνα 4.3Α, Β*), οπότε δεν προσφέρουν την εξήγηση για τις διαφορές στο σωματικό βάρος μεταξύ τους.

4.1.2 Δοκιμασίες ανοχής στη γλυκόζη (GTT), αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT) και μέτρηση επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων

Η παχυσαρκία συνήθως συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και από την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης. Υποβάλαμε τους μύες σε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (glucose tolerance test-GTT) κατά την όγδοη εβδομάδα δίαιτας (*Εικόνα 4.4A*) και σε δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (insulin tolerance test-ITT) κατά τη δέκατη τέταρτη εβδομάδα δίαιτας (*Εικόνα 4.4B*) για να ελεγχθεί εάν η απόκρισή τους στη δίαιτα πλούσια σε λιπαρά συνοδευόταν από αλλαγή στην ευαισθησία τους στη δράση της ινσουλίνης.



Εικόνα 4.4: Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (GTT) (A) και δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT) (B) σε μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Τα δύο αυτά πειράματα έδειξαν ότι οι μύες, στους οποίους απουσιάζουν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα, είχαν καλύτερη απόκριση στη δράση της ινσουλίνης και μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία σε αντίθεση με τους μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, εύρημα συμβατό με τη μικρότερη αύξηση σωματικού βάρους.

Επιπλέον μετρήθηκαν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στην κυκλοφορία μετά από νηστεία (*Εικόνα 4.5A, B*). Οι *Rag1^{-/-}* μύες, οι οποίοι σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, είχαν στατιστικά σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία.



Εικόνα 4.5: Επίπεδα χοληστερόλης (Α) και τριγλυκεριδίων (Β) μετά από νηστεία σε μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

4.1.3 Μελέτη μεταβολικών παραμέτρων με έμμεση θερμιδομετρία

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, μία πιθανή εξήγηση για τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά είναι οι διαφορές στην κατανάλωση ενέργειας. Για να διευκρινιστεί αυτή η υπόθεση, πραγματοποιήθηκε έμμεση θερμιδομετρική ανάλυση στους μύες όλων των κατηγοριών. Μετρήθηκαν η κατανάλωση οξυγόνου (VO₂) και η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (VCO₂) και υπολογίστηκε το αναπνευστικό πηλίκο, ο μεταβολικός ρυθμός και η κινητικότητα, τόσο για τους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά είναι οι σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (*Εικόνα 4.6Α-Ε*) όσο και για εκείνους που σιτίστηκαν με διατη καν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (*Εικόνα 4.7Α-Ε*) σε ημερήσια βάση.



Εικόνα 4.6: Καταγραφή των μεταβολικών παραμέτρων με χρήση έμμεσης θερμιδομετρίας, VO₂ (A), VCO₂ (B), αναπνευστικού πηλίκου (Γ), μεταβολικού ρυθμού (Δ) κινητικότητας (Ε) σε μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα.

Τα αποτελέσματα από τους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα έδειξαν ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες είχαν στατιστικά σημαντικά ανεβασμένο μεταβολικό ρυθμό, παρά την παρόμοια κινητικότητα. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν τάση ελάττωσης του αναπνευστικού πηλίκου στους *Rag1^{-/-}* μύες. Οι μύες με χαμηλότερο αναπνευστικό πηλίκο χρησιμοποιούν κατά προτεραιότητα λιπαρά οξέα αντί για υδατάνθρακες για την παραγωγή ενέργειας.



Εικόνα 4.7: Μελέτη μεταβολικών παραμέτρων με χρήση έμμεσης θερμιδομετρίας, VO₂ (A), VCO₂ (B), αναπνευστικού πηλίκου (Γ), μεταβολικού ρυθμού (Δ) και κινητικότητας (Ε) σε μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Οι διαφορές των μεταβολικών παραμέτρων μεταξύ των *Rag1*-/- μυών και των μυών αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα είχαν παρόμοια τάση με τις ομάδες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (*Εικόνα 4.7Α-Ε*). Ειδικότερα, το αναπνευστικό πηλίκο ήταν μικρότερο στους *Rag1*-/- μύες αλλά δεν έφτασε στα όρια στατιστικής σημαντικότητας με τους αριθμούς ζώων που χρησιμοποιήσαμε. Ο μεταβολικός ρυθμός των *Rag1*-/- μυών παρέμεινε στατιστικά σημαντικότερα αυξημένος και μετά από δίαιτα πλούσια σε λιπαρά

Στο τέλος του πειράματος, οι μύες θυσιάστηκαν και απομονώθηκαν ιστοί, όπως οι επιδιδυμικός, υποδόριος, φαιός λιπώδης ιστός και το ήπαρ, από όλες τις πειραματικές ομάδες για μελέτη και χαρακτηρισμό των ιστολογικών διαφορών, καθώς και ανάλυση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών σχημάτων ανά γονότυπο. Για το χαρακτηρισμό της μεταβολικής δραστηριότητας των μυών συμπεριλάβαμε αξιολόγηση των ιστολογικών, βιοχημικών και μοριακών στοιχείων στους ιστούς που συμμετέχουν στις κύριες αλλαγές που χαρακτηρίζουν την παχυσαρκία, δηλαδή το λιπώδη ιστό (επιδιδυμικό, φαιό, υποδόριο) και το ήπαρ.

4.1.4 Μελέτη ηπατικού ιστού

4.1.4.1 Ιστολογικός και βιοχημικός χαρακτηρισμός

Η μελέτη του ήπατος, μετά από ιστολογική εξέταση με χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E) σε τομές παραφίνης (*Εικόνα 4.8*) και Oil Red O (ORO) σε κρυοτομές (*Εικόνα 4.9*), αποκάλυψε εντυπωσιακή διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων. Η ιστολογική εξέταση έδειξε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά δεν παρουσίασαν λιπώδη διήθηση του ήπατος, σε αντίθεση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου, οι οποίοι εμφάνισαν εκτεταμένη μακροφυσαλιδώδη λίπωση. Οι μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρουσίασαν διπώδους διήθησης.



Εικόνα 4.8: Ιστολογική ανάλυση του ηπατικού ιστού με χρώση Η&Ε των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Στις τομές H&E τα λιποσταγονίδια παρατηρούνται ως κενοτόπια, καθώς τα λιποσταγονίδια διαλύονται κατά την επεξεργασία του ιστού.



Εικόνα 4.9: Ιστολογική ανάλυση του ηπατικού ιστού με χρώση ORO των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Στις κρυοτομές, και με χρώση ORO, τα λιποσταγονίδια εμφανίζονται χρωματισμένα με ερυθρό χρώμα.

Για να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση μετρήθηκε επίσης η περιεκτικότητα του ηπατικού ιστού σε λίπος (*Εικόνα 4.10*).



Εικόνα 4.10: Ανάλυση περιεκτικότητας τριγλυκεριδίων στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα ιστολογικά ευρήματα, καθώς οι *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά είχαν παρόμοια περιεκτικότητα τριγλυκεριδίων με τους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα, ενώ οι μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά είχαν στατιστικά σημαντικότερα αυξημένη περιεκτικότητα τριγλυκεριδίων στο ήπαρ.

4.1.4.2 Έκφραση γονιδίων που ενέχονται στο μεταβολισμό λιπιδίων και στην ανάπτυξη της NAFLD

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια επηρεάζονται και συμμετέχουν στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και NAFLD. Πρώτα εξετάσαμε την οξείδωση των λιπαρών οξέων, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την κατανάλωση ενέργειας. Αυξημένη οξείδωσή τους στο ήπαρ θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί δεν παρατηρείται λιπώδης διήθηση στο ήπαρ των *Rag1^{-/-}* μυών που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα της έμμεσης θερμιδομετρικής ανάλυσης, που αποκάλυψε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες είχαν την τάση να έχουν μικρότερο αναπνευστικό πηλίκο.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ενώ στους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα η έκφραση των γονιδίων *Pgc1c*, *Ppara* και *Acox1* στους *Rag1^{-/-}* μύες ήταν αυξημένη, η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο γονοτύπων χανόταν στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (*Εικόνα 4.11*).



Εικόνα 4.11: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων με τη χρήση qRT-PCR στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά (Β) δίαιτα.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε γονίδια που συμμετέχουν στη *de novo* λιπογένεση, αφού οι διαφορές στην οξείδωση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ δεν εξήγησαν όλες τις μεταβολές στο φαινότυπο των *Rag1^{-/-}* μυών. Εξετάστηκαν με qRT-PCR τα γονίδια *Ppary, Scd1, Acc1, Srebp1c* (*Εικόνα 4.12A, B*).



Εικόνα 4.12: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που διαμεσολαβούν τη λιπογένεση με τη χρήση qRT-PCR στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά (Β) δίαιτα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στους *Rag1*^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα μερικά γονίδια που συμμετέχουν στη *de novo* λιπογένεση έχουν αυξημένη έκφραση σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με χρήση μικροσυστοιχιών (*Πίνακας 4.1*).

Πίνακας 4.1: Μελέτη έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της λιπογένεσης με τη χρήση μικροσυστοιχιών στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Rag1 ^{-/-} ND vs	Rag1 ^{-/-} HFD vs	WT HFD vs	Rag1 ^{-/-} HFD vs	Γονίδιο	Genbank
WT ND	WT HFD	WT ND	Rag1 ^{-/-} ND		Κωδικός
3,6667	2,2939	0,5884	0,3681	Acaca	NM_133360
1,8054	2,7856	0,2619	0,4041	Acacb	BC022940
0,6588	0,6671	1,3734		Dgat1	NM_010046
3,4899			0,1628	Fasn	NM_007988
			0,1903	Scd1	NM_009127
1,6325	1,381		0,8081	Scd2	NM_009128
2,2642				Srebf1	NM_011480

4.1.4.3 Έκφραση γονιδίων που ενέχονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το ήπαρ, μέσω δράσης της ινσουλίνης, παράγει γλυκόζη, ανταποκρινόμενο στις ενεργειακές απαιτήσεις του οργανισμού. Όπως είναι γνωστό, η ινσουλίνη καταστέλλει τη γλυκονεογένεση, μία δράση της που ελαχιστοποιείται μετά την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης. Για το λόγο αυτό αποφασίσαμε να μελετήσουμε την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, εξετάζοντας την έκφραση του γονιδίου της ηπατικής φωσφο-ενολοπυροσταφυλικής καρβοξυ-κινάσης (*Pepck*), το οποίο καταλύει την αρχική αντίδραση της γλυκονεογένεσης (*Εικόνα 4.13Α, Β*).



Εικόνα 4.13: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Pepck που συμμετέχει στο μονοπάτι της γλυκονεογένεσης με τη χρήση qRT-PCR στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά (Β) δίαιτα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ή έκφραση του γονιδίου *Pepck* στους μύες που σιτίζονται με κανονική εργαστηριακή δίαιτα δεν διέφερε μεταξύ των δύο γονοτύπων. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη στους *Rag1-⁻⁻* μύες, κάτι που συνάδει με τη μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία τους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, η μελέτη της έκφρασης των ηπατικών γονιδίων δεν μπόρεσε να εξηγήσει πλήρως το φαινότυπο των *Rag1^{-/-}* μυών μετά από την έκθεσή τους σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Έτσι, η προσοχή στράφηκε στην ανάλυση των διαφορετικών τύπων του λιπώδους ιστού που συμμετέχουν στην αποθήκευση αλλά και στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

4.1.5 Μελέτη επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού

Κατά τη συλλογή των ιστών, διαπιστώθηκε διαφορά στο βάρος του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού. Για το λόγο αυτό, ο ιστός ζυγίστηκε και έγινε αναγωγή του βάρους στο σωματικό βάρος των μυών, ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι διαφορετικές ομάδες με πλέον αντικειμενικό τρόπο (*Εικόνα 4.14*).



Εικόνα 4.14: Αναγωγή του βάρους του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού στο σωματικό βάρος των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το βάρος του λιπώδους ιστού, σε σχέση με το σωματικό βάρος των *Rag1^{-/-}* μυών που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, δεν μεταβάλλεται σημαντικά, σε σχέση με αυτό των μυών που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Αντίθετα, υπερτροφία του ιστού παρατηρήθηκε στους μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Φαίνεται έτσι ότι η διαφορά στην αύξηση του σωματικού βάρους που παρατηρήθηκε μεταξύ των μυών στις διαφορετικές πειραματικές ομάδες οφείλεται στην αυξημένη αποθήκευση ενέργειας στο λιπώδη ιστό με τη μορφή λίπους, που οδήγησε και στην υπερτροφία του.

Η ιστολογική εξέταση του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού με χρώση Η&Ε των τομών παραφίνης (*Εικόνα 4.15*) αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέγεθος των κυττάρων, το οποίο μετρήθηκε με ειδικά σχεδιασμένο αλγόριθμο με χρήση της MATLAB, που υπολογίζει την επιφάνεια του κάθε κυττάρου σε κάθε εικόνα (*Εικόνες 4.16, 4.17A, B*). Όπως φαίνεται, τα λιποκύτταρα των μυών αγρίου τύπου, σε συμφωνία με τις διαφορές σωματικού βάρους και βάρους του επιδιδυμικού ιστού, έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα λιποκύτταρα των *Rag1^{-/-}* μυών που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, ενώ δεν βρήκαμε διαφορά στα λιποκύτταρα μεταξύ των μυών που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα.



Εικόνα 4.15: Ιστολογική ανάλυση του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού με χρώση H&E των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.



Εικόνα 4.16: Μέγεθος των κυττάρων του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού. Οι μετρήσεις έγιναν σε τομές του ιστού των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα, με χρώση H&E.



Εικόνα 4.17: Κατανομή μεγέθους κυττάρων. Οι μετρήσεις έγιναν σε τομές του ιστού των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (A) ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (B), με χρώση H&E.

Η αυξημένη οξείδωση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ των Rag1--- μυών που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα, καθώς και η ανάλυση της έκφρασης γονιδίων στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό με χρήση μικροσυστοιχιών (Πίνακας 4.2), μας οδήγησαν στη μελέτη γονιδίων που προωθούν και συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, όπως τα Adipoq, Pgc1a, Hadha, Ppara, Cpt1a (Εικόνα 4.18).

Πίνακας 4.2: Αντιπροσωπευτικά γονίδια της οξείδωσης των λιπαρών οξέων με διαφορετική έκφραση στη σύγκριση των δύο γονοτύπων που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό.

Rag1 ^{./-} ND vs WT ND	Rag1 ^{./.} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{-/-} HFD vs Rag1 ^{-/-} ND	Gene Symbol	Genbank
	1,6913			Acaa2	NM_177470
	1,6496			Acadm	NM_007382
	1,3716	1,4689	2,7314	Cpt1a	NM_013495
	1,8705		1,989	Hadha	AK035316
	2,8292			Ucp3	NM_009464
	1,6695			Acaa1a	NM_130864
	1,7799		1,6204	Acaa1b	NM_146230
	1,7737		1,5699	Ech1	NM_016772
	5,5807		6,716	Pdk4	NM_013743
	1,9513	0,3367	0,5677	Fgf21	NM_020013
	1,5491	0,5863		Ppargc1b	NM_133249
0,5165	1,5947	0,5865	1,811	Adipoq	NM_009605
	1,6496			Acadm	NM_007382
	1,8951		2,2813	Ppara	NM_011144
	1,5473	0,7068		Ppard	NM_011145
1,8312	2,2716			Adipor2	AK039667
	2,171		2,231	Acad11	AK041180



Εικόνα 4.18: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων με τη χρήση qRT-PCR στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά (Β) δίαιτα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν αυξημένη έκφραση αυτών των γονιδίων, καταδεικνύοντας ότι, στους *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίζονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, τα αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή ενέργειας αντί να αποθήκευονται στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό.

Ακολούθως, εξετάστηκε και η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη λιπογένεση (*Εικόνα 4.19*) προκειμένου να διαπιστώσουμε αν αυτό το μονοπάτι είναι μειωμένο στους *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, κάτι που θα ενίσχυε την υπόθεσή μας ότι τα λιπαρά οξέα κατά προτίμηση οξειδώνονται, παρά αποθηκεύονται σε αυτόν τον ιστό. Επίσης αναλύσαμε και την έκφραση ενός αντιπροσωπευτικού γονιδίου για το μονοπάτι της λιπόλυσης, ώστε να ελέγξουμε αν συνυπάρχει και χρησημοποίηση αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων για την αυξημένη παραγωγή ενέργειας στους *Rag1^{-/-}* μύες (*Εικόνα 4.19*).



Εικόνα 4.19: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της λιπογένεσης και λιπόλυσης με τη χρήση qRT-PCR στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά (Β) δίαιτα.

Τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά στους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα ανάμεσα στους δύο γονοτύπους. Αντίθετα, στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση του *Dgat*, που προωθεί την αποθήκευση του λίπους, και αυξημένη έκφραση του *Lipe*, που συμμετέχει στη λιπόλυση στους *Rag1^{-/-}* μύες. Τα ανωτέρω ενισχύουν την υπόθεσή μας ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες χρησιμοποιούν για παραγωγή ενέργειας το λίπος που λαμβάνεται από τη δίαιτα, αλλά και αποθηκευμένα τριγλυκερίδια.

4.1.6 Μελέτη υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού

Στη συνέχεια, έγινε ιστολογική εξέταση του υποδόριου λιπώδους ιστού με χρώση H&E (*Εικόνα 4.20*).



Εικόνα 4.20: Ιστολογική ανάλυση του υποδόριου λιπώδους ιστού με χρώση Η&Ε των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Η ιστολογική εξέταση με H&E χρώση στον υποδόριο λιπώδη ιστό έδειξε "φαιοποιημένες-μπεζ" περιοχές στους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, οι *Rag1^{-/-}* μύες διατηρούσαν περιοχές φαιοποιημένου-μπεζ λιπώδους ιστού, σε αντίθεση με την αντίστοιχη ομάδα μυών αγρίου τύπου. Όπως συζητήθηκε στην εισαγωγή, οι φαιοποιημένες-μπεζ περιοχές εκφράζουν το γονίδιο *Ucp1*, το οποίο χρησιμοποιεί τα λιπαρά οξέα για παραγωγή θερμότητας. Η έκφραση της UCP1 εξετάστηκε και με χρώση ανοσοφθορισμού στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (*Εικόνα 4.21*).



Εικόνα 4.21: Απεικόνιση των φαιοποιημένων περιοχών όπου εντοπίζεται η UCP1 με αντίσωμα ανοσοφθορισμού σε επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό μυ αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκε με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Σε συμφωνία με την H&E χρώση, φάνηκε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίζονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά είχαν αυξημένη έκφραση UCP1. Στη συνέχεια, εξετάσθηκε η έκφραση των γονιδίων που αποτελούν αντιπροσωπευτικούς δείκτες για τη θερμογένεση, *Ucp1, Prdm16, Cidea και Pgc1α* (*Εικόνα 4.22*).



Εικόνα 4.22: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών φαιού ιστού και γονιδίων που επάγουν τη φαιοποίηση κυττάρων με τη χρήση qRT-PCR στον υποδόριο λιπώδη ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (A) ή πλούσια σε λιπαρά (B) δίαιτα.

Η ανάλυση της έκφρασης αυτών των γονιδίων έδειξε ότι ο υποδόριος λιπώδης ιστός των *Rag1-⁻⁻* μυών που σιτίζονταν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, έχει αυξημένη ικανότητα να χρησιμοποιεί λιπαρά οξέα για παραγωγή ενέργειας σε σχέση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου, σε συμφωνία και με τα υπόλοιπα δεδομένα μας.

Ακολούθως, έγινε ιστολογική εξέταση του φαιού λιπώδους ιστού (Εικόνα 4.23).



Εικόνα 4.23: Ιστολογική ανάλυση του φαιού λιπώδους ιστού με χρώση Η&Ε των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Η ιστολογική ανάλυση του φαιού λιπώδους ιστού έδειξε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά παρουσίαζαν συσσώρευση από λιποσταγονίδια μικρότερου μεγέθους στα κύτταρα τους, από ότι οι μύες αγρίου τύπου. Οι μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα δεν παρουσίασαν διαφορές στη μορφολογία των λιποκυττάρων. Τέλος εξετάσθηκε και η έκφραση του *Ucp1* (*Εικόνα* 4.24).



Εικόνα 4.24: Επίπεδα έκφρασης Ucp1 με τη χρήση qRT-PCR στο φαιό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (A) ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (B).

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια διαφορά στην έκφραση του Ucp1 στους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Αντιθέτως, οι Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά παρουσίασαν μεγαλύτερη έκφραση του Ucp1, σε συμφωνία με την ιστολογική εικόνα και με το συνολικό φαινότυπό τους, μετά από σίτιση με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

4.1.7 Έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη φλεγμονή που συνοδεύει την ανάπτυξη παχυσαρκίας

Εκτός από διαταραχές στο μεταβολισμό, κατά την παχυσαρκία είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται και το ανοσοποιητικό σύστημα, με χαρακτηριστικά ενεργής φλεγμονώδους διαδικασίας. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η αύξηση των επιπέδων της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης TNFα και η συνεπακόλουθη παρεμπόδιση της δράσης της ινσουλίνης⁴³. Έτσι, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν γονίδια που συμμετέχουν στη φλεγμονή, στο ήπαρ και στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό, τους δύο ιστούς που επηρεάζονται περισσότερο κατά την παχυσαρκία.

4.1.7.1 Ήπαρ

Κατά την ιστολογική εξέταση των τομών ήπατος που είχαν υποβληθεί σε χρώση H&E, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός μακροφάγων στους ιστούς των *Rag1^{-/-}* μυών. Με σκοπό να διελευκάνουμε αν τα μακροφάγα αυτά έχουν χαρακτηριστικά προ-φλεγμονώδους M1 ή αντι-φλεγμονώδους M2 φαινοτύπου, εξετάσαμε την έκφραση γονιδίων που οδηγούν ή συμμετέχουν στα προγράμματα μεταγραφής γονιδίων της Th1 κυτταρικής απάντησης και M1 μακροφάγων και της Th2 κυτταρικής απάντησης και των M2 μακροφάγων με qRT-PCR (*Εικόνα 4.25*) ή με μελέτη μικροσυστοιχιών (*Πίνακες. 4.3, 4.4*).



Εικόνα 4.25: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση με τη χρήση qRT-PCR στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (A) ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (B).

Πίνακας 4.3: Αντιπροσωπευτικά γονίδια της Μ1 ανοσοαπόκρισης με διαφορετική έκφραση στη σύγκριση των δύο γονοτύπων που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Rag1 ^{./-} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{-/-} HFD vs Rag1 ^{-/-} ND	Gene Symbol	Genbank
0,5398				lfng	NM_008337
3,8582	4,0146			116	NM_031168
2,0893	2,0171			ll12a	NM_008351
1,499	2,3387	0,538		ll1b	NM_008361
2,0416			0,5657	ll15	NM_008357
2,122		2,1251		Vcam1	NM_011693
	2,4196		1,9002	Ccl8	NM_021443
0,4812	0,7219	0,636		Cxcl10	NM_021274
	0,4218	0,6875	0,3652	Cxcl9	NM_008599
	0,5141	0,6452	0,3164	Cxcl11	NM_019494
0,2666	0,3952		1,3505	Ccr7	NM_007719
0,3216	0,3012	1,5919		Irf5	NM_012057

Rag1 ^{./-} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{-/-} HFD vs Rag1 ^{-/-} ND	Gene Symbol	Genbank
0,7676	0,657			Itgax	AK089167
2,5235				Ccl2	NM_011333
3,7891	3,4319			Socs3	NM_007707

Πίνακας 4.4: Αντιπροσωπευτικά γονίδια της M2 ανοσοαπόκρισης με διαφορετική έκφραση στη σύγκριση των δύο γονοτύπων που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα στον ηπατικό ιστό.

Rag1 ^{./-} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{-/-} HFD vs Rag1 ^{-/-} ND	Gene Symbol	Genbank
1,3786			0,7514	Stat6	NM_009284
1,609		1,4172		Tlr1	NM_030682
13,0481	8,2381			Cxcl1	NM_008176
1,7277		1,5102		Fgl2	NM_008013
	1,5912		2,0481	Mgl1	NM_010796
	1,3456		1,67	Mgl2	NM_145137
3,6161	5,8403			ll1rn	NM_031167
1,2427		1,2395		ll4ra	NM_00100870 0
1,3611		1,2781		Ppargc1b	NM_133249
3,6161	5,8403			ll1rn	NM_031167
1,2427		1,2395		ll4ra	NM_00100870 0

Τα αποτελέσματά μας, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, δείχνουν ότι οι *Rag1-⁻⁻* μύες στις δύο διαφορετικές συνθήκες δείχνουν αύξηση σε γονίδια κυτοκινών τυπικά της προφλεγμονώδους απόκρισης, όπως εκείνα που κωδικοποιούν χημειοτακτικούς παράγοντες. Παράλληλα, οι *Rag1-⁻⁻* μύες εκφράζουν περισσότερο παράγοντες που συνάδουν με μακροφάγα M2 φαινοτύπου.

4.1.7.2 Επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός

Στη συνέχεια, εξετάστηκε και η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην πόλωση των μακροφάγων προς την Μ1 ή M2 ανοσοαπάντηση στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό με RT-PCR (*Εικόνα 4.26*) και με μελέτη των μικροσυστοιχιών (*Πίνακες 4.5, 4.6*).



Εικόνα 4.26: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση με τη χρήση qRT-PCR στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή (Α) ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα (Β).

Πίνακας 4.5: Αντιπροσωπευτικά γονίδια της Μ1 ανοσοαπόκρισης με διαφορετική έκφραση
στη σύγκριση των δύο γονοτύπων που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια
σε λιπαρά δίαιτα στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό.

Rag1 ^{./.} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs Rag1 ^{./-} ND	Gene Symbol	Genbank
0,5236			1,6794	Tnf	NM_013693
0,682		1,442	1,5847	Cd86	NM_019388
0,67	0,527			ll12a	NM_008351
1,6541				ll1b	NM_008361
0,6937		0,8019		ll15	NM_008357

Rag1 ^{./.} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{-/-} HFD vs Rag1 ^{-/-} ND	Gene Symbol	Genbank
0,684			1,5321	Vcam1	NM_011693
				Cxcl10	NM_021274
0,5509			1,7216	Cxcl9	NM_008599
				Cxcl11	NM_019494
0,6932		1,4917	1,6751	lrf5	NM_012057
0,5098				Ccl2	NM_011333

Πίνακας 4.6: Αντιπροσωπευτικά γονίδια της M2 ανοσοαπόκρισης με διαφορετική έκφραση στη σύγκριση των δύο γονοτύπων που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό.

Rag1 ^{./.} ND vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs WT HFD	WT HFD vs WT ND	Rag1 ^{./-} HFD vs Rag1-/- ND	Gene Symbol	Genbank
	1,6972		2,3288	Stat6	NM_009284
0,3311			2,3033	Retnla	NM_020509
0,2928				Mgl2	NM_145137
			1,5526	ll4ra	NM_001008700
	1,5473	0,7068		Ppard	NM_011145
1,5703		0,4835	0,3546	Ppargc1b	NM_133249
	1,5399	0,571		Ppargc1b	NM_133249

Σε αυτόν τον ιστό οι διαφορές στην έκφραση κυτοκινών δεν ήταν τόσο μεγάλες σε σχέση με αυτές που ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ για τους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Αντιθέτως, στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, η έκφραση Μ1 κυτοκινών ήταν πολύ μικρότερη στους *Rag1^{-/-}* σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου, σε συμφωνία με το φαινότυπο του ιστού. Επίσης η έκφραση αδιπονεκτίνης ήταν μεγαλύτερη στους *Rag1^{-/-}* μύες (*Εικόνα 4.18B*). Σημαντικό υποστηρικτικό εύρημα είναι ότι στα δεδομένα των μικροσυστοιχιών υπάρχει μεγαλύτερη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *Ppara*, *Pgc1β*, *Stat6* που οδηγούν προς την M2 πόλωση των μακροφάγων στους *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Επιπλέον, η ιστολογική εξέταση του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού, έδειξε εμφανή συγκέντρωση μακροφάγων γύρω από λιποκύτταρα (crown like structures) στους μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Παραθέτουμε ενδεικτική απεικόνιση των εναποθέσεων μακροφάγων, με χρώση H&E, καθώς και με σήμανση των μακροφάγων με F4/80 αντίσωμα με ανοσοφθορισμό σε κρυοτομή επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού (*Εικόνα* 4.27).



Εικόνα 4.27: Απεικόνιση των εναποθέσεων μακροφάγων με χρώση Η&E και με σήμανση των μακροφάγων με F4/80 αντίσωμα με ανοσοφθορισμό στον επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού μυ αγρίου τύπου που σιτίστηκε με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Παρόμοιες εναποθέσεις παρατηρούνται συχνά γύρω από νεκρωτικά λιποκύτταρα στον υπερτροφικό λιπώδη ιστό στις περιπτώσεις παχυσαρκίας. Η έλλειψη αυτού του σχηματισμού στις υπόλοιπες ομάδες είναι αναμενόμενη, καθώς συνάδει με παρατήρηση ότι τα λιποκύτταρα ήταν αρκετά μικρότερα σε σχέση με αυτά των παχύσαρκων μυών αγρίου τύπου.

4.1.8 Διαφορές στην απόκριση σε πρόκληση παχυσαρκίας μυών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, οι *Rag1^{-/-}* μύες και ειδικά με γενετικό υπόβαθρο BALB/c, χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε μοντέλα ανοσολογικών και φλεγμονωδών νόσων (π.χ. άσθμα). Όπως συζητήσαμε, η παχυσαρκία συνοδεύεται από ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος και είναι αποδεκτή ως μία φλεγμονώδης νόσος. Έχει δειχθεί ότι οι BALB/c μύες αναπτύσσουν μεγαλύτερη αντίσταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας από ότι οι

C57BL/6 μύες. Η επόμενη σειρά πειραμάτων στόχευσε στην ταυτοποίηση των πιθανών διαφορών στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και των διαμεσολαβητικών μεταβολικών λειτουργιών ανάμεσα σε BALB/c και C57BL/6 μύες αγρίου τύπου και *Rag1-*^{-/-}. Αυτά τα πειράματα αποτελούν συμπλήρωμα του πρώτου μέρους των μελετών μας για κατάδειξη των διαφορών της μεταβολικής λειτουργίας μεταξύ μυών αγρίου τύπου και *Rag1*^{-/-}, αλλά και στήριξης των διαφορών στην ανοσολογική απόκριση σε συνδυασμό με τη μεταβολική λειτουργία, μέρος του αναπτυσσόμενου τομέα του ανοσομεταβολισμού.

Έτσι BALB/c μύες αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}* σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά για 16 εβδομάδες και μελετήσαμε το σωματικό βάρος, την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, τις μεταβολικές παραμέτρους, την ιστολογική εξέταση του ήπατος και των λιπωδών ιστών, καθώς και τη δυνατότητα των λιπωδών ιστών να καταβολίζουν λίπος κατ' αντιστοιχία με τις λεπτομερειακές μελέτες στους C57BL/6 μύες.



Εικόνα 4.28: Καταγραφή της μεταβολής του σωματικού βάρους των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.



Εικόνα 4.29: Καταγραφή της ποσοστιαίας αύξησης του σωματικού βάρους των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα στο τέλος του πειράματος.

Στο τέλος του πειράματος, οι BALB/c μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα αύξησαν το σωματικό τους βάρος κατά 0.12% ± 1%, οι *Rag1*-/- μύες 4.3% ± 3.985%, ενώ οι μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά κατά 19.8% ± 3.2% και οι αντίστοιχοι *Rag1*-/- κατά 12.03% ± 1.96% (*Εικόνες 4.28, 4.29*). Η μικρή παροδική μείωση στο σωματικό βάρος στο τέλος του πειράματος πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι λίγες μέρες πριν είχε προηγηθεί η δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT).

Όπως φαίνεται και στις εικόνες 4.1 και 4.28, οι BALB/c μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά αύξησαν το σωματικό τους βάρος κατά 19.8% ± 3.2% ενώ οι αντίστοιχοι C57BL/6 μύες πολύ περισσότερο, κατά 28% ± 2.8%, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Και σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο, δεν υπήρχε διαφορά στην πρόσληψη τροφής (*Εικόνα 4.30*).



Εικόνα 4.30: Καταναλούμενη τροφή στους BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1-/- που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα της χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία μετά από νηστεία και, όπως δείχνουμε, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά των C57BL/6 μυών (*Εικόνα 4.31A, B*).



Εικόνα 4.31: Επίπεδα χοληστερόλης (Α) και τριγλυκεριδίων (Β) μετά από νηστεία σε BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Στη συνέχεια υποβάλαμε τους μύες σε δοκιμασίες ανοχής γλυκόζης (GTT) και αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT) (*Εικόνα 4.32Α, Β*). Επίσης, μετρήσαμε τα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκόζης στον ορό μετά από 16 ώρες νηστείας, και υπολογίστηκε και ο HOMA-IR προκειμένου να αξιολογήσουμε την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης (*Εικόνα 4.33Α-Γ*).



Εικόνα 4.32: Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (GTT) (Α) και δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (ITT) (Β) σε BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.



Εικόνα 4.33: Επίπεδα γλυκόζης (Α), ινσουλίνης (Β) και ΗΟΜΑ-ΙR (Γ) μετά από νηστεία 16 ωρών σε BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι και στο BALB/c γενετικό υπόβαθρο, οι *Rag1^{-/-}* μύες είναι πλέον ανθεκτικοί στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης.
Στη συνέχεια, εξετάσαμε τη μεταβολική λειτουργία των BALB/c μυών με τη χρήση έμμεσης θερμιδομετρίας (*Εικόνα 4.34*).



Εικόνα 4.34: Μελέτη μεταβολικών παραμέτρων με χρήση έμμεσης θερμιδομετρίας, VO₂ (A), VCO₂ (B), αναπνευστικού πηλίκου (Γ), μεταβολικού ρυθμού (Δ) και κινητικότητας (Ε) σε BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Όπως φαίνεται, οι BALB/c *Rag1^{-/-}* μύες είχαν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα σε σχέση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο αναπνευστικό πηλίκο, παρά τον αυξημένο μεταβολικό ρυθμό των *Rag1^{-/-}* μυών και την ίδια κινητικότητα. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά των C57BL/6 μυών.

Στη συνέχεια εξετάσαμε εάν και σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο το ήπαρ παρουσιάζει σημαντικά ελαττωμένη λιπώδη διήθηση (*Εικόνα 4.35*).



Εικόνα 4.35: Ιστολογική ανάλυση του ηπατικού ιστού με χρώση H&E των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Η ιστολογική εξέταση δεν έδειξε λιπώδη διήθηση του ήπατος στους *Rag1^{-/-}* μύες σε πλήρη συμφωνία με τα ευρήματά μας στους C57BL/6 μύες.

Ο επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός των μυών αγρίου τύπου ήταν βαρύτερος από αυτόν των *Rag1^{-/-}* μυών (*Εικόνα 4.36*) και τα λιποκύτταρα ήταν μεγαλύτερα (*Εικόνα 4.37*). Όμως η διαφορά τους δεν ήταν τόσο μεγάλη όσο στους C57BL/6 μύες σε συμφωνία με τα ευρήματά μας στα σωματικά τους βάρη που επίσης δεν είχαν την ανάλογη διαφορά.



Εικόνα 4.36: Αναγωγή του βάρους του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού στο σωματικό βάρος των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή ή πλούσια σε λιπαρά δίαιτα.



Εικόνα 4.37: Ιστολογική ανάλυση με χρώση Η&Ε (Α) και μέγεθος των λιποκυττάρων του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Η ικανότητα του ιστού να καταβολίζει τα λιπαρά οξέα ήταν και στους BALB/c *Rag1^{-/-}* μύες αυξημένη, όπως φάνηκε από την έκφραση των σχετικών γονιδίων (*Εικόνα 4.38*). Η έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων ήταν επίσης μειωμένη στους *Rag1^{-/-}* μύες σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα και τα αντίστοιχα των C57BL/6 μυών.



Εικόνα 4.38: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και τη φλεγμονή με τη χρήση qRT-PCR στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Η ιστολογική εξέταση του υποδόριου λευκού λιπώδους ιστού έδωσε ευρήματα αντίστοιχα με αυτά των C57BL/6 μυών, με σημαντική αύξηση των φαιοποιημένων-μπεζ περιοχών στους *Rag1^{-/-}* μύες. Επίσης, η έκφραση της UCP1 όπως ήταν αναμενόμενο ήταν σημαντικά περισσότερη στους *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα των μυών αγρίου τύπου (*Εικόνα 4.39*).



Εικόνα 4.39: Ιστολογική ανάλυση με χρώση Η&Ε και απεικόνιση των φαιοποιημένων περιοχών όπου εντοπίζεται η UCP1 με αντίσωμα ανοσοφθορισμού σε τομές των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, βρέθηκε αυξημένη έκφραση γονιδίων δεικτών του φαιοποιημένου ιστού και της θερμογένεσης στους *Rag1^{-/-}* μύες (*Εικόνα 4.40*).



Εικόνα 4.40: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών φαιοποιημένου ιστού και γονιδίων που συμμετέχουν στη θερμογένεση με τη χρήση qRT-PCR στον υποδόριο λιπώδη ιστό BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Τέλος, εξετάσαμε και το φαιό λιπώδη ιστό και παρατηρήσαμε μικρότερα λιποσταγονίδια (*Εικόνα 4.41*) και μεγαλύτερη έκφραση του *Ucp1* (*Εικόνα 4.42*) στους *Rag1^{-/-}* μύες, σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των C57BL/6 μυών.



Εικόνα 4.41: Ιστολογική ανάλυση του φαιού λιπώδους ιστού με χρώση H&E των BALB/c μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.



Εικόνα 4.42: Επίπεδα έκφρασης Ucp1 με τη χρήση qRT-PCR στο φαιό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι οι *Rag1*^{-/-} μύες, και στα δύο γενετικά υπόβαθρα που εξετάσαμε, έχουν αυξημένη χρησιμοποίηση των λιπαρών οξέων σε σχέση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Ως αποτέλεσμα, οι *Rag1*^{-/-} μύες αναπτύσσουν μεγαλύτερη αντίσταση στις αλλαγές που προκαλεί η δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, όπως η αλλαγή στο σωματικό βάρος, η ανάπτυξη παχυσαρκίας και η ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης. Τα παραπάνω υποστηρίζουν ότι τα λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παχυσαρκίας αλλά και της NAFLD.

4.2 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης NAFLD σε μύες με τροποποιημένο ανοσολογικό σύστημα – Απενεργοποίηση ΝΚΤ κυττάρων

Επόμενος στόχος της μελέτης ήταν να εξετάσουμε εάν, παρεμποδίζοντας τη δράση των ΝΚΤ κυττάρων, θα μπορούσαμε να «μιμηθούμε» τον ηπατικό φαινότυπο των *Rag1-^{-/-}* μυών που σιτίζονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, δηλαδή την προστασία τους από την ανάπτυξη NAFLD. Τα NKT κύτταρα αναγνωρίζουν

λιπιδικά αντιγόνα, τα οποία τους παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d¹³⁷, και έτσι αποτελούν έναν πιθανό κυτταρικό πληθυσμό που ενδεχομένως διαμεσολαβεί τις δράσεις των ανοσολογικών κυττάρων στη διαδικασία της αποθήκευσης λίπους και ενέργειας.

Για το λόγο αυτό, δύο ομάδες μυών αγρίου τύπου σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά για 4 εβδομάδες. Στην αρχή της 4ης εβδομάδας και εφεξής κάθε 2 ημέρες στη μία ομάδα χορηγήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CD1d και στην άλλη PBS (ομάδα ελέγχου), όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, κάναμε εβδομαδιαία μετρήσεις του σωματικού βάρους των ζώων και μετρήθηκε η ποσότητα προσλαμβανομένης τροφής. Μετά από 11 ημέρες από την αρχή της 4^{ης} εβδομάδας, οι μύες θυσιάστηκαν. Στο τέλος του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη μεταβολή του σωματικού βάρους ή στην κατανάλωση τροφής ανάμεσα στους μύες που έλαβαν PBS και στους μύες στους οποίους χορηγήθηκε το αντίσωμα (*Εικόνα* 4.43A, B).



Εικόνα 4.43: Παρακολούθηση του σωματικού βάρους (Α) και κατανάλωση τροφής (Β) των μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Έτσι αποφασίσαμε να μελετήσουμε το ήπαρ, καθώς αυτό παρουσίασε την πιο ξεκάθαρη ιστολογική διαφορά μεταξύ των μυών αγρίου τύπου και αυτών στους οποίους απουσίαζαν τα λεμφοκύτταρα. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε τον ηπατικό ιστό με χρώσεις H&E σε τομές παραφίνης και ORO σε κρυοτομές (*Εικόνα 4.44A, B*).



Εικόνα 4.44: Ιστολογική ανάλυση με χρώση H&E (A) και ORO (B) σε τομές ηπατικού ιστού μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Η ιστολογική εξέταση έδειξε ότι και οι δύο ομάδες μυών είχαν αναπτύξει εκτεταμένη μακροφυσαλιδώδη λίπωση. Ακολούθως μετρήσαμε την περιεκτικότητα του ηπατικού ιστού σε λίπος και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τις παραπάνω παρατηρήσεις, καθώς οι μετρήσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες (*Εικόνα 4.45*).



Εικόνα 4.45: Ανάλυση περιεκτικότητας τριγλυκεριδίων στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που ενέχονται στο μεταβολισμό λιπιδίων. Εξετάσθηκαν γονίδια που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων (*Pgc1a, Cpt1a, Ppara*), στη *de novo* λιπογένεση (*Acc1*), στη διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη (*Lpl*), καθώς και το γονίδιο *Fabp4*, που δεσμεύει λιπαρά οξέα ώστε να μεταφερθούν στους ιστούς και του οποίου η έκφραση σχετίζεται με την παχυσαρκία (*Εικόνα 4.46*).



Εικόνα 4.46: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων με τη χρήση qRT-PCR στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν σταστιστικά σημαντική διαφορά σε κάποιο από τα γονίδια που μελετήθηκαν, υποδηλώνοντας την απουσία διαφορών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η μελέτη του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού. Κατά τη συλλογή ιστών μετά τη θυσία των μυών, μετρήθηκε το βάρος του ιστού και έγινε αναγωγή προς το σωματικό βάρος (*Εικόνα 4.47*).



Εικόνα 4.47: Αναγωγή του βάρους του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού στο σωματικό βάρος μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις, δεν διαπιστώθηκε διαφορά στο βάρος του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού, αλλά η ιστολογική εξέταση με χρώση Η&Ε και η μέτρηση του μεγέθους των λιποκυττάρων έδειξαν ότι οι μύες στους οποίους χορηγήθηκε το CD1d αντίσωμα είχαν μικρότερα λιποκύτταρα (Εικόνα 4.48).



Εικόνα 4.48: Ιστολογική ανάλυση του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού με χρώση Η&Ε (Α) και μέγεθος λιποκυττάρων (Β) των μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Επιπροσθέτως μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων (*Εικόνα 4.49*).





Τα αποτελέσματα και σε αυτόν τον ιστό δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα μεταβολικά μονοπάτια που μελετήθηκαν.

Τέλος, μελετήθηκε και η έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν τη φλεγμονώδη αντίδραση που αναπτύσσεται στο ήπαρ και στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό λόγω παχυσαρκίας (*Εικόνα 4.50Α, Β*).



Εικόνα 4.50: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση με χρήση qRT-PCR στον ηπατικό (Α) και επιδιδυμικό λιπώδη ιστό (Β) μυών αγρίου τύπου που έλαβαν PBS ή αντίσωμα CD1d.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας, στον ηπατικό ιστό δεν υπήρξε διαφορά στην έκφραση γονιδίων κυτοκινών και μορίων Saa1, II1-b, που ενέχονται στην προ-φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση, καθώς και των δεικτών F4/80, Cd11c. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν στην έκφραση του χημειοτακτικού παράγοντα για τα μονοκύτταρα, Ccl2, καθώς και του Foxp3, χαρακτηριστικού δείκτη των Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Τα γονίδια αυτά παρουσίασαν μειωμένη έκφραση στους μύες στους οποίους χορηγήθηκε το αντίσωμα CD1d, υποδηλώνοντας ότι ίσως τα ΝΚΤ κύτταρα επηρεάζουν τη στρατολόγηση μακροφάγων και τον αριθμό των Τρυθμιστικών κυττάρων.

Στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση κάποιου από τα γονίδια που μελετήθηκαν.

4.3 Χαρακτηρισμός της ανάπτυξης NASH σε μύες με τροποποιημένο ανοσολογικό σύστημα – Θετή μεταφορά κυτταροτοξικών CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων

Αφού διαπιστώθηκε ότι τα ΝΚΤ κύτταρα δεν έχουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, προχωρήσαμε στην ταυτοποίηση του ειδικού πληθυσμού των ανοσοκυττάρων που θα μπορούσε να αντιστρέψει τον ηπατικό φαινότυπο των Rag1^{-/-} μυών. Από την ομάδα της ερευνήτριας Καραλή, στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ, είχαν γίνει μελέτες in vitro προσομοίωσης των in vivo πειραμάτων που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 4.1. Εν συντομία, κύτταρα HepG2, συν-καλλιεργήθηκαν με CD4⁺ ή CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, απομονωμένα από περιφερικό αίμα ανθρώπου, με παρουσία ή μη ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids - FFAs). Ιστολογικές μελέτες με χρώση ORO, έδειξαν ότι η παρουσία CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων και λιπαρών οξέων ενισχύει περισσότερο την αποθηκεύση λίπους στα ηπατικά κύτταρα σε σύγκριση με τη συν-καλλιέργεια με CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο σπλαγχνικός λιπώδης ιστός σε κατάσταση παχυσαρκίας παρουσιάζει αύξηση στον πληθυσμό των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων και ότι αυτή η αύξηση συνδέεται με τη χαρακτηριστική, κατά την παχυσαρκία, διήθηση του ιστού από μακροφάγα⁸¹.

Με βάση τα ανωτέρω, προχωρήσαμε σε θετή μεταφορά CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων, απομονωμένων από σπλήνα μυών αγρίου τύπου σε *Rag1^{-/-}* μύες που σιτίζονταν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Τρείς ομάδες μυών, αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}*, σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά για 4 εβδομάδες. Στην αρχή της τρίτης εβδομάδας, έγινε θετή μεταφορά 10x10⁶ κυττάρων εμπλουτισμένων σε CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, από μύες αγρίου τύπου στη μία ομάδα *Rag1^{-/-}* μυών, ενώ σε μία ομάδα μυών αγρίου τύπου και σε μία ομάδα *Rag1^{-/-}* μυών έγινε έγχυση με αποστειρωμένο PBS (ομάδες ελέγχου). Μετά από δύο εβδομάδες, οι μύες θυσιάστηκαν. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, λάβαμε εβδομαδιαίες μετρήσεις του σωματικού βάρους των μυών. Σε αυτό το πείραμα, λόγω της μικρής διάρκειάς του, δεν έγινε καμία άλλη μέτρηση, ώστε οι μύες να έχουν το λιγότερο δυνατό στρες και να μην επηρεαστούν οι υπό εξέταση παράμετροι. Στο τέλος του πειράματος, το σωματικό βάρος των *Rag1^{-/-}* μυών, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, δεν διέφερε από το σωματικό βάρος των μυών των δύο άλλων ομάδων (*Εικόνα 4.51*).



Εικόνα 4.51: Παρακολούθηση του σωματικού βάρους των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.

Η επιτυχία της θετής μεταφοράς των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στο ήπαρ των *Rag1^{-/-}* μυών επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στο ήπαρ με ανοσοφθορισμό (*Εικόνα 4.52*).



Εικόνα 4.52: Ανίχνευση CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων με ανοσοφθορισμό σε κρυοτομή ηπατικού ιστού μυών αγρίου τύπου Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ιστολογία του ηπατικού ιστού με χρώσεις H&E σε τομές παραφίνης και ORO σε κρυοτομές (*Εικόνα 4.53A, B*).



Εικόνα 4.53: Ιστολογική ανάλυση του ηπατικού ιστού με χρώση H&E (A) και ORO (B) των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.

Η ιστολογική εξέταση έδειξε, σε συμφωνία με τα παραπάνω πειράματα, ότι οι μύες αγρίου τύπου παρουσίαζαν αρχικά στάδια μακροφυσαλιδώδους λίπωσης ενώ το ήπαρ των *Rag1*-/- μυών δεν είχε σημεία διήθησης από λίπος. Σε αντίθεση, το ήπαρ των *Rag1*-/- μυών, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, είχε ευρήματα συμβατά με μικροφυσαλιφώδη λίπωση. Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν και στις ηπατικές τομές στις οποίες έγινε χρώση με ORO. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η περιεκτικότητα λίπους στα ηπατικά δείγματα από όλες τις πειραματικές ομάδες, προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι μεταξύ τους διαφορές (*Εικόνα 4.54*).



Εικόνα 4.54: Ανάλυση περιεκτικότητας τριγλυκεριδίων στον ηπατικό ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ T λεμφοκύτταρα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η διαφορά στην περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια στο ήπαρ των *Rag1^{-/-}* μυών που έλαβαν PBS και των *Rag1^{-/-}* μυών στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, δεν υπήρχε διαφορά στην περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια ανάμεσα στο ήπαρ των μυών αγρίου τύπου και των *Rag1^{-/-}* μυών, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η μελέτη του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού. Κατά τη συλλογή των ιστών μετρήθηκε το βάρος τους και έγινε αναγωγή προς το σωματικό βάρος (*Εικόνα 4.55*).



Εικόνα 4.55: Αναγωγή του βάρους του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού στο σωματικό βάρος των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.

Παρατηρήθηκε ότι η μάζα του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού των Rag1-μυών, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8+ Τ λεμφοκυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από των *Rag1^{-/-}* μυών που έλαβαν PBS, αλλά παρέμεινε στατιστικά σημαντικότερα μικρότερη από αυτήν των μυών αγρίου τύπου. Ακολούθησε ιστολογική εξέταση του ιστού με χρώση H&E (*Εικόνα 4.56*) και μετρήθηκε το μέγεθος των λιποκυττάρων (*Εικόνες 4.57, 4.58*).



Εικόνα 4.56: Ιστολογική ανάλυση του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού με χρώση Η&Ε των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 4.57: Μέγεθος των κυττάρων του επιδιδυμικού λιπώδους ιστού. Οι μετρήσεις έγιναν σε τομές του ιστού των μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα με χρώση H&E.



Εικόνα 4.58: Κατανομή μεγέθους κυττάρων. Οι μετρήσεις έγιναν σε τομές του ιστού των μυών αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}* που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα με χρώση H&E.

Τα αποτελέσματά μας, σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις, έδειξαν ότι το μέγεθος των λιποκυττάρων των *Rag1^{-/-}* μυών, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από αυτά των *Rag1^{-/-}* μυών που έλαβαν PBS, αλλά και στατιστικά σημαντικά μικρότερο από των μυών αγρίου τύπου.

Τέλος, εξετάσθηκε η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της οξείδωσης των λιπαρών οξέων (*Εικόνα 4.59*).



Εικόνα 4.59: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων με τη χρήση qRT-PCR στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό μυών αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} που έλαβαν PBS ή CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν τάση μειωμένης έκφρασης του γονιδίου *Pgc1β* στους *Rag1^{-/-}* μύες στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, σε σχέση με τους *Rag1^{-/-}* μύες που έλαβαν PBS. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *Ppara*.

Συμπερασματικά, το πείραμα αυτό υποδεικνύει τη συμβολή των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στο μεταβολισμό και στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και NAFLD και προσφέρει μία εξήγηση για το φαινότυπο των *Rag1^{-/-}* μυών.

5. Συζήτηση

Η κατανόηση της παθογένειας της NAFLD και της παχυσαρκίας και η αναγνώριση παραγόντων κινδύνου για την εξέλιξη της νόσου και πιθανών φαρμακευτικών στόχων, συγκεντρώνει τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της συχνότητας της νόσου και της σοβαρής πιθανότητας εξέλιξής της σε ηπατική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η νόσος, στο μη αναστρέψιμο στάδιο του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, είναι η κυριότερη αιτία παρουσίας ασθενών στις λίστες αναμονής για μεταμόσχευση ήπατος και ο αριθμός των νοσούντων, ενηλίκων αλλά και παιδιών, αυξάνεται συνεχώς¹³⁸. Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι προσπάθειες για να διασαφηνισθεί ο ρόλος των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεση της νόσου^{56, 59, 87}. Τα ευρήματα των μελετών αυτών δείχνουν ότι συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων ευθύνονται για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που έχουν συσχετισθεί με την παθογένεση αλλά και την εξέλιξη της νόσου. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα έχουν χαρακτηρισθεί καλύτερα από τα κύτταρα της λεμφικής σειράς. Για άλλους τύπους κυττάρων, όπως τα ΝΚΤ κύτταρα, παρά την πληθώρα μελετών και τον αρχικό ενθουσιασμό, δεν έχει διασαφηνισθεί ο ρόλος τους. Πιο πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν νέους πληθυσμούς κυττάρων, όπως τα ILC2 κύτταρα και τα ηωσινόφιλα, με σημαντικό ρόλο στην ενεργειακή ομοιοστασία και στο μεταβολισμό και, τουλάχιστον έμμεσα, στην ανάπτυξη της νόσου^{71, 78}. Επιπρόσθετα, νέοι μηχανισμοί για τους τρόπους που το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζει το λιπώδη ιστό και την ανάπτυξη της παχυσαρκίας έρχονται στο φώς^{71,} ¹²⁶. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αξιολόγηση της συμμετοχής των κυττάρων της λεμφικής σειράς του ανοσοποιητικού συστήματος στην ανάπτυξη και εξέλιξη της παχυσαρκίας και της λιπώδους διήθησης του ήπατος. Σε δεύτερο χρόνο σκοπεύσαμε στην ταυτοποίηση του πιθανού συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου και των μηχανισμών που διαμεσολαβούν τη συμμετοχή τους στην παθογένεση της NASH, με κύριο ενδιαφέρον την επίδραση στο μεταβολισμό και την ενεργειακή ομοιοστασία. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της επαγόμενης παχυσαρκίας και της λιπώδους διήθησης του ήπατος σε μύες με έλλειψη Τ και Β λεμφοκυττάρων (*Rag1*-/-). Τα πρωτότυπα ευρήματά μας, δείχνουν ότι η έλλειψη λεμφοκυττάρων προστατεύει τον οργανισμό από την διατροφικής αιτιολογίας ανάπτυξη παχυσαρκίας, ινσουλινοαντίστασης και NAFLD. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν για πρώτη φορά το ρόλο των λεμφοκυττάρων στην ενεργειακή ομοιοστασία, όπως διαμεσολαβείται από τους διαφορετικούς υποτύπους του λιπώδους ιστού. Τέλος, σε μία ανεξάρτητη σειρά πειραμάτων, χαρακτηρίσαμε την ανάπτυξη πειραματικής παχυσαρκίας σε μύες αγρίου τύπου και *Rag1^{-/-}*, από δύο διαφορετικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα γενετικά υπόβαθρα μυών, των C57BL/6 και BALB/c, και περιγράψαμε τις μεταξύ τους διαφορές.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε αρσενικούς μύες ηλικίας 12 εβδομάδων, τους οποίους σιτήσαμε με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (45 kcal%) για 15 εβδομάδες και δείξαμε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες, παρά τον παρόμοιο αρχικό ρυθμό αύξησης βάρους με τους μύες αγρίου τύπου, επιβράδυναν και κατέληξαν σε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο βάρος. Παράλληλα, έκθεση σε δοκιμασίες ανοχής γλυκόζης την περίοδο που δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο βάρος μεταξύ των δύο γονοτύπων, καθώς και σε δοκιμασία ευαισθησίας στην ινσουλίνη έδειξε ότι οι *Rag1^{-/-}* μύες ήταν σαφώς πλέον ινσουλινοευαίσθητοι και άρα είχαν καλύτερο έλεγχο της γλυκόζης και ινσουλίνης αίματος μετά από νηστεία. Παράλληλα με τη μελέτη μας, μερικές ακόμα μελέτες χρησιμοποίησαν *Rag1^{-/-}* μύες είτε για μελέτη της ανάπτυξης παχυσαρκίας είτε για της ΝAFLD. Αυτές καταλήγουν σε ένα εύρος αποτελεσμάτων που πιθανά οφείλονται σε διαφορές στη δίαιτα, ηλικία, φύλο των μυών αλλά και στη διάρκεια του πειράματος.

Οι Bhattacharjee J et al., χορήγησαν 30% (w/v) φρουκτόζη για 12 εβδομάδες σε διάφορες ομάδες μυών, χωρίς να διευκρινίζεται το φύλο, με γενετικής αιτιολογίας ανοσοκαταστολή ηλικίας 6 εβδομάδων¹³⁹. Στο τέλος των 12 εβδομάδων, οι B6.129S7 Rag1^{-/-} μύες είχαν μικρότερη αύξηση σωματικού βάρους από ότι οι αντίστοιχοι μύες αγρίου τύπου και στις δοκιμασίες αντίστασης στην ινσουλίνη και ανοχής γλυκόζης δεν είχαν σημεία ινσουλινοαντίστασης, σε αντίθεση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Οι Wolf MJ et al., χρησιμοποίησαν C57BL/6 Rag1^{-/-} μύες, ηλικίας 5 εβδομάδων για να μελετήσουν στεατοηπατίτιδα και καρκίνο του ήπατος μετά από χορήγηση δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά αλλά με έλλειψη χολίνης για 11 μήνες. Η έλλειψη χολίνης μειώνει την έκκριση λιπιδίων-VLDL από το ήπαρ ευνοώντας έτσι την περαιτέρω συσσώρευση λίπους¹⁴⁰. Το σωματικό βάρος ανάμεσα στους δύο γονοτύπους δεν διέφερε αλλά οι Rag1^{-/-} μύες είχαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης αίματος. Στη μελέτη των Winer S *et al*, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες ηλικίας 6 εβδομάδων, στους οποίους χορηγήθηκε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (60% kcal) για 14 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι οι *Rag1*^{-/-} μύες αύξησαν το σωματικό τους βάρος περισσότερο από ότι οι αντίστοιχοι μύες αγρίου τύπου. Επιπλέον, οι *Rag1*^{-/-} μύες παρουσίασαν ινσουλινοαντοχή και δυσανεξία στη γλυκόζη⁸². Άλλη μία μελέτη των Lui X *et al*., χρησιμοποίησε C57BL/6 μύες 3 εβδομάδων και χορήγησε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (42,2% kcal) για 11 εβδομάδες. Οι *Rag1*^{-/-} μύες αύξησαν περισσότερο το σωματικό τους βάρος αλλά δεν παρουσίασαν διαφορά στην ινσουλινοευαισθησία¹⁴¹. Τέλος, οι Duffaut C *et al*., χρησιμοποίησαν C57BL/6 *Rag2*^{-/-} μύες στους οποίους χορήγησαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (45% kcal) για 12 εβδομάδες. Τα αποτελέσματά τους δεν έδειξαν διαφορές στο σωματικό βάρος ή στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης¹⁴².

Άλλες παράμετροι που μελετήθηκαν και συνηγορούν με το σχετικό προτέρημα των Rag1^{-/-} μυών είναι τα χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία μετά από νηστεία. Από τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, στις μελέτες των Wolf MJ et al., και Bhattacharjee J et al., τα επίπεδα της χοληστερόλης στην κυκλοφορία ήταν χαμηλότερα στους Rag1^{-/-} μύες. Τέλος, δείχνουμε ότι ο μεταβολικός ρυθμός των Rag1^{-/-} μυών είναι αυξημένος σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου με τάση για χαμηλότερο αναπνευστικό πηλίκο, ένδειξη χρησιμοποίησης κυρίως λιπιδίων αντί υδατανθράκων για παραγωγή ενέργειας. Η μελέτη των Lui X et al., έδειξε επίσης χαμηλότερο αναπνευστικό πηλίκο με τη διαφορά ότι βρίσκει μειωμένη παραγωγή θερμότητας στους Rag1^{-/-} μύες, υποδεικύοντας συνολική ελάττωση του μεταβολισμού, σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς που οδηγούν στην αυξημένη χρησιμοποίηση των λιπιδίων και λειτουργούν στην προστασία των *Rag1^{-/-}* μυών από την ανάπτυξη παχυσαρκίας, εξετάσαμε ιστολογικά τους μεταβολικά ενεργούς ιστούς. Αρχίζοντας από το ήπαρ, παρατηρήσαμε ότι δεν είχε σημεία λιπώδους διήθησης λόγω συσσώρευσης λιπιδίων. Αυτή η εικόνα ήταν σταθερή και διαφοροποιούσε τους *Rag1^{-/-}* μύες από τους μύες αγρίου τύπου ακόμα και στη χρονική περίοδο κατά την οποία δεν είχαν διαφορές στο σωματικό βάρος. Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε και από την ανεύρεση πολύ μειωμένων

τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Σημαντικό είναι ότι, μετά την ανακοίνωση αυτού του ευρήματός μας σε παγκόσμιο συνέδριο, μελέτες όπως αυτές των Wolf MJ et al., και Bhattacharjee J et al., επιβεβαίωσαν την παρατήρησή μας^{84, 139}. Για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που διαμεσολαβούν αυτά τα ευρήματα, αναλύσαμε την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και ειδικά στην οξείδωση των λιπαρών οξέων. Βρήκαμε ενεργοποίηση αυτού του μεταβολικού μονοπατιού στους Rag1-/- μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα αλλά όχι στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Στη συνέχεια αναλύσαμε την έκφραση γονιδίων του μονοπατιού της λιπογένεσης, όπου και πάλι παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στους Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα αλλά όχι σε αυτούς που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Έτσι καταλήξαμε ότι τα μονοπάτια αυτά δεν είναι υπεύθυνα για την προστασία των Rag1-/- μυών από λιπώδη διήθηση του ήπατος. Ένα επιπλέον μεταβολικό μονοπάτι που επηρεάζεται κατά την παχυσαρκία είναι αυτό του μεταβολισμού της γλυκόζης. Μελετώντας την έκφραση του γονιδίου Pepck, παρατηρήσαμε ότι εκφραζόταν λιγότερο στους Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά από τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Η παρατήρηση αυτή ήταν αναμενόμενη καθώς η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1, με αποτέλεσμα να παραμένει αυτός στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων και να επάγει την έκφραση των ενζύμων phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) και glucose 6phosphatase (G6Pase), που καταλύουν την γλυκονεογένεση²³.

Στη συνέχεια, συνδυάζοντας τα ευρήματά μας ότι το ήπαρ των *Rag1*-/- μυών δεν συσσωρεύει λιπίδια αλλά και δεν παρουσιάζει διαφορές στην οξείδωση των λιπιδίων, προχωρήσαμε στη μελέτη άλλων πιθανών τόπων οξείδωσης των λιπιδίων και άρα ελάττωσης του διαθεσίμου τους για εναπόθεση στο ήπαρ. Με αυτό το σκεπτικό μελετήσαμε το μονοπάτι της οξείδωσης των λιπιδίων στους επιδιδυμικό, υποδόριο λευκό και φαιό, λιπώδεις ιστούς. Αρχίσαμε την εξέταση με το σπλαγχνικό λιπώδη ιστό, καθώς είναι γνωστό ότι η αύξησή του σχετίζεται με την παχυσαρκία. Η ανάλυσή μας έδειξε ότι η σχέση της συνολικής μάζας του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού προς το σωματικό βάρος, καθώς και το μέγεθος των λιποκυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντικά ελαττωμένα στους *Rag1*-/-

μύες σε σχέση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Αυτή η παρατήρηση ήταν σε πλήρη συνάφεια με το μικρότερο σωματικό βάρος των Rag1^{-/-} μυών. Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπιδίων έδειξε ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού στους Rag1-^{/-} μύες ανεξάρτητα από τη δίαιτα στην οποία υποβλήθηκαν. Αυτό σημαίνει ότι ο επιδιδυμικός λιπώδης ιστός των Rag1^{-/-} μυών διατηρεί τη δυνατότητά του να καταβολίζει λίπος. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών έδειξαν μεγαλύτερη έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στους Rag1-/μύες. Έτσι φαίνεται ότι ένα μεγάλο μέρος των λιπιδίων που καταναλώνονται από τους *Rag1^{-/-}* μύες καταβολίζεται στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό. Για να αποκλείσουμε ότι ο συγκεκριμένος ιστός έχει αυξημένη αποθήκευση λιπιδίων, εξετάσαμε επίσης το μονοπάτι της λιπογένεσης. Στους μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα η έκφραση των γονιδίων δεν διέφερε μεταξύ των δύο γονοτύπων. Στους *Rag1-/-* μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά η αποθήκευση των λιπιδίων ήταν χαμηλότερη ενώ η λιπόλυση ήταν αυξημένη, πιθανώς σε συνάρτηση με τον αυξημένο ρυθμό οξείδωσης των λιπιδίων. Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι το μονοπάτι της λιπογένεσης στους Rag1^{-/-} μύες δεν είναι ενεργοποιημένο και ότι οι μύες αυτοί περισσότερο καταβολίζουν παρά αποθηκεύουν το λίπος που καταναλώνεται.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον υποδόριο λιπώδη ιστό, καθώς τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, μπορεί να αποκτήσει το φαινότυπο και τις ιδιότητες φαιού λιπώδους ιστού και να καταβολίζει λιπίδια για την παραγωγή θερμότητας¹¹⁶. Ιστολογική εξέταση έδειξε ότι περιοχές φαιοποιημένου-μπεζ ιστού υπήρχαν μεν στο υποδόριο λίπος και στους *Rag1*^{-/-} και στους μύες αγρίου τύπου που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα, αλλά η έκτασή τους ήταν πολύ περισσότερη στους *Rag1*^{-/-} μύες. Αυτό το εύρημα υποστηρίζεται και με την αυξημένη έκφραση γονιδίων δεικτών επαγωγής της φαιοποιημένες-μπεζ περιοχές αλλά όχι της ίδιας έκτασης όπως μετά από σίτιση με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων έδειξε όπως μετά από σίτιση με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων έδειξε ότι τα γονίδια *Cidea* και *Pgc1α*, που είναι δείκτες της

φαιοποίησης, εξακολουθούσαν να είναι αυξημένα στους *Rag1*^{-/-} μύες. Επιπλέον, με χρώση ανοσοφθορισμού, παρατηρήθηκε περισσότερη UCP1 στους *Rag1*^{-/-} μύες. Έτσι καταλήξαμε ότι και ο υποδόριος λευκός λιπώδης ιστός συμβάλλει στον καταβολισμό των επιπλέον λιπιδίων που λαμβάνονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Τέλος εξετάσαμε και το φαιό λιπώδη ιστό, που ως γνωστόν χρησιμοποιεί λιπίδια για την παραγωγή ενέργειας. Η ιστολογική εξέταση του ιστού δεν έδειξε κάποια διαφορά μεταξύ των μυών που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Απεναντίας, στους μύες που σιτίσθηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, οι μύες αγρίου τύπου είχαν πολύ μεγαλύτερα λιποσταγονίδια αποθηκευμένα στα φαιά κύτταρά τους από ότι οι *Rag1*^{-/-} μύες. Σε αντιστοιχία, η έκφραση του *Ucp1* ήταν επίσης μεγαλύτερη στους *Rag1*^{-/-} μύες παρά στους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου.

Συγκεντρωτικά, μετά την εξέταση αυτών των ιστών, και όπως συνοψίζεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 5.1*), οι *Rag1^{-/-}* μύες μπορούν να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικότερα το μεγαλύτερο φορτίο λιπιδίων που καταναλώνεται μέσω αυξημένης οξείδωσης, και έτσι εμποδίζουν την ανάπτυξη της NAFLD καθώς και της ινσουλινοαντοχής.



Εικόνα 5.1: Γραφική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού αντιμετώπισης του αυξημένου φορτίου λιπιδίων. Τα αυξημένα λιπίδια της δίαιτας στους Rag1^{-/-} μύες εισέρχονται στην κυκλοφορία και καταβολίζονται μέσω της οξείδωσής τους από το σπλαγχνικό λευκό λιπώδη ιστό και μέσω θερμογένεσης από το φαιοποιημένο-μπεζ λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. Υποθέτουμε ότι έτσι το ήπαρ προστατεύεται από λιπώδη διήθηση.

Ένα άλλο αναπόσπαστο επακόλουθο της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου είναι η ανάπτυξη φλεγμονής. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, κατά την ανάπτυξη της παχυσαρκίας ο αριθμός και το προφίλ των Τ λεμφοκυττάρων αλλάζει και συνεπώς στρατολογούνται και ενεργοποιούνται μακροφάγα, τα οποία πολώνονται προς το Μ1 προφίλ^{81, 82}. Έτσι αναρωτηθήκαμε τι γίνεται στους Rag1^{-/-} μύες όταν σιτίζονται για μεγάλο διάστημα με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, δεδομένου ότι δεν διαθέτουν λεμφοκύτταρα. Από την ιστολογική ανάλυση του παρατηρήθηκε, επιβεβαιώθηκε ήπατος και από то συνεργαζόμενο παθολογοανατόμο, ότι οι Rag1^{-/-} μύες διέθεταν περισσότερα μακροφάγα από τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση, οι Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με κανονική εργαστηριακή δίαιτα είχαν υψηλότερη έκφραση δεικτών ειδικών για M1 μακροφάγα, F4/80 και CD11c, από τους μύες αγρίου τύπου και επίσης είχαν αύξηση στη Cc/2 που δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα μακροφάγα. Αντίθετα, στους μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, οι δείκτες των Μ1 μακροφάγων δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων, παρόλο που η Cc/2 είχε μεγαλύτερη έκφραση στους Rag1^{-/-} μύες. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα Saa1 και IL-1β ήταν αυξημένα στους *Rag1^{-/-}* μύες ανεξαρτήτως δίαιτας. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι οι Rag1-/- μύες δεν έχουν μεταβολή του, ήδη αυξημένου, αριθμού των μακροφάγων τους, σε αντίθεση με την παρατηρούμενη αύξηση των δεικτών στους μύες αγρίου τύπου. Ο αυξημένος αριθμός μακροφάγων στους Rag1^{-/-} μύες θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αποτελεί αντιστάθμιση στην έλλειψη λεμφοκυττάρων. Αντίστοιχα, η υπερέκφραση των κυτοκινών και άλλων παραγόντων, που συντελούν στην πόλωση των μακροφάγων προς Μ1 ή Μ2 προφίλ, θα μπορούσε να οφείλεται στην έλλειψη παραγόντων που εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα και συμμετέχουν στη διαδικασία αυτής της πόλωσης. Στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στην έκφραση κυτοκινών και ειδικών δεικτών για τα Μ1 ή Μ2 μακροφάγα ανάμεσα στους δύο γονοτύπους μετά από σίτιση με κανονική εργαστηριακή δίαιτα. Στους Rag1^{-/-} μύες που σιτίστηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, υπήρξε σημαντική μείωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, η οποία συνάδει με την αυξημένη έκφραση αδιπονεκτίνης αλλά και με τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης. Οι Μ2 δείκτες δεν παρουσίασαν διαφορές. Αυτά τα δεδομένα είναι σε πλήρη συνάφεια με τον προστατευμένο φαινότυπο

που παρουσιάζουν οι *Rag1^{-/-}* μύες και την ινσουλινοευαισθησία. Σε αντίθεση, οι μύες αγρίου τύπου που δεν μεταβολίζουν αποτελεσματικά τα αυξημένα λιπαρά που προσλαμβάνονται με τη δίαιτα, τα αποθηκεύουν στον αυξανόμενο λιπώδη ιστό, προκαλώντας λιποτοξικότητα και ενεργοποίηση των μακροφάγων που διηθούν τον παχύσαρκο λιπώδη ιστό και συνδράμουν στην ινσουλινοαντίσταση.

Ένας άλλος στόχος της μελέτης μας ήταν να συγκρίνουμε τις επιπτώσεις της απώλειας των λεμφοκυττάρων στη μεταβολική λειτουργία κατά την πρόκληση παχυσαρκίας σε δύο διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα, C57BL/6 και BALB/c. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και στο BALB/c γενετικό υπόβαθρο το σημαντικό ρόλο των λεμφοκυττάρων στη ρύθμιση της χρησιμοποίησης της ενέργειας. Επίσης, σε συμφωνία και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, δείξαμε ότι οι BALB/c μύες αγρίου τύπου έχουν πλέον ισχυρούς μηχανισμούς αντίστασης στην ανάπτυξη παχυσαρκίας από ότι οι C57BL/6 μύες¹³¹. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε BALB/c μύες αγρίου τύπου και Rag1^{-/-} έδειξαν ότι και σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο, αν και η διαφορά στο σωματικό βάρος μεταξύ των μυών δεν ήταν τόσο σημαντική, οι *Rag1^{-/-}* μύες είναι περισσότερο προστατευμένοι από την παχυσαρκία, την ινσουλινοαντίσταση και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος. Η εξήγηση για αυτόν τον προστατευμένο φαινότυπο των BALB/c *Rag1^{-/-}* μυών είναι παρόμοια με εκείνη των αντίστοιχων C57BL/6 μυών. Πιο συγκεκριμένα, και σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο, οι *Rag1^{-/-} μ*ύες παρουσίασαν υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα και παρόμοια κινητικότητα. Η αύξηση του βάρους του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού σε σχέση με το σωματικό βάρος, όπως και το μέγεθος των λιποκυττάρων τους, ήταν μικρότερη στους Rag1-- μύες. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών στους C57BL/6 μύες, η οξείδωση των λιπαρών οξέων στον ιστό αυτό στους *Rag1^{-/-}*μύες φάνηκε να είναι αυξημένη, όπως φάνηκε και από τη μεγαλύτερη έκφραση του Cpt1a. Επιπλέον, και στους BALB/c, αντίστοιχα με τους C57BL/6 μύες ο υποδόριος λιπώδης ιστός περιείχε σημαντικής έκτασης φαιοποιημένες-μπεζ περιοχές εύρημα που στοιχειοθετείται και από την αυξημένη έκφραση της UCP1 μέσω χρώσης ανοσοφθορισμού και αυξημένη έκφραση των γονιδίων Prdm16, Cidea και Pgc1a στους Rag1^{-/-} μύες. Παράλληλα, και στο φαιό λιπώδη ιστό των Rag1^{-/-} μυών η έκφραση της Ucp1 ήταν μεγαλύτερη προς περαιτέρω ισχυροποίηση των ανωτέρω ευρημάτων. Επίσης στον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό των BALB/c *Rag1^{-/-}* μυών η έκφραση M1

προφλεγμονωδών κυτοκινών ήταν χαμηλότερη σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση του Adipoq, όπως και στους C57BL/6 μύες. Έτσι καταλήγουμε ότι ο τρόπος με τον οποίο οι Rag1^{-/-} μύες διαχειρίζονται το αυξημένο φορτίο λιπαρών και προστατεύονται από την ανάπτυξη της παχυσαρκίας, ινσουλινοαντίστασης και λιπώδους διήθησης του ήπατος, είναι παρόμοιος και στα δύο γενετικά υπόβαθρα. Επίσης, οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι το BALB/c γενετικό υπόβαθρο, που χρησιμοποιείται ευρέως σε ανοσολογικές μελέτες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μελέτες που εστιάζονται στο μεταβολισμό. Αυτό βοηθά στην αποφυγή της χρησιμοποίησης αναίτια αυξημένου αριθμού μυών, συνεπικουρώντας στη μείωση του αριθμού των πειραματόζωων, κεντρικό στόχο της ερευνητικής πρακτικής στην Ευρώπη για την επόμενη δεκαετία.

Τα παραπάνω πρωτότυπα ευρήματα συνηγορούν στο σημαντικό ρόλο των λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας και της NAFLD μέσω δράσεων στη χρησιμοποίηση των λιπιδίων στα διαφορετικά αποθέματα λιπώδους ιστού. Τελευταία, πολλές μελέτες ασχολούνται με τη φαιοποίηση του υποδόριου λιπώδους ιστού, με την υπόθεση ότι θα μπορούσε να αποτελέσει φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της επιδημίας της παχυσαρκίας¹⁰⁹. Ήδη έχουν ταυτοποιηθεί παράγοντες όπως η μυοκίνη IRISIN και ο FGF21, που αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους εναντίον της παχυσαρκίας.

Αφού επιβεβαιώσαμε το ρόλο των λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας και της λιπώδους διήθησης του ήπατος, στη συνέχεια θελήσαμε να ταυτοποιήσουμε τον υποπληθυσμό λεμφοκυττάρων, που είναι ο κύριος υπεύθυνος των δράσεών τους. Πρώτα ερευνήσαμε εάν τα ΝΚΤ κύτταρα διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Η επιλογή μας βασίστηκε στο γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα αναγνωρίζουν λιπιδικά αντιγόνα τα οποία τους παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d και απαρτίζουν ένα ήπατος⁹¹. μεγάλο ποσοστό λεμφοκυττάρων TOU Έτσι αρκετά των απενεργοποιήσαμε την πρωτεΐνη αυτή σε μύες αγρίου τύπου για να δούμε εάν, σιτίζοντάς τους με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, θα βελτιωνόταν η παχυσαρκία και η λιπώδης διήθηση του ήπατος. Στο τέλος του πειράματος δεν βρήκαμε διαφορές στο σωματικό βάρος ή στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των διαφορετικών ομάδων θεραπείας. Κατά την ιστολογική εξέταση του ηπατικού ιστού, παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες εκτεταμένη λίπωση και παρόμοιες τιμές ηπατικών τριγλυκεριδίων. Αντίστοιχα ήταν τα ευρήματα και για τα γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον επιδιδυμικό λιπώδη ιστό. Το βάρος του στους μύες που έλαβαν το αντίσωμα ήταν ελαφρά μικρότερο, καθώς και το μέγεθος των κυττάρων, σε σχέση με αυτό των μυών που έλαβαν PBS, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Η γονιδιακή ανάλυση δεν έδειξε διαφορές στα γονίδια που αφορούν στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στα γονίδια που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση. Από τη μελέτη μας συμπεραίνουμε ότι τα ΝΚΤ κύτταρα από μόνα τους δεν μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη της παχυσαρκίας και την επακόλουθη λιπώδη διήθηση του ήπατος. Μελέτες που ερευνούν το ρόλο των κυττάρων αυτών δεν έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα, καθώς έχει περιγραφεί ότι τα ΝΚΤ προωθούν αλλά και σε άλλες μελέτες ότι καταστέλλουν την παθογένεια κατά την παχυσαρκία. Στη μελέτη των Kotas ME et al., χρησιμοποίησαν CD1d^{-/-} μύες, στους οποίους χορηγήθηκε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και βρέθηκε μεγαλύτερη αύξηση στη διήθηση του ήπατος από λιπίδια και μικρότερη ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης. Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι δεν παρουσίασαν διαφορά⁹⁹. Οι διαφορές που καταγράφηκαν σε αυτήν τη μελέτη, αλλά όχι και στη δική μας, πιθανώς να οφείλονται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν CD1d^{-/-} μύες αντί για ουδετεροποίηση της CD1d με αντίσωμα. Όπως έχει δειχθεί από πολλές μελέτες, η γονιδιακή απαλοιφή μορίων του ανοσολογικού συστήματος έχει πολλές φορές αποτέλεσμα αντισταθμιστικές δεν ως αλλαγές που ενεργοποιούνται από ουδετεροποίηση των ίδιων αυτών παραγόντων μέσω χορήγησης αντισωμάτων^{143, 144}. Επιπρόσθετοι λόγοι για τις αναντιστοιχίες στα ευρήματα μεταξύ μελετών είναι η περιεκτικότητα σε λίπος στις διαφορετικές δίαιτες και η χρονική διάρκεια χορήγησής τους. Η μελέτη των Lynch L et al., έδειξε επίσης προστατευτικό ρόλο των ΝΚΤ κυττάρων στην εξέλιξη της παχυσαρκίας. Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν Ja18--- μύες, από τους οποίους λείπουν τα iNKT κύτταρα, τους οποίους σίτισαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά για 8 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση στο σωματικό τους βάρος, στεάτωση και ινσουλινοαντίσταση. Επίσης, θετή μεταφορά iNKT κυττάρων σε παχύσαρκους μύες μείωσε το σωματικό βάρος, καθώς και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος και αύξησε την ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης⁹³. Σε άλλη μελέτη των Wu J *et al.*, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Οι CD1d^{-/-} μύες σιτίστηκαν με δίαιτα υψηλότερης περιεκτικότητας σε λιπαρά από

εκείνη που χρησιμοποιήσαμε εμείς, για 12 εβδομάδες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι *CD1d^{-/-}* μύες κέρδισαν λιγότερο βάρος από τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου, παρόλο που κατανάλωναν παρόμοια ποσότητα τροφής και είχαν παρόμοια κατανάλωση ενέργειας. Επίσης παρατηρήθηκε ότι οι *CD1d^{-/-}* μύες είχαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη και μικρότερη διήθηση του ήπατος¹⁰¹. Τέλος, η μελέτη των Wolf MJ *et al.*, έδειξε ότι τα NKT κύτταρα αυξάνονται στο ήπαρ κατά την εξέλιξη της NAFLD και ότι τα NKT κύτταρα, μέσω της κυτοκίνης LIGHT, βοηθούν στην αποθήκευση λιπιδίων στο ήπαρ, δείχνοντας έτσι ότι διαδραματίζουν έναν μη προστατευτικό ρόλο. Τα δικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι η απενεργοποίηση των NKT κυττάρων δεν επηρεάζει την παθογένεση της παχυσαρκίας και την εξέλιξη της λιπώδους διήθησης του ήπατος, στη δεδομένη χρονική διάρκεια του πειράματος. Οι μελέτες στις οποίες αναφερθήκαμε είναι μέρος από την πληθώρα μελετών που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα. Έτσι, παραμένει να διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος αυτών των κυττάρων στην εξέλιξη της νόσου.

Τέλος, αποφασίσαμε να εξετάσουμε το ρόλο των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων στην παχυσαρκία και στην εξέλιξη της λιπώδους διήθησης του ήπατος. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός αυτών των κυττάρων αυξάνεται κατά την εξέλιξη και εδραίωση της παχυσαρκίας στο λιπώδη ιστό, ειδικά σε σχέση με τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα, που είναι γνωστά για την κατασταλτική τους δράση στις φλεγμονώδεις καταστάσεις^{82, 84}. Ειδικότερα, η μελέτη των Nishimura S et al., έδειξε ότι ο επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός διηθείται πρώτα από CD8⁺ T λεμφοκύτταρα και κατόπιν από μακροφάγα, υποδεικνύοντας έτσι ότι η ομάδα αυτή παίζει πρωταρχικό ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία που χαρακτηριστικά αναπτύσσεται λόγω παχυσαρκίας⁸¹. Έτσι μελετήσαμε το ρόλο τους στην παχυσαρκία, καθώς και τις επιπτώσεις θετής μεταφοράς αυτών των κυττάρων σε Rag1^{-/-} μύες που σιτίζονταν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, στην εξέλιξη της λιπώδους διήθησης του ήπατος και στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Αφού πρώτα επιβεβαιώσαμε με χρώση ανοσοφθορισμού ότι τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα που χορηγήθηκαν εξωγενώς διήθησαν το ήπαρ, εξετάσαμε και την ιστολογική εικόνα του ήπατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από 4 εβδομάδες σίτισης με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, οι μύες αγρίου τύπου παρουσίαζαν μικρής έκτασης μακροφυσαλιδώδη λίπωση ενώ οι Rag1^{-/-} μύες δεν παρουσίασαν σημεία διήθησης από λιπίδια. Οι *Rag1*-/- μύες στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων ανέπτυξαν επίσης μικροφυσαλιδώδη λίπωση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με μέτρηση των τριγλυκεριδίων του ήπατος όπου φαίνεται ότι οι *Rag1*-/- μύες, στους οποίους έγινε θετή μεταφορά CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, είχαν στατιστικά σημαντική αύξηση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ σε σχέση με τους *Rag1*-/- μύες της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με αυτά της μελέτης των Wolf MJ *et al.*, που έκαναν ουδετεροποίηση των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων με αντίσωμα σε μύες αγρίου τύπου που σιτίζονταν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Μετά από 4 και 8 εβδομάδες χορήγησης του αντισώματος, παρατηρήθηκε βελτίωση της βλάβης που είχε υποστεί το ήπαρ, όπως έδειξαν μετρήσεις των επιπέδων της ALT⁸⁴.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό, που φάνηκε στα αρχικά πειράματα να επηρεάζεται περισσότερο από τη δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Στο πείραμά μας φάνηκε ότι η αύξηση του σωματικού βάρους των μυών που έλαβαν τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα σε σχέση με τους *Rag1^{-/-}* μύες οφειλόταν στην αύξηση του επιδιδυμικού λευκού λιπώδους ιστού. Το μέγεθος των λιποκυττάρων ήταν επίσης μεγαλύτερο στους μύες που έλαβαν τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση είχε τάση μείωσης στους μύες που έλαβαν τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην οξείδωση είχε τάση μείωσης στους μύες που έλαβαν τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα, πιθανώς λόγω του περιορισμένου χρόνου που διήρκεσε η θετή μεταφορά των CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα δρουν επιβαρυντικά στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας και την εξέλιξη της λιπώδους διήθησης του ήπατος ακόμα και όταν η δράση τους είναι βραχύχρονη, όπως συνοψίζεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 5.2*).



Εικόνα 5.2: Γραφική αναπαράσταση της επίπτωσης της θετής μεταφοράς των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε Rag1^{-/-} μύες που σιτίζονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι η απουσία των λεμφοκυττάρων στους μύες, δημιουργεί ένα πιο ευνοϊκό περιβάλλον για αντίσταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και των επακόλουθων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων και της ινσουλινοαντίστασης και της λιπώδους διήθησης του ήπατος. Αυτό επιτυγχάνεται με την αποδοτικότερη διαχείριση των λιπιδίων στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό, όπου αυξάνεται η οξείδωσή τους και μειώνεται η λιπογένεση αλλά και στο φαιοποιημένο-μπεζ υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό, όπου λιπιδία тα χρησιμοποιούνται για την κατανάλωση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας. Τέλος, από τα πειράματά μας φαίνεται ότι τα ΝΚΤ κύτταρα δεν διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην εξέλιξη και παθογένεια της παχυσαρκίας. Απεναντίας, τα CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα φάνηκε να ενισχύουν σημαντικά τις επιπλοκές που συνεπάγονται της παχυσαρκίας, συμπεριλαμβανομένης της λιπώδους διήθησης του ήπατος.

Τα ευρήματά μας είναι πρωτότυπα και υπογραμμίζουν την πιθανότητα σημαντικής συνεισφοράς διακριτών ομάδων κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος σε νέα θεραπευτικά σχήματα για την παχυσαρκία και την ηπατική στεάτωση, στο πλαίσιο των ευρέως αναπτυσσόμενων ανοσοθεραπειών. Στο μέλλον θα έχει ενδιαφέρον να αναπτυχθούν τρόποι με τους οποίους θα μπορούσε να ενισχυθεί η ανάπτυξη φαιοποιημένων-μπεζ περιοχών στον υποδόριο λευκό λιπώδη ιστό, αφού βέβαια επιβεβαιωθούν τα ευρήματά μας και στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό. Οι ευρέως διαδεδομένες προσπάθειες για ανάπτυξη νέων σχημάτων ανοσοθεραπειών πιστεύουμε ότι θα έχουν εφαρμογές και στην ηπατική στεάτωση και στετοηπατίτιδα, αλλά και στην παχυσαρκία, με σοβαρές πιθανότητες ανεύρεσης νέων θεραπειών.

6. Βιβλιογραφία

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB and Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980; 55: 434-8.

2. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017; 37 Suppl 1: 81-4.

3. Zois CD, Baltayiannis GH, Bekiari A, et al. Steatosis and steatohepatitis in postmortem material from Northwestern Greece. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 3944-9.

4. Targher G and Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 235-40.

5. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*. 2002; 346: 1221-31.

6. Adams LA and Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005; 22: 1129-33.

7. Yu AS and Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Reviews in gastroenterological disorders*. 2002; 2: 11-9.

8. Ramesh S and Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 2005; 42 Suppl: S2-12.

9. Sanal MG. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease-the emperor has no clothes? *World J Gastroenterol*. 2015; 21: 3223-31.

10. Cortez-Pinto H and Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): diagnosis and clinical course. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2004; 18: 1089-104.

11. Wieckowska A, McCullough AJ and Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology*. 2007; 46: 582-9.

12. Joseph AE, Saverymuttu SH, al-Sam S, Cook MG and Maxwell JD. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clinical radiology*. 1991; 43: 26-31.

13. Kim CH and Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2008; 75: 721-8.

14. Nonomura A, Enomoto Y, Takeda M, et al. Clinical and pathological features of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2005; 33: 116-21.

15. Cohen JC, Horton JD and Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011; 332: 1519-23.

Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol.* 2007; 20 Suppl 1: S40-8.
 Mofrad PS and Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease. *MedGenMed.* 2003;

5: 14.

18. Brunt EM and Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 5286-96.

19. Reddy JK and Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G852-8.

20. Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM and Mulder CJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 2474-86.

21. European Association for Study of L and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of hepatology*. 2015; 63: 237-64.

22. Kato K, Takamura T, Takeshita Y, et al. Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic fatty liver disease. *PloS one*. 2014; 9: e92170.

23. Postic C and Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 829-38.

24. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD and Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115: 1343-51.

25. Tamura S and Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115: 1139-42.

26. Goldberg IJ, Eckel RH and Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research*. 2009; 50 Suppl: S86-90.

27. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K and Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews*. 2002; 23: 201-29.

28. Ginsberg HN, Zhang YL and Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of medical research*. 2005; 36: 232-40.

29. Kawano Y and Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*. 2013; 48: 434-41.

30. Shimomura I, Bashmakov Y and Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 1999; 274: 30028-32.

31. Sanders FW and Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016; 91: 452-68.

32. Uyeda K and Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006; 4: 107-10.

33. Fabbrini E, Sullivan S and Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010; 51: 679-89.

34. Wanders RJ, Komen J and Kemp S. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS journal*. 2011; 278: 182-94.

35. Forbes JM and Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*. 2013; 93: 137-88.

36. Rakhshandehroo M, Knoch B, Muller M and Kersten S. Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha target genes. *PPAR research*. 2010; 2010.

37. Vega RB, Huss JM and Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology*. 2000; 20: 1868-76.

38. Mandard S, Muller M and Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004; 61: 393-416.
39. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999; 98: 115-24.

40. Ginsberg HN and Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *Journal of lipid research*. 2009; 50 Suppl: S162-6.

41. Day CP and James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998; 114: 842-5.

42. Buzzetti E, Pinzani M and Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016; 65: 1038-48.

43. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL and Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995; 95: 2409-15.

44. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H and Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116: 3015-25.

45. Heilbronn LK and Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Current pharmaceutical design*. 2008; 14: 1225-30.

46. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 112: 1821-30.

47. Gregor MF and Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*. 2011; 29: 415-45.

48. Olefsky JM and Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010; 72: 219-46.

49. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ and Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011; 11: 85-97.

50. Reilly SM and Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017.

51. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007; 282: 35279-92.

52. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011; 17: 179-88.

53. Rosen ED and Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014; 156: 20-44.

54. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116: 115-24.

55. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ and Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*. 2012; 61: 346-54.

56. Nati M, Haddad D, Birkenfeld AL, Koch CA, Chavakis T and Chatzigeorgiou A. The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Rev Endocr Metab Disord*. 2016; 17: 29-39.

57. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H and Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; 302: G1310-21.

58. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, et al. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* 2006; 4: 13-24.

59. Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab.* 2013; 17: 851-9.

60. Claria J, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Rius B and Titos E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Frontiers in immunology*. 2011; 2: 49.

61. Sica A and Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122: 787-95.

62. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2008; 7: 496-507.

63. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008; 7: 485-95.

64. Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*. 2010; 51: 511-22.

65. Liu J, Divoux A, Sun J, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009; 15: 940-5.

66. Chmelar J, Chatzigeorgiou A, Chung KJ, et al. No Role for Mast Cells in Obesity-Related Metabolic Dysregulation. *Frontiers in immunology*. 2016; 7: 524.

67. Gutierrez DA, Muralidhar S, Feyerabend TB, Herzig S and Rodewald HR. Hematopoietic Kit Deficiency, rather than Lack of Mast Cells, Protects Mice from Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2015; 21: 678-91.

68. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*. 2012; 18: 1407-12.

69. Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, et al. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2009; 175: 1473-82.

70. Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117: 175-84.

71. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011; 332: 243-7.

72. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*. 2014; 157: 1292-308.

73. Ronnblom L and Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus*. 2008; 17: 394-9.

74. Chen Y, Tian J, Tian X, et al. Adipose tissue dendritic cells enhances inflammation by prompting the generation of Th17 cells. *PloS one*. 2014; 9: e92450.
75. Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St Clair J, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 2009; 119: 3213-25.

76. Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, et al. Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2013; 58: 589-602.

77. Hoyler T, Klose CS, Souabni A, et al. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity*. 2012; 37: 634-48.

78. Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2013; 210: 535-49.

79. Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*. 2014.

80. Sell H, Habich C and Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8: 709-16.

81. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; 15: 914-20.

82. Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009; 15: 921-9.

83. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007; 115: 1029-38.

84. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*. 2014; 26: 549-64.

85. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009; 15: 930-9.

86. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *Journal of immunology*. 2010; 185: 1836-45.

87. Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR and Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia*. 2012; 55: 2583-92.

88. Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012; 143: 765-76 e3.

89. Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashino K and Taniguchi M. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *International immunology*. 1995; 7: 1157-61.

90. Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L and Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*. 2002; 296: 553-5.

91. Exley MA and Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology*. 2004; 40: 1033-40.

92. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, et al. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010; 30: 193-9.

93. Lynch L, Nowak M, Varghese B, et al. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity*. 2012; 37: 574-87.

94. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ and Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews Immunology*. 2004; 4: 231-7.

95. Godfrey DI and Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1ddependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 114: 1379-88.

96. Li Z, Soloski MJ and Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 42: 880-5.

97. Ma X, Hua J and Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *Journal of hepatology*. 2008; 49: 821-30.

98. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DG and O'Farrelly C.
Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European journal of immunology*. 2009; 39: 1893-901.
99. Kotas ME, Lee HY, Gillum MP, et al. Impact of CD1d deficiency on metabolism. *PloS one*. 2011; 6: e25478.

100. Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U and Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology*. 2000; 31: 633-40.

101. Wu L, Parekh VV, Gabriel CL, et al. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: E1143-52.

102. Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259: 87-91.

103. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF and Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; 271: 665-8.

104. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001; 293: 1673-7.

105. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; 420: 333-6.

106. de Luca C and Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008; 582: 97-105.

107. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y and Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007; 148: 241-51.

108. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D and Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of lipid research*. 2012; 53: 619-29.

109. Harms M and Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013; 19: 1252-63.

110. Wu J, Cohen P and Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013; 27: 234-50.

111. Seale P and Lazar MA. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes*. 2009; 58: 1482-4.

112. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*. 2009; 360: 1509-17.

113. Enerback S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab.* 2010; 11: 248-52.

114. Seale P, Conroe HM, Estall J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121: 96-105.

115. Lepper C and Fan CM. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. 2010; 48: 424-36.

116. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012; 150: 366-76.

117. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H and Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* 2012; 16: 348-62.

118. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2009; 297: E977-86.

119. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2010; 298: E1244-53.

120. Wang QA, Tao C, Gupta RK and Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013; 19: 1338-44.

121. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP and Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* 2012; 15: 480-91.

122. Seale P, Kajimura S and Spiegelman BM. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev*. 2009; 23: 788-97.

123. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012; 26: 271-81.

124. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481: 463-8.

125. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122: 1022-36.

126. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*. 2015; 160: 74-87.

127. Rao RR, Long JZ, White JP, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014; 157: 1279-91.

128. Fischer K, Ruiz HH, Jhun K, et al. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat Med*. 2017; 23: 623-30.

129. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K and Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004; 22: 460-6.

130. Waller-Evans H, Hue C, Fearnside J, et al. Nutrigenomics of high fat diet induced obesity in mice suggests relationships between susceptibility to fatty liver disease and the proteasome. *PloS one*. 2013; 8: e82825.

131. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013; 56: 1129-39.

132. Resource M-AM. The hemocytometer (counting chamber). 2014.

133. Tek-Event. Neubauer Sperm counting chamber. 2014.

134. Clodrosome EN-. Animal Injection - Intravenous Adminisitration (retro-orbital). 2014.

135. QIAGEN. RT² SYBR Green qPCR Master Mixes. 2014.

136. Hoopes L. Genetic Diagnosis: DNA Microarrays and Cancer. *Nature Education*. 2008; 1: 3.

137. Godfrey DI, McCluskey J and Rossjohn J. CD1d antigen presentation: treats for NKT cells. *Nat Immunol*. 2005; 6: 754-6.

138. Lewin SM, Mehta N, Kelley RK, Roberts JP, Yao FY and Brandman D. Liver transplantation recipients with nonalcoholic steatohepatitis have lower risk hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2017; 23: 1015-22.

139. Bhattacharjee J, Kumar JM, Arindkar S, et al. Role of immunodeficient animal models in the development of fructose induced NAFLD. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014; 25: 219-26.

140. Zeisel SH and Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1994; 14: 269-96.

141. Liu X, Huh JY, Gong H, et al. Lack of mature lymphocytes results in obese but metabolically healthy mice when fed a high-fat diet. *International journal of obesity*. 2015; 39: 1548-57.

142. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M and Bouloumie A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 384: 482-5.

143. Campbell IK, O'Donnell K, Lawlor KE and Wicks IP. Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 107: 1519-27.

144. Feldmann M and Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annual review of immunology*. 2001; 19: 163-96.
Original Research

Strain-specific Differences in the Effects of Lymphocytes on the Development of Insulin Resistance and Obesity in Mice

Elisavet Kodela,^{1,2} Maria Moysidou,^{1,2} Sevasti Karaliota,¹ Yassemi Koutmani,¹ Panagiotis Tsakanikas,¹ Konstantia Kodella,¹ Eleni A Karavia,⁴ Kyriakos E Kypreos,⁴ Nikolaos Kostomitsopoulos,^{1,*} and Katia P Karalis^{1,3}

Obesity is characterized as a chronic, low-grade inflammatory disease owing to the infiltration of the adipose tissue by macrophages. Although the role of macrophages in this process is well established, the role of lymphocytes in the development of obesity and metabolism remains less well defined. In the current study, we fed WT and $Rag1^{-/-}$ male mice, of C57BL/6J and BALB/c backgrounds, high-fat diet (HFD) or normal diet for 15 wk. Compared with WT mice, $Rag1^{-/-}$ mice of either of the examined strains were found less prone to insulin resistance after HFD, had higher metabolic rates, and used lipids more efficiently, as shown by the increased expression of genes related to fatty acid oxidation in epidydimal white adipose tissue. Furthermore, $Rag1^{-/-}$ mice had increased Ucp1 protein expression and associated phenotypic characteristics indicative of beige adipose tissue in subcutaneous white adipose tissue and increased Ucp1 expression in brown adipose tissue. As with inflammatory and other physiologic responses previously reported, the responses of mice to HFD show strain-specific differences, with increased susceptibility of C57BL/6J as compared with BALB/c strain. Our findings unmask a crucial role for lymphocytes in the development of obesity and insulin resistance, in that lymphocytes inhibit efficient dissipation of energy by adipose tissue. These strain-associated differences highlight important metabolic factors that should be accommodated in disease modeling and drug testing.

Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; epiWAT, epididymal WAT; HFD, high-fat diet; ITT, insulin tolerance testing; ND, normal diet; *Rag1^{-/-}*, recombination-activating gene 1 knockout; scWAT, subcutaneous WAT; WAT, white adipose tissue; UCP1, uncoupling protein 1

Obesity has been evolved to an epidemic with its incidence among adults and children rising globally. Several of the leading causes of death in developed countries, such as cardiovascular diseases and cancer are included in the comorbidities of obesity and the associated development of insulin resistance.31,32 Numerous studies have demonstrated that obesity is a chronic, low-grade, inflammatory disease.^{14,23} It has been well established that the hypertrophic white adipose tissue (WAT) activates the resident immune cells to secrete chemokines that promote the infiltration of WAT by a plethora of circulating immune cells such as macrophages, dendritic cells, mast cells, neutrophils, eosinophils and type 2 innate lymphoid cells.^{20,22,25,36,37,43} Recent evidence implicates the cells of the adaptive immune system, particularly CD8+, CD4+ T cells and regulatory T cells, in the pathogenesis of obesityassociated inflammation and insulin resistance.4,10,30,41,42 However, the exact contribution of lymphocytes in the cascade of events leading to dysregulation of energy utilization in obesity remains to be elucidated.^{1,21,41} Emerging evidence demonstrates the critical role of the interaction between the immune system and metabolism in disease development,^{1,30,41} making the characterization of the metabolic activity of the different mouse strains used in research imperative for the successful interpretation and translation of preclinical findings to human studies.

In this study, we investigated the role of lymphocyte deficiency in the strain-specific development of obesity. For this reason, we compared BALB/c mice, one of the most commonly used strains for immunology and inflammation- related studies, and C57BL/6J mice, the most widely used mouse strain in disease modeling, strains. Furthermore, to assess the role of lymphocytes in obesity, we used male WT mice and a line that lacks mature B and T lymphocytes, Rag1^{-/-} mice,²⁶ from both strains in a standard experimental manipulation for inducing body weight gain, adipose tissue expansion, and the development of insulin resistance due to the administration of high-fat diet (HFD, 45% kcal fat) for 4 mo. Similar to the well-described immune response,33 metabolic activity shows considerable strain-dependent variability, which most likely underlies the discrepancies among the results of similarly designed studies, 1,27,40 that has not been addressed yet to our knowledge. Our findings show that the C57BL/6J strain is prone to diet-induced obesity and insulin resistance, whereas BALB/c mice27 are affected much less, thus demonstrating another strain-specific difference in physiologic responses, which

Received: 04 May 2017. Revision requested: 06 Jun 2017. Accepted: 02 Aug 2017. ¹Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Clinical Experimental Surgery & Translational Research, Athens, Greece;²University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece;³Endocrine Division, Boston Children's Hospital, Boston, Massachuttes;⁴Department of Pharmacology, University of Patras Medical School, Patras, Greece.

^{*}Corresponding author. Email: nkostom@bioacademy.gr

are important to consider in preclinical studies and drug development.

Materials and Methods

The study was performed in the laboratory animal facility of the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (Athens, Greece). The facility is registered as a 'breeding' and 'user' establishment according to the Greek Presidential Decree 56/2013, which harmonizes Greek national legislation on animal experimentation with the European Community Directive 2010/63 on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Animals. Male mice of $Rag1^{-/-}$ genotype on a C57BL/6 or BALB/c background were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). WT C57BL/6J and BALB/c mice were provided by the animal facilities at the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens. Mice were allocated randomly into experimental groups for each genotype. All animals were group-housed in IVC (1284L, Blue Line Sealsafe, Tecniplast, Buguggiate, Italy) in the same animal room, which was supplied with HEPA-filtered air at 15 air-changes hourly at a temperature of 22 ± 2 °C, relative humidity of $55\% \pm 10\%$, a 12:12-h light:dark cycle (lights on, 0700), light intensity of 300 lx at 1 m above the floor in the middle of the room, and positive air pressure of 0.6 Pa within the room. Room conditions were monitored continuously through the central Building Management System of the animal facility. The mice had unrestricted access to water and either HFD, consisting of 45% of calories from fat (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ), or normal diet (ND; 4RF21, Mucedola, Milan, Italy) for 15 or 16 wk, respectively. All mice in the animal facility were screened regularly by using a health-monitoring program, in accordance to the Federation of European Laboratory Animal Science Association and were free from a wide range of pathogens.9 At the end of the experiment, mice were euthanized by cervical dislocation. All experimental procedures reported here were approved by the competent veterinary authority of the Prefectures of Athens in accordance with the National Registration (Presidential Decree 56/2013) in harmonization to the European Directive 63/2010.

Histologic analysis. Tissues were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde and processed for routine paraffin histology. Paraffin-embedded tissues were sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin, according to standard protocol. Adipocyte cell size was measured by using automated Mat-Lab-based software developed in our lab. For immunohistochemistry, the tissues were incubated with 0.1% w/v Pronase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 37 °C for 8 min, washed, and blocked with PBS containing 10% normal goat serum and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), followed by overnight incubation at 4 °C with the primary antibodies. UCP1 was detected by using rabbit antiUCP1 antibody (dilution, 1:500; ab10983, Abcam, Cambridge, United Kingdom). After several washes with PBS, the tissue was incubated for 2 h with the secondary antibody, AlexaFluor 488-labeled donkey antirabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Braintree, MA). Another washing step was followed by incubation in 4,6-diamidin-2-phenylindol and further washes before the sections were mounted by using Vectashield mounting medium (Vector Labs, Burlingame, CA).

Indirect calorimetry. Metabolic measurement was performed by using an indirect calorimetry system (Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, OH). In short, mice were singly housed for 2 d for acclimation, weighed, and then housed individually in specifically designed calorimeter chambers with unrestricted access to diet and water for 72 h under a 12:12-h light:dark cycle and ambient temperature of 22 °C. Metabolic parameters (VO₂, VCO₂, and rates) were determined at system settings of an air flow of 0.6 L/min and sample flow rate of 0.5 L/min. The system was calibrated against a standard gas mixture to measure O₂ consumed (that is, VO₂, mL/kg/h) and CO₂ generated (VCO₂, mL/kg/h). Metabolic rate, respiratory quotient (ratio of VCO₂/VO₂, RER), and activity (counts) were evaluated over a 48-h period.

Quantitative real-time RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from tissues by using TRI reagent (Sigma-Aldrich) and was treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX). cDNA was made from 2 µg total RNA by using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and was initiated from random hexamer primers (Life Technologies, Waltham, MA). Quantitative real-time PCR analysis was performed using RT² SYBR Green qPCR Master Mix (SA Biosciences, Frederick, MD) in a Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Primers used for real-time PCR analysis were: actin (forward, 5' CCC AGG CAT TGC TGA CAG G 3'; reverse, 5' TGG AAG GTG GAC AGT GAG GC 3'); Pgc1a (forward, 5' TCA CCC TCT GGC CTG ACA AAT CTT 3'; reverse, 5' TTT GAT GGG CTA CCC ACA GTG TCT 3'); Lipe (forward, 5' AAG GAC TTG AGC AAC TCA GA 3'; reverse, 5' TTG ACT ATG GCT GAC GTG TA 3'); Ucp1 (forward, 5' TCT TCT CAG CCG GAG TTT CAG CTT 3'; reverse, 5' ACC TTG GAT CTG AAG GCG GAC TTT 3'); Cidea (forward, 5' ATC ACA ACT GGC CTG GTT ACG 3'; reverse, 5' TACTACCCGGTGTCCATTTCT 3'); Prdm16 (forward, 5' CAG CAC GGT GAA GCC ATT C 3'; reverse, 5' GCG TGC ATC CGC TTG TG 3'); Dgat (forward, 5' TCA TGG GTG TCT GTG GGT TA 3'; reverse, 5' CAG AGT GAA ACC AGC CAA CA 3'); Cpt1a (forward, 5' GTC AAG CCA GAC GAA GAA CA 3'; reverse, 5' CGA GAA GAC CTT GAC CAT AG 3'); Adipoq (forward, 5' GGA GAT GCA GGT CTT CTT G 3'; reverse, 5' TTC TCC AGG CTC TCC TTT 3'); Tnfα (forward, 5' TCT CAT GCA CCA CCA TCA AGG ACT 3'; reverse, 5' ACC ACT CTC CCT TTG CAG AAC TCA 3'), iNOS (forward, 5' CAG AGG ACC CAG AGA CAA GC 3'; reverse, 5' CCT GGC CAG ATG TTC CTC TA 3'); and IL6 (forward, 5' TCC AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA 3'; reverse, 5' TAA GCC TCC GAC TTG TGA AGT GGT 3'). Gene expression levels were normalized to actin and calculated according to the $2^{-}\Delta\Delta^{Ct}$ method.

Glucose tolerance testing. For glucose tolerance testing, mice were fasted overnight. The next morning, glucose levels in tail blood were measured by using a standard glucometer (Contour XT, Bayer, IN) before and at timed intervals (0, 15, 30, 60 and 120 min) after intraperitoneal injection of D-glucose (2 g/kg; Gibco, Grand Island, NY).

Insulin tolerance testing. After a 5-h fast, mice were injected with insulin (1U/kg IP; Sanofi Aventis, Somerset, NJ). Glucose concentrations in blood collected from the tail vein at 0, 15, 30, 60 and 120 min after insulin injection were measured by using a handheld glucometer (Contour XT, Bayer, IN).

Measurement of plasma total cholesterol and triglyceride contents. Mice were fasted for 16 h, after which the cholesterol and triglyceride contents in serum collected from all mice were measured as described previously.¹⁵

Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm SEM. Differences were analyzed by using unpaired 2-tailed *t* tests (for single comparisons) or 2-way ANOVA with repeated measures followed by post hoc Bonferroni multiple-comparison tests by using Prism (version 5.00, GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Effect of lymphocyte deficiency on HFD-induced adiposity. Age-matched C57BL/6J WT and *Rag1^{-/-}* male mice were



Figure 1. Effects of lymphocyte deficiency on HFD-induced obesity. (A) Body weights of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed ND or HFD for 15 wk. (B) Food intake as measured by indirect calorimetry over 72 h. (C) Epididymal fat pad weight adjusted to body weight of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed ND or HFD for 15 wk. (D) Representative histology (hematoxylin and eosin stain; scale bar, 100 µm) and (E) relative cell size of epiWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. Circulating levels of (F) fasting cholesterol and (G) triglycerides. (H) Expression of *Adipoq* gene in epiWAT. (I) Expression of inflammatory cytokine genes in the epiWAT. Data were analyzed by repeated-measures ANOVA and posthoc multiple comparison tests or *t* tests. Data are expressed as mean ± SEM; *, P < 0.05; †, P < 0.01; ‡, P < 0.001; n = 3 to 5 mice per group.

maintained on HFD for 15 wk. The patterns of the body weight gain were indistinguishable between the 2 genotypes during the first 6 wk of HFD feeding (Figure 1 A) but began to lag thereafter in the *Rag1*-/- mice despite their similar food intake (Figure 1 B) as measured by indirect calorimetry. The differences in body weight between the 2 genotypes became significant (*P* < 0.001) after 3 mo of HFD (Figure 1 A). The weight gain of the respective (control) groups on ND was comparable between the 2 genotypes throughout the study (Figure 1 A). As suggested by the differences in body weight, the ratio of epididymal WAT (epiWAT) to body weight was lower (*P* < 0.001) in the *Rag1*-/- mice as compared with their WT counterparts at the end of the experiment (Figure 1 C). The decreased mass of the epiWAT depot together with the smaller adipocyte size in *Rag1*-/- mice (*P* < 0.001; Figure 1 D and E) indicate compromised energy storage

in the WAT. This result might be due to more efficient utilization of excess energy, unmasked by the hypercaloric diet (Figure 1 C through E). In line with this hypothesis, fasting cholesterol and triglyceride levels in the circulation showed a trend toward lower values in $Rag1^{-/-}$ mice (P = 0.08 and P = 0.12, respectively; Figure 1 F and G), whereas the adiponectin expression in their epiWAT was significantly higher (P < 0.001) than in WT controls (Figure 1 H). As expected, the expression of inflammatory cytokines was significantly lower (P < 0.05) in the epiWAT of $Rag1^{-/-}$ mice than in WT controls (Figure 1 I), in further support of the protective $Rag1^{-/-}$ phenotype against the development of HFD-induced obesity and associated endpoints.

Effects of lymphocyte deficiency on insulin sensitivity. To assess insulin sensitivity, we conducted glucose tolerance testing at experimental week 8. Whereas C57BL/6J WT mice exhibited

Vol 68, No 1 Comparative Medicine February 2018



Figure 2. Effects of lymphocyte deficiency on insulin sensitivity and metabolic parameters. (A) Glucose tolerance test of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed a ND or HFD for 8 wk. (B) Insulin tolerance test of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed a ND or HFD for 14 wk. Data were analyzed by repeated measures ANOVA and posthoc multiple comparison tests. Data are expressed as mean ± SEM; *, P < 0.05; †, P < 0.01; ‡, P < 0.001; n = 3 or 4 mice per group. (C through G) Measurement of metabolic characteristics over 48 h in WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed HFD. (C), VO₂. (D) VCO₂. (E) Respiratory quotient (RER). (F) Metabolic rate. (G) Total activity (G). Data were analyzed by *t* test and are expressed as mean ± SEM; *, P < 0.05; †, P <

elevated blood glucose levels at 2 h after glucose administration, $Rag1^{-/-}$ mice had much better (P < 0.001) tolerance to the glucose challenge (Figure 2 A). In the same manner, $Rag1^{-/-}$ HFD fed mice exhibited a much better (P < 0.05) response to insulin over the course of insulin tolerance testing (ITT) than their WT counterparts (Figure 2 B).

Metabolic activity in lymphocyte-deficient mice. Next, we used indirect calorimetry to assess differences in the metabolic phenotypes of C57BL/6J WT and $Rag1^{-/-}$ mice. In agreement with the earlier-described findings, $Rag1^{-/-}$ mice showed increased (P < 0.05) oxygen consumption (Figure 2 C) and carbon dioxide production (Figure 2 D) despite their similar food intake (Figure 1 B) and motor behaviors (Figure 2 G) to those of the WT mice. In addition, RER tended to be slightly lower in the $Rag1^{-/-}$ mice (P = 0.08; Figure 2 E), indicating the preferential use of fatty acids instead of carbohydrates as the primary energy source. In addition, the metabolic rate was higher (P < 0.05) in $Rag1^{-/-}$ mice than WT mice (Figure 2 F).

Effects of lymphocyte deficiency on lipid storage in WAT and dissipation of energy. To gain insight into why $Rag1^{-/-}$ mice on HFD are protected from the development of insulin resistance and obesity, we first assessed lipid metabolism in their various WAT depots. Gene expression profiling identified increased (P < 0.05) expression of genes involved in lipid oxidation and lipolysis in the $Rag1^{-/-}$ epiWAT depot compared with the WT tissue (Figure 3 A). Furthermore, the reduced (P < 0.05) expression of

diglyceride acyltransferase in *Rag1*^{-/-} mice (Figure 3 A) might be directly linked to their resistance to the development of obesity.

We then examined the subcutaneous WAT (scWAT) depot of the *Rag1^{-/-}* mice, a fat depot that demonstrates plasticity, in that it shifts from energy storage to energy dissipation through the development of areas of 'beige fat,' which is rich in mitochondria.^{5,13,44} Histologic analysis of scWAT revealed smaller adipocytes that stained strongly positive with a specific antiUCP1 antibody, in the *Rag1^{-/-}* but not in the WT tissue (Figure 3 B i and ii). This staining pattern characterizes the induction of beige adipogenesis, indicative of the increased tissue content in adipocytes capable of increased energy utilization.^{29,34} The upregulation (*P* < 0.05) of genes that are highly expressed in beige adipocytes, such as cell death-inducing DFFA-like effector α (*Cidea*) and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (*Pgc1a*), in *Rag1^{-/-}* compared with WT scWAT (Figure 3 C) was in line with the histologic findings.

Lastly, we analyzed the BAT depot, because changes in BAT activity can profoundly affect body weight and alter glucose homeostasis.⁸ As anticipated, lipid droplets were smaller (P < 0.05) in $Rag1^{-/-}$ adipocytes than in WT cells (Figure 3 D). In agreement with this phenotype, Ucp1 expression was upregulated (P < 0.05) in the BAT of $Rag1^{-/-}$ HFD-fed mice, in line with increased thermogenic capacity, compared with that in WT controls (Figure 3 E).



Figure 3. Lymphocyte deficiency favors the dissipation of energy in the various adipose depots. (A) Expression of genes associated with fatty acid oxidation, lipogenesis, and lipolysis in the epiWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. Data were analyzed by *t* test. (B) Representative hematoxylin and eosin (i; scale bar, 100 µm) and UCP1 staining (ii; scale bar, 50 µm) of scWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (C) Expression of beige genes in the scWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice placed on HFD. (D) Representative hematoxylin and eosin staining (scale bar, 100 µm) of brown adipose tissue (BAT) in WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (E) Expression of Ucp1 in the BAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. Data were analyzed by *t* test and are expressed as mean \pm SEM; *, *P* < 0.05; *n* = 3 to 5 mice per group.

Strain-associated differences in the responses of *Rag1^{-/-}* mice to HFD. As discussed earlier, *Rag1^{-/-}* mice are primarily used in modeling autoimmune and specific infectious or inflammatory processes. For these purposes, the BALB/c strain is selected, due to its demonstrated sensitivity to immune challenge and its Th2-biased responses.³³ A prime example of this bias comes from studies on asthma and other allergic responses.^{6,12} In addition, BALB/c mice are relatively resistant to the development of HFD-induced obesity.^{27,38} Given our findings from the C57BL/6J *Rag1^{-/-}* mice, we decided to compare their responses to HFD with those of BALB/c *Rag1^{-/-}* mice and assess whether the previously shown differing sensitivity to immune challenges extends to their responses to HFD (Figure 4).

By the end of the experiment, WT ND mice had gained $0.1\% \pm 1\%$ and $Rag1^{-/-}$ ND mice $4.3\% \pm 4.0\%$ in body weight (Figure

4 A), whereas WT HFD mice gained 19.8% ± 3.2% and *Rag1*^{-/-} HFD 12.0% ± 2.0% (Figure 4 B). The slight decrease in body weight at the end of the experiment likely is related to ITT, a stressor for all mice, performed just a few days earlier. Regarding interstrain differences in WT mice of the same genotype, body weight gain was more pronounced in C57BL/6J mice (28.0% ± 2.8% increase) than in BALB/c mice (19.8% ± 3.2%; *P* < 0.05; Figures 1 A and 4 A). Notably, circulating cholesterol (*P* < 0.05) and triglyceride levels were lower in BALB/c *Rag1*^{-/-} mice (Figure 4 G and H), whereas the expression of adiponectin in epiWAT was significantly (*P* < 0.01) increased (Figure 4 I). In addition, expression of inflammatory cytokines in the epiWAT of *Rag1*^{-/-} mice of the BALB/c strain was significantly (*P* < 0.01) lower than in WT controls (Figure 4 J), similar to our findings from studying C57BL/6J mice (Figures 1 I and 5).



Figure 4. Effects of lymphocyte deficiency on HFD-induced obesity in the BALB/c strain. (A) Body weights of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed ND or HFD for 16 wk. (B) Body weight gain at the end of the experiment. (C) Food intake over 72 h as measured by indirect calorimetry. (D) Epididymal fat pad weight adjusted to body weight of WT and $Rag1^{-/-}$ mice placed on ND or HFD for 16 wk. (E) Representative hematoxylin and eosin staining (scale bar, 100 µm) and (F) relative cell size of epiWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (G and H) Circulating levels of (G) fasting cholesterol and (H) triglycerides. (I) Expression of *Adipoq* in the epiWAT. (J) Expression of inflammatory cytokine genes in the epiWAT. Data were analyzed by repeated-measures ANOVA and posthoc multiple comparison tests or *t* test and are expressed as mean ± SEM*, *P* < 0.05; †, *P* < 0.01; ‡, *P* < 0.001; *n* = 3 to 5 mice per group.

Along these lines, BALB/c WT mice on HFD were less prone than HFD-fed C57BL/6J WT mice to developing insulin resistance, as shown by the results of glucose tolerance testing (P< 0.01; Figures 2 A and 5 A), and ITT (P < 0.05; Figures 2 B and 5 B). Similar to our findings in the C57BL/6J strain, BALB/c $Rag1^{-/-}$ mice were less prone to the metabolic effects of HFD, as shown by their body weight gain, adiposity, and insulin sensitivity, compared with their WT counterparts.

Regarding metabolic activity as measured by indirect calorimetry, $Rag1^{-/-}$ mice showed increased oxygen consumption (P < 0.05; Figure 5 C) and carbon dioxide production (P < 0.05; Figure 5 D), as compared with WT mice, despite the similar food intake (Figure 4 C) and motor behavior (Figure 5 G) in the 2 groups. Furthermore, RER did not differ between groups (Figure 5 E), despite the higher metabolic rate of the $Rag1^{-/-}$ mice (P < 0.05; Figure 5 F). These findings were similar to those in the C57BL/6J mice (Figure 2 C through G) demonstrating that genotype-related differences remain consistent between the 2 mouse strains used (Figure 6).

This response is further highlighted by the increased energy dissipation via the adipose tissue, demonstrated by the induced fatty acid oxidation in the epiWAT (P < 0.01; Figure 6 A) and the activation of thermogenic factors such as Ucp1 in the scWAT (P < 0.01; Figure 6 B and C) and BAT depots (P < 0.01; Figure 6 D



Figure 5. Effects of lymphocyte deficiency on insulin sensitivity and metabolic parameters in the BALB/c strain. (A) Glucose tolerance test of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed a ND or HFD for 14 wk. (B) Insulin tolerance test of WT and $Rag1^{-/-}$ mice fed a ND or HFD for 15 wk. (C through G) Measurement of metabolic characteristics over 48 h by using indirect calorimetry. (C) VO₂, (D) VCO₂, (E) RER, (F) metabolic rate, and (G) total activity in WT and $Rag1^{-/-}$ mice placed on HFD. Data were analyzed by repeated-measures ANOVA and posthoc multiple-comparison tests and are expressed as mean ± SEM *, P < 0.05; †, P < 0.01; ‡, P < 0.001; n = 3 to 5 mice per group.

and E) in the BALB/c $Rag1^{-/-}$ mice. These findings are similar to those from the C57BL/6J mice studies (Figure 3).

Discussion

In summary, the findings of our study suggest that metabolic activity is greater in *Rag1*^{-/-} mice than WT mice and that this difference is maintained in 2 of the most commonly used mouse strains. As a result, *Rag1*^{-/-} mice exhibit resistance to HFD-mediated changes in body weight, adiposity, and insulin sensitivity. Intrastrain differences in body weight, adiposity, and insulin resistance were identified in the current study, as has been shown with other physiologic responses, such as immune activation.¹⁹ These data suggest that lymphocyte deficiency confers prophylaxis against HFD-induced obesity even in mice with associated activation of the innate immune system, such as *Rag1*^{-/-} mice.²³⁵

In the current study, we applied the model of high-fat diet-induced obesity to assess the effects of lymphocyte deficiency on adiposity in 2 mouse strains. For this reason, we compared the metabolic responses of 2 most commonly used *Rag1^{-/-}* mouse strains, C57BL/6J and BALB/c. Our findings demonstrate the importance of the adaptive immune system in the regulation of the dissipation of energy and the corresponding development of obesity and insulin resistance after a hypercaloric diet in these mouse strains. In addition, we confirmed that WT BALB/c mice are more resistant than the WT C57BL/6J mice to the dietinduced obesity, consistent with the literature.²⁷

Previous studies have sought to reveal the relationship between HFD and the adaptive immune response in the development of obesity but have yielded diverse conclusions. In one study,⁴¹ C57BL/6 Rag1^{-/-} mice fed a 60% fat diet for 14 wk gained more body weight and were less sensitive to insulin than their WT counterparts. Using the same mouse line, other researchers who maintained C57BL/6J mice for 11 wk on a diet containing 42.2% fat showed that Rag1-/- gained more weight than WT mice, although insulin resistance did not differ between groups. In another study,⁷ C57BL/6J Rag2^{-/-} and WT mice maintained on a 45% fat diet for 12 wk had similar body weight and insulin resistance. Furthermore, compared with their WT counterparts, B6.129S7 Rag1-/- mice fed a 30% fructose solution for 12 wk gained less body weight and retained insulin sensitivity.1 Overall, the differences among the studies cited might be due to variability between the applied diets or to differences in the genetic background or age of the mice used. Our current results were obtained from age-matched C57BL/6J and BALB/c male mice and provide strong evidence of the protective phenotype of Rag1-/- mice against HFD -induced adiposity and insulin resistance. Importantly, the characterization of both strains has confirmed their suitability for obesity studies and demonstrated that experiments with both strains are unnecessary, leading to use of reduced numbers of mice.

In this context, we have shown that, over a 15-wk period on a hypercaloric diet, *Rag1*^{-/-} mice, which are unable to mount adaptive immune responses, do not gain as much weight as their WT counterparts, despite their similar food intake. The difference in body weight between the 2 genotypes was associated with decreased epiWAT mass and adipocytes of smaller size. Furthermore, the hypercaloric diet used rendered the WT



Figure 6. Lymphocyte deficiency alters lipid metabolism in WAT and favors dissipation of energy. (A) Expression of genes associated with fatty acid oxidation, lipogenesis, and lipolysis in the epiWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (B) Representative hematoxylin and eosin staining (i; scale bar, 100 µm) and UCP1 staining (ii; scale bar, 50 µm) of scWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (C) Expression of genes associated with beige adipose tissue in the scWAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (D) Representative hematoxylin and eosin staining (scale bar, 100 µm) of BAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. (E) Production of Ucp1 in the BAT of WT and $Rag1^{-/-}$ male mice fed HFD. Data were analyzed by *t* test and are expressed as mean ± SEM; *, *P* < 0.05; †, *P* < 0.01; ‡, *P* < 0.001; *n* = 3 or 4 mice per group.

mice more insulin-resistant, whereas their *Rag1*^{-/-} counterparts remained more sensitive as shown by the results of glucose tolerance testing and ITT. These responses are in line with the resistance of Rag1^{-/-} mice to the development of obesity as compared with their WT counterparts. The detailed assessment of their increased metabolic rate and oxygen consumption, hallmarks of catabolic phenotypes, yielded hints regarding why animals unable to mount adaptive immune responses bear this 'protective' phenotype. This finding is in agreement with their increased expression of epiWAT $Cpt1\alpha$, an early gene in the mitochondrial fatty acid oxidation cascade.²⁸ In addition, we identified more abundant UCP1 production, a protein that indicates increased thermogenic capacity, in the scWAT of the *Rag1*^{-/-} mice; this finding is in line with their metabolic phenotype. Furthermore, the increased expression of Cidea and Pgc1a, characteristic of beige adipose tissue and mitochondrial biogenesis, respectively,

in the *Rag1^{-/-}* scWAT provides evidence for activated energy dissipation mechanism also in line with overall protection from HFD-induced obesity. Finally, the *Rag1^{-/-}* BAT showed increased *Ucp1* expression and decreased lipid droplet size, compared with the WT BAT.

According to our data, $Rag1^{-/-}$ mice are less prone to develop obesity, despite their more activated innate immune system; most likely this is an adaptive response for the lack of a functional adaptive immune system.¹⁹ In particular, we found that after 15 to 16 wk of feeding the HFD, the expression of proinflammatory cytokines in the epiWAT was significantly lower in the $Rag1^{-/-}$ mice compared with the WT. This result is consistent with the protected phenotype of $Rag1^{-/-}$ mice, which are able to metabolize the increased lipids provided via the diet and increase their energy expenditure; in contrast, in WT mice, the increased lipids are stored in the expanding adipose tissue, resulting in lipotoxic effects. One of the hallmarks of the expanding adipose tissue in obesity is its infiltration by macrophages.^{39,45} This macrocytic infiltration likely is orchestrated by CD8⁺ T cells, given that their numbers in the adipose tissue increase before macrophage infiltration occurs;³⁰ consequently a futile cycle is established, leading to increased adiposity and inflammation. This process indicates how lymphocytes are critical for macrophage activation in the expanded adipose tissue—an observation in agreement with the compromised response of the *Rag1^{-/-}* mice to obesity and insulin resistance over time. Together, these findings suggest that the contribution of the adaptive immune system in the induction of adiposity may be primarily due to altered lipid utilization within the various adipose tissue depots.^{1,7,21,41}

Emerging evidence suggests 'beige-ing' of scWAT as a potential therapeutic target for obesity and insulin resistance. Several either gain- or loss-of-function mouse models for genes involved in the development and activity of beige adipose tissue are resistant to weight gain.¹³ Recently, molecules such as IRISIN and FGF21, which induce beige adipose tissue, are considered as promising targets for the treatment of human obesity.^{3,11} Further support on the therapeutic potential of beige adipocytes, is provided by studies showing that the implantation of human beige adipocytes in the scWAT of obese NOD-scid IL.2rg^{null} mice improved glucose tolerance.²⁴ Our findings suggest the possibility that lymphocytes act as a brake for beige adipogenesis, either directly or through their effects on innate immune cells.

In summary, our results provide strong evidence of the effects of lymphocyte deficiency on the dissipation of energy and the induction of beige adipogenesis in mice, independent of the strain studied. Given the number of studies that involve lymphocyte-deficient mouse models, consideration of the associated differences in metabolic activity may provide useful insights for interpretation of findings and even for more informative experimental designs. Finally, these findings may contribute to the design of new therapeutic approaches, including immunomodulatory interventions,^{16,17} for states of altered lymphocyte numbers, including not only obesity but also severe wasting, a serious unmet medical need associated with chronic devastating conditions including cancer, infectious disease, heart failure, Alzheimer disease, and more.¹⁸

Acknowledgments

This work was supported by Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: Herakletus II and NSRF 2007–2013 Programme for Development (EU Regional Development Fund)," Greek Ministry of Education and Religious Affairs, Culture, and Sports.

References

- Bhattacharjee J, Kumar JM, Arindkar S, Das B, Pramod U, Juyal RC, Majumdar SS, Nagarajan P. 2014. Role of immunodeficient animal models in the development of fructose-induced NAFLD. J Nutr Biochem 25:219–226.
- Bombeiro AL, Santini JC, Thome R, Ferreira ER, Nunes SL, Moreira BM, Bonet IJ, Sartori CR, Verinaud L, Oliveira AL. 2016. Enhanced immune response in immunodeficient mice improves peripheral nerve regeneration following axotomy. Front Cell Neurosci 10:1–14.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. 2012. A PGC1α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature 481:463–468.

- Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, Mathis D. 2012. PPARγ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T_{res} cells. Nature 486:549–553.
- Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontiini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ, Wu J, Gunawardana SC, Banks AS, Camporez JP, Jurczak MJ, Kajimura S, Piston DW, Mathis D, Cinti S, Shulman GI, Seale P, Spiegelman BM. 2014. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. Cell 156:304–316.
- De Vooght V, Vanoirbeek JA, Luyts K, Haenen S, Nemery B, Hoet PH. 2010. Choice of mouse strain influences the outcome in a mouse model of chemical-induced asthma. PLoS One 5:1–9.
- Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A. 2009. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. Biochem Biophys Res Commun 384:482–485.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. Cell Metab 9:203–209.
- FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits, Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig, and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim 48:178–192. PubMed
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med 15:930–939.
- Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonenkov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM. 2012. FGF21 regulates PGC1α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. Genes Dev 26:271–281.
- Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. Science 282:2261–2263.
- 13. Harms M, Seale P. 2013. Brown and beige fat: development, function, and therapeutic potential. Nat Med **19:**1252–1263.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor α: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259:87–91.
- Karavia EA, Papachristou DJ, Liopeta K, Triantaphyllidou IE, Dimitrakopoulos O, Kypreos KE. 2012. Apolipoprotein A-I modulates processes associated with diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. Mol Med 18:901–912.
- Kavanaugh A. 1999. An overview of immunomodulatory intervention in rheumatoid arthritis. Drugs Today (Barc) 35:275–286.
- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs, and combination immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol 13:273–290.
- Kir S, Komaba H, Garcia AP, Economopoulos KP, Liu W, Lanske B, Hodin RA, Spiegelman BM. 2016. PTH–PTHrP receptor mediates cachexia in models of kidney failure and cancer. Cell Metab 23:315–323.
- Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. 2011. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. Diabetes 60:2474–2483.
- Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat Med 15:940–945.
- Liu X, Huh JY, Gong H, Chamberland JP, Brinkoetter MT, Hamnvik OP, Mantzoros CS. 2015. Lack of mature lymphocytes results in obese but metabolically healthy mice when fed a high-fat diet. Int J Obes (Lond) 39:1548–1557.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 117:175–184.

- Mathis D. 2013. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. Cell Metab 17:851–859.
- 24. Min SY, Kady J, Nam M, Rojas-Rodriguez R, Berkenwald A, Kim JH, Noh HL, Kim JK, Cooper MP, Fitzgibbons T, Brehm MA, Corvera S. 2016. Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. Nat Med 22:312–318.
- Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A, Chawla A, Locksley RM. 2013. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. J Exp Med 210:535–549.
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68:869–877.
- 27. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N. 2013. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. Diabetologia 56:1129–1139.
- Muoio DM, Newgard CB. 2006. Obesity-related derangements in metabolic regulation. Annu Rev Biochem 75:367–401.
- 29. Nicholls DG, Locke RM. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol Rev 64:1–64.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. 2009. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med 15:914–920.
- 31. **Pi-Sunyer X.** 2009. The medical risks of obesity. Postgrad Med **121**:21–33.
- 32. **Prendergast C, Gidding SS.** 2014. Cardiovascular risk in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus. Curr Diab Rep **14**:454.
- Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. 2011. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. Vet Pathol 49:32–43.
- Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. 2013. UCP1 in brite–beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. Cell Reports 5:1196–1203.
- 35. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol 7:118–130.
- 36. Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, Sipula IJ, Dedousis N, Scott DK, Morel PA, Thomson AW, O'Doherty RM. 2012. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of

obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. Diabetes **61**:2330–2339.

- Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. Nat Med 18:1407–1412.
- 38. Waller-Evans H, Hue C, Fearnside J, Rothwell AR, Lockstone HE, Calderari S, Wilder SP, Cazier JB, Scott J, Gauguier D. 2013. Nutrigenomics of high fat diet induced obesity in mice suggests relationships between susceptibility to fatty liver disease and the proteasome. PLoS One 8:1–12.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112:1796–1808.
- West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. 1992. Dietary obesity in 9 inbred mouse strains. Am J Physiol 262:R1025– R1032.
- Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med 15:921–929.
- 42. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, Ringelhan M, Simonavicius N, Egger M, Wohlleber D, Lorentzen A, Einer C, Schulz S, Clavel T, Protzer U, Thiele C, Zischka H, Moch H, Tschop M, Tumanov AV, Haller D, Unger K, Karin M, Kopf M, Knolle P, Weber A, Heikenwalder M. 2014. Metabolic activation of intrahepatic CD8⁺ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis, and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. Cancer Cell 26:549–564.
- Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. Science 332:243–247.
- 44. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 150:366–376.
- 45. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 112:1821–1830.