

Human Adipose Tissue :

I. การศึกษาเนื้อเยื่อไขมันในหลอดทดลอง

สมพงษ์ จินายน*

เนื้อเยื่อไขมัน (*adipose tissue*) เป็นที่สะสมพลังงานเพื่อใช้สำหรับเมตาบอลิซึมของเซลล์ในร่างกาย เซลล์ไขมัน (*adipose cells* หรือ *fat cells* หรือ *adipocytes*) มีหน้าที่สำคัญ 2 อย่างคือ *esterification function* และ *lipolytic function* หน้าที่อย่างแรกได้แก่การสร้างสาร *Triglycerides (TG)* แล้วเก็บสะสมไว้ในเซลล์ ส่วน *lipolytic function* คือการสลายตัว (*hydrolysis*) ของ *TG* ในเซลล์เกิดเป็นสาร *glycerol* และ *free fatty acids (FFA)* สารชนิดหลังบางส่วนเข้าสู่กระแสโลหิตผ่านไปทั่วและอวัยวะอื่น (เช่น กล้ามเนื้อ) ที่ซึ่งมีการ *oxidation* ของ *FFA* ให้พลังงานสำหรับการทำหน้าที่ของเซลล์ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ในคนปกติการดำเนินหน้าที่แต่ละอย่างของเซลล์ไขมันถูกควบคุมโดยองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ความต้องการแคลอรีของร่างกาย ปริมาณและชนิดของอาหารที่บริโภค ฤทธิ์ของฮอร์โมน เช่น *insulin* และ *catecholamines* ที่มีต่อเนื้อเยื่อไขมัน และการทำงานของ *enzyme* ในเซลล์ไขมัน

ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่ของเนื้อเยื่อไขมันเองและความสัมพันธ์กับการทำงานของอวัยวะอื่นในร่างกายนั้น ได้มาจากการศึกษาชิ้นเนื้อเยื่อชนิดนี้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ทั้งนี้

โดยอาศัยสมบัติที่ว่าเมื่อตัดส่วนของเนื้อเยื่อไขมันออกจากร่างกายของสัตว์ทดลองหรือคนแล้วนำมาศึกษาทันทีในภาวะแวดล้อมที่เตรียมให้คล้ายกันกับในร่างกาย เช่นการใช้

* ภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูติร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

incubation medium ที่เป็น physiological buffer และมีกลูโคสในปริมาณเท่ากับที่พบในกระแสเลือด การควบคุมอุณหภูมิระหว่างการทดลองให้เท่ากับของร่างกาย การระวังไม่ให้ชั้นเนื้อเยื่อไขมันได้รับความกระทบกระเทือนมาก ชั้นเนื้อเยื่อจะมีชีวิตและดำเนินหน้าที่อยู่ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง (3-4 ชม.) จึงทำให้สามารถศึกษา biological activities ของเซลล์ไขมันได้ ผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลองนี้อาจแสดงถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย (invivo) ขณะที่เนื้อเยื่อถูกแบ่งออกมาด้วยวิธีนี้ทำให้ทราบถึงการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายทั้งในภาวะปกติและพยาธิสภาพ ความผิดปกติในเมตาบอลิซึมของเนื้อเยื่อชนิดนี้ ที่พบในภาวะที่มีไขมันในเลือดสูง (hypertriglyceridaemia), การมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (obesity) และโรคเบาหวาน อาจจะเป็นเพียงปรากฏการณ์ที่พบร่วมเป็นสาเหตุหรือผลของภาวะและโรคดังกล่าว

ในระยะของการศึกษาประมาณ 30 ปีมาแล้วและต่อเนื่องมาจนถึงในปัจจุบัน นักค้นคว้าได้ใช้เนื้อเยื่อไขมันเช่น epididymal fat pads, perirenal fats และ parametrial fats ที่ได้รับจากสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนูขาว (wistar rats และ Sprague - Dawley rats),

หนูตะเภา, และ hamsters หรือใช้ subcutaneous fat จากสุนัข Rodbell (66,67) ได้รายงานว่ามีมวลวัตถุของเนื้อเยื่อไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน และส่วนน้อยเป็นพวก stromal vascular structures ซึ่งได้แก่ blood vessels, fibroblasts, mast cells, macrophages และ nerve fibers เซลล์ไขมันมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ปริมาตรส่วนใหญ่ (99%) เป็น fat droplet ซึ่งประกอบด้วย TG ที่สะสมไว้ (43) มี nucleus อยู่ใน cytoplasm ซึ่งเป็นส่วนแคบอยู่รอบ fat droplet ขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ไขมันเกิดขึ้นภายใน cytoplasm (34) เช่นการสร้าง TG (esterification) และการสลายตัวของ TG (lipolysis) ดังแสดงในรูปที่ 1 เซลล์ไขมันสร้าง TG จากสาร alpha - glycerophosphate และ fatty acyl Co A โดยปกติ TG ที่สร้างขึ้นใหม่อยู่ใน pool ขนาดเล็กใน cytoplasm และอยู่ในภาวะสมดุลกับ TG บนผิวของ fat droplet ในโมเลกุลของ TG ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า triglyceride - glycerol และ triglyceride fatty ส่วนแรกได้จากสาร α -glycerophosphate ซึ่งส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จากกลูโคส (51) ส่วน triglyceride - fatty acids ได้มาจากหลายแหล่งหรือถูกสร้างจากสารอื่น เช่น

จากการ lipolysis ของ TG ในเซลล์ไขมันได้ glycerol และ FFA สารชนิดหลังที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งจะถูกใช้ไปในการ re-esterification และมีบางส่วนถูกปล่อยออกจากเซลล์ (FFA release) เข้าสู่กระแสโลหิตและไปยังอวัยวะอื่น นอกจากนั้นเซลล์ไขมันสามารถรับ FFA จาก plasma (FFA uptake) หรือสังเคราะห์ fatty acids ขึ้นเอง (de novo synthesis) จากสาร acetate ซึ่งบางส่วนได้มาจากเมตาบอลิซึมของกลูโคส fatty acids เหล่านี้ถูกเปลี่ยนเป็น fatty acyl CoA และรวมกับ α -glycerophosphate เกิดเป็น triglycerides

วิธีการนำเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายนอกมาศึกษาในหลอดทดลอง

จากการค้นคว้าต่อมา ได้มีผู้รายงานว่ามีเมตาบอลิซึมในเนื้อเยื่อไขมันแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสัตว์ทดลอง (76) และพบความแตกต่างกันระหว่างการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันของหนูและของนกตัว (18,32,38,42,50) ดังนั้นผลที่ได้จากการใช้สัตว์ทดลองเป็นแบบอย่างสำหรับศึกษาจึงไม่อาจอธิบายถึงหน้าที่ทุกอย่าง รวมทั้งปฏิกิริยาการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เกิดขึ้นในร่างกายของคนได้อย่างแท้จริง การศึกษาโดยใช้เนื้อเยื่อไขมันจากคนเริ่มขึ้นเมื่อประมาณ 17 ปี มา

แล้ว โดยได้ชิ้นเนื้อเยื่อมาจาก 3 วิธีคือ วิธีแรกจากผู้ป่วยขณะที่ได้รับการผ่าตัดใหญ่โดยใช้ยาสลบทั่วไป เช่น ผ่าตัดหน้าท้องเพื่อการรักษาโรคของอวัยวะในช่องท้อง หรือการผ่าตัดบริเวณเต้านม (ทั้งนี้ได้รับความช่วยเหลือจากศัลยแพทย์) ชิ้นเนื้อเยื่อไขมันที่นำมาศึกษาได้แก่ abdominal subcutaneous fat หรือ omental fat (20,24,28,30,36,50,54,) หรือ mammary tissue (50) ชิ้นเนื้อดังกล่าวมีน้ำหนัก (wet weight) ประมาณ 5 g ถึงแม้ว่าวิธีนี้ได้เลือกศึกษาในผู้ป่วยที่ไม่มีความผิดปกติด้วยโรคทางเมตาบอลิซึม และไม่ป่วยด้วยโรคเรื้อรังก็ตาม แต่การศึกษาก็มีขอบเขตจำกัด และไม่อาจกล่าวได้ว่าผลของการทดลองนั้นแสดงถึงหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อไขมันของคนที่มีสุขภาพสมบูรณ์ วิธีที่สองคือการทำ surgical biopsy โดยใช้ยาระงับความรู้สึกเฉพาะที่เพื่อตัดส่วน subcutaneous fat (น้ำหนัก 1-3 g) จากบริเวณหลายแห่งของร่างกาย เช่นที่บริเวณหน้าท้อง ตะโพกและหน้าขา (4,14,16,17,20,59) วิธีนี้ทำให้สามารถศึกษาได้ทั้งในคนที่มีความผิดปกติ คนอ้วนและผู้ป่วยด้วยโรคต่างๆ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ต้องการศึกษา biological activities ของเนื้อเยื่อไขมันซ้ำหลายครั้งในบุคคลเดียวกันก็ไม่อาจใช้วิธีที่สองได้ เพราะ

การสังเกตความเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่อเนื่อง ต้องทดลองในเนื้อเยื่อไขมันที่ได้มาจากบริเวณเดียวกันในร่างกายของแต่ละบุคคล การทำ surgical biopsies ซ้ำหลายครั้งในระยะสั้นจึงเป็นการรบกวนผู้ถูกทำการทดลอง

การทำ percutaneous needle biopsy ของเนื้อเยื่อไขมันด้วยการใช้เข็มพิเศษที่แนะนำโดย Hirsch และ Goldrick (42) หรือ Diengott และ kerpel (22) จึงเหมาะสำหรับการแก้ปัญหาที่กล่าวข้างต้น (35,41,49,60,63, 69,70) และเป็นวิธีการที่ใช้เวลาน้อย ด้วยวิธีนี้จะได้อเนื้อเยื่อไขมัน ปริมาณน้อยกว่าสองวิธีแรก (คือได้ประมาณ 100-600 mg) แต่ก็เพียงพอสำหรับการศึกษาในหลอดทดลอง การทำ needle biopsy บริเวณตะโพกในคนที่มีความสุขสมบูรณ์และมีน้ำหนักตัวปกติ ทำได้ประมาณอาทิตย์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลาติดต่อกัน 3 อาทิตย์ โดยที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนอื่นเกิดขึ้น

วิธีเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อไขมัน

ชิ้นเนื้อไขมันเมื่อตัดออกจากร่างกายแล้ว ต้องรีบใส่ในภาชนะสำหรับเก็บความร้อน ซึ่งบรรจุ normal saline solution หรือ buffer solution เช่น Krebs Ringer bicarbonate หรือ phosphate solution (77) ที่มีความ

เข้มข้นของ calcium เท่ากับครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ได้แนะนำไว้ นายดิงกล่าวอันให้มีอุณหภูมิ 37°C และนำมาที่ห้องปฏิบัติการโดยเร็ว เพราะควรทำการทดลองภายใน 10-15 นาที หลังจากเนื้อเยื่อถูกตัดออกจากร่างกายในกรณีที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของเนื้อเยื่อไขมันต้องระวังการกระทบกระเทือนต่อชิ้นเนื้อ เพราะเซลล์ไขมันของคน มีเยื่อหุ้มเซลล์บางทำให้เซลล์แตกง่ายกว่าเซลล์ไขมันของสัตว์ทดลอง (32, 68) เมื่อเซลล์ไขมันในชิ้นเนื้อถูกทำลายมากในระหว่างวิธีการเตรียมการทดลองทำให้ผลของการทดลองเปลี่ยนแปลง เช่นอัตราการเปลี่ยน C^{14} -glucose ให้เป็น triglyceride-glycerol และ CO_2 ลดลง (9, 42) และฤทธิ์ของ insulin ในการเร่งปฏิกิริยาเหล่านี้ลดลงด้วย (9, 38, 42) สิ่งที่ต้องปฏิบัติคือใช้ปากคีบจับชิ้นเนื้อค่อยๆ และวางลงบนกระดาษที่ใช้สำหรับชั่งน้ำหนักสาร แล้วตัดแยกพวก connective tissue และก้อนเลือดให้เห็นติดอยู่ออกโดยใช้กรรไกรขนาดเล็กที่มีปลายแหลมและคม และแบ่งชิ้นเนื้อเยื่อไขมันออกเป็นส่วนเล็กๆ บิสีเหลี่ยมขนาดกว้างยาวประมาณ 5-8 มม. ชับน้ำให้แห้งโดยเขี่ยชิ้นเนื้อเล็กวางบนกระดาษกรอง ในกรณีที่ต้องการศึกษาหน้าที่ของชิ้นเนื้อเยื่อไขมันในสภาพที่คงรูปเดิม (intact tissue) ใช้ชิ้นเนื้อเยื่อเล็กสำหรับการ

ทดลองมีน้ำหนักประมาณ 100-300 mg และ
ซึ่งหั่นเป็นชิ้นที่แน่นอนแล้วใส่ลงใน incubation
medium (Krebs-Ringer phosphate หรือ
bicarbonate buffer pH 7.4) ซึ่งทราบปริมาตร
และบรรจุอยู่ใน siliconized flasks หรือ
polyethylene vials นอกจากนี้ยังเติมกลูโคส
ในปริมาณ 5.5 mM/L สำหรับเป็นพลังงาน
ใช้ในการดำรงชีวิตของเซลล์ไขมันนอกร่างกาย
(44) และเติม bovine serum albumin
(BSA) 40mg/ml เพื่อเป็นสารสำหรับจับพวก
FFA ที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (78) ถ้าไม่มี
BSA ใน incubation medium สาร FFA ที่
เกิดขึ้นจากการทำหน้าที่ของเซลล์จะค้างอยู่ใน
เซลล์มากเกินไป ทำให้เกิดการขัดขวางต่อการ
ทำงานเซลล์ไขมัน (73)

ถ้าต้องการศึกษาหน้าที่ของเซลล์ไขมัน
โดยตรง ต้องแยกเอาเฉพาะส่วนของเซลล์
ไขมันออกมาเพื่อการทดลอง ซึ่งเรียกว่าการ
เตรียม isolated fat cells (IFC) ซึ่งเตรียมได้
โดยวิธีของ Rodbell (66) โดยการผสมชั้น
เนื้อเยื่อไขมันที่ได้แบ่งเป็นส่วนเล็กกับ enzyme
Collagenase (ซึ่งได้มาจาก Clostridium his-
tolyticum) ด้วยปริมาณ 2-5 mg enzyme/ml
buffer/50mg ของน้ำหนักเนื้อเยื่อไขมัน แล้ว
อุ่นที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 1½-2 ชม. ใน

Dubnoff metabolic shaker ซึ่งเป็น water-
bath ที่ปรับอัตราความเร็วของการเขย่าได้
(อัตราที่ใช้คือ 60 ครั้งต่อนาที) เมื่อพวก
fibrous tissues ถูกย่อยโดย enzyme ดังกล่าว
เซลล์ไขมันที่เป็นอิสระซึ่งเบากว่าน้ำก็ลอยขึ้น
ข้างบน ส่วนเซลล์พวกอื่นตกอยู่ข้างล่าง ทำให้
แยกเซลล์ไขมันเท่านั้นมาศึกษาได้ (14, 29, 32,
36, 38, 47, 50)

การศึกษานิวคลีเอตและหน้าที่ของ enzymes
ในเนื้อเยื่อไขมันนั้นใช้ homogenate ที่ได้จาก
การบดชั้นเนื้อเยื่อหรือเซลล์ไขมัน (IFC) ด้วย
homogenizer แล้วแยกออกเป็นส่วนด้วย
refrigerated ultracentrifuge หลังการปั่น
แยกจะได้ fat cake (คือ TG ที่แตกออก
จากเซลล์) อยู่ชั้นบนสุด และชั้นส่วนอื่นของ
เซลล์ตกอยู่เป็นตะกอน มีน้ำใสอยู่ตรงกลาง
ของหลอดทดลองซึ่งเก็บไว้สำหรับศึกษาปฏิ-
กริยาของ enzymes ได้ (4, 17, 26)

การทำงานของเนื้อเยื่อไขมันของคนในหลอด ทดลอง

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro)
ในภาวะแวดล้อมที่เหมือนกับในร่างกาย (basal
conditions) พบว่าเนื้อเยื่อไขมันของคนนั้น
สามารถกระทำหน้าที่ได้หลายอย่างคือ

1. รับกลูโคส (take up) จาก incubation medium (5, 25, 61)

2. ใช้ กลูโคสเพื่อการสร้างสาร total lipids ภายในเซลล์ไขมัน จากการทดลองที่ใช้ สารกลูโคสสังเคราะห์ เช่น glucose $1-C^{14}$, glucose $-6-C^{14}$ หรือ glucose- $U-C^{14}$ (uniformly labelled glucose) พบว่า radioactive carbon (C^{14}) จากโมเลกุลกลูโคสสังเคราะห์ที่อยู่ใน TG นั้น ประมาณ 85% อยู่ในส่วนของ triglyceride-glycerol ส่วนอีก 15% พบใน triglyceride-fatty acids (27, 37, 38, 42, 74) ซึ่งส่วนใหญ่ของ C^{14} อยู่ใน palmitic acid (42) การกระจายตัวของ C^{14} ในสารไขมันต่างชนิดมีดังนี้ 74% อยู่ใน triglycerides 23% อยู่ใน diglycerides, ที่เหลือเล็กน้อยพบใน monoglyceride, phospholipids และ tissue FFA (42)

3. เปลี่ยนกลูโคสให้เป็น CO_2 โดยการ oxidation ผ่าน tricarboxylic acid cycle และ phosphogluconate-oxidative pathway (14, 20, 27, 32)

4. สร้างสาร glycogen จากกลูโคส (20, 21)

5. เปลี่ยน acetate- C^{14} ให้เป็น TG (ในภาวะที่มีกลูโคสอยู่ใน incubation medium ด้วย) โดยพบ C^{14} อยู่ในส่วน triglyceride-fatty acids ของสาร TG (28,30,42) นอกจากนี้ยังพบ C^{14} ใน CO_2 ด้วย (30)

6. ทำให้สาร pyruvate- $3-C^{14}$ เปลี่ยนเป็น CO_2 , triglyceride-glycerol และ triglyceride-fatty acids เมื่อมีกลูโคสอยู่ใน incubation medium (14, 16)

7. สามารถรับ (take up) สาร palmitic acid จาก incubation medium เข้าภายในเซลล์ไขมันและโดยการ esterification (รวมตัวกับ α -glycerphosphate) สร้างเป็น TG (2, 29, 40, 42)

8. ปล่อย FFA บางส่วนออกสู่ incubation medium ซึ่งมี albumin เป็น fatty acid acceptor (40, 42, 50)

9. ปล่อยสาร glycerol ซึ่งเกิดจากการ lipolysis ของ TG ในเซลล์ไขมันออกนอกเซลล์ จึงใช้ปริมาณของ glycerol ที่อยู่ใน incubation medium เป็นเครื่องแสดงถึงอัตราการสลายตัว (lipolytic index) ของ TG (10)

การสลายตัวของ TG ในเนื้อเยื่อไขมันทดสอบได้โดยการวัดปริมาณของ glycerol และ FFA ที่ถูกปล่อยออกมาสู่ incubation medium แต่ glycerol ที่ปล่อยออกจากชั้นเนื้อเยื่อไขมัน หรือ isolated fat cells ถือเป็นเครื่องวัดที่แน่นอนกว่าระดับของ FFA ทั้งนี้เพราะ FFA ที่เกิดขึ้นในเซลล์นั้นส่วนหนึ่งถูกใช้ไปในการสร้าง TG อีก (re-esterification) มีบางส่วนเท่านั้นที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์

นอกจากนั้นเซลล์ไขมันยังสามารถรับสารจาก medium เข้าสู่ในเซลล์ไขมันเพื่อใช้ในการสร้าง TG ได้อีกดังกล่าวแล้ว (และดูรูปที่ 1) ดังนั้นค่าของ FFA release จึงเป็นผลลัพธ์ระหว่างอัตราของการ lipolysis และ esterfication ในเนื้อเยื่อไขมัน (7)

มีผู้ศึกษาชนิดและการทำงานของ enzymes ในเนื้อเยื่อไขมันได้แก่ lipoprotein lipase (13, 24, 54, 55, 60, 62) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการขนย้าย triglycerides ที่อยู่ใน plasma lipoprotein-complexes ออกจากกระแสโลหิต โดยการที่ lipoprotein lipase ทำหน้าที่ย่อย plasma TG ออกเป็น glycerol และ FFA ปฏิกริยานี้เกิดที่บริเวณผิวหน้าของ endothelial capillaries ของเนื้อเยื่อไขมัน และเซลล์ไขมันรับ FFA ที่เกิดเข้าภายในเซลล์ สำหรับใช้ในการ oxidation หรือการสร้าง TG (64, 65) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ enzymes ที่ช่วยในการเมตาบอลิซึมของสารกลูโคส เช่น hexokinase, aldolase, hexophosphate isomerase, lactate dehydrogenase, glycerophosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase และ pyruvate kinase (17, 26) และยังได้ศึกษาหน้าที่ของ enzymes ที่สำคัญในการสังเคราะห์สาร fatty acids ขึ้นภายในเซลล์ เช่น malic

dehydrogenase, citrate cleavage enzyme และ acetyl CoA carboxylase (17, 35)

ฮอร์โมนสำคัญที่ควบคุมการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันของคน

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง TG ในเซลล์ไขมันคือ insulin จากการศึกษาในหลอดทดลองโดยการ incubation ชิ้นเนื้อเยื่อไขมันกับ insulin ในปริมาณที่เท่ากับระดับที่พบในกระแสโลหิตหลังอาหาร (0.01 -- 0.5 μ /ml) ได้มีรายงานว่าทำให้ glucose uptake ของเนื้อเยื่อไขมันเพิ่มขึ้น (25, 61) นอกจากนี้ยังเพิ่มการใช้กลูโคสเพื่อสร้าง triglyceride-glycerol, triglyceride-fatty และ CO₂ (6,27, 28,32,38,59,69) รวมทั้ง glycogen (20,21) การตอบสนองและความไวต่อฤทธิ์ของ insulin นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่นวิธีการเตรียมชิ้นเนื้อและ IFC (9,32,42,68) อายุของบุคคลที่ชิ้นเนื้อเยื่อไขมันถูกตัดออกมา (38, 68) ขนาดของเซลล์ไขมันในเนื้อเยื่อ (20, 36, 68, 69) ชนิดและปริมาณอาหารที่กินใช้บริโภคเป็นประจำก่อนที่ชิ้นเนื้อเยื่อไขมันถูกแยกออกมาเพื่อใช้ในการทดลอง (14, 21, 42, 69, 75) สำหรับปฏิกริยาขั้นแรกที่ insulin ทำให้เกิด biological effects ในเซลล์ดังกล่าวแล้ว ได้แก่ การที่ฮอร์โมนรวมตัวกับ insulin receptors ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ไขมัน (56)

สำหรับกลวิธีในการที่ TG ภายในเซลล์ สลายตัวให้เป็น FFA และ glycerol เกิดขึ้น โดยหน้าที่ของ enzyme triglyceride lipase ที่อยู่ในเซลล์ไขมัน lipolytic pathway นั้น ประกอบด้วยหลายขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 2 อธิบายโดยย่อดังนี้ catecholamines (epinephrine และ norepinephrine), glucagon และ พวก bata adrenergic stimulators (isopropyl-norepinephrine) รวมทั้ง bata adrenergic receptors ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ไขมัน (12, 18, 23, 57) ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาของ adenylyl cyclase ซึ่งเป็น membrane bound enzyme (19) และมีหน้าที่ช่วยทำให้ ATP เปลี่ยนเป็นสาร cyclic 3' 5' - AMP (1, 31) สารชนิดหลังเมื่อเพื่อปริมาณเพิ่มขึ้นจะทำให้ enzyme protein kinase มีการทำงานมากขึ้น (48) โดยทำให้เกิดการ phosphorylation ของ enzyme triglyceride lipase (7, 46, 48) (เปลี่ยนจาก inactive เป็น active form เมื่อรวมตัวกับ phosphate) ซึ่งทำให้เกิดการ hydrolysis ของ TG เป็นสาร di- และ mono-glycerides ตามลำดับและถูกย่อยต่อโดย enzyme lipase ชนิดอื่นได้เป็น glycerol และ FFA (2, 3, 7, 24, 46) การศึกษาในหลอดทดลองในภาวะที่เหมือนกับในร่างกายนั้น ขบวนการ lipolysis ยังดำเนินอยู่ได้ในระยะ

เวลาสั้น (3 ชม.) ทั้งนี้เพราะระหว่างการทดลองเนื้อเยื่อไขมันยังแสดงการตอบสนองต่อฤทธิ์ของ plasma endogenous catecholamines อยู่จึงทำให้วัดอัตราการ basal lipolysis ได้ เมื่อเติม catecholamines หรือ isopropyl-norepinephrine หรือ theophylline หรือ caffeine ลงใน incubation system ระดับของ glycerol release สูงขึ้นกว่าระดับที่ baseline จึงทำให้วัด lipolytic activity ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อไขมันที่มีต่อฮอร์โมนหรือสารดังกล่าวได้ (3, 12, 18, 23, 57) theophylline หรือ caffeine เป็นสารพวก xanthine derivatives มีหน้าที่ขัดขวางต่อการทำงานของ enzyme phosphodiesterase (PDE) (39, 47) cyclic-AMP จึงคงสภาพอยู่คือไม่เปลี่ยนเป็น non-cyclic AMP ทำให้อัตราการสลายตัวของ TG ในเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น (18, 36, 47) insulin มีฤทธิ์ทำให้ lipolysis ลดลง (antilipolytic effects) (58, 36) เพราะว่ามีผลลดปริมาณของ cyclic-AMP (47, 31) และเพิ่มการทำงานของ PDE (53)

การรายงานผลของเมตาบอลิซึมในเนื้อเยื่อไขมัน

การรายงานผลของ metabolic parameters ในเนื้อเยื่อไขมันควรเป็นหน่วยของ

ปริมาณสารที่วิเคราะห์ต่อจำนวนเซลล์ไขมัน
ภายในระยะเวลาที่ทำการทดลอง เช่น FFA
release จากชั้นเนื้อเยื่อไขมันเท่าจำนวน
micromoles/10⁶ adipose cells/2hr การแปล
ผลแบบนี้เหมาะสมสำหรับการเปรียบเทียบ
ความสามารถในการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันที่
ได้จากต่างบุคคล (39, 62, 68) ทั้งนี้เพราะ
ขนาดของเซลล์ไขมันในแต่ละคนไม่เท่ากัน
และนอกจากนั้น metabolic activities ของ
เนื้อเยื่อชนิดนี้เพิ่มขึ้นตามขนาดของเซลล์ไขมัน
เช่นอัตราการสร้าง TG (11, 36, 69, 74),
การสลายตัวของ TG (3, 36, 39) ปริมาณ
ของ cholesterol และ protein (11) และการ
ทำงานของ enzymes หลายชนิด (11, 13, 26,
62, 63) ในระยะแรกของการศึกษา นัก
ค้นคว้าได้รายงานค่าของ metabolic param-
eters เป็นหน่วยของปริมาณสารต่อจำนวนน้ำ
หนัก (กรัม) ของชั้นเนื้อเยื่อไขมัน หรือต่อ
ปริมาณ triglycerides, โปรตีน หรือ DNA
ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อไขมัน แต่ค่าของการทดลอง
ที่ได้ด้วยการแปลผลดังกล่าว ไม่เหมาะสมสำหรับ
การเปรียบเทียบการทำงานของเนื้อเยื่อไขมัน
ระหว่างบุคคล ด้วยเหตุผลหลายอย่างคือ
การแสดงผลความเข้มข้นของสารเป็นหน่วย
ต่อ น้ำหนักของเนื้อเยื่อ หรือต่อปริมาณ

triglycerides นั้นไม่ได้แสดงความสามารถที่
แท้จริงในการทำงานของเซลล์ ไขมันเพราะว่า
ในกรณีที่เซลล์ ไขมันมีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำหนัก
ของเซลล์แต่ละเซลล์ รวมทั้งปริมาณ trigly-
cerides ที่อยู่ใน fat droplet เพิ่มขึ้นด้วยแต่
เนื้อที่บริเวณ cytoplasm ขยายเพิ่มขึ้นเล็กน้อย
เท่านั้น ทำให้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของ
fat droplet และ cytoplasm เพิ่มขึ้นมากกว่า
ที่พบในเซลล์ที่มีขนาดปกติ (26) อีกประการ
หนึ่งเมื่อเซลล์ ไขมันเพิ่มขนาดขึ้นทำให้จำนวน
เซลล์ต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของเนื้อเยื่อน้อยลง
ดังนั้นค่าของ metabolic activities ของเนื้อ
เยื่อไขมันต่อหน่วยน้ำหนักจึงลดลง ทำให้ดู
เหมือนว่าการทำงานของเนื้อเยื่อชนิดนี้ลดลง
เมื่อเซลล์เพิ่มขนาดขึ้น ซึ่งไม่ตรงกับรายงาน
ที่ว่าเซลล์ไขมันขนาดใหญ่มีอัตราการทำงานสูง
กว่าเซลล์ขนาดเล็ก

การแปลผลการทำงานเนื้อเยื่อไขมันต่อ
หน่วยปริมาณของ DNA หรือ protein ก็เช่น
เดียวกัน ถึงแม้ว่าปริมาณของ DNA และ
โปรตีนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวน
nuclei ของเซลล์ทุกชนิดที่อยู่ในเนื้อเยื่อไขมัน
จึงใช้แทนจำนวนของเซลล์ในเนื้อเยื่อได้ (8)
แต่ Rodbell (67) ได้ศึกษาจากเนื้อเยื่อไขมัน
ของหนู พบว่าจำนวนเซลล์ของพวก stromal-

vascular structures นี้มีประมาณ 60% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดในเนื้อเยื่อไขมัน ทั้งนี้ปริมาณของ DNA หรือโปรตีนจึงไม่ได้แสดงถึงจำนวนที่แท้จริงของเซลล์ไขมัน อัตราการทำงานของเนื้อเยื่อหรือของ enzymes ในเนื้อเยื่อที่มีค่าเป็นหน่วยต่อ mg DNA content จึงไม่ได้ขึ้นอยู่กับการจำนวนของเซลล์ไขมันแต่อย่างเดียว (33,70)

วิธีวัดขนาดและจำนวนของเซลล์ไขมัน

ด้วยเหตุผลดังกล่าวแล้วข้างต้นในการศึกษาเมตาบอลิซึมเนื้อเยื่อไขมันในหลอดทดลอง จึงต้องทราบขนาดและจำนวนเซลล์ไขมันที่อยู่ในชั้นเนื้อที่ใช้สำหรับการทดลอง การวัดขนาดเซลล์ไขมันของคนทำได้หลายวิธีดังนี้

ก. วิธีใช้กล้องจุลทรรศน์วัดขนาดของเซลล์ในแผ่นเนื้อเยื่อไขมัน (70) คือการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ไขมันในชั้นเนื้อเยื่อไขมันซึ่งถูกตัดเป็นแผ่นบางโดยวิธีการ frozen-cut section วิธีการโดยย่อ แช่ชิ้นเนื้อเยื่อไขมันใน 35% formaldehyde นาน 7 นาที จากนั้นทำให้ชั้นเนื้อแข็งด้วย carbon dioxide snow และตัดด้วย microtome ออกเป็นแผ่นบางที่มีความหนาประมาณ 200

microns วางแผ่นเนื้อบางลงบน microscopic glass plate แล้วใช้แก้วทรงกระบอกขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. สูง 3 มม.) วางรอบชั้นเนื้อ แก้วทรงกระบอกนี้ทำด้วย vacuum grease ที่ปลายทั้งสองข้าง จึงวางติดกับ glass plate ได้แน่น หยด Ringer's solution ลงในแก้วทรงกระบอกและปิดด้วย cover slide แล้วดูเซลล์ไขมันโดยใช้ Zeiss photomicroscope ที่กำลังขยาย 256 เท่า วัดขนาดของเซลล์แต่ละเซลล์จำนวน 100 เซลล์ ด้วย eyepiece micrometer ชนิดมี scale สำหรับวัดระยะติดอยู่ (scale แบ่งออกเป็น 100 ส่วน แต่ละส่วน = 2.44 microns) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของแต่ละเซลล์ในตำแหน่งที่ได้ปรับภาพให้เห็นเยื่อหุ้มเซลล์ชัดที่สุดและได้เส้นผ่าศูนย์กลางที่กว้างที่สุด ขึ้นต่อไปหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางและค่าเฉลี่ยของปริมาตร โดยใช้สูตรสำหรับคำนวณหาปริมาตรของรูปทรงกลมซึ่งได้ตัดแปลงโดย Goldrick (33) โดยการใช้ค่า variance และค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางแทนการให้ค่าเฉลี่ยเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะว่าต้องการทราบค่าเฉลี่ยปริมาตรของเซลล์ไขมัน ไม่ใช่ปริมาตรของค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ (33, 41)

$$\text{ปริมาตรเฉลี่ยของเซลล์ไขมัน} = \frac{\pi}{6} (3\sigma^2 + \bar{d}^2) \bar{d}$$

เมื่อ σ^2 = variance เป็นเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ทั้งหมดที่วัด

\bar{d} = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ (microns)

ขั้นต่อไปหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสารไขมัน (triglyceride) ในเซลล์ โดยใช้ความหนาแน่นของ TG ในเซลล์ไขมันเท่ากับ 0.915 (45) และใช้สูตรน้ำหนักของสารไขมันต่อหนึ่งเซลล์ (micrograms of total lipid/cell) = $\frac{\pi}{6} \times 0.915 (3\sigma^2 + \bar{d}^2) \bar{d} \times 10^6$

ข. วิธีใช้กล้องจุลทรรศน์วัดขนาดของ isolated fat cells (IFC)

วิธีนี้วัดขนาดของเซลล์ไขมัน (IFC) ด้วยวิธีเตรียมชั้นเนื้อเยื่อไขมัน) Bray (15) และ Smith (74) ได้วัดขนาดของ IFC แต่ละเซลล์ (จำนวน 100-300 เซลล์)

โดยใช้ photomicroscope ที่มี calibrated ocular, micrometer เช่นเดียวกับที่ใช้ในวิธี ก. และคำนวณหาค่าเฉลี่ยของ micrograms of TG/cell โดยการใช้สูตรของ Goldrick (33) ส่วน Mcleod และคณะ (52) ได้ถ่ายภาพของ IFC โดยการ Zeiss photomicroscopic system ที่กำลังขยาย 85.5 เท่า (Carl Zeiss, Oberkochen/Wuertt, West Germany) โดยใช้แผ่นฟิล์มขนาด 5 x 7 นิ้ว จำนวน 6 แผ่น เมื่อล้างฟิล์มและได้แผ่น negatives แล้วนำมาวัดขนาดของเซลล์ (จำนวน 300-500 เซลล์) โดยใช้เครื่อง Zeiss particle size analyzer TGZ 3 ซึ่งเป็น

การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยวิธีกึ่งอัตโนมัติและผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของปริมาตรและน้ำหนัก TG ของเซลล์โดยใช้สูตรของ Dr. Goldrick ดังได้กล่าวแล้ว ภาพของเซลล์ไขมันที่ได้จากแผ่นฟิล์ม negative มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 3

ในกลุ่มคนอายุกลางคน (52 ปี) และมีน้ำหนักตัวปกติมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเซลล์ไขมัน = 0.54 ± 0.14 micrograms (49) ส่วนในกลุ่มคนที่มีอายุน้อยกว่า (20-27 ปี) มีค่าต่ำกว่าคือ 0.31 ± 0.07 micrograms (71) ปริมาณ total lipid ในเซลล์ไขมันคือ ปริมาณของ triglycerides ใน fat droplet (43) อีกประการหนึ่งจากการศึกษา Hirsch และ Gallian (41) พบว่าปริมาณเฉลี่ยของไขมันต่อหนึ่งเซลล์ ซึ่งคำนวณจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ มีค่าใกล้เคียงกับค่าของไขมันที่ได้จากการวัดปริมาณ total lipid ในชั้นเนื้อเยื่อหาคือจำนวนของเซลล์ทั้งหมดที่

มีอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นนั้น ดังนั้นจำนวน micrograms ของ TG ต่อหนึ่งเซลล์แสดงถึงขนาดของเซลล์ไขมัน เมื่อเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ปริมาณของ total lipid (TG) สูงขึ้นจึงทำให้มีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย

การวัดจำนวนเซลล์ไขมันในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน (น้ำหนัก a mg) ที่ใช้เพื่อทดสอบ metabolic activities ทำได้ดังนี้คือ ชั่งน้ำหนักของชั้นเนื้อเยื่ออีกจำนวนหนึ่ง (b mg) และใส่ลงในน้ำยาสกัดแยก เพื่อแยกเอา total lipid ออกมาหาปริมาณโดยวิธีการทางเคมี (72) ได้ c mg คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารไขมันทั้งหมด ต่อน้ำหนักชั้นเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งเท่ากับ $\frac{c}{b}$ ค่านี้ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารไขมันทั้งหมดของชั้นเนื้อเยื่อน้ำหนัก a mg ได้เท่ากับ $a \times \frac{c}{b}$ mg ซึ่งเมื่อหารค่าหลังนี้ด้วย น้ำหนักของสารไขมันต่อหนึ่งเซลล์ (วัดด้วยวิธี ก. หรือ ข.) ก็ทราบจำนวนเซลล์ไขมันที่มีอยู่ในชั้นเนื้อไขมันน้ำหนัก a mg ที่ได้ใช้ในการทดสอบ และนิยมรายงานผลของการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันหรือเซลล์ไขมัน เป็นหน่วยแสดงปริมาณของสารต่อ 10^5 หรือ 10^6 adipose cells ในเวลาที่ทำการศึกษาทดสอบ

ค. การวัดจำนวนและขนาดของเซลล์ของไขมัน โดยใช้ osmium fixation technique

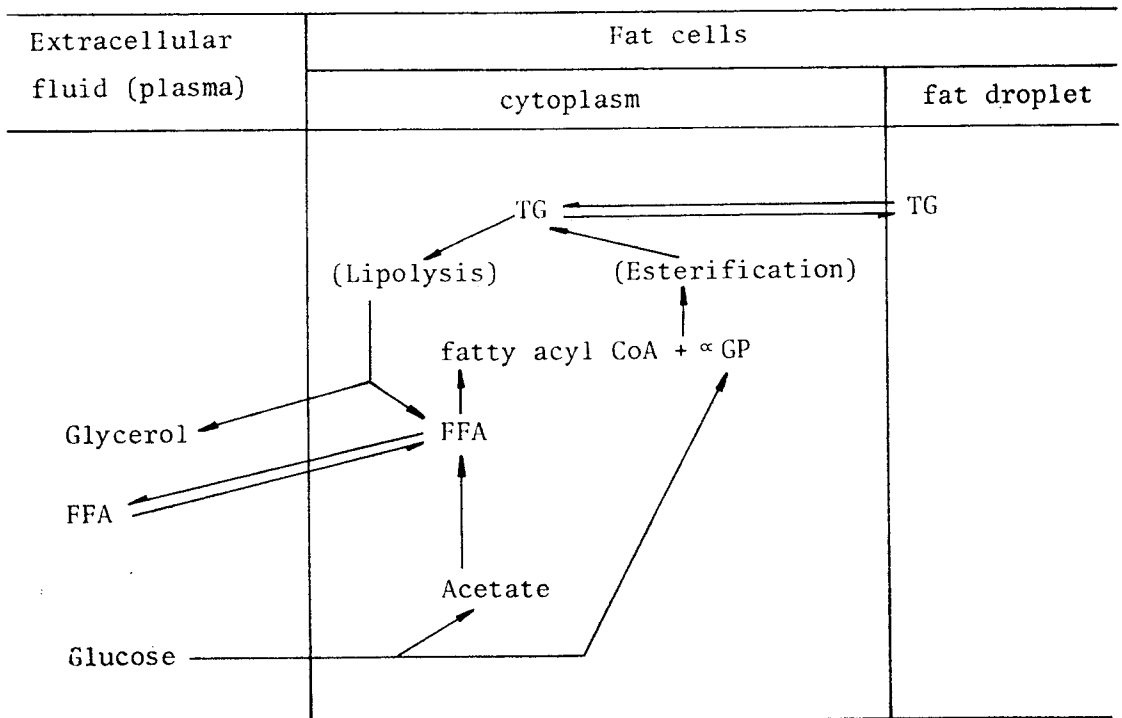
(41, 70) ซึ่งทำโดยการอุ่นชั้นเนื้อไขมันที่ทราบน้ำหนักแล้ว a mg กับ 2% osmium tetroxide ใน buffer ที่ประกอบด้วย collidine ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ไขมันที่มี osmium จับติดอยู่หลุดออกจาก connective tissue matrix หลังจากแยกเซลล์ไขมันออกด้วยการกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดของช่องต่างๆกัน ผสมเซลล์ที่ได้กับ isotonic saline ที่ทราบปริมาตรแล้วนับจำนวนเซลล์ (b) โดยใช้ Coulter electronic counter model B หรือ Celloscope 302 เมื่อทราบจำนวนไขมัน (TG) ทั้งหมด (c mg) ของชั้นเนื้อเยื่อไขมันน้ำหนัก d mg ก็จะคำนวณหา น้ำหนักหรือปริมาณไขมันต่อหนึ่งเซลล์ ได้
$$= \frac{c \times a}{d \times b}$$
 micrograms of total lipid/cell

สรุป ได้รวบรวมความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ เมตาบอลิซึมในเนื้อเยื่อไขมันของคนเพื่อให้ทราบถึงการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันในร่างกาย ในภาวะปกติ และบทบาทของฮอร์โมน เช่น insulin และ catecholamines ซึ่งควบคุมการทำหน้าที่ของเนื้อเยื่อชนิดนี้ ในบทความนี้ได้กล่าวถึงวิธีการตัดแยกเนื้อเยื่อไขมันออกจากร่างกายคนเพื่อใช้ศึกษาในหลอดทดลอง วิธีเตรียมชั้นเนื้อเยื่อสำหรับการทดสอบฤทธิ์ของ insulin และ catecholamines ที่แสดง

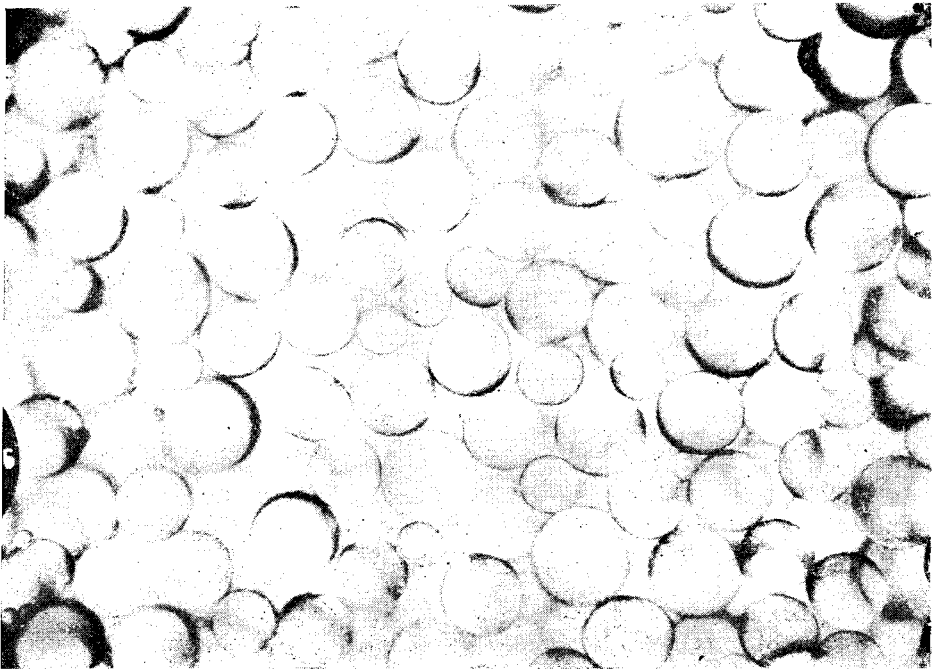
ต่อการสร้างและการสลายตัวของสาร triglycerides ภายในเซลล์ รวมทั้งการวัดขนาดและจำนวนของเซลล์ ไขมันในชั้นเนื้อเยื่อใช้สำหรับการรายงานผลการทดลอง ทั้งนี้เพื่อเป็นหลักในการที่จะค้นคว้าหรือศึกษาถึงความผิดปกติของการทำงานของเนื้อเยื่อไขมันหรือ

หน้าที่และปริมาณของ enzymes ในเนื้อเยื่อไขมัน ที่อาจจะเป็นสาเหตุหรือเป็นผลของพยาธิสภาพบางอย่างเช่น ความอ้วน การมีระดับไขมันในเลือดสูง หรือการที่เซลล์ในร่างกายเกิดภาวะต้านทานต่อฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin resistance)

รูปที่ 1 การสร้าง สะสมและเคลื่อนย้าย triglycerides ในเซลล์ ไขมัน (34)



- TG = triglycerides หรือ triacylglycerols
- α GP = alpha-glycerophosphate
- FFA = free fatty acids



รูปที่ 3 ภาพถ่าย isolated fat cells ซึ่งเตรียมจากการย่อยชิ้นเนื้อเยื่อไขมันด้วย collagenase (กำลังขยาย 85.5 เท่า)

References

1. Arner P : Relationship between intracellular cyclic AMP and lipolysis in human adipose tissue. *Acta Med scand* 200 : 179-86, 76
2. Arner P, Östman J : Mono- and diacylglycerols in human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 369 : 209-21, 74
3. Arner P, Liljeqvist L, Östman J : Metabolism of mono- and diacylglycerols in subcutaneous adipose tissue of obese and normal weight subjects. *Acta Med scand* 200 : 187-94, 76
4. Belfiore F, Borzi V, Napoli E, et al : Enzymes related to lipogenesis in the adipose tissue of obese subjects. *Metabolism* 25 : 483-93, 76
5. Bjorntorp P : studies on adipose tissue from obese patient with or without diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 179 : 229-34, 66
6. Bjorntorp P : The effect of insulin in vitro on human adipose tissue from normal and diabetic subjects. *Acta Med scand* 181 : 389-402, 67
7. Bjorntorp P : Lipid mobilization from human subcutaneous adipose tissue in vitro. *Acta Med Scand* 182 : 717-26, 67
8. Bjorntorp P, Martinsson A : The composition of human subcutaneous adipose tissue in relation to its morphology. *Acta Med Scand* 179 : 475-81, 66
9. Bjorntorp P, Martinsson A : Conversion of Glucose¹⁴-C into carbon dioxide and lipids in different specimens of human subcutaneous adipose tissue. *Acta Med Scand* 181 : 359-66, 67
10. Bjorntorp P, Östman J : "Human adipose tissue. Dynamic and regulation" in *Advances in metabolic disorder*. Edited by Levine R and Luft R. Academic press, New York and London 1971 vol.5 pp 277-327
11. Bjorntorp P, Sjostrom L : The composition and metabolism in vitro of adipose tissue fat cells of different sizes. *Europ J Clin Invest* 2 : 78-84, 72
12. Bjorntorp P, Karlsson M, Horden A : Quantitative aspects of lipolysis and reesterification in human adipose tissue in vitro. *Acta Med Scand* 185 : 89-97, 69
13. Bjorntorp P, Enzi G, Ohlson R, et al : Lipoprotein lipase activity and uptake of exogenous triglycerides in fat cells of different size. *Horm Metab Res* 7 : 230-37, 75
14. Bray GA : Effect of diet and triiodothyronine on the activity of sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase and on the metabolism of glucose and pyruvate by adipose tissue of obese patients. *J Clin Invest* 48 : 1413-22, 69
15. Bray GA : Measurement of subcutaneous fat cells from obese patients. *Ann Int Med* 73 : 565-69, 70
16. Bray GA : Lipogenesis in human adipose tissue : some effects of nibbling and gorging. *J Clin Invest* 51 : 537-48, 72

17. Bray GA, Glennon JA, Salan LB, et al: Spontaneous and experimental human obesity: effects of diet and adipose cell size on lipolysis. *Metabolism* 26: 739-47, 77
18. Burns TW, Langley PE: Lipolysis by human adipose tissue. The role of cyclic 3,5,-adenosine monophosphate and adrenergic receptor sites. *J Lab Clin Med* 75: 983-97, 70
19. Burns TW, Langley PE, Robison GA: site of free-fatty-acid inhibition of lipolysis by human adipocytes. *Metabolism* 24: 265-76, 75
20. Davidson MB: Effect of obesity on insulin sensitivity of human adipose tissue. *Diabetes* 21: 6-12, 72
21. Davidson MB: Insulin sensitivity of the large human adipocyte in vitro. *Diabetes* 24: 1086-93, 75
22. Diengott D, Kerpel S: New types of needle for obtaining large samples of human adipose tissue. *J Lipid Res* 8: 58-60, 67
23. Efendic S, Östman J: Catecholamines and metabolism of human adipose tissue. iv. Influence of glucose on catecholamine-induced lipolysis in human omental adipose tissue in vitro. *Acta Med Scand* 187: 485-91, 70
24. Elkeles RS: Lipoprotein lipase in human adipose tissue. *Clin Sci Mol Med* 46: 753-62, 74
25. Enghardt A, Kasperek R, Liebermeister H, et al: Studies on glucose utilization and insulin responsiveness of human subcutaneous adipose tissue in obese and non-obese subjects. *Horm Metab Res* 3: 266-72, 71
26. Enghardt A, Gries FA, Liebermeister H, et al: Size, lipid and enzyme content of isolated human adipocytes in relation to nutritional state. *Diabetologia* 7: 51-8, 71
27. Fessler A, Beck JC: The effect of insulin on the metabolism of human adipose tissue in vitro. *Biochim Biophys Acta* 106: 199-201, 65
28. Fessler A, Beck JC, Rubinstein D: Factors affecting lipid synthesis in human adipose tissue in vitro. *Metabolism* 16: 438-44, 67
29. Galton DJ: Lipogenesis in human adipose tissue. *J Lipid Res* 9: 19-26, 68
30. Gellhorn A, Marks PA: The composition and biosynthesis of lipids in human adipose tissues. *J Clin Invest* 40: 925-32, 61
31. Gilbert CH, Galton DJ: The effect of catecholamines and fasting on cyclic-AMP and release of glycerol from human adipose tissue. *Horm Metab Res* 6: 229-33, 74
32. Goldrick RB: Effects of insulin on glucose metabolism in isolated human fat cells. *J Lipid Res* 8: 581-88, 67
33. Goldrick RB: Morphological changes in the adipocyte during fat deposition and mobilization. *Am J Physiol* 212: 717-82, 67

34. Goldrick RB: "Deposition and mobilization of lipids in man" in Biochemistry and Methodology of lipids edited by Johnson AR, Davenport JB. Wiley-Interscience, New York. London. Sydney. Toronto. 1971, pp 507-510
35. Goldrick RB, Galton DJ: Fatty acid synthesis de novo in human adipose tissue. Clin sci Mol Med 46: 469-79, 74
36. Goldrick RB, Mc Loughlin GM: Lipolysis and lipogenesis from glucose in human fat cells of different sizes. Effects of insulin, epinephrine and theophylline. J Clin Invest 49: 1213-23, 70
37. Goldrick RB, Ashley BCE, Lloyd ML: Effects of prolonged incubation and cell concentration on lipogenesis from glucose in isolated human omental fat cells. J Lipid Res 10: 253-59, 69
38. Gries FA, Steinke J: Comparative effects of insulin on adipose tissue segments and isolated fat cells of rats and man. J Clin Invest 46: 1413-21, 67
39. Gries FA, Berger M, Neumann M, et al: Effects of norepinephrine theophylline and dibutyryl cyclic AMP on in vitro lipolysis of human adipose tissue in obesity. Diabetologia 8: 75-83, 72
40. Hamosh M, Hamosh P, Bar-Maor JA, et al: Fatty-acid metabolism by human adipose tissues. J Clin Invest 42: 1648-52, 63
41. Hirsch J, Gallian E: Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. J Lipid Res 9: 110-19, 68
42. Hirsch J, Goldrick RB: Serial studies on the metabolism of human adipose tissue I. Lipogenesis and free fatty acid uptake and release in small aspirated samples of subcutaneous fat. J Clin Invest 43: 1776-92, 64
43. Hirsch J, Farquhar JW, Ahrens EH, Jr, et al: Studies of adipose tissue in man: a microtechnique for sampling and analyses. Am J Clin Nutr 8: 499-511, 60
44. Ho RJ, England R, Meng HC: Effect of glucose on lipolysis and energy metabolism in fat cells. Life sci 9: 137-50, 70
45. Keys A, Borzek J: Body fat in adult man. Physiol Rev. 38: 245-325, 53
46. Khoo JC, Aquino AA, Steinberg D: The mechanism of activation of hormone sensitive lipase in human adipose tissue. J Clin Invest 53: 1124-31, 74
47. Kissebah AH, Fraser TR: The in vitro ¹⁴C-cyclic AMP production normal human adipose tissue in response to some hormones and in uncontrolled and controlled diabetic adipose tissue. Horm Metab Res 4: 72-77, 72
48. Kissebah AH, Vydellingum N, Tulloch BR, et al: The role of calcium in insulin action. I. purification and properties of enzymes regulating lipolysis in human adipose tissue: effects of cyclic-AMP and calcium ions. Horm Metab Res 6: 247-55, 74

49. Krotkiewski M, Sjöström L, Björntorp P, et al : Regional adipose tissue cellularity in relation to metabolism in young and middle aged women. *Metabolism* 24 : 703-10, 75
50. Lisch H-J, Sailer S, Sandhofer F, et al : Action of insulin and glucose on the re-esterification rate of free fatty acids in isolated human fat cells. *Diabetologia* 9 : 499-504, 73
51. Margolis S, Vaughan M : α -Glycerophosphate synthesis and breakdown in homogenates of adipose tissue. *J Biol Chem* 237 : 44-8, 62
52. Mcleod KI, Goldrick RB, Whyte HM : The effect of maternal malnutrition on the progeny in the rat. Studies on growth, body composition and organ cellularity in first and second generation progeny. *Aust J Expt Biol Med sci* 50 : 435-446, 72
53. Moskowitz J, Fain JN : Hormonal regulation of lipolysis and phosphorylase activity in human fat cells. *J Clin Invest* 48 : 1802-08, 69
54. Nestel PJ, Havel RJ : Lipoprotein lipase in human adipose tissue. *Proc Soc Exp Biol Med* 109 : 985-87, 62
55. Nilsson-Ehle P : Human lipoprotein lipase activity : comparison of assay methods. *Clin Chim Acta* 54 : 283-91, 74
56. Olefsky JM, Jen P, Reaven GM : Insulin binding to isolated human adipocytes. *Diabetes* 23 : 565-71, 74
57. Östman J, Backman L, Hallberg D : Cell size and lipolysis by human subcutaneous adipose. *Acta Med Scand* 193 : 469-75, 73
58. Ostman J Backman L, Hallberg D : Cell size and the antilipolytic effect of insulin in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 11 : 159-64, 75
59. Owen JA, Jr, Lindsay RW, Gaskin JH, et al : Response of human adipose tissue to endogenous serum insulin-like activity in vitro. *Metabolism* 16:47-56, 67
60. Persson B, Schröder G, Hood B : Lipoprotein lipase activity in human adipose tissue : assay methods. Relations to the serum triglyceride level in a normolipidemic population. The effect of ethyl chlorophenoxy isobutyrate. *Atherosclerosis*. 16 : 37-49, 72
61. Pozza G, Ghidoni A, Basilico C : Glucose uptake and gas exchange in human adipose tissue incubated in vitro. *Lancet* I : 836, 63
62. Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD : Human adipose tissue lipoprotein lipase : comparison of assay methods and expression of activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 148 : 279-300, 75
63. Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD : Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal-and diet-induced activity. *J Clin Invest* 56 : 1108-17, 75

64. Robinson DS: The clearing factor lipase and its action in the transport of fatty acids between the blood and the tissues. *Advan Lipid Res* 1:133-82, 63
65. Robinson DS: "The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport" in *Comprehensive biochemistry* edited by Florkin M, Stotz EH. Elsevier, Amsterdam. 1970, vol 18 pp 51-116
66. Rodbell M: Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239:375-80, 64
67. Rodbell M: Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 239:753-55, 64
68. Salans LB, Knittle JL, Hirsch J: The role of adipose tissue cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest* 47:153-65, 68
69. Salans LB, Bray GA, Cushman SW, et al: Glucose metabolism and response to insulin by human adipose tissue in spontaneous and experimental obesity. Effects of dietary composition and adipose cell size. *J Clin Invest* 53:848-56,74
70. Sjöström L, Björntorp P, Vrana J: Microscopic fat cell size measurements on frozen-cut adipose tissue in comparison with automatic determinations of osmium-fixed fat cells. *J Lipid Res* 12:521-30, 71
71. Sjöström L, Smith U, Krotkiewski M, et al: Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism* 21:1143-53, 72
72. Skidmore WD, Entenman C: The determination of esterified fatty acids in glycerides, cholesterol esters, and phosphatides, *J. Lipid Res* 3:356-63,62
73. Smith U: Insulin responsiveness and lipid synthesis in human fat cells of different sizes effect of the incubation medium. *Biochim Biophys Acta* 218:417-23,70
74. Smith U: Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *J Lipid Res* 12:65-70, 71
75. Smith U, Cahlin E, Schersten J: Sucrose feeding in man. Effects on lipolysis and antilipolytic action of insulin in the adipose tissue. *Acta Med Scand* 194:147-50, 73
76. Steinke J, Miki E, Cahill GF: Assay of crystalline insulin and of serum insulin-like activity of different species on adipose tissue of the rat, mouse, and guinea pig. *New Engl J Med* 273:1464-67, 65
77. Umbreit WW, Burris RH, Stauffer JF: *Manometric techniques*. Burgess Publishing Company, Minneapolis 4th edition 1964. p 132
78. Vaughan M: The Production and release of Glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J Biol Chem* 237:3354-58,62