

השפעות משטרים תזונתיים שונים:

הגבלה קלורית בחולדות ודיאטה עשירה בשומן בעכברים

על ביטוי ורמות אדיפונקטין

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך בתזונה"

מאת

מעין ברנע

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של פרופ' זכריה מדר ודר' אבי שמאי

האוניברסיטה העברית בירושלים

הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

המכון לביוכימיה, מדעי המזון והתזונה

רחובות

תודה

תודות מקרב לב לפרופ' זכריה מדר, על הליווי הצמוד והמקצועי, על המידע והחוכמה הרבה שהיו כנר לרגלי ועל הדחיפה המתמדת למצויינות.

תודות רבות לדר' אבי שמאי שהצליח תמיד להאיר והבהיר את הדברים מזווית ראייה אחרת ומרעננת, הערותיו והארותיו סייעו לי רבות בכתיבת עבודה זו.

תודה לכל החברים במכון לביוכימיה, המזון והתזונה ולחברי במעבדה שתמיד תמיד הושיטו יד, ברכה טימר, ארז אילן, מיכל האן-אוברציגר ומעין ניסימוב-זסלבר .

תודה למשפחתי היקרה כור מחצבתי, על התמיכה, העידוד והדחיפה להמשיך גם בשעות הלא קלות ולכל אורך הדרך.

ברצוני להקדיש את העבודה לזכר אבי, בן-עמי זהר ז"ל, שהיה ההשראה הראשונה שלי וחסרונו גדול.

5.....	תקציר	
7.....	מונחים וקיצורים	
8.....	1. מבוא	
9.....	אדיפונקטין	1.1
9.....	הקדמה	1.1.1
10.....	השפעות מטבוליות של אדיפונקטין	1.1.2
10.....	מנגנון הפעולה	1.1.3
12.....	אדיפונקטין ותזונה	1.1.4
17.....	הרצפטורים של אדיפונקטין	1.2
19.....	AMPK – AMP activated protein kinase	1.3
22.....	ACC – Acetyl-CoA carboxylase	1.4
25.....	מטרות המחקר	1.5
26.....	2. חומרים ושיטות	
26.....	חומרים	2.1
26.....	כימיקלים וביוכימיקלים:	2.1.1
28.....	נוגדנים:	2.1.2
29.....	פריימרים ל-PCR:	2.1.3
30.....	שיטות עבודה:	2.2
30.....	חיות הניסוי:	2.2.1
31.....	העמסת גלוקוז OGTT	2.2.2
32.....	דגימות רקמה	2.2.3
33.....	בדיקת אדיפונקטין ואינסולין בסרום. (Radioimmunoassay)	2.2.4
34.....	הפקת דוגמאות חלבון קביעת חלבון כללי בשיטת Bradford	2.2.5
34.....	קביעת חלבון ספציפי: Western Immunoblotting	2.2.6
35.....	הפקת Total RNA	2.2.7
36.....	קביעת רמות cDNA - PCR	2.2.8
39.....	Real-Time Quantitative PCR	2.2.9
41.....	ניתוח סטטיסטי	2.3
42.....	3. תוצאות	
42.....	ניסוי הגבלה קלורית	3.1
42.....	משקל החולדות	3.1.1
43.....	נתונים ביוכימיים	3.1.2
44.....	העמסת גלוקוז	3.1.3
45.....	ביטוי RNA לאדיפונקטין ברקמת השומן	3.1.4
46.....	רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן	3.1.5
47.....	רמות אדיפונקטין בסרום	3.1.6
48.....	3.2 ניסוי תזונה עשירה בשומן	
48.....	השפעת תזונה עשירה בשומן על משקל הגוף בעכברים	3.2.1
49.....	נתונים ביוכימיים	3.2.2
51.....	העמסת סוכר	3.2.3
52.....	ביטוי RNA של אדיפונקטין ברקמת השומן של עכברים	3.2.4
53.....	רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן של עכברים	3.2.5
54.....	אדיפונקטין בסרום	3.2.6
55.....	רצפטורים לאדיפונקטין	3.2.7
57.....	האנזים AMPK ו-pAMPK	3.2.8
59.....	האנזים ACC ו-pACC	3.2.9
61.....	4. דיון	
67.....	5. ביבליוגרפיה	
78.....	Abstract	

תקציר

אדיפונקטין הוא הורמון המופרש מרקמת השומן ונמצא כי הוא מעורב במטבוליזם של שומן וגלוקוז. אדיפונקטין נקשר לשני רצפטורים, AdipoR1 ו-AdipoR2, בכבד ובשרירי השלד ומפעיל שרשרת של קינאזות. השפעותיו משוייכות לשפעול האנזים AMP Kinase (AMPK) המזרחן ומעכב את האנזים acetyl-CoA carboxylase (ACC) ובכך מפחית את ייצור מלוניל-CoA. מחקרים מראים כי ככל הנראה לצריכה הקלורית תפקיד בבקרה על רמות אדיפונקטין בסרום. נמצא כי הגבלה קלורית וירידה במשקל המושגת על ידי שינויים בהרגלי אכילה לאורך זמן קשורות לרמות אדיפונקטין גבוהות בסרום. להבדיל, השמנה וסוכרת סוג 2 נמצאו קשורות לירידה ברמות אדיפונקטין בפלסמה. מטרת המחקר הנוכחי היתה להעריך את השפעות ההגבלה הקלורית ותזונה עשירה בשומן על ביטוי mRNA והחלבון אדיפונקטין ברקמת השומן ועל רמותיו בסרום. בנוסף, בניסוי התזונה העשירה בשומן נבדקה מידת הזרחון של AMPK ו-ACC והביטוי של הרצפטורים בכבד ובשריר.

ארבע עשרה חולדות Sprague Dawley ממין זכר קיבלו תזונה ללא הגבלה (AL) או 60% הגבלה קלורית (CR) מהצריכה היומית הממוצעת במשך 4 חודשים. העליה במשקל של החולדות בקבוצת CR היתה נמוכה במובהק מאשר בקבוצת AL. עקומות OGTT היו נמוכות מעט 60 ו-120 דקות לאחר העמסת הגלוקוז, אולם השטח מתחת לעקומה לא נבדל בין הקבוצות. רמות גלוקוז ואינסולין בצום וכן מדד HOMA-IR לא נבדלו בין הקבוצות. לא נמצאו הבדלים בביטוי mRNA של אדיפונקטין וברמות החלבון ברקמת השומן של חולדות בקבוצת CR בהשוואה לחיות AL. אולם, רמות אדיפונקטין היו גבוהות בחולדות בקבוצת CR ($6.61 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ לעומת $3.07 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$, $P < 0.001$). נמצא גם קשר הפוך בין רמות אדיפונקטין בסרום ומשקל רקמת השומן האפידידמלית ומשקל הגוף.

בניסוי אחר ארבעים עכברים C57BL/6J ממין זכר הוזנו בדיאטה עשירה בשומן (HF) או בדיאטת ביקורת במשך 4 חודשים. העליה במשקל הגוף של העכברים בקבוצת HF היתה גדולה באופן מובהק משל העכברים בקבוצת הביקורת. עקומות OGTT של קבוצת HF היו גבוהות באופן מובהק 60 ו-90 דקות לאחר העמסת סוכר וכן השטח מתחת לעקומה. רמות גלוקוז בצום לא נבדלו בין הקבוצות אולם רמות אינסולין בצום ומדד HOMA-IR היו גבוהים במובהק בקבוצת HF בהשוואה לקבוצת הביקורת. נמצאה ירידה מובהקת בביטוי mRNA של אדיפונקטין (51%) וברמות החלבון (15%) ברקמת השומן של עכברי HF. אולם, רמות אדיפונקטין בסרום לא נבדלו בין הקבוצות. יחד עם זאת, נמצא קשר ישיר בין רמות אדיפונקטין בסרום למשקל רקמת השומן האפידידמלית של העכברים בקבוצת HF.

הביטוי של mRNA של הרצפטורים AdipoR1 ו-AdipoR2 בכבד העכברים ירד ב-40% וב-60% בהתאמה. לעומת זאת, בשרירים הביטוי של הרצפטורים הוכפל. לא נמצאה השפעה של התזונה על ביטוי וזרחון AMPK בכבד. אולם, בשריר נמצאה ירידה מובהקת בזרחון והשפעול של AMPK. הביטוי והזרחון של ACC בכבד לא נבדל בין הקבוצות. בשריר נמצאה ירידה מובהקת ברמות ACC המזרחן בקבוצת HF.

ניכר מהתוצאות כי לתזונה השפעה חשובה על ביטוי ורמות אדיפונקטין. הגבלה קלורית הגבילה רמות אדיפונקטין בסרום ללא שינוי בביטוי ברקמת השומן. מצד שני, דיאטה עשירה בשומן גרמה לירידה ברגישות לאינסולין ולביטוי אדיפונקטין ברקמת השריר ללא שינוי ברמות אדיפונקטין בסרום. בשני הניסויים לא נמצא מתאם בין מידת הרגישות לאינסולין ורמות אדיפונקטין בסרום. תוצאות אלה מדגישות את מורכבות מנגנוני הבקרה שלאחר התרגום של רמות אדיפונקטין בסרום. בנוסף, נמצא כי תזונה עשירה בשומן הגבירה את ביטוי הרצפטורים לאדיפונקטין בשרירים בעוד שפעילות האנזימים הקשורים לאדיפונקטין ירדה. לעומת זאת, בכבד ירד הביטוי של הרצפטורים ואילו פעילות האנזימים לא הושפעה. מתוצאות אלה עולה כי לתזונה עשירה בשומן השפעה ספציפית לרקמה על הגורמים הקשורים בפעילות אדיפונקטין. לסיכום, למרות שיש קשר ברור בין תזונה למידת הרגישות לאינסולין, עדיין לא ברור תפקידו של אדיפונקטין בקשר הזה.

ACC – Acetyl CoA Carboxylase

AMPK – adenosine mono phosphate activated kinase

APS - Ammonium persulfate

BSA - Bovine serum albumin

DEPC - diethyl pyrocarbonate

DTT- Dithiothreitol

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

HOMA-IR - Homeostatic model assessment.

NP-40- Nonidet P-40

PAGE - Polyacrylamide gel electrophoresis

PEPCK – phospho enol pyruvate carboxy kinase

PMSF - Phenylmethanesulfonyl fluoride

PPAR – peroxisome proliferator activated receptor

PVP-Polyvinylpyrrolidone

SDS - Sodium dodecyl sulfate

TBS- Tris buffer saline

TBS-t - Tris buffer saline with 0.1% Tween-20

TEMED - N, N, N, N – Tetramethylethylenediamine

Tris - Tris (hydroxymethyl) aminomethane

TRITON-X 100 polyoxyethylene(10) isooctylphenyl ether

1. מבוא

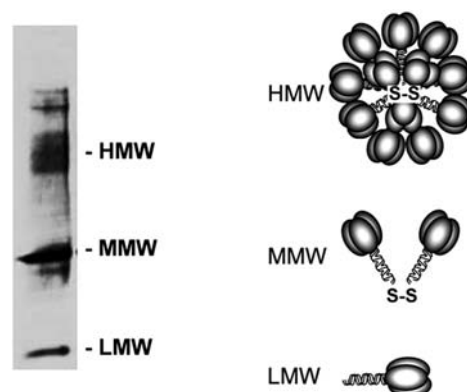
העליה החדה בהשמנת היתר בעולם המערבי הינה סוגיה בריאותית מדאיגה. זהו גורם סיכון עיקרי למחלות מסכנות חיים כגון סוכרת מסוג 2 או מחלות לב. התזונה בעולם המערבי מאופיינת בתכולה גבוהה של שומן וסוכרים פשוטים. נמצא שמרכיבים תזונתיים בודדים, כולל חומצות שומן משפיעים ישירות על תנגודת לאינסולין (Yu *et al.* 2002). עליה בצריכת השומן בתזונה קשורה גם להצטברות רקמת שומן (Spiegelman and Flier 1996), והשמנת יתר מאופיינת בהצטברות שומנים בכל תאי הגוף וכן בגדילה מואצת ובלתי תקינה של תאי שומן. כיום ידוע ומקובל כי רקמת השומן אינה רק איבר אוגר אנרגיה, אלא משתתפת בוויסות של ההומיאוסטאזיס האנרגטי. היא גם רקמה אנדוקרינית המפרישה מגוון רחב של מולקולות בעלות פעילות ביולוגית כגון חומצות שומן חופשיות (Shulman 2000), אדיפסין (White *et al.* 1992), לפטין (Maffei *et al.* 1995), PAI-1 (Shimomura *et al.* 1996), רזיסטין (Steppan *et al.* 2001), TNF α (Hotamisligil 1999) ואדיפונקטין (Scherer *et al.* 1995). הראיות המצטברות מעידות שחלק מהמולקולות המופרשות מרקמת השומן מעורבות בפיזיולוגיה של תנגודת לאינסולין וטרשת עורקים הקשורות בהשמנה.

1.1 אדיפונקטין

1.1.1 הקדמה

אדיפונקטין הוא חלבון שהתגלה במקביל ע"י ארבע קבוצות שונות באמצע שנות התשעים ותואר לראשונה בשנת 1995 ע"י Scherer וקבוצתו בשם ACRP30 (adipocyte complement related protein of 30kDa) (Scherer *et al.* 1995). הקבוצות האחרות קראו לו בשמות AdipoQ, GBP28 gelatin binding protein of 28kDa, ו- APM1 - adipose most abundant gene transcript 1 (Hu *et al.* 1996; Maeda *et al.* 1996; Nakano *et al.* 1996). החלבון בנוי מ- 247 חומצות אמינו, הרצף הראשוני שלו כולל רצף איתות שנחתך מהחלבון הבוגר, קצה אמיני לא שמור שלאחריו domain בעל מבנה קולאגני וקצה קרבוקסילי בעל מבנה גלובולרי. לקצה הקרבוקסילי דמיון מבני ל- tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), למרות היעדר דימיון ברצף הראשוני. החלבון עובר מודיפיקציות לאחר השעתוק הכוללות גליקוזילציות על שיירי ליזין במיקומים 68,71,80 ו- 104 והידרוקסילציה על פרולין 94 בדומיין הקולאגני. האיזורים שעוברים מודיפיקציות נמצאו שמורים מבחינה אבולוציונית (Wang *et al.* 2002).

החלבון יוצר מבנה טרימר בסיסי ככל הנראה דרך הדומיין הגלובולרי (Shapiro and Scherer 1998), בתנאים מסויימים אף ניתן לזהות דימר (Scherer *et al.* 1995) שנוצר ככל הנראה ע"י קשר דיסולפידי על ציסטאין 39 באתר הקולאגני (Pajvani *et al.* 2003). הטרימר יוצר מבנים מסדר גבוה יותר באמצעות אסוציאציות בין ההליקס המשולש של האתר הקולאגני של הטרימר. המבנים מסדר גבוה הם דימרים של טרימרים, הקרויים גם הקסמרים ובסרום מצויים אדיפונקטין בעל משקל מולקולרי נמוך (LMW). ההקסמרים יוצרים ביניהם מבנים מסדר גבוה יותר שבסרום נמצאים כאדיפונקטין בעל משקל מולקולרי גבוה (HMW) (Shapiro and Scherer 1998).



תמונה 1: מבנים מסדר גבוה של אדיפונקטין (Kadowaki 2005)

1.1.2 השפעות מטבוליות של אדיפונקטין

הגן לאדיפונקטין ממוקם על כרומוזום 3q27 ומורכב משלושה אקסונים ושני אינטרונים. איזור זה של הכרומוזום נמצא כאתר לגנים מועמדים הקשורים לפנוטיפ התסמונת המטבולית (Kissebah *et al.* 2000). המידע העדכני ביותר מצביע על כך שאדיפונקטין ממלא תפקיד חשוב ברגישות לאינסולין, אך מנגנוני הפעילות המדויקים של אדיפונקטין ותפקידו בהגברת הרגישות לאינסולין עדיין נחקרים. ההורמון מצוי בריכוזים גבוהים בפלסמה הנמדדים ב- $\mu\text{g/ml}$. בניגוד להורמונים וציטוקינים אחרים המופרשים מרקמת השומן כגון לפטין ו-TNF- α , ריכוזו יורד במצבים של השמנה, תנגודת לאינסולין וסוכרת מסוג 2 בבני אדם ובמכרסמים (Scherer *et al.* 1995; Hotta *et al.* 2000; Weyer *et al.* 2001). נראה שלמבנים בעלי המשקלים השונים של ההורמון המצויים בפלסמה פעילות שונה ושעיקר פעילות הגברת הרגישות לאינסולין קשורה למבנה בעל המשקל הגבוה (Pajvani *et al.* 2003; Pajvani *et al.* 2004). ידוע שאדיפונקטין מעורב במטבוליזם של גלוקוז ושומן (Berg *et al.* 2002). הוא מגביר חמצון חומצות שומן בשריר ומחזק את עיכוב הגלוקוקוניאוגנזה בכבד שנגרם ע"י אינסולין. מתן אדיפונקטין לעכברים הביא לירידה חדה ומובהקת ברמות הגלוקוז בפלסמה, ללא תלות ברמות האינסולין בפלסמה (Berg *et al.* 2001) ולירידה בריכוזי חומצות שומן חופשיות בפלסמה (Fruebis *et al.* 2001).

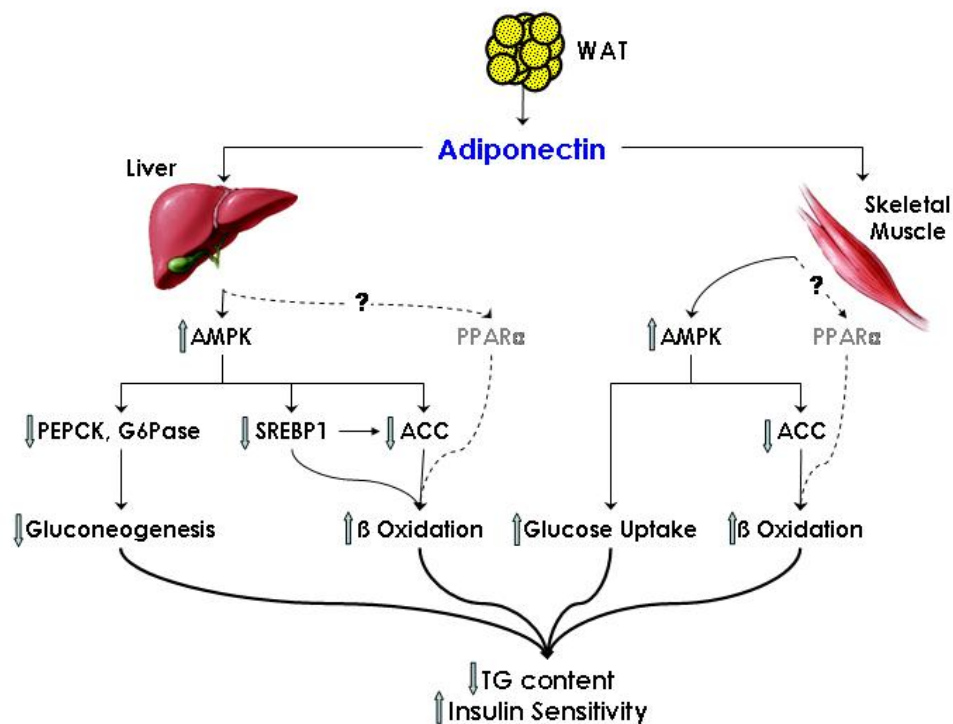
1.1.3 מנגנון הפעולה

בחמש השנים האחרונות נחקרים ומזוהים מסלולי האיתות והמנגנונים המביאים לאפקטים המטבוליים של אדיפונקטין. בעכברים שמנים לאחר טיפול באדיפונקטין נצפתה ירידה בתנגודת לאינסולין, על ידי הפחתת תכולת הטריגליצרידים בשריר ובכבד. בהמשך נמצא כי אדיפונקטין הביא לעליה בשעתוק של מולקולות המעורבות בטרנספורט של חומצות שומן כגון CD36, האנזים acyl-CoA oxidase המשפעל את חומצות השומן בשלב החמצון הראשוני ובחלבון UCP2 המשתתף בתהליכים צורכי אנרגיה. החוקרים שיערו כי אדיפונקטין משפעל את גורם השעתוק α peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α) ובכך מביא לעליה בשעתוק וביטוי הגנים המעורבים הנ"ל אולם מנגנון זה טרם פוענח (Yamauchi *et al.* 2001).

כאשר נבדקו מנגנונים קצרי מועד נמצא כי אדיפונקטין מעורר חמצון חומצות שומן במנגנון שאינו מעורב במסלול של PPAR α . אדיפונקטין נקשר לשני רצפטורים, adipoR1 ו-adipoR2 בכבד ובשריר ומפעיל שרשרת פעילות אנזימטית של קינאזות (Yamauchi *et al.* 2003). ההשפעות שלו מיוחסות לשפעול של האנזים AMP Activated Protein Kinase (AMPK) (Tomas *et al.* 2002; Yamauchi *et al.* 2002) שמזרחן ומעכב את האנזים acetyl-CoA carboxylase (ACC). בכך גורם אדיפונקטין לירידה בייצור של מלוניל-CoA שהוא השלב הקובע בסינתזת חומצות שומן וכתוצאה מכך חומצות השומן מפונות לחמצון

במיטוכונדריה.

מנגנון ההגברה של חמצון חומצות שומן דרך עיכוב האנזים ACC משותף הן לשריר והן לכבד, אולם לשפעול של AMPK נמצאו גם השפעות שונות ברקמות השונות. בשריר נמצא כי השפעול של AMPK עורר הגברה בספיגת הגלוקוז באופן שאינו תלוי בהשפעותיו על חומצות שומן (Hardie *et al.* 1998; Winder and Hardie 1999; Mu *et al.* 2001). בתאי כבד נמצא גם כי השפעול של AMPK הביא לירידה בביטוי של מולקולות המעורבות בגלוקוניאוגנזה כגון phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ו-glucose-6-phosphatase (G6Pase) (Lochhead *et al.* 2000). כמו כן נמצא ששפעול AMPK בכבד הוביל לירידה בביטוי של Sterol-regulatory-element-binding-protein-1 (SREBP-1), (Bronner *et al.* 2004), זהו גורם שעתוק המעורב בביטוי של אנזימים ליפוגנים כגון ACC, עיכובו מוביל לירידה בסנינתזה של טריגליצרידים. חסימת השפעול של AMPK באמצעות שימוש במוטנט שלילי דומיננטי מעכבת כל אחת מההשפעות של אדיפונקטין. עיכוב זה מעיד על כך שהשפעות אדיפונקטין על המטבוליזם של גלוקוז וחומצות שומן מתרחש דרך השפעול של AMPK (Yamauchi *et al.* 2002).



תמונה 2: סיכום מנגנון הפעילות המשוער של אדיפונקטין בשריר ובכבד

1.1.4 אדיפונקטין ותזונה

מעט ידוע על השפעת ההרכב התזונתי על ביטוי אדיפונקטין, רמותיו בפלסמה והשפעותיו ברקמות. צריכת אלוהול מתונה נמצאה קשורה בריכוזים גבוהים יותר של אדיפונקטין. דיאטה עשירה בפחמימות עם עומס גליקמי גבוה נמצאה קשורה לריכוזי אדיפונקטין נמוכים (Pischon *et al.* 2005). כאשר נבחנה ההשפעה של מקור החלבון בתזונה, לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות האדיפונקטין בקבוצה שצרכה חלבון סויה לעומת קזאין (Nagasawa *et al.* 2002). לעומת זאת, נמצא שחלבון שהופק מדוחן קוריאני העלה את רמות האדיפונקטין בפלסמה (Choi *et al.* 2005).

1.1.4.1 הגבלה קלורית ואדיפונקטין

קיימות מספר גישות טיפוליות לשינוי המאזן האנרגטי, אולם התערבות תזונתית כגון צום או דיאטה דלת קלוריות היא עדיין היעילה ביותר לקידום אבדן מסת שומן במטופלים שמנים (Ayyad and Andersen 2000). כבר משנת 1935 ידוע שהגבלת כמות המזון הנצרכת על-ידי מכרסמים במעבדה מאריכה את תוחלת החיים שלהם (McCay *et al.* 1935). מחקרים תזונתיים במכרסמים הצביעו על כך שגורם המפתח הינו כמות הקלוריות בתזונה, ומכאן עלה המושג הגבלה קלורית (Masoro 1984; Richardon 1985; Weindruch and Walford 1988). תזונה אופיינית של הגבלה קלורית מכילה 60-70% מכמות המזון שחיה תאכל אם תינתן לה גישה ללא הגבלה למזון. מבחינה אבולוציונית, הגבלה קלורית מייצגת ככל הנראה הסתגלות למחזורי חסר. כל אורגניזם שהצליח להאט תהליכי הזדקנות ורבייה בתקופות מחסור, אך שימר את היכולת להתרבות כאשר הופיע שוב המזון, היה בעל יתרון תחרותי על אורגניזמים אחרים שלא יכלו לעשות זאת (Harrison and Archer 1989; Holliday 1989). ברמה הפיזיולוגית, ההשפעה של הגבלה קלורית מאופיינת היטב (Weindruch and Walford 1988), תחילתה בשלב אקוטי עם תחילת ההגבלה הקלורית ולאחריה מספר שבועות של הסתגלות עד להגעה למצב של תפקוד פיזיולוגי שונה ויציב. במצב זה התגלו חום גוף נמוך מהרגיל, ירידה ברמות הגלוקוז והאינסולין, הפחתה במשקל ורמות השומן בגוף (Koubova and Guarente 2003). נראה גם כי חיות תחת משטר של הגבלה קלורית עמידות יותר לעקות חיצוניות כגון עקת חום ועקה חיצונית (Sohal and Weindruch 1996). מחקרים ראשוניים דיווחו על ירידה בקצב המטבולי בחיות המצויות תחת הגבלה קלורית (Weindruch and Walford 1988), באופן התומך בתיאוריות שמניחות כי הנזק החמצוני הוא הגורם להזדקנות (Harman 1956). אולם מחקרים מאוחרים יותר, בהם החוקרים נרמלו את הקצב המטבולי למשקל הגוף הרזה, לא נמצאה ירידה בקצב המטבולי של חיות תחת הגבלה קלורית (Masoro *et al.* 1982).

נמצא שהגבלה קלורית יעילה בדחיה ואפילו מניעה מוחלטת של מחלות רבות המופיעות בגיל מבוגר, במודלים של עכברים למגוון רחב של מחלות (Weindruch and Walford 1988; Lane *et al.* 1999; Stern *et al.* 2001). ירידה מכוונת במשקל אף משפרת הרבה מהסיבוכים המוכרים של השמנה, כולל תנגודת לאינסולין (Kahn and Flier 2000). אולם, המנגנונים המולקולריים בהם זה קורה עדיין לא ידועים. השפעות ההגבלה הקלורית נחקרו בעכברים *ob/ob* (Soukas *et al.* 2000). נמצאו 8 קבוצות של גנים שהביטוי שלהם נבדל בין טיפול בלפטין להגבלה קלורית, דבר השעיד על האפשרות שהגבלה קלורית בפני עצמה עשויה לווסת ביטוי של גנים ברקמת השומן באופן עצמאי מאובדן מסת שומן.

מאחר שלהגבלה קלורית שני ביטויים עיקריים: הארכת חיים וירידה במסת השומן, נמצא כי מסת השומן ולא הגיל היא שגרמה לירידה ברגישות לאינסולין הפריפריאלית (Colberg *et al.* 1995). בעוד ששיפור בפעילות של אינסולין הינה תגובה אופיינית להגבלה קלורית ועשויה להיות מעורבת במנגנונים המשפיעים על אריכות חיים, פעילות אינסולין לקויה קשורה לעליה בשיעורי התמותה. כמו כן נמצא כי אחוז מסת השומן ממשקל הגוף מגיעה לערך קריטי מסויים. בערכים גבוהים יותר קשה להבחין בשינויים במטבוליזם של גלוקוז או ברגישות לאינסולין. רק כאשר יורדים מתחת לערך קריטי זה מושגים שינויים משמעותיים ברגישות לאינסולין, ללא תלות בגיל (Barzilai *et al.* 1998). מחקרים שונים נערכו על מנת לזהות את ההבדלים בין מאגרי שומן שונים. נמצאו עדויות לכך שגנים המעורבים במטבוליזם, ובמיוחד במסלולים ליפוליטיים התבטאו במידה שונה בהתאם למיקום של השומן בגוף (Vohl *et al.* 2004). מספר מחקרים אף הראו הבדלים תלויי מגדר בביטוי גנים מאותם מאגרי שומן, מה שיכול להצביע על בקרה הורמונלית על ביטוי גנים אלה (Klaus and Keijer 2004).

מעדויות שמצטברות עולה כי הצריכה הקלורית מעורבת בוויסות רמות אדיפונקטין בסרום. נראה שאדיפונקטין עשוי להיות אחת החוליות המקשרות בין הגבלה קלורית לשיפור רגישות הגוף לאינסולין. נמצא שצריכה קלורית גבוהה בתזונה הביאה לירידה מתונה ברמות אדיפונקטין בסרום, למרות ירידה במשקל שנגרמה בעקבות הוצאה קלורית גבוהה בזמן פעילות גופנית (Mousavinassab *et al.* 2005). הגבלה קלורית וירידה במשקל שהושגו באמצעות שינויים ארוכי טווח בסגנון החיים קשורים לריכוזי אדיפונקטין גבוהים בסרום (Esposito *et al.* 2003). לעומת זאת, במחקר בו נבחנה תזונה מאוד דלת קלוריות למשך תקופה קצרה לא מצאו השפעות על רמות אדיפונקטין בסרום (Anderlova *et al.* 2005).

בנשים שמנות שעברו 4 שבועות של הגבלה קלורית חמורה (800 קק"ל ליום) נמצא שיפור במדדים של רגישות לאינסולין, אולם ביטוי mRNA של אדיפונקטין ברקמת השומן התת עורית, כמו גם רמותיו בסרום לא השתנו אצל נשים עם BMI שנע בין 30 ל- 40 (Garaulet *et al.* 2004). בזמן הדיאטה מרבית הקורלציות ההפוכות שנמצאו בין אדיפונקטין למשתנים אחרים הקשורים לתסמונת המטבולית נעלמו. היעלמות הקורלציות עשויה להעיד על כך שיתכן שהתפקיד של אדיפונקטין בשיפור הרגישות לאינסולין אינו מרכזי כפי ששיערו.

קיימת הטרוגניות בתגובה לדיאטה דלת קלוריות (573 קק"ל ליום) בנשים שמנות ($BMI > 50$) במשך יומיים. רק בחלק מהנשים נצפתה הגדלת הביטוי של mRNA של אדיפונקטין ברקמת שומן תת עורית, בעוד שבחלקן לא נצפתה תגובה (Liu *et al.* 2003). השינוי ברמות אדיפונקטין בפלסמה, אצל נשים שנמצאה אצלן עליה בביטוי, היה קטן. מידע זה מעיד על כך שהתרומה של רקמת השומן התת עורית לרמות אדיפונקטין אינה קשורה באופן הדוק לשיפור ברגישות לאינסולין כתוצאה מהגבלה קלורית.

בעוד שהממצאים לגבי רקמת השומן התת עורית שנויים במחלוקת, ידוע כי קיים קשר הפוך בין רמות אדיפונקטין בפלסמה למסת השומן התוך בטני (Asayama *et al.* 2003; Kwon *et al.* 2005). עליה ברקמת השומן התוך בטנית הינה שינוי אופייני בהרכב הגוף בעת הזדקנות (Enzi *et al.* 1986; Shimokata *et al.* 1989) הנמדד על ידי השינוי ביחס שבין היקף המותן לירך. שינוי זה מתרחש ללא תלות בשינויי BMI (Shimokata *et al.* 1989). מספר מחקרים במטופלים בני כל הגילאים הדגימו כי עליה במסת רקמת השומן התוך בטנית קשורה לעליה ברמות האינסולין בצום ולאחר הארוחה ולפגיעה בסבילות לגלוקוז (Bjorntorp 1991; Kissebah 1991). בניסוי בחולדות נמצא, כי הביטוי של mRNA של אדיפונקטין ברקמת השומן התוך בטנית של חולדות שמנות נמוך במובהק מהביטוי בחיות רזות. באותו ניסוי לא נמצא הבדל בין החיות בביטוי אדיפונקטין ברקמת השומן התת עורית. כמו כן נמצא כי הגבלה קלורית (40% מכמות המזון הבסיסית) הביאה לעליה בביטוי mRNA של אדיפונקטין ברקמת השומן התוך בטנית (Milan *et al.* 2002).

1.1.4.2 תזונה עשירה בשומן ואדיפונקטין

צריכה גבוהה של שומן נחשבת גורם עיקרי להשמנת יתר בבני אדם ובחיות (Bray and Popkin 1998; Hill *et al.* 2000). דיאטה עשירה בשומן משרה תנגודת לאינסולין בשרירי השלד (Wilkes *et al.* 1998) וכאשר התזונה עשירה בפחמימות בנוסף לשומן, היא משרה סוכרת מסוג 2 במודלים של חיות (Surwit *et al.* 1988). תנגודת לאינסולין תלוית השמנה, המושרית על ידי דיאטה עשירה בשומן, היא גורם סיכון מרכזי לסוכרת ומחלות לב כליליות (Reaven 1995; Spiegelman and Flier 1996). הרכב חומצות השומן הספציפי עשוי להיות מכריע בקביעת ההשפעות המטבוליות והביוכימיות של השומן בתזונה על הגוף. לחומצות שומן רב-בלתי רוויות PUFA (Polyunsaturated fatty acids) יכולת ייחודית להפנות חומצות שומן מסינתזה של טריגליצרידים לחמצון. תוצרי החמצון של PUFA מסוג n-6 הן גם ליגנד יעיל לשפעול של PPAR γ שנמצא בעל השפעה מכריעה על הרגישות לאינסולין (Kersten *et al.* 2000; Willson *et al.* 2001). נמצא גם ש-PPAR γ מעורב גם בויות של ביטוי אדיפו-ציטוקינים, כולל אדיפונקטין (Iwaki *et al.* 2003). קיימות אף עדויות שההשפעות של PUFA עשויות להיות מתווכות באמצעות AMPK (Suchankova *et al.* 2005).

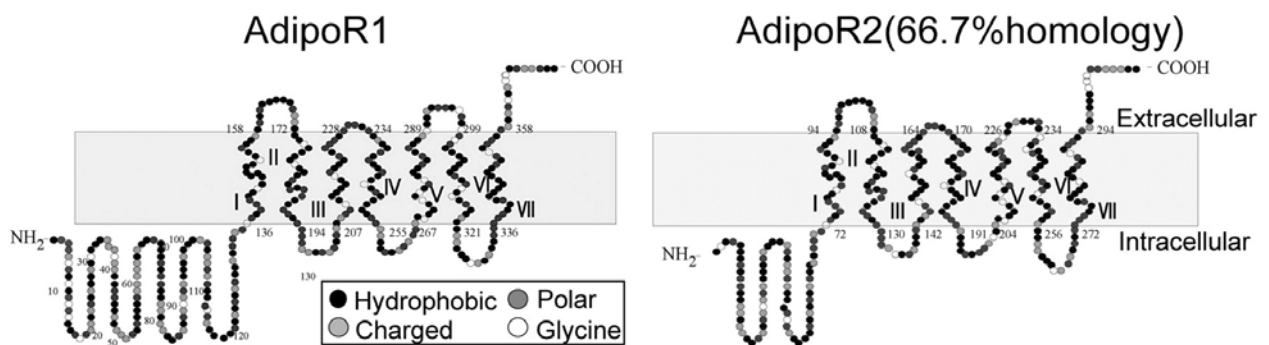
חוקרים מעריכים שרמות נמוכות של אדיפונקטין נגרמות על-ידי השפעות גומלין בין גורמים גנטיים, כגון פולימורפיזם בנוקליאוטיד בודד בגן לאדיפונקטין וגורמים סביבתיים כגון דיאטה עשירה בשומן. לתפוצת השומן בגוף עשוי להיות תפקיד, היות ששומן המפוזר בעיקר במרכז הגוף ובאיזור פנים הבטן הוא בעל קשר הדוק יותר עם תנגודת לאינסולין מאשר שומן תת עורי (Cnop *et al.* 2003; Vilarrasa *et al.* 2005). ייתכן שיש הבדלים בין מאגרי שומן שונים בהפרשת אדיפונקטין. ראיה שנמצאה על ידי Cnop מעידה על כך שבפרטים בריאים לכאורה, רמות אדיפונקטין בפלסמה קשורות יותר לשומן תוך גופי מאשר לשומן תת עורי וכי זה יכול להיות מתווך בקשר שבין השמנה באיזור הבטן ובין תנגודת לאינסולין. עליה במאגרי שומן תוך גופיים מביאה לירידה ברמות אדיפונקטין ועליה ברמות חוצות שומן חופשיות בפלסמה שבתורן גורמות לתנגודת לאינסולין בכבד וברקמות הפריפריאליות, בעיקר בשרירים (Buemann *et al.* 2005).

מספר קבוצות התייחסו לקשר השלילי בין רמות אדיפונקטין בסיסיות בפלסמה וריכוזי חומצות שומן ו/או טריגליצרידים בפלסמה (Hotta *et al.* 2000; Bernstein *et al.* 2004) והניחו שהפרשת אדיפונקטין עשויה להיות מבוקרת ע"י ריכוזי חומצות שומן בפלסמה באמצעות משוב שלילי. אולם לא כל המחקרים תומכים בהשערה זאת (Punyadeera *et al.* 2005).

יש מספר דיווחים קודמים על השפעות השומן בתזונה על אדיפונקטין. האכלה של חולדות בתזונה עשירה בשומן למשך 16 שבועות הובילה להשמנה ניכרת שצויינה בהכפלה של מסת רקמת השומן (Naderali *et al.* 2003). נמצאה ירידה גדולה בביטוי mRNA של אדיפונקטין המעידה על בקרה שלילית של ביטוי mRNA של אדיפונקטין בחולדות שמנות כתוצאה מתזונה. לעומת זאת, בחולדות אלו נמצאו רמות אדיפונקטין בפלסמה גבוהות במובהק בהשוואה לקבוצת ביקורת. ממצא זה מנוגד לתוצאות שנצפו בבני אדם, שם נמצאה ירידה ברמות אדיפונקטין בבבני אדם שמנים בהשוואה לאנשים לא סוכרתיים בעלי משקל נורמלי. במחקרים אחרים נבדקו ההשפעות של הרכב חומצות השומן על אדיפונקטין ועל הרגישות לאינסולין. קיים מידע מועט לגבי ההשפעות של חומצות שומן רוויות או טראנס בתזונה עשירה בשומן על אדיפונקטין (Ibrahim *et al.* 2005). במחקר שבו הוזנו חולדות בחומצות שומן רוויות או טראנס נמצאה ירידה ברגישות לאינסולין ועליה של ליפוליזיס. חומצות שומן רוויות הביאו לירידה בביטוי mRNA של אדיפונקטין, לבקרה שלילית של GLUT4 ובקרה חיובית של lipoprotein lipase (LPL) בעוד שחומצות שומן טרנס גרמו לבקרה שלילית של PPAR γ ו-LPL (Saravanan *et al.* 2005). לא נמצאו הבדלים ברמות אדיפונקטין בפלסמה של עכברים שהוזנו בתזונה עשירה בחומצות שומן רוויות או רב בלתי רוויות (You *et al.* 2005). לעומת זאת, נמצא כי לשמן דגים השפעה חיובית על רמות אדיפונקטין ולפטיין בפלסמה של חולדות בעלות תנגודת לאינסולין שהוזנו בדיאטה עשירה בסוכרוז (Rossi *et al.* 2005).

1.2 הרצפטורים של אדיפונקטין

בעוד אדיפונקטין זוהה לראשונה בשנת 1995 (Scherer *et al.* 1995) הרצפטורים שלו ורצפיהם הגנטיים זהו לראשונה בשנת 2003 על-ידי Yamauchi (Yamauchi *et al.* 2003). בתחילה זוהה החלבון AdipoR1 בשריר, על ידי קשירה לאדיפונקטין גלובולרי. אולם, היות שהיה ידוע כי דפוס ההקשרות של אדיפונקטין גלובולרי ואדיפונקטין באורך מלא הפוך בכבד ובשריר, חשדו החוקרים כי קיימים לפחות שני רצפטורים שונים. בסקירה ספריית הגנים נמצא רק גן אחד בעל הומוולוגיה של 67% ברצף חומצות האמינו שנקרא AdipoR2. כאשר החוקרים המשיכו ובדקו נמצא כי AdipoR1 נפוץ בעיקר בשריר ואילו AdipoR2 נפוץ בעיקר בכבד, מה שעשוי להסביר את ההבדלים בקשירה של סוגי אדיפונקטין השונים ברקמות. היום ידוע כי הרצפטורים מבוטאים גם בתאי בלב (Blucher *et al.* 2005) וברקמת השומן (Kharroubi *et al.* 2003). ככל הנראה הרצפטורים הנם חלבונים אינטגרליים בממברנת התא, החוצים אותה 7 פעמים. אולם, בניגוד לרצפטורים אחרים ממשפחת G protein coupled receptors, מחוץ לתא מצוי הקצה ה-C טרמינלי בעוד שבתוך התא הקצה ה-N טרמינלי (Yamauchi *et al.* 2003). כאשר בוצע ניתוח קשירה על ידי עקומת Scatchard התברר כי AdipoR1, הנפוץ יותר בשריר, קושר טוב יותר את הקצה הגלובולרי של אדיפונקטין. הרצפטור AdipoR2, שנפוץ יותר בכבד, קושר טוב יותר אדיפונקטין באורך מלא.



תמונה 3: המבנה המשוער של הרצפטורים לאדיפונקטין. (Kadowaki 2005)

במחקר שאפיין את הרצפטורים הללו נעשה שימוש באדיפונקטין שהופק במערכות בקטריאליות ולא עבר שינויים לאחר התרגום. כמו כן, לא אופיינה יכולת הקשירה של הרצפטורים למבנים מסדר גבוה של אדיפונקטין (הקסמרים ומעלה). בסרום כמעט ואין אדיפונקטין גלובולרי או את הטרימר של אדיפונקטין. אולם, משערים כי יש בסרום פרוטאז ורדוקטאז המפיקים צורות אלו של ההורמון מהקומפלקסים הגדולים של ההורמון (Fruebis *et al.* 2001). בשנת 2004 הראו Hug ו-Lodish כי בתאי כיליה עובריים המבטאים DNA של תאי שריר, קשר החלבון T-Cadherin קומפלקסים גדולים של אדיפונקטין, הן HMW והן LMW, שהופקו במערכות אאוקריוטיות (Hug *et al.* 2004).

יחד עם זאת, היות ש-T-cadherin הוא חלבון חוץ תאי, לא ידוע כיצד הוא יכול לתווך סיגנל תוך תאי של אדיפונקטין.

המחקר לזיהוי הגורמים המשפיעים על ביטוי הרצפטורים ומערך הבקרה עליהם מצוי בראשיתו. ידוע כי רמות ה-mRNA של הרצפטורים עולות לאחר צום וכי הזנה חוזרת משיבה אותן במהירות לרמה שלפני הצום (Tsuchida *et al.* 2004). נמצא גם כי ביצירת מצבי הפואינסולינימיה באופן מלאכותי יש עליה חדה ברמות mRNA של הרצפטורים, בעוד שמתן אינסולין מדכא את הביטוי של הרצפטורים. בתאי β בלב לב נמצאו השפעות שונות לחומצות שומן שונות. בעוד שחשיפה לחומצה אולאית הביאה להגברת הביטוי של הרצפטורים, חומצה פלמיתית לא השפיעה על רמות ה-mRNA. ברקמת השומן נמצאו הבדלים בביטוי הרצפטורים בין מאגרי השומן השונים (Bluher *et al.* 2005). בצום הביטוי של AdipoR1 היה גבוה יותר ברקמת שומן חום וברקמת שומן אפיגונלי בעוד שברקמת שומן תת עורית היה הביטוי שלו נמוך יותר. במקביל, הביטוי של AdipoR2 היה גבוה יותר ברקמת שומן אפיגונלית אך לא נמצאה עדות לבקרה של צום או אכילה על ביטוי ברקמת שומן תת עורית או בשומן חום. כמו כן נמצא כי קיים דפוס ביטוי תלוי שעות יום בכל רקמות השומן, וכי הביטוי של הרצפטורים היה נמוך יותר בין השעות 20:00 ל-6:00 (Bluher *et al.* 2005).

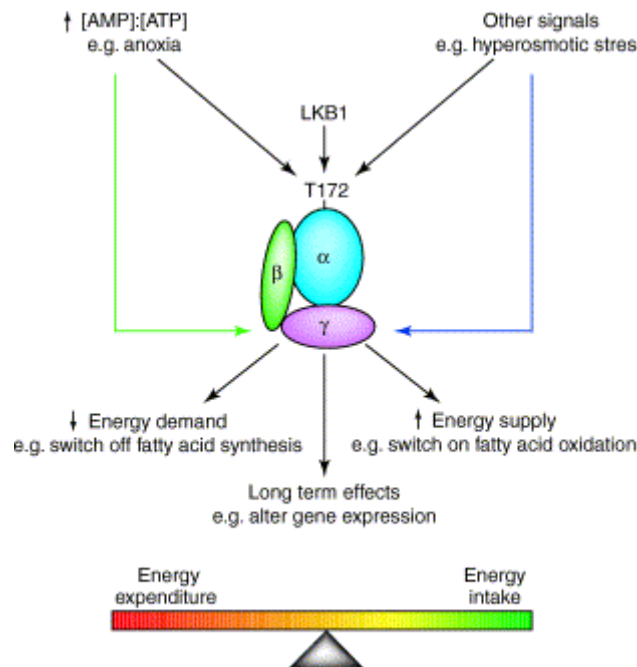
1.3 AMPK – AMP activated protein kinase

האנזים AMPK תואר לראשונה בשנת 1987 (Carling *et al.* 1987) הגם שאספקטים של הפעילות שלו תוארו בשני דיווחים בלתי תלויים כבר ב-1973 (Beg *et al.* 1973; Carlson and Kim 1973). האנזים הינו חלבון הטרו-טרימר המורכב מיחידה קטיליטית α , ומשתי תת-יחידות רגולטריות המסומנות β ו- γ . תת יחידה α בעלת פעילות של קינאז בקצה ה-N טרמינלי שלה, ומתחברת ליחידות β ו- γ דרך הקצה ה-C טרמינלי שלה (Crute *et al.* 1998). החלבון שמור מאוד לאורך האבולוציה וחלבונים הומולוגיים לכל 3 תת-היחידות נמצאו בצמחים, שמרים, חרקים ויונקים (Hardie *et al.* 2003). ביונקים קיימות מספר צורות של כל אחת מתת היחידות ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$) שהינן תוצרים של גנים שונים. כל 12 הצירופים האפשריים קיימים ככל הנראה ביונקים ו- alternative splicing של הגנים מוסיף למורכבות של המערכת (Carling 2004). מהות קיומם של האיזופורמים השונים עדיין לא פוענחה במלואה, אך ככל הנראה הם מאפשרים ספציפיות לרקמה וכן ספציפיות בתגובה לסוגי גירוי שונים.

כפי שניתן להבין משם האנזים AMPK הבקרה על השפעול שלו נעשית באמצעות AMP. השפעול על-ידי AMP נעשה באופן ישיר על ידי קשירה לאתר אלוסטרי בתת יחידה γ . מנגנון שפעול נוסף של האנזים הינו זרחון באמצעות החלבון LKB1 על Thr-172 שנמצא בלולאת האקטיבציה על תת יחידה α (Hong *et al.* 2003). בעקיפין AMP מעורר זרחון על-ידי LKB1 (Hawley *et al.* 1995) ומעכב דה-פוספורילציה של האנזים על-ידי פוספטוזות (Davies *et al.* 1995). ככל הנראה, ההשפעה של AMP על הזרחון והדה-פוספורילציה נעשית באמצעות קשירה ישירות ל-AMPK ולא לקינאזות או הפוספאטוזות של AMPK. העובדה ש-AMP משפעל את האנזים AMPK בשלושה מנגנונים משמעה שהמערכת רגישה מאוד לשינויים קטנים בריכוזי AMP תאיים.

הנוקליאוטיד ATP בריכוזים גבוהים הינו אנטגוניסט של כל שלושת המנגנונים הקשורים ב-AMP ומכאן שהמערכת מווסתת למעשה שינויים ביחס AMP:ATP התאי. מגוון מצבים ומצבי לחץ המעלים ריכוזי AMP ומורידים ריכוזי ATP גורמים לשפעול של AMPK. מצבים אלו יכולים להגרם כתוצאה מרעלים מטבוליים המעכבים שלבים שונים במטבוליזם של גלוקוז או חומרים מפרי צימוד בשרשרת הנשימה. כן ייתכנו מצבי עקה פתולוגיים כגון מחסור בגלוקוז (רעב), איסכמיה, מחסור בחמצן או עקה חמצונית. במצבים פיזיולוגיים תקינים נגרמת עקה שמקורה בצריכת ATP בשל פעילות גופנית (Winder and Hardie 1996). השפעול של AMPK בתגובה לפעילות גופנית גורם לעיכוב ישיר של מסלולים צרכי ATP. במקביל מוגברים מסלולים מטבוליים של פחמימות ושומנים במטרה להעלות בחזרה רמות ATP בשריר.

ידוע גם כי האנזים משופעל על ידי התרופות לטיפול בסוכרת מסוג 2 מטפורמין (Zhou *et al.* 2001) ותרופות ממשפחת התיאזולידינזונים (TZD) (Fryer *et al.* 2002). אולם, עדיין נדרש מחקר נוסף שיבהיר עד כמה השפעול של AMPK חיוני להשפעות התרופויות של התרופות.



T/BS

תמונה 4: AMPK משמר את מאזן האנרגיה התוך תאי בתגובה לשינוי ביחס AMP:ATP (Carling 2004)

פרט לשינוי ביחס AMP:ATP מושפע AMPK ממספר אדיפוקינים. פרט לאדיפונקטין, שנידון בהרחבה, גם לפטין משפעל את AMPK על ידי זרחונו. לפטין, המופרש מרקמת השומן בכמויות הולכות ועולות ככל שמסתה עולה, ידוע כבעל השפעה מרכזית על וויסות של צריכת מזון. לפטין מעורר חמצון חומצות שומן (Minokoshi *et al.* 2002) וצריכת גלוקוז על ידי הרקמות (Kamohara *et al.* 1997). כמו כן הוא מונע הצטברות שומנים ברקמות שאינן רקמת השומן, שאלמלא כן עלולה לגרום לפגיעה בתפקוד (Unger 2002). הגם שידוע כי ללפטין השפעה על מסלולי ביטוי גנים, רבות מהשפעותיו מיידיות מכדי ליחסן למסלולים אלה. אכן, בשנת 2002 נמצא כי לפטין גורם לזרחון ושפעול של תת יחידה α של AMPK בשרירי שלד (Minokoshi *et al.* 2002). פרט ללפטין ידוע כי רזיסטין, אדיפוקין הידוע כגורם לתנגודת לאינסולין בכבד, מפחית את הזרחון של AMPK בכבד (Muse *et al.* 2004). יחד עם זאת זהו מידע ראשוני ועדיין לא ברור האם זוהי השפעה מרכזית של רזיסטין.

השפעול של AMPK גורם להפעלה של מסלולים קטבוליים המייצרים ATP ובמקביל עוצר מסלולים צורכי ATP, בעיקר מסלולים אנאבוליים. השפעה זאת מתרחשת באמצעות זרחון ישיר של אנזימים המעורבים בתהליכים מטבוליים וכן באמצעות השפעות ארוכות טווח על ביטוי גנים וחלבונים. AMPK משפיע על הצריכה האנרגטית, שימוש באנרגיה ואחסנת אנרגיה באמצעות ויסות צריכת המזון והמטבוליזם. הוא מווסת מגוון רחב של מולקולות ומסלולים המבקרים צריכת גלוקוז ושומנים ואחסונם בשרירי השלד, הלב, רקמת השומן, הכבד ותאי β בלב.

אחד המסלולים המרכזיים המושפעים משפעול AMPK הוא חמצון חומצות שומן. AMPK מזרחה את האנזים ACC, המזרז סינתזה של מלוניל-CoA מאצטיל CoA. זהו השלב קובע הקצב בסינתזה של חומצות שומן, שהיות שמלוניל CoA הינו חומר המוצא לסינתזה חומצות שומן בריכוזים גבוהים מלוניל-CoA מעכב את השלב קובע הקצב של כניסת חומצות שומן למיטוכונדריה לצורך חמצון. הזרחון של ACC מעכב את האנזים ובכך גורם לירידה ברמות מלוניל-CoA התאיות ולעליה בחמצון חומצות שומן. מסלול זה נחשב להשפעתו המרכזית של AMPK, הוא מוביל להפחתת מאגרי השומן בשריר ובכבד ומכאן ההשפעה של AMPK בהגברת הרגישות לאינסולין.

פרט להשפעתו על מסלולים מטבוליים, AMPK הוא ווסת חשוב של צריכת מזון באמצעות פעילותו במח. הפעילות שלו בהיפותרמיה מושפעת ממחזורי צום ואכילה כלומר, צום מגביר את פעילות AMPK במח בעוד שהזנה חוזרת מדכאת את פעילותו. לפטין מדכא פעילות AMPK במח, דיכוי זה חיוני להשפעות של דיכוי התיאבון והירידה במשקל האופייניות ללפטין. לעומתו פפטידים מעוררי תיאבון כגון גרלין מעוררים פעילות של AMPK בהיפותרמיה. השפעות הפוכות אלה מעידות על כך שמערכת זו מתפקדת בשני הכיוונים, הן לדכא והן לעורר תיאבון (Andersson *et al.* 2004). האפשרות ששינויים בפעילות של AMPK יכולים להסביר שינויים בצריכת המזון מחזקת על-ידי העובדה ששפעול ישיר של AMPK בהיפותרמיה מביא להגדלת צריכת המזון ולעליה במשקל הגוף. עיכובו גורם לירידה בצריכת המזון ולאבדן משקל גוף (Minokoshi *et al.* 2004).

ACC – Acetyl-CoA carboxylase 1.4

האנזים ACC מזרז את הקרבוקסילציה של אצטיל-CoA ללמלונל-CoA. מלונל-CoA הינו הפרקורסור המרכזי בסינתזת חומצות שומן (Hardie 1989). במקביל הוא גם ווסת חיוני של חמצון β של חומצות שומן במיטוכונדריה על ידי העיכוב של האנזים palmitoyltransferase-1 (CPT1) (McGarry and Brown 1997). האנזים CPT1 קובע את קצב כניסת חומצות שומן ארוכות למיטוכונדריה לצורך חמצון. ביונקים, ACC הוא אנזים רב-תפקידי, השייך למשפחה של אנזימים המזרזים מעבר בין מולקולרי של קבוצת קרבוקסיל באמצעות ביוטין כקבוצה פרוסטטית. המידע על מבנה האנזים מוגבל, אך ידוע כי הוא בעל קבוצת ביוטין נושאת קרבוקסיל, ביוטין קרבוקסילאז וקרבוקסיל טרנספראז, כל הדומיינים מצויים בשרשרת חלבונית אחת (Hardie 1989). לאור המידע המבני המועט, מנגנון התגובה המפורט והיבטים רבים של הבקרה של ACC מעורפלים בחלקם. הריאקציה עצמה, כמו בשאר האנזימים במשפחה, מתרחשת בשני שלבים: 1. קרבוקסיליה של הביוטין 2. העברת הקרבוקסיל מהביוטין למולקולה המקבלת. המשקל המולקולרי הנמוך ביותר של האנזים הנטיבי מעיד כי התצורה הקטנה ביותר שלו *in vivo* הינה כדימרים. במערכות *in vitro* נמצאו אף מבנים פולימריים בעלי משקלים גבוהים, אולם קיימת מחלוקת לגבי טיבם של פולימרים אלו, האם הם אכן קיימים *in vivo* ומהו תפקידם בפעילות של האנזים (Iverson *et al.* 1990). מבחינת המבנה של האנזים עולה כי האתר הפעיל שלו מצוי באיזור הממשק של הדימר. השיירים המעורבים בתהליך שמורים היטב במינים שונים, מה שמעיד על כך שמבנה דומה קיים במגוון רחב של מינים (Zhang *et al.* 2003).

לאנזים שני איזופורמים עיקריים: ACC α בעל משקל של כ- 265kDa ו- ACC β בעל משקל של כ- 280kDa, ההבדל במשקל האיזופורמים נובע מקצה N טרמינלי מוארך של ACC β . שני האיזופורמים הם תוצרים מובחנים של שני גנים נפרדים, הגן ל- ACC α מצוי על כרומוזום 17 (Abu-Elheiga *et al.* 1995) והגן ל- ACC β על כרומוזום 12 (Allred and Roman-Lopez 1988). הזיהוי של שני האיזופורמים העלה את הסברה כי קיימים הטרודימרים. אולם, קיים ספק באשר לאפשרות זאת, לאור דפוס הביטוי השונה ברקמות שונות והגילוי כי ACC α הוא ציטוזולי בעוד ACC β ככל הנראה מצומד למיטוכונדריה (Abu-Elheiga *et al.* 2000). קיימת תפוצה נבדלת תלויית רקמה של האיזופורמים השונים שעשויה להעיד על הבדלים פונקציונליים. ברקמות ליפוגניות כגון רקמת השומן או בלוטות חלב ACC α הוא האיזופורם העיקרי. ברקמות צורכות אנרגיה, כגון שרירי השלד והלב, נפוץ בעיקר ACC β (Bianchi *et al.* 1990). בכבד שמקיים הן תהליכים ליפוגניים והן תהליכים ליפוליטיים מופיעים שני האיזופורמים (Abu-Elheiga *et al.* 1997). יחד עם זאת, ACC α מבוטא בכל התאים לצורך סינתזת ליפידים המעורבים בבניית המברנות ובתהליכים תוך תאיים (Mao and Seyfert 2002).

בשריר, עליה בחמצון β קשורה לירידה משמעותית ברמות מלוניל-CoA, בעוד שבכבד העליה בחמצון β מתרחשת ללא שינוי ברמות מלוניל-CoA. הבדלים אלו בין הרקמות מעידים על כך ש-ACC β מצוי באיזור מובדל בתא שאינו נגיש למלוניל-CoA שמקורו ב-ACC α . ככל הנראה, ACC β מצומד לממברנה החיצונית של המיטוכונדריה. הבסיס המולקולרי לצימוד זה טרם פוענח, אולם הוא מערב ככל הנראה איזור הידרופובי בקצה ה-N טרמינלי שאינו קיים ב-ACC α . מרבית ההבדלים בין אנזימים שמקורם במינים שונים מצויים באיזור זה של החלבון, שאינו חלק מהאתרים הקטליטיים שלו.

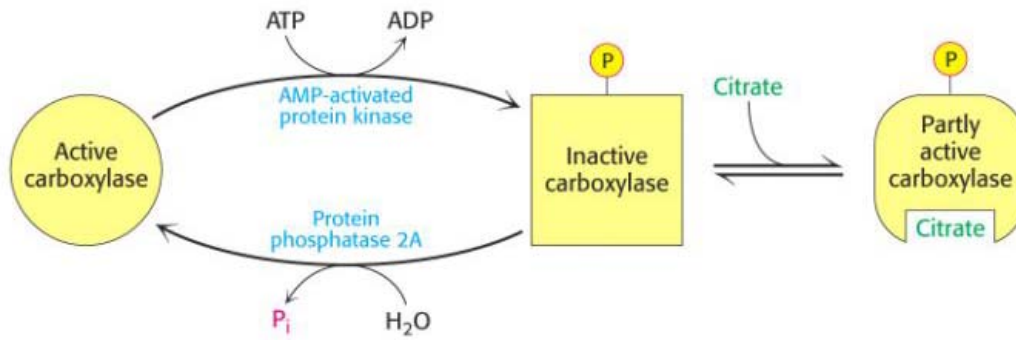
מידת הפעילות של ACC וקצב סינתזת חומצות שומן ברקמות מפתח משתנה במהירות בתגובה למגוון גורמים פיזיולוגיים (Wakil *et al.* 1983). בטווחי זמן ארוכים הבקרה מתבצעת באמצעות מנגנוני שיעתוק ולאחר השעתוק. רמות mRNA של ACC α מצויות בתיאום עם רמות mRNA של אנזימים נוספים המשתתפים בתהליכים ליפוגניים כגון FAS. במידה מסויימת הן מתואמות גם עם רכיבים של מסלולים קשורים אחרים כגון גליקוליזה, כולסטרול אסטר ומסלול הסינתזה של פוספוליפידים (Shimano *et al.* 1999). הבקרה על שעתוק ACC β תלויה ברקמה. בכבד, הרעבה מדכאת את הביטוי של האנזים והזנה חוזרת בארוחה עשירה בפחמימות מעלה את ביטוי (Oh *et al.* 2003). לעומת זאת, בשריר בזמן הרעבה אין שינוי ברמות האנזים אלא רק הורדה של רמות מלוניל CoA באמצעות מנגנונים המדכאים את פעילות האנזים (Winder *et al.* 1995). לביטוי השפעה לא ספציפית על כלל משפחת האנזימים תלויי הביטוי. ייתכן שקיימות גם השפעות ספציפיות של ביטוי על ACC, בעיקר ברמת הביטוי, ככל הנראה באופן תלוי איזופורם (Baez-Saldana *et al.* 2004).

הבקרה בטווח הקצר על פעילות ACC יוצאת לפועל באמצעות מעכבים וזרזים מטבוליים וכן על-ידי זרחון הפיך באמצעות אנזימים (Kim 1983). חומרי ביניים במעגל חומצת הלימון, ציטראט ואיזוציטראט, משפעלים ACC ותהליכי ליפוגנזה. לפיכך, ציטראט משמש כמשפעל קלאסי, בהיותו הפרקורסור המייד של הסובטראט, אצטיל-CoA. ציטראט מזרז את שני שלבי הריאקציה, ככל הנראה על ידי שינוי קונפורמציה (Moss and Lane 1972). שפעול על-ידי ציטראט מעלה את קצב פעילות האנזים אך איננו משפיע על האפיניות שלו לסובסטרט, הוא מערב ככל הנראה ATP הנחוץ הן לפעולת האנזים והן לשילוב הציטראט. כמו כן הוא מונע קשירה של קבוצות אציל-CoA בעלות שרשרת ארוכה שהן בעלות אפקט מעכב וגורם לדיסוציאציה של קבוצות קשורות. גלוטאמט גם הוא משפעל אלוסטרי של ACC, ככל הנראה בשל דימיונו המבני לציטראט (Boone *et al.* 2000). אולם, הוא משפעל חלש מציטראט ומשפיע בריכוזים גבוהים בהרבה. עדיין, הוא עשוי להיות רלוונטי גם בתנאים בתוך התא, היות שגלוטאמט מופיע בתא בטווח רחב של ריכוזים. רמותיו מושפעות מרמות גלוטמין דרך פעילות האנזים גלוטאמינז. בקרה זאת עשויה לספק קשר בין המטבוליזם של חומצות אמינו למטבוליזם של חומצות שומן ופחמימות.

מלוניל-CoA, תוצר הריאקציה של ACC, מתפקד כמעכב תחרותי של האנזים (Gregolin *et al.* 1968). העיכוב משמעותי רק אם נוצרים בסביבת האנזים ריכוזים גבוהים יחסית של המולקולה. קבוצות אציל-CoA בעלות שרשרת ארוכה LCACoAs (Long-chain acyl-CoAs), תוצר המסלול הליפוגני, נחשבות מעכב היזון-חוזר קלאסי של ACC. בתא, הריכוז הכללי של LCACoAs, יכול להיות גבוה בהרבה מה- Ki שלהן (5.5nM), אולם היות שמרבית הקבוצות קשורות לחלבון ACBP (acyl-CoA binding protein) מעריכים כי הריכוז של LCACoAs חופשיות נע בטווח 2-10nM (Faergeman and Knudsen 1997). העובדה שמסלולי סינתזת חומצות שומן פעילים בכבד למרות Ki נמוך של LCACoAs, מעידה על כך שריכוזי LCACoAs חופשיות בציטוזול נמוכים מ- 5.5nM (Faergeman and Knudsen 1997). לפיכך, סביר להניח ש-LCACoAs ולא מלוניל-CoA הינן הרגולטור השלילי בתנאים פיזיולוגיים.

פרט לאפקטורים האלוסטרים, ידוע כי האנזים ACC עובר זרחון שגורם להשבתה שלו, בעוד שהסרת הזרחון משיבה לו את הפעילות. בניסויים באנזים במערכות *in-vitro*, נמצא כי הן AMPK והן PKA מזרחנים את ACC. האנזים PKA מזרחן את האנזים ב-Ser-77 וב-Ser-1200 מה שמוביל לירידה של כ-30% במהירותו המקסימלית ולירידה באפיניות לציטראט. AMPK מזרחן את ACC על סרין בעמדות 79, 1200 ו-1215, מה שמוביל לירידה של 90% במהירות המקסימלית ולירידה חזקה במיוחד באפיניות לציטראט (Davies *et al.* 1990). כאשר בוצעה הסרה פרוטיאוליטית של מקטע מהחלבון הכולל את קבוצות סרין בעמדות 77 ו-79, נמצא כי השפעת הזרחון על ידי PKA ו-AMPK בוטלה. ממצא זה מעיד על כך שזהו האיזור האחראי להשפעה של AMPK ו-PKA, ולא סרין בעמדה 1200, אולם המנגנון של התהליך טרם פוענח (Davies *et al.* 1990).

בניסויים *in-vivo* בתאי שומן והפטוציטים, נמצא ששפעול PKA על ידי גלוקגון ואדרנלין הביא לזרחון של ACC על סרין בעמדות 79 ו-1200, ולא בעמדה 77 כפי שהיה ידוע מניסויי *in vitro* (Haystead *et al.* 1990). תוצאות אלה הביאו את החוקרים לשער כי השפעות של PKA על ACC הינן לא ישירות אלא דרך השפעול של AMPK. השערה זאת נתמכת על ידי הממצא של Birnbaum כי עליה ברמות cAMP באדיפוציטים הביאה לשפעול AMPK ולעליה בשיעור הליפוליזה (Yin *et al.* 2003). ההשערה שהשפעות של AMPK ו-PKA מתווכות על ידי זרחון סרין בעמדה 79 נתמכת על ידי העובדה ששייר זה וסביבתו נמצא שמורים מאוד במספר רב של מינים ובשני האיזופורמים העיקריים של האנזים.



תמונה 5: מנגנון הבקרה המשוער על פעילות ACC

לסיכום, הפעילות נטו של האנזים בתא או ברקמה הינה תוצאה של האינטראקציה בין הרמות של האפקטורים האלוסטריים השונים והפעילות של הקינאז והפוספאטז הספציפיים. הפעילות נטו הינה גם תוצאה של רמות האנזים על צורתיו השונות שעשויות להיות בעלות מאפייני בקרה מעט שונים.

1.5 מטרות המחקר

מטרות המחקר הנוכחי היו להעריך את ההשפעה של משטרים תזונתיים שונים: הגבלה קלורית ותזונה עשירה בשומן רווי על מידת הרגישות לאינסולין וההורמון אדיפונקטין

השאלות הספציפיות שנבדקו:

1. השפעות התזונה על משקל הגוף ועל מדדים שונים של סבילות לגלוקוז ורגישות לאינסולין
2. השפעות משטרי התזונה השונים על ביטוי mRNA והחלבון אדיפונקטין ברקמת השומן ועל רמות אדיפונקטין בסרום.
3. השפעת תזונה עשירה בשומן על ביטוי הרצפטורים לאדיפונקטין בכבד ובשריר ומידת הזרחון של האנזימים AMPK ו-ACC בכבד ובשריר.

2. חומרים ושיטות

2.1 חומרים

2.1.1 כימיקלים וביוכימיקלים:

Abgene

REVERSE-IT™ RTASE BLEND AMV and MMuLV
ReddyMix™ PCR Buffer

Amersham International Life Science, England:

ECL Western Blot Detection Reagents.

Amersham CFB

D – Glucose 200Mci/ml

BDH Laboratory Supplies, England:

EDTA, SDS.

Bio-Rad, CA, USA:

Bradford reagent- Bio Rad protein assay
Prestained Broad Range - Precision Protein, Standards

Boehringer Biochemica Mannheim, Germany:

30% Acrylamid-Bis acrylamid,
Proteinase inhibitor cocktail tablets.

DiaSorin Inc. MN, USA

Insulin RIA kit (INSIK5 P2796).

Eastman Kodak NY, USA.

Agarose.

Fiber Sales & Development Corp.

Cellulose

Fluka, USA:

Glucose anhydrous, Skim milk powder, TEMED.

Frutarom Chemicals LTD, Haifa, Israel:

Sucrose,

Sodium hydroxide

Potassium chloride

Ethyl alcohol

Acetic acid

Methanol

Starch.

Fuji Film, Japan:

Fuji medical x-ray film, 100 nF.

J.T. Baker, USA:

Sodium chloride .

Tween 20 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate)

LINCO Research, Inc. MO, USA

Adiponectin Ria Kit (MADP-60HK)

Merck, Germany:

Glycerol,

Riedel-de Haen, Germany:

K₂HPO₄ (di-Potassium hydrogen phosphate).

Sigma Chemicals, MO, USA:

2-Mercaptoethanol

APS

Bromophenol Blue

BSA

DTT

EDTA

Etidium Bromide

Glycine

HEPES

MgSO₄

NP-40

pyruvic acid

TEMED

Tri-Reagent

Tris

2.1.2 נוגדנים:

Affinity BioReagents, CO, USA

Adiponectin

Cell Signaling Technology, Inc, USA:

AMPK

Phospho-AMPK (Thr-172)

ACC

phospho-ACC (Ser-79)

Pierce IL, USA:

Goat anti Rabbit IgG peroxidase conjugated.

2.1.3 פריימרים ל-PCR:

MBC, Israel:

Adiponectin - mouse

Forward GGA GAG AAG GGA GAG AAA GGA G

Reverse TGT CGA CTG TTC CAT GATT CTC

Adiponectin - rat

Forward AAT CCT GCC CAG TCA TGA AG

Reverse GTC CCC TTC CCC ATA CAC TT

AdipoR1 - mouse

Forward TCT CCT GGC TCT TCC ACA CT

Reverse GAC AAA GCC CTC AGC GAT AG

AdipoR2 - mouse

Forward CCC TCT GCA AGA GAA AGT GG

Reverse TAG CCA GCC TAT CTG CCC TA

18S

Forward TCG AAC GTC TGC CCT ATC

Reverse CAG ACT TGC CCT CCA ATG

2.2 שיטות עבודה:

2.2.1 חיות הניסוי.

14 חולדות Sprague Dawley ממין זכר במשקל 250 ג"ר ו- 40 עכברים C57BL/J6 ממין זכר במשקל 18-20 גר', סופקו על ידי חברת Harlan ירושלים. החולדות והעכברים הוחזקו בבית החיות של הפקולטה לחקלאות בכלובים סטנדרטים, על מצע של נסורת עץ, בצפיפות של חולדה בודדת בכלוב ו- 5 עכברים בכלוב עם גישה חופשית למזון ולמים. התנאים בבית החיות נשמרו מבוקרים בטמפרטורה של (22-24 °C), ובתנאי הארה של 12 שעות אור ו- 12 שעות חושך ביממה. העבודה נעשתה על פי הנחיות הועדה האחראית לניסויים בבעלי חיים באוניברסיטה העברית בירושלים.

2.2.1.1 הגבלה קלורית:

החולדות חולקו לשתי קבוצות (7 חולדות בקבוצה). במהלך השבוע הראשון היתה לחיות גישה חופשית למזון, המזון נשקל על בסיס יומיומי ונאמדה הצריכה. החל מהשבוע השני הועברה קבוצה אחת של החיות להגבלה קלורית בהדרגתיות ובתום השבוע הן קיבלו 60% מצריכת המזון הממוצעת ליום. המזון נשקל וחולק לחולדות בקבוצת הניסוי מדי יום. לחיות בקבוצת הביקורת היתה גישה חופשית למזון בכמות בלתי מוגבלת. החיות נשקלו מדי שבוע, הניסוי נמשך 18 שבועות.

2.2.1.2 דיאטה עשירה בשומן:

העכברים חולקו לשתי קבוצות (20 עכברים בקבוצה). כל קבוצה הוזנה באחת משתי דיאטות, דיאטה עשירה בשומן אשר הכילה שמן סויה ושומן דקלים ברמה של 42% מהצריכה הקלורית וקבוצת ביקורת שקיבלה דיאטה שהכילה שמן סויה ברמה של 16% מהצריכה הקלורית. הרכב הדיאטות מתואר בטבלה מס' 1. על מנת למנוע חמצון השמנים הדיאטות אוחסנו ב-20°C וכל יומיים הוחלף המזון בכלי האוכל בכלובי החיות. החיות נשקלו מדי שבוע, הניסוי נמשך 20 שבועות.

2.2.1.3 דיאטות הניסוי.

טבלה מס' 1: הרכב הדיאטות (g/Kg).

ביקורת	עשירה בשומן	
200	200	קזאין
3	3	מתיונין
527	377	עמילן
100	100	סוכרוז
50	50	תאית
70	70	שמן סויה
0	150	שומן דקלים
40	40	מינרלים
10	10	ויטמינים
0.014	0.014	BHT
1000	1000	סה"כ

2.2.2 העמסת גלוקוז OGTT .

שלושה ימים לפני הקרבת החיות, נלקחה טיפת דם מקצה הזנב, על מקלון מדידה עבור בדיקת רמות גלוקוז בדם תוך שימוש בגלוקומטר (Medisence- Precision Q.I.DTM). לאחר מכן הולעטו החיות בגלוקוז (0.3 gr גלוקוז לכל 100 gr חולדה/עכבר) בעזרת מזרק ומחט הלעטה לתוך הקיבה. רמות הגלוקוז בדם נמדדו בזמנים 30, 60, 90 ו-120 דקות מרגע ההלעטה.

השטח תחת העקומה (AUC) חושב לפי כלל הטרפז.

2.2.3 דגימות רקמה.

2.2.3.1 שריר

נלקחו שרירי רגל Gastrocnemius הוקפאו בחנקן נוזלי, נטחנו והועברו לבקבוקונים, הדוגמאות הוקפאו ב -80°C עד לביצוע הבדיקות.

2.2.3.2 דגימות דם

ביום ההקרבה, לאחר הוצאת השרירים, נאספו דגימות דם מהוריד הנבוב התחתון למבחנות של 10 ml ללא EDTA שנשמרו על קרח. המבחנות סורכזו ב- 1500 x g במשך 10 דקות ב 4°C . הסרום הועבר להקפאה ב- -20°C , עד לביצוע הבדיקות.

2.2.3.3 כבד

לאחר הוצאת הדם הוצא הכבד. הרקמה נשקלה במהירות והוקפאה בחנקן נוזלי, נטחנה והועברה לבקבוקונים, הדוגמאות הוקפאו ב -80°C עד לביצוע הבדיקות.

2.2.3.4 שומן

רקמת השומן מהאשכים הוצאה בשלמותה, ללא כלי הדם. הרקמה ונשקלה במהירות והוקפאה בחנקן, נוזלי נטחנה והועברה לבקבוקונים שאוחסנו ב -80°C עד לשימוש.

2.2.4 בדיקת אדיפונקטין ואינסולין בסרום. (Radioimmunoassay)

עקרון: השיטה מבוססת על השיטה שתוארה על ידי (Morgan CR 1963; Feldman H) (1971), לפי שיטה זו ההורמון (אדיפונקטין/אינסולין) בדוגמא נקשר לנוגדנים ספציפיים לו ומתחרה עליהם עם הורמון מסומן רדיואקטיבי בכמות קבועה וידועה. ככל שרמות ההורמון בסרום גבוהות כמות גדולה ממנו נקשרת לנוגדנים ורמת הקרינה הרדיואקטיבית קטנה. ביצוע השיטה:

2.2.4.1 אינסולין

הוכן עקום כיוול עם ריכוזי אינסולין ידועים, דוגמאות הסרום הופשרו והוכנות מבחנות עם $100 \mu\text{g}$ סרום (בשתי חזרות לכל דוגמא). לכל המבחנות הוספו, $100 \mu\text{g}$ אינסולין מסומן ב- ^{125}I , ו- $100 \mu\text{g}$ נוגדן. המבחנות עורבבו בעזרת Vortex והודגרו למשל הלילה במקרר. ביום השני הוספו 1 ml ריאגנט השקעה לכל המבחנות, בוצע וורטקס והמבחנות הושארו לעמוד במשך 15 דקות בטמפרטורת החדר. לאחר מכן סורכזו כל המבחנות במשך 15 דקות ב- $2000 \times g$. מיד בתום הסירכוז נשאב הנוזל העליון. לאחר מכן נקראו כל המבחנות ב-gamma counter למשך דקה.

2.2.4.2 אדיפונקטין

הוכנו מבחנות Total (רק אדיפונקטין מסומן ב- ^{125}I), מבחנות Non Specific Binding (NSB) עם אדיפונקטין מסומן ב- ללא נוגדן, ומבחנות B_0 (מקסימום קשירה) עם אדיפונקטין מסומן ב- ונוגדן. כמו כן הוכנו מבחנות עקום כיוול עם $100 \mu\text{g}$ אדיפונקטין לא מסומן בריכוזים ידועים ומבחנות של הדוגמאות עם $100 \mu\text{g}$ דוגמא מהולה, (2 מבחנות מכל סוג). לכל המבחנות הוסף $100 \mu\text{g}$ בופר ריאקציה פרט ל- NSB ($300 \mu\text{g}$) ו- B_0 ($200 \mu\text{g}$). לכל המבחנות הוסף $100 \mu\text{g}$ אדיפונקטין מסומן ב- ^{125}I ולכל המבחנות הוסף $100 \mu\text{g}$ נוגדן לאדיפונקטין פרט למבחנות Total ו- NSB. המבחנות עורבבו ב- vortex והודגרו למשך הלילה בטמפרטורת החדר. למחרת הוספו לכל המבחנות פרט למבחנות ה- Total $10 \mu\text{g}$ נוגדן שני לארנב ו- 1 ml ריאגנט השקעה מצונן (4°C). המבחנות עורבבו ב- vortex והושארו למשך 20 דקות. כל המבחנות פרט למבחנות Total סורכזו ב- $3000 \times g$ בטמפרטורה 4°C במשך 20 דקות. מיד בתום הסירכוז נשאב הנוזל העליון. לאחר מכן נקראו כל המבחנות ב-gamma counter למשך דקה.

2.2.4.3 חישוב התוצאות

התוצאות חושבו על ידי הנוסחה:

$$\% \frac{B}{B_0} = \frac{Sample_{Count}}{Bound - Total_{Count}} \cdot 100$$

B_0 - מקסימום קשירה במבחנה ללא הורמון קר.

התוצאות של Percent Bound הוצבו בעקומת הסטנדרט LogLogit והתקבלו תוצאות של אינסולין ב- $\mu\text{U/ml}$ או של אדיפונקטין ב- ng/ml שהומרו ל- $\mu\text{g/ml}$ ע"י הכפלה ב- 1000.

2.2.5 הפקת דוגמאות חלבון קביעת חלבון כללי בשיטת Bradford.

דוגמאות רקמת הכבד, השריר והשומן הומגנו ע"י פוליטרון בבופר ליזיס קר (Tris 20mM, NaCl 145mM, Glycerol 10%, EDTA 5mM, Triton-X 1%, NP-40 0.50%, PMSF 100 μM , NaF 50 μM , Na_3VO_4 1mM, Protease inhibitors 8850 μg , ביחס של 1ml בופר לכל 0.2 gr רקמה. הרקמות סורכזו ב- 4°C במהירות של 8850x, במשך 20 דקות. בדוגמאות שומן נוצרה פאזת שומן עליונה, הפאזה המרכזית נלקחה וסורכזה שוב באותם תנאים על מנת להשתחרר מעודפי שומן. קביעת חלבון נעשתה לפי (Bradford 1976) כאשר חלבון אלבוּמין מסרוּם בקר (BSA 1 mg/ml) שימש כסטנדרט לעקומת כיוול. מהנוזל העליון של הדוגמא המסוכרזת נלקחה דוגמה ונמהלה, אליה של הוספה תמיסת ריאגנט Bradford המהולה 1:5 במים מזוקקים. לאחר טלטול והמתנה של 5 דקות, נמדדה עוצמת הבליעה של הדוגמאות באורך גל 595nm במכשיר ELISA reader מודל 450 של חברת Bio-Rad.

2.2.6 קביעת חלבון ספציפי: Western Immunoblotting.

דוגמה שהכילה 5 mg חלבון, הומסה ב- Sample buffer (Stacking buffer, SDS 3.6%, 20% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol ו-1% Bromophenol blue) ביחס של 1:3 ונשמרה ב-20°C עד השימוש. הדוגמא הועמסה על ג'ל SDS PAGE בריכוז המתאים לגודל החלבון הנבדק (15% עבור אדיפונקטין, 10% עבור AMPK או phospho-AMPK ו-7.5% עבור ACC או phospho-ACC), הרצת הדוגמאות בג'ל נעשתה עם בופר הרצה Tris-Glycine המכיל 1% SDS וארכה 1-2 שעות בעוצמת זרם של 45mA לכל פלטת ג'ל. בתום ההרצה, החלבונים המופרדים הועברו לממברנת ניטרולולוז עם בופר העברה (T.B) Tris-Glycine המכיל 20% Methanol בתהליך Electrotransfer. העברת החלבונים התבצעה ב-4°C, במשך שעתיים בעוצמת זרם של 250mA. לאחר העברת החלבונים (Blotting), הממברנה הושרתה בבופר מיוסוך (Blocking) שהכיל 5% אבקת חלב רזה או 5% BSA אשר הומסו ב- TBST במשך שעתיים בטמפרטורת החדר.

בתום המיטוך, הודגרה הממברנה למשך הלילה ב- 4°C בתמיסת TBST המכילה 5% BSA או 5% אבקת חלב רזה ונוגדנים ספציפיים נגד אדיפונקטין (במיהול 1:4000 עבור עכבר, 1:2000 עבור חולדה) או נגד AMPK (במיהול 1:2000), או נגד האנזים המזורחן phospho-AMPK (במיהול 1:1000 לכבד, 1:500 לשריר) או נגד ACC (במיהול 1:2000 לכבד, 1:500 לשריר) או נגד phospho-ACC (במיהול 1:500). בתום ההדגרה, נשטפה הממברנה ב- TBS-t (שטיפה אחת מהירה ו-4 שטיפות של 10 דקות כל אחת) להסרת קשירה לא ספציפית. לצורך זיהוי אתרי קשירת הנוגדן הספציפי, הודגרה הממברנה עם תמיסת TBS-t המכילה 5% BSA או 5% אבקת חלב רזה ונוגדן שני Goat anti rabbit IgG Peroxidase (במיהול 1:20,000). בתום הדגרה של שעה בטמפרטורת החדר, נשטפו עודפי הנוגדן השני עם TBS-t (שטיפה אחת מהירה ו-4 שטיפות של 10 דקות כל אחת). חשיפת הממברנה לפילם ופיתוח הפילם נעשתה בשיטת enhanced chemiluminescence (ECL).

2.2.6.1 דנסיטומטריה.

כימות רמת ביטוי חלבון נעשתה על ידי סריקה בסורק Umax 400pro ושימוש בתוכנת הדנסיטומטריה GelPro.

2.2.7 הפקת Total RNA

הפקת ה-RNA נעשתה על פי השיטה שתוארה על ידי (Chomczynski and Sacchi, 1987), רקמות הכבד והשריר הומגנו ב-Tri-Reagent ביחס של 1ml Tri-Reagent לכל 0.2 gr רקמה. רקמת השומן הומגנה ביחס של 1 Tri-Reagent לכל 0.4gr רקמה. רקמת השומן המהומגנת סורכה במשך 10 דקות *g 12,000 ב- 4°C ונוצרה פאזה עליונה שומנית, הפאזה הנוזלית התחתונה נאספה לצורך המשך עבודה. לאחר אינקובציה של 5 דקות בטמפרטורת החדר, הוסף לכל מבחנה, 0.2ml כלורופורם והמבחנה נוערה כ-15 שניות עד לקבלת צבע ורוד. הרקמות סורכו ב 4°C במהירות של 12000xg, במשך 15 דקות. הפאזה הנוזלית העליונה השקופה נאספה, הועברה לאפנדורף עם 0.5ml איזופרופנול והושארה לאינקובציה בטמפרטורת החדר, ל-10-5 דקות. לאחר מכן סורכו המבחנות ב-12000xg במשך 10 דקות ב- 4°C והורחק הנוזל העליון. המשקע (RNA) הורחף באתנול, 75% האפנדופים סורכו ב-12000xg במשך 5 דקות ונשפך הנוזל העליון. האפנדורפים הונחו פתוחים במנדף, להרחקת האתנול ולאחר מכן הומסו במים שטופלו ב-DEPC.

ריכוז ה-RNA, נקבע קריאה בספקטרופוטומטר קפילרי במקרה של כמויות RNA קטנות או ע"י מיהול פי 40 וקריאה בספקטרופוטומטר באורכי גל 260, 280. דוגמאות אשר הראו יחס $260/280=1.7-2$ נשמרו ב 20°C עד לשימוש.
ריכוז ה-RNA בדוגמא חושב לפי הנוסחה:

שיעור מיהול הדגימה $\text{RNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{O.D}_{260} \times 40 \times$

$10 \text{ O.D} = 40\mu\text{g RNA/ml}$

2.2.8 קביעת רמות cDNA - PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) הינה שיטה, המאפשרת ריבוי מקטעי cDNA יחודיים, על ידי שימוש בפריימרים ספציפים, המוכנסים למערכת הריאקציה.
ה- RT (Reverse Transcriptase) מאפשר שימוש ב-mRNA ליצירת cDNA.
יצירת cDNA מ-mRNA.

1-5 $\mu\text{g RNA}$

1 μl 0.5 $\mu\text{g Oligo dt}$ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

2 μl Amplification Primer 1 (10 μM) (ANTISENCE)

חימום הדוגמאות ל- 100°C ל-5 min וקרור מידי בקרח.

5 μl 5X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]

1.25 μl 10 mM (each) dNTP Mix (NUCLEOTIDE MIX)

1 μl M-MLV RT (H-)

18 μl RNA WATER

Mix Gently

חימום במכשיר ה-PCR על פי תוכנית ה-RT.
50 דקות 40°C - 55°C יצירת הגדיל המשלים של ה-cDNA.
15 דקות 70°C אינאקטיבציה של האנזים.

הגברת ה-cDNA על ידי PCR

2.5 μl 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]

1.5 μl 25 mM MgCl₂

0.5 μl 10 mM dNTP Mix (NUCLEOTIDE MIX)

1 μl Amplification Primer 1 (10 μM)

1 μl Amplification Primer 2 (10 μM)

0.25 μl Taq DNA polymerase (2-5 U/ μl)

0.5-5 μl cDNA (from first strand reaction, preferably RNase H-treated)

Add up to 25 μl Autoclaved DEPC Treated distilled water.

PCR על פי התוכנית לפי הטבלה שלהלן:
 30 שניות 94°C דנטורציה של הפריימרים והגדילים של cDNA,
 30 שניות $X^{\circ}\text{C}$ הברידיזציה של הפריימרים אל מקטעי cDNA,
 30 שניות 72°C התארכות הגדילים החדשים וחזרה לדנטורציה Y מחזורים.
 10 דקות השלמת התארכות ב 72° .

טבלה 2: תנאי ריאקציית PCR לכל גן:

	X °C	Y cycles			גודל תוצר
		שומן	שריר	כבד	
Rat					
18S		20			
Adiponectin	57	24			628
Mouse					
18S	55	14	19	15	266
Adiponectin	57	22			599
AdipoR1	57		25	26	320
AdipoR2	57		28	26	415

המערכת ל-PCR: נעשה PCR עם מספר עולה של מחזורים לזיהוי הטווח הלינארי עבור כל גן.

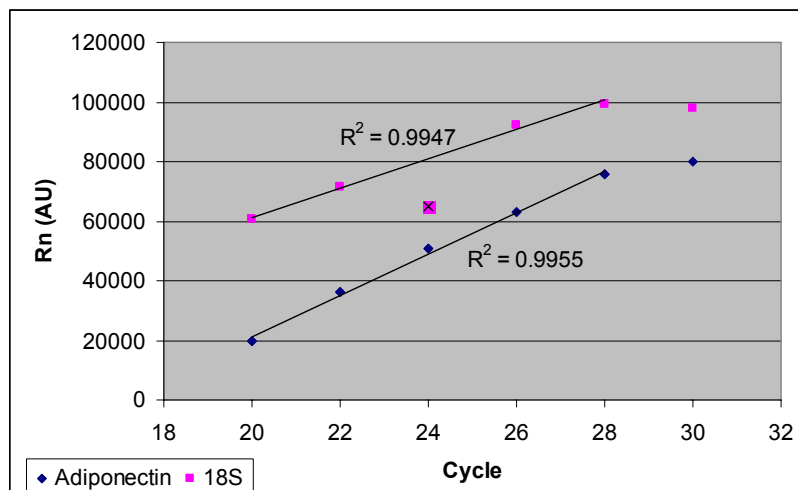
2.2.8.1 חולדה:



18S

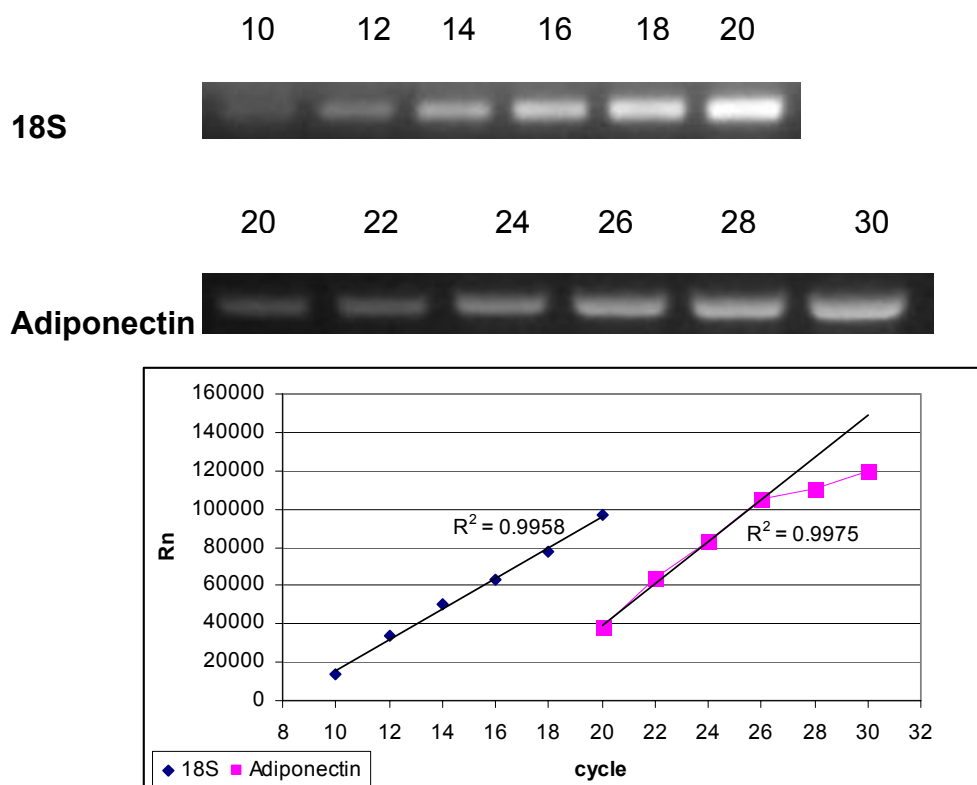


Adiponectin

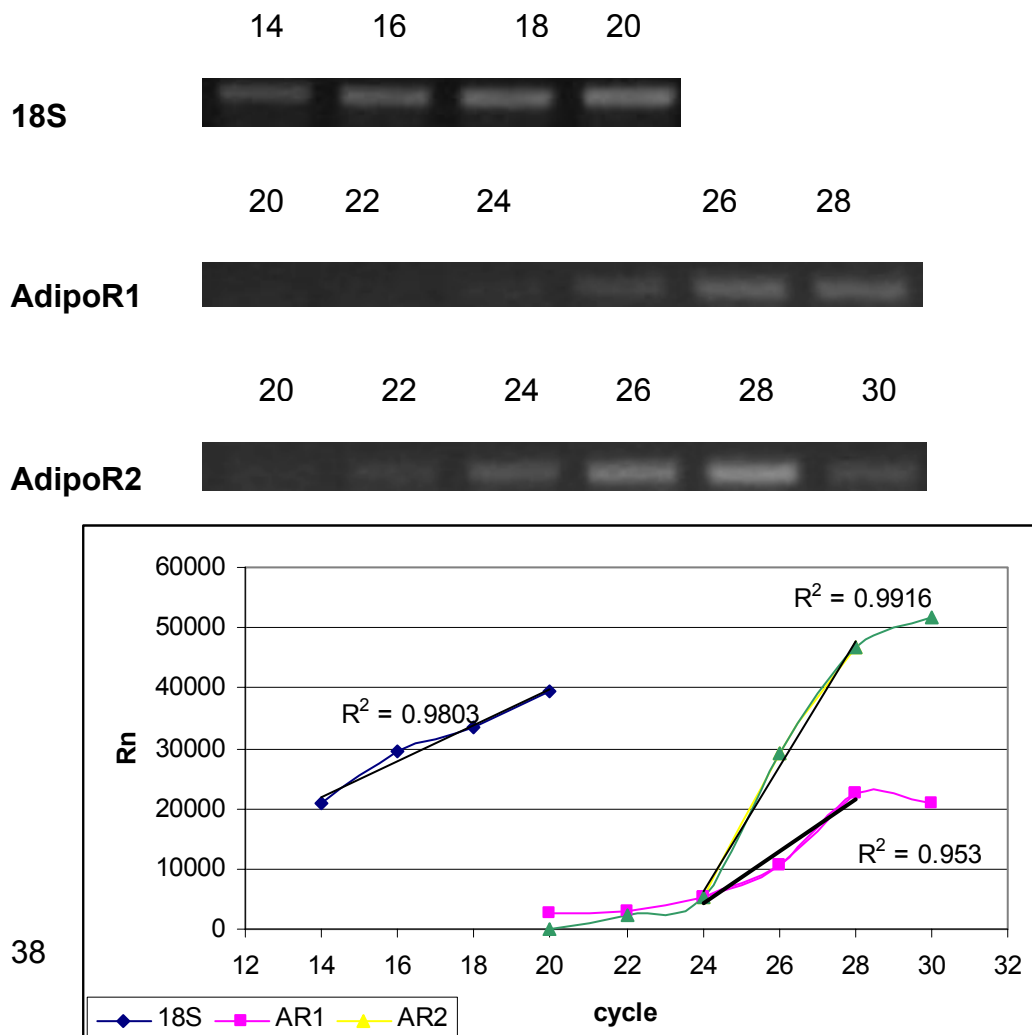


2.2.8.2 עכבר

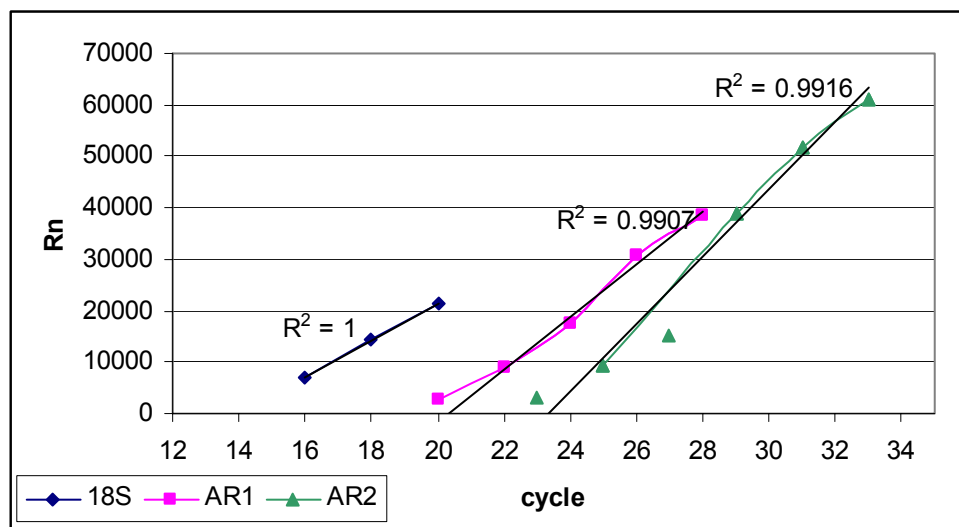
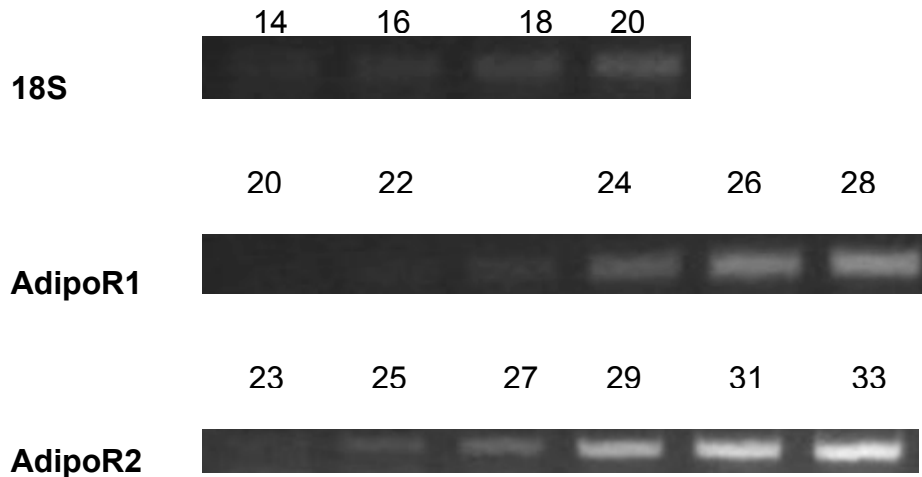
רקמת שומן



רקמת כבד



38



2.2.8.3 הפרדת מקטעי cDNA על ידי אלקטרופורזה.

תוצרי ה RT PCR הופרדו על ג'ל אגרוז 1% בבופר TAE נוכחות אתידיום ברומיד, במכשיר אלקטרופורזה אופקי של חברת "תמר". לכל דוגמא הוסף 10x Loading Buffer ולאחר ערבוב הוטען לג'ל. ההרצה נעשתה בבופר TAE במתח של 100V ללא הגבלת זרם במשך כ-90 דקות. לאחר ההרצה צולם הג'ל במצלמה דיגיטלית על שולחן UV ונעשתה דנסיטומטריה לצילום.

Real-Time Quantitative PCR 2.2.9

real-time PCR הינה שיטה הדומה במהותה ל- PCR שתוארה לעיל, וגם בה יש הגברה של החומר הגנטי בעזרת אנזים. אולם, בשיטה זאת כמות החומר הגנטי הנוצרת במבחנה נאמדת בזמן אמת במהלך התרחשות הריאקציה ולא בסופה. במהלך הריאקציה נמדדת הפלואורסציה של SYBR green הנכלא בין סלילים כפולים של DNA, ככל שכמות החומר הגנטי גדלה כך גדלה מידת הפלואורסציה. שיטה זאת מאפשרת קביעה כמותית של ביטוי mRNA של גנים והשוואה מדוייקת בין קבוצות להבדיל משיטת ה- PCR המסורתית.

דוגמאות ה- cDNA מהרקמות השונות נמהלו בהתאם לגן הנבדק ונעשה שימוש בפריימרים שתוכנו בתוכנת primer express לפי הטבלה שלהלן:

Gene	Forward	Reverse
adiponectin	CAG GCA TCC CAG GAC ATC C	CCA AGA AGA CCT GCA TCT CCT TT
adipoR1	AGT TCA TGT ATA AGG TCT GGG AGG	CAC ATC TAC GGG ATG ACT CTC CA
adipoR2	TTC CTA TTA TGA AAA TAG CCC GGA	CAT GAT GGG AAT GTA GGA GC
18S	CAC GGA CAG GAT TGA CAG AT	CAA ATC GCT CCA CCA ACT AA

הריאקציות בוצעו במערכת ABI 7300.

הריאקציה נערכה בנפח 20µl וכל מבחנה הכילה:

10 µl 2XQPCR SYBR Green mix (Buffer, DNA polymerase, SYBR Green, dNTP mix, MgCl₂)

1 µl Amplification forward primer (500 nM)

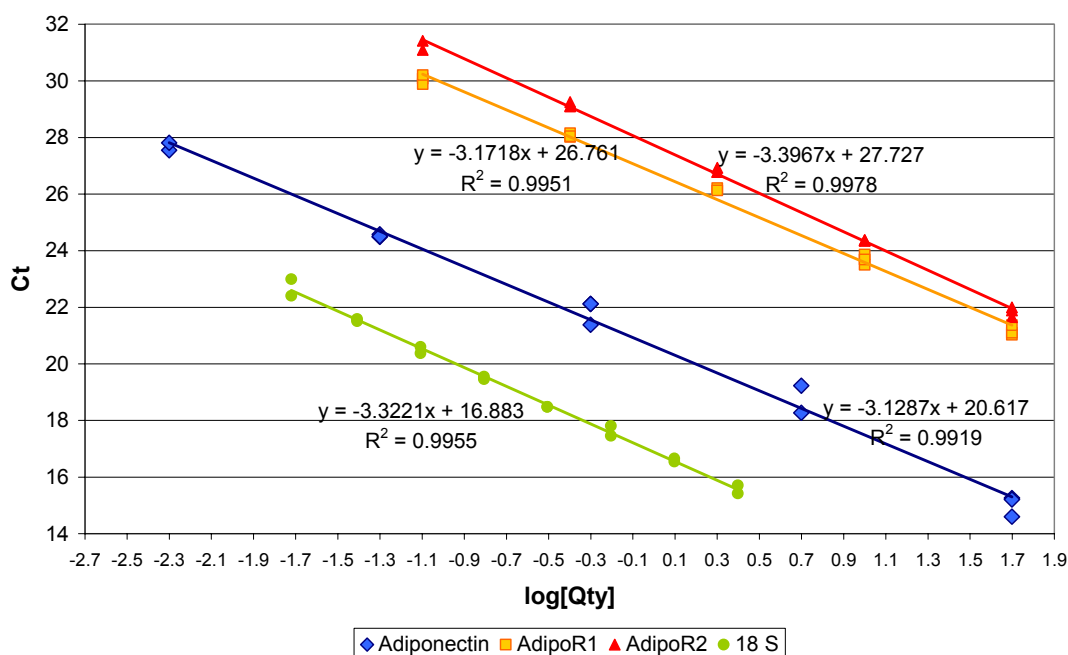
1 µl Amplification reverse primer (500 nM)

5 µl diluted cDNA (from first strand reaction)

3 µl autoclaved DEPC Treated distilled water.

בשלב ראשון בוצעו עקומי כיוול לריכוזים שונים של cDNA על מנת לקבוע את מידת המיהול הנחוצה עבור כל גן. עבור כל ריכוז נקבע סף הדטקציה Ct (מספר המחזור הראשון בו הסיגנל הפלואורסנטי של החומר הגנטי היה חזק מהרקע) והוא הוצב על גרף כשהמשתנה הבלתי תלוי הוא log הריכוז של cDNA. שיפועי הגרפים שנמצאו עבור 18S והגנים הנבדקים היו שווים, בטווח הטעות הניסויית, מה שהעיד על כך שיעילות ההגברה של הגנים הנבדקים היתה דומה.

עקומי הכיוול:



לאחר קביעת ריכוז ה-cDNA בטווח הלינארי, נערכו ריאקציות כפולות לקביעת מידת הביטוי של הגן, לפי התוכנית שלהלן:

מחזור אחד:

2 דקות 50°C איתחול.

10 דקות 95°C דנטורציה ראשונית

40 מחזורים:

15 שניות 95°C דנטורציה של הפריימרים ושל ה-cDNA,

60 שניות 50°C הארכה והגברה של cDNA.

עבור כל דוגמא נערכו בו זמנית ריאקציות כפולות עבור הגן הנבדק ועבור 18S לצורך נרמול כמות ה-cDNA. היות שהריאקציה נעשתה באותה יעילות עבור הגן הנבדק ו-18S ניתן היה לכמת את רמות ה-mRNA של הגן ביחס ל-18S בשיטת $\Delta\Delta Ct$.

בשלב ראשון חושב הערך $-\Delta Ct$ עבור כל דוגמא:

$$-\Delta Ct = Ct_{18S} - Ct_{\text{target gene}}$$

לאחר מכן חושב הערך $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta\Delta Ct = (\text{median } \Delta Ct_{\text{experimental group}}) - (\text{median } \Delta Ct_{\text{control group}})$$

השינוי בביטוי הגן הנבדק בקבוצת הניסוי ביחס לקבוצת הביקורת חושב כ: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

2.3 ניתוח סטטיסטי.

נתונים שלא התפלגו נורמלי או היו בעלי אי שוויון שוניות עברו טרנספורמציה לוגריטמית. ניתוח סטטיסטי של תוצאות הניסויים נעשה בתוכנה JMP, במבחן T-Test. הבדלים נחשבו מובהקים כאשר רמת המובהקות הייתה $p < 0.05$.

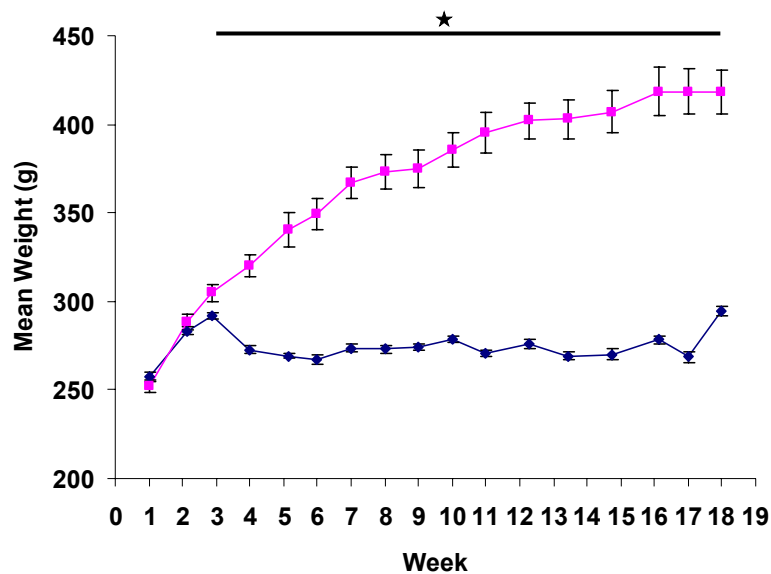
3. תוצאות

3.1 ניסוי הגבלה קלורית

בניסוי זה נבדקה ההשפעה של הגבלה קלורית ל- 60% מהצריכה היומית הממוצעת במשך כ- 4 חודשים בחולדות מזן Sprague Dawley. ההגבלה הקלורית ידועה כגורמת להפחתה במסת השומן ובמשקל הגוף, על כן נבדקה השפעתה על מדדים שונים של תנגודת לאינסולין ועל ביטוי אדיפונקטין.

3.1.1 משקל החולדות

השפעת ההגבלה הקלורית על משקל החולדות מוצגת באיור 1. החולדות עברו שבוע הסתגלות הדרגתית להגבלה הקלורית. החל מתום השבוע הראשון להגבלה הקלורית נבדלו משקלי החיות באופן מובהק ($p < 0.05$). בתום תקופת הניסוי משקל החולדות שתזונתן הוגבלה היה נמוך ב- 30% ממשקל החיות אשר לא הוגבלו בצריכת המזון (טבלה 3).



איור 1. השפעת ההגבלה הקלורית על משקל החיות.

שינוי במשקל הגוף של החולדות במהלך 19 שבועות הניסוי. התוצאות מוצגות כממוצע משקל של 7 חיות בכל קבוצת הניסוי \pm שגיאת תקן.

* מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

○ הגבלה קלורית

■ ללא הגבלת מזון (ביקורת)

3.1.2 נתונים ביוכימיים

טבלה 4: השפעת הגבלה קלורית על נתונים פיזיולוגיים ומטבוליים.

<i>P value</i>	<i>CR</i> (n=7)	<i>Control</i> (n=7)	
<0.001	294.6±2.5	418.0±12.5	משקל גוף סופי (גר')
<0.001	2.62±0.25	5.35±0.52	משקל רקמת השומן האפידידמלית (גר')
<0.05	0.9±0.1	1.3±0.1	% משקל רקמת השומן ממשקל הגוף
0.5	86.7±1.8	85.1±1.4	רמות גלוקוז בצום (mg/dL)
0.6	30.5±2	32.3±3.3	רמות אינסולין בצום(μU)
0.8	6.5±0.5	6.7±0.6	HOMA-IR

3.1.2.1 משקל רקמת השומן האפידידמלית

כפי שניתן לראות בטבלה 3 משקל רקמת השומן של החולדות בקבוצת הניסוי היה נמוך ב- 52% ממשקל רקמת השומן של החולדות בקבוצת הביקורת ($p < 0.01$). כאשר נבדק ההבדל במשקל רקמת השומן כ- % ממשקל הגוף נמצא כי הוא נמוך במובהק ב- 30% בקבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת (ללא הגבלה במזון).

3.1.2.2 רמות גלוקוז בצום

רמות הגלוקוז בצום בין קבוצות הניסוי היו דומות.

3.1.2.3 רמות אינסולין בסרום

רמות אינסולין בצום נמדדו בשיטת Radioimmunoassay כפי שמתואר בפרק "חומרים ושיטות". רמות אינסולין בצום בין קבוצות הניסוי לא נבדלו משמעותית.

3.1.2.4 מדד HOMA-IR לרגישות לאינסולין

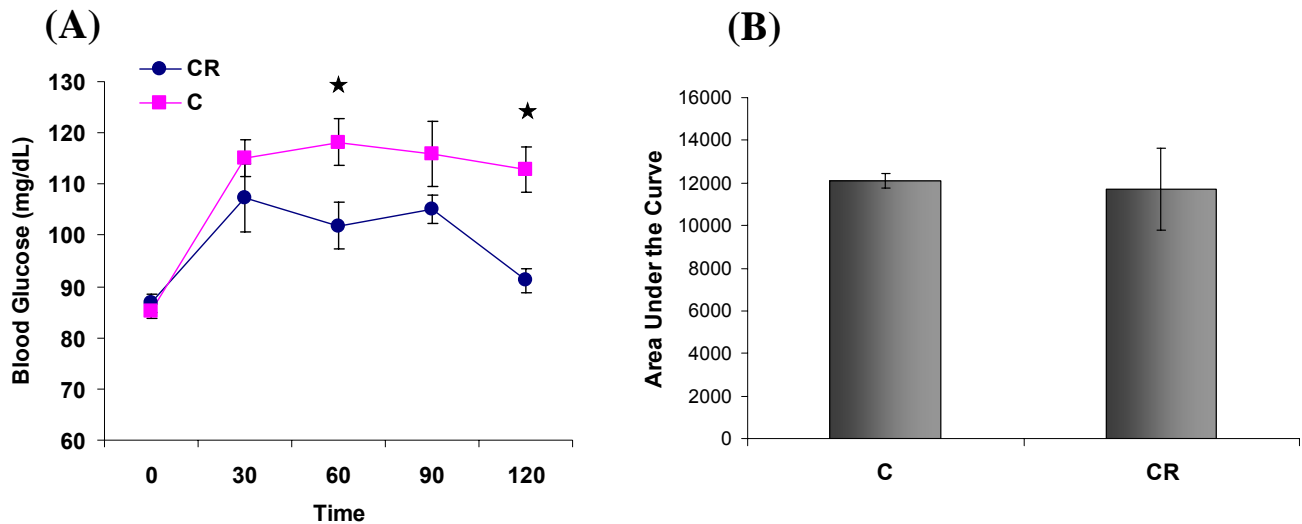
המדד HOMA-IR (Homeostatic model assessment) לרגישות לאינסולין חושב לפי רמות אינסולין (I_0) וגלוקוז (G_0) בצום לפי הנוסחה הבאה:

$$HOMA = \frac{I_0 (\mu U / ml) \cdot G_0 (mg / dL)}{405}$$

זהו מדד קליני בעל קורלציה גבוהה לתוצאות של טכניקות clamp המשמש להערכת שינויים ברגישות לאינסולין. ככל שרמות המדד גבוהות הרגישות לאינסולין נמוכה. לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות במידת הרגישות לאינסולין.

3.1.3 העמסת גלוקוז

בשבוע האחרון של הניסוי בוצעה בחולדות העמסת גלוקוז שתוצאותיה מתוארות באיור 2. רמות הגלוקוז היו נמוכות ($p < 0.05$) בקבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת 60 ו-120 דקות לאחר ביצוע ההעמסה (A). יחד עם זאת, כאשר נבדק השטח שתחת העקומה לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הקבוצות (B).



איור 2. השפעת ההגבלה הקלורית על רמות הגלוקוז בדם לאחר העמסת גלוקוז.

(A) רמות גלוקוז בדם בצום ו-30, 60, 90 ו-120 דקות לאחר העמסת גלוקוז (0.3gr גלוקוז לכל 100 gr חולדה).

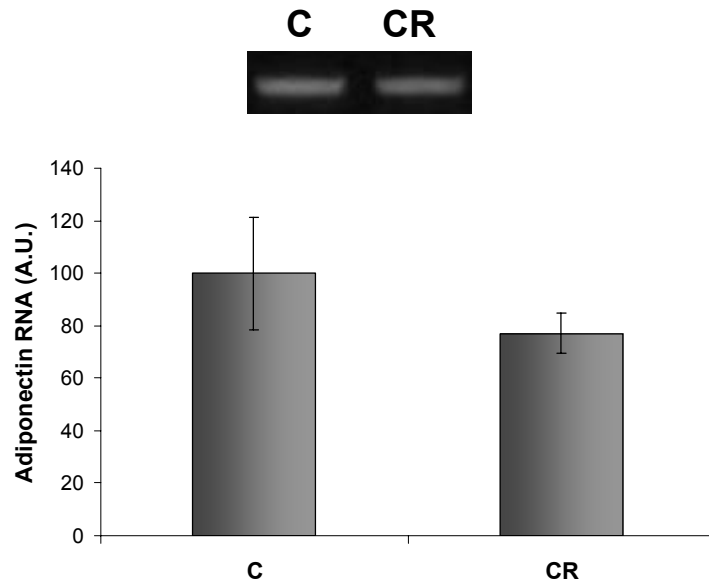
(B) השטח מתחת לעקומת העמסת הגלוקוז כפי שחושב לפי חוק הטרפז.

התוצאות מוצגות כממוצע של 7 חיות בכל קבוצת הניסוי \pm שגיאת תקן.

* מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

3.1.4 ביטוי RNA לאדיפונקטין ברקמת השומן

רמת ה-mRNA של אדיפונקטין לא השתנתה ברקמת השומן ($p=0.33$) כתוצאה מהדיאטות השונות.

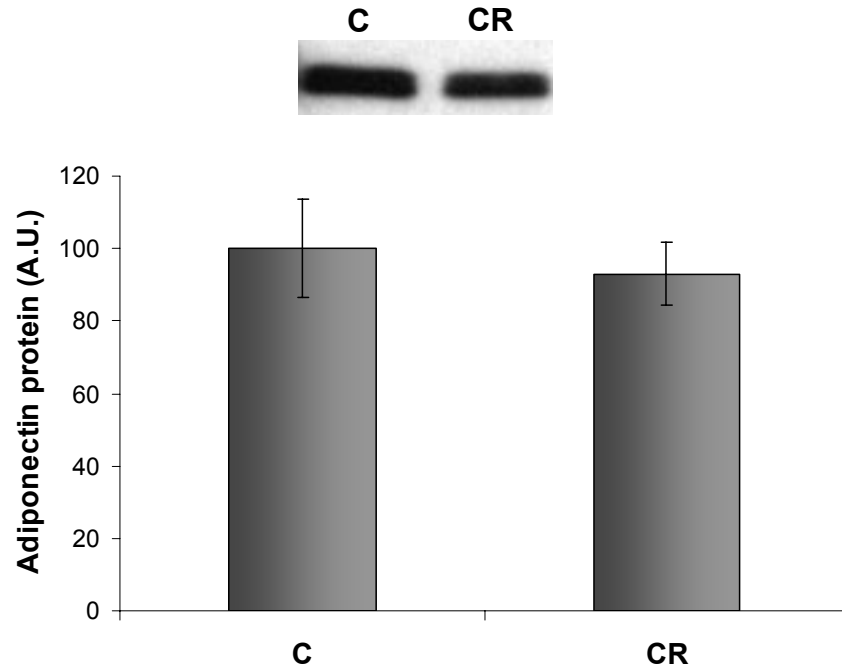


איור 3 . השפעת ההגבלה הקלורית על ביטוי RNA לאדיפונקטין ברקמת השומן.

התמונה מייצגת 7 חזרות בלתי תלויות. RNA ריבוזומלי 18S מהווה ביקורת לכמות ה-RNA שהוטענה. תוצרי ה-RT-PCR כיחידות שרירותיות (A.U. Arbitrary Units) באחוזים מדיאטת הביקורת של אדיפונקטין ברקמת השומן. ממוצע ה-mRNA בשומן של 7 חיות בכל קבוצת ניסוי \pm שגיאת תקן.

3.1.5 רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן

ביטוי החלבון אדיפונקטין (איור מס' 4) ברקמת השומן היתה דומה בין הקבוצות שניזונו בדיאטות השונות.

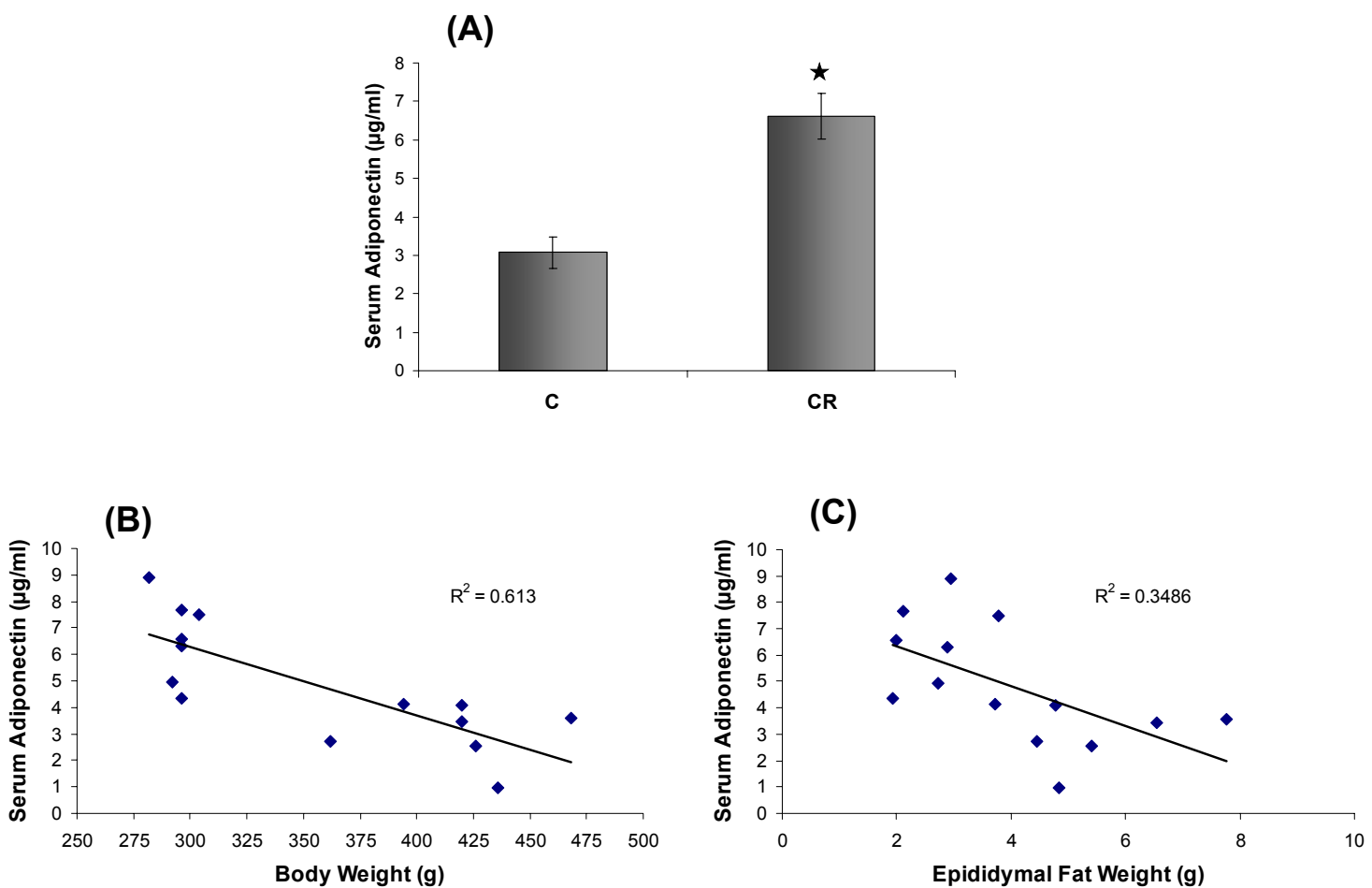


איור 4. השפעת ההגבלה הקלורית על רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן.

Western Blot עבור החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן, התמונה מייצגת 7 חזרות בלתי תלויות. התוצאות המוצגות ביחידות שרירותיות כאחוזים מדיאטת הביקורת, מייצגות את ממוצע ביטוי החלבון ברקמת השומן, של 7 חיות בכל קבוצת הניסוי ± שגיאת תקן.

3.1.6 רמות אדיפונקטין בסרום

באיור 5 מוצגת השפעת ההגבלה הקלורית על רמות אדיפונקטין בסרום של החולדות. רמות אדיפונקטין בסרום בצום היו גבוהות במובהק בקבוצת ההגבלה הקלורית ($3.07 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$) בקבוצת הביקורת לעומת ($6.61 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ בקבוצת ההגבלה הקלורית, $P < 0.001$) (איור 5A). נמצא קורלציה שלילית בין משקל גוף לרמות אדיפונקטין בסרום ($R^2 = 0.613$, $P < 0.05$) (איור 5B) וכן קורלציה שלילית בין משקל רקמת השומן לרמות אדיפונקטין בסרום ($R^2 = 0.349$, $P < 0.05$) (איור 5C) עבור כלל החיות בניסוי ($n=14$). לא נמצאה קורלציה בין רמות אדיפונקטין בסרום למידת הרגישות לאינסולין כפי שנבדקה ע"י מדד HOMA-IR.



איור 5. השפעת ההגבלה הקלורית על רמות אדיפונקטין בסרום.

(A) ממוצע רמות האדיפונקטין בסרום בצום של 7 חולדות בכל קבוצת ניסוי \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

(B) קורלציה בין משקל הגוף לרמות אדיפונקטין בסרום בצום של 14 חולדות.

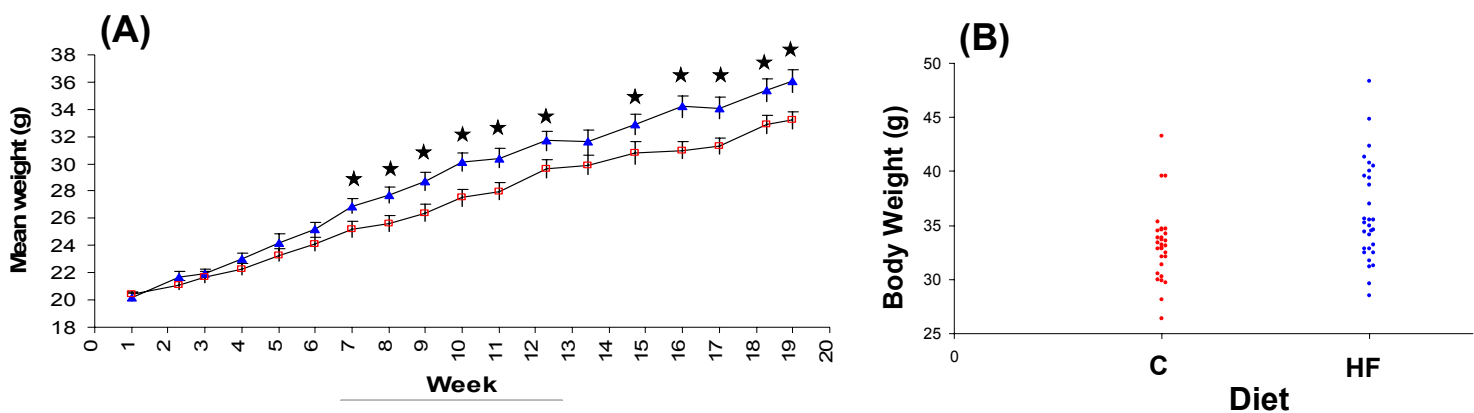
(C) קורלציה בין משקל רקמת השומן לרמות אדיפונקטין בסרום בצום של 14 חולדות.

3.2 ניסוי תזונה עשירה בשומן

בניסוי זה נבדקה ההשפעה של צריכה דיאטה עשירה בשומן (40%) ודיאטה דלת שומן (16%) כקבוצת ביקורת במשך כארבעה חודשים על מדדים שונים של תנגודת לאינסולין, על ביטוי אדיפונקטין וגורמים הקשורים אליו בעכברים מין C57BL/J6.

3.2.1 השפעת תזונה עשירה בשומן על משקל הגוף בעכברים

השפעת הדיאטות על משקל העכברים מוצגת באיור 6. החל מהשבוע השביעי למתן הדיאטות משקלי העכברים שקיבלו תזונה עשירה בשומן היו גבוהים במובהק ($p < 0.05$) ממשקלי העכברים שקיבלו דיאטה דלת שומן (איור 6A). בתום תקופת הניסוי משקל העכברים שקיבלו דיאטה עשירה בשומן היה גבוה ב- 20% ממשקל העכברים בקבוצת הביקורת. הפיזור של משקלי החיות בתום הניסוי היה גדול בשתי הקבוצות (איור 6B, טבלה 5), לפיכך בהמשך ניתחנו את המידע בשני אופנים. תחילה השווינו בין 10 החיות בעלות המשקל הגבוה ביותר בקבוצת התזונה העשירה בשומן (HW) - 50% העליונים, לעומת החיות הרזות ביותר בקבוצת הביקורת (LW) - 50% התחתונים. כמו כן השווינו בין שתי קבוצות הניסוי (20 חיות בקבוצה), דיאטה עשירה בשומן לעומת דיאטה דלה שומן (ביקורת).



איור 6. השפעת דיאטה עשירה בשומן על משקל הגוף.

(A) שינוי משקל הגוף של העכברים במהלך 20 שבועות הניסוי. התוצאות מוצגות כממוצע משקל של 20 חיות בכל קבוצת הניסוי \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

(B) פיזור של משקל הגוף הסופי של העכברים בשתי קבוצות הניסוי.

▲ דיאטה עם 40% שומן (עשירה בשומן)

□ דיאטה עם 16% שומן (ביקורת)

3.2.2 נתונים ביוכימיים

טבלה 5: השפעת דיאטה עשירה בשומן נתונים פיזיולוגיים ומטבוליים.

משקל נמוך ביותר (LW) בקבוצת הביקורת לעומת המשקל הגבוה ביותר (HW) בקבוצת הניסוי *			כלל הקבוצה			
<i>P</i> value	<i>HF</i> (<i>n</i> =10)	<i>Control</i> (<i>n</i> =10)	<i>P</i> value	<i>HF</i> (<i>n</i> =20)	<i>Control</i> (<i>n</i> =20)	
<0.001	41.6±0.90	29.5±0.60	<0.001	38.1±0.90	31.2±0.50	משקל גוף סופי (גר')
<0.001	1.76±0.11	0.92±0.06	<0.001	1.5±0.09	1.07±0.05	משקל רקמת השומן האפידידמלית (גר')
<0.01	4.7±0.3	3.4±0.2	<0.05	4.2±0.2	3.8±0.1	% משקל רקמת השומן ממשקל הגוף
<0.01	132±4.80	105±4.94	0.13	130±5.92	117±6.71	רמות גלוקוז בצום (mg/dL)
<0.01	20.7±3.74	7.5±1.26	<0.01	15.6±2.3	9.3±0.83	רמות אינסולין בצום (µU)
<0.01	7.1±1.50	2±0.42	<0.01	5.3±0.89	2.8±0.39	HOMA-IR

הנתונים המוצגים הינם הממוצע ± שגיאת תקן

* 10 החיות בעלות המשקל הגבוה ביותר בקבוצת התזונה העשירה בשומן (HW) - 50% העליונים, לעומת החיות הרזות ביותר בקבוצת הביקורת (LW) - 50% התחתונים.

3.2.2.1 משקל רקמת השומן האפידידמלית

כפי שניתן לראות בטבלה 4 משקל רקמת השומן של העכברים היה גבוה ב- 30% בקבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת ($p < 0.01$) וב- 48% בקבוצת HW לעומת LW ($P < 0.01$). כאשר נבדק ההבדל במשקל רקמת השומן כ- % ממשקל הגוף נמצא כי הוא גבוה ב- 10% בקבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת ($p < 0.05$) וב- 28% בקבוצת HW לעומת LW ($P < 0.01$).

3.2.2.2 רמות גלוקוז בצום

רמות גלוקוז בצום היו גבוהות אך לא באופן מובהק בכלל קבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת. הן היו גבוהות בקבוצת HW לעומת LW ($P < 0.01$).

3.2.2.3 רמות אינסולין בסרום

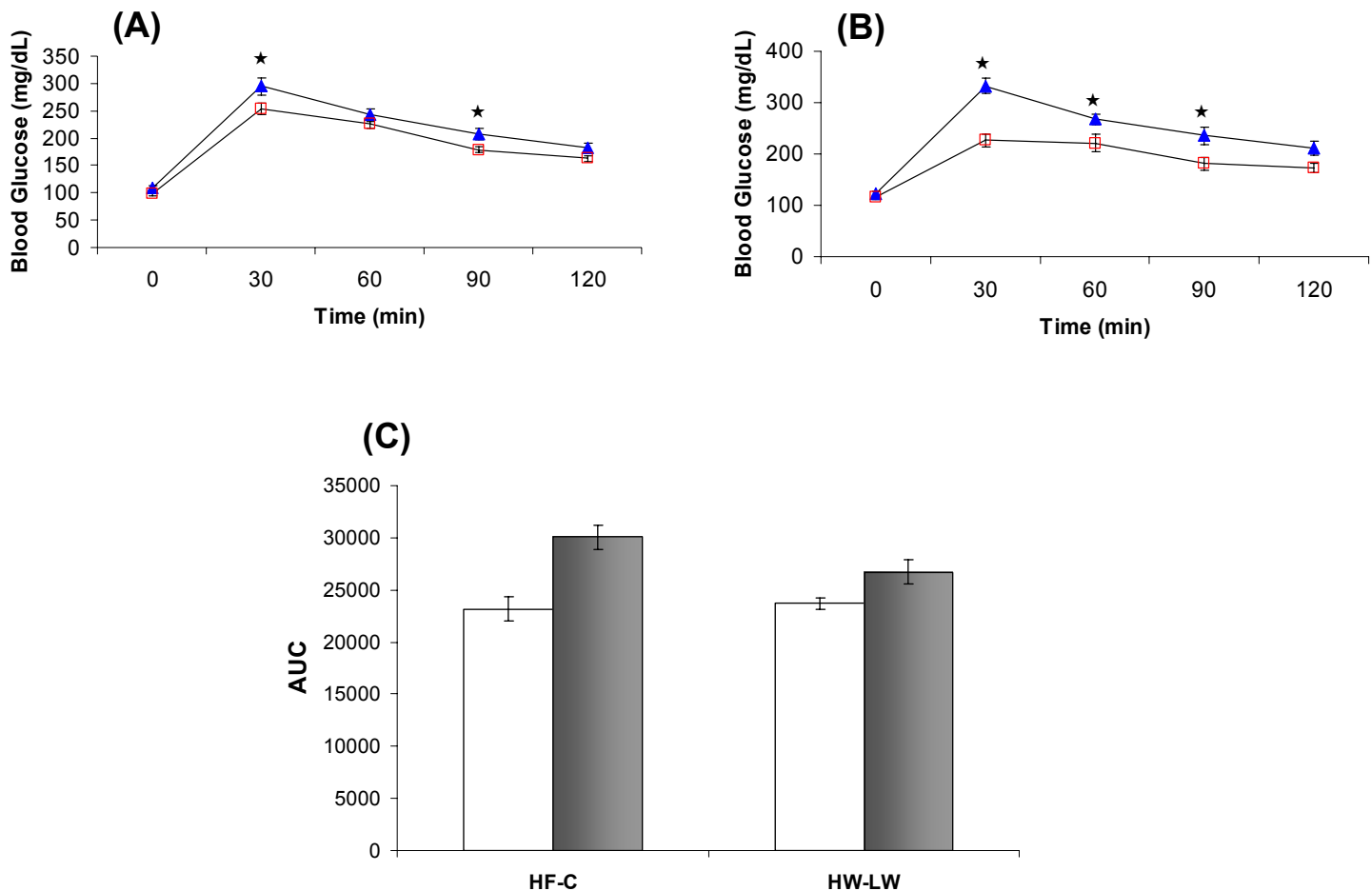
רמות האינסולין בסרום, כפי שנמדדו בשיטת radioimmunoassay, היו גבוהות במובהק ב-67% בכלל קבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת ופי 2.7 בקבוצת HW בהשוואה לקבוצת LW.

3.2.2.4 מדד HOMA-IR לרגישות לאינסולין

המדד HOMA-IR לרגישות לאינסולין חושב לפי רמות אינסולין וגלוקוז בצום. המדד HOMA-IR היה גבוה במובהק הן בכלל קבוצת הניסוי לעומת הביקורת והן בקבוצת HW לעומת LW. הרמות הגבוהות במובהק של HOMA מעידות על הירידה ברגישות לאינסולין בעקבות הצריכה של דיאטה עשירה בשומן.

3.2.3 העמסת סוכר

בשבוע האחרון של הניסוי בוצעה בעכברים העמסת גלוקוז שתוצאותיה מתוארות באיור 7. רמות הגלוקוז נמצאו גבוהות במובהק בקבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת 30 ו- 90 דקות לאחר ביצוע ההעמסה (איור 7A). בקבוצת HW נמצאו רמות גלוקוז גבוהות במובהק 30, 60 ו- 90 דקות לאחר העמסת הגלוקוז בהשוואה לקבוצת LW (איור 7B). השטח שתחת העקומה היה גדול במובהק הן בכלל קבוצת הניסוי לעומת הביקורת והן בהשוואה בין קבוצות HW ו-LW (איור 7C).

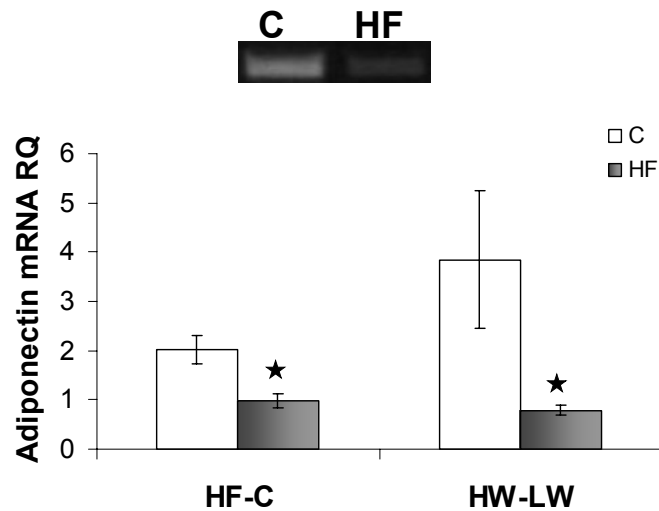


איור 7. השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות גלוקוז בדם לאחר העמסת סוכר. השינוי ברמות גלוקוז בדם בצום ו- 30, 60, 90 ו- 120 דקות לאחר העמסת גלוקוז (0.3gr) גלוקוז לכל 100 gr חולדה/עכבר) בכלל קבוצת הניסוי לעומת הביקורת. (A) ובקבוצת HW לעומת קבוצת LW (B). (C) השטח מתחת לעקומת העמסת הגלוקוז כפי שחושב לפי חוק הטרפז. התוצאות מוצגות כממוצע של 10 חיות בקבוצות HW ו-LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה ± שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

- ▲ דיאטה עם 40% שומן (עשירה בשומן)
- דיאטה עם 16% שומן (ביקורת)
- דיאטה עם 40% שומן (עשירה בשומן)
- דיאטה עם 16% שומן (ביקורת)

3.2.4 ביטוי RNA של אדיפונקטין ברקמת השומן של עכברים

כפי שניתן לראות באיור 8 רמות mRNA של אדיפונקטין כפי שנבדקו ב-PCR וב-Quantitative Real time PCR (QPCR) ירדו באופן מובהק ב-79% בקבוצת HW לעומת LW וב-51% בכלל קבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת.

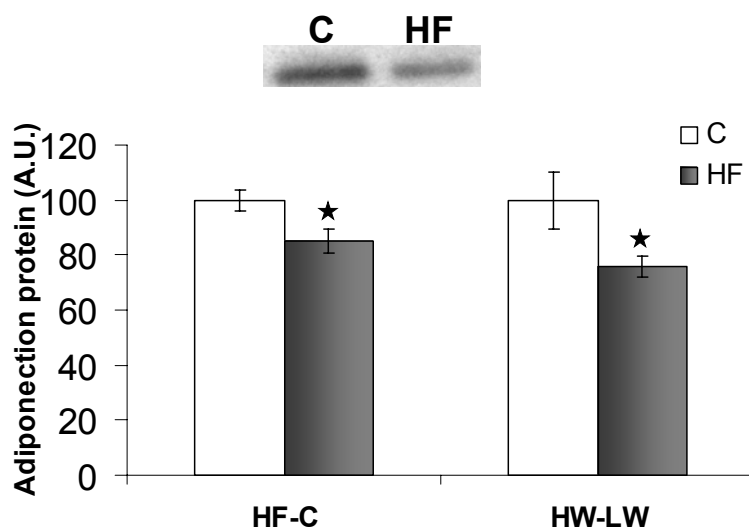


איור 8. השפעת דיאטה עשירה בשומן על ביטוי RNA לאדיפונקטין ברקמת השומן.

התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות ב-PCR. התבטאות הגן מיוחסת ל-RNA ריבוזומלי 18S בכל ניסוי. באיור מוצגות תוצאות QPCR לגן לאדיפונקטין ברקמת השומן. RNA ריבוזומלי 18S שימש כגן ייחוס. התוצאות מוצגות כממוצע של 7 חיות בקבוצות HW ו-LW ושל 14 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה ± שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

3.2.5 רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן של עכברים

ביטוי החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן (איור מס' 9), ירד באופן מובהק ב- 24% בקבוצת HW לעומת LW וב- 15% בכלל קבוצת הניסוי לעומת קבוצת הביקורת.



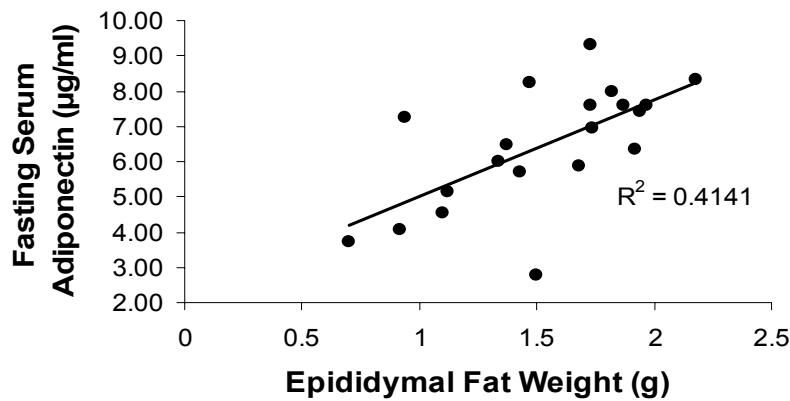
איור 9. השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות החלבון אדיפונקטין ברקמת השומן.

Western Blot של אדיפונקטין ברקמת השומן. התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות. התוצאות מוצגות כאחוז מדיאטת הביקורת ומייצגות את ממוצע ביטוי החלבון ברקמת השומן של 10 עכברים בקבוצת HW ו- LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים (p<0.05) לפי מבחן T-Test.

3.2.6 אדיפונקטין בסרום

רמות אדיפונקטין בסרום בצום בקבוצת HW היו $7.22 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$ לעומת $7.23 \pm 0.64 \mu\text{g/ml}$ ב-LW. כמו כן, נמצאה ירידה קלה אך לא מובהקת ברמות אדיפונקטין בסרום של כלל הקבוצה שקיבלה תזונה עשירה בשומן בהשוואה לקבוצת הביקורת ($7.12 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ vs. $6.44 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$, $P=0.2$).

נמצאה קורלציה חיובית בין משקל רקמת השומן של חיות שקיבלו תזונה עשירה בשומן (n=20) לרמות אדיפונקטין בסרום ($R^2=0.414$, $P<0.05$) (איור 10), לא נמצאה קורלציה דומה בקבוצת הביקורת או עבור כלל החיות בניסוי (n=40). לא נמצאה קורלציה בין רמות אדיפונקטין בסרום למידת הרגישות לאינסולין כפי שנבדקה ע"י מדד HOMA-IR.



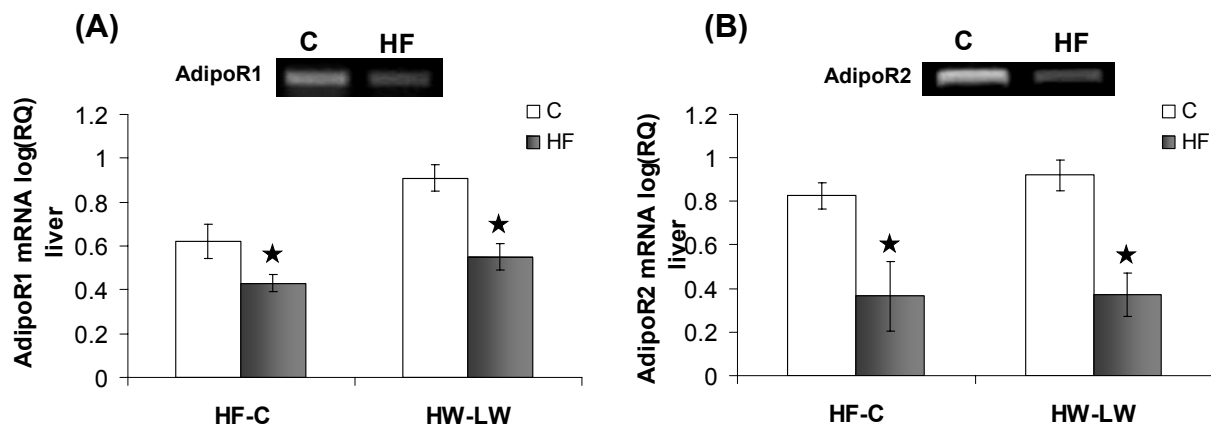
איור 10. מתאם בין רמות אדיפונקטין בסרום בצום למשקל רקמת השומן האפידידימלית בעכברים שקיבלו תזונה עשירה בשומן, n=20.

3.2.7 רצפטורים לאדיפונקטין

אדיפונקטין נקשר ברקמות לשני רצפטורים, AdipoR1 ו-AdipoR2. הרצפטור AdipoR1 נפוץ יותר בשריר ובעוד שהרצפטור AdipoR2 נפוץ יותר בכבד. רמות RNA של שני הרצפטורים נבדקו הן בכבד והן בשריר של החיות.

3.2.7.1 רצפטורים לאדיפונקטין בכבד

רמות RNA של שני הרצפטורים של אדיפונקטין, כפי שנבדקו ב-QPCR, ירדו באופן מובהק בכבד של עכברים שהוזנו בתזונה עשירה בשומן, הן בקבוצת HW לעומת LW והן בכלל קבוצת הניסוי בהשוואה לקבוצת הביקורת. התבטאות של AdipoR1 ירדה ב-40% בקבוצת HW וב-31% בכלל הקבוצה (איור 11A). ההתבטאות של AdipoR2 ירדה ב-60% בקבוצת HW וב-55% בכלל הקבוצה (איור 11B).



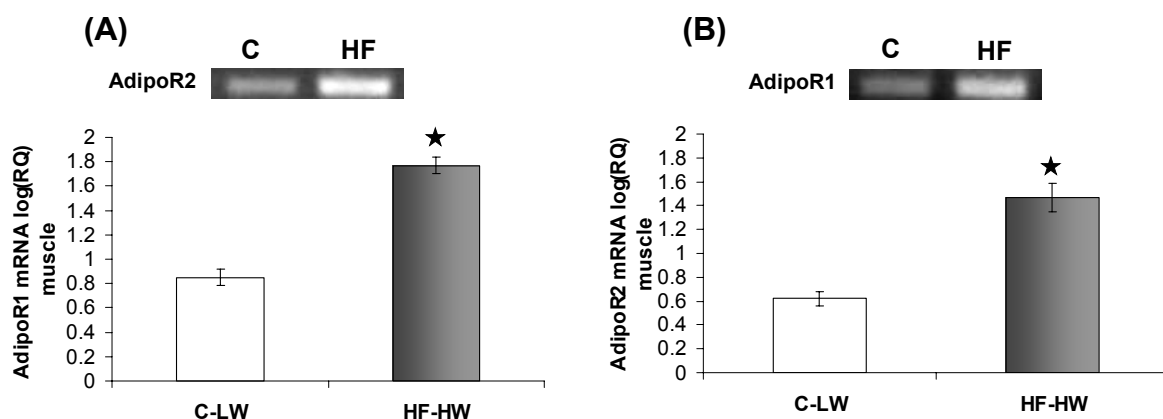
איור 11. השפעת דיאטה עשירה בשומן על ביטוי ה-RNA של הרצפטורים לאדיפונקטין בכבד.

בגרפים: תוצאות real-time PCR של AdipoR1 (A) של AdipoR2 (B) בכבד לאחר טרנספורמציה לוגריתמית. RNA ריבוזומלי 18S שימש כגן ייחוס. התוצאות מוצגות כממוצע של 7 עכברים בקבוצת HW ו-14 עכברים בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

בתמונת מובא להמחשה צילום הג'ל של תוצרי ה-PCR עבור הרצפטורים לאדיפונקטין (A) AdipoR1 (B) AdipoR2 בכבד. כל תמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות.

3.2.7.2 רצפטורים לאדיפונקטין בשריר

רמות RNA של שני הרצפטורים של אדיפונקטין בשריר עלו באופן מובהק בחיות שהוזנו בתזונה עשירה בשומן, הן בקבוצת HW לעומת LW והן בכלל קבוצת הניסוי לעומת הביקורת. RNA של AdipoR1 עלה פי 2 בקבוצת HW (איור 12A) וב- 24% בכלל הקבוצה. RNA של AdipoR2 עלה פי 2.4 בקבוצת HW (איור 12B) וב- 39% בכלל הקבוצה..



איור 12. השפעת דיאטה עשירה בשומן על ביטוי ה-RNA של הרצפטורים לאדיפונקטין בשריר.

בגרפים: תוצאות real-time PCR של AdipoR1 (A) של AdipoR2 (B) של AdipoR2 בשריר לאחר טרנספורמציה לוגריתמית. RNA ריבוזומלי 18S שימש כגן ייחוס. התוצאות מוצגות כממוצע של 7 עכברים בקבוצת HW ו- 14 עכברים בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

בתמונת מובא להמחשה צילום הגל של תוצרי ה-PCR עבור הרצפטורים לאדיפונקטין (A) AdipoR1 (B) AdipoR2 בשריר. כל תמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות.

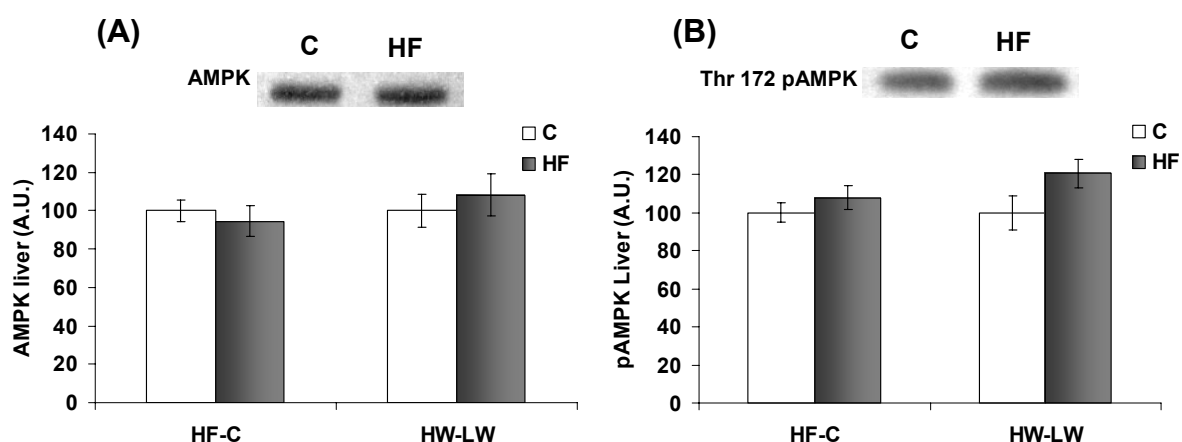
■ דיאטה עשירה בשומן (40%)
□ ביקורת

3.2.8 האנזים AMPK ו-pAMPK

עם הקשירה של אדיפונקטין לרצפטורים מתרחש זרחון של האנזים AMPK על Thr¹⁷² ושפעולו. רמות כלליות של האנזים AMPK ורמות האנזים המזורחן ב-Thr¹⁷² נבדקו בכבד ובשריר באמצעות Western Blot.

3.2.8.1 רמות החלבון AMPK בכבד

רמות החלבון AMPK בכבד והחלבון המזורחן phospho-AMPK נמצאו דומות בין קבוצת הניסוי לקבוצת הביקורת או בין קבוצת HW ל-LW (איור 13).



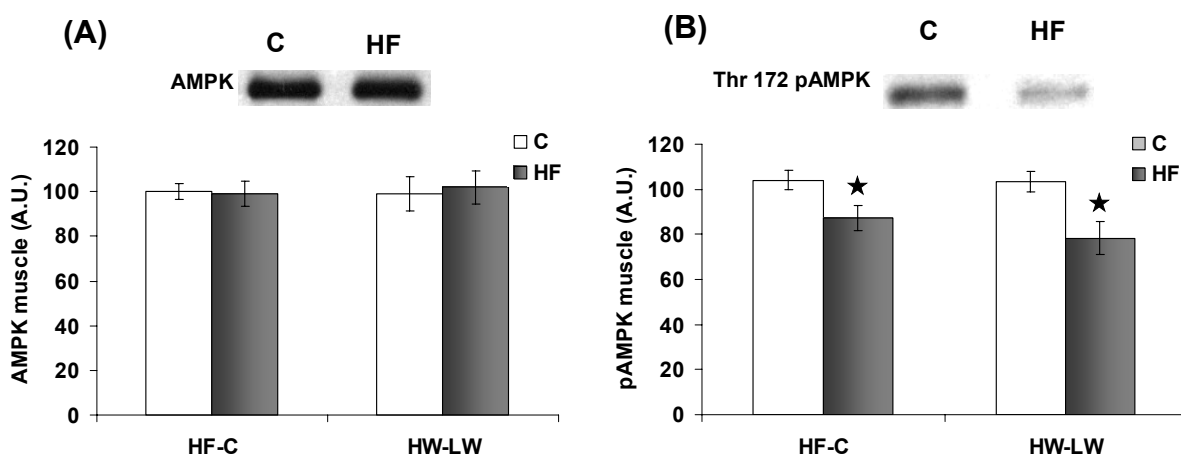
איור 13. השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות AMPK ו-AMPK מזורחן בכבד.

Western Blot של (A) AMPK (B) והחלבון המזורחן phospho-AMPK ברקמת כבד. התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות

התוצאות מוצגות ביחידות שרירותיות כאחוזים מדיאטת הביקורת, מייצגות את ממוצע ביטוי החלבון של 10 חיות בקבוצות HW ו-LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה ± שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים (p<0.05) לפי מבחן T-Test.

3.2.8.2 רמות החלבון בשריר

רמות החלבון AMPK הלא מזורחן בשריר לא נבדלו בין קבוצת הניסוי לקבוצת הביקורת או בין קבוצת HW ל-LW (איור 14A). לעומת זאת נמצאה ירידה מובהקת של 16% ברמות החלבון המזורחן והפעיל phospho-AMPK בקבוצת הניסוי שניזונה מתזונה עשירה בשומן לעומת קבוצת הביקורת. בקבוצת HW נמצאה ירידה של 24% לעומת קבוצת LW (איור 14A). הירידה ברמות האנזים המזורחן מעידות על פעילות מופחתת של האנזים בהשפעת דיאטה עשירה בשומן.



איור 14. השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות AMPK ו-AMPK מזורחן בשריר.

Western Blot של (A) החלבון AMPK (B) החלבון המזורחן phospho-AMPK ברקמת שריר. התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות.

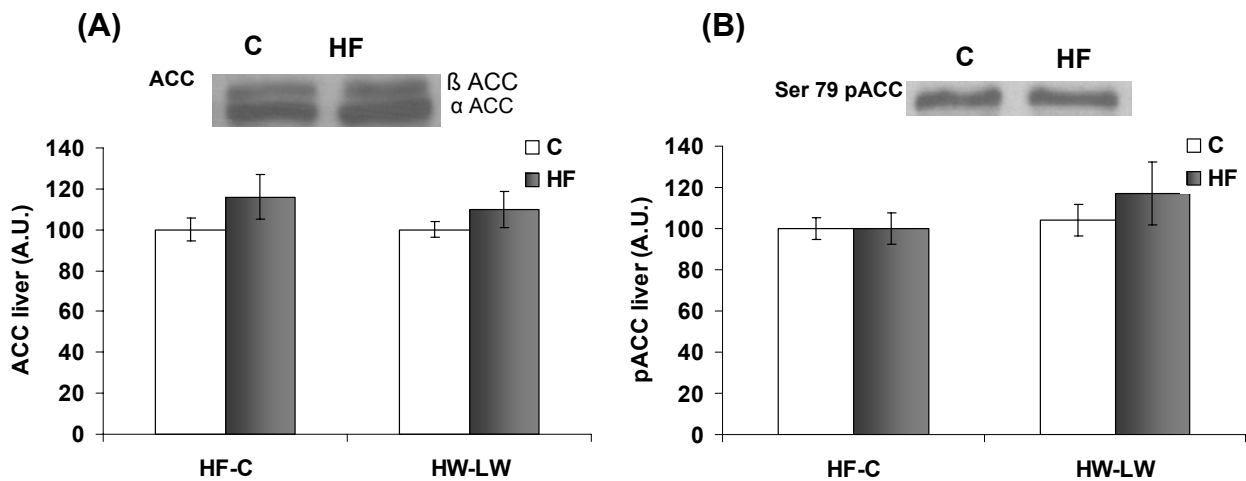
התוצאות, המוצגות ביחידות שרירותיות כאחוזים מדיאטת הביקורת, מייצגות את ממוצע ביטוי החלבון של 10 חיות בקבוצות HW ו-LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p < 0.05$) לפי מבחן T-Test.

3.2.9 האנזים ACC ו-pACC

האנזים הפעיל phospho-AMPK מזרחן את האנזים ACC על Ser⁷⁹, האנזים המזורחן אינו פעיל וכך נפסקת הסינתזה של חומצות שומן והן מופנות לחמצון β במיטוכונדריה. רמות כלליות של האנזים ACC ורמות האנזים המזורחן נבדקו בכבד ובשריר באמצעות Western Blot.

3.2.9.1 רמות החלבון ACC בכבד

רמות החלבון ACC והחלבון המזורחן phospho-ACC בכבד היו דומות בין קבוצת הניסוי לקבוצת הביקורת או בין קבוצת HW ל-LW (איור 15).



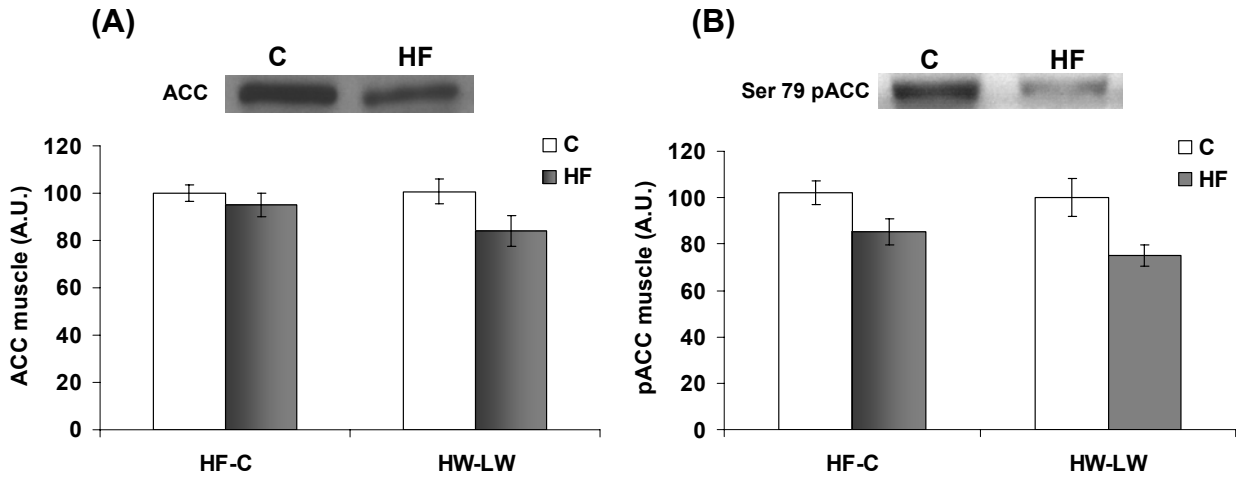
איור 15. השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות ACC ו-ACC מזורחן בכבד.

Western Blot של (A) החלבון ACC (B) והחלבון המזורחן phospho-ACC ברקמת כבד. התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות

התוצאות מוצגות ביחידות שרירותיות כאחוזים מדיאטת הביקורת, מייצגות את ממוצע ביטוי החלבון של 10 חיות בקבוצת HW ו-LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים לפי מבחן T-Test ($p < 0.05$).

3.2.9.2 רמות החלבון ACC בשריר

רמות החלבון הלא מזורחן ACC בשריר היו דומות בין קבוצת הניסוי לקבוצת הביקורת, נראתה מגמת ירידה ברמות החלבון בין קבוצת HW ל-LW ($p=0.064$) (איור 16A). רמות החלבון המזורחן phospho-ACC שאיננו פעיל ירדו באופן מובהק ב-16% בכלל קבוצת הניסוי לעומת הביקורת וב-24% בקבוצת HW לעומת קבוצת LW (איור 16B), מה שמעיד על פעילות מופחתת של האנזים בהשפעת דיאטה עשירה בשומן.



איור 16 . השפעת דיאטה עשירה בשומן על רמות ACC ו-ACC מזורחן בשריר.

Western Blot של (A) החלבון ACC (B) והחלבון המזורחן phospho-ACC ברקמת שריר. התמונה מייצגת 20 חזרות בלתי תלויות

התוצאות מוצגות ביחידות שרירותיות כאחוזים מדיאטת הביקורת, מייצגות את ממוצע ביטוי החלבון של 10 חיות בקבוצות HW ו-LW ושל 20 חיות בכל קבוצת ניסוי שלמה \pm שגיאת תקן. * מסמנת הבדלים מובהקים ($p<0.05$) לפי מבחן T-Test.

4. דיון

המחקר הנוכחי בחן השפעות של שני משטרים תזונתיים: תזונה עשירה בשומן והגבלה קלורית על מטבוליזם של גלוקוז, רגישות לאינסולין, אדיפונקטין ומשתנים מטבוליים אחרים. הניסוי שבחן דיאטה עשירה בשומן נערך בעכברים בעוד שניסוי ההגבלה הקלורית בחולדות. הגבלת כמות המזון של חולדות Sprague Dawley ל- 60% מהצריכה היומית הממוצעת, הביאה לירידה במשקל ושמירה על משקל גוף קבוע במהלך תקופת הניסוי, בעוד שהחולדות שגישתן למזון לא הוגבלה עלו במשקל לאורך מרבית תקופת הניסוי. בסוף הניסוי נמצאו הבדלים של 30% ו- 52% במשקל גוף וברקמת השומן האפידידמלית בהתאמה (איור 1, טבלה 4). לא נמצאו הבדלים במדדים שונים כמו רגישות לאינסולין, רמות אינסולין וגלוקוז בצום ומדד HOMA-IR, אשר היו דומים בשתי הקבוצות. נמצאו שינויים קלים בסבילות לגלוקוז בזמן 30 ו- 60 דקות לאחר העמסת סוכר.

בניסויים אחרים של הגבלה קלורית בחולדות נמצאו בתום תקופת הניסוי הבדלים במשקל הגוף ומשקל רקמת השומן האפידידמלית (Barzilai *et al.* 1998). כמו כן נצפו רמות דומות של גלוקוז בין קבוצות הניסוי. אולם, רמות האינסולין בתום תקופת הניסוי היו נמוכות במובהק בקבוצה שהצריכה הקלורית שלה הוגבלה לעומת קבוצת הביקורת. הרגישות לאינסולין כפי שנאמדה בשיטת Hyperinsulinemic euglycemic clamp היתה אף היא גבוהה יותר בקבוצה שהוגבלה במזון (Barzilai *et al.* 1998; Barzilai *et al.* 1998). ההבדלים שנצפו ברמות האינסולין עשויים להיות תוצאה של משך הניסוי. במחקרים בהם הניסוי נמשך 18 חודשים, משקל הגוף הסופי של שתי הקבוצות היה גבוה מאוד בהשוואה למשקל הגוף הסופי של הקבוצות בניסוי הנוכחי. גם רמות הגלוקוז הבסיסיות כפי שנבדקו במחקרים הללו היו גבוהות בהרבה מאלו שנמצאו בניסוי הנוכחי. רמות האינסולין שנמצאו בקבוצת הביקורת בניסוי הנוכחי דומות לרמות האינסולין בחיות בנות 4 חודשים בתחילת הניסוי (Barzilai *et al.* 1998) או בחיות שמשקלן נמוך יחסית (Barzilai *et al.* 1998). מכאן שבניסוי הנוכחי הרמות הנמוכות הן של גלוקוז והן של אינסולין בקבוצת הביקורת, למרות ההבדל במשקל הגוף ומשקל רקמת השומן האפידידמלית, מעידות על כך שהחולדות בקבוצת הביקורת בניסוי הנוכחי לא פיתחו תנגודת לאינסולין.

במחקרים בבני אדם נמצא שהגבלה קלורית לתקופה דומה הובילה לירידה ברמות האינסולין ובמדד HOMA למידת התנגודת לאינסולין ללא שינוי ברמות הגלוקוז הבסיסיות (Brehm *et al.* 2003; Farnsworth *et al.* 2003; Brinkworth *et al.* 2004; Brinkworth *et al.* 2004). אולם, במרבית הניסויים בהם בוצעה הגבלה קלורית בבני אדם נבחנו השפעותיה על אנשים שבתחילת הניסוי היו בעלי עודף משקל או השמנת יתר עם הגברה מסויימת של תנגודת לאינסולין ואפילו חולי סוכרת מסוג 2. מכאן שיש כמובן הבדל מהותי באופן עריכת הניסוי ובתוצאות הנצפות, שכן בניסוי זה החיות החלו במשקל תקין וככל הנראה כפי שנידון לעיל לא פתחו מצבי תנגודת לאינסולין.

לא נמצאו הבדלים בביטוי mRNA והחלבון אדיפונקטין ברקמת השומן בין הקבוצות (איורים 3,4), אולם רמותיו עלו באופן מובהק בסרום והיו כפולות בקבוצת ההגבלה הקלורית בהשוואה לקבוצת הביקורת (איור 5A). ממצאים אלה דומים לממצאים במחקרים קודמים שדיווחו כי הגבלה קלורית וירידה במשקל מביאה לעליה ברמות אדיפונקטין בסרום בעכברים, חולדות ובני אדם (Berg *et al.* 2001; Esposito *et al.* 2003;) (Zhu *et al.* 2004). כבר דווח בעבר כי העליה ברמות אדיפונקטין בסרום מתרחשת ככל הנראה בשלבים שלאחר שעתוק ותרגום החלבון, זאת על אף שלא נמצאו הבדלים ברמות mRNA (Combs *et al.* 2003). במקביל נמצאו גם מתאמים שליליים בין רמות אדיפונקטין בדם למשקל הגוף ומשקל רקמת השומן האפידידמלית (איורים 5B ו-5C). גם תוצאות אלה דומות לדיווחים קודמים המורים על ירידה ברמות אדיפונקטין בסרום בבני אדם ככל שיש עליה במסת רקמת השומן (Asayama *et al.* 2003; Kwon *et al.* 2005). יחד עם זאת לא נמצא מתאם משמעותי בין רמות אדיפונקטין בסרום למידת הרגישות לאינסולין כפי שנאמדה ע"י HOMA-IR. Garaulet ועמיתיו דיווחו כי ירידה מתונה במשקל הובילה להיעלמות המתאם בין רמות אדיפונקטין בסרום לפרמטרים שונים של תנגודת לאינסולין (Garaulet *et al.* 2004). החוקרים הסבירו את חוסר המתאם בין אדיפונקטין לרמות אינסולין בסרום בכך ש רמות האדיפונקטין לא השתנו בעקבות הדיאטה. כמו כן, בעוד שאדיפונקטין אמור להוריד רמות גלוקוז בדם ללא הגברת ההפרשה של אינסולין, לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות ברמות הגלוקוז בדם בצום ושעתיים לאחר העמסת סוכר ואילו רמות האינסולין ירדו. ייתכן שהיעדר המתאם במחקר הנוכחי נובע מכך שאין הבדלים בין הקבוצות ברמות האינסולין בצום ובמידת הרגישות לאינסולין.

האכלה של עכברים מזן C57BL/6J בתזונה עשירה בשומן (42% מהקלוריות מקורן בשומן) במשך כארבעה חודשים גרמה לעליה במשקל הגוף, במשקל רקמת השומן האפידידמלית וב- % משקל רקמת השומן ביחס למשקל הגוף (טבלה 5, איור 6). תוצאות אלה מחזקות דיווחים קודמים כי תזונה עשירה בשומן, יכולה להוביל להשמנה במודלים של מכרסמים (Hill *et al.* 2000). פיזור משקלי החיות בתום הניסוי היה גדול בשתי הקבוצות (איור 6B, טבלה 5) והבדלי המשקל הסופי היו מובהקים אך לא גדולים, מצב זה אופייני ומשקף תגובה שונה של פרטים באוכלוסיה לתזונה דומה וקורה גם בבני אדם. לא כל הפרטים עולים במשקל באותה המידה בשל הבדלים גנטיים, מטבוליים והתנהגותיים. לאור הפיזור הרחב במשקל הגוף בחרנו בהמשך לנתח את המידע בשני אופנים. תחילה השוונו בין 10 החיות בעלות המשקל הגבוה ביותר בקבוצת התזונה העשירה בשומן (HW) - 50% העליונים, לעומת החיות הרזות ביותר בקבוצת הביקורת (LW) - 50% התחתונים. כמו כן השוונו בין שתי קבוצות הניסוי (20 חיות בקבוצה), דיאטה עשירה בשומן לעומת דיאטה דלה שומן (ביקורת). ללא תלות באופן ניתוח הנתונים נמצאו הבדלים מובהקים עבור מרבית המשתנים שנבדקו.

נמצאה ירידה ברגישות לאינסולין כפי שנאמדה ע"י HOMA (טבלה 5) ופגיעה בסבילות לגלוקוז כפי שנאמדה על ידי העמסת גלוקוז (איור 7). הקשר בין השמנה לירידה ברגישות לאינסולין נצפה כבר בראשית שנות ה-60 (Rabinowitz and Zierler 1962). כמו כן ידוע כי תזונה עשירה בשומן גורמת לפגיעה בקצב כניסת הגלוקוז לשריר לאחר העמסת סוכר (Grundleger and Thenen 1982) ולירידה ברגישות הרקמות המגיבות לאינסולין (Kraegen *et al.* 1991; Boden *et al.* 1993).

משקל גוף גבוה בשל תזונה עשירה בשומן נמצא קשור לירידה בביטוי של mRNA של אדיפונקטין המלווה בירידה ברמות החלבון ברקמת השומן (איורים 8,9). במחקרים אחרים ירידה בביטוי של אדיפונקטין נמצאה בבני אדם עם סוכרת מסוג 2 (Statnick *et al.* 2000) ובחולדות שניזונו מתזונה עשירה בשומן או בפחמימות (Naderali *et al.* 2003). ממצא זה יכול לספק הסבר חלקי לאופן שבו שומן בתזונה יכול להוביל לירידה ברגישות לאינסולין כתוצאה מהירידה בביטוי אדיפונקטין. אולם, במחקר הנוכחי ירידה בביטוי אדיפונקטין לא הובילה לירידה משמעותית ברמות אדיפונקטין בסרום. במודלים של מכרסמים לא נמצא באופן עקבי קשר הפוך בין משקל ורמות אדיפונקטין בסרום (Naderali *et al.* 2003). במחקר זה נבדקו רמות אדיפונקטין בסרום בשיטת radioimmunoassay הבוחנת את כלל רמות האדיפונקטין מבלי לאמוד את ההבדלים בתפוצת הקומפלקסים השונים המצויים בדם. Pajvani ועמיתיו מצאו כי רמות אדיפונקטין בעל משקל מולקולרי גבוה הינן פרופורציונליות לכלל רמת האדיפונקטין בסרום ובעלות קורלציה טובה יותר למידת הרגישות לאינסולין (Pajvani *et al.* 2004). קיימת אפשרות שלמרות היעדר הבדלים ברמות האדיפונקטין הכלליות בסרום, תזונה עשירה בשומן גרמה להבדלים ביחס בין רמות אדיפונקטין HMW לרמות אדיפונקטין LMW. ייתכן וזו הסיבה לחוסר השפעה של תזונה עשירה בשומן על רמות אדיפונקטין בסרום. יחד עם זאת, טרם פותחו שיטות, רגישות ומדוייקות למדידת ההבדלים בין הקומפלקסים השונים של אדיפונקטין ולא התאפשרה בדיקה של הנחה זאת. למרות היעדר הבדלים ברמות האדיפונקטין בסרום בין הקבוצות, נמצא מתאם חיובי בין רמות אדיפונקטין בסרום, משקל רקמת השומן (איור 10) ומשקל הגוף. ממצא זה יכול להצביע על כך שהעלייה במסת השומן מפצה על הירידה בביטוי אדיפונקטין. עדות התומכת בתאוריה זאת נמצאה כאשר בדקנו רמות אדיפונקטין בסרום של עכברים בעלי משקל מסת שומן דומה ונמצא, כי רמות אדיפונקטין בסרום היו נמוכות במובהק בעכברים שקיבלו תזונה עשירה בשומן בהשוואה לעכברים מקבוצת הביקורת.

כאשר בוחנים את ממצאי המחקר הנוכחי וממצאים של דיווחים אחרים (Yoda *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2002; Combs *et al.* 2003; Esposito *et al.* 2003; Naderali *et al.* 2003; Tsuchida *et al.* 2004) ניתן לראות שרמות אדיפונקטין בדם אינן קשורות בהכרח לשינוי בביטוי mRNA של אדיפונקטין ברקמת השומן. במחקר הנוכחי בניסוי ההגבלה הקלורית נצפתה עליה ברמות ההורמון בסרום למרות שלא נמצאו הבדלים בביטוי ברקמת השומן. בניסוי ההזנה בדיאטה עשירה בשומן לא נמצאו הבדלים ברמות ההורמון בדם למרות הירידה בביטוי ברקמת השומן. ככל הנראה רמות אדיפונקטין בדם מבוקרות על ידי מנגנונים מורכבים בשלב שלאחר השעתוק שטרם נחקרו לעומק.

מורכבות מנגנוני הבקרה באה לידי ביטוי גם במגמות המתאם השונות שנמצאו בניסויים השונים. בניסוי ההגבלה הקלורית נמצאה קורלציה הפוכה בין משקל הגוף ומשקל רקמת השומן לרמות אדיפונקטין בסרום. לעומתו בניסוי התזונה העשירה בשומן נמצאה קורלציה חיובית בין רמות ההורמון בסרום משקל הגוף ומשקל רקמת השומן של קבוצת הניסוי ואילו בקבוצת הביקורת לא נמצאה קורלציה כלל. מכאן, שהבקרה על רמות ההורמון בדם אינה תלויה רק בתכולה הקלורית של התזונה אלא גם בהרכב התזונה וספציפית בהרכב חומצות השומן.

על מנת להמשיך ולהעריך את ההשפעה של צריכה של דיאטה עשירה בשומן, נמדד ביטוי mRNA של הרצפטורים של אדיפונקטין, AdipoR1 ו-AdipoR2 בכבד ובשרירי השלד. ככל הנראה AdipoR1 הוא רצפטור של החלק הגלובולרי של אדיפונקטין ונפוץ בעיקר בשריר, בעוד ש-AdipoR2 הוא רצפטור של החלבון השלם ומבוטא בעיקר בכבד (Yamauchi *et al.* 2003). נצפתה תגובה ספציפית לכל רקמה בביטוי RNA של הרצפטורים. בעוד שבכבד נמצאה ירידה בביטוי (איור 11), בשריר נמצאה עליה בביטוי RNA של הרצפטורים (איור 12).

המנגנונים האחראים לרגולציה של ביטוי הרצפטורים של אדיפונקטין אינם ברורים וקיימים דיווחים סותרים לגבי השפעות אינסולין על ביטוי הרצפטורים. Tsuchida ועמיתיו דיווחו כי קיים מתאם שלילי בין רמות אינסולין בדם וביטוי mRNA של שני הרצפטורים הן בשריר והן בכבד. במקביל, יש ירידה בביטוי הרצפטורים ברקמות שונות בעכברים מזן ob/ob. מתן אינסולין דיכא ביטוי של הרצפטורים על ידי שפעול של PI3 קינאז ועיכוב של Foxo1 (Tsuchida *et al.* 2004). יחד עם זאת, משך הניסוי במחקר זה וההבדלים במידת הרגישות לאינסולין לא דווחו. Inukai דיווח כי הביטוי בתאי שריר של AdipoR1 אך לא של AdipoR2 דוכא בעקבות מתן אינסולין (Inukai *et al.* 2005). בניגוד לדיווחים הללו, נמצא מתאם חיובי בין רמות אינסולין לביטוי AdipoR1 בשרירי שלד (Staiger *et al.* 2004), אך לא נמצאו הבדלים בביטוי של AdipoR1 בשרירים של מטופלים סוכרתיים או בריאים (Kharroubi *et al.* 2003; Debard *et al.* 2004).

גורמים אחרים פרט לאינסולין שעשויים להיות מעורבים בבקרה של ביטוי הרצפטורים כוללים: הגברת הביטוי בצום, דיכוי הביטוי בעת האכלה חוזרת (Staiger *et al.* 2004) או רמות של חומצות שומן חופשיות בדם (Kharroubi *et al.* 2003). לאור האמור לעיל ייתכן שהשינוי ברמות האינסולין בצום מלווה בשינוי בפרופיל השומנים בדם שעשוי להוביל להבדלים שנצפו בביטוי הרצפטורים במחקר הנוכחי.

במחקר זה, נבדקו הרמות של AMPK ו- ACC בצורתם המזורחנת. זאת לאור העובדה שידוע כי אדיפונקטין גורם להגברת חמצון חומצות שומן באמצעות זרחון ושפעול של AMPK שלאחר מכן מזרחן ומעכב את ACC (Tomas *et al.* 2002; Yamauchi *et al.* 2002). נמצאה השפעה תלויית רקמה של תזונה עשירת שומן אנזימים אלו, בעוד שלא נמצאו הבדלים בין הקבוצות במידת הזרחון של AMPK ו- ACC בכבד (איורים 13,15), הרי שבשריר היתה ירידה ברמות האנזימים המזורחנים phospho-AMPK ו- phosphoACC בקבוצה שניזונה מתזונה עשירה בשומן (איורים 14,16).

השפעות תזונתיות על מידת הזרחון הפעילות של AMPK ו- ACC עדיין אינה ברורה. Wilkes מתאר גם הוא השפעה ספציפית לרקמה של תזונה עשירה בשומן על זרחון של AMPK. בעוד שהזרחון של AMPK בשריר ירד כתוצאה מהתזונה, לא נמצאו הבדלים בכבד (Wilkes *et al.* 2005). מחקרים קודמים כבר הראו שצום של 24 שעות והגבלה קלורית לא השפיעו על הזרחון של AMPK הן בכבד והן בשריר למרות רמות שונות של לפטין, בעוד שרמות ACC ו- phospho-ACC בכבד היו נמוכות (Gonzalez *et al.* 2004). Tanaka ועמיתיו אף דיווחו כי בעכברים טרנסגניים המבטאים לפטין ביתר נמצאה עליה משמעותית במידת הזרחון של AMPK ו- ACC בהשוואה לעכברים wild type. הזנה בדיאטה עשירה בשומן הביאה לביטול ההבדלים שנמצאו בהשוואה לקבוצת הביקורת, אולם במחקר זה לא נבדקו שינויים ברמות אדיפונקטין לאחר מתן הדיאטה (Tanaka *et al.* 2005).

קיימים דיווחים לא עיקביים לגבי ההשפעות של חומצות שומן מסוגים שונים על רמות AMPK ו- ACC מזורחנים בכבד. בעוד ש- Suchankova ועמיתה דיווחו על עליה ברמת האנזימים המזורחנים לאחר 7 ימים של תזונה מועשרת בשמן דגים (Suchankova *et al.* 2005), Dobrzyn לא דיווח על השפעה של העשרת התזונה בשמן דגים במשך 14 ימים על רמות phospho-AMPK בכבד ובשריר (Dobrzyn *et al.* 2005). כמו כן נמצא ש ACC בכבד היה פעיל ביותר בחולדות שקיבלו תזונה עשירה בחומצות שומן רוויות ומידת הפעילות היתה בעלת מתאם חיובי עם רמות טריגליצרידים בכבד ובפלסמה (Takeuchi *et al.* 2001).

אין ספק כי לתזונה, ולחומצות השומן בתזונה בפרט, קיימת השפעה שונה ברשמות השונות על זרחון AMPK ו- ACC. יחד עם זאת, באף אחד מהמחקרים שנסקרו לעיל לא הוערכה מידת התנגודת לאינסולין או רמות אדיפונקטין בסרום, ופרט למחקר בו נבדקה השפעת התזונה על הסיגנל של לפטין (Gonzalez *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2005), לא צוינו הבדלים במשקל הגוף בין הקבוצות הנחקרות. יתכן כי השומן בתזונה גורם לפגיעה בסיגנל של אדיפונקטין ו/או לפטין בשריר ועל כן נגרמת ירידה במידת הזרחון של AMPK ו-

ACC, תיאוריה שנתמכת על ידי המחקר של Tsuchida (Tsuchida *et al.* 2004). אולם, יש צורך לבצע ניסויים נוספים על מנת לבדוק השפעות אפשריות אלה. פגיעה במנגנון הסיגנל לא יכולה להסביר את ההבדלים שנמצאו בין הרקמות בתגובה לתזונה.

יתכן, שניתן להסביר חלקית את ההבדלים בשפעול של AMPK ו-ACC בין השריר לכבד באמצעות ההבדלים בתפוצת קומפלקסים של אדיפונקטין בעלי משקל שונה (LMW ו- HMW) כפי שתוארו על ידי Wilkes (Wilkes *et al.* 2005) ועל-ידי ההבדלים בביטוי הרצפטורים. מאחר שרמות אדיפונקטין בעל משקל גבוה (HMW) פרופורציונליות לכלל רמות האדיפונקטין ורלוונטיות לרגישות הכבד לאינסולין, הן האחראיות להיעדר הבדלים ברמות phospho-ACC ו- phospho-AMPK בכבד בין קבוצת הניסוי לקבוצת הביקורת. מצד שני, אדיפונקטין בעל משקל מולקולרי נמוך (LMW) פחות זמין בדם ובעקבות כך פחות אדיפונקטין גלובולרי היה זמין לשריר. יתכן והעליה בביטוי הרצפטורים באה לפצות על מיעוט ההורמון ובכך להגדיל את הסיכוי לאינטראקציה עם ההורמון וממתנת הירידה במידת הזרחון של AMPK ו-ACC.

לסיכום, מחקר זה הראה השפעות שונות של משטרים תזונתיים שונים על ביטוי אדיפונקטין. הגבלה קלורית גרמה לירידה משקל הגוף ולעליה ברמות אדיפונקטין בסרום של חולדות למרות שלא נמצאו שינויים בביטוי החלבון ברקמת השומן. דיאטה עשירה בשומן גרמה לעליה במשקל ולירידה ברגישות לאינסולין. כמו כן נמצאה ירידה בביטוי של אדיפונקטין ברקמת השומן שלא באה לידי ביטוי ברמות אדיפונקטין בסרום. בשריר, נמצאה עליה בביטוי הרצפטורים וירידה ברמות AMPK ו-ACC ממזרחנים. בניגוד לשריר, בכבד חלה ירידה בביטוי הרצפטורים אולם לא נמצאו שינויים ברמות AMPK ו-ACC המזרחנים. היעדר המתאם בין רמות אדיפונקטין בסרום למידת התנגדות לאינסולין כפי שנמדדה על-ידי HOMA-IR בשני הניסויים, יחד עם הממצאים השונים ברקמות היעד של אדיפונקטין שנבדקו, הכבד והשריר מעלה סימן שאלה לגבי אופי הקשר בין רמות אדיפונקטין כלליות בסרום ורגישות כלל הגוף לאינסולין.

מעבודה זו עולה, כי לתזונה השפעה חשובה על ביטוי רמות אדיפונקטין וכי לתזונה עשירה בשומן השפעה תלוית רקמה על אדיפונקטין ואנזימים הקשורים אליו. אולם, למרות שיש קשר ברור בין תזונה למידת הרגישות לאינסולין, עדיין לא ברור תפקידו של אדיפונקטין בקשר הזה.

5. ביבליוגרפיה

- Abu-Elheiga, L., D. B. Almarza-Ortega, A. Baldini and S. J. Wakil Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem* (1997) **272**: 10669-77.
- Abu-Elheiga, L., W. R. Brinkley, L. Zhong, S. S. Chirala, G. Woldegiorgis and S. J. Wakil The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**: 1444-9.
- Abu-Elheiga, L., A. Jayakumar, A. Baldini, S. S. Chirala and S. J. Wakil Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**: 4011-5.
- Allred, J. B. and C. R. Roman-Lopez Enzymatically inactive forms of acetyl-CoA carboxylase in rat liver mitochondria. *Biochem J* (1988) **881-5**: 251 (
- Anderlova, K., J. Kremen, R. Dolezalova, J. Housova, D. Haluzikova, M. Kunesova and M. Hakuzik The influence of very-low-calorie-diet on serum leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in obese women. *Physiol Res* (2005) **Epub ahead of print**
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling and C. J. Small AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* (2004) **279**: 12005-8.
- Asayama, K., H. Hayashibe, K. Dobashi, N. Uchida, T. Nakane, K. Kodera, A. Shirahata and M. Taniyama Decrease in serum adiponectin level due to obesity and visceral fat accumulation in children. *Obes Res* (2003) **11**: 1072-9.
- Ayyad, C. and T. Andersen Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obes Rev* (2000) **1**: 113-9.
- Baez-Saldana, A., I. Zendejas-Ruiz, C. Revilla-Monsalve, S. Islas-Andrade, A. Cardenas, A. Rojas-Ochoa, A. Vilches and C. Fernandez-Mejia Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* (2004) **79**: 238-43.
- Barzilai, N., S. Banerjee, M. Hawkins, C. J. Chang, W. Chen and L. Rossetti The effect of age-dependent increase in fat mass on peripheral insulin action is saturable. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (1998) **53**: B141-6.
- Barzilai, N., S. Banerjee, M. Hawkins, W. Chen and L. Rossetti Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest* (1998) **101**: 1353-61.
- Beg, Z. H., D. W. Allmann and D. M. Gibson Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* (1973) **54**: 1362-9.
- Berg, A. H., T. P. Combs, X. L. Du, M. Brownlee and P. Scherer The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* (2001) **7**: 947-9.53
- Berg, A. H., T. P. Combs and P. E. Scherer ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* (2002) **13**: 84-89.
- Bernstein, E. L., P. Koutkia, K. Ljungquist, J. Breu, B. Canavan and S. Grinspoon Acute regulation of adiponectin by free fatty acids. *Metabolism* (2004) **53**: 790-3.
- Bianchi, A., J. L. Evans, A. J. Iverson, A. C. Nordlund, T. D. Watts and L. A. Witters Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* (1990) **265**: 1502-9.
- Bjorntorp, P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* (1991) **14**: 1132-43.

- Blüher, M., M. Fasshauer, S. Kralisch, M. R. Schon, K. Krohn and R. Paschke Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **329**: 1127-32.
- Boden, G., X. Chen, R. A. DeSantis and Z. Kendrick Effects of age and body fat on insulin resistance in healthy men. *Diabetes Care* (1993) **16**: 728-33.
- Boone, A. N., A. Chan, J. E. Kulpa and R. W. Brownsey Bimodal activation of acetyl-CoA carboxylase by glutamate. *J Biol Chem* (2000) **275**: 10819-25.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) **72**: 248-54.
- Bray, G. A. and B. M. Popkin Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* (1998) **68**: 1157-1173.
- Brehm, B. J., R. J. Seeley, S. R. Daniels and D. A. D'Alessio A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* (2003) **88**: 1617-23.
- Brinkworth, G. D., M. Noakes, J. B. Keogh, N. D. Luscombe, G. A. Wittert and P. M. Clifton Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2004) **28**: 661-70.
- Brinkworth, G. D., M. Noakes, B. Parker, P. Foster and P. M. Clifton Long-term effects of advice to consume a high-protein, low-fat diet, rather than a conventional weight-loss diet, in obese adults with type 2 diabetes: one-year follow-up of a randomised trial. *Diabetologia* (2004) **47**: 1677-86.
- Bronner, M., R. Hertz and J. Bar-Tana Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *Biochem J* (2004) **384**: 295-305.
- Buemann, B., T. I. Sorensen, O. Pedersen, E. Black, C. Holst, S. Toubro, S. Echwald, J. J. Holst, C. Rasmussen and A. Astrup Lower-body fat mass as an independent marker of insulin sensitivity--the role of adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2005) **29**: 624-31.
- Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* (2004) **29**: 18-24.
- Carling, D., V. A. Zammit and D. G. Hardie A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* (1987) **223**: 217-22.
- Carlson, C. A. and K. H. Kim Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* (1973) **248**: 378-80.
- Choi, Y. Y., K. Osada, Y. Ito, T. Nagasawa, M. R. Choi and N. Nishizawa Effects of dietary protein of Korean foxtail millet on plasma adiponectin, HDL-cholesterol, and insulin levels in genetically type 2 diabetic mice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* (2005) **69**: 31-37.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) **162**: 156-9.
- Cnop, M., P. J. Havel, K. M. Utzschneider, D. B. Carr, M. K. Sinha, E. J. Boyko, B. M. Retzlaff, R. H. Knopp, J. D. Brunzell and S. E. Kahn Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* (2003) **46**: 459-69.
- Colberg, S. R., J. A. Simoneau, F. L. Thaete and D. E. Kelley Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* (1995) **95**: 1846-53.
- Combs, T. P., A. H. Berg, M. W. Rajala, S. Klebanov, P. Iyengar, J. C. Jimenez-Chillaron, M. E. Patti, S. L. Klein, R. S. Weinstein and P. E. Scherer Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* (2003) **52**: 268-76.

- Crute, B. E., K. Seefeld, J. Gamble, B. E. Kemp and L. A. Witters Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* (1998) **273**: 35347-54.
- Davies, S. P., N. R. Helps, P. T. Cohen and D. G. Hardie 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* (1995) **377**: 421-5.
- Davies, S. P., A. T. Sim and D. G. Hardie Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem* (1990) **187**: 183-90.
- Debard, C., M. Laville, V. Berbe, E. Loizon, C. Guillet, B. Morio-Liondore, Y. Boirie and H. Vidal Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* (2004) **47**: 917-925.
- Dobrzyn, A., P. Dobrzyn, M. Miyazaki and J. M. Ntambi Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **332**: 892-896.
- Enzi, G., M. Gasparo, P. R. Biondetti, D. Fiore, M. Semisa and F. Zurlo Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am J Clin Nutr* (1986) **44**: 739-46.
- Esposito, K., A. Pontillo, C. Di Palo, G. Giugliano, M. Masella, R. Marfella and D. Giugliano Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women - A randomized trial. *JAMA* (2003) **289**: 1799-1804.
- Faergeman, N. J. and J. Knudsen Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* (1997) **323 (Pt 1)**: 1-12.
- Farnsworth, E., N. D. Luscombe, M. Noakes, G. Wittert, E. Argyiou and P. M. Clifton Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am J Clin Nutr* (2003) **78**: 31-9.
- Feldman H, R. D. (1971). *Mathematical Theory of radioimmunoassay. Principles of competitive protein-binding assays*. D. W. Odell WD. Philadelphia, J.B. Leppincott Company: 158-203.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. S. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain and H. F. Lodish Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**: 2005-2010.
- Fryer, L. G., A. Parbu-Patel and D. Carling The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* (2002) **277**: 25226-32.
- Garaulet, M., N. Viguerie, S. Porubsky, E. Klimcakova, K. Clement, D. Langin and V. Stich Adiponectin gene expression and plasma values in obese women during very-low-calorie diet. Relationship with cardiovascular risk factors and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) **89**: 756-60.
- Gonzalez, A. A., R. Kumar, J. D. Mulligan, A. J. Davis, R. Weindruch and K. W. Saupe Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2004) **287**: E1032-E1037.
- Gregolin, C., E. Ryder, R. C. Warner, A. K. Kleinschmidt, H. C. Chang and M. D. Lane Liver acetyl coenzyme A carboxylase. II. Further molecular characterization. *J Biol Chem* (1968) **243**: 4236-45.
- Grundleger, M. L. and S. W. Thenen Decreased insulin binding, glucose transport, and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. *Diabetes* (1982) **31**: 232-7 :
- Hardie, D. G. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* (1989) **28**: 117-46.

- Hardie, D. G., D. Carling and M. Carlson The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* (1998) **67**: 821-55.
- Hardie, D. G., J. W. Scott, D. A. Pan and E. R. Hudson Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* (2003) **546**: 113-20.
- Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* (1956) **11**: 298-300.
- Harrison, D. E. and J. R. Archer Natural selection for extended longevity from food restriction. *Growth Dev Aging* (1989) **53**: 3.
- Hawley, S. A., M. A. Selbert, E. G. Goldstein, A. M. Edelman, D. Carling and D. G. Hardie 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* (1995) **270**: 27186-91.
- Haystead, T. A., F. Moore, P. Cohen and D. G. Hardie Roles of the AMP-activated and cyclic-AMP-dependent protein kinases in the adrenaline-induced inactivation of acetyl-CoA carboxylase in rat adipocytes. *Eur J Biochem* (1990) **187**: 199-205.
- Hill, J. O., E. L. Melanson and H. T. Wyatt Dietary fat intake and regulation of energy balance: Implications for obesity. *J Nutr* (2000) **130**: 284S-288S.
- Holliday, R. Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays* (1989) **10**: 125-7.
- Hong, S. P., F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling and M. Carlson Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**: 8839-43.
- Hotamisligil, G. S. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* (1999) **245**: 621-5.
- Hotta, K., T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa and Y. Matsuzawa Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) **20**: 1595-9.
- Hu, E., P. Liang and B. M. Spiegelman AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* (1996) **271**: 10697-10703.
- Hug, C., J. Wang, N. S. Ahmad, J. S. Bogan, T.-S. Tsao and H. F. Lodish T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *PNAS* (2004) **101**: 10308-10313.
- Ibrahim, A., S. Natrajan and R. Ghafoorunissa Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism* (2005) **54**: 240-6.
- Inukai, K., Y. Nakashima, M. Watanabe, N. Takata, T. Sawa, S. Kurihara, T. Awata and S. Katayama Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) **288**: E876-E882.
- Iverson, A. J., A. Bianchi, A. C. Nordlund and L. A. Witters Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit composition. *Biochem J* (1990) **269**: 365-71.
- Iwaki, M., M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima and I. Shimomura Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* (2003) **52**: 1655-63.
- Kahn, B. B. and J. S. Flier Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* (2000) **106**: 473-8.1
- Kamohara, S., R. Burcelin, J. L. Halaas, J. M. Friedman and M. J. Charron Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* (1997) **389**: 374-7.

- Kersten, S., B. Desvergne and W. Wahli Roles of PPARs in health and disease. *Nature* (2000) **405**: 421-4.
- Kharroubi, H., J. Rasschaert, D. L. Eizirik and M. Cnop Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) **312**: 1118-1122.
- Kim, K. H. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Curr Top Cell Regul* (1983) **22**: 143-76.
- Kissebah, A. H. Insulin resistance in visceral obesity. *Int J Obes* (1991) **15 Suppl 2**: 109-15.
- Kissebah, A. H., G. E. Sonnenberg, J. Myklebust, M. Goldstein, K. Broman, R. G. James, J. A. Marks, G. R. Krakower, H. J. Jacob, A. Weber, L. Martin, J. Blangero and A. G. Comuzzie Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**: 14478-14483.
- Klaus, S. and J. Keijer Gene expression profiling of adipose tissue: individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition* (2004) **20**: 115-20.
- Koubova, J. and L. Guarente How does calorie restriction work? *Genes Dev* (2003) **17**: 313-21.
- Kraegen, E. W., P. W. Clark, A. B. Jenkins, E. A. Daley, D. J. Chisholm and L. H. Storlien Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* (1991) **40**: 1397-403.
- Kwon, K., S. H. Jung, C. Choi and S. H. Park Reciprocal association between visceral obesity and adiponectin: in healthy premenopausal women. *Int J Cardiol* (2005) **101**: 385-90.
- Lane, M. A., D. K. Ingram and G. S. Roth Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicol Sci* (1999) **52**: 41-8.
- Liu, Y. M., J. M. Lacorte, N. Viguerie, C. Poitou, V. Pelloux, B. Guy-Grand, C. Coussieu, D. Langin, A. Basdevant and K. Clement Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short-term very low calorie diet and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab* (2003) **88**: 5881-6.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-T)(-Delta Delta C) method. *Methods* (2001) **25**: 402-408.
- Lochhead, P. A., I. P. Salt, K. S. Walker, D. G. Hardie and C. Sutherland 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* (2000) **49**: 896-903.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa and K. Matsubara CDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* (1996) **221**: 286-289.
- Maffei, M., H. Fei, G. H. Lee, C. Dani, P. Leroy, Y. Zhang, R. Proenca, R. Negrel, G. Ailhaud and J. M. Friedman Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**: 6957-60.
- Mao, J. and H. M. Seyfert Promoter II of the bovine acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha-encoding gene is widely expressed and strongly active in different cells. *Biochim Biophys Acta* (2002) **1576**: 324-9.
- Masoro, E. J. Nutrition as a modulator of the aging process. *Physiologist* (1984) **27**: 98-101.
- Masoro, E. J., B. P. Yu and H. A. Bertrand Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) **79**: 4239-41.
- McCay, C. M., M. F. Cromwell and L. A. Maynard The effect of retarded growth upon the length of life span and ultimate body size. (1935) **10**: 63-79.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* (1997) **244**: 1-14.

- Milan, G., M. Granzotto, A. Scarda, A. Calcagno, C. Pagano, G. Federspil and R. Vettor Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* (2002) **10**: 1095-103.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fougère, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* (2004) **428**: 569-74.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Muller, D. Carling and B. B. Kahn Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* (2002) **415**: 339-43.
- Morgan CR, L. A. Immunoassay of insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, and diabetic rats. *diabetes* (1963) **12**: 115-26.
- Moss, J. and M. D. Lane Acetyl coenzyme A carboxylase. IV. Biotinyl prosthetic group-independent malonyl coenzyme A decarboxylation and carbosyl transfer: generalization to other biotin enzymes. *J Biol Chem* (1972) **247**: 4952.9-
- Mousavinasab, F., T. Tahtinen, J. Jokelainen, P. Koskela, M. Vanhala, J. Oikarinen and S. Keinänen-Kiukaanniemi Lack of increase of serum adiponectin concentrations with a moderate weight loss during six months on a high-caloric diet in military service among a young male Finnish population. *Endocrine* (2005) **26**: 65-69.
- Mu, J., J. T. Brozinick, Jr., O. Valladares, M. Bucan and M. J. Birnbaum A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* (2001) **7**: 1085-94.
- Muse, E. D., S. Obici, S. Bhanot, B. P. Monia, R. A. McKay, M. W. Rajala, P. E. Scherer and L. Rossetti Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* (2004) **114**: 232-9.
- Naderali, E. K., D. Estadella, M. Rocha, L. C. Pickavance, S. Fatani, R. G. Denis and G. Williams A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci (Lond)* (2003) **105**: 403-8.
- Naderali, E. K., D. Estadella, M. Rocha, L. C. Pickavance, S. Fatani, R. G. P. Denis and G. Williams A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clinical Science* (2003) **105**: 403-408.
- Nagasawa, A., K. Fukui, T. Funahashi, N. Maeda, I. Shimomura, S. Kihara, M. Waki, K. Takamatsu and Y. Matsuzawa Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res* (2002) **34**: 635-639.
- Nakano, Y., T. Tobe, N. H. Choi, Miura, T. Mazda and M. Tomita Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Int J Obes* (1996) **120**: 803-812.
- Oh, S. Y., S. K. Park, J. W. Kim, Y. H. Ahn, S. W. Park and K. S. Kim Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver. *J Biol Chem* (2003) **278**: 28410-7.
- Pajvani, U. B., X. Du, T. P. Combs, A. H. Berg, M. W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee and P. E. Scherer Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* (2003) **278**: 9073-85.
- Pajvani, U. B., M. Hawkins, T. P. Combs, M. W. Rajala, T. Doebber, J. P. Berger, J. A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A. H. Xiang, K. M. Utzschneider, S. E. Kahn, J. M. Olefsky, T. A. Buchanan and P. E. Scherer Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* (2004) **279**: 12152-62.
- Pischon, T., C. J. Girman, N. Rifai, G. S. Hotamisligil and E. B. Rimm Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men. *Am J Clin Nutr* (2005) **81**: 780-786.

- Punyadeera, C., A. H. Zorenc, R. Koopman, A. J. McAinch, E. Smit, R. Manders, H. A. Keizer, D. Cameron-Smith and L. J. van Loon The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol* (2005) **152**: 427-36.
- Rabinowitz, D. and K. L. Zierler Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Characterization of insulin resistance and evidence for adaptive hyperinsulinism. *J Clin Invest* (1962) **41**: 2173-81.
- Reaven, G. M. The fourth musketeer--from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* (1995) **38**: 3-13.
- Richardson, A. *The effect of age and nutrition on protein synthesis by cell and tissues from mammals.* (1985) Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Rossi, A. S., Y. B. Lombardo, J. M. Lacorte, A. G. Chicco, C. Rouault, G. Slama and S. W. Rizkalla Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (2005) **289**: R486-R494.
- Saravanan, N., A. Haseeb, N. Z. Ehtesham and Ghafoorunissa Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol* (2005) **153**: 159-65 :
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini and H. F. Lodish A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* (1995) **270**: 26746-9.
- Shapiro, L. and P. E. Scherer The crystal structure of a complement1-q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* (1998) **8**: 335-338.
- Shimano, H., N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, A. H. Hasty, J. Osuga, Y. Tamura, F. Shionoiri, Y. Iizuka, K. Ohashi, K. Harada, T. Gotoda, S. Ishibashi and N. Yamada Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* (1999) **274**: 35832-9.
- Shimokata, H., J. D. Tobin, D. C. Muller, D. Elahi, P. J. Coon and R. Andres Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity. *J Gerontol* (1989) **44**: M66-73.
- Shimomura, I., T. Funahashi, M. Takahashi, K. Maeda, K. Kotani, T. Nakamura, S. Yamashita, M. Miura, Y. Fukuda, K. Takemura, K. Tokunaga and Y. Matsuzawa Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* (1996) **2**: 800-3.
- Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* (2000) **106**: 171-6.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* (1996) **273**: 59-63.
- Soukas, A., P. Cohen, N. D. Socci and J. M. Friedman Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* (2000) **14**: 963-80.
- Spiegelman, B. M. and J. S. Flier Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* (1996) **87**: 377-89.
- Staiger, H., S. Kaltenbach, K. Staiger, N. Stefan, A. Fritsche, A. Guirguis, C. Peterfi, M. Weisser, F. Machicao, M. Stumvoll and H. U. Haring Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *Diabetes* (2004) **53**: 2195-2201.
- Statnick, M. A., L. S. Beavers, L. J. Conner, H. Corominola, D. Johnson, C. D. Hammond, R. Rafaeloff-Phail, T. Seng, T. M. Suter, J. P. Sluka, E. Ravussin, R. A. Gadski and J. F. Caro Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* (2000) 81-88.

- Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima and M. A. Lazar The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* (2001) **409**: 307-12.
- Stern, J. S., M. D. Gades, C. M. Wheelton and A. T. Borchers Calorie restriction in obesity: prevention of kidney disease in rodents. *J Nutr* (2001) **131**: 913S-917S.
- Suchankova, G., M. Tekle, A. K. Saha, N. B. Ruderman, S. D. Clarke and T. W. Gettys Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **326**: 851-8.
- Suchankova, G., M. Tekle, A. K. Saha, N. B. Ruderman, S. D. Clarke and T. W. Gettys Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) **326**: 851-858.
- Surwit, R. S., C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin and M. N. Feinglos Diet-Induced Type-II Diabetes in C57Bl/6J Mice. *Diabetes* (1988) **37**: 1163-1167.
- Takeuchi, H., T. Nakamoto, Y. Mori, M. Kawakami, H. Mabuchi, Y. Ohishi, N. Ichikawa, A. Koike and K. Masuda Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* (2001) **65**: 1748-54.
- Tanaka, T., S. Hidaka, H. Masuzaki, S. Yasue, Y. Minokoshi, K. Ebihara, H. Chusho, Y. Ogawa, T. Toyoda, K. Sato, F. Miyanaga, M. Fujimoto, T. Tomita, T. Kusakabe, N. Kobayashi, H. Tanioka, T. Hayashi, K. Hosoda, H. Yoshimatsu, T. Sakata and K. Nakao Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes* (2005) **54**: 2365-74.
- Tomas, E., T. S. Tsao, A. K. Saha, H. E. Murrey, C. Zhang, S. I. Itani, H. F. Lodish and N. B. Ruderman Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**: 16309-13.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai and T. Kadowaki Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* (2004) **279**: 30817-22.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai and T. Kadowaki Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *Journal of Biological Chemistry* (2004) **279**: 30817-30822.
- Unger, R. H. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* (2002) **53**: 31.9-36
- Vilarrasa, N., J. Vendrell, J. Maravall, M. Broch, A. Estepa, A. Megia, J. Soler, I. Simon, C. Richart and J. M. Gomez Distribution and determinants of adiponectin, resistin and ghrelin in a randomly selected healthy population. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2005) **63**: 329-35.
- Vohl, M. C., R. Sladek, J. Robitaille, S. Gurd, P. Marceau, D. Richard, T. J. Hudson and A. Tchernof A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* (2004) **12**: 1217-22.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* (1983) **52**: 537-79.
- Wang, Y., A. Xu, C. Knight, L. Y. Xu and G. J. Cooper Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* (2002) **277**: 19521-9.
- Weindruch, R. and R. L. Walford *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. (1988) Springfield, Illinois, Charles C. Thomas.

- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R. E. Pratley and P. A. Tataranni Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* (2001).1930-5 :86 (
- White, R. T., D. Damm, N. Hancock, B. S. Rosen, B. B. Lowell, P. Usher, J. S. Flier and B. M. Spiegelman Human adiponectin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* (1992) **267**: 9210-3.
- Wilkes, J., M. Nguyen, G. Bandyopadhyay, E. Nelson and J. Olefsky Topiramate Treatment Causes Skeletal Muscle Insulin Sensitization And Increased Acrp30 Secretion In High-Fat-Fed Male Wistar Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) **Epub ahead of print**
- Wilkes, J. J., A. Bonen and R. C. Bell A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (1998) **38**: E679-E686.
- Willson, T. M., M. H. Lambert and S. A. Kliewer Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* (2001) **70**: 341-67.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* (1996) **27** :0E299-304.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* (1999) **277**: E1-10.
- Winder, W. W., P. S. MacLean, J. C. Lucas, J. E. Fernley and G. E. Trumble Effect of fasting and refeeding on acetyl-CoA carboxylase in rat hindlimb muscle. *J Appl Physiol* (1995) **78**: 578-82.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai and T. Kadowaki Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* (2003) **423**: 762-769-
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai and T. Kadowaki Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* (2003) **423**: 762-9.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn and T. Kadowaki Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* (2002) **8**.1288-95 :
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M. L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel and T. Kadowaki The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* (2001) **7**: 941-6.
- Yin, W., J. Mu and M. J. Birnbaum Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* (2003) **278**: 43074-80.
- Yoda, M., Y. Nakano, T. Tobe, S. Shioda, N. H. Choi-Miura and M. Tomita Characterization of mouse GBP28 and its induction by exposure to cold. *Int J Obes* (2001) **25**.75-83 :
- You, M., R. Considine, T. Leone, D. Kelly and D. Crabb Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* (2005) **Epub ahead of print**
- Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen and G. I. Shulman Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol-3kinase activity in muscle. *J Biol Chem* (2002) **277**: 50230-6.

- Zhang, H., Z. Yang, Y. Shen and L. Tong Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Science* (2003) **299**: 2064-7.
- Zhang, Y., M. Matheny, S. Zolotukhin, N. Tumer and P. J. Scarpace Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta 3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* (2002) **1584**: 115-122.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* (2001) **108**: 1167-74.
- Zhu, M., J. Miura, L. X. Lu, M. Bernier, R. DeCabo, M. A. Lane, G. S. Roth and D. K. Ingram Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol* (2004) **39**: 1049-59.

Abstract

Adiponectin is an adipocyte-secreted hormone that has been shown to be involved in glucose and lipid metabolism. Adiponectin binds to 2 different receptors, AdipoR1 and AdipoR2 in liver and skeletal muscle activating a protein kinase cascade. Its effects are attributed to the activation of AMP-kinase (AMPK) that leads to increased acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation and inactivation reduced malonyl-CoA production. Studies suggest that caloric intake may be involved in the regulation of serum adiponectin levels. Caloric restriction and weight loss achieved by long-term lifestyle change are associated with higher adiponectin concentrations. On the other hand, diet-induced obesity and type-2 diabetes are associated with decreased plasma adiponectin levels. The aim of the present study was to assess the effect of either caloric restriction or high-fat (HF) diet on adiponectin mRNA and protein expression in adipose tissue and serum levels. In addition, AMPK and ACC phosphorylation in the liver and skeletal muscles and adiponectin receptors expression was determined in the HF diet experiment.

Fourteen Sprague Dawley male rats were fed either ad libitum (AL) or 60% caloric restriction (CR) of average daily food intake for 4 months. AL rats exhibited significantly greater weight gain than CR. OGTT curves were slightly lower in the CR group, but AUC did not differ between the groups. Fasting glucose and insulin levels, and consequently HOMA-IR did not differ between the groups. No differences were observed in adiponectin RNA expression and protein levels in adipose tissue of CR animals compared with AL. However, serum adiponectin levels significantly higher in the CR rats (6.61 ± 0.60 vs. $3.07 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$ $P < 0.001$). Serum adiponectin levels also negatively correlated with both body weight and epididymal fat weight.

Forty C57bl/6J male mice were fed either a HF or control diet for 4 months. HF mice exhibited significantly greater weight gain, abnormal OGTT curves and elevated HOMA (5.3 ± 0.89 vs. 2.8 ± 0.39). A significant reduction of adiponectin RNA expression (51%) and protein levels (15%) was observed in adipose tissue of HF animals. However, serum adiponectin levels did not differ between groups ($7.12 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ vs. $6.44 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$). Yet, serum adiponectin levels of the HF group positively correlated with epididymal fat weight. Expression of hepatic mRNA of AdipoR1 and AdipoR2 was reduced by 40% and 60% respectively in HF-High Weight animals. In contrast, receptor mRNA expression increased twofold in muscle tissues. No effect was found on hepatic AMP-activated protein kinase (AMPK) expression however, a significant reduction of phospho-AMPK levels in

muscles was observed. Hepatic Acetyl-CoA carboxylase (ACC) was similar between groups but in muscles, the inactive form phospho-ACC was significantly reduced ($P < 0.05$). It is apparent from these results that nutrition has an important effect on adiponectin expression and levels. Caloric restriction led to increased serum adiponectin levels not associated with changes in its expression in adipose tissue. On the other hand, a high-fat diet led to decreased insulin sensitivity and down-regulated adiponectin expression in adipose tissue, but did not affect its serum levels. No correlation was found between insulin sensitivity and adiponectin serum levels in both experiments. These results emphasize the complexity of post-transcriptional control mechanisms for circulating adiponectin levels. HF diet also lowered related enzymes activity in skeletal muscles while receptor expression was elevated. In contrast, hepatic receptor abundance was decreased but related enzymes activity was not affected. These results suggest that HF diet has a tissue specific effect on adiponectin and associated enzyme expression. Yet, though there is a clear association of nutrition and insulin sensitivity, the role of adiponectin in this relation remains to be investigated.

**The effect of different nutritional regiments:
caloric restriction and high-fat diet
on the expression and levels of adiponectin
in mice and rats**

M.Sc. thesis

Submitted to the Faculty of Agriculture, Food and Environmental
Quality Sciences of the Hebrew University of Jerusalem

By
Maayan Barnea

Rehovot, Israel

January 2006