

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΗΣ ΣΕ
ΟΡΜΟΝΕΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ**

της
Ανατολής Π. Πετρίδου

Μεταπτυχιακή διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική ολοκλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Άσκηση και Υγεία)

2001
Θεσσαλονίκη

Εγκεκριμένη από το Καθηγητικό σώμα:

1ος Επιβλέπων: Βασίλης Μούγιος, αναπληρωτής καθηγητής

2ος Επιβλέπων: Παντελής Αρζόγλου, αναπληρωτής καθηγητής

3ος Επιβλέπων: Λάμπρος Συντώσης, αναπληρωτής καθηγητής

© 2001
Ανατολή Π. Πετρίδου
ALL RIGHTS RESERVED

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πριν δύο χρόνια βρισκόμουν σε παρόμοια θέση με τη σημερινή, προσπαθώντας να προλογίσω τη διπλωματική μου εργασία, προσπαθώντας να βρω τα κατάλληλα λόγια για να εκφράσω αυτά που νιώθω, προσπαθώντας να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που στάθηκαν πλάι μου.

Κατά δύο χρόνια μεγαλύτερη και έχοντας ανέβει ακόμη ένα σκαλί γνώσης, νιώθω ακόμη πιο σίγουρη για την επιλογή μου να ασχοληθώ με την επιστήμη που λέγεται Βιοχημεία της Άσκησης.

Μπαίνοντας ακόμη πιο βαθιά στο άγνωστο, με μονοπάτια σκοτεινά, που πολλές φορές ήταν δύσβατα και μη ελπιδοφόρα, η παρουσία του επιβλέποντα καθηγητή μου Βασίλη Μούγιου ήταν πηγή δύναμης για μένα. Σε όλες τις φάσεις της παρούσας εργασίας, από τη σύλληψη της ιδέας μέχρι και την ολοκλήρωση της συγγραφής της, ο Δρ Βασίλης Μούγιος ήταν πάντα κοντά μου, με αμέτρητες ώρες υπομονής, αισιοδοξίας και ανεκτίμητης βοήθειας. Τον ευγνωμονώ βαθιά για την επιστημονική του στήριξη και ιδιαίτερα για τη στήριξη του σε όλες τις δυσκολίες που συνάντησα σε αυτή την τόσο πλούσια για μένα πορεία.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή Παντελή Αρζόγλου και τον αναπληρωτή καθηγητή Λάμπρο Συντώση, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς και την αδερφή μου για την καθημερινή τους συμπαράσταση σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δύο εθελοντές που πήραν μέρος στις προσανατολιστικές μελέτες και στους δέκα εθελοντές που πήραν μέρος στο πείραμα.

Α.Π.

Θεσσαλονίκη, 15/10/2001

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανατολή Π. Πετρίδου

Επίδραση της άσκησης στη δραστικότητα της ευαίσθητης σε ορμόνες λιπάσης του
λιπώδους ιστού

(Υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή, Βασίλη Μούγιου)

Παρότι πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση της άσκησης στη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, δεν έχει μελετηθεί η δραστικότητα της ευαίσθητης σε ορμόνες λιπάσης (HSL), του ενζύμου που καθορίζει το ρυθμό λιπόλυσης, κατά τη διάρκεια της άσκησης. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης άσκησης μέτριας έντασης στην πραγματική δραστικότητα (ανάλογα με το βαθμό φωσφορυλίωσης) της HSL στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό. Στην έρευνα έλαβαν μέρος δέκα νέοι αγύμναστοι άντρες, οι οποίοι ποδηλάτησαν για 30 min σε καρδιακή συχνότητα 120-130 σφ/min. Πραγματοποιήθηκε βιοψία λιπώδους ιστού από την γλουτιαία περιοχή σε ηρεμία, στο 5ο, στο 15ο και στο 30ό λεπτό της άσκησης, καθώς και στο 15ο λεπτό παθητικής αποκατάστασης. Ο λιπώδης ιστός ομογενοποιήθηκε παρουσία αναστολέων της αποφωσφορυλίωσης και της φωσφορυλίωσης της HSL, ώστε να διατηρηθεί στο βαθμό φωσφορυλίωσής της τη στιγμή της βιοψίας. Η δραστικότητα της HSL υπολογίστηκε από τη μείωση της συγκέντρωσης των ενδογενών τριακυλογλυκερολών κατά τη διάρκεια επώασης του ομογενοποιημένου. Οι τριακυλογλυκερόλες υπολογίστηκαν με συνδυασμό χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και αέριας χρωματογραφίας. Η δραστικότητα της HSL βρέθηκε σημαντικά διαφορετική στα 5 χρονικά σημεία βιοψίας ($p < 0,001$). Η δραστικότητα αυξήθηκε σημαντικά (από 0,0015 σε 0,0099 μmol τριακυλογλυκερολών $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) στο 5ο λεπτό της άσκησης ($p = 0,002$) και μειώθηκε σταδιακά στη συνέχεια. Δεν παρατηρήθηκε εκλεκτική απόσπαση κάποιου λιπαρού οξέος από τις τριακυλογλυκερόλες. Συμπερασματικά, χάρη στην ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου προσδιορισμού της πραγματικής δραστικότητας της HSL, αυτή μετρήθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια άσκησης και βρέθηκε να εξαπλασιάζεται 5 min μετά την έναρξη της άσκησης.

ABSTRACT

Anatoli P. Petridou

Effect of exercise on the activity of hormone-sensitive lipase in adipose tissue
(Under the supervision of Vassilis Mougios, associate professor)

Although a considerable number of studies have investigated the effect of exercise on adipose tissue lipolysis, the activity of the hormone-sensitive lipase (HSL), the rate-limiting enzyme of lipolysis, has not been measured during exercise. The aim of the present study was to investigate the effect of moderate exercise on the actual activity (according to phosphorylation state) of HSL in human adipose tissue. Ten young sedentary men cycled for 30 min at a heart rate of 120-130 beats/min. Adipose tissue biopsy was performed from the buttock area at rest, at 5, 15, and 30 min of exercise, as well as at 15 min of passive recovery. Adipose tissue was homogenized in the presence of inhibitors of HSL phosphorylation and dephosphorylation in order to maintain the enzyme at the phosphorylation state at the time of biopsy. HSL activity was determined by monitoring the decrease of endogenous triacylglycerol concentration during incubation of the homogenate. Triacylglycerols were determined through a combination of thin-layer and gas chromatography. HSL activity was significantly different at the 5 time points of biopsy ($p < 0,001$). The activity increased significantly (from 0,0015 to 0,0099 $\mu\text{mol triacylglycerol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) at 5 min of exercise ($p = 0,002$). No selective release of fatty acids from triacylglycerols was noticed. In conclusion, thanks to the development of a new assay of the actual activity of HSL, this was determined for the first time during exercise and was found to increase six-fold at 5 min of exercise.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	ii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	iii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	vi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	2
Λιπόλυση	2
Μέθοδοι μελέτης της λιπόλυσης	3
Μικροδιαπίδυση	3
Αρτηριοφλεβικές διαφορές	4
Έγχυση ιχνηθετών	4
Απομόνωση λιποκυττάρων	4
Μηχανισμός επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση	4
Επίδραση των συνθηκών οξείας άσκησης στη λιπόλυση	6
Επιδράσεις χρόνιας άσκησης στη λιπόλυση	8
Μελέτη της λιπόλυσης σε μοριακό επίπεδο	10
Η ευαίσθητη σε ορμόνες λιπάση	11
Φωσφορυλίωση	11
«Συνεργάτες»	13
Επίδραση της άσκησης στην HSL	13
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	15
ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	15

ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	16
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	17
Δείγμα	17
Προκαταρκτικές μετρήσεις	17
Πρωτόκολλο άσκησης	18
Βιοψία	18
Ομογενοποίηση λιπώδους ιστού	18
Επάαση ομογενοποιηήματος	19
Εκχύλιση λιπιδίων	19
Διαχωρισμός τριακυλογλυκερολών	20
Παρασκευή και διαχωρισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων	21
Υπολογισμός της δραστικότητας της HSL	22
Προσδιορισμός τριακυλογλυκερολών στον ορό	22
Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης στον ορό	23
Ερευνητική υπόθεση	23
Στατιστικές υποθέσεις	23
Στατιστική επεξεργασία	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ατομικά στοιχεία εθελοντών ($n = 10$).....	25
Πίνακας 2. Κατανομή λιπαρών οξέων στις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού.....	26
Πίνακας 3. Δραστικότητα της HSL κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης και κατά την αποκατάσταση.....	28
Πίνακας 4. Ρυθμοί λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό.....	31

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Σειρά των αντιδράσεων της λιπόλυσης.....	2
Σχήμα 2. Μηχανισμός ρύθμισης της λιπόλυσης	6
Σχήμα 3. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενων από τις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού	26
Σχήμα 4. Δραστικότητα της HSL κατά τη διάρκεια ποδηλάτησης στους 120- 130 σφ/min και κατά την παθητική αποκατάσταση.....	27

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΗΣ ΣΕ ΟΡΜΟΝΕΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

Η μείωση του σωματικού λίπους είναι επιδίωξη σημαντικού μέρους του πληθυσμού. Λόγοι αυτής της επιδίωξης είναι η βελτίωση της υγείας, της εξωτερικής εμφάνισης, της απόδοσης σε διάφορες σωματικές δραστηριότητες και ειδικά για τους αθλητές, η αύξηση της αθλητικής απόδοσης.

Το σωματικό λίπος αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες. Επομένως, η μείωσή του απαιτεί μείωση των τριακυλογλυκερολών η οποία επιτυγχάνεται με την αύξηση του ρυθμού διάσπασής τους σε σχέση με τον ρυθμό σύνθεσής τους. Η διάσπαση των τριακυλογλυκερολών ονομάζεται λιπόλυση. Άρα, η μείωση του σωματικού λίπους προϋποθέτει αύξηση του ρυθμού λιπόλυσης.

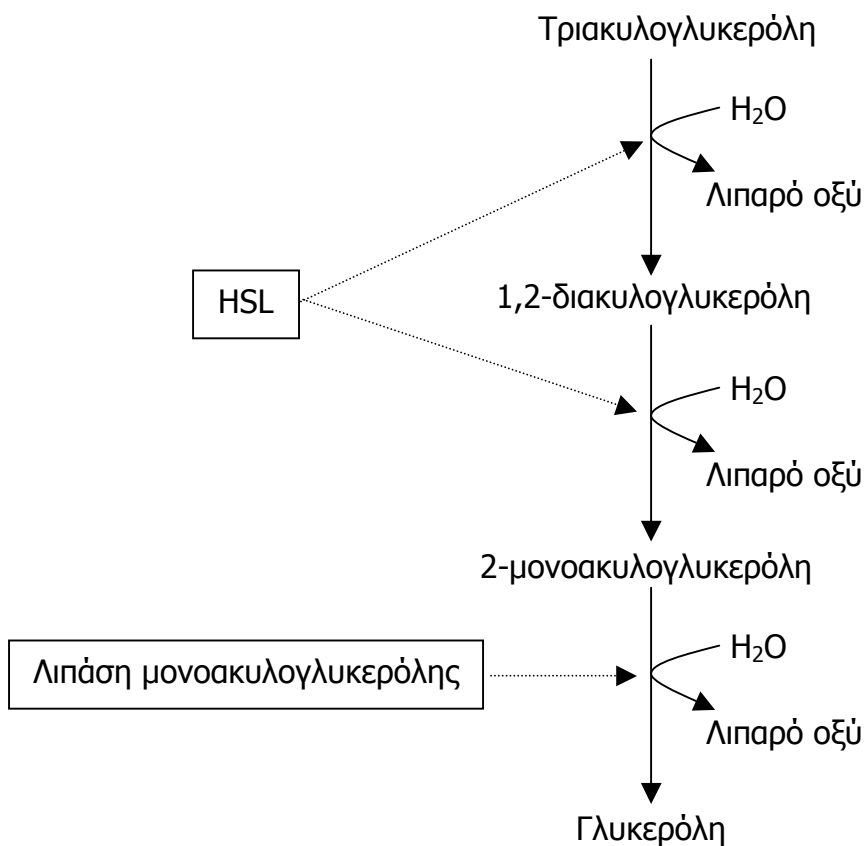
Ένας από τους τρόπους αύξησης του ρυθμού λιπόλυσης είναι η σωματική άσκηση η οποία αυξάνει τη δραστικότητα του ενζύμου που καταλύει το καθοριστικό της λιπόλυσης βήμα. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται ευαίσθητη σε ορμόνες λιπάση (hormone-sensitive lipase, συντομογραφικά HSL), επειδή η δραστικότητά του ρυθμίζεται από ορμόνες. Πλήθος ερευνητών έχουν μελετήσει την επίδραση της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης εξετάζοντας είτε ολόκληρο τον οργανισμό είτε συγκεκριμένες περιοχές του λιπώδους ιστού. Δεν υπάρχουν ωστόσο μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης μέσα στο χώρο διεξαγωγής της, δηλαδή το λιποκύτταρο. Επίσης, δεν έχει μετρηθεί η δραστικότητα της HSL σε συνθήκες άσκησης. Κάτι τέτοιο θα ήταν πιο άμεσο και θα εξουδετέρωνε παράγοντες που πιθανά αλλοιώνουν τα ευρήματα των μέχρι τώρα σχετικών ερευνών.

Σκοπός επομένως της παρούσας έρευνας ήταν να μετρήσει τη δραστικότητα της HSL του ανθρώπινου λιπώδους ιστού κατά τη διάρκεια άσκησης και κατά την αποκατάσταση. Τα ευρήματά μας προσφέρουν για πρώτη φορά στοιχεία για τη χρονική εξέλιξη της δραστικότητας της HSL κατά την άσκηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Λιπόλυση

Η λιπόλυση μέσα στα λιποκύτταρα ολοκληρώνεται με τρεις διαδοχικές αντιδράσεις. Στην πρώτη, η τριακυλογλυκερόλη υδρολύεται προς 1,2-διακυλογλυκερόλη και λιπαρό οξύ (σχήμα 1). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την HSL (EC 3.1.1.3) και αποτελεί το καθοριστικό βήμα της λιπόλυσης, επειδή είναι η πιο αργή από τις τρεις αντιδράσεις. Στη δεύτερη αντίδραση, η οποία καταλύεται επίσης από την HSL, η 1,2-διακυλογλυκερόλη υδρολύεται προς 2-μονοακυλογλυκερόλη και λιπαρό οξύ. Τέλος, η 2-μονοακυλογλυκερόλη υδρολύεται προς γλυκερόλη και λιπαρό οξύ με τη δράση ενός άλλου ενζύμου, της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης.



Σχήμα 1. Σειρά των αντιδράσεων της λιπόλυσης.

Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό είναι δυσδιάλυτα στο νερό και, γι' αυτό, μεταφέρονται στο αίμα δεσμευμένα από την αλβουμίνη. Μέσω του αίματος καταλήγουν στους ιστούς (κυρίως στο ήπαρ και στους μύες), όπου είτε οξειδώνονται για παραγωγή ενέργειας είτε χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση άλλων λιπιδίων. Ένα μέρος των λιπαρών οξέων που παράγονται με τη λιπόλυση δεν εξέρχεται από τα λιποκύτταρα, αλλά επανεστεροποιείται προς τριακυλογλυκερόλες. Έχει αναφερθεί ότι, κατά την ηρεμία, το 70 % των παραγόμενων από τη λιπόλυση λιπαρών οξέων επανεστεροποιούνται, κατά τη διάρκεια άσκησης το ποσοστό αυτό πέφτει στο 25 – 35 %, ενώ στην αρχή της αποκατάστασης ανεβαίνει στο 90 % (Wolfe, Klein, Carraro, and Weber, 1990). Ο μικρός βαθμός επανεστεροποίησης των λιπαρών οξέων κατά την άσκηση έχει βεβαιωθεί και από τους Mulla, Simonsen και Bülow (2000).

Η τύχη της γλυκερόλης που προκύπτει από τη λιπόλυση βρίσκεται έξω από τα λιποκύτταρα, αφού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανασύνθεση τριακυλογλυκερολών ή για παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωσής της λόγω απουσίας του ενζύμου, κινάση της γλυκερόλης. Έτσι, μεταφέρεται μέσω του αίματος και προσλαμβάνεται κυρίως από το ήπαρ για παραγωγή γλυκόζης (Martin, 1996).

Μέθοδοι μελέτης της λιπόλυσης

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μελέτης της λιπόλυσης είναι η μικροδιαπίδυση, οι αρτηριοφλεβικές διαφορές, η έγχυση ιχνηθετών και η απομόνωση λιποκυττάρων. Σε αυτές τις μεθόδους στηρίζεται το μεγαλύτερο μέρος της γνώσης μας γύρω από την επίδραση της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης.

Μικροδιαπίδυση

Στη μέθοδο της μικροδιαπίδυσης εισάγεται στον εξωκυττάριο χώρο του λιπώδους ιστού ένας πλαστικός σωληνίσκος περιβαλλόμενος από ημιπερατή μεμβράνη, η οποία επιτρέπει τη διόδο ουσιών μικρού μοριακού βάρους. Με τον τρόπο αυτό μετράται η συγκέντρωση της γλυκερόλης και από τις μεταβολές της υπολογίζεται ο ρυθμός λιπόλυσης. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η αδυναμία μέτρησης των

λιπαρών οξέων (επειδή είναι δεσμευμένα από την αλβουμίνη και δεν περνούν τη μεμβράνη), το υψηλό κόστος και η πολυπλοκότητά της (Arner, 1999).

Αρτηριοφλεβικές διαφορές

Στη μέθοδο αυτή μετράται η συγκέντρωση γλυκερόλης ή λιπαρών οξέων σε αρτηριακό και φλεβικό αίμα που αρδεύει και παροχετεύει, αντίστοιχα, το λιπώδη ιστό. Από τη διαφορά των δύο συγκεντρώσεων υπολογίζεται η παραγωγή γλυκερόλης ή λιπαρών οξέων από τον ιστό. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι, για ανατομικούς λόγους, η εφαρμογή της περιορίζεται σε μια συγκεκριμένη αποθήκη λίπους, το υποδόριο κοιλιακό (Frayn, Fielding, and Summers, 1997).

Έγχυση ιχνηθετών

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην εισαγωγή στο αίμα γλυκερόλης ή λιπαρών οξέων ιχνηθετημένων με σταθερά ή ραδιενεργά ισότοπα και στη μέτρηση των μεταβολών της συγκέντρωσής τους σε σχέση με τις αντίστοιχες φυσικές ενώσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι παρέχει δεδομένα μόνο για ολόκληρο τον οργανισμό και όχι για μεμονωμένους ιστούς.

Απομόνωση λιποκυττάρων

Μετά από βιοψία λιπώδους ιστού, το δείγμα επωάζεται με κολλαγονάση, η οποία καταλύει την υδρόλυση του κολλαγόνου που συνδέει τα λιποκύτταρα (Rodbell, 1964). Στα απομονωμένα λιποκύτταρα μετράται ο ρυθμός λιπόλυσης (μέσω μέτρησης της απελευθερούμενης γλυκερόλης) μετά από προσθήκη ενεργοποιητών ή αναστολέων της. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυνατότητα πειραματισμού με περισσότερους τροποποιητές της λιπόλυσης και ο ακριβέστερος έλεγχος του συστήματος. Μειονεκτήματα είναι ότι δεν μελετάται η λιπόλυση in vivo και ότι είναι αδύνατη η μελέτη της οξείας επίδρασης της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης, επειδή τα λιποκύτταρα δεν μπορούν να διατηρηθούν διεγερμένα.

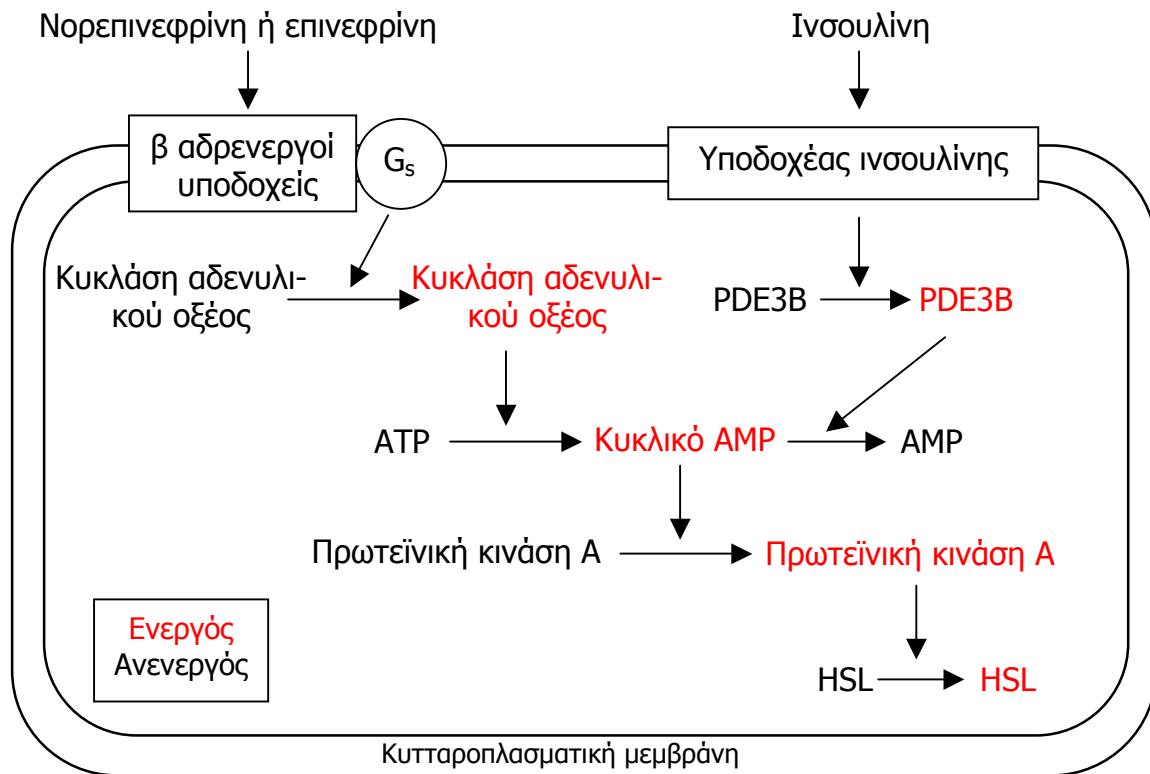
Μηχανισμός επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση

Παράγοντες, όπως οι διατροφικές συνήθειες, η ορμονική κατάσταση, η άσκηση, η φυσική κατάσταση, η ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον και τα γονίδια, επηρεάζουν το ρυθμό λιπόλυσης (Large and Arner, 1998· Wahrenberg, Bolinder, and Arner,

1991· Despres, Bouchard, Savard, Tremblay, Marcotte, and Theriault, 1984b· Shephard, 1992· Bouchard, Despres, and Mauriege, 1993· Mauriege et al., 1992). Από αυτούς, στην παρούσα μελέτη την προσοχή μας συγκέντρωσε η άσκηση.

Η άσκηση αυξάνει το ρυθμό λιπόλυσης μέσω της αυξημένης έκκρισης των κατεχολαμινών, νορεπινεφρίνης και επινεφρίνης, από απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και από τα επινεφρίδια. Οι κατεχολαμίνες συνδέονται με τους β αδρενεργούς υποδοχείς που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των λιποκυττάρων και προκαλούν ενεργοποίηση του ενζύμου, κυκλάση του αδενυλικού οξέος, μέσω των πρωτεϊνών G_s , οι οποίες οφείλουν το όνομά τους στο ότι δεσμεύουν GTP και GDP (σχήμα 2). Οι πρωτεΐνες G_s αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, α , β και γ . Η σύνδεση μιας κατεχολαμίνης με το β αδρενεργό υποδοχέα οδηγεί στην αντικατάσταση του GDP από GTP στην υπομονάδα α της πρωτεΐνης G_s και στο διαχωρισμό της από τις υπομονάδες $\beta\gamma$. Η $G_{s\alpha}$ είναι αυτή που ενεργοποιεί την κυκλάση του αδενυλικού οξέος, η οποία αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) μέσω της διάσπασης του ATP. Το cAMP ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση (cAMP-PK) ή πρωτεϊνική κινάση A, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και, σε 1-2 min, ενεργοποιεί την HSL (Nilsson, Stralfors, Fredrikson, and Belfrage, 1980). Από την άλλη πλευρά, η ινσουλίνη ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τη φωσφοδιεστεράση 3B (PDE3B), η οποία μειώνει τα επίπεδα του cAMP (Holm, Østerlund, Laurell, and Contreras, 2000). Επιπλέον, η ινσουλίνη αυξάνει τη δραστηριότητα πρωτεϊνικών φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν την HSL (Stralfors, and Honnor, 1989). Με τους τρόπους αυτούς η ινσουλίνη αναστέλλει τη λιπολυτική δράση των κατεχολαμινών (Nilsson et al., 1980). Μια ακόμη δράση της ινσουλίνης σε βάρος της λιπόλυσης είναι η αύξηση του ρυθμού επανεστεροποίησης των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό (Zierath et al., 1998· Evans, Clark, and Frayn, 1999). Με την άσκηση όμως, η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται, οπότε αίρεται η αντιλιπολυτική της δράση (Ranallo and Rhodes, 1998).

Οι κατεχολαμίνες μπορούν να ασκήσουν και αντιλιπολυτική δράση συνδεδεμένες με τους α_2 αδρενεργούς υποδοχείς, οι οποίοι αναστέλλουν την κυκλάση του αδενυλικού οξέος μέσω των πρωτεϊνών G_i . Η δράση αυτή ασκείται ακόμα και κατά την άσκηση (Stich et al., 1999b), παρότι επικρατεί το β αδρενεργικό μονοπάτι.



Σχήμα 2. Μηχανισμός ρύθμισης της λιπόλυσης.

Επίδραση των συνθηκών οξείας άσκησης στη λιπόλυση

Παρά το πλήθος των μελετών στο θέμα της επίδρασης της έντασης και της διάρκειας της άσκησης στην οξειδωση των λιπών, ελάχιστες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των παραγόντων αυτών στο ρυθμό λιπόλυσης είτε συνολικά στο σώμα είτε στο λιπώδη ιστό. Παρότι ο Turcotte (1999) σε ανασκόπησή του αναφέρει ότι η λιπόλυση στο λιπώδη ιστό αυξάνεται με τη διάρκεια και την ένταση της άσκησης μέχρι το 60-65 % της VO_2max , κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, οι Romijn και συν. (1993) έδειξαν ότι ο ρυθμός λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό μετά από 30 min άσκησης στο 25 % της VO_2max ήταν μεγαλύτερος, αν και όχι σημαντικά διαφορετικός, απ' ό,τι στο 65 ή 85 % της VO_2max . Σε ό,τι αφορά τη διάρκεια της άσκησης, ο συνολικός ρυθμός λιπόλυσης αυξήθηκε σταδιακά μέχρι το 15^ο λεπτό της άσκησης στο 25 % της VO_2max και στη συνέχεια παρέμεινε σχετικά σταθερός, ενώ στις υψηλότερες εντάσεις παρουσίασε σταδιακή αύξηση. Την ίδια πορεία του συνολικού ρυθμού λιπόλυσης στο 25 % της VO_2max διαπίστωσαν και οι Mora-Rodriguez και Coyle (2000).

Οι Mora-Rodriguez και Coyle (2000) συνέκριναν το συνολικό ρυθμό λιπόλυσης κατά τη διάρκεια άσκησης στο 25 και 45 % της VO_2max , διατηρώντας όμως ίδια τα επίπεδα επινεφρίνης με έγχυσή της στη διάρκεια της άσκησης στη χαμηλή ένταση. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο ρυθμός λιπόλυσης ήταν χαμηλότερος στην υψηλή ένταση.

Οι Mulla και συν. (2000) έδειξαν ότι ο ρυθμός λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό αυξήθηκε σημαντικά μετά από 90λεπτη άσκηση στο 40 % της VO_2max και μετά από 60λεπτη άσκηση στο 60 % της VO_2max . Ωστόσο, ήταν ίδιος μετά τα δύο είδη άσκησης. Μετά την άσκηση, η λιπόλυση μειώθηκε απότομα, αλλά άρχισε να αυξάνει ξανά 1 h μετά και παρέμεινε υψηλή επί 2 h. Η κινητοποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων ήταν μεγαλύτερη μετά την άσκηση στο 60 % της VO_2max .

Ο ρυθμός λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό αυξήθηκε σταδιακά στη διάρκεια παρατεταμένης (90-100 min) ποδηλάτησης στο 50 % της VO_2max (de Glisezinski et al., 1998b· Horowitz, Leone, Feng, Kelly, and Klein, 2000). Μάλιστα, ενώ σε ηρεμία ο ρυθμός λιπόλυσης ήταν παρόμοιος στον κοιλιακό και μηριαίο λιπώδη ιστό, στο τέλος της άσκησης ήταν σημαντικά υψηλότερος στην κοιλιακή χώρα (Horowitz, 2000). Ανοδική πορεία είχε και ο συνολικός ρυθμός λιπόλυσης στη διάρκεια 60λεπτης ποδηλάτησης στο 70 % της VO_2max (Klein, Coyle, and Wolfe, 1995).

Σε εθελοντές που ποδηλάτησαν δύο φορές από 1 h στο 50 % της VO_2max με διάλειμμα 1 h βρέθηκε ότι η λιπόλυση στο λιπώδη ιστό ήταν υψηλότερη κατά τη διάρκεια της δεύτερης συνεδρίας άσκησης (Stich et al., 2000). Το εύρημα αυτό αποδόθηκε από τους ερευνητές στα παρατηρηθέντα αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης και μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης κατά τη δεύτερη συνεδρία.

Η λιπολυτική ανταπόκριση ανθρώπινων λιποκυττάρων στις κατεχολαμίνες ήταν κατά 20–35 % υψηλότερη στο τέλος οξείας άσκησης σε σύγκριση με την ηρεμία (Wahrenberg, Engfeldt, Bolinder, and Arner, 1987). Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός συνολικής λιπόλυσης μετά από β αδρενεργική διέγερση δεν ήταν σημαντικά διαφορετικός πριν και μετά από 60λεπτη άσκηση αθλητών αντοχής στο 70 % της VO_2max (Klein et al., 1995). Τέλος, η β αδρενεργική διέγερση της λιπόλυσης στο

λιπώδη ιστό ήταν σημαντικά υψηλότερη πριν απ' ό,τι μετά από 60λεπτη άσκηση απροπόνητων αντρών στο 50 % της $VO_2\max$ (Marion-Latard et al., 2001).

Από τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της έντασης της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό ή στο συνολικό ρυθμό λιπόλυσης στο σώμα. Τα δεδομένα για την επίδραση της διάρκειας της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό είναι αντιφατικά, ενώ, σε ό,τι αφορά το συνολικό ρυθμό λιπόλυσης, φαίνεται να υπάρχει συμφωνία ότι σε χαμηλής έντασης άσκηση σταθεροποιείται μετά από μια αρχική αύξηση, ενώ σε υψηλότερες εντάσεις παρουσιάζει συνεχή αύξηση.

Επιδράσεις χρόνιας άσκησης στη λιπόλυση

Οι Despres, Bouchard, Savard, Tremblay, Marcotte και Theriault (1984a,b), μελετώντας απομονωμένα λιποκύτταρα, βρήκαν ότι προπονημένα άτομα εμφάνισαν υψηλότερη λιπόλυση σε ηρεμία και μέγιστη λιπόλυση προκαλούμενη από επινεφρίνη, σε σύγκριση με απροπόνητα άτομα. Είκοσι εβδομάδες προπόνησης ήταν επαρκείς για την επίτευξη αυτών των προσαρμογών, αφού οδήγησαν σε λιπόλυση ηρεμίας συγκρίσιμη και μέγιστη λιπόλυση μεγαλύτερη από εκείνη μαραθωνοδρόμων. Επιπλέον, μαραθωνοδρόμοι δεν είχαν υψηλότερο ρυθμό λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια άσκησης από μέτρια προπονημένους δρομείς αντοχής (Kanaley, Mottram, Scanlon, and Jensen, 1995).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, οι Crampes, Riviere, Beauville, Marceron, και Garrigues (1989) βρήκαν ότι η προπόνηση αύξησε την αποτελεσματικότητα του β αδρενεργικού μονοπατιού σε ηρεμία, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το ρυθμό λιπόλυσης, και ότι αυτή η ενίσχυση ήταν μεγαλύτερη στις γυναίκες απ' ό,τι στους άντρες. Στις γυναίκες μάλιστα η προπόνηση προκάλεσε ταυτόχρονη μείωση της αποτελεσματικότητας του αντιλιπολυτικού α_2 αδρενεργικού μονοπατιού. Αντίθετα, οι Despres και συν. (1984b) έδειξαν ότι οι άντρες αύξησαν περισσότερο την προκαλούμενη από την επινεφρίνη μέγιστη λιπόλυση μετά από προπόνηση απ' ό,τι οι γυναίκες. Η αυξημένη λιπολυτική ευαισθησία με την προπόνηση μετριάζεται από τον υπερσιτισμό (Carey, 2000).

Δύο ακόμη μελέτες στον άνθρωπο υποστηρίζουν την αύξηση του ρυθμού λιπόλυσης με την προπόνηση. Οι Stich και συν. (1999a) ανέφεραν ότι αερόβια προπό-

νηση 12 εβδομάδων προκάλεσε αύξηση στη β αδρενεργική ανταπόκριση του υποδόριου λιπώδους ιστού σε παχύσαρκους άντρες. Επίσης, οι Coggan, Raguso, Gastaldelli, Sidossis και Yeckel (2000) βρήκαν ότι η συνολική λιπόλυση ήταν μεγαλύτερη σε προπονημένους απ' ό,τι σε απροπόνητους άντρες κατά τη διάρκεια άσκησης υψηλής έντασης (75-80 % της $VO_2\max$). Τέλος, προπονημένοι επίμυες είχαν υψηλότερο μέγιστο ρυθμό λιπόλυσης προκαλούμενο από επινεφρίνη και υψηλότερη αιματική ροή στο λιπώδη ιστό σε σύγκριση με απροπόνητους επίμυες (Enevoldsen, Stallknecht, Fluckey, and Galbo, 2000).

Ο μηχανισμός της αυξημένης λιπολυτικής ανταπόκρισης στη β αδρενεργική διέγερση μετά από χρόνια άσκηση δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, μελέτες σε προπονημένους αρουραίους (Bukowiecki, Lupien, Follea, Paradis, Richard, and LeBlanc, 1980· Izawa, Komabayashi, Mochizuki, Suda, and Tsuboi, 1991), υποδεικνύουν ότι δεν οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή cAMP, αλλά σε αυξημένη δραστηριότητα της cAMP-PK και της HSL. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το εύρημα ότι η συσσώρευση cAMP στα λιποκύτταρα προπονημένων αρουραίων μετά από β αδρενεργική διέγερση ήταν μικρότερη απ' ό,τι σε απροπόνητα ζώα, παρότι η λιπόλυση και η ενεργοποίηση της HSL δεν ήταν μειωμένες (Shepherd, Noble, Klug and Gollnick 1981). Από την άλλη πλευρά, έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι η κύρια λιπολυτική αλλαγή που προκαλεί η προπόνηση δεν περνά μέσα από το β αδρενεργικό μονοπάτι (Shepherd and Bah, 1988).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω έρευνες που βρήκαν αύξηση της λιπόλυσης με την προπόνηση, πλήθος ερευνών δεν βρήκαν σημαντικές αλλαγές. Σε σύγκριση με απροπόνητα άτομα, άτομα προπονημένα αερόβια επί 10-16 εβδομάδες δεν εμφάνισαν διαφορετικό ρυθμό λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό, είτε σε ηρεμία είτε στη διάρκεια άσκησης στην ίδια απόλυτη ένταση που κυμαινόταν μεταξύ 50 και 65 % της μέγιστης αερόβιας ικανότητας πριν το πρόγραμμα προπόνησης (Horowitz, and Klein, 2000· Horowitz et al., 2000· Lange et al., 2001· Friedlander, Casazza, Horning, Buddinger, and Brooks, 1998· Friedlander, Casazza, Horning, Usaj, and Brooks, 1999). Επιπλέον, οι Friedlander και συν. (1998· 1999), δεν βρήκαν διαφορετικό ρυθμό λιπόλυσης ούτε στη διάρκεια άσκησης στην ίδια σχετική ένταση πριν και μετά το πρόγραμμα προπόνησης.

Επιπλέον, οι Horowitz, Braudy, Martin και Klein (1999) δεν βρήκαν διαφορές στη συνολική λιπόλυση και στην αιματική ροή στο λιπώδη ιστό σε κατάσταση ηρεμίας πριν και μετά από ένα πρόγραμμα προπόνησης αντοχής διάρκειας 16 εβδομάδων. Επίσης, η προκαλούμενη από β αδρενεργική διέγερση μέγιστη λιπόλυση δεν μεταβλήθηκε μετά από ένα πρόγραμμα προπόνησης 12 εβδομάδων στο 40 % της $\dot{V}O_2\max$ (van Aggel-Leijssen, Saris, Homan, and van Baak, 2001).

Υπάρχει, τέλος, και το εύρημα ότι τα λιποκύτταρα προπονημένων ατόμων εμφάνισαν χαμηλότερο ρυθμό λιπόλυσης σε ηρεμία, αλλά μεγαλύτερη ανταπόκριση στην επινεφρίνη σε σύγκριση με τα λιποκύτταρα απροπόνητων ατόμων (Toode, Viru and Eller, 1993· de Glisezinski et al., 1998b). Επιπλέον, οι Hickner, Racette, Binder, Fisher και Kohrt (2000) βρήκαν ότι μετά από 10 ημέρες προπόνησης αντοχής αυξήθηκε η αντιλιπολυτική δράση της ινσουλίνης.

Από την παραπάνω παρουσίαση φαίνεται ότι δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς την επίδραση της προπόνησης στο ρυθμό λιπόλυσης, αφού υπάρχουν μελέτες που βρίσκουν θετική, αρνητική ή ουδέτερη επίδραση. Ωστόσο, δεν αμφισβητείται η αυξημένη οξειδωση των λιπών κατά την άσκηση σε προπονημένα άτομα σε σύγκριση με απροπόνητα. Αν αυτό δεν οφείλεται σε αυξημένη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, θα πρέπει να αποδοθεί σε αύξηση της οξειδωσης λιπαρών οξέων προερχόμενων από τις ενδοκυτταρικές τριακυλογλυκερόλες, σε αύξηση της πυκνότητας των ενδοκυτταρικών μιτοχονδρίων, σε αυξημένη μεταφορά των λιπαρών οξέων μέσα σε αυτά ή σε συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων (Jeukendrup, Saris, and Wagenmakers, 1998).

Μελέτη της λιπόλυσης σε μοριακό επίπεδο

Πλεονέκτημα των μεθόδων μελέτης της επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση που αναφέρθηκαν στις σελίδες 3-4 και στις οποίες στηρίχτηκε το μεγαλύτερο μέρος των ευρημάτων που περιγράφηκαν στις σελίδες 6-10 είναι ότι μελετούν τη λιπόλυση *in vivo*. Κύριο όμως μειονέκτημά τους είναι ότι αδυνατούν να εξετάσουν τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό του λιπώδους ιστού (Frayn et al., 1997). Αδυνατούν, επομένως, να προσδιορίσουν με ακρίβεια το ρυθμό λιπόλυσης εκεί όπου αυτή συμβαίνει και να ελέγξουν μεμονωμένα τους παράγοντες που την επηρεάζουν. Για

να γίνει αυτό απαιτείται η εισβολή στο λιποκύτταρο και η μελέτη του πρωταγωνιστή της λιπόλυσης, της HSL, σε μοριακό επίπεδο.

Η ευαισθητή σε ορμόνες λιπάση

Μετά από χρόνια αδυναμίας καθαρισμού της HSL σε δραστική μορφή, οι Fredrikson, Stralfors, Nilsson και Belfrage (1981) καθάρισαν την HSL από λιπώδη ιστό αρουραίων και βρήκαν ότι η καθαρισμένη λιπάση καταλύει την υδρόλυση γαλακτωματοποιημένης τρι-, δι- και μονοελαοϋλογλυκερόλης, καθώς και ελαοϋλοχοληστερόλης με σχετικούς ρυθμούς 1:10:4:1,5. Το μοριακό βάρος της HSL είναι 84 kDa και το άριστο pH 7 (Stralfors, Olsson, and Belfrage, 1987). Το ανθρώπινο γονίδιο της HSL αποτελείται από 9 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 786 αμινοξέων (Holm, Belfrage, Osterlund, Davis, Schotz, and Langin, 1994). Οι HSL ανθρώπου και αρουραίου είναι κατά 83 % όμοιες, ενώ η πρωτεΐνη του ανθρώπου είναι μεγαλύτερη κατά 18 αμινοξέα (Holm et al., 1994). Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι η HSL βρίσκεται στο λιπώδη ιστό με τη μορφή λειτουργικού διμερούς αποτελούμενου από ομόλογες υπομονάδες (Shen, Patel, Hong, and Kraemer, 2000). Η δραστικότητα της HSL εμφανίζεται υψηλότερη στο σπλαχνικό λίπος σε σύγκριση με το υποδόριο λίπος (Morimoto, Tsujita, and Okuda, 1997· Enevoldsen et al., 2000). Εκτός από το λιπώδη ιστό, η HSL έχει εντοπιστεί και στις μυϊκές ίνες, όπου επίσης υδρολύει τις ενδοκυτταρικές τριακυλογλυκερόλες (Oscai, Essig, and Palmer, 1990).

Φωσφορυλίωση

Σημαντικό χαρακτηριστικό της HSL, που τη διαφοροποιεί από άλλες ουδέτερες λιπάσες, είναι ότι η δραστικότητά της ελέγχεται αποκλειστικά από αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, η οποία βρίσκεται κάτω από ορμονικό και νευρικό έλεγχο (Stralfors et al., 1987). Η HSL φωσφορυλιώνεται σε δύο θέσεις, ονομαζόμενες ρυθμιστική και βασική θέση (Stralfors and Belfrage, 1983). Η cAMP-PK φωσφορυλιώνει την HSL στη ρυθμιστική θέση που στον άνθρωπο βρίσκεται στη σερίνη 551. Δύο αμινοξέα πιο πέρα, στη σερίνη 553, βρίσκεται η βασική θέση (Holm, Langin, Manganiello, Belfrage, and Degerman, 1997), η οποία φωσφορυλιώνεται από την ενεργοποιούμενη από το AMP (όχι κυκλικό) πρωτεϊνική κινάση και από την εξαρτώμενη από Ca^{2+} -καλμοντουλίνη πρωτεϊνική κινάση (Garton and Yeaman, 1990). Οι αντί-

στοιχεις θέσεις φωσφορυλίωσης της HSL στον αρουραίο είναι οι σερίνες 563 και 565 (Yeaman and Smith, 1994). Σε απομονωμένα λιποκύτταρα αρουραίων οι Stralfors και Belfrage (1983) έδειξαν ότι ο βαθμός φωσφορυλίωσης της ρυθμιστικής θέσης σχετίζεται θετικά με το ρυθμό λιπόλυσης. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της βασικής θέσης δεν έχει επίδραση στη δραστικότητα της HSL (Stralfors, Bjorgell, and Belfrage, 1984). Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι σε λιποκύτταρα αρουραίων η βασική θέση φωσφορυλιώνεται σε μεγάλο βαθμό όταν αυτά δεν είναι διεγερμένα. Αυτό, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η φωσφορυλίωση της μιας θέσης αποκλείει τη φωσφορυλίωση της άλλης (λόγω της στενής γειτνίασης), οδηγεί στην πιθανότητα ενός αντιλιπολυτικού ρόλου της φωσφορυλιωμένης βασικής θέσης και στην αναγκαιότητα αποφωσφορυλίωσης της βασικής θέσης πριν τη φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής θέσης (Garton, Campbell, Carling, Hardie, Colbran, and Yeaman, 1989· Garton and Yeaman, 1990).

Η HSL αποφωσφορυλιώνεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1, 2A και 2C του λιπώδους ιστού (Ingebritsen and Cohen, 1983· Olsson and Belfrage, 1987). Παρασκευάσμα πρωτεϊνικών φωσφατασών από το λιπώδη ιστό έχει την ιδιότητα να αποφωσφορυλιώνει και, ως επακόλουθο, να απενεργοποιεί απομονωμένη HSL που είχε προηγουμένως φωσφορυλιωθεί από την cAMP-PK (Stralfors and Belfrage, 1983). Η φωσφατιδυλοχολίνη που βρίσκεται στη μεμβράνη των ενδοκυτταρικών σταγονιδίων λίπους αναστέλλει τη λιπολυτική δράση της HSL (Morimoto, Tsujita, and Okuda, 1998).

Όταν καθαρισμένη HSL φωσφορυλιώνεται, η δραστικότητά της αυξάνεται μόνο κατά 2-4 φορές, σε αντίθεση με την 50πλάσια ως 100πλάσια διέγερση της λιπόλυσης από τη νορεπινεφρίνη που παρατηρείται σε ακέραια λιποκύτταρα (Shen, Sridhar, Bernlohr, and Kraemer, 1999· Stralfors and Belfrage, 1983). Αυτή η ασυμφωνία έχει αποδοθεί σε μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης HSL από την υδατική φάση του κυτταροπλάσματος προς το σταγονίδιο λίπους (Egan, Greenberg, Chang, Wek, Malkolm, and Londos, 1992· Shen et al., 2000· Morimoto, Kameda, Tsujita, and Okuda, 2001) και στη στενή σύνδεσή της με κάποιο συστατικό της επιφάνειας του σταγονιδίου (Egan et al., 1992). Στην ίδια δημοσίευση αναφέρεται ότι αυτή η μεγάλη διαφορά στο ρυθμό λιπόλυσης ανάμεσα σε ορμονικά διεγερμένα και μη διεγερμένα λιποκύτταρα εξαφανίζεται με την εφαρμογή υπερήχων, η οποία μάλλον

αυξάνει το ρυθμό λιπόλυσης των μη διεγερμένων κυττάρων. Στη μεταφορά της HSL από την υδατική φάση στο σταγονίδιο λίπους δε συμμετέχει ο κυτταρικός σκελετός. Απαιτείται όμως ATP είτε για τη φωσφορυλίωση της λιπάσης είτε για τη μετατόπιση της (Brasaemle, Levin, Adler-Wailes, and Londos, 2000).

«Συνεργάτες»

Έχει προταθεί ότι η μετατόπιση της HSL προς το σταγονίδιο λίπους διευκολύνεται από την αλληλεπίδρασή της με ειδικές κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως οι περιλιπίνες, η σχετιζόμενη με τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων πρωτεΐνη και η λιποτρανσίνη (Shen et al., 2000). Οι περιλιπίνες είναι φωσφοπρωτεΐνες στην επιφάνεια των σταγονιδίων λίπους. Διακρίνονται τρεις ισομορφές, οι A, B και C, από τις οποίες κυριότερη είναι η περιλιπίνη A. Η τελευταία φωσφορυλιώνεται μαζί με την HSL και, με κάποιο τρόπο, επιτρέπει την πρόσβασή της στο υπόστρωμα (τριακυλογλυκερόλες) που βρίσκεται στο σταγονίδιο λίπους (Souza et al., 1998· Clifford, Londos, Kraemer, Vernon, and Yeaman, 2000). Αντίθετα, όταν η περιλιπίνη δεν είναι φωσφορυλιωμένη, προστατεύει τις τριακυλογλυκερόλες από τη δράση της HSL (Londos, Brasaemle, Schultz, Segrest, and Kimmel, 1999).

Μια άλλη πρωτεΐνη που έχει προταθεί ότι αλληλεπιδρά με την HSL είναι η πρωτεΐνη δέσμευσης λιπιδίων των λιποκυττάρων (adipocyte lipid-binding protein, ALBP, Shen et al., 1999). Η σύνδεση της ALBP με την HSL διευκολύνει την εκροή των λιπαρών οξέων από το λιποκύτταρο, αποτελώντας το πρώτο βήμα της οργανωμένης μεταφοράς τους. Όταν δεν υπάρχει η παραπάνω σύνδεση, τα λιπαρά οξέα συσσωρεύονται στο εσωτερικό των λιποκυττάρων. Ωστόσο, είναι ακόμη άγνωστο αν η αλληλεπίδραση της HSL με την ALBP επηρεάζει τη λειτουργία της περιλιπίνης ή άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη λιπόλυση.

Επίδραση της άσκησης στην HSL

Εντοπίστηκε μία μόνο μελέτη που αναφέρεται στη σχέση άσκησης και HSL (de Glisezinski et al., 1998b). Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η επίδραση τρίμηνης αερόβιας προπόνησης στην ολική δραστικότητα της HSL. Ως ολική δραστικότητα νοείται η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου (όταν είναι πλήρως φωσφορυλιωμένο) και μετράται με τη χρήση συνθετικού υποστρώματος (συνήθως μια 1(3)-ακυλο-2-ακυλογλυκερόλη), ο ρυθμός υδρόλυσης του οποίου είναι ανεξάρτητος του βαθ-

μού φωσφορυλίωσης της HSL (Fredrikson et al., 1981). Αντίθετα, η λεγόμενη βασική δραστικότητα αντικατοπτρίζει το βαθμό φωσφορυλίωσης του ενζύμου και μετράται με τη χρήση τριελαΐνης ως υπόστρωμα. Στην παραπάνω μελέτη (De Glisezinski et al., 1998b) βρέθηκε σημαντική μείωση της ολικής δραστικότητας της HSL (από 225 σε 101 mU/mg πρωτεΐνης) στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων αντρών μετά το προπονητικό πρόγραμμα.

Είναι φανερό ότι υπάρχει βιβλιογραφικό κενό σε ό,τι αφορά την επίδραση οξείας άσκησης στη δραστικότητα της HSL. Το κενό αυτό οφείλεται μάλλον στην απουσία μεθόδου προσδιορισμού της πραγματικής δραστικότητας της HSL, η οποία να εκδηλώνεται στο φυσικό της υπόστρωμα (δηλαδή, τα ενδογενή σταγονίδια λίπους) και να εξαρτάται από το βαθμό φωσφορυλίωσης του ενζύμου.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της έρευνας ήταν να μελετήσει την επίδραση ποδηλάτησης μέτριας έντασης στη δραστικότητα της HSL του ανθρώπινου λιπώδους ιστού. Επιμέρους σκοποί ήταν: α) να μελετηθεί η δραστικότητα της HSL σε συνάρτηση με το χρόνο της άσκησης, β) να μετρηθεί η δραστικότητα της HSL κατά την παθητική αποκατάσταση.

ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η σημασία της έρευνας έγκειται στην παραγωγή νέας γνώσης στο θέμα της επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα:

- Δημιουργήθηκε νέα μέθοδος προσδιορισμού της δραστικότητας της HSL με τη χρήση ενδογενούς υποστρώματος και με τη διατήρηση της HSL στο επίπεδο φωσφορυλίωσης που έχει *in vivo*.
- Μελετήθηκε για πρώτη φορά η χρονική εξέλιξη της ενεργοποίησης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κατά την άσκηση και μετά το τέλος της.
- Μετρήθηκαν τιμές δραστικότητας της HSL στο λιπώδη ιστό (με άμεσο τρόπο και με ενδογενές υπόστρωμα) σε ηρεμία και άσκηση, τιμές που απουσιάζουν από τη βιβλιογραφία.

ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Ένα σύστημα μέτρησης της δραστικότητας της HSL, ανάλογα με το βαθμό φωσφορυλίωσής της, δημιουργήθηκε σε μια σειρά εννέα προσανατολιστικών μελετών. Στο σύστημα αυτό επιδιώχθηκε η διατήρηση του βαθμού φωσφορυλίωσης της HSL τη στιγμή της βιοψίας, για όσο χρονικό διάστημα απαιτούσε ο προσδιορισμός της δραστικότητάς της. Αυτό έγινε με την προσθήκη αναστολέων της αποφωσφορυλίωσης αλλά και της φωσφορυλίωσής της. Επίσης προστέθηκαν αναστολείς της πρωτεϊνόλυσης για την αποφυγή αποικοδόμησης του ενζύμου. Το υπόστρωμα της HSL ήταν οι ενδογενείς τριακυλογλυκερόλες και οι συνθήκες επώασης για τον προσδιορισμό της δραστικότητας σχεδιάστηκαν να είναι όσο το δυνατό πλησιέστερες στις συνθήκες *in vivo*. Στο λιπώδη ιστό υπάρχει και μια άλλη λιπάση τριακυλογλυκερολών, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), ο προσδιορισμός της δραστικότητας της οποίας μαζί με εκείνη της HSL θα υπερτιμούσε την τελευταία. Η παρεμβολή της LPL αποφεύχθηκε με την πραγματοποίηση του προσδιορισμού σε pH 7, που είναι μακριά από το άριστο pH της (8,5), και απουσία αποπρωτεΐνης CII και ηπαρίνης, που είναι ενεργοποιητές της (Mersmann, 1998).

Για να ελεγχθεί η ένταση της άσκησης που επιλέχτηκε για το πείραμα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο αίμα πριν και μετά την άσκηση. Ο προσδιορισμός έγινε φωτομετρικά με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων της εταιρείας Roche (Mannheim, Γερμανία) σε τριχοειδικό αίμα από τη ράγα του δακτύλου των εθελοντών. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος πριν την άσκηση ήταν 1,77 mmol/L, ενώ μετά την άσκηση 3,21 mmol/L. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τη μέτρια ένταση του πρωτοκόλλου άσκησης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δείγμα

Στη μελέτη έλαβαν μέρος εθελοντικά 10 αγύμναστοι (απείχαν από οποιασδήποτε μορφής άθληση τον τελευταίο ένα χρόνο), υγιείς (δεν έπασχαν από κάποια οξεία ή χρόνια πάθηση) άντρες ηλικίας 21-27 ετών. Προϋπόθεση για τη συμμετοχή των εθελοντών στη μελέτη ήταν να μην πάσχουν από υπερλιπιδαιμία (συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών και χοληστερόλης στον ορό κάτω από τα 240 mg/dL, που θεωρούνται ως ασφαλές όριο από την American Heart Association), αφού η δραστικότητα της HSL επηρεάζεται από τη συγγενή υπερλιπιδαιμία (μείωση της δραστικότητάς της μέχρι και 45 % σύμφωνα με τους Reynisdottir et al., 1997). Οι εθελοντές ενημερώθηκαν γραπτά και προφορικά για το σχεδιασμό της έρευνας κατά την πρώτη τους επίσκεψη στο εργαστήριο και συμφώνησαν να συμμετάσχουν. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Προκαταρκτικές μετρήσεις

Κατά την πρώτη επίσκεψη των εθελοντών στο εργαστήριο μετρήθηκε η σωματική μάζα σε ηλεκτρονικό ζυγό της εταιρείας Seca (Hamburg, Γερμανία) με ακρίβεια 0,1 kg και το ύψος σε αναστημόμετρο ενσωματωμένο στον ίδιο ζυγό με ακρίβεια 0,1 cm. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίστηκε ο δείκτης σωματικής μάζας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από φλέβα του βραχίονα σε καθιστή θέση για τον προσδιορισμό τριακυλογλυκερολών και χοληστερόλης, όπως περιγράφεται παρακάτω. Τέλος, κάθε εθελοντής ποδηλάτησε δοκιμαστικά επί 30 min σε εργοποδηλάτο Ergometer KX1 της εταιρείας Kettler (Ense-Parsit, Γερμανία) για την εύρεση της ισχύος στην οποία θα ασκούσαν κατά την κύρια δοκιμασία. Για το σκοπό αυτό, η ισχύς του εργοποδηλάτου αυξομειωνόταν κατά τη διάρκεια της ποδηλάτησης μέχρι να βρεθεί εκείνη, στην οποία η καρδιακή συχνότητα του ασκουμένου κυμαι-

νόταν μεταξύ 120 και 130 σφ/min. Όπως υπολογίσαμε, αυτό το εύρος καρδιακής συχνότητας αντιστοιχεί περίπου στο 40-45 % του αποθέματος καρδιακής συχνότητας των εθελοντών.

Πρωτόκολλο άσκησης

Τουλάχιστον μία εβδομάδα μετά την προκαταρκτική επίσκεψη, κάθε εθελοντής, ξεκούραστος και μετά από 12ωρη νηστεία, προσήλθε στο εργαστήριο με αυτοκίνητο για την κύρια δοκιμασία. Μετά από ηρεμία 15 min ποδηλάτησε επί 30 min στην ισχύ που βρέθηκε (κατά την προκαταρκτική επίσκεψη) να αυξάνει την καρδιακή του συχνότητα σε 120-130 σφ/min. Η τελευταία επιτυγχάνονταν από το τρίτο λεπτό της ποδηλάτησης. Η καρδιακή συχνότητα μετρίοταν από σφυγμομετρητή συνδεδεμένο με το λοβό του δεξιού αυτιού του εθελοντή και εμφανιζόταν στην οθόνη του εργοποδηλάτου. Ο σφυγμομετρητής είχε ελεγχθεί ως προς την ακρίβειά του σε όλο το εύρος καρδιακής συχνότητας του πειράματος με τη χρήση σφυγμομετρητή Polar Accurex (Kempele, Φινλανδία).

Βιοψία

Η βιοψία πραγματοποιήθηκε από τον υποδόριο λιπώδη ιστό του άνω έξω τεταρτημορίου της γλουτιαίας περιοχής των εθελοντών με τη χρήση αποστειρωμένης βελόνας μεγάλου διαμετρήματος (16 G), όπως περιγράφεται από τους Beynen και Katan (1985). Η δειγματοληψία γινόταν με τον εθελοντή σε καθιστή θέση και κατά προτίμηση από το δεξιό γλουτό. Αν κάποια δειγματοληψία προκαλούσε αιμάτωμα, οι επόμενες πραγματοποιούνταν στον αριστερό γλουτό. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 5 δειγματοληψίες λιπώδους ιστού. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε μετά από τα 15 min ηρεμίας. Οι επόμενες πραγματοποιήθηκαν στη διάρκεια της ποδηλάτησης και, συγκεκριμένα, στο 5ο και 15ο λεπτό. Η τέταρτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ακριβώς μετά το τέλος της ποδηλάτησης, στο 30ό λεπτό, και η τελευταία μετά από 15 min παθητικής αποκατάστασης.

Ομογενοποίηση λιπώδους ιστού

Η ανάλυση κάθε δείγματος λιπώδους ιστού γινόταν αμέσως χωρίς αποθήκευση. Αρχικά, το δείγμα ομογενοποιούνταν σε γυάλινο ομογενοποιητή της εταιρείας Kop-

tes (Vineland, NJ, ΗΠΑ), χωρητικότητας 1 mL, εσωτερικά εσφυρισμένο, με επίσης γυάλινο και εσφυρισμένο έμβολο. Πριν τη δειγματοληψία του λιπώδους ιστού τοποθετούνταν στον ομογενοποιητή 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 0,1 mol/L, pH 7, που περιείχε:

- 1 mmol/L EDTA για τη δέσμευση του Ca^{2+} και του Mg^{2+} , τα οποία χρειάζονται για τη δράση:
 - ενζύμων που χρησιμοποιούν ATP, όπως οι κινάσες και η συνθετάση του ακυλοσυνενζύμου A,
 - πρωτεϊνών εξαρτώμενων από το Ca^{2+} και
 - των πρωτεϊνικών φωσφατασών 2B και 2C.
- Τους αναστολείς πρωτεϊνών, αντιπαΐνη (20 mg/L), λευπεπτίνη (20 mg/L) και πεπστατίνη (10 mg/L), από την εταιρεία Sigma (St. Louis, MO, ΗΠΑ).
- Μείγμα αναστολέων φωσφατασών (κωδικός P 2850 της Sigma) σε αναλογία 1:100 μέρη διαλύματος.
- Τον αναστολέα I της cAMP-PK (Sigma) σε συγκέντρωση 2,5 μ mol/L.

Το παραπάνω διάλυμα τοποθετούνταν στον ομογενοποιητή προκαταβολικά, ώστε να ζυγιστεί ο λιπώδης ιστός μέσα σε αυτό και να έχουμε την ταχύτερη δυνατή επαφή των λιποκυττάρων με τους αναστολείς. Ανάλογα με το βάρος του λιπώδους ιστού, προσθέτονταν διάλυμα, ώστε το βάρος του να είναι 20πλάσιο εκείνου του λιπώδους ιστού. Η ομογενοποίηση επιτυγχάνονταν με 15-20 περιστροφικά ανεβοκατεβάσματα του εμβόλου. Από τη στιγμή της βιοψίας μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση του λιπώδους ιστού μεσολαβούσαν 30-40 s.

Επώαση ομογενοποιήματος

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της HSL έγινε με παρακολούθηση της μείωσης των ενδογενών τριακυλογλυκερολών κατά τη διάρκεια 30λεπτης επώασης του ομογενοποιήματος. Το ομογενοποίημα μεταφερόταν από τον ομογενοποιητή σε δοκιμαστικό σωλήνα και επωζόταν στους 37 °C με συνεχή και έντονη ανάδευση με μαγνητική ράβδο. Κατά τη διάρκεια της επώασης, λαμβάνονταν 10 μ L ομογενοποιήματος εις τριπλούν στην αρχή, στο 15ο και στο 30ό λεπτό της επώασης.

Εκχύλιση λιπιδίων

Για να τερματιστεί η αντίδραση διάσπασης των τριακυλογλυκερολών (μέσω της μετουσίωσης της HSL) και ταυτόχρονα να εκχυλιστούν τα λιπίδια του ομογενοποιημένου, τα 10 μL που λαμβάνονταν κατά την επώαση προσθέτονταν σε 1 mL οργανικού διαλύτη με σύσταση 2-προπανόλη – επτάνιο – 1 N θειϊκό οξύ σε αναλογίες όγκων 40:10:1 (Dole, 1956). Στους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου έγινε η ανάμειξη, είχαν τοποθετηθεί προκαταβολικά 3 μL διαλύματος τριδεκαεπτανοΐνης σε χλωροφόρμιο, συγκέντρωσης 23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ως εσωτερικό πρότυπο για το μετέπειτα υπολογισμό της συγκέντρωσης των τριακυλογλυκερολών (οι φυσικές τριακυλογλυκερόλες δεν έχουν τριδεκαεπτανοΐλομάδα). Τα δείγματα αναδεύονταν σε κυκλομείκτη και μετά από 10 min προσθέτονταν 400 μL επτανίου και 600 μL νερού. Το μείγμα αναδεύονταν για 1 min με σκοπό την ολοκλήρωση της εκχύλισης. Μετά την ανάδευση δημιουργούνταν δύο στοιβάδες, από τις οποίες η υπερκείμενη περιείχε τα εκχυλισμένα λιπίδια. Η στοιβάδα αυτή μεταφερόταν σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμιζόταν κάτω από ρεύμα αζώτου για τη συμπύκνωση του υλικού.

Διαχωρισμός τριακυλογλυκερολών

Για το διαχωρισμό των τριακυλογλυκερολών από τις υπόλοιπες κατηγορίες λιπιδίων του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Πρόκειται για ένα είδος χρωματογραφίας προσρόφησης, κατά την οποία ένας διαλύτης (κινητή φάση) ταξιδεύει κατά μήκος μιας λεπτής πλάκας από πορώδες υλικό. Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή της πλάκας και παρασύρεται από την κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος ταξιδεύουν κατά μήκος της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με τη συνάφειά τους προς το διαλύτη, και μ' αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται.

Χρησιμοποιήθηκε πλάκα από σίλικα της εταιρείας Sigma. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα διαλύονταν σε 30 μL διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 (v/v) και από αυτά ενσταλλάζονταν στην πλάκα 10 μL με μικροσύριγγα. Η κινητή φάση ήταν πετρελαϊκός αιθέρας - διαιθυλαιθέρας - οξικό οξύ 80:20:1 (v/v/v). Η πλάκα τοποθετούνταν μέσα σε ειδικό γυάλινο δοχείο, όπου είχε ήδη τοποθετηθεί η κινητή φάση και αναπτυσσόταν για 45 min. Στη συνέχεια αφαιρούνταν, στέγγωνε και ψεκαζόταν με διάλυμα 0,2 % διχλωροφλουοροσκειΐνης σε αιθανόλη. Με τη βοήθεια

υπεριώδους φωτός εντοπίζονταν οι κηλίδες των τριακυλογλυκερολών και αποξέονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό πώμα.

Παρασκευή και διαχωρισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των τριακυλογλυκερολών έγινε μέσω της μετατροπής τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι μετρήθηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε το απόξεσμα των τριακυλογλυκερολών προσθέτονταν 0,5 mL διαλύματος μεθοξειδίου του νατρίου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 0,5 mol/L (Sigma) και το μείγμα επωαζόταν στους 50 °C για 10 min (Kramer et al., 1997). Με αυτήν τη μέθοδο, οι ακυλομάδες των τριακυλογλυκερολών μετατρέπονταν σε μεθυλεστέρες των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Για την εκχύλιση των μεθυλεστέρων προσθέτονταν 1 mL εξανίου και το μείγμα αναδευόταν για 1 min σε κυκλομείκτη. Από τις δύο σχηματιζόμενες στοιβάδες, η υπερκείμενη (που περιείχε τους μεθυλεστέρες) μεταφερόταν σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμιζόταν κάτω από ρεύμα αζώτου για τη συμπύκνωση των μεθυλεστέρων.

Η αέρια χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας κατανομής, κατά την οποία τα συστατικά ενός μείγματος κατανέμονται ανάμεσα σε μια στάσιμη και μια κινητή φάση. Η στάσιμη φάση είναι υγρή και είναι προσροφημένη επάνω στο στερεό υλικό ενός μακρού και στενού σωλήνα, που ονομάζεται στήλη αέριας χρωματογραφίας. Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα σε κλίβανο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ο οποίος είναι το κεντρικό μέρος του αέριου χρωματογράφου. Κατά μήκος της στήλης ταξιδεύει η κινητή φάση, που είναι αέρια. Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης και παρασύρεται από την κινητή φάση κατά μήκος της στάσιμης. Τα συστατικά του δείγματος, λόγω της διαφορετικής χημικής τους δομής, έχουν διαφορετική κατανομή μεταξύ κινητής και στάσιμης φάσης με αποτέλεσμα να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από την ροή της κινητής φάσης και από το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης.

Για την ανάλυση των μεθυλεστέρων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος 5890 Series II της εταιρείας Hewlett-Packard (Waldbronn, Γερμανία) εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη BPX70 της εταιρείας SGE (Ringwood, Victoria, Αυστραλία) μήκους 30 m. Η θερμοκρασία της στήλης προγραμματίστηκε να ξεκινάει από τους 140 °C και να φτάνει τους 205 °C με ρυθμό 5 °C/min. Η κινητή φάση ήταν το αδρανές αέριο, ήλιο με ροή 0,67 mL/min (στους 140 °C).

Οι συμπυκνωμένοι μεθυλεστέρες διαλύονταν σε 50 μL εξανίου και από αυτά εισαγόταν 1 μL με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης. Κατά την έξοδο του από τη στήλη, κάθε μεθυλεστέρας ανιχνευόταν με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας και το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα διοχετευόταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Εκεί μετατρεπόταν σε καμπύλη έντασης του σήματος ως προς το χρόνο εξόδου από τη στήλη, το ονομαζόμενο χρωματογράφημα. Σε αυτό, κάθε μεθυλεστέρας απεικονίζεται ως μία αιχμή. Το εμβαδόν κάτω από την αιχμή είναι ανάλογο της ποσότητας του μεθυλεστέρα και υπολογιζόταν με ολοκλήρωση από το πρόγραμμα HP 3365 ChemStation της Hewlett-Packard. Το εμβαδόν κάθε αιχμής μετατρεπόταν σε συγκέντρωση μεθυλεστέρα μετά από σύγκρισή του με το εμβαδόν της αιχμής του δεκαεπτανοϊκού μεθυλεστέρα που υπήρχε σε κάθε χρωματογράφημα, προερχόμενο από την τρανσμεθυλίωση του εσωτερικού προτύπου.

Υπολογισμός της δραστικότητας της HSL

Από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο υπολογίστηκε η εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των ακυλομάδων των τριακυλογλυκερολών του λιπώδους ιστού. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των τριακυλογλυκερολών, αθροίζονταν οι συγκεντρώσεις των μεθυλεστέρων και το άθροισμα διαιρούσαν με τρία (αφού σε κάθε τριακυλογλυκερόλη αντιστοιχούν τρεις μεθυλεστέρες). Έτσι, προέκυπταν συγκεντρώσεις τριακυλογλυκερολών σε μmol ανά mg λιπώδους ιστού. Στη συνέχεια υπολογιζόταν η μεταβολή της συγκέντρωσης των τριακυλογλυκερολών στο χρόνο, γινόταν αναγωγή στο λεπτό και, τελικά, η δραστικότητα της HSL εκφραζόταν σε μmol τριακυλογλυκερολών $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Επειδή η επικρατούσα μονάδα δραστικότητας της HSL στηρίζεται στα παραγόμενα λιπαρά οξέα, οι τελικές τιμές πολλαπλασιάζονταν επί τρία ώστε να εκφραστούν και σε $\text{U} \times \text{mg}^{-1}$.

Προσδιορισμός τριακυλογλυκερολών στον ορό

Ο προσδιορισμός των τριακυλογλυκερολών έγινε με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο, η οποία στηρίζεται στην πλήρη υδρόλυσή τους και την ακόλουθη μέτρηση της γλυκερόλης που απελευθερώνεται. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Triglycerides Liquid reagent (αριθμός καταλόγου 70.B5.011171) της εταιρείας BEST (A-

θήνα) και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των τριακυλογλυκερολών στηρίχθηκε στη χρήση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 200 mg/dL. Από τις τελικές τιμές αφαιρέθηκαν 10 mg/dL ως διόρθωση για την ελεύθερη γλυκερόλη που υπάρχει σε κάθε δείγμα.

Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης στον ορό

Ο προσδιορισμός έγινε με ενζυμική φωτομετρική μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Cholesterol Liquid reagent (αριθμός καταλόγου 70.B5.011141) της BEST και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στηρίχθηκε στη χρήση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 200 mg/dL.

Ερευνητική υπόθεση

Η δραστικότητα της HSL αυξάνεται στη διάρκεια 30λεπτης ποδηλάτησης μέτριας έντασης και μειώνεται 15 min μετά το τέλος αυτής.

Στατιστικές υποθέσεις

Η μηδενική και η εναλλακτική υπόθεση διατυπώνονται ως εξής:

Μηδενική υπόθεση:

Η δραστικότητα της HSL είναι η ίδια σε ηρεμία, στη διάρκεια 30λεπτης ποδηλάτησης και 15 min μετά το τέλος αυτής.

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$, όπου μ_1 είναι η δραστικότητα της HSL σε ηρεμία, μ_2 και μ_3 η δραστικότητα της HSL στα 5 και 15 min ποδηλάτησης, μ_4 στο τέλος της και μ_5 15 min μετά το τέλος της ποδηλάτησης.

Εναλλακτική υπόθεση:

Η δραστικότητα της HSL μεταβάλλεται στη διάρκεια ποδηλάτησης και 15 min μετά το τέλος της σε σύγκριση με τη δραστικότητα της σε ηρεμία.

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$

Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Για τη σύγκριση της εκατοστιαίας κατανομής των ακυλομάδων των τριακυλογλυκερολών πριν και μετά την επώαση χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t του Student. Η σύγκριση της δραστικότητας της HSL στα 5 χρονικά σημεία βιοψίας λιπώδους ιστού έγινε με απλή ανά-

λυση διακύμανσης (ANOVA) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Πριν την ANOVA έγινε έλεγχος των τιμών δραστηριότητας της HSL ως προς τη σφαιρικότητα και βρέθηκε ότι υπάρχει. Την εύρεση σημαντικής διαφοράς ακολούθησε δοκιμασία του Scheffé για τον εντοπισμό της ανάμεσα σε ζεύγη παρατηρήσεων. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα STATISTICA 5.1. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ατομικά στοιχεία των εθελοντών παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

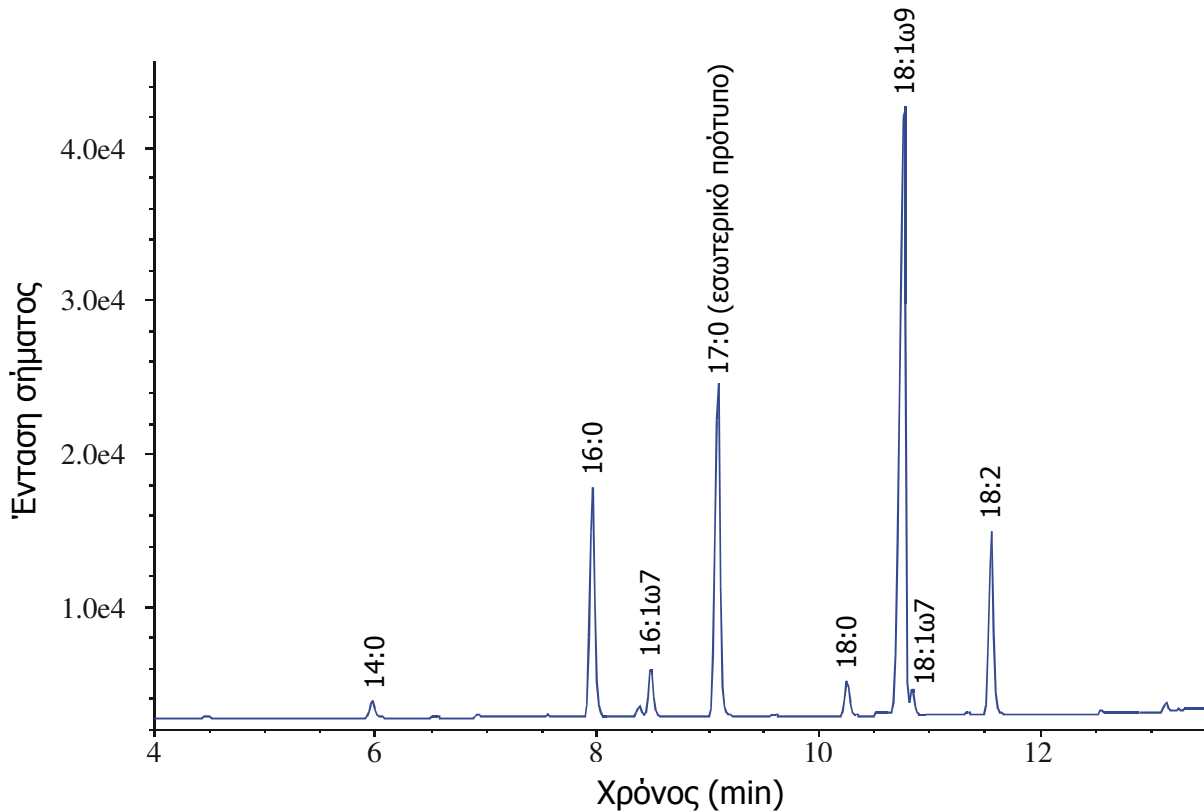
Πίνακας 1. Ατομικά στοιχεία εθελοντών (n = 10)

Κωδικός	Ηλικία (έτη)	Σωματική μάζα (kg)	Ύψος (m)	Μέση ισχύς ποδηλάτησης (W)	Μέση καρδιακή συχνότητα ποδηλάτησης (σφ/min)
1	25	91,0	1,75	120	126
2	23	77,6	1,86	115	126
3	24	73,0	1,86	75	129
4	25	74,5	1,73	110	130
5	21	81,1	1,81	100	127
6	25	82,4	1,79	80	125
7	26	80,0	1,85	125	125
8	25	76,6	1,67	110	125
9	26	83,6	1,93	110	127
10	25	77,2	1,79	120	128
Μέση τιμή	24,5	79,7	1,80	106	127
Τυπικό σφάλμα	0,5	1,6	0,02	5	1

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 50 δειγματοληψίες λιπώδους ιστού (5 από κάθε εθελοντή) μάζας $24,4 \pm 1,0$ mg.

Κατά την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο ανιχνεύτηκαν 8 μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων προερχόμενοι από τις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού. Από αυτούς, τρεις αντιστοιχούσαν στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, μυριστικό (14:0), παλμιτικό (16:0) και στεατικό (18:0), τρεις στα μονοακόρεστα, παλμιτελαϊκό (16:1ω7), ελαιικό (18:1ω9) και βαξενικό (18:1ω7), και ένας στο πολυακόρεστο, λινελαϊκό (18:2). Ένα τυπικό χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο σχήμα 3.

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\NV-F2953.D



Σχήμα 3. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενων από τις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού.

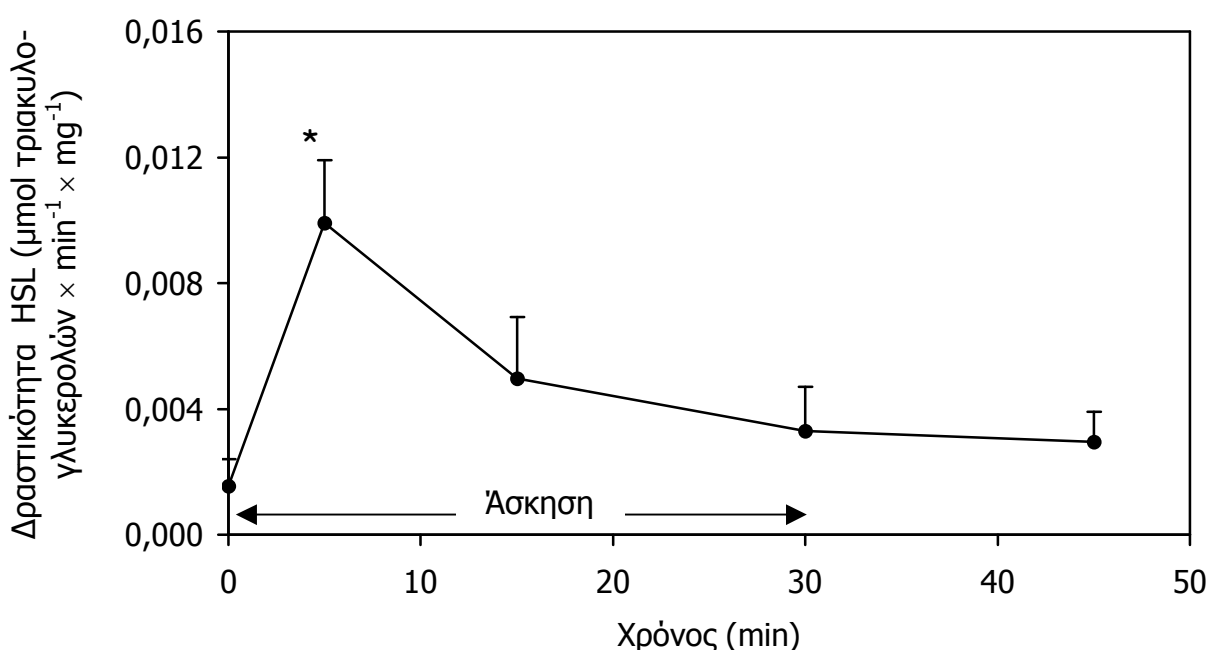
Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η κατανομή λιπαρών οξέων στις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού από όλες τις δειγματοληψίες ($n = 50$) στην αρχή της επώασης. Το ελαϊκό ήταν το πιο άφθονο λιπαρό οξύ, ακολουθούμενο από το παλμιτικό και το λινελαϊκό.

Πίνακας 2. Κατανομή λιπαρών οξέων στις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού

Λιπαρό οξύ	Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή
Μυριστικό (14:0)	$2,4 \pm 0,1$
Παλμιτικό (16:0)	$21,7 \pm 0,2$
Παλμιτελαϊκό (16:1ω7)	$4,5 \pm 0,1$
Στεατικό (18:0)	$3,6 \pm 0,1$
Ελαϊκό (18:1ω9)	$50,6 \pm 0,5$
Βαξενικό (18:1ω7)	$1,9 \pm 0,0$
Λινελαϊκό (18:2)	$15,4 \pm 0,3$

Στο τέλος των επωάσεων (30 min) για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της HSL, η κατανομή των λιπαρών οξέων ήταν πολύ όμοια με εκείνη κατά την έναρξη των επωάσεων, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η μόνη εξαίρεση παρουσιάστηκε στο βαξενικό οξύ, το ποσοστό του οποίου ανέβηκε από 1,8 σε 1,9 % ($p < 0,05$) στο τέλος της επώασης του ομογενοποιημάτος που αντιστοιχούσε στη δειγματοληψία των 5 min ποδηλάτησης.

Η χρονική εξέλιξη της δραστηριότητας της HSL στη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζεται στο σχήμα 4. Ο συντελεστής διακύμανσης της μεθόδου μέτρησης της δραστηριότητας της HSL ήταν 12 %.



Σχήμα 4. Δραστηριότητα της HSL κατά τη διάρκεια ποδηλάτησης στους 120-130 σφ/min και κατά την παθητική αποκατάσταση. Ο αστερίσκος δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά από την έναρξη και το τέλος της άσκησης, καθώς και από το τέλος της αποκατάστασης.

Η δραστηριότητα της HSL στα 5 χρονικά σημεία δειγματοληψίας λιπώδους ιστού παρουσιάζεται επίσης στον πίνακα 3, εκφρασμένη σε δύο μονάδες για τη διευκόλυνση της σύγκρισης με τις τιμές της βιβλιογραφίας.

Πίνακας 3. Δραστικότητα της HSL κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης και κατά την αποκατάσταση

Χρόνος (min)	Δραστικότητα HSL	
	μmol τριακυλογλυκερολών $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$	U $\times \text{mg}^{-1}$
0	0,0015 \pm 0,0009	0,0046 \pm 0,0026
5	0,0099 \pm 0,0020	0,0298 \pm 0,0059
15	0,0050 \pm 0,0020	0,0149 \pm 0,0059
30	0,0034 \pm 0,0014	0,0099 \pm 0,0042
45	0,0030 \pm 0,0009	0,0089 \pm 0,0028

Με την ANOVA βρέθηκε ότι η δραστικότητα της HSL ήταν σημαντικά διαφορετική στα 5 χρονικά σημεία βιοψίας ($p < 0,001$). Η δραστικότητα αυξήθηκε σημαντικά στο 5ο λεπτό της ποδηλάτησης ($p = 0,002$), εμφανίζοντας τιμή 6,4 φορές υψηλότερη από εκείνη στην ηρεμία. Στο 15ο λεπτό της ποδηλάτησης η δραστικότητα της HSL μειώθηκε παραμένοντας ωστόσο υψηλότερη, αν και όχι στατιστικά σημαντικά, από εκείνη στην ηρεμία. Η δραστικότητα της HSL μειώθηκε ακόμη περισσότερο στο τέλος της ποδηλάτησης και στα 15 min της αποκατάστασης. Η δραστικότητα της HSL στα 5 min ήταν σημαντικά υψηλότερη από ό,τι στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες ($p = 0,02$ και $0,01$, αντίστοιχα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μέτρηση της χρονικής εξέλιξης της δραστηριότητας της HSL στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης μέτριας έντασης και κατά την παθητική αποκατάσταση. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε μια καινούργια μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας της HSL η οποία έχει τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

- Χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τις ενδογενείς τριακυλογλυκερόλες των λιποκυττάρων.
- Διατηρεί το υπόστρωμα στο φυσικό περιβάλλον δράσης της HSL, στο οποίο συνυπάρχουν παράγοντες, όπως οι περιλιπίνες, που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου.
- Μετρά την πραγματική δραστηριότητα της HSL, ανάλογα με το βαθμό φωσφορυλίωσής της.

Η χρησιμότητα της μεθόδου επιβεβαιώνεται από τις επισημάνσεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την ανάγκη δημιουργίας μεθόδου που θα μετρά τη δραστηριότητα της HSL ανάλογα με το βαθμό φωσφορυλίωσής της (Holm et al., 1997· Frayn, Langin, Holm, and Belfrage, 1993).

Μειονεκτήματα της παρούσας μεθόδου μέτρησης της δραστηριότητας της HSL είναι:

- Δεν δίνει πληροφορίες για το ρυθμό εξόδου των προϊόντων της λιπόλυσης στην κυκλοφορία.
- Δεν ενδείκνυται για δειγματοληψία από άλλες περιοχές του λιπώδους ιστού με μεγαλύτερη αιμάτωση.
- Τα επαναλαμβανόμενα τρυπήματα ίσως προκαλούν στρες στον εθελοντή.

Για τη μελέτη επιλέχθηκαν άντρες, επειδή ο ρυθμός λιπόλυσης στις γυναίκες αυξάνεται από τα οιστρογόνα (Ruby and Robergs, 1994). Οι εθελοντές είχαν παρόμοια ηλικία και σωματομετρικά χαρακτηριστικά για να περιοριστούν παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το ρυθμό λιπόλυσης.

Επιλέχθηκε άσκηση μέτριας έντασης και διάρκειας, επειδή τέτοιου είδους άσκηση ενεργοποιεί τη λιπόλυση (όπως περιγράφηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση) και εξυπηρετούσε τους σκοπούς της μελέτης. Ο καθορισμός της έντασης της άσκησης μέσω της καρδιακής συχνότητας βρίσκεται πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες γύμνασης, αφού είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος καθορισμού της έντασης στην καθημερινότητα και έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές που ασχολούνται με τη λιπόλυση (De Glisezinski et al., 1998a·1998b).

Το εντυπωσιακότερο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ότι η δραστικότητα της HSL κορυφώθηκε στο 5^ο λεπτό της ποδηλάτησης, ενώ στη συνέχεια παρουσίασε σταδιακή πτώση, παρότι συνεχίστηκε το ερέθισμα της άσκησης. Σε συμφωνία με το εύρημα αυτό είναι τα αποτελέσματα έρευνας στην οποία μετρήθηκε η δραστικότητα της HSL σε μυ αρουραίου μετά από ηλεκτρικό ερεθισμό (Langfort, Ploug, Ihlemann, Holm, and Galbo, 2000). Σε σύγκριση με την ηρεμία, η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε σημαντικά αυξημένη μετά από 1 και 5, αλλά όχι μετά από 10 ή 60 min διέγερσης.

Πιθανή αιτία της πτώσης της δραστικότητας της HSL μετά από τα πρώτα 5 min της άσκησης είναι η απευαισθητοποίηση των β αδρενεργών υποδοχέων. Ο μηχανισμός αυτής της απευαισθητοποίησης έχει περιγραφεί ως εξής (Nelson and Cox, 2000): Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, η σύνδεση μιας κατεχολαμίνης με τον β αδρενεργό υποδοχέα οδηγεί στο διαχωρισμό της πρωτεΐνης G_s σε G_{sa} (που ενεργοποιεί την κυκλάση του αδενυλικού οξέος) και $G_{s\beta\gamma}$. Η $G_{s\beta\gamma}$ προσελκύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη την κινάση του β αδρενεργού υποδοχέα, ένα ένζυμο που κανονικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα στην περιοχή όπου αλληλεπιδρά με την G_s . Η φωσφορυλίωση αυτή όμως δημιουργεί θέση σύνδεσης για μια άλλη πρωτεΐνη, τη β-αρρεστίνη, η οποία εμποδίζει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την G_s , αναστέλλοντας την οδό της β αδρενεργικής διέγερσης. Επιπλέον, η σύνδεση της αρρεστίνης προάγει την απόσυρση του υποδοχέα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη σε μικρά ενδοκυτταρικά κυστίδια με ενδοκυττάρωση. Οι υποδοχείς σε αυτά τα κυστίδια αποφωσφορυλιώνονται και επιστρέφουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη

ολοκληρώνοντας το κύκλωμα και αποκαθιστώντας την ευαισθησία του συστήματος στις κατεχολαμίνες.

Είναι λοιπόν πιθανό, η δράση των κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια της άσκησης να προκάλεσε αναστολή του μονοπατιού φωσφορυλίωσης της HSL, με αποτέλεσμα την πτώση της δραστηριότητάς της μετά την αρχική διέγερση. Η υπόθεση της απευαισθητοποίησης υποστηρίζεται και από το ότι η β αδρενεργική διέγερση της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό ήταν σημαντικά υψηλότερη πριν απ' ό,τι μετά από 60λεπτη άσκηση απροπόνητων αντρών στο 50 % της VO_2max (Marion-Latard et al., 2001).

Παρότι η απευαισθητοποίηση των β αδρενεργών υποδοχέων φαίνεται ως η πιθανότερη αιτία της παρατηρηθείσας πτώσης της δραστηριότητας της HSL μετά την αρχική κορύφωση στην αρχή της άσκησης, υπάρχουν δύο ακόμη πιθανές αιτίες. Η πρώτη είναι η ενεργοποίηση πρωτεϊνικών φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν την HSL και η δεύτερη η ενεργοποίηση της ενεργοποιούμενης από το AMP πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία (όπως αναφέρθηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση) φωσφορυλιώνει την HSL στη βασική θέση εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση στη ρυθμιστική θέση.

Επειδή δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία τιμές πραγματικής δραστηριότητας της HSL στο λιπώδη ιστό είτε σε ηρεμία είτε, πολύ περισσότερο, σε άσκηση, τα δεδομένα μας δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα με εκείνα άλλων ερευνητών. Μπορούν όμως να συγκριθούν με τιμές ρυθμού λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό που έχουν προσδιοριστεί έμμεσα με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στη βιβλιογραφική ανασκόπηση. Η σύγκριση αυτή παρουσιάζεται στον πίνακα 4 και δείχνει μεγάλη ασυμφωνία τιμών ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 4. Ρυθμοί λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό

Μελέτη	Μέθοδος	Ρυθμός λιπόλυσης (μmol $\text{γλυκερόλης} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	
		Ηρεμία	Άσκηση
Horowitz et al., 2000	Μικροδιαπίδυση	$0,5 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-6}$
Mulla et al., 2000	Αρτηριοφλεβικές διαφορές	$0,5 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$
De Glisezinski et	Απομόνωση λιπο-	1×10^{-4}	

Η ασυμφωνία ανάμεσα στα αποτελέσματα του πίνακα 4 είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Παρότι και οι δύο πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν *in vivo*, έχουν 10πλάσια διαφορά στις τιμές ηρεμίας. Επίσης, παρότι και στις τρεις πρώτες μελέτες ο υπολογισμός του ρυθμού λιπόλυσης βασίστηκε στην ίδια παραδοχή (ότι όλη η παραγόμενη από τη λιπόλυση γλυκερόλη εξέρχεται από τα λιποκύτταρα), οι τιμές ηρεμίας διαφέρουν μέχρι και κατά 200 φορές. Η παραπάνω παραδοχή, αν και ευρέως αποδεκτή, δεν είναι βέβαιο ότι ισχύει. Γι' αυτό θεωρούμε πλεονέκτημα της παρούσας έρευνας το ότι μελετήσαμε τη λιπόλυση μετρώντας τη μείωση των τριακυλογλυκερολών, λαμβάνοντας ταυτόχρονα μέτρα για την αποφυγή της επαναστεροποίησης των παραγόμενων λιπαρών οξέων. Αυτό έγινε με την προσθήκη του EDTA για τη δέσμευση του Mg^{2+} που, σε σύμπλοκο με το ATP, χρειάζεται για τη σύνθεση ακυλοσυνενζύμου A από λιπαρά οξέα ως πρώτο βήμα για τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών. Επομένως, οι πολύ υψηλότερες τιμές δραστηριότητας της HSL στην παρούσα μελέτη σε σύγκριση με τις τιμές ρυθμού λιπόλυσης του πίνακα 4 ίσως οφείλονται στο ότι το μεγαλύτερο μέρος των προϊόντων της λιπόλυσης, περιλαμβανομένης της γλυκερόλης, δεν εξέρχονται των λιποκυττάρων ή εξέρχονται με μεγάλη καθυστέρηση.

Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των ακυλομάδων των τριακυλογλυκερολών πριν και μετά την επώαση του λιπώδους ιστού δείχνει ότι δεν υπήρξε εκλεκτική υδρόλυση κάποιας ακυλομάδας από την HSL. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα που υποστηρίζουν εκλεκτική απόσπαση ακυλομάδων από την HSL και συγκεκριμένα προτίμηση στην απελευθέρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Gavino and Gavino, 1992). Επιπλέον, βρέθηκε ότι, γενικά, για συγκεκριμένο μήκος ανθρακικής αλυσίδας, ο σχετικός ρυθμός απελευθέρωσης λιπαρών οξέων από απομονωμένα λιποκύτταρα αυξάνεται με την αύξηση των ακόρεστων δεσμών, ενώ, για συγκεκριμένο αριθμό ακόρεστων δεσμών, ο ρυθμός απελευθέρωσης μειώνεται με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας (Raclot and Groscolas, 1993· Raclot, Langin, Lafontan, and Groscolas, 1997). Παρόμοια εκλεκτικότητα βρέθηκε για καθαρισμένη

HSL απέναντι σε συνθετικά γαλακτώματα λιπιδίων (Raclot, Holm, and Langin, 2001)

Η ασυμφωνία της παρούσας μελέτης με τις παραπάνω έρευνες ίσως οφείλεται στον πολύ μικρότερο χρόνο επώασης (0,25-0,5 έναντι 1,5-24 h). Είναι δηλαδή πιθανό να μη δόθηκε αρκετός χρόνος για την εμφάνιση στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στα λιπαρά οξέα ως προς το ρυθμό απελευθέρωσής τους από τις τριακυλογλυκερόλες. Ωστόσο, οι συνθήκες μελέτης της υδρόλυσης των τριακυλογλυκερολών στις παραπάνω έρευνες διέφεραν από αυτές της παρούσας, οι οποίες ήταν και οι πλησιέστερες στις συνθήκες *in vivo*.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

1. Επειδή για πρώτη φορά, μέσα από την παρούσα μελέτη, μετρήθηκε η πραγματική δραστικότητα της HSL (ανάλογα με το βαθμό φωσφορυλίωσής της), χρειάζεται να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα με τη διεξαγωγή και άλλων παρόμοιων πειραμάτων.
2. Χρειάζεται βελτίωση της μεθόδου μέτρησης της δραστικότητας της HSL και, συγκεκριμένα, της ομοιογένειας του λιπώδους ιστού κατά την επώαση, αφού οι τιμές μας συχνά εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις και γι' αυτό το λόγο οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.
3. Θα είχε ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών άσκησης (είδος, ένταση και διάρκεια) στη δραστικότητα της HSL καθώς και σε γυναίκες.
4. Θα μπορούσε να μελετηθεί η δραστικότητα της HSL σε γυναίκες και σε άλλες περιοχές του λιπώδους ιστού, αφού ο ρυθμός λιπόλυσης παρουσιάζει διαφορές από φύλο σε φύλο και από περιοχή σε περιοχή.
5. Η μέθοδος που αναπτύξαμε δίνει τη δυνατότητα μελέτης της επίδρασης άλλων παραγόντων, εκτός από την άσκηση, στη δραστικότητα της HSL. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι η παχυσαρκία, η διατροφή, διατροφικά συμπληρώματα και φάρμακα.
6. Η παρακολούθηση της δραστικότητας της HSL κατά την άσκηση θα ήταν χρήσιμο να συνδυαστεί με την παρακολούθηση των μεταβολών στις συγκεντρώσεις μεταβολιτών και ορμονών στο αίμα. Αυτό δεν έγινε στην παρούσα μελέτη λόγω της επικέντρωσής μας στην ανάπτυξη της νέας μεθόδου και για να μην προκληθεί υπερβολική δυσφορία στους εθελοντές.
7. Τέλος, θα ήταν χρήσιμο, παράλληλα με τη δραστικότητα της HSL να μετρηθεί η ποσότητα του ενζύμου και τα επίπεδα mRNA του, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για αλλαγές στη γονιδιακή έκφρασή του, ιδιαίτερα μετά από χρόνια άσκηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arner, K.N. (1999). Macronutrient metabolism of adipose tissue at rest and during exercise: a methodological viewpoint. *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 877-886.
- Beynen, A.C., and Katan, M.B. (1985). Rapid sampling and long-term storage of subcutaneous adipose-tissue biopsies for determination of fatty acid composition. *American Journal of Clinical Nutrition* 42: 317-322.
- Bouchard, C., Despres, J.P., and Mauriege, P. (1993). Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocrinology Reviews* 14: 72-93.
- Brasaemle, D.L., Levin, D.M., Adler-Wailes, D.C., and Londos, C. (2000). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1483: 251-262.
- Bukowiecki, L., Lupien, J., Follea, N., Paradis, A., Richard, D., and LeBlanc, J. (1980). Mechanism of enhanced lipolysis in adipose tissue of exercise-trained rats. *American Journal of Physiology* 239: E422-E429.
- Carey, G.B. (2000). Cellular adaptations in fat tissue of exercise-trained miniature swine: role of excess energy intake. *Journal of Applied Physiology* 88: 881-887.
- Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G., and Yeaman, S.J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5011-5015.
- Coggan, A.R., Raguso, C.A., Gastaldelli, A., Sidossis, L.S., and Yeckel, C.W. (2000). Fat metabolism during high-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Metabolism* 49: 122-128.
- Crampes, F., Riviere, D., Beauville, M., Marceron, M., and Garrigues, M. (1989). Lipolytic response of adipocytes to epinephrine in sedentary and exercise-trained subjects: sex-related differences. *European Journal of Applied Physiology* 59: 249-255.
- De Glisezinski, I., Harant, I., Crampes, F., Trudeau, E., Felez, A., Cottet-Emard, J.M., Garrigues, M., and Riviere, D. (1998a). Effect of carbohydrate ingestion on adipose tissue lipolysis during long-lasting exercise in trained men. *Journal of Applied Physiology* 84: 1627-1632.

- De Glisezinski, I., Crampes, F., Harant, I., Berlan, M., Hejnova, J., Langin, D., Riviere, D., and Stich, V. (1998b). Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *American Journal of Physiology* 275: E951-E956.
- Despres, J.P., Bouchard, C., Savard, R., Tremblay, A., Marcotte, M., and Theriault, G. (1984a). Level of physical fitness and adipocyte lipolysis in humans. *Journal of Applied Physiology* 56: 1157-1161.
- Despres, J.P., Bouchard, C., Savard, R., Tremblay, A., Marcotte, M., and Theriault, G. (1984b). The effect of a 20-week endurance training program on adipose-tissue morphology and lipolysis in men and women. *Metabolism* 33: 235-239.
- Dole, V.P. (1956). A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation* 35: 150-154.
- Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M., Wek, S.A., Malkolm, C.M., and Londos, C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 8537-8547.
- Enevoldsen, L.H., Stallknecht, B., Fluckey, J.D., and Galbo, H. (2000). Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology* 279: E585-592.
- Evans, K., Clark, M.L., and Frayn, K.N. (1999). Effects of an oral and intravenous fat load on adipose tissue and forearm lipid metabolism. *American Journal of Physiology* 276: E241-E248.
- Frayn, K.N., Fielding, B.A., and Summers, L.K.M. (1997). Investigation of human adipose tissue metabolism in vivo. *Journal of Endocrinology* 155: 187-189.
- Frayn, K.N., Langin, D., Holm, C., and Belfrage, P. (1993). Hormone-sensitive lipase: quantitation of enzyme activity and mRNA level in small biopsies of human adipose tissue. *Clinica Chimica Acta* 216: 183-189.
- Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N.O., and Belfrage, P. (1981). Hormone sensitive lipase of rat adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* 256: 6311-6320.
- Friedlander, A.L., Casazza, G.A., Horning, M.A., Usaj, A., and Brooks, G.A. (1999). Endurance training increases fatty acid turnover, but not fat oxidation, in young men. *Journal of Applied Physiology* 86: 2097-2105.
- Friedlander, A.L., Casazza, G.A., Horning, M.A., Buddinger, T.F., and Brooks, G.A. (1998). Effects of exercise intensity and training on lipid metabolism in young women. *American Journal of Physiology* 275: E853-E863.

- Garton, A.J., and Yeaman, S.J. (1990). Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *European Journal of Biochemistry* 191: 245-250.
- Garton, A.J., Campbell, D.G., Carling, D., Hardie, D.G., Colbran, R.J., and Yeaman, S.J. (1989). Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry* 179: 249-254.
- Gavino, V.C., and Gavino, G.R. (1992). Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids* 27: 950-954.
- Hickner, R.C., Racette, S.B., Binder, E.F., Fisher, J.S., and Kohrt, W.M. (2000). Effects of 10 days of endurance exercise training on the suppression of whole body and regional lipolysis by insulin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85: 1498-1504.
- Holm, C., Østerlund, T., Laurell, H., and Contreras, A. (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual Review of Nutrition* 20: 1-24.
- Holm, C., Langin, D., Manganiello, V., Belfrage, P., and Degerman, E. (1997). Regulation of hormone-sensitive lipase activity in adipose tissue. *Methods in Enzymology* 286: 45-67.
- Holm, C., Belfrage, P., Østerlund, T., Davis, R.C., Schotz, M.C., and Langin, D. (1994). Hormone-sensitive lipase: structure, function, evolution and overproduction in insect cells using the baculovirus expression system. *Protein Engineering* 7: 537-541.
- Horowitz, J.F., and Klein, S. (2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 558S-563S.
- Horowitz, J.F., Leone, T.C., Feng, W., Kelly, D.P., and Klein, S. (2000). Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR α in the metabolic response to training. *American Journal of Physiology* 279: E348-E355.
- Horowitz, J.F., Braudy, R.J., Martin, W.H., and Klein, S. (1999). Endurance exercise training does not alter lipolytic or adipose tissue blood flow sensitivity to epinephrine. *American Journal of Physiology* 277: E325-E331.
- Ingebritsen, T.S., and Cohen, P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338.

- Izawa, T., Komabayashi, T., Mochizuki, T., Suda, K., Tsuboi, M. (1991). Enhanced coupling of adenylate cyclase to lipolysis in permeabilized adipocytes from trained rats. *Journal of Applied Physiology* 71: 23-29.
- Jeukendrup, A.E., Saris, W.H., and Wagenmakers, A.J. (1998). Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *International Journal of Sports Medicine* 19: 231-244.
- Kanaley, J.A., Mottram, C.D., Scanlon, P.D., and Jensen, M.D. (1995). Fatty acid kinetic responses to running above or below lactate threshold. *Journal of Applied Physiology* 79: 439-447.
- Klein, S., Coyle, E.F., and Wolfe, R.R. (1995). Effect of exercise on lipolytic sensitivity in endurance-trained athletes. *Journal of Applied Physiology* 78: 2201-2206.
- Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., and Yurawecz, M.P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* 32: 1219-1228.
- Lange, K.H., Lorentsen, J., Isaksson, F., Juul, A., Rasmussen, M.H., Christensen, N.J., Bulow, J., and Kjaer, M. (2001). Endurance training and GH administration in elderly women: effects on abdominal adipose tissue lipolysis. *American Journal of Physiology* 280: E886-E897.
- Langfort, J., Ploug, T., Ihlemann, J., Holm, C., and Galbo, H. (2000). Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. *Biochemistry J.* 351: 207-214.
- Large, V., and Arner, P. (1998). Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes and Metabolism* 24: 409-418.
- Londos, C., Brasaemle, D.L., Schultz, C.J., Segrest, J.P., and Kimmel, A.R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Cell and Developmental Biology* 10: 51-58.
- Marion-Latard, F., De Glisezinski, I., Crampes, F., Berlan, M., Galitzky, J., Suljkovicova, H., Riviere, D., and Stich, V. (2001). A single bout of exercise induces beta-adrenergic desensitization in human adipose tissue. *American Journal of Physiology* 280: R166-R173.
- Martin, W.H. (1996). Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. *Exercise and Sports Science Reviews* 24: 203-231.
- Mauriege, P., Despres, J.P., Marcotte, M., Tremblay, A., Nadeau, A., Moorjani, S., Lupien, P., Dussault, J., Fournier, G., Theriault, G., et al. (1992). Adipose tissue

- lipolysis after long-term overfeeding in identical twins. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 16: 219-225.
- Mersmann, H.J. (1998). Lipoprotein and hormone-sensitive lipases in porcine adipose tissue. *Journal of Animal Science* 76: 1396-1404.
- Mora-Rodriguez, R., and Coyle, E.F. (2000). Effects of plasma epinephrine on fat metabolism during exercise: interactions with exercise intensity. *American Journal of Physiology* 278: E669-E676.
- Morimoto, C., Kameda, K., Tsujita, T., and Okuda, H. (2001). Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *Journal of Lipid Research* 42: 120-127.
- Morimoto, C., Tsujita, T., and Okuda, H. (1998). Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocytes. *Journal of Lipid Research* 39: 957-962.
- Morimoto, C., Tsujita, T., and Okuda, H. (1997). Norepinephrine-induced lipolysis in rat fat cells from visceral and subcutaneous sites: role of hormone-sensitive lipase and lipid droplets. *Journal of Lipid Research* 38: 132-138.
- Mulla, N.A., Simonsen, L., and Bulow, J. (2000). Post-exercise adipose tissue and skeletal muscle lipid metabolism in humans: the effects of exercise intensity. *Journal of Physiology* 524: 919-928.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2000). Lehninger principles of biochemistry. New York, Worth pp: 454-455.
- Nilsson, N.O., Stralfors, P., Fredrikson, G., and Belfrage, P. (1980). Regulation of adipose tissue lipolysis: Effects of noradrenaline and insulin on phosphorylation of hormone-sensitive lipase and on lipolysis in intact rat adipocytes. *FEBS Letters* 111: 125-130.
- Olsson, H., and Belfrage, P. (1987). The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *European Journal of Biochemistry* 168: 399-405.
- Oscai, L.B., Essig, D.A., and Palmer, W.K. (1990). Lipase regulation of muscle triglyceride hydrolysis. *Journal of Applied Physiology* 69: 1571-1577.
- Raclot, T., Holm, C., and Langin, D. (2001). A role for hormone-sensitive lipase in the selective mobilization of adipose tissue fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1532: 88-96.

- Raclot, T., Langin, D., Lafontan, M., and Groscolas, R. (1997). Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochemical Journal* 324: 911-915.
- Ranallo, R.F., and Rhodes, E.C. (1998). Lipid metabolism during exercise. *Sports Medicine* 26:29-42.
- Reynisdottir, S., Angelin, B., Langin, D., Lithell, H., Eriksson, M., Holm, C., and Arner, P. (1997). Adipose tissue lipoprotein lipase and hormone sensitive lipase. Contrasting findings in familial combined hyperlipidemia and insulin resistance syndrome. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 17: 2287-2292.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biological Chemistry* 239: 375-380.
- Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Castaldelli, J.F., Horowitz, J.F., Endert, E., and Wolfe, R.R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology* 265: E380-E391.
- Ruby, B.C., and Robergs, R.A. (1994). Gender differences in substrate utilisation during exercise. *Sports Medicine* 17: 393-410.
- Shen, W.J., Patel, S., Hong, R., and Kraemer, F.B. (2000). Hormone sensitive lipase functions as an oligomer. *Biochemistry* 39: 2392-2398.
- Shen, W.J., Sridhar, K., Bernlohr, D.A., and Kraemer, F.B. (1999). Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 5528-5532.
- Shephard, R.J. (1992). Fat metabolism, exercise, and the cold. *Canadian Journal of Sport Science* 17: 83-90.
- Shepherd, R.E., and Bah, M.D. (1988). Cyclic AMP regulation of fuel metabolism during exercise: regulation of adipose tissue lipolysis during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 20: 531-538.
- Shepherd, R.E., Noble, E.G., Klug, G.A., Gollnick, P.D. (1981). Lipolysis and cAMP accumulation in adipocytes in response to physical training. *Journal of Applied Physiology* 50: 143-148.
- Souza, S.C., de Vargas, L.M., Yamamoto, M.T., Lien, P., Franciosa, M.D., Moss, L.G., and Greenberg, A.S. (1998). Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor α to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24665-24669.

- Stich, V., de Glisezinski, I., Berlan, M., Bulow, J., Galitzky, J., Harant, H., Suljkovicova, H., Lafontan, M., Riviere, D., and Crampes, F. (2000). Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology* 88: 1277-1283.
- Stich, V., de Glisezinski, I., Galitzky, J., Hejnova, J., Crampes, F., Riviere, D., and Berlan, M. (1999a). Endurance training increases the beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue in obese subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 23: 374-381.
- Stich, V., de Glisezinski, I., Crampes, F., Suljkovicova, H., Galitzky, J., Riviere, D., Hejnova, J., Lafontan, M., and Berlan, M. (1999b). Activation of antilipolytic α_2 -adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. *American Journal of Physiology* 277: R1076-R1083.
- Stralfors, P., and Honnor, R.C. (1989). Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. *European Journal of Biochemistry* 182: 379-385.
- Stralfors, P., Olsson, H., and Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase. In *The enzymes* (Krebs, E.G. & Boyer, P.D., eds) vol. 18, pp. 147-177, Academic Press, Orlando.
- Stralfors, P., Bjorgell, P., and Belfrage, P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: Identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 3317-3321.
- Stralfors, P., and Belfrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 258: 15146-15152.
- Souza, S.C., de Vargas, L.M., Yamamoto, M.T., Lien, P., Franciosa, M.D., Moss, L.G., and Greenberg, A.S. (1998). Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24665-24669.
- Toode, K., Viru, A., and Eller, A. (1993). Lipolytic actions of hormones on adipocytes in exercise-trained organisms. *Jpn Journal of Physiology* 43: 253-258.
- Turcotte, L.P. (1999). Role of fats in exercise. Types and quality. *Clinical Sports Medicine* 18: 485-498.
- van Aggel-Leijssen, D.P., Saris, W.H., Homan, M., and van Baak, M.A. (2001). The effect of exercise training on beta-adrenergic stimulation of fat metabolism in obese men. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25:16-23.

- Wahrenberg, H., Bolinder, J., and Arner, P. (1991). Adrenergic regulation of lipolysis in human fat cells during exercise. *European Journal of Clinical Investigation* 21: 534-541.
- Wahrenberg, H., Engfeldt, P., Bolinder, J., Arner, P. (1987). Acute adaptation in adrenergic control of lipolysis during physical exercise in humans. *American Journal of Physiology* 253: E383-E390.
- Wolfe, R.R., Klein, S., Carraro, F., and Weber, J.M. (1990). Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *American Journal of Physiology* 258: E382-E389.
- Yeaman, S.J., and Smith, G.M. (1994). The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Advances in Enzyme Regulation* 34: 355-370.
- Zierath, J.R., Livingston, J.N., Thörne, A., Bolinder, J., Reynisdottir, S., Lönnqvist, F., and Arner, P. (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* 41: 1343-1354.