

PENINGKATAN KADAR LEPTIN DENGAN PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) MELALUI AKTIVASI *PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR gamma* (PPAR γ) PADA KULTUR PREADIPOSIT KELINCI

INCREASING LEPTIN LEVELS WITH PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) BY *PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR gamma* (PPAR γ) ACTIVATION ON RABBIT PREADIPOCYTE CULTURE

Muhammad Rasjad Indra
Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Unibraw Malang

ABSTRACT

For the past three decades, PUFA has been recognized as important energy sources and cell membrane component. PUFA also plays key roles in many cellular events such as gene regulation and leptin activation. The role of this fatty acid is still unknown especially *in vitro*. The purpose of this research was to examine the effect of PUFA of the corn oil in increasing leptin concentration by PPAR γ activation. Preadipocyte culture from rabbit was incubated by PUFA of corn oil. PUFA have been given on doses 0, 4, 8 and 16 μ M. PPAR γ protein and leptin levels were analyzed by ELISA. PPAR γ expression was analyzed by immunocytochemistry. The research result showed that every treatment has increased PPAR γ levels inconsistently. PPAR γ concentration increased significantly on 4 μ M PUFA treatment compared to control, 8 and 16 μ M PUFA of corn oil. But there were no significant difference between control and 8 μ M PUFA treatments. Leptin levels increased significantly between administration on 4 μ M PUFA and 16 μ M PUFA of corn oil administration. Leptin levels was not significantly different between control and 8 μ M PUFA. There was also strong correlation between PPAR γ expression and leptin levels. PUFA of corn oil increases leptin levels through PPAR γ activation.

Key words: PUFA, preadipocyte, leptin, PPAR γ

PENDAHULUAN

Polyunsaturated fatty acid (PUFA) ω -3 dan ω -6 (linoleat dan linolenat) merupakan asam lemak esensial yang tidak dapat disintesis oleh mamalia dan senyawa ini diperoleh melalui sumber makanan. Salah satu sumber PUFA adalah minyak jagung. Diet PUFA dapat mengurangi akumulasi trigliserid di jaringan, sedangkan rendahnya lipid dalam jaringan berhubungan dengan penurunan risiko sindroma metabolik (1). PUFA berperan dalam pembentukan struktur membran sel, metabolisme sel sel, dan merupakan ligan natural *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR) tetapi peranan asam lemak ini masih belum banyak diketahui terutama secara *in vitro* (2). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian agar pemahaman tentang mekanisme PUFA dalam sinyal transduksi lebih jelas.

PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated receptors*) merupakan reseptor inti yang diaktifkan oleh ligan natural, antara lain asam lemak dan eicosanoid (lektotrien, prostaglandin) dan beberapa agonist farmakologis seperti pioglitazone. Setelah berikatan dengan *peroxisome prolife-*

rator response elements (PPRE), PPAR yang teraktifasi selanjutnya akan meregulasi transkripsi beberapa gen yang antara lain mengontrol metabolisme sel lipid bahkan juga glukosa serta siklus sel dan respon imun. Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa PPAR γ meningkatkan ekspresi leptin di adiposit.

Leptin adalah hormon yang disintesis terutama oleh adiposit dan memiliki peran penting pada homeostasis energi. Mekanisme dasar pengendalian ekspresi gen leptin di jaringan lemak putih maupun lemak coklat masih belum diketahui secara jelas.

Umpan balik ekspresi gen leptin di jaringan lemak coklat terutama melalui mediasi efek leptin pada sistem saraf simpatis oleh sistem saraf pusat, sedangkan pengendalian ekspresi leptin pada jaringan lemak putih nampaknya melalui mekanisme yang tidak tergantung pada aktifitas sistem saraf simpatis.

Pengendalian kadar leptin oleh diet sudah dibuktikan oleh beberapa peneliti. Restriksi maupun pengembalian diet dapat mempengaruhi kadar leptin plasma dan ekspresi gen *ob* pada rodensia maupun manusia (3,4). Dalam hal ini, restriksi menurunkan sedangkan *refeeding* meningkatkan kadar leptin kembali (5,6). Sinyal metabolik yang mengubah fungsi adiposit termasuk sintesis leptin dan reseptornya masih belum banyak diketahui. Sementara *Peroxisome Proliferators Activated Receptor- γ* (PPAR γ) yang salah satu

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXI, No.2, Agustus 2005
Korespondensi: M. Rasjad Indra; Lab. Ilmu Faal FK Unibraw
Malang; Telp. (0341) 580993 ext 115
Email: rasjad@fk.unibraw.ac.id

ligand alaminya adalah PUFA diketahui merupakan regulator utama dalam diferensiasi dan fungsi adiposit. Dengan demikian perlu diteliti seberapa jauh kandungan PUFA dalam minyak jagung dapat meningkatkan sintesis leptin adiposit secara *in vitro* untuk mendasari penatalaksanaan obesitas dan sindroma metabolik melalui diet.

METODE

Isolasi Preadiposit dan Kultur Adiposit

Setelah dipelihara 2 minggu, kelinci dibunuh dan diambil jaringan lemak omentum untuk dilakukan kultur sel adiposit. Jaringan lemak dicuci dengan PBS *free* Ca sebanyak 3 kali. Jaringan dicacah sampai 1 mm² dalam media *serum free*. Sel diisolasi dengan 0,02 g/mL *Collagenase type I* (Gibco BRL) dalam media *serum free*. Suspensi sel diinkubasi 37 °C selama 3 jam. Suspensi sel disaring dengan filter nylon 250 µm. Filtrat diputar 2000 rpm selama 7 menit. Pelet yang mengandung *stromal vascular cell* diresuspensi dengan media *serum free*. Sel diputar 2000 rpm selama 5 menit. Pelet diresuspensi dalam media kultur (DMEM/F12 Ham (1:1), 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES, 50 mg/mL Penstrep, 10 µM Natrium Bicarbonat, 10 % FBS) (7).

Isolasi Protein Preadiposit Kelinci

Isolasi protein preadiposit kelinci bertujuan untuk mendapatkan protein yang digunakan sebagai sampel dalam mengukur kadar protein PPAR γ . Sel kultur preadiposit kelinci dilisis dengan bufer lisis yang mengandung 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM (*p*-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride hydrochloride (PMSF) dan 1 % Nonidet P-40. Sel diinkubasi dalam 10 menit, suhu 37°C selama 10 menit. Sel diputar 12000 rpm 4 °C selama 5 menit. Pelet dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak dua kali. Pelet diresuspensi dengan PBS dan disimpan dalam freezer -30 °C (2)

Pengukuran Kadar protein PPAR γ dan Leptin dengan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Leptin dalam *coating buffer* (1:9) didapatkan dengan melarutkannya dalam TBS sampai 1 ml hingga memiliki kadar 10 µg/ml dan ditambahkan *coating buffer* hingga 10 ml. Antigen di-*coating* pada plate ELISA selama semalam pada suhu 4°C. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. Diblok dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PBS) 50 µl / well. Diinkubasi selama 2 jam suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit.

Antibodi primer (50 µl/well) dimasukkan kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. *Coating* antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG AP Conjugated* (1:2500) dalam TBS melalui inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS-Tween 3x3 menit. Ditambahkan substrat pNPP dalam dietanolamin 10% (50 µl / well). Diinkubasi 30 menit, suhu

ruang (tidak dicuci, yang dibaca adalah pNPP yang terikat Ab sekunder). Ditambahkan NaOH 3M (50 µl/ well) sebagai stop reaction. Setelah 15 menit, dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda=405$ nm.

Eksresi PPAR γ dengan imunositokimia

Untuk melihat peningkatan ekspresi protein PPAR γ dan leptin digunakan metode *Double Staining Immunocytochemistry* (Dako – USA; Santa Cruz – USA). Setelah selesai diperlakukan, kultur adiposit dicuci dengan HEPES buffer (Sigma-USA) dan difiksasi menggunakan 4% paraformaldehyde selama 30 menit. Dibilas dengan PBS pH 7,4 dan diinkubasi menggunakan 5% *blocking serum* (SantaCruz) yang mengandung 0,25% triton X-100 selama 1 jam dan dibilas dengan PBS pH 7,4. Setelah itu diinkubasi dengan monoclonal anti PPAR γ (SantaCruz) selama 1 jam, dibilas dengan PBS pH 7,4. Selanjutnya diinkubasi pada 3% H₂O₂ (Sigma-USA) selama 10 menit dan dibilas dengan PBS pH 7,4. Kemudian diinkubasi dengan *link 2nd antibody polimer labelled with SA-HRP* (Dako-USA) dan dibilas dengan PBS pH 7,4, diaplikasikan DAB (SantaCruz) selama 3 menit dan dicuci dengan dH₂O. Diinkubasi menggunakan *double staining blocking reagent* (Dako-USA) selama 30 menit dan diinkubasi menggunakan monoklonal anti Leptin (SantaCruz) selama 2 jam dan dibilas dengan PBS pH 7,4. Terakhir diinkubasi pada *2nd antibody polymer labelled with AP* (Dako-USA) selama 1 jam dan dibilas dengan PBS pH 7,4 dan diaplikasikan fast red selama 10 menit. Dibilas dengan dH₂O dan *counterstaining* menggunakan mayer hematoxillen.

HASIL PENELITIAN

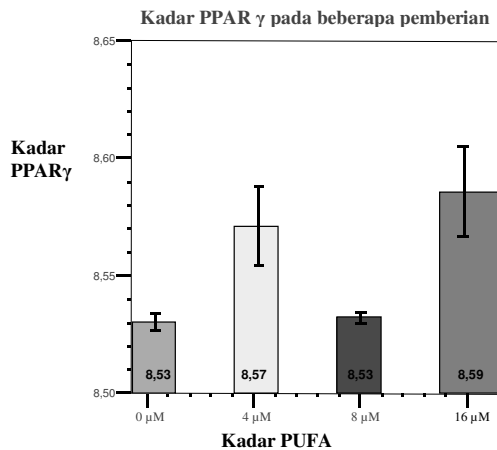
Polyunsaturated Fatty acid merupakan ligan alami PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). Pada penelitian ini menggunakan PUFA (*Polyunsaturated Fatty acid*) dalam minyak jagung sebagai perlakuan kultur preadiposit kelinci untuk mengamati kadar protein PPAR γ dan kadar leptin. Kadar protein PPAR γ dan leptin ditentukan dengan ELISA dan pengamatan keberadaan leptin dengan Imunositokimia. Kadar PUFA yang digunakan adalah 0 (kontrol), 4 µM, 8 µM dan 16µM. Hasil penelitian dapat ditunjukkan sebagai berikut :

Pengaruh PUFA dalam Minyak Jagung terhadap Kadar protein PPAR γ

Kadar protein PPAR γ pada preadiposit kelinci setelah pemberian PUFA selama 24 jam menunjukkan peningkatan, tetapi peningkatan kadar PPAR γ tidak konsisten pada setiap perlakuan. Kadar protein PPAR preadiposit kelinci meningkat setelah preadiposit dipapar dengan 4 µM PUFA tetapi menurun pada perlakuan 8 µM dan kemudian diikuti peningkatan kadar PPAR γ pada perlakuan 16 µM PUFA.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kadar PPAR γ pada perlakuan 4 μ M meningkat secara nyata dibandingkan dengan kontrol, 8 μ M maupun 16 μ M PUFA, tetapi tidak didapatkan beda kadar PPAR γ bermakna antara kontrol dengan perlakuan 8 μ M PUFA seperti terlihat pada Tabel 1 ($p \leq 0,05$)

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 dapat disimpulkan bahwa peningkatan PUFA dapat meningkatkan kadar protein PPAR γ preadiposit kelinci meskipun tidak konsisten.



Gambar 1. Kadar PPAR γ pada masing-masing perlakuan setelah preadiposit kelinci dipapar dengan PUFA dalam minyak jagung ($p \leq 0,05$).

Tabel 1. Rerata kadar PPAR γ pada kultur preadiposit kelinci setelah dipapar PUFA selama 24 jam ($p \leq 0,05$)

Perlakuan	N	Mean $\pm$ SD ($p \leq 0,05$)
Kontrol	24	8.531 $\pm$ 0.007 ^a
4 μ M PUFA	24	8.571 $\pm$ 0.034 ^b
8 μ M PUFA	22	8.532 $\pm$ 0.005 ^a
16 μ M PUFA	24	8.586 $\pm$ 0.038 ^b

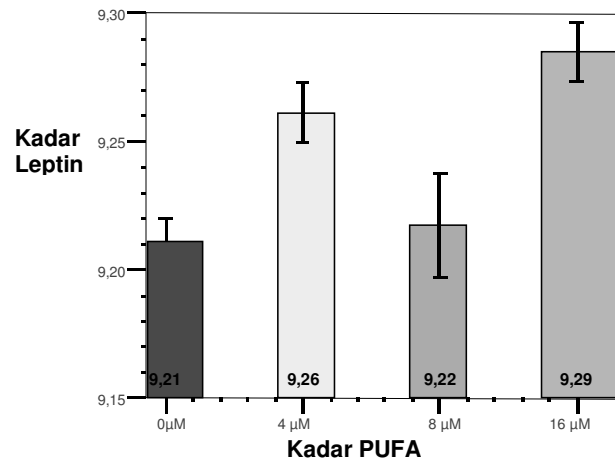
Keterangan:

Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan berbeda signifikan.

Pengaruh PUFA dalam Minyak Jagung terhadap Kadar Leptin

Hasil pengukuran kadar leptin menunjukkan fenomena yang sama dengan kadar protein PPAR γ . Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa kadar leptin pada perlakuan 4 μ M PUFA meningkat tetapi kadar leptin menurun pada perlakuan 8 μ M. Kadar leptin meningkat lagi setelah perlakuan dengan konsentrasi 16 μ M PUFA. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kadar leptin pada perlakuan 4 μ M berbeda secara nyata dibandingkan dengan kontrol, 8 μ M

dan 16 μ M PUFA. Kadar leptin pada kontrol tidak berbeda nyata dengan perlakuan 8 μ M PUFA sedangkan perlakuan 4 μ M meningkat secara nyata dibandingkan dengan perlakuan 16 μ M PUFA seperti terlihat pada Tabel 2 ($p \leq 0,05$).



Gambar 2. Kadar Leptin pada masing-masing perlakuan setelah preadiposit kelinci diinkubasi dengan PUFA dalam minyak jagung ($p \leq 0,05$).

Tabel 2. Rerata kadar Leptin pada kultur preadiposit kelinci setelah dipapar PUFA selama 24 jam

Perlakuan	N	Mean $\pm$ SD
Kontrol	24	9.211 $\pm$ 0.018 ^a
4 μ M PUFA	24	9.261 $\pm$ 0.024 ^b
8 μ M PUFA	22	9.209 $\pm$ 0.010 ^a
16 μ M PUFA	24	9.289 $\pm$ 0.023 ^c

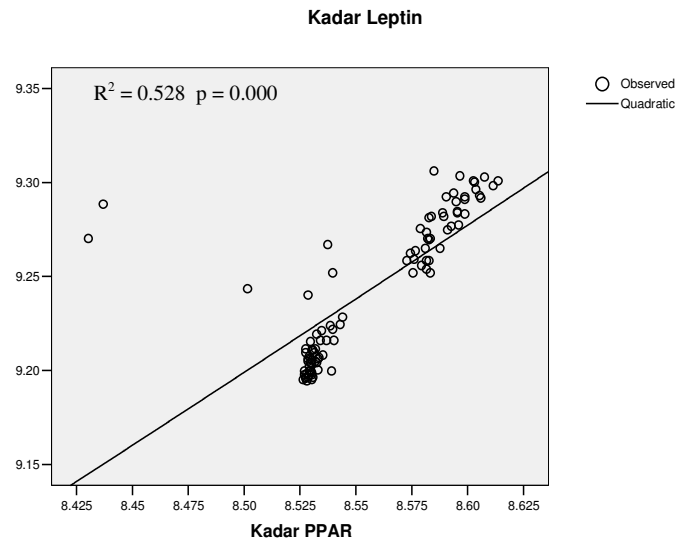
Keterangan.

Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan berbeda signifikan.

Hasil pengukuran kadar leptin media sel kultur setelah dipapar PUFA menunjukkan bahwa kadar leptin berhubungan dengan peningkatan konsentrasi PUFA. Fenomena perubahan kadar leptin media sel kultur preadiposit ini berhubungan dengan perubahan kadar PPAR γ .

Interaksi antara Kadar Protein PPAR γ dengan Kadar Leptin

Pada Gambar 3 dapat dilihat hubungan antara kadar PPAR γ dengan leptin pada preadiposit kelinci setelah diinkubasi dengan PUFA. Persamaan regresi menunjukkan bahwa perubahan kadar PPAR γ diikuti oleh perubahan kadar leptin dalam media sel dengan koefisien regresi dan korelasi yang cukup kuat.

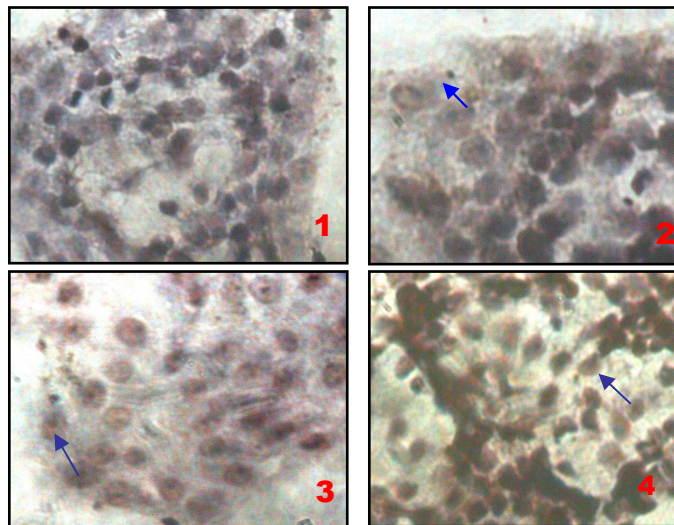


Gambar 3. Hubungan antara PPAR γ dan Leptin dengan persamaan kuadrat.

Keberadaan PPAR γ pada Preadiposit Kelinci pada masing – masing perlakuan

Keberadaan PPAR γ pada preadiposit kelinci pada masing-masing perlakuan dianalisis dengan pengecatan imunositokimia. Hasil analisis dengan *Corel Draw versi 11* menunjukkan bahwa PPAR γ meningkat pada perlakuan 4 μ M PUFA ($151,79 \pm 12,58$) dibandingkan kontrol ($164,29 \pm 14,79$) tetapi menurun pada perlakuan 8 μ M PUFA ($161,34 \pm 14,03$). Pada perlakuan 16 μ M PUFA ($128,27 \pm 13,47$) meningkat secara nyata dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan 4 μ M PUFA.

Pada Gambar 4 dan Tabel 3 menunjukkan bahwa keberadaan PPAR γ di preadiposit kelinci berhubungan dengan kadar PPAR γ yang diukur dengan ELISA. Bertolak dari hasil kedua pengukuran tersebut (imunositokimia dan ELISA) dapat dikonfirmasi bahwa terjadi perubahan ekspresi PPAR γ di bawah pengaruh PUFA minyak jagung.



Gambar 4. Hasil identifikasi PPAR γ pada preadiposit kelinci setelah diinkubasi dengan PUFA dalam minyak jagung dengan Imunositokimia 1) kontrol; 2) 4 μ M PUFA; 3) 8 μ M PUFA; 4) 16 μ M PUFA (200 x) Tanda panah menunjukkan lokasi PPAR γ

DISKUSI

Penemuan PPAR dan asam lemak sebagai ligan beberapa tahun lalu telah berhasil mengungkap mekanisme lipid sebagai modulator ekspresi gen. Temuan tersebut disusul dengan kumpulan bukti-bukti bahwa PPAR berperan dalam jaringan pengendali penegakan homeostasis energi dalam organisme. Dengan dibuktikannya bahwa mediator lipid, misalnya eikosanoid (lektrien dan prostaglandin) adalah ligan natural PPAR, makin membuka peluang pelacakan determinan-determinan dalam novel keseimbangan energi serta fungsi PPAR dikaitkan dengan homeostasis energi, pengendalian siklus sel, inflamasi dan respons imun. Dengan demikian, PPAR merupakan target intervensi terapeutik yang menjanjikan melalui pengembangan agonis dan antagonis PPAR dalam penatalaksanaan penyakit, misalnya obesitas dan diabetes mellitus, aterosklerosis, inflamasi kronis, dan karsinogenesis (8).

Peran kunci PPAR γ dalam adipogenesis dan sebagai reseptor obat penambah sensitifitas insulin merupakan pendorong dilakukannya kajian regulasi ekspresi reseptor ini dikaitkan dengan nutrisi, obesitas, dan diabetes. Kadar PPAR γ adiposit meningkat secara bermakna pada tikus yang mendapat pakan tinggi lemak dibanding tinggi karbohidrat (6). Sebaliknya, puasa 48 jam menurunkan ekspresi PPAR γ di jaringan lemak subkutan maupun visceral (3).

Tabel 3. Distribusi PPAR γ dari hasil analisis dengan Corel Draw versi 11

Perlakuan	Mean $\pm$ SD
Kontrol	164,29 $\pm$ 14,79 ^a
4 μ M PUFA	151,79 $\pm$ 12,58 ^b
8 μ M PUFA	161,34 $\pm$ 14,03 ^a
16 μ M PUFA	128,27 $\pm$ 13,47 ^b

Keterangan.

Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata sedangkan notasi yang berbeda menunjukkan berbeda signifikan ($p \leq 0.05$).

Penelitian ekspresi PPAR γ pada lemak subkutan pada 14 subyek berat badan ideal dan obese menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA PPAR γ 2 pada individu obese, demikian juga pada rasio PPAR γ 2 / γ 1 terhadap massa lemak tubuh (BMI) (4,5). Diet rendah kalori pada individu obese juga menyebabkan penurunan (*down-regulation*) ekspresi mRNA PPAR γ 2 di jaringan lemaknya.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa asam linoleat menurunkan massa jaringan lemak, memicu resistensi insulin dan lipodistrofi (5,7,9), namun demikian, mekanisme yang mendasari efek tersebut masih belum jelas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam linoleat terkonjugasi (*Conjugated Linoleic Acid*, (CLA)) menurunkan kadar trigliserida dalam kultur sel stroma vaskuler yang mengandung adiposit manusia yang terdeferensiasi melalui jalur

sinyal transduksi MAPK / ERK-dependent transcriptional yang mengendalikan ekspresi gen yang mengatur ambilan glukosa dan asam lemak serta metabolisme sel (10).

Pengendalian kadar leptin oleh diet sudah dibuktikan oleh beberapa peneliti. Peningkatan kadar leptin pada diet tinggi lemak sudah diketahui dari beberapa model penelitian, antara lain pada tikus Sprague-Dawley (11). Akan tetapi efek dari tipe lemak dalam diet terhadap ekspresi leptin masih belum diketahui. Penelitian untuk mengungkap pengendalian jangka panjang leptin plasma oleh diet asam lemak tak jenuh (PUFA) pada tikus resisten insulin akibat pemberian pakan sukrosa jangka panjang telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Penurunan kembali kadar leptin setelah pemberian minyak ikan selama 6 minggu setelah sempat meningkat pada pemberian 3 minggu pada tikus resisten insulin akibat diet sukrosa menunjukkan adanya inkonsistensi efek PUFA dalam minyak ikan setelah pemberian jangka panjang (12).

Peningkatan kadar PPAR γ di adiposit setelah pemberian PUFA dari minyak jagung menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi PPAR γ yang diinduksi oleh kandungan PUFA pada minyak jagung. Temuan ini sesuai dengan peran PUFA sebagai ligand PPAR γ . Di samping itu, pemberian PUFA pada penelitian ini juga menyebabkan peningkatan kadar Leptin di medium kultur. Hal ini menunjukkan adanya induksi PUFA terhadap ekspresi leptin di adiposit. Selanjutnya asosiasi yang kuat dan konsisten antara kadar PPAR γ dan leptin pada penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi leptin di adiposit terjadi melalui rantai sinyal transduksi melibatkan PPAR γ .

Peningkatan PPAR γ dan leptin dibawah pengaruh PUFA minyak jagung pada penelitian ini ternyata tidak konsisten, dimana terjadi penurunan pada pemberian PUFA 8 μ M yang kemudian meningkat lagi pada pemberian 16 μ M. Inkonsistensi tersebut memiliki kemiripan dengan hasil penelitian yang melaporkan penurunan respons ekspresi leptin setelah pemberian minyak ikan selama 6 minggu. Walaupun penelitian ini menggunakan minyak jagung sebagai sumber PUFA, tetapi kemiripan tersebut kemungkinan terjadi oleh sebab ketidak samaan alur sinyal transduksi antara jenis PUFA yang terkandung dalam minyak jagung maupun minyak ikan dalam mempengaruhi ekspresi PPAR γ maupun leptin adiposit (11,13).

Adanya peran PPAR γ dalam menstimulasi ekspresi leptin yang ditunjukkan pada penelitian ini lebih mengkonfirmasi hasil penelitian terdahulu. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa PUFA dalam minyak jagung dapat meningkatkan kadar leptin melalui peningkatan PPAR γ . Temuan ini dapat digunakan untuk mendasari peran PUFA sebagai nutrisi asam lemak dalam menghambat atau mengurangi obesitas. Hal ini didasarkan atas peran leptin sebagai umpan balik negatif ke sistem syaraf pusat melalui

penghambatan pusat lapar, meningkatkan laju metabolisme sel, dan meningkatkan penggunaan energi.

KESIMPULAN

Polyunsaturated fatty acid (PUFA) dalam minyak jagung dapat meningkatkan kadar leptin melalui aktivasi PPAR γ .

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Steven DC. *Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome*. American Society for Nutritional Sciences 2001.
2. Yasuki K, Satoshi M, Keiji E, Hiroshi S, and Tohru K. *Regulation of Insulin-like Growth Factor-I Expression in Mouse Preadipocyte Ob1771 Cells*. 1996; 271(17): 9883-9886
3. Maffei M, Halaas J and Ravussin E. *Leptin Levels in Humans and Rodent: Measurement of Plasma Leptin and ob RNA in Obese and Weight Reduced Subjects*. Nat. Med 1995; 1:1155-1161
4. MacDouglas OA, Hwang CS and Fan H. *Regulated Expression of The Obese Gene Product (Leptin) in White Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes*. USA: Proc. Natl. Acad. Sci; 1995; 92: 9034-9037.
5. Caro J, Sinha M and Kolaczynski J. *Leptin The Tale of an Obesity Gene*. Diabetes 1996; 45:1455-1462
6. Kolaczynski H, Ogawa Y and Hosoda K. *Augmented Expression of The Obese Gene in The Adipose Tissue From Rat Fed High-Fat Diet*. Biophys. Res. Commun. Biochem 2001; 216: 355-358
7. Fried S K and Moussa N M. *Culture of adipose Tissue and Isolated Adipocytes*. Methods in Molecular Biology Adipose Tissue Protocols. Alhaud G (Ed.)Totowa, New Jersey: Human Press; 2001; 197-212.
8. Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gagliardino JJ and Gomez-Dumm CL. *Long Term Administration of Sucrose-Rich Diet to Normal Rats: Relationship between Metabolic and Hormonal Profiles and Morphological Changes in The Endocrine Pancreas*. Metabolism 2002; 45: 1527-1532
9. Clarke SD. *Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: a Mechanism to Improve Energy Balance and Insulin Resistance*. Br. J. Nutr 2000; 83: S59-S66
10. Brown V. *Clinical Interest of PPARs Ligands. Particular Benefit in Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome* Diabetes Metab. 2004; 30; 7-12
11. Bidlingmaler M and Mathias T. *Immunoassays Measurement of Leptin in Molecular Biology Adipose Tissue Protocols*. Alhaud G (Ed.)Totowa, New Jersey: Human Press; 2001; 323-330.
12. Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo, Quignard-Boulange A, Slama G and Rizkalla SW. *Regulation of Glucose Transport and Transporter-4 (GLUT-4) in Muscle and Adipocyte of Sucrose-Fed Rats: Effects of N3 Poly And Monounsaturated Fatty Acids*. Horm. Metab. Res. (in press) 2002.
13. Zuo X, Wu Y, Morris JS, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Fischer SM, Lippman SM, and Shureiqi I. *Oxidative Metabolism of Linoleic Acid Modulates PPAR-Beta / Delta Suppression of PPAR-Gamma Activity*. Oncogene advance online publication, 14 November 2005.

