

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Mgr Urszula Rażny

**Angiogeneza w modelu zespołu metabolicznego u myszy
z wyłączonym genem receptora kwasu retinowego (RXR α)
w hepatocytach**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej

Katedry Biochemii Klinicznej

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Kraków, 2011 rok

*Pani prof. dr hab. med. Aldonie Dembińskiej-Kieć
składam serdeczne podziękowania
za wszechstronną pomoc i cenne uwagi,
bez których nie powstałaby ta praca doktorska.
Podziękowania kieruję również do pracowników
Katedry i Zakładu Biochemii Klinicznej Collegium Medium UJ.*

*Pracę tą dedykuję
Rodzicom i Mężowi*

SPIS TREŚCI:

1.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
2.	WSTĘP	13
2.1	Zespół metaboliczny	13
2.1.1	Kryteria diagnostyczne	14
2.2	Tkanka tłuszczowa	15
2.2.1	Biała i brązowa tkanka tłuszczowa	15
2.2.2	Endokrynną aktywność tkanki tłuszczowej.....	17
2.2.2.1	Adipokiny biorące udział w równowadze energetycznej/metabolizmie	17
2.2.2.2	Adipokiny prozapalne.....	22
2.2.2.3	Adipokiny przeciwzapalne	24
2.2.2.4	Inne adipokiny	25
2.2.3	Metaboliczna aktywność tkanki tłuszczowej	28
2.3	Rozrost tkanki tłuszczowej	32
2.3.1	Adipogeneza	32
2.3.1.1	Regulacja adipogenezy	34
2.3.2	Rola angiogenezy w rozwoju tkanki tłuszczowej.....	36
2.3.2.1	Mechanizm tworzenia naczyń	36
2.3.2.2	Regulacja angiogenezy w tkance tłuszczowej.....	45
2.4	Tkanka tłuszczowa a zespół metaboliczny	48
2.5	Czynniki transkrypcyjne RXR, a zaburzenia metaboliczne	51
2.5.1	Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPARs)	54
2.5.2	Receptory wątrobowe (LXR).....	57
2.5.3	Receptor farnesoidylowy (FXR)	59
2.6	Angiogeneza w cukrzycy	60
2.6.1	Angiopatia cukrzycowa	62
3.	ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	64
4.	MATERIAŁY I METODY	65
4.1	Materiały użyte do badań	65
4.1.1	Pasze używane w hodowli myszy	65
4.1.2	Odczynniki do oznaczeń biochemicznych we krwi	65

4.1.3	Odczynniki używane w ocenie angiogenezy <i>in vivo</i>	65
4.1.4	Odczynniki używane do metod biologii molekularnej.....	66
4.1.5	Aparatura używana w realizowaniu badania	68
4.1.6	Grupy zwierząt (myszy) użyte w badaniach.....	68
4.2	METODY	69
4.2.1	Użyte w badaniach modele zwierzęce.....	69
4.2.2	Protokół badań (Ryc. 10).....	69
4.2.3	Kontrolne oznaczenie genotypu myszy	71
4.2.3.1	Izolacja całkowitego RNA.....	71
4.2.3.2	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	71
4.2.3.3	Reakcja PCR.....	72
4.2.4	Pomiary wagi myszy	72
4.2.5	Badania biochemiczne.....	72
4.2.5.1	Oznaczanie stężenia cholesterolu	73
4.2.5.2	Oznaczanie stężenia triglicerydów	73
4.2.5.3	Oznaczanie stężenia glukozy	73
4.2.5.4	Oznaczanie stężenia insuliny	73
4.2.5.5	Oznaczanie stężenia leptyny.....	74
4.2.5.6	Oznaczanie stężenia adiponektyny	75
4.2.6	Model angiogenezy <i>in vivo</i> (wg Ohasi i inni, 2004)	75
4.2.6.1	Opracowanie modelu angiogenezy <i>in vivo</i>	75
4.2.6.2	Analiza immunohistochemiczna odpowiedzi angiogennej	78
4.2.7	Analiza zmian w ekspresji genów w komórkach i kapilarach matrigelu	80
4.2.7.1	Izolacja całkowitego RNA z komórek naciekających matrigel.....	80
4.2.7.2	Skreeningowe oznaczenie ekspresji genów. Hybrydyzacja z macierzą oligonukleotydową (Affymetrix Mouse 430A_2).....	80
4.2.7.3	Analiza ekspresji genów po hybrydyzacji z macierzą oligonukleotydową.....	81
4.2.7.4	Potwierdzenie ekspresji wyselekcjonowanych przez hybrydyzację z mikromacierzą oligonukleotydową genów przy użyciu techniki Real time RT-PCR.....	82
4.3	Analiza statystyczna	84
5.	WYNIKI	85

5.1	Charakterystyka użytego modelu do badań	85
5.2	Wpływ skarmiania dietą wysokotłuszczową na spożycie paszy, wagę ciała oraz parametry biochemiczne surowicy krwi myszy	86
5.2.1	Spożycie paszy i waga ciała myszy podczas skarmiania dietą wysokotłuszczową	86
5.2.2	Zmiana parametrów biochemicznych krwi podczas skarmiania dietą wysokotłuszczową	88
5.2.2.1	Poziom glukozy surowicy krwi w trakcie skarmiania	88
5.2.2.2	Poziom triglicerydów surowicy krwi w trakcie skarmiania	89
5.2.2.3	Poziom cholesterolu surowicy krwi w trakcie skarmiania	89
5.3	Porównanie parametrów po 7 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową	93
5.3.1	Waga ciała myszy	93
5.3.2	Poziom glukozy i insuliny	93
5.3.3	Poziom cholesterolu i triglicerydów	94
5.3.4	Poziom adipokin	94
5.4	Wpływ diety wysokotłuszczowej na odpowiedź angiogeną w użytym modelu angiogenezy <i>in vivo</i>	99
5.4.1	Immunohistochemiczna ocena wpływu diety wysokotłuszczowej na angiogenezę	99
5.4.2	Analiza ekspresji genów w komórkach matrigelu	102
5.4.2.1	Wpływ diety wysokotłuszczowej na ekspresję genów w matrigelu - analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową	102
5.4.2.2	Potwierdzenie wpływu diety na ekspresję wybranych genów metodą ilościową (q Real Time PCR)	106
5.5	Podsumowanie wyników badań	117
6.	DYSKUSJA	124
7.	WNIOSKI KOŃCOWE	131
8.	PIŚMIENNICTWO	133
9.	SPIS RYCIN	173
10.	SPIS TABEL	181
11.	STRESZCZENIE (j. polski)	183
12.	STRESZCZENIE (j. angielski)	184

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ang – angiopoetyna (ang. *angiopoietin*)

ABCA1 – ang. *ATP-binding cassette dependent transporter, sub-family A (ABC1), member 1*

ABCG - ang. *ATP-binding cassette dependent transporter, subfamily G*

AC - cyklaza adenyłowa

ACE – konwertaza angiotensyny (ang. *angiotensin-converting enzyme*)

ACS - syntetaza acylo-CoA

ACTH – hormon adrenokortykotropowy

AGEs – końcowe produkty zaawansowanej glikacji (ang. *advanced glycation end products*)

AGT - angiotensynogen

ALEs – produkty końcowe zaawansowanej lipooksydacji (ang. *advanced lipooxidation end products*)

AMP – adenozyomonofoforan

ANP - przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)

Apo-A1 – apolipoproteina A1

AQP7 – akwaporyna 7

AR - receptor adrenergiczny

ATGL – lipaza triglicerydów (ang. *adipose triglyceride lipase*)

ATP – adenozynotrifosforan

BAT – brunatna tkanka tłuszczowa (ang. *brown adipose tissue*)

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*)

BNP - mózgowy peptyd natriuretyczny (ang. *brain natriuretic peptide*)

cAMP – cykliczny adenozyomonofoforan

cGMP – cykliczny guanozyomonofoforan

C/EBP - ang. *CCAAT/Enhancer Binding Protein*

CETP - białko przenoszące estry cholesterolu (ang. *cholesterol ester transfer protein*)

CCL2 - ang. *Chemokine (C-C motif) ligand 2*

CHF - przewlekła niewydolność serca (ang. *chronic heart failure*)

ChREBP – ang. *carbohydrate responsive element binding protein*

CoA – koenzym A

COX - cyklooksygenaza

CRP – białko C reaktywne (ang. *C-reactive protein*)

CXCL10 – ang. *C-X-C motif chemokine 10*

DAG – diacyloglicerol

DEX - deksametazon

DGAT- acylotransferaza diacyloglicerolu (ang. *acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase*)

DHA – kwas dokozaheksaenowy (ang. *docosahexaenoic acid*)

EC – komórka śródbłónka (ang. *endothelial cell*)

ECM – macierz pozakomórkowa (ang. *extracellular matrix*)

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)

ENA-78 – epitelialny peptyd 78 aktywujący neutrofile (ang. *epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide 78*)

eNAMPT – zewnątrzkomórkowa fosforybozylotransferaza nikotynamidu (ang. *extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase*)

eNOS – **NOS3**, śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (ang. *endothelial nitric synthase*)

EPA – kwas eikozapentaenowy (ang. *eicosapentaenoic acid*)

EPC komórki – śródbłonkowe komórki progenitorowe (ang. *endothelial progenitor cells*)

ER – retikulum endoplazmatyczne

FABP4 – białko wiążące kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acid binding protein 4*)

FAS – syntaza kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid synthase*)

FATP – białko transportujące kwasy tłuszczowe (ang. *fatty – acid transport protein*)

FFAs – wolne kwasy tłuszczowe (ang. *free fatty acids*)

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)

FOXC2 - ang. *forkhead box protein C2*

FXR – farnesoidylowy receptor (ang. *farnesoid X receptor*)

G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)

GCP-2 – peptyd 2 chemotaktyczny dla granulocytów (ang. *granulocyte chemotactic peptide-2*)

GLP 1 – glukagonopodobny peptyd 1 (ang. *glucagon like peptide 1*)

GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
(ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

GRO $\alpha\beta\gamma$ – ang. *growth-related oncogene*

GTP - guanozynotrifosforan

HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*)

HFD – dieta wysokotłuszczowa

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*)

HIF- α – czynnik indukowany niedotlenieniem (ang. *hypoxia inducible factor α*)

HOMA – wskaźnik insulinowrażliwości (ang. *homeostasis model assessment*)

HRE – ang. *hormone response elements*

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)

HSL – hormonozależna lipaza (ang. *hormone sensitive lipase*)

HUVEC komórki – ludzkie komórki śródbłonkowe żyły pępowinowej (ang. *human umbilical vein endothelial cells*)

IBMX - izobutylometyloksantyna

ICAM – międzykomórkowa molekula adhezyjna (ang. *intercellular adhesion molecule*)

IDF – Międzynarodowa Komisja Cukrzycowa (ang. *International Diabetes Federation*)

IGF - insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor-1*)

IGFPB-rP2 – białko 2 wiążące IGF (ang. *insulin-like growth factor binding protein-2*)

IL-6 – interleukina 6

iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*)

IP-10 – białko 10 indukujące interferon gamma (ang. *interferon gamma-induced protein 10*)

IR – receptor insulinowy

IRS1 - białko substratowe 1 receptora insulinowego (ang. *insulin receptor substrate-1*)

IS – istotność statystyczna

JNK – c-Jun N terminalna kinaza (ang. *c-Jun N-terminal kinase*)

LDL – lipoproteiny o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*)

LPL – lipaza lipoproteinowa

LXRs - receptory wątrobowe (ang. *liver X receptors*)

MAPK - kinaza aktywowana mitogenami (ang. *mitogen- activated protein kinase*)

MCP-1- białko 1 chemotaktyczne dla monocytów (ang. *monocyte chemotactic protein 1*)

MGL – lipaza monoglicerydowa (ang. *monoglycerid lipase*)

MIF - czynnik zahamowania migracji makrofagów (ang. *macrophage migration inhibitory factor*)

MIG – monokina indukowana przez interferon gamma (ang. *monokine induced by interferon-gamma*)

MMP – metaloproteinaza macierzy (ang. *matrix metalloproteinase*)

NADPH- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NAFLD – niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*)

NAP-2 – białko 2 aktywujące neutrofile (ang. *neutrophil-activating protein-2*)

NASH - niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby (ang. *non-alcoholic steatohepatitis*)

NFκB – czynnik jądrowy κB (ang. *nuclear factor κB*)

NGF – czynnik wzrostu neuronów (ang. *neuronal growth factor*)

NO – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*)

NPR - receptor peptydu natriuretycznego (ang. *natriuretic peptide receptor*)

NPY – neuropeptyd Y

NRF2 - ang. *Nuclear Factor-E2-related factor 2*

PA - kwas fosfatydylowy

PAI-1 - inhibitor 1 aktywatora plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PBEF – ang. *pre-b cell colony- enhancing factor*

PDE3B – fosfodiesteraza 3B (ang. *phosphodiesterase 3B*)

PD-ECGF – płytkowy czynnik wzrostu komórek śródbłonka (ang. *platelet-derived endothelial cell growth factor*)

PDGFβ - pochodzący z płytek czynnik wzrostu β (ang. *platelet-derived growth factor, type B*)

PECAM-1 - płytkowośródbłonkowe białko adhezyjne 1 (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*)

PEGF – czynnik wzrostu barwnikowego epitelium (ang. *pigment epithelium growth factor*)

P13K - kinaza 3-fosfatydylinozytolu

PEX - ang. *hemopexin like domain of MMP-2*

PGC1α – koaktywator 1 α receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (ang. *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α*)

PGE - prostaglandyna

PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placenta inducible growth factor*)

PKA – kinaza białkowa A (ang. *protein kinase A*)

PKB – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*)

PKC – kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*)

PKG – kinaza białkowa G (ang. *protein kinase G*)

POMC - proopiomelanokortyna

PPARs – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferation activated receptors*)

PXR – ang. *pregnane X receptor*

PUFAs – wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*)

QUICKI – wskaźnik insulinowrażliwości (ang. *quantitative insulin-sensitivity check index*)

RANTES - CCL5; ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*;
ang. *Chemokine (C-C motif) ligand 5*

RARs - receptory kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptors*)

RAS - układ renina-angiotensyna (ang. *renin-angiotensin system*)

RBP4 – białko 4 wiążące retinol (ang. *retinol binding protein 4*)

ROS – wolne rodniki (ang. *reactive oxygen species*)

RXRs - receptory kwasu retinoidowego (ang. *retinoid X receptor*)

RXRa ko myszy – myszy z delecją genu RXRa w hepatocytach

SAA – surowiczy amyloid A (ang. *serum amyloid A*)

SCD-1 – desaturaza 1 steroilo-CoA (ang. *stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*)

Sfrp5 - ang. *secreted frizzled-related protein 5*

SREBP-1c - (ang. *sterol regulatory element-binding protein 1c*)

STD – dieta standardowa

SVF komórki – frakcja komórek progenitorowych izolowana z tkanki tłuszczowej (ang. *stromal vascular fraction cells*)

T2DM – cukrzyca typu 2

TF – czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*)

TG - triglicerydy

TGFβ - transformujący czynnik wzrostowy β (ang. *transforming growth factor β*)

TIMP-2 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 2 (ang. *tissue-localized inhibitor of metalloproteinase-2*)

TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α*)

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue-type plasminogen activator*)

TR - receptor hormonu tarczycy (ang. *thyroid hormone receptor*)

TSH – hormon tyreotropowy

TSP-1 – trombospondyna 1

TZDs – tiazolidinediony (ang. *thiazolidinediones*)

UCP2 – białko rozprzegające 2 (ang. *uncoupling protein 2*)

UCP3 - białko rozprzegające 3 (ang. *uncoupling protein 3*)

uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase-type plasminogen activator*)

VCAM-1 – molekula adhezyjna 1 komórek naczyniowych (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*)

(VE)-kadheryna - naczyniowo-śródbłonkowa kadheryna (ang. *vascular endothelial cadherin*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR-2 – receptor 2 czynnika wzrostu śródbłonka naczyń

VDR - receptor witaminy D (ang. *vitamin D receptor*)

VIP - wazoaktywny peptyd jelitowy (ang. *vasoactive intestine peptide*)

VLDL – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*)

VSMCs – komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*)

WT myszy – myszy kontrolne (ang. *wild type*)

2. WSTĘP

2.1 Zespół metaboliczny

Okres prodromalny, poprzedzający rozwój cukrzycy typu 2 (zwany zespołem X lub zespołem Reavena, a ostatnio zespołem metabolicznym czy *prediabetes*) cechuje niewielka ilość objawów klinicznych (głównie otyłość i nadciśnienie). Otyłość brzuszna jest bowiem udowodnionym czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 (*Philips i Prins, 2008*).

Zespół metaboliczny charakteryzują natomiast liczne objawy biochemiczne, wynikające z insulinooporności tkankowej: hiperinsulinemia, charakterystyczna dyslipidemia (wysoki poziom wolnych kwasów tłuszczowych i bogatych w triglicerydy lipoprotein, a obniżony poziom lipoprotein o wysokiej gęstości), przewlekły odczyn zapalny i aktywacja układu krzepnięcia (*Ford, 2004; Grundy i inni, 2004; Kahn i inni, 2005; Eckel i inni, 2005*). Zespół metaboliczny rozwija się przeważnie u osób: w średnim wieku, obu płci, wszystkich grup etnicznych, a zwłaszcza w populacji afro-amerykańskiej, u zmieniających dietę emigrantów pochodzących z krajów słabiej uprzemysłowionych (*Grundy i inni, 2004; Sironi i inni, 2004; Reaven i inni, 1993*). W wyniku „glukolipotoksyczności” (stresu metabolicznego komórek, którego skutkiem jest magazynowanie lipidów w postaci kropli lipidowych w mięśniach lub hepatocytach) dochodzi do aktywacji układu immunologiczno-zapalnego (*Hanley i inni, 2005*) i apoptozy komórek beta trzustki, czego konsekwencją jest rozwój pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 (*Grundy i inni, 2004; Kiec-Wilk, 2009; Cusi, 2010*).

Głównymi powikłaniami zespołu metabolicznego, oprócz rozwoju cukrzycy typu 2, jest wystąpienie chorób sercowo-naczyniowych, czego przyczyną jest uszkodzenie śródbłónka oraz zaburzenie jego funkcji w wyniku: dyslipidemii, hiperglikemii i przewlekłego odczynu immunologiczno-zapalnego. Dodatkowo, zaburzenie funkcji śródbłónka, ischemia oraz wytwarzane lokalnie cytokiny prozapalne prowadzą do rozwoju patologicznej angiogenezy manifestującej się klinicznie np. retinopatią cukrzycową (*Girach i inni, 2006*).

Rozwój zespołu metabolicznego jest determinowany: predyspozycjami genetycznymi (choroba wielogenowa), czynnikami środowiskowymi (brakiem aktywności fizycznej, wysokokaloryczną dietą bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe i węglowodany), starzeniem czy zaburzeniami hormonalnymi (*Grundy i inni, 2004; Grundy i inni, 2005; Handelsman, 2009*).

2.1.1 Kryteria diagnostyczne

Po raz pierwszy w latach 80-tych Reaven wprowadził pojęcie „zespołu metabolicznego” jako schorzenia charakteryzującego się zaburzeniami metabolicznymi związanymi z otyłością, których biochemicznymi objawami są: hipertriglicerydemia, obniżony poziom HDL, hiperinsulinemia oraz upośledzona tolerancja glukozy (Reaven, 1988). Obecnie w diagnostyce obowiązuje definicja Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej IDF (ang. *International Diabetes Federation*) z kwietnia 2005r (Tabela 1). IDF bierze pod uwagę odrębności etniczne jeżeli chodzi o wartość obwodu w talii (Handelsman, 2009).

Zgodnie z tą definicją warunkiem niezbędnym dla rozpoznania zespołu metabolicznego jest obecność otyłości brzusznej (obwód w talii u Europejsek równy lub powyżej 80 cm i równy lub powyżej 94 cm u Europejczyków). Ponadto, należy stwierdzić występowanie 2 spośród 4 następujących czynników: stężenie triglicerydów powyżej 1,7 mmol/l (150mg/dl) lub leczenie hipertriglicerydemii; ciśnienie tętnicze skurczowe powyżej 130 mmHg i rozkurczowe powyżej 85 mmHg (lub leczenie wcześniej rozpoznanego nadciśnienia tętniczego); zwiększone stężenie glukozy na czczo równe lub powyżej 5,6mmol/l (100mg/dl) lub rozpoznana wcześniej cukrzyca typu 2; obniżone stężenie HDL-C poniżej 1,0 mmol/l (40mg/dl) u mężczyzn i poniżej 1,3 mmol/l (50 mg/dl) u kobiet (lub leczenie tego zaburzenia lipidowego) (Tabela 1).

Tabela 1. Definicja zespołu metabolicznego opracowana przez IDF (wg Handelsman, 2009).

Warunek niezbędny do rozpoznania:
Otyłość brzuszna obwód talii – mężczyźni: >94 cm; kobiety: >80 cm w populacji europejskiej; i wartości swoiste dla innych grup etnicznych. Jeżeli BMI wynosi >30 kg/m ² , pomiar obwodu talii nie jest konieczny do orzeczenia otyłości brzusznej
co najmniej 2 z 4 wymienionych poniżej czynników:
Stężenie triglicerydów ≥ 150 mg/dl ($\geq 1,7$ mmol/l) lub leczenie hipertriglicerydemii
Stężenie cholesterolu HDL – mężczyźni: <40 mg/dl (<1,03 mmol/l); kobiety: <50 mg/dl (<1,29 mmol/l) lub leczenie niskiego stężenia HDL-Cholesterolu
Ciśnienie tętnicze krwi: skurczowe ≥ 130 mmHg lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg, lub leczenie wcześniej rozpoznanego nadciśnienia tętniczego
Stężenie glukozy na czczo ≥ 100 mg/dl ($\geq 5,6$ mmol/l); lub wcześniej rozpoznana cukrzyca. Jeżeli stężenie glukozy na czczo ma wartość wyższą niż podana powyżej, wymagane jest przeprowadzenie doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT), który nie jest niezbędny do orzeczenia zespołu metabolicznego

2.2 Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa jest odmianą tkanki łącznej wykazującą heterogenną budowę. Zbudowana jest głównie z różnej wielkości adipocytów, pomiędzy którymi przebiegają naczynia krwionośne i włókna nerwowe. W tkance tej również znajdują się: multipotencjalne komórki macierzyste, preadipocyty, fibroblasty i komórki epitelialne oraz komórki układu immunologiczno-zapalnego (makrofagi i limfocyty), których ilość rośnie wraz z rozrostem tkanki tłuszczowej (Kiess i inni, 2008; Cinti 2005, Halberg i inni, 2008).

Tkanka tłuszczowa stanowi rezerwę energetyczną i warstwę izolacyjną (podskórna tkanka tłuszczowa), bierze udział w termoregulacji (brunatna tkanka tłuszczowa) oraz osłania i stabilizuje narządy wewnętrzne (podskórna i okołonarządowa tkanka tłuszczowa). Jest tkanką aktywną metabolicznie, w której w adipocytach zachodzi gromadzenie substratów energetycznych – lipidów w postaci triglicerydów (TG) jak i uwalnianie kwasów tłuszczowych (i glicerolu) ze zmagazynowanych w adipocytach TG, w wyniku lipolizy zależnej od hormonów lub stymulacji beta-adrenergicznej (Penicaud i inni, 2000). Ponadto, tkanka ta stanowi organ endokrynnny, który poprzez wytwarzane substancje (adipokiny) reguluje nie tylko procesy metaboliczne całego organizmu, ale również: apetyt, odpowiedź immunologiczno-zapalną, angiogenezę, ciśnienie i krzepnięcie krwi, dojrzewanie tkanek młodego organizmu i jego starzenie (Fonseca-Alaniz i inni, 2008, Ailhaud, 2006; Ouchi i inni, 2011). Tkanka tłuszczowa uczestniczy zatem aktywnie w kontroli żywotności i dobrostanu ustroju (Wozniak i inni, 2009; Oller Do Nascimento i inni, 2009).

2.2.1 Biała i brunatna tkanka tłuszczowa

W organizmach ludzi dominuje biała tkanka tłuszczowa, której nadmiar (przy braku wysiłku fizycznego) może prowadzić do zaburzeń metabolicznych. Główną rolą białej tkanki tłuszczowej jest magazynowanie substratu energetycznego - lipidów w postaci TG w celu ich wykorzystania w okresie zapotrzebowania energetycznego organizmu (generacja ATP, termogeneza w mitochondriach). Adipocyty tej tkanki tłuszczowej są dużymi komórkami, a ich wielkość zależy od zmagazynowanych w ich wnętrzu kropli lipidowych, które składają się głównie z TG i stanowią około 90% objętości komórki. Adipocyty białej tkanki tłuszczowej mają nieliczne, cienkie mitochondria, które są zgromadzone głównie pod błoną komórkową. Budowa

tych komórek umożliwia zatem magazynowanie nadmiaru kwasów tłuszczowych (np. po posiłku), a uwalnianie kwasów tłuszczowych (FFAs) w okresie międzyposiłkowym (Cinti, 2005; Cinti, 2009).

U ludzi biała tkanka tłuszczowa stanowi zręb podskórnej oraz trzewnej tkanki tłuszczowej. Brak podskórnej tkanki tłuszczowej, wynikający z upośledzonej zdolności do jej tworzenia (lipodystrofia nabyta i wrodzona), skutkuje podwyższonym poziomem FFAs w krążeniu, czego konsekwencją jest rozwój insulinooporności i cukrzycy typu 2 (Petersen i inni, 2002; van Wijk i inni, 2005). Tkanka tłuszczowa trzewna charakteryzuje się silniejszą odpowiedzią zarówno lipolityczną jak i endokrynną (uwalniane adipokiny). Stąd trzewna tkanka tłuszczowa jest głównym czynnikiem prowadzącym do rozwoju zespołu metabolicznego (Meng i inni, 2010, Despre's i inni, 2008).

Brunatna tkanka tłuszczowa wykazuje silniejszą aktywność metaboliczną w porównaniu do białej tkanki tłuszczowej (Cinti, 2005; Cannon i Ne Nedergaard, 2005). Tkanka ta odpowiada bowiem za generację niezbędnej do życia energii w postaci ciepła (termogenezę) drogą rozpręganania oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach (Gonzalez-Barroso i inni, 2000; Cannon i Nedergaard, 2010). Najwięcej tej tkanki występuje u małych ssaków (gryzonie) i noworodków, które mają trudność w utrzymaniu odpowiedniej temperatury ciała. Wraz z wiekiem jej ilość ulega redukcji. U ludzi dorosłych szczątkowa brunatna tkanka tłuszczowa jest rozmieszczona w obszarze okołoszyjnym, nadobojczykowym, pachowym, przykregowym, śródpiersiowym oraz nadbrzusznym (Saely i inni, 2010). Jej poziom natomiast i aktywność u ludzi rośnie po ekspozycji na zimno, w odpowiedzi na stymulację β -adrenergiczną (Cinti, 2005; Cannon i inni, 2004). W celu pełnienia wyżej wymienionych funkcji, adipocyty brunatnej tkanki tłuszczowej zawierają liczne, lecz drobne krople lipidowe oraz wiele dużych i sferycznych mitochondriów posiadających białko rozpręgające UCP1 (ang. *uncoupling protein 1*) (Gonzalez-Barroso i inni, 2000). W związku z dużą aktywnością metaboliczną, tkanka ta jest silniej unaczyniona i unerwiona niż biała tkanka tłuszczowa.

U ludzi z nadwagą lub otyłych, funkcja metaboliczna tej tkanki jest obniżona, a generacja adipokin jest nasiloną (Saito i inni, 2009). Stąd ukierunkowanie różnicowania komórek białej tkanki tłuszczowej w kierunku brunatnej mogłoby stanowić sposób leczenia otyłości (Himms-Hagen i inni, 2001; Cannon i Nedergaard, 2010). Przy głodzeniu, przebywaniu w niższych temperaturach, zwiększeniu wysiłku fizycznego może bowiem dojść do odróżnicowania się białej

tkanki tłuszczowej w brunatną (*Barbatelli i inni, 2010*). Po adrenergicznej stymulacji (ekspozycja na zimno lub po stymulacji agonistami receptora beta 3 adrenergicznego) wzrasta biogeneza mitochondriów i ekspresja UCP1 w komórkach białej tkanki tłuszczowej. Ten efekt koreluje ze zmniejszeniem masy ciała w otyłości indukowanej dietą. Zatem u ludzi liczba adipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej w obrębie białej tkanki tłuszczowej zależy od czynników środowiskowych (*Guerra i inni, 1998*).

2.2.2 Endokrynną aktywność tkanki tłuszczowej

W komórkach tkanki tłuszczowej (zwłaszcza brzusznej) wytwarzane są białka (adipokiny) pełniące różnorodne funkcje: autokrynną, parakrynną lub endokrynną w ustroju. W otyłości i/lub metabolicznych zaburzeniach dochodzi do zaburzenia równowagi w ich wytwarzaniu. Zmiany w poziomie adipokin prowadzą do zakłócenia insulinowrażliwości i przemian metabolicznych (*Ailhaud, 2006; Ouchi i inni, 2011, Achima i Flier, 2000; Gimeno i inni, 2005; Hutley i Prins, 2005*) (Ryc. 1). Wśród adipokin wyróżnia się (Tabela 2): białka regulujące metabolizm glukozy/lipidów, białka prozapalne jak i adipokiny przeciwzapalne, substancje stymulujące naczyniotworzenie jak również pełniące odmienne funkcje (uczestniczące w kaskadzie krzepnięcia; w regulacji ciśnienia krwi; kontrolujące: apetyt, dojrzewanie komórek progenitorowych i inne) (Tabela 2). Poniżej opisano funkcje wybranych adipokin. Angiogenne właściwości tych substancji przedstawiono w rozdziale 2.3.2.2.

2.2.2.1 Adipokiny biorące udział w równowadze energetycznej/metabolizmie Leptyna

Leptyna jest nieglikozylowanym hormonem peptydowym o masie 16 kDa, ulegającym ekspresji w: adipocytach, śluzówce żołądka i gruczole mlecznym (*Kopff i inni, 2005*). Synteza tej adipokiny jest regulowana: podczas pobierania pokarmu, przez status energetyczny komórki jak i poprzez białka prozapalne (*Chan i inni, 2005; Bates i inni, 2003; Myers i inni, 2008*). Leptyna wydzielana przez tkankę tłuszczową; działając na podwzgórze; po przekroczeniu bariery krew-mózg; reguluje: apetyt, ilość zużywanej przez organizm energii, różnicowanie komórek progenitorowych oraz angiogenezę (*Friedman i Halaas, 1998; Lee i inni, 2009; Fantuzzi i Faggioni, 2000; Ribatti i inni, 2008*). Ilość leptyny koreluje z masą tkanki tłuszczowej, zatem jej poziom rośnie w surowicy krwi osób otyłych (*Tokuda i inni, 2008*). Jej działanie

centralne jest związane z hamowaniem sekrecji neuropeptydu Y (NPY) oraz ze stymulacją sekrecji proopiomelanokortyny (POMC), co prowadzi do zmniejszenia apetytu (*Sahu, 2008; Wang i inni, 2008*). W ośrodkowym układzie nerwowym głównym miejscem jej działania jest jądro łukowate podwzgórza, w którym znajdują się receptory dla leptyny (*Tokuda i inni, 2008; Bates i Myers, 2003*). Aktywność leptyny stymuluje również katabolizm (beta-oksydację) lipidów w wątrobie oraz lipolizę w mięśniach szkieletowych i adipocytach (*Long i Zierath, 2006*). Ta adipokina zwiększa proces beta-oksydacji także i w innych tkankach (*Lee i inni, 2002*), a zaburzenie jej działania prowadzi do akumulacji TG w komórkach wątroby i narządów obwodowych. Leptyna hamuje również hydrolizę estrów cholesterolu i w ten sposób przyczynia się do powstania komórek piankowatych, będących składnikami blaszek miażdżycowych (*O'Rourke i inni, 2002*). Otyłości towarzyszy podwyższony poziom leptyny przy uczuciu głodu, co może wynikać z centralnej leptynooporności (*Munzberg i Myers, 2005*). Zjawisko to może być związane z upośledzeniem transportu leptyny do mózgu lub zmniejszeniem ekspresji jej receptora w podwzgórzu (*Stocker i Cawthorne, 2008*). Adipokina ta stymuluje lipolizę, hamuje lipogenezę, poprawia insulinowrażliwość, zwiększa metabolizm glukozy oraz stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych. Leptyna wykazuje również działanie prozapalne poprzez: aktywację prozapalnych komórek, promowanie odpowiedzi limfocytów Th1 oraz poprzez pośredniczenie w produkcji prozapalnych cytokin: TNF α , IL-2, IL-6. U ludzi, leptyna stymuluje również proliferację i aktywację monocytów w hodowlach *in vitro*, a hamuje miogenezę (*Fernández-Riejos i inni, 2010; Yu i inni, 2008; Rodriguez i inni, 2010*).

Adiponektyna

Adiponektyna jest białkiem o masie 30kDa wykazującym homologię z kolagenem VIII i X, oraz z czynnikiem dopełniacza C1q. Jest wytwarzana wyłącznie przez adipocyty. Wykazano, że w cukrzycy typu 2 i zespole metabolicznym, a także w insulinooporności i otyłości poziom tej adipokiny obniża się (*Hajer i inni, 2007; Gil-Campos i inni, 2004*).

Adiponektyna jest substancją pełniącą funkcję przeciwzapalną, przeciwmiażdżycową oraz wykazującą działanie ochronne przed rozwojem cukrzycy (*Matsuda i inni, 2002; Stefan i Stumvoll, 2002*). Adipokina ta hamuje bowiem glukoneogenezę w wątrobie, stymuluje wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe, zwiększa utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie oraz indukuje produkcję ATP w mitochondriach (*Kadowaki i Yamauchi, 2005*;

Liu i inni, 2010; Zhou i inni, 2005). Adipokina ta promuje również odkładanie TG w adipocytach, zapobiegając ich magazynowaniu w wątrobie i mięśniach, co prowadzi do zwiększenia insulinowrażliwości (*Kim i inni, 2007*). Ponadto, osoby z wyższym stężeniem adiponektyny w surowicy krwi są mniej podatne na rozwój cukrzycy (*Lindsay i inni, 2002*). W badaniach wykazano, że wartości stężeń adiponektyny korelują dodatnio z wartościami: wskaźnika insulinowrażliwości QUICKI (ang. *quantitative insulin-sensitivity check index*) oraz stężenia cholesterolu frakcji HDL (*Lindsay i inni, 2005*). Adiponektyna reguluje również ciśnienie krwi poprzez nasilenie uwalniania tlenku azotu (NO) poprzez komórki śródbłónka naczyń (*Long i inni, 2006*).

Rezystyna

Rezystyna jest peptydem o masie 12kDa. Jest wytwarzana głównie przez makrofagi, ale również przez: mięśnie, komórki trzustki i adipocyty. Adipokina ta poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB, indukuje prozapalne cytokiny: IL-1, IL-6, IL-12 i TNFα (*Kusminski i inni, 2005*). Rezystyna aktywuje również enzymy glikoneogenezy i nasila glikogenolizę, czego konsekwencją jest zwiększenie wątrobowej oporności na insulinę. Fizjologiczną rolą tej adipokiny jest podtrzymywanie odpowiedniej glikemii podczas głodu (*McTernan i inni, 2006*).

Chemeryna

Chemeryna jest chemokiną ulegającą ekspresji w białej tkance tłuszczowej i wywierającą istotny wpływ na dojrzewanie adipocytów i ich metabolizm (*Goralski i inni, 2007; Roh i inni, 2007*). Jej poziom jest wyższy u osób otyłych (*Goralski i inni, 2007*) i wzrasta podczas różnicowania preadipocytów do adipocytów. Wyłączenie genu chemeryny lub jej receptora zaburza dojrzewanie preadipocytów. Białko to promuje stymulowany insuliną wychwyt glukozy oraz zwiększa przekaznictwo sygnału od receptora insuliny (*Bozaoglu i inni, 2007*).

Adypsyna

Adypsyna nazywana również ludzkim czynnikiem dopełniacza D46 jest enzymem biorącym udział w alternatywnej ścieżce aktywacji dopełniacza (*Paglialunga i inni, 2008*). Jej poziom rośnie u ludzi otyłych (*Masłowska i inni, 1999*). Jest produkowana przez adipocyty

i makrofagi M2. Jest proteazą wykazującą dużą homologię do czynnika dopełniacza D. Bierze udział w syntezie białka ASP (ang. *acylation-stimulating protein*). Adypsina stymuluje również magazynowanie TG i hamuje lipolizę (Lago i inni, 2007; Lago i inni, 2009).

Apelina

Apelina jest bioaktywnym peptydem, będącym endogennym ligandem dla receptora orfanowego, który jest homologiem receptora dla angiotensyny II (Sun i inni, 2011). Adipokina ta jest wytwarzana przez adipocyty, ale również komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej (SVF) (ang. *stromal vascular fraction cells*). Jest ona związana z otyłością i insulinowrażliwością, choć nadal trwają badania nad aktywnością tej cytokiny. Bezpośredni wpływ na ekspresję genu dla apeliny ma insulina (działa poprzez aktywację kinazy fosfotydyloinozytolu, kinazy białkowej C i p38 MAPK). Głód jest czynnikiem hamującym wydzielanie apeliny, a jej stężenie wzrasta (podobnie jak stężenie insuliny) po posiłku (Wei i inni, 2005). Apelina zmniejsza pobieranie pokarmu, hamuje indukowane glukozą uwalnianie insuliny, indukuje syntezę NO, a hamuje przekaznictwo sygnału od angiotensyny II. Peptyd ten stymuluje również wychwyt glukozy w mięśniu szkieletowym przez mechanizm zależny od AMP kinazy (Lago i inni, 2007; Lago i inni, 2009, i Attané i inni, 2011).

Wisfatyna

Wisfatynę zidentyfikowano w 2004 roku u myszy i u ludzi, jako substancję wytwarzaną przede wszystkim przez trzewną tkankę tłuszczową (stąd pochodzi jej nazwa – ang. *visceral fat*). Odkryte białko było strukturalnie homologiczne z syntetyzowaną przez limfocyty cytokiną PBEF (ang. *pre-beta cell colony- enhancing factor*), określoną w 1994 roku jako substancja produkowana przez limfocyty i stymulująca ich dojrzewanie oraz odpowiedź zapalną (Fukuhara i inni, 2005). Wisfatyna jest obecnie uważana za pozakomórkową formę enzymu - fosforybozyltransferazy nikotynamidu eNAMPT (ang. *extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase*). Enzym ten jest niezbędny do syntezy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego NAD (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) (Pittelli i inni, 2010), który odgrywa kluczową rolę m. in. w regulacji białka - sirtuiny 1 (SIRT1), wykazującej aktywność deacetylazy histonowej (zwanej „genem długowieczności”) (Borradaile i inni, 2009). Wisfatyna jest produkowana przez adipocyty, ale również neutrofile (Garten i inni, 2010;

Costford i inni, 2010). W dotychczasowych analizach wykazano, że ekspresja wisfatyny wzrasta w otyłości (*de Luis i inni, 2010*). Substancja ta indukuje chemotaksję i produkcję IL-1 β , TNF- α i IL-6 w monocytach oraz zwiększa proliferację limfocytów typu B.

Adipokinie tej przypisuje się również zdolność do wiązania i pobudzania receptorów insulinowych, a więc działanie insulinomimetyczne (*Fukuhara i inni, 2005; Guzik i inni, 2006; Revollo i inni, 2007*). Wisfatyna (podobnie do insuliny) zwiększa wychwyt glukozy przez adipocyty i komórki mięśniowe, hamuje natomiast uwalnianie glukozy przez hepatocyty. Podobnie jak insulina wywołuje akumulację TG w preadipocytach i zwiększa syntezę TG z glukozy (*Garten i inni, 2009; Lago i inni 2007*).

Waspina

Waspina jest inhibitorem proteazy serynowej, produkowanym przez adipocyty. Zwiększa insulinowrażliwość, hamuje uwalnianie rezystyny, leptyny i TNF α . Jej poziom wzrasta w otyłości (*Klötting i inni, 2006*).

Omentyna

Omentyna jest wytwarzana przez komórki SVF. Adipokina ta zwiększa stymulowany insuliną transport glukozy w adipocytach i reguluje funkcje insuliny. Funkcją omentyny jest zwiększanie insulinowrażliwości zarówno miejscowo jak i ogólnoustrojowo (*Moreno-Navarrete i inni, 2010*). Omentyna stymuluje bowiem insulinozależny wychwyt glukozy zarówno w adipocytach podskórnej tkanki tłuszczowej jak i trzewnej. Przypuszcza się, że omentyna działając parakrynnie, zwiększa insulinowrażliwość i stymuluje metabolizm glukozy, wpływając w ten sposób na dystrybucję tkanki tłuszczowej (*Yang i inni, 2006*).

Lipokalina-2

Lipokalina-2 jest sekrecyjną glikoproteiną. Jej produkcja jest regulowana przez aktywację zapalenia. Synteza tej adipokiny odbywa się w: adipocytach, makrofagach, ale również neutrofilach oraz komórkach wątroby i nerek. Lipokalina-2 zaburza metabolizm glukozy i insulinowrażliwość (*Esteve i inni, 2009; Jin i inni, 2011*).

Białko wiążące retinol-4 (RBP4) (ang. *retinol binding protein 4*)

RBP4 należy do rodziny lipokalin i jest transporterem retinolu we krwi, produkowanym przez adipocyty oraz przez wątrobę (Hassink i inni, 2009). Białko to promuje insulinooporność i rozwój cukrzycy typu 2 (Ou i inni, 2011). Poziom RBP4 jest podwyższony u osób chorujących na cukrzycę typu 2 (Mody i inni, 2008).

2.2.2.2 Adipokiny prozapalne

Czynnik chemotaktyczny monocytów 1 (MCP1) (ang. *monocyte chemotactic protein 1*)

MCP1 jest cytokiną, która stymuluje migrację komórek układu odpornościowego do miejsca zapalenia. W otyłości występuje zwiększona infiltracja tkanki tłuszczowej przez makrofagi, które wydzielają białka prozapalne (m. in.: IL-6 i TNF α), przyczyniające się do nasilenia insulinooporności. Białko to hamuje fosforylację kinazy tyrozynowej receptora insuliny i obniża stymulowany insuliną dokomórkowy transport glukozy (Sell i Eckel, 2007). Ponadto, MCP1 hamuje wzrost i różnicowanie adipocytów poprzez regulację ekspresji genów związanych z adipogenezą (Cancello i inni, 2006; Juge-Aubry i inni, 2005).

Interleukina 1 (IL-1)

IL-1 jest generowana przez: monocyty, komórki śródbłonna, fibroblasty i inne. Cytokina ta indukuje: ekspresję białek ostrej fazy, proliferację komórek (limfocytów, fibroblastów, komórek mięśni gładkich ściany naczyń), produkcję przeciwciał i cytokin oraz stymuluje angiogenezę (Moschen i inni, 2011). Odnośnie metabolizmu, IL-1 zaburza homeostazę glukozy i insulinowrażliwość. Zmniejsza ekspresję i aktywność lipazy lipoproteinowej (LPL) oraz obniża różnicowanie adipocytów poprzez zahamowanie ekspresji receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR γ) (ang. *peroxisome proliferation activated receptors* γ).

Ponadto, IL-1 i TNF α stymulują ekspresję międzykomórkowej molekuly adhezyjnej 1 (ICAM-1) (ang. *intercellular cell adhesion molecule 1*) oraz molekuly adhezyjnej 1 komórek naczyńniowych (VCAM-1) (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) (Cancello i inni, 2006; Juge-Aubry i inni, 2005).

Interleukina -6 (IL-6)

IL-6 jest produkowana przez monocyty, adipocyty, komórki śródbłónka, fibroblasty i inne. Cytokina ta inicjuje odpowiedź immunologiczno-zapalną (*Popko i inni, 2010, Fernández-Real i inni, 2001*). Jedna trzecia krążącej w naczyniach krwionośnych IL-6 pochodzi z tkanki tłuszczowej. Wytwarzanie tej cytokiny w tkance trzewnej jest 2–3-krotnie wyższe niż w tkance podskórnej. IL-6 zmniejsza przekazywanie sygnału od insuliny i leptyny oraz indukuje uwalnianie białka ostrej fazy - CRP z wątroby. W otyłości, za produkcję tej cytokiny są głównie odpowiedzialne preadipocyty i makrofagi tkanki tłuszczowej (*Popko i inni, 2010*). Adipokina ta obniża ekspresję białka substratowego 1 receptora insulinowego IRS-1 (ang. *insulin receptor substrate-1*) i transportera glukozy Glut4. Indukuje również lipolizę, ale i utlenianie kwasów tłuszczowych. Wysoki poziom IL-6 stanowi ponadto czynnik ryzyka dla rozwoju cukrzycy typu 2 i powikłań sercowo-naczyniowych (*Lee i inni, 2009*). Cytokina ta hamuje również ekspresję receptorów insulinowych w naczyniach (*Sabio i inni, 2008*). W tkankach obwodowych natomiast, zmniejsza adipogenezę i wydzielanie adiponektyny oraz ekspresję wisfatyny. W ośrodkowym układzie nerwowym z kolei, stężenie IL-6 ujemnie koreluje z ilością tkanki tłuszczowej u osób z nadwagą, co sugeruje odmienne działanie IL-6 na obwodzie i w ośrodkowym układzie nerwowym (*Cancello i inni, 2006; Klein i inni, 2007*).

Czynnik martwicy nowotworów α TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*)

TNF- α jest cytokiną (zwaną historycznie kachektyną), która indukuje insulinooporność i zwiększa lipolizę w adipocytach (*Hotamisligil i inni, 1993*). TNF- α jest również modulatorem apoptozy (*Lau i inni, 2011*) oraz hamuje aktywność genów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych i glukozy. Cytokina ta również zmniejsza wydzielanie niektórych adipokin, w tym adiponektyny, promując w ten sposób lokalnie insulinooporność w tkankach (*Maury i inni, 2009*). W wątrobie cytokina ta hamuje ekspresję genów związanych z transportem glukozy do komórek i utlenianiem kwasów tłuszczowych (*Cancello i inni, 2006; Juge Aubry i inni, 2005*). TNF- α zwiększa również ekspresję IL-6 oraz białek adhezyjnych w ścianie naczynia. Cytokina ta aktywuje również ekspresję receptorów wymiatających (ang. *scavenger receptors*), stymuluje pobieranie przez makrofagi utlenionych form lipoprotein o małej gęstości ox LDL (ang. *oxidised low density lipoproteins*) oraz indukuje infiltrację makrofagów w ścianie naczynia (*Ohta i inni, 2005*).

Interleukina – 8 (IL-8)

IL-8 (CXCL8) jest chemokiną promującą rozwój stanu zapalnego poprzez indukcję migracji komórek układu immunologicznego: np. monocytów. Cytokina ta stymuluje adhezję i tzw. „rolling” komórek odczynu zapalnego do śródbłonka. Synteza tego białka odbywa się w śródbłonku naczynia, ale i w komórkach SVF (ang. *stromal vascular fraction cells*). Chemokina ta również promuje angiogenezę. W otyłości jej poziom istotnie wzrasta (Cancello i inni, 2006; Juge-Aubry i inni, 2005).

2.2.2.3 Adipokiny przeciwzapalne

Antagonista receptora dla IL-1 (IL-1Ra)

Antagonista receptora dla IL-1 (IL-1Ra) jest produkowany w odpowiedzi na stres przez M2 makrofagi w celu zahamowania odpowiedzi zapalnej w warunkach fizjologicznych. Wykazano, że podwyższenie jego poziomu jest związane z insulinoopornością (Cancello i inni, 2006; Juge-Aubry i inni, 2005).

Interleukina – 10 (IL-10)

IL-10 jest cytokiną uwalnianą przez aktywowane makrofagi i limfocyty. Niski poziom tej substancji występuje w otyłości, zespole metabolicznym oraz cukrzycy (Esposito i inni, 2004). Cytokina ta działa przeciwzapalnie, stymuluje insulinowrażliwość oraz chroni komórki śródbłonka poprzez działanie antagonistyczne w stosunku do TNF- α i IL-6 (Gunnnett i inni, 2002; Esposito i inni, 2004).

Sfrp5 (ang. *secreted frizzled-related protein 5*)

Sfrp5 jest białkiem uczestniczącym w przekaznictwie sygnału w szlaku Wnt, który jest odpowiedzialny za przetrwanie komórek progenitorowych (hamuje różnicowanie komórek np. osteoblastów) (Day i inni, 2005). Białko to jest uważane za adipokinę przeciwzapalną, której ekspresja jest obniżona w otyłości i cukrzycy typu 2, co potwierdzają badania na modelach zwierzęcych. Myszy z wyłączonym genem Sfrp5 skarmiane dietą wysokotłuszczową, wykazują bowiem nietolerancję glukozy i odkładanie złogów tłuszczowych w wątrobie oraz akumulację makrofagów w tkance (Ouchi i inni, 2010).

2.2.2.4 Inne adipokiny

Czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VEGF jest głównie wytwarzany przez komórki śródbłónka, ale również komórki SVF oraz makrofagi tkanki tłuszczowej, głównie trzewnej (Rehman i inni, 2004). Reguluje angiogenezę również tkanki tłuszczowej (rozdział 2.3.2.1.2). Poziom tego czynnika wzrostowego w surowicy krwi dodatnio koreluje z masą tkanki tłuszczowej trzewnej oraz ulega podwyższeniu podczas różnicowania adipocytów (Miyazawa-Hoshimoto i inni, 2003). Ponadto zaobserwowano, że insulina jest silnym aktywatorem ekspresji genu VEGF oraz stymuluje uwalnianie tego białka przez adipocyty w hodowlach *in vitro* (Mick i inni, 2002). Prozapalne cytokiny również indukują ekspresję tego czynnika w tkance tłuszczowej zarówno w hodowlach *in vitro* jak i w badaniach *in vivo* (Rega i inni, 2007).

Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) (ang. *tissue type plasminogen activator*)

t-PA jest najważniejszym, szybko działającym aktywatorem plazminogenu, który przekształca plazminogen w plazminę.

Inhibitor 1 aktywatora plazminogenu (PAI-1) (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PAI-1 jest inhibitorem proteaz serynowych. Hamuje fibrynolizę poprzez tworzenie kompleksów z t-PA i urokinazowym aktywatorem plazminogenu (u-PA) (ang. *urokinase-type plasminogen activator*). Jest produkowany głównie przez komórki śródbłónka i płytki krwi, ale także przez preadipocyty (Mertens, 2002). U osób z otyłością i insulinoopornością stwierdza się podwyższone stężenie PAI-1 (wyższe w tkance tłuszczowej trzewnej niż podskórnej) (Alessi i inni, 1997).

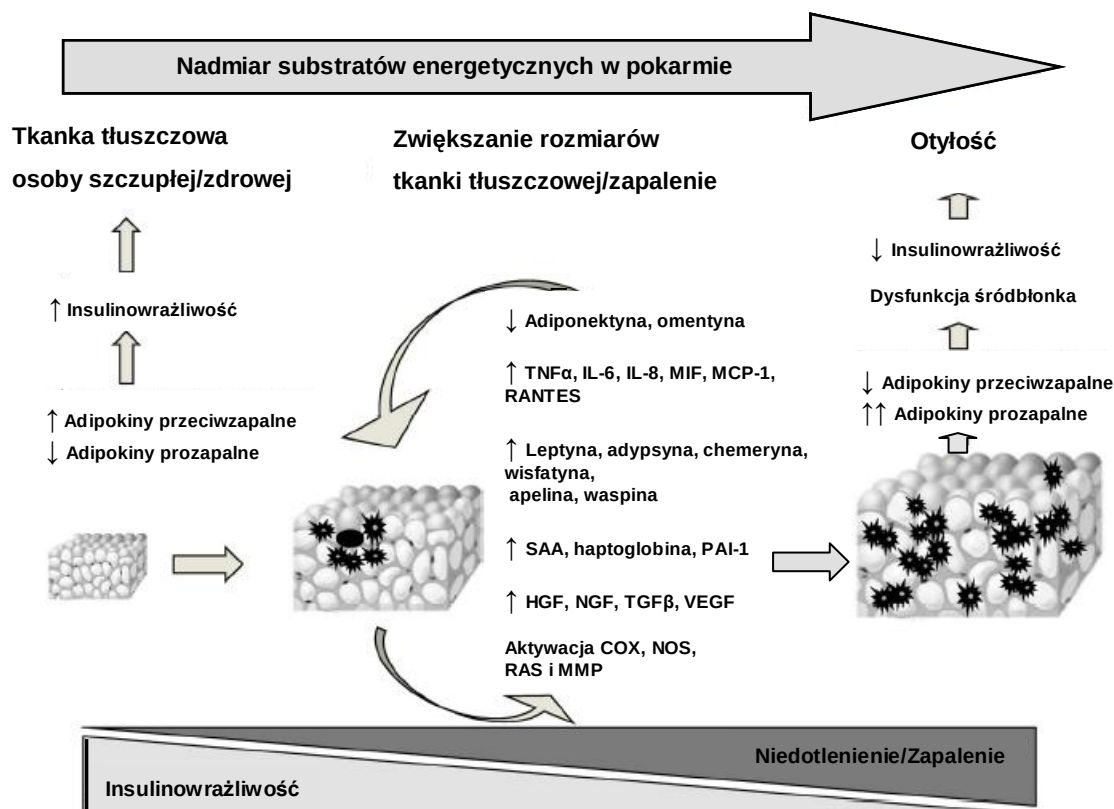
Komponenty układu renina-angiotensyna (RAS) (ang. *renin-angiotensin system*)

Tkanka tłuszczowa wytwarza również komponenty RAS, do których m. in. zaliczamy: angiotensynogen (AGT), konwertazę angiotensyny (ACE) (ang. *angiotensin-converting enzyme*) i angiotensynę 2. Angiotensynogen jest prekursorem dla syntezy angiotensyny 2 związanej z regulacją ciśnienia krwi. Angiotensyna 2 jest produkowana przez komórki SVF i adipocyty.

Angiotensynogen stymuluje stan zapalny w naczyniach, a jego poziom wzrasta w otyłości. Prawdopodobnie ta adipokina bierze również udział w procesie różnicowania

preadipocytów do adipocytów z udziałem wyżej opisanego antagonisty receptora dla IL-1 (IL1Ra) (Karastergiou i inni, 2010).

Haptoglobina jest markerem otyłości, gdyż jej poziom rośnie wraz ze wzrostem masy ciała. Jest glikoproteiną, która należy do białek ostrej fazy (Fain i inni, 2004).



Ryc. 1. Schemat zmian zachodzących w tkance tłuszczowej podczas zwiększania jej rozmiarów (wg Karastergiou, 2010).

Podczas przyjmowania nadmiaru substratów energetycznych tkanka tłuszczowa rozrasta się, co prowadzi do hipertrofii i apoptozy adipocytów oraz do uwalnianiania chemotaktycznych adipokin (np. MCP-1), czego rezultatem jest stymulacja infiltracji makrofagów do tkanki i wzrost jej odpowiedzi prozapalnej. Zmianom w poziomie wytwarzanych adipokin towarzyszy wzrost insulinooporności i niedotlenienia.

COX – cyklooksygenaza, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów 1, MIF – czynnik zahamowania migracji monocytów, MMP – metaloproteinaza macierzy, NGF – czynnik wzrostu neuronów, NOS – syntaza tlenku azotu, PAI-1 – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu, RANTES (ang. *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), RAS – układ renina-angiotensyna, SAA – surowiczy amyloid A, TGFβ - transformujący czynnik wzrostowy β, TNFα - czynnik martwicy nowotworów α, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

Tabela 2. Funkcje adipokin.

Adipokina	Metabolizm	Prozapalne adipokiny	Przeciwzapalne adipokiny	Angiogeneza
Leptyna	✓	✓		✓
Adiponektyna	✓		✓	✓
Rezystyna	✓	✓		✓
Chemeryna	✓			✓
Adypsyna	✓	✓		
Apelina	✓			✓
Wisfatyna	✓	✓		✓
Waspina	✓		✓	
Omentyna	✓			
Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	✓			✓
Haptoglobina		✓		
Lipokalina 2	✓	✓		
RBP4	✓			
IL-6	✓	✓		
MCP1	✓	✓		
MIF		✓		
TNF alfa	✓	✓		✓
IL-1Ra	✓		✓	
IL-1	✓	✓		✓
IL-8		✓		✓
IL-10	✓		✓	
IL-4		✓		✓
IL-18		✓		
Sfrp5	✓		✓	
u-PA				✓
t-PA				✓
Angiotensynogen		✓		
Angiotensyna				✓
Haptoglobina		✓		
Angiopoetyna 1				✓
Angiopoetyna 2				✓
Czynnik wzrostowy fibroblastów FGF				✓
Czynnik wzrostowy hepatocytów HGF	✓			✓
Czynnik wzrostowy nerwów NGF				✓
Czynnik tkankowy				✓
VEGF				✓
TGFβ	✓			✓

2.2.3 Metaboliczna aktywność tkanki tłuszczowej

Biała tkanka tłuszczowa jest aktywnym metabolicznie organem, który reaguje na status energetyczny organizmu poprzez aktywację biochemicznych szlaków lipogenezy lub lipolizy. Magazynowanie lipidów w postaci TG w adipocytach jest indukowane przez insulinę i czynnik insulinopodobny (IGF) poprzez obniżenie poziomu cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) i aktywności kinazy białkowej A (PKA) oraz poprzez zahamowanie fosforylacji hormonozależnej lipazy (HSL). Działanie antylipolityczne wykazują również: prostaglandyna E2 (PGE2) oraz neuropeptyd Y (NPY) (Schoelch i inni, 2004; Valet i inni, 1990; Duncan i inni, 2008; Jaworski i inni, 2009).

Synteza TG (Coleman i Lee, 2004) (Ryc. 2) wymaga obecności glicerolo-3-fosforanu oraz kwasów tłuszczowych estryfikowanych koenzymem A (acyloCoA). Glicerolo-3-fosforan jest pozyskiwany ze szlaku glikolizy jako bezpośredni produkt działania aldolazy lub jako produkt izomeryzacji fosfodihydroksyacetonu. Adipocyty nie posiadają kinazy glicerolowej, co uniemożliwia im syntezę glicerolo-3-fosforanu bezpośrednio z glicerolu, dlatego też glikoliza pozostaje w tych komórkach jedynym jego źródłem (Coleman i Lee, 2004).

Proces syntezy glicerolo-3-fosforanu jest kontrolowany przez insulinę. Insulina uwolniona w czasie posiłku stymuluje translokację transpotera GLUT4 do błony komórkowej, co prowadzi do zwiększenia transportu glukozy. Metabolizm heksoz w kierunku glikolizy jest przyspieszany przez insulinę, czego konsekwencją jest większa produkcja glicerolo-3-fosforanu (Sethi, 2007; Lafontan, 2008).

Kwasy tłuszczowe do syntezy TG w tkance tłuszczowej pochodzą głównie z lipoprotein (Large i inni, 2004) (Ryc. 2). Kwasy tłuszczowe uwalniane z krążących lipoprotein przez lipazę lipoproteinową śródbłonka (LPL), dyfundują przez błonę adipocyta. W transporcie tym bierze udział receptor CD36, który prezentuje kwasy tłuszczowe białku transportującemu kwasy tłuszczowe FATP (AP2) (ang. *fatty acid transport protein*). Drugim źródłem kwasów tłuszczowych do syntezy TG w adipocycie jest ich powstawanie *de novo* z acetylo-CoA, będącego produktem dekarboksylacji oksydacyjnej pirogronianu pochodzącego z glikolizy. Kluczowym enzymem tej syntezy jest karboksylaza acetylo-CoA, w wyniku działania której powstaje malonylo-CoA, pełniący również rolę regulacyjną. Tworzenie malonylo-CoA jest regulowane dostępnością substratów (cytrynian stymuluje), statusem energetycznym komórki (AMP hamuje) oraz hormonalnie (insulina stymuluje, glukagon i adrenalina hamują).

Wydłużanie łańcucha acylowego (do 16 atomów węgla) syntetyzowanego *de novo* kwasu tłuszczowego przebiega z udziałem cytoplazmatycznego kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych (FAS) (*Duplus i inni, 2000; Sethi, 2007*).

Proces syntezy TG poprzedza aktywacja kwasów tłuszczowych, polegająca na ich estryfikacji z CoA z udziałem cytoplazmatycznej syntetazy acylo-CoA. Częsteczki acylo-CoA przenoszone są na kolejne grupy hydroksylowe glicerolo-3-fosforanu. W wyniku pierwszej reakcji acylacji w pozycji C-1 przyłączony zostaje kwas nasycony i powstaje lizofosfatyna. W acylacji węgla C-2 zazwyczaj bierze udział reszta kwasu nienasyconego. Ostatnia acylacja poprzedzona jest usunięciem grupy fosforanowej przez fosfatazę i prowadzi do utworzenia triacyloglicerolu.

Natomiast w czasie ujemnego bilansu energetycznego lub zwiększonego zapotrzebowania na energię (np. podczas głodu, wysiłku fizycznego, pomiędzy posiłkami) rezerwy TG ulegają lipolizie, a zatem TG są hydrolizowane do kwasów tłuszczowych i glicerolu (*Kolditz i Langin, 2010; Ahmadian i inni, 2007*). Uwalnianie kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej zależy od aktywności hormonozależnej lipazy tkanki tłuszczowej (HSL) i jej współdziałania z białkami błony kropli lipidowych – tzw. białkami PAT (perylipina, adipofilina i TIP47). Preferowanym substratem dla lipazy HSL są diacyloglicerole, podczas gdy charakterystyczna dla adipocytów lipaza ATGL preferuje triacyloglicerole, a monoacyloglicerole stanowią substrat dla lipazy MGL (*Lass i inni, 2011, Duncan i inni, 2007*).

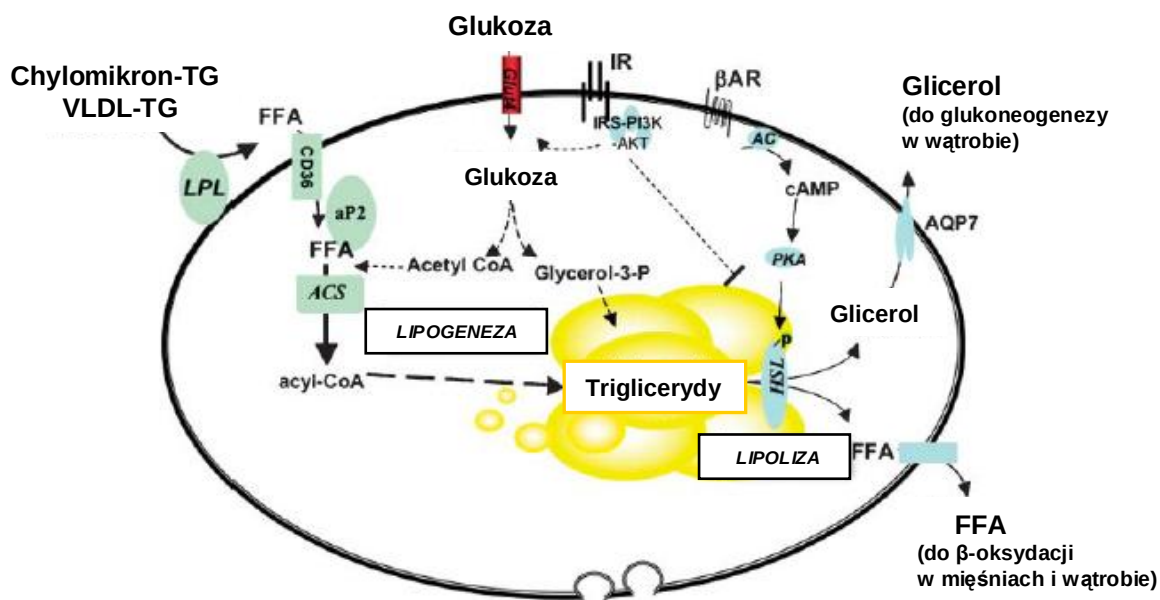
Głównymi aktywatorami lipolizy białej tkanki tłuszczowej (Ryc. 3) są katecholaminy (noradrenalina i adrenalina), glukagon, hormon adrenokortykotropowy (ACTH) oraz glukokortykoidy. Aktywacja receptorów adrenergicznych β przez aminy katecholowe prowadzi do lipolizy poprzez aktywację cAMP i kinazy białkowej A (PKA), podczas gdy aktywacja receptora adrenergicznego α działa antylipolitycznie (*Lafontan, 2008; Stich i inni, 2000; Villena i inni, 2004*). PKA również fosforyluje białko kropli lipidowych – perylipinę, co umożliwia lipazom lepszy dostęp do kropli lipidowych (*Brasaemle, 2007*).

Lipoliza białej tkanki tłuszczowej jest również indukowana przez przedsionkowy (ANP) i mózgowy (BNP) czynnik natriuretyczny, tlenek azotu (NO) oraz L-argininę, która stanowi prekursor NO. Substancje te stymulują lipolizę poprzez aktywację kinazy zależnej od cGMP (PKG) i fosforylację HSL (*Jobgen i inni, 2006; Lafontan 2008*). Lipolityczną aktywność wykazuje również TNF- α uwalniany przez makrofagi i adipocyty głównie brzusznej tkanki

tłuszczowej (Jaworski i inni, 2007). Hormon tyreotropowy (TSH) jest kolejnym białkiem wykazującym aktywność lipolityczną, największą w okresie płodowym. Wraz z wiekiem jego aktywność stopniowo zanika (Gagnon i inni, 2010). Wśród aktywatorów lipolizy można również wyróżnić endogenne substancje aktywujące receptory sprzęgnięte z białkami Gs lub blokujące działanie białek G1 jak np.: inkretyna: glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1) (ang. *glucagon-like peptide-1*), parathormon, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) (ang. *vasoactive intestinal hormone*) (Ruiz-Grande i inni, 1992; Majumdar i Weber, 2010; Taniguchi i inni, 1987; Richter i inni, 1989).

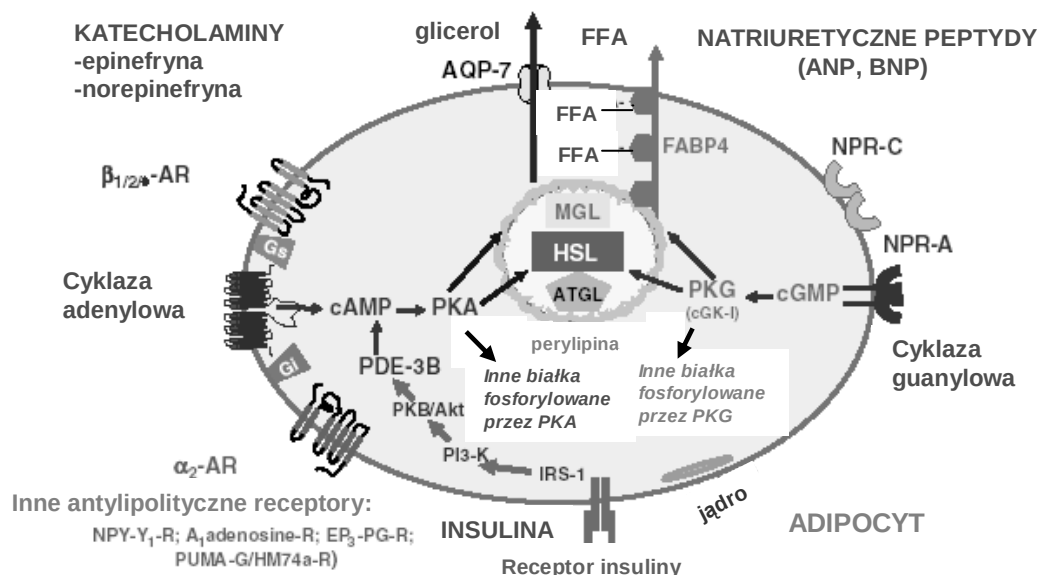
Insulina wykazuje przeciwne działanie do katecholamin czy hormonu wzrostu. Wiąże się bowiem do receptora na adipocytach, co prowadzi do fosforylacji i aktywacji fosfodiesterazy 3B (PDE3B) oraz do obniżenia cAMP, czego konsekwencją jest zahamowanie lipolizy (Choi i inni, 2006).

Uwolnione kwasy tłuszczowe tworzą kompleksy z białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe FABP (ang. *fatty acid binding protein*), a następnie są transportowane do błony komórkowej i przenoszone na zewnątrz komórki przez białko FATP. Glicerol natomiast jest transportowany poza komórkę przez białka akwagliceroporyny (np. akwaporynę 7) (AQP7) (Sethi i inni, 2007).



Ryc. 2. Metabolizm lipidów w adipocytach (wg Sethi, 2007). Opis w tekście.

AC-cyklaza adenylowa, ACS- syntetaza acylo-CoA, aP2 – białko transportujące kwasy tłuszczowe, AQP7 – akwaporyna 7, AR - receptor adrenergiczny, FFA – wolny kwas tłuszczowy, HSL-lipaza hormonozależna, IR – receptor insulinowy, P13K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PKA – kinaza białkowa A.



Ryc. 3. Ścieżki lipolizy w adipocytach (wg Lafontan, 2008).

Przekaznictwo sygnału w adipocytach od katecholamin (poprzez receptory β i α_2 adrenergiczne), od peptydów natriuretycznych (poprzez receptor A NPR-A) oraz od insuliny (poprzez receptor IRS-1). Wewnątrzkomórkowy poziom cAMP jest kontrolowany poprzez: katecholaminy (epinefrynę i norepinefrynę) poprzez związanie z receptorem β adrenergicznym i aktywację cyklazy adenylowej, aktywację receptorów zmniejszających poziom cAMP (α_2 adrenergiczny receptor), adenozyne, prostaglandynę, neuropeptyd Y, kwas nikotynowy oraz insulinę (poprzez aktywację fosfodiesterazy 3B). Czynniki natriuretyczne zwiększają aktywność cyklazy guanylowej zależnej od receptora NPR-A i syntezę cGMP. cAMP i cGMP uczestniczą w zależnej od kinaz (PKA i PKG) fosforylacji HSL i perylipiny. Ufosforylowana perylipina umożliwia hydrolizę TG przez HSL i translokację tego enzymu z cytozolu na powierzchnię kropli lipidowych. Kinazy PKA i PKG fosforylują enzymy i czynniki transkrypcyjne oraz mogą wpływać na uwalnianie różnych molekuł przez adipocyty. Stymulacja receptorów insulinowych przeciwdziała produkcji cAMP poprzez aktywację fosfodiesterazy 3B. Produkty hydrolizy TG (FFAs i glicerol) są uwalniane z adipocytów. FFAs wiążą się z FABP4, są transportowane do błony komórkowej i przenoszone na zewnątrz komórki przez białko transportujące kwasy tłuszczowe FATP. Glicerol jest transportowany poza komórkę przez białka akwagliceroporyny (akwaporynę 7 AQP7) obecne na błonie komórkowej adipocytów.

AC - cyklaza adenylowa, A1 adenosine-R - A1 receptor adenozyne, ATGL - lipaza triglicerydów, AQP-7 - akwaporyna-7, AR - receptor adrenergiczny, EP3-PGR - receptor prostaglandyny EP3, FABP4 – białko 4 wiążące kwasy tłuszczowe, FFA - wolny kwas tłuszczowy, GC - cyklaza guanylowa, Gi - hamujące białko wiążące GTP, Gs - stymulatorowe białko wiążące GTP, HSL - hormonozależna lipaza, IRS-1 - białko substratowe 1 receptora insulinowego, MGL - lipaza monoglicerydowa, NPR-C - receptor peptydu natriuretycznego C, NPY-Y1-R - receptor neuropeptydu Y1, PR-A - receptor peptydu natriuretycznego A, PDE-3B - cykliczny nukleotyd fosfodiesterazy 3B, PI3-K - kinaza 3-fosfatydoinozytolu, PKA - kinaza białkowa A, PKB - kinaza białkowa B/Akt, PKG (cGK-I) - kinaza białkowa G, PUMA-G/HM74a-R - receptor kwasu nikotynowego.

2.3 Rozrost tkanki tłuszczowej

W wyniku napływu nieużytych w mięśniach szkieletowych substratów energetycznych, tkanka tłuszczowa zwiększa swoje rozmiary poprzez stymulację dojrzewania preadipocytów (adipogeneza) oraz zwiększenie rozmiarów adipocytów (hipertrofia) (Ryc. 1) (*Bays i inni, 2008*). Zwiększanie rozmiarów tkanki tłuszczowej prowadzi do indukcji niedotlenienia, które hamuje dalsze dojrzewanie preadipocytów, a indukuje unaczynienie tkanki tłuszczowej (angiogenezę) (Ryc. 1) (*Lafontan, 2008*).

2.3.1 Adipogeneza

Adipogeneza rozpoczyna się w życiu płodowym. Po urodzeniu, tkanka tłuszczowa noworodka gwałtownie się rozrasta w wyniku zwiększenia liczby i rozmiarów komórek. Proces adipogenezy zachodzi również u ludzi dorosłych. Chociaż całkowita liczba adipocytów jest indywidualna i determinowana już podczas dzieciństwa i dorosłości, 10% całkowitej liczby adipocytów jest odnawianych na rok w każdym wieku (*Spalding i inni, 2008*). Podczas adipogenezy macierzyste komórki mezenchymalne podlegają wieloetapowemu procesowi adipogenezy tj. różnicowaniu się komórek preadipocytów (komórek fibroblastopodobnych) do dojrzałych adipocytów (komórek wypełnionych prawie całkowicie lipidami i wrażliwych na działanie insuliny). Na proces różnicowania adipocytów wpływają hormony, cytokiny jak również składniki pokarmowe (kwasy tłuszczowe, glukoza, aminokwasy, kwas retinowy z beta-karotenu, czy witamina D) (*Fève 2005*). W czasie różnicowania zmiana ulega ekspresja genów, co prowadzi do zmiany fenotypu (wyglądu i funkcji komórki) oraz wydzielania wielu z wymienionych powyżej białek (adipokin) charakterystycznych dla dojrzałego adipocyta (*Gregoire, 2001*).

Dojrzewanie adipocyta zaczyna się od zahamowania proliferacji, a następnie aktywowany jest proces różnicowania poprzez dobranie odpowiednich sygnałów mitogennych i adipogennych (*Gregoire, 2001*). W hodowli tkankowej różnicowanie komórek jest indukowane przez mieszaninę adipogennych czynników zawierającą: insulinę (o wyższym stężeniu niż fizjologiczne), deksametazon (DEX) oraz izobutylometyloksantynę (IBMX) (*Rosen i inni, 2000*). Insulina stymuluje akumulację lipidów w komórkach tłuszczowych oraz wykazuje działanie antyapoptotyczne (*Girard i inni, 1994; Kiess i Gallaher, 1998*).

Deksametazon należy do glukokortykoidów, które indukują adipogenezę poprzez aktywację adipogennych czynników transkrypcyjnych C/EBP δ (ang. *CCAAT/Enhancer Binding Protein δ*) i PPAR- γ (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) (Cao i inni, 1991; Wu i inni, 1996). Ponadto, deksametazon hamuje ekspresję czynnika pref-1 (ang. *preadipocyte factor-1*), wykazującego działanie anty-adipogenne (Smas i inni, 1999). IBMX z kolei indukuje adipogenezę poprzez zwiększenie poziomu cAMP w komórce, który bierze udział w aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cAMP-activated transcription factor*) uczestniczącego w adipogenezie (Reusch i inni, 2000). Z drugiej strony, IBMX stymuluje adipogenezę poprzez obniżenie poziomu czynnika transkrypcyjnego Sp1, hamującego ekspresję C/EBP α w komórce (Tang i inni, 1999).

Różnicowaniu komórek w obecności czynników adipogennych towarzyszy wspomniana powyżej zmiana kształtu komórek z fibroblastycznego na sferyczny, co wynika z aktywacji białek cytoszkieletu (Gregoire, 2001). Po zahamowaniu wzrostu komórek, preadipocyty ulegają przynajmniej jednemu cyklowi replikacji DNA, co prowadzi do podwojenia ich liczebności (etap ekspansji klonalnej) (Rosen i inni, 2000). Po proliferacji preadipocytów różnicowanie jest indukowane przez czynniki transkrypcyjne: C/EBP α , β , γ (ang. *CCAAT/Enhancer Binding Protein*) oraz SREBP-1c (ang. *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*), FOXC2 (ang. *Forkhead box protein C2*) i PPAR γ (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) (Ryc. 4).

Poznana jest częściowo sekwencja ekspresji czynników transkrypcyjnych i ich koaktywatorów wiodąca do promowania adipogenezy (Valet i inni, 2002). Czynniki transkrypcyjne C/EBP β , i γ ulegają ekspresji jako pierwsze, potem następuje ekspresja PPAR γ , która z kolei aktywuje ekspresję C/EBP α . C/EBP α wzmacnia ekspresję PPAR γ w celu utrzymania różnicowania się komórek. SREBP-1c zwiększa transkrypcyjną aktywność PPAR γ . FOXC2 również aktywuje ekspresję genów stymulujących różnicowanie preadipocytów (C/EBP α , PPAR γ i SREBP-1c). (Valet i inni, 2002). Zatem główną rolę w końcowym różnicowaniu preadipocytów odgrywa PPAR γ . Ten czynnik transkrypcyjny może aktywować proces adipogenezy wyłącznie jako heterodimer z retinoidowym receptorem X α (RXR α).

Zaobserwowano, że zależnej od PPAR γ adipogenezie towarzyszy zwiększona biogeneza mitochondriów (Bogacka i inni, 2005; Rosen i Spiegelman, 2006). Metabolizm adipocyta może

być bowiem kontrolowany przez zmiany w poziomie mitochondriów. Rosiglitazon – silny agonista PPAR γ , oprócz zwiększenia insulino-wrażliwości i adipogenezy, wywołuje zmiany w morfologii mitochondriów oraz aktywuje ekspresję niektórych białek mitochondrialnych (Jobgen i inni, 2006). Podczas różnicowania komórek białej tkanki tłuszczowej, w hodowlach *in vitro* zaobserwowano również wzrost ekspresji genów kodujących czynniki NRF2 (ang. *Nuclear Factor-E2-related factor 2*) i PGC-1 α (ang. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*) uczestniczących w biogenezie mitochondriów (Semple i inni, 2004; Seifert i inni, 2010; Ducluzeau i inni, 2011). Różnicowanie preadipocytów do adipocytów prowadzi bowiem do indukcji proliferacji mitochondriów. Te organella komórkowe są nie tylko miejscem katabolizmu kwasów tłuszczowych, ale odgrywają istotną rolę w lipogenezie, ponieważ dostarczają kluczowych związków pośrednich do syntezy TG. Przykładowo, generacja acylo-CoA w reakcji aktywacji kwasów tłuszczowych wymaga dużej liczby mitochondriów (De Pauw i inni, 2009; Ducluzeau i inni, 2011).

Zaburzenie procesu adipogenezy (w wyniku dysfunkcji mitochondriów lub defektów przekazywania sygnałów od proadipogennych czynników transkrypcyjnych) indukuje lipotoksyczność FFAs w narządach obwodowych (w wątrobie, mięśniach szkieletowych i trzustce) (De Pauw i inni, 2009).

2.3.1.1 Regulacja adipogenezy

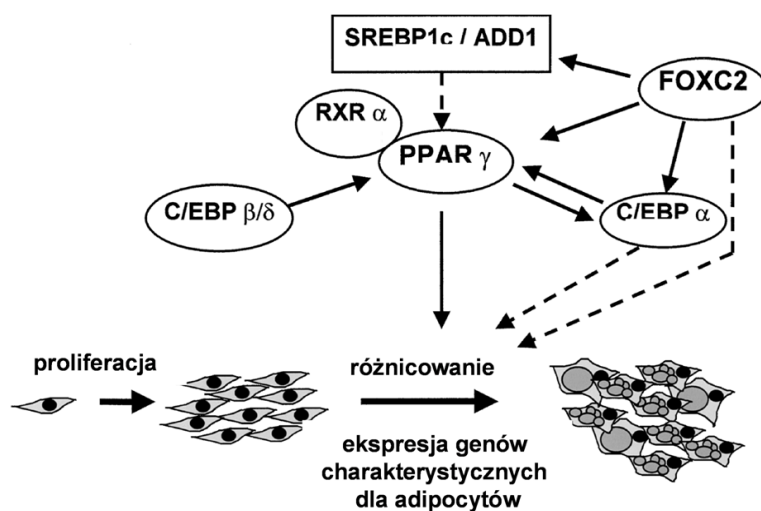
Ilość i skład lipidów (kwasów tłuszczowych) dostarczanych z pożywieniem ma istotny wpływ na metabolizm lipidów oraz na: rozwój, rozmiary, rozmieszczenie i czynność endokrynną tkanki tłuszczowej. Wpływ kwasów tłuszczowych na szybkość reakcji metabolicznych w adipocycie może zachodzić poprzez ich odmienny udział w regulacji ekspresji i syntezy oraz aktywności enzymów biorących udział w ich przemianach (Raclot i Oudart, 1999; Al-Hasani i Joost, 2005; Madsen i inni, 2005; Oller, 2009).

Kwasy tłuszczowe regulują różnicowanie i dojrzewanie adipocytów. W zależności od ich rodzaju obserwuje się ich działanie pro- lub antyadipogenne. Wpływają one zatem na ilość i wielkość komórek tkanki tłuszczowej oraz na stopień gromadzenia przez nią lipidów (w tym lipidów budulcowych błon komórkowych) (Duplus i inni, 2000). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFAs) z rodziny n-6 (głównie kwas arachidonowy) stymulują różnicowanie preadipocytów poprzez bezpośredni udział w syntezie prostaglandyn. Prostacykliny PGI $_2$ i PGJ $_2$,

będące metabolitami kwasu arachidonowego w tkance tłuszczowej, indukują adipogenezę (Aubert i inni, 2000; Forman i inni, 1995). Z kolei Prostaglandyna $F_{2\alpha}$ hamuje różnicowanie adipocytów *in vitro* (Serrero i inni, 1992). Kwasy z rodziny n-3 (kwas eikozapentaenowy - EPA oraz dokozaheksaenowy - DHA) hamują aktywność cyklooksygenaz i adipogenezę (zahamowanie tworzenia kropli lipidowych w hodowlach preadipocytów) (Kim i inni, 2006). Nasycony kwas palmitynowy z kolei indukuje adipogenezę poprzez aktywację ekspresji czynników transkrypcyjnych C/EBP α i PPAR γ (Guo i inni, 2007).

Adipogeneza, jak opisywano powyżej, jest również regulowana przez adipokiny. Prozapalne adipokiny (TNF- α , IL6) hamują adipogenezę poprzez obniżenie ekspresji adipogennych czynników transkrypcyjnych (Cawthorn i Sethi, 200; Valet i inni, 2002). Ponadto, różnicowanie adipocytów obniżają również następujące adipokiny: chemeryna, rezystyna, PAI-1 i TGF β (Goralski i inni, 2007; Fève, 2005).

Z kolei nadekspresja adiponektyny promuje proliferację preadipocytów i ekspresję adipogennych czynników transkrypcyjnych (Fève 2005). Proadipogenne działanie wykazuje również czynnik zahamowania migracji makrofagów MIF (ang. *macrophage migration inhibitory factor*) (Ikeda i inni, 2008). Innym aktywatorem adipogenezy jest tlenek azotu (NO) indukujący biogenezę mitochondriów (Nisoli i inni, 2004).



Ryc. 4. Transkrypcyjna regulacja adipogenezy (wg Valet i inni, 2002).

C/EBP α , β , γ - ang. CCAAT/Enhancer Binding Protein, FOXC2 - ang. Forkhead box protein C2, PPAR γ - ang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , SREBP-1c - ang. Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c.

2.3.2 Rola angiogenezy w rozwoju tkanki tłuszczowej

Zwiększaniu rozmiarów tkanki tłuszczowej towarzyszy wzmożona reakcja angiogenna, która ma na celu zapewnienie odpowiedniego dopływu substancji odżywczych i tlenu do rozwijającej się tkanki (*Rupnick i inni, 2002*). Unaczynienie tkanki tłuszczowej odgrywa również rolę w transporcie lipidów do docelowego miejsca ich katabolizmu. W okresie zapotrzebowania energetycznego, ze strumieniem krwi napływają, ale i wypłukiwane są na obwód adipokiny i FFAs z adipocytów. Unaczynienie tkanki tłuszczowej jest konieczne dla zwiększenia jej rozmiarów, gdyż perycyty stanowią źródło progenitorów dla komórek tkanki tłuszczowej (*Rodriguez i inni, 2005; Rechman i inni, 2004*).

Sieć naczyń w obrębie tkanki tłuszczowej przyczynia się również do rozwoju odpowiedzi zapalnej. Makrofagi poprzez mikrokrażenie tkanki tłuszczowej mogą szybciej dotrzeć do miejsc docelowych, gdzie ich zadaniem jest usuwanie nekrotycznych adipocytów oraz uczestniczenie w odpowiedzi zapalnej. Ponadto, mogą również stanowić prekursorzy komórek biorących udział w angiogenezie (*Chudek i Więcek, 2006*).

Naczyniotworzenie w obrębie tkanki tłuszczowej jest regulowane przez chemokiny lokalnie wytwarzane przez komórki tkanki tłuszczowej: makrofagi, komórki podścieliska i adipocyty. Funkcja tkanki i jej homeostaza jest zatem ściśle związana z mikrokrażeniem w tej tkance (*Hausman i Richardson, 2004; Christiaens i Lijnen, 2010; Rutkowski i inni, 2009*), a przeciwciała przeciwko czynnikom proangiogennym hamują wzrost nie tylko sieci naczyń, ale i przyrost tkanki tłuszczowej (*Rupnick i inni, 2002*).

2.3.2.1 Mechanizm tworzenia naczyń

W tworzeniu naczyń (podczas wczesnej embriogenezy jak i po urodzeniu) zarówno w przebiegu procesów fizjologicznych (np. unaczynienie rosnących tkanek) jak i patologicznych (unaczynienie masy nowotworu; rewaskularyzacja niedotlenionej tkanki; nasilona angiogeneza towarzysząca procesowi zapalnemu, cukrzycy i miażdżycy) uczestniczą procesy: waskulogeneza, angiogeneza i stabilizacja/remodelling istniejących naczyń (*Fan Tai-Ping, 1995; Risau, 1997; Gupta i Zhang, 2005; Matsumoto i inni, 2006*).

2.3.2.1.1 Waskulogeneza

Waskulogeneza jest procesem tworzenia prymitywnej sieci małosprawnych i pierwotnych kapilar. Podczas rozwoju embrionalnego naczynia krwionośne powstają z komórek mezodermy różnicujących się w hemangioblasty, które stanowią komórki prekursorowe (progenitorowe) wspólne dla komórek śródbłónka naczyń i komórek krwi. Następnie, komórki te pod wpływem odpowiednich czynników wzrostu, różnicują się w angioblasty tworzące sieć kapilar o prostej funkcji (Carmeliet 2001, Isner 1999). Proces tworzenia naczyń na drodze waskulogenezy zachodzi również po urodzeniu i jest traktowany jako tworzenie naczyń *de novo* poprzez różnicowanie, proliferację i migrację komórek prekursorowych śródbłónka EPC (ang. *Endothelial Precursor Cell*) pochodzących ze szpiku kostnego (Patan, 2001; Ribatti i inni, 2009). Komórki EPC prezentują fenotyp komórek embrionalnych pochodzących z hemangioblastu oraz wykazują zdolność do migracji, proliferacji oraz różnicowania się w kierunku komórek śródbłónka naczyń w systemie naczyń krwionośnych obwodowych. Czynniki wzrostowe, cytokiny lub hormony uwalniane w odpowiedzi na niedokrwienie tkanki promują proliferację, różnicowanie i mobilizację komórek EPC ze szpiku kostnego (Takahashi 1999; Lyden i inni, 2001). Po osiedleniu w tkance, komórki EPC przyjmują fenotyp i funkcje charakterystyczne dla komórek śródbłónka ściany naczyń (Balconi 2000, Takahashi 1999, Asahara 1999). Zatem komórki progenitorowe ze szpiku kostnego przyczyniają się do tworzenia nowych naczyń poprzez zdolność do różnicowania się w komórki śródbłónka naczyniowego (Lyden i inni, 2001, Mund i inni, 2010). Z kolei mięśnie gładkie ściany naczyń tworzone są angioblastów lub pierwotnych fibroblastów, które różnicują się w kierunku perycytów. Komórki te mogą również stanowić prekursory dla preadipocytów (Rehman i inni, 2004; Rodriguez i inni, 2005).

2.3.2.1.2 Angiogeneza

Angiogeneza jest zjawiskiem polegającym na wypączkowywaniu nowych naczyń z już istniejących, w odpowiedzi na niedotlenienie lub zapalenie. Jest to złożony proces składający się z następujących etapów: destabilizacji ściany naczynia i pobudzenia komórek śródbłónka; wzrostu przepuszczalności ściany naczyń; degradacji błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej przez proteazy (metaloproteinazy macierzy); proliferacji i migracji komórek śródbłónka; wytworzenia tubularnych struktur nowego naczynia umożliwiających przepływ krwi;

prolifracji i migracji komórek mezenchymalnych do nowego naczynia; otoczenia nowopowstałych naczyń przez dojrzałe perycyty; stabilizacji naczyń: wzmocnienia oddziaływań komórka-komórka oraz komórka–macierz pozakomórkowa (Ryc. 5) (*Papetti i inni, 2002; Poverini, 2002 Masson i inni, 2002; Sacewicz i inni, 2009*).

Proces tworzenia naczyń (organizowanie się komórek w struktury zwane tubułami i powstawanie białek podścieliska jako podpory dla naczyń) jest regulowany przez szereg czynników zarówno stymulujących angiogenezę jak i ją hamujących (*Sund i inni, 2005, Yancopoulos i inni, 2000*).

Do czynników stymulujących angiogenezę należą m. in. czynniki wzrostowe np.: VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), aFGF i bFGF (*Fibroblast Growth Factor*) (*Wafai i inni, 2009; Tomanek i inni, 2008*), angiopoetyna 1 i 2 (*Dunk i inni, 2000*), TGF α i TGF β (ang. *Transforming Growth Factor*) (*Schroeder i inni, 1986*), PIGF (ang. *Placenta Inducible Growth Factor*), płytkowy czynnik wzrostu B PDGF β (ang. *Platelet-Derived Growth Factor, type B*) (*Tomanek i inni, 2008; Magnusson i inni, 2007*), czynnik wzrostu komórek śródbłoka uwalniany przez płytki PD-ECGF (ang. *Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*) (*Sato i inni, 1993; Miyazono i inni, 1991*), czynnik wzrostu hepatocytów HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*), tlenek azotu (*Näslund i inni, 2000; Ohnishi i inni, 2003*). Angiogeneza jest ponadto indukowana przez: heparinę, integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ (*Eliceiri i inni, 1999*), metaloproteinazy (MMP-1, MMP-2, MMP-9) (*Conway i inni, 2001; Ghajar i inni, 2008*) i angiogenezę. Aktywatorami naczyniotworzenia są ponadto: cytokiny prozapalne (TNF α , interleukina 8, interleukina 6, interleukina 1 β) (*Yuan i inni, 2000, Cohen i inni, 1996; Liebovich i inni, 1987*), czynniki pobudzające kolonizację makrofagów i granulocytów (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów G-CSF ang. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF ang. *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (*Sari i inni, 2009*), chemokiny (nabłonkowe białko pobudzające neutrofile 78 ENA-78 ang. *Epithelial Neutrophil Activating Protein-78*), geny związane ze wzrostem (GRO $\alpha\beta\gamma$ ang. *Growth Related Genes*), białko chemotaktyczne dla granulocytów (GCP-2), zasadowe białko płytkowe (PBP), beta-tromboglobulina, białko pobudzające neutrofile (NAP-2) i prawdopodobnie wiele innych (*Zielonka i inni, 2003; Strieter i inni, 1995*).

Inhibitory angiogenezy obejmują: trombospondynę (*diPietro, 1997*), angiostatynę (*O'Reilly i inni, 1994*), endostatynę (*Perletti i inni, 2000*), troponinę 1 (*Moses i inni, 1999*), tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3) (*Gomez i inni, 1997*), antyintegrynę $\alpha_v\beta_3$, PEX (ang. *Hemopexin Like Domena MMP-2*), czynnik płytkowy 4 (*Perollet i inni, 1998*), interferony (α , β , γ), IP-10 (ang. *interferon γ inducible protein*) (*Majewski i inni, 1994*), interleukiny (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18) (*Huang i inni, 1999; Silvestre i inni, 2000; Voest i inni 1995; Duda i inni, 2000*), TGF β 1, chemokiny CXC (*Balestrieri, 2008*), MMP-12, antytrombinę III (*O'Reilly i inni, 1999*), heparyny drobnocząteczkowe (*Norrby, 1996*), monokinę indukowaną przez interferon γ - MIG, prolaktynę (*Zielonka, 2004*) itp.

W angiogenezie istotną rolę odgrywają również oddziaływania komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, w których biorą udział integryny (*Dedhar, 1996; Ramjaun i inni, 2009*) jak i oddziaływania komórka-komórka, w których uczestniczą VE-kadheryny, kateniny, endogliny i efryny.

a) Rola wybranych czynników wzrostowych w procesie angiogenezy

Jednymi z ważniejszych czynników indukujących i regulujących tworzenie naczyń są: czynnik wzrostowy śródbłónka ściany naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*) i zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (ang. *basic Fibroblast Growth Factor - bFGF*) (*Carmeliet 2001, Isner 1999; Gerhardt, 2008; Przybylski i inni, 2009*). Odpowiedzią bowiem na te czynniki wzrostowe jest degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej przez proteazy, co umożliwia migrację i proliferację komórek śródbłónka z istniejących naczyń w kierunku działającego proangiogenego bodźca. Początkiem tego procesu jest uaktywnienie plazminogenu w plazminę, rozkładającą białka macierzy: fibronektynę, lamininę itp. W degradacji macierzy pozakomórkowej ECM (ang. *extracellular matrix*) uczestniczą metaloproteazy macierzowe (ang. *matrix metalloproteinases – MMPs*) i aktywatory plazminogenu: tPA i uPA (*Ghajar i inni, 2008*).

VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Do rodziny czynników wzrostu śródbłónka naczyń zalicza się VEGF A oraz VEGF: B, C, D, E i łożyskowy czynnik wzrostowy (ang. *Placenta Growth Factor - PlGF*). VEGF A i B

są czynnikami wzrostowymi komórek śródbłónka naczyń krwionośnych, a VEGF C i D aktywują wzrost naczyń limfatycznych. Te czynniki są produkowane przez: komórki mięśni gładkich naczyń, komórki śródbłónka naczyń, makrofagi, komórki niedotlenionej tkanki, komórki nowotworowe i komórki szpiku (Zachary 2001) jak i komórki SVF tkanki tłuszczowej, (zwłaszcza brzusznej) (Cao i inni, 2007). Transkrypcja mRNA dla VEGF jest regulowana m. in. przez czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *Hypoxia-Inducible Factor-1*), którego ekspresja jest aktywowana w komórkach niedotlenionej tkanki (HIF-1 α) lub aktywowana czynnikami wzrostowymi (Wang 1995, Semenza 2001; Semenza 2009). Także czynniki transkrypcyjne takie jak AP-1 czy NF κ B, których ekspresja jest pobudzana przez wolne rodniki (np. NO) i cytokiny prozapalne aktywują promotor VEGF wiodąc do nasilenia ekspresji genu i produkcji VEGF (Collins, 2000).

VEGF działa głównie przez dwa receptory VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (Flk-1/KDR). Przyłączenie liganda do receptora powoduje aktywację wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej, autofosforylację receptora i aktywację szeregu wewnątrzkomórkowych dróg przekazu sygnału (Zachary 2001). VEGF działa na komórki śródbłónka naczyń głównie przez receptor VEGFR-2 (Flk-1) (McMahon 2000). Ten czynnik wzrostowy pobudza proliferację komórek śródbłónka naczyń przez wpływ na ekspresję genów cykliny D1 oraz zależną od cyklin kinazę 4 (Pedram 1998, Kim 2001). VEGF pobudza proces angiogenezy przez zwiększenie ekspresji genów *metaloproteinaz*, *urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA)*, *receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR)* koniecznych do degradacji białek podścieliska (Lamoreaux 1998, Hood 1998). Czynnik ten indukuje również ekspresję genów: *inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1)*, *czynnika tkankowego TF*, *integrzyn* oraz *selektyn ICAM*, *VCAM* i *E-selektyny* (Kim 2001, Cohen 1999, Zachary 2001). Wykazano generację i obecność receptorów dla VEGF na wielu niezróżnicowanych liniach komórek szpiku czy komórek nowotworowych, co przemawia za rolą VEGF w proliferacji niezróżnicowanych komórek.

VEGF aktywuje również ekspresję genu *Bcl-2* i przez to chroni komórki śródbłónka przed apoptozą (Dimmeler 2000; Ferrara, 2009; Ferrara, 1999; Gupta i inni, 1999; Brown i inni, 1997; Gerhardt, 2008).

Ten czynnik wzrostowy wpływa na proliferację komórek śródbłónka, a także prawdopodobnie na migrację i żywotność głównie poprzez zwiększenie ilości generowanego przez śródbłonek tlenku azotu (NO) (Morbidelli 1996, Kroll 1998, Parenti 1998;

Ahmad i inni, 2006). NO pośredniczy w rozkurczu naczyń, hamuje agregację płytek i ekspresję białek adhezyjnych makrofagów, hamuje proliferację komórek mięśni gładkich naczyń (*Zachary 2000*). Stwierdzono również, że NO pobudza angiogenezę w modelach *in vivo* i w modelach *in vitro* (*Pipili-Synetos 1993*).

bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*)

Innym ważnym czynnikiem angiogennym jest bFGF, który należy do rodziny czynników wzrostowych fibroblastów - FGF. Te czynniki wzrostowe pobudzają proliferację, migrację i różnicowanie się różnych typów komórek pochodzenia endo- i mezodermalnego w tym także komórek śródbłonna naczyń oraz perycytów (*Bastaki 1997, Kroon 2000*).

Czynniki z rodziny FGF działają na komórkę przez cztery typy receptorów FGFR 1-4. Wiązanie tych czynników wzrostu do ich receptorów jest nasilane przez interakcję FGF z proteoglikanami błony komórkowej zawierającymi siarczan heparanu (*Richardson 1999; Presta i inni, 2005*). Po przyłączeniu bFGF do receptora następuje autofosforylacja domeny wewnątrzkomórkowej receptora i aktywacja dróg wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału.

Podobnie jak VEGF, bFGF w procesie angiogenezy ułatwia migrację i adhezję komórek śródbłonna naczyń do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, pobudza ekspresję genów *uPA*, *tPA*, *metaloproteinaz*, *integryny $\alpha_v\beta_3$* oraz chroni komórki śródbłonna naczyń przed apoptozą pobudzając ekspresję genu *Bcl-2* (*Ettenson 1995, Karsan 1997*). Udowodniono, że bFGF aktywuje również powstawanie angioblastów, ich migrację i w odróżnieniu od VEGF stymuluje uporządkowanie komórek prowadzące do powstania pełnowartościowej sieci naczyń (*Pepper i inni, 1992; Demirdögen i inni, 2010*).

b) Oddziaływania komórka-macierz zewnątrzkomórkowa

Oddziaływania komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, w których biorą udział integryny wydają się być niezbędne dla prawidłowego przebiegu angiogenezy (*Dedhar 1996; Garmy Susini i Varner, 2008; Bussolino i inni, 2009*). Integryny należą do białek adhezyjnych zakotwiczonych w błonie komórkowej. Są heterodimerami złożonymi z różniących się budową podjednostek $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$.

Stwierdzono, że podczas rozwoju sieci naczyń sygnał przekazywany do wnętrza komórek przez wewnątrzkomórkowe domeny integryn i przez receptory dla czynników wzrostowych

reguluje: przeżycie, proliferację i migrację komórek śródbłonka. Główną rolę w procesie angiogenezy odgrywają integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$, które częścią zewnątrzkomórkową oddziałują z białkami macierzy (vitronektyną, lamininą, fibronektyną, kolagenem i fibrynogenem). W części wewnątrzkomórkowej integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ oddziałując z taliną i aktynowymi filamentami cytoszkieletu komórki, aktywują kinazę białkową FAK (Hemler 1998, Soldi 1999, Strömblad i inni, 1996).

Ekspresja tych integryn jest regulowana przez czynniki proangiogenne: VEGF, bFGF, PDGF czy TGF β . Stwierdzono, że integryny pobudzają migrację komórek śródbłonka, regulują degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej przez proteazy, zapobiegają apoptozie regulowanej przez produkty genów *p53* i *p21* (Soldi 1999, Klein 1993). Zablockowanie tych białek powierzchniowych komórek śródbłonka przez przeciwciała hamuje powstawanie tubul (eksperymenty *in vitro*) oraz proces neowaskularyzacji (badania *in vivo*) (Friedlander 1995, Mangi 2000).

c) Oddziaływania komórka-komórka

W oddziaływaniach komórka-komórka, biorą udział liczne białka błony komórkowej jak np. śródbłonkowe VE-kadheryny, kateniny, endogliny, efryny i ich receptory (Bazzoni 1999, Lampugnani 1997; Adams i Alitalo, 2007; Davis i Camarillo, 1996).

VE-kadheryny są błonowymi białkami adhezyjnymi komórek śródbłonka ściany naczyń. VE-kadheryny jako dimery oddziałują z mikrofilamentami aktynowymi cytoszkieletu za pośrednictwem katenin (Steinberg 1999). Badania *in vivo* i *in vitro* udowodniły udział tych białek w powstawaniu układu sieci naczyń (Lampugnani 1997). Przeciwciała przeciw zewnątrzkomórkowej domenie kadheryn hamują powstawanie struktur podobnych do naczyń (tubul) w modelu angiogenezy *in vitro* (Bach 1998, Matsumura 1997). O znaczeniu tych białek świadczy fakt, że transgeniczne embriony myszy z mutacją -/- genu *VE-kadheryn* obumierają we wczesnych stadiach rozwojowych, na skutek defektów w organizacji krążenia wieńcowego. Komórki śródbłonka ściany naczyń tych transgenicznych embrionów myszy są zdolne do formowania prymitywnych naczyń, ale przy braku kadheryn ekspansja i różnicowanie się komórek śródbłonka w duże i małe naczynia jest zahamowana. Mutacja w domenie cytoplazmatycznej VE-kadheryn również powoduje tego typu zaburzenia (Carmeliet 1999).

W oddziaływaniach komórka-komórka bierze również udział płytkowo-śródbłonkowy czynnik adhezyjny 1 (PECAM-1/CD31) (*ang. platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*). CD31 jest błonową glikoproteiną należącą do nadrodziny immunoglobulin, której masa wynosi 130 kDa. Białko to ulega ekspresji na białych krwinkach, na trombocytach oraz na komórkach śródbłonka naczyń (*Yan i inni, 1995; O'Brien i inni, 2004*). PECAM-1 bierze udział w regulacji wzrostu i rozprzestrzeniania nowotworów, przepuszczalności naczyń, angiogenezie itp. (*Muller, 1995, Newman i Newman, 2003; DeLisser i inni, 2010*). Mianowicie, zaobserwowano, że zablokowanie przekaźnictwa sygnału poprzez użycie przeciwciał anti-CD31 zahamowało tworzenie tubul w hodowlach komórek śródbłonka *in vitro* oraz wzrost naczyń *in vivo*, co wskazuje na znaczący udział tej molekuly w angiogenezie (*DeLisser i inni, 1997*).

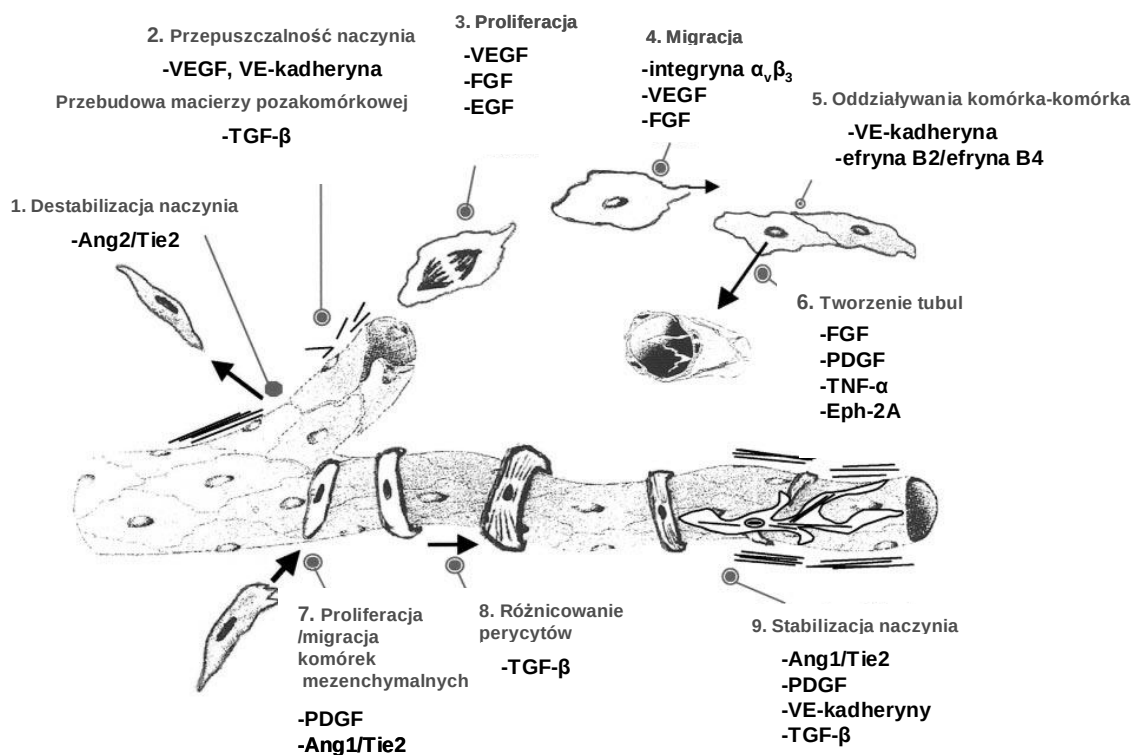
Endogliny są dodatkową komponentą regulatorową receptora TGF β . Mutacja genu *endoglin* powoduje zaburzenia w budowie naczyń (*López-Novoa i inni, 2010*).

Efryny (Eph) i ich receptory są regulatorami angiogenezy *in vitro* i *in vivo* (*Pasquale 1997*). Mutacje $-/-$ genów *EphB2* i *EphB3* są letalne na skutek wielu defektów w powstawaniu systemu naczyniowego. Stwierdzono również, że EphA1 nasila proces angiogenezy w modelu neowaskularyzacji rogówki królika (*Gale 1999*). Efryna B1 i B2 wpływa na powstawanie rozgałęzionych struktur podobnych do kapilar w modelach *in vitro* (*Adams 1999; Wang i inni, 2010*). Efryna B1 aktywuje zależną od integryny $\alpha_v\beta_3$ adhezję komórek śródbłonka do fibrynogenu. Oddziaływanie efryna-receptor moduluje adhezję komórek śródbłonka ściany naczyń. Oddziaływanie efryna-efryna umożliwia oddziaływanie wewnątrzkomórkowej domeny z integrynami, kadherynami i białkami cytoszkieletu (*Wang 1998, Adams 1999; Mosch i inni, 2010*).

2.3.2.1.3 Stabilizacja naczyń (vascular remodelling)

Ostatnim etapem angiogenezy jest „dojrzewanie” nowo powstałego naczynia. Mechaniczny stres, towarzyszący przemieszczającym się komórkom śródbłonka, jak i siłom ścierającym napływającego strumienia krwi aktywuje PDGF- β , który bierze udział w stabilizacji naczynia. Taka sieć ulega przebudowie w celu utworzenia dojrzałych naczyń, co wymaga rekrutacji komórek mezenchymalnych i ich różnicowania do perycytów, które stabilizują nowouformowane naczynia, a w procesie tym bierze udział PDGF (*Zhang i inni, 2009; Tirziu i inni, 2005*). Stymuluje on migrację komórek przydanki oraz mięśni gładkich naczyń

(VSMC), a te z kolei hamują proliferację i ruch komórek śródbłónka (Rundhaug, 2005). W dalszym etapie angiogenezy istotną rolę odgrywają angiopoetyny (Ang) i ich receptory (Tie1 i Tie2). Białka te są niezbędne do połączenia komórek śródbłónka z otaczającymi komórkami mezenchymalnymi i do stabilizacji naczynia (Maisonpierre i inni, 1997, Huang i inni, 2011). Receptor Tie1 bierze udział w różnicowaniu komórek śródbłónka i utrzymaniu integralności naczynia krwionośnego, a receptor Tie2 uczestniczy w tworzeniu sieci naczyń (Puri i inni, 1995). Angiopoetyny 1 i 2 poprzez receptor Tie2 pobudzają lub hamują komórki śródbłónka naczyń krwionośnych. Ang1 stymuluje dojrzewanie sieci naczyniowej, a Ang2 czyni komórki śródbłónka podatnymi na czynniki angiogenne, co prowadzi do destabilizacji naczynia (Asahara i inni, 1998).



Ryc. 5. Mechanizmy fizjologicznej angiogenezy (wg Papetti i Herman, 2002).

Angiogeneza obejmuje niżej opisane etapy: destabilizację naczynia przez angiopoetynę 2 (Ang2) (1); indukowaną VEGF przepuszczalność naczyń (2); proliferację komórek śródbłónka (3) i ich migrację (4) przez przebudowaną macierz (5); formowanie tubul przez które płynie krew (6); proliferację i migrację komórek mezenchymalnych do nowoutworzonego naczynia (7) i ich różnicowanie w kierunku perycytów (8); utworzenie oddziaływań komórka-komórka i oddziaływań z macierzą pozakomórkową w celu stabilizacji naczyń (9).

Ang – angiopoetyna, EGF – naskórkowy czynnik wzrostu, Eph-2A – efryna 2A, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, PDGF – pochodzący z płytek czynnik wzrostu, TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β , TNF- α - czynnik martwicy nowotworów α , VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń.

2.3.2.2 Regulacja angiogenezy w tkance tłuszczowej

W rozrastającej się tkance dochodzi do niedotlenienia (*Bouloumié i inni, 2002*) i wzrasta ekspresja podjednostek HIF-1 α , które stanowią czynniki transkrypcyjne dla proangiogennych genów oraz prowadzą do wzrostu ekspresji prozapalnych adipokin (IL-6, TNF- α , MCP-1 itp.) (*Carmeliet, 2000; Maxwell i inni, 1999; Hirota i Semenza, 2006; Semenza i inni, 2006*). Hipoksja hamuje również dojrzewanie preadipocytów i indukuje transport glukozy przez adipocyty. Angiogeneza w tkance tłuszczowej jest niezbędna do przeciwdziałania lokalnemu niedotlenieniu. Tkanka tłuszczowa jest bogata w mezenchymalne komórki prekursorowe śródbłónka naczyń, makrofagi jak i krążące komórki progenitorowe, które przyczyniają się do indukcji angiogenezy poprzez lokalne generowanie czynników proangiogennych (*Cao i inni, 2007*) (Ryc. 6). Podobnie jak lokalne niedotlenienie, również chroniczny stres, do którego komórki nie mogą się przystosować (warunki stresowe/glukokortykoidy, niska temperatura, wysokotłuszczowa dieta) stymuluje sympatyczny układ nerwowy i prowadzi do zwiększenia ekspresji neuropeptydu Y (NPY), nie wpływając na poziom noradrenaliny (*Żukowska i inni, 2003*). Stres i dieta wysokotłuszczowa zwiększają poziom glukokortykoidów, szczególnie w trzewnej tkance tłuszczowej, co prowadzi do wzrostu ekspresji NPY i jego receptorów Y2R w tkance tłuszczowej. Stymulacja tych receptorów na komórkach śródbłónka i komórkach tkanki tłuszczowej aktywuje angiogenezę i adipogenezę, co w konsekwencji indukuje zwiększanie rozmiarów głównie trzewnej tkanki tłuszczowej (*Żukowska i inni, 2003*). W wyniku rozrostu tkanki tłuszczowej nasila się miejscowy odczyn zapalny i wzrasta unaczynienie tej tkanki. Dodatkowo, temu zjawisku sprzyja hiperinsulinemia i hiperleptynemia towarzysząca otyłości/insulinooporności (*Kuo i inni, 2008*). Różnorodność komórek w obrębie tkanki tłuszczowej determinuje wytwarzanie przez nią różnorodnych czynników wzrostowych i cytokin stymulujących angiogenezę (Ryc. 6): leptyny, VEGF, FGF-2, HGF, IGF, TNF- α , TGF- β (*Li i inni, 2002; Baillargeon i inni, 2006*), łożyskowego czynnika wzrostowego (PIGF), VEGF-C, rezystyny (*Saiki i inni, 2006; Samad i inni, 1998; Voros i inni, 2005*), czynnika tkankowego (TF), neuropeptydu Y (NPY) (*Kuo i inni, 2007; Lijnen i inni, 2006*), czynnika wzrostu komórek naskórka wiążącego heparynę (ang. *heparin-binding epidermal growth factor*) i angiopoetyn (*Friedman i inni, 1998; Hiraoka i inni, 2006*). Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej ASC (ang. *adipose-derived stem cells*) wytwarzają proangiogenne czynniki: VEGF, HGF, GM-CSF,

FGF-2, i TGF- β (Bouloumie i inni, 2001). Komórki zapalne również znacząco przyczyniają się do unaczynienia tkanki tłuszczowej jak na przykład makrofagi produkujące: TNF- α , VEGF, FGF-2, IL-1b, IL-6 i IL-8 (Wellen i inni, 2003; Wellen i inni, 2005).

Plastyczność unaczynienia tkanki tłuszczowej jest wynikiem równowagi pomiędzy czynnikami proangiogennymi i inhibitorami angiogenezy. Ponadto, lokalnie wytwarzane przez tkankę tłuszczową adipokiny również wpływają na przebudowę ściany naczyń i angiogenezę (Rocha i inni, 2007; Costa i inni 2007; Tigno i inni, 2003; Vona-Davis i inni, 2007; Cowey i Hardy, 2006).

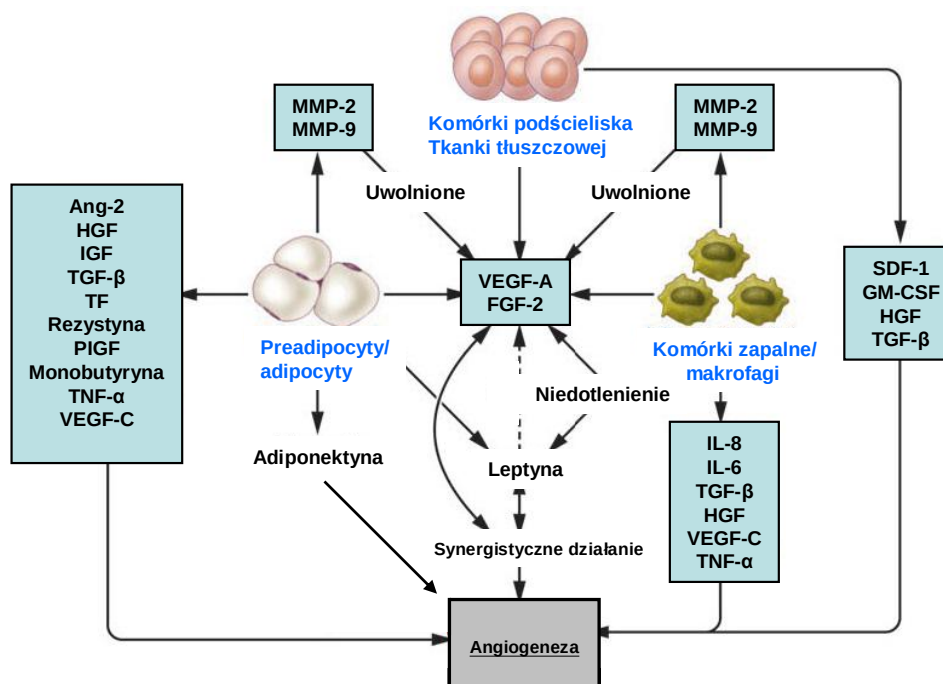
Leptyna bierze udział w stresie oksydacyjnym i zapaleniu, jak również stymuluje tworzenie naczyń krwionośnych *in vivo* (Tigno i inni, 2003; Frühbeck, 2006, Anagnostoulis i inni, 2008). Mianowicie, zwiększa ona ekspresję śródbłonkowej endoteliny-1 i śródbłonkowej syntazy tlenu azotu oraz aktywuje ekspresję molekuł adhezyjnych istotnych dla procesu angiogenezy na komórkach śródbłonka (Frühbeck 2006). Leptyna reguluje również proces angiogenezy poprzez indukcję ekspresji metaloproteaz MMP-2, MMP-9 i tkankowego inhibitora metaloproteinaz TIMP-1 oraz TIMP-2 (Park i inni, 2001) co wykazano w badaniach *in vivo* i *in vitro*. Zaobserwowano również, że stężenie tej adipokiny jest markerem powikłań naczyniowych i może w przyszłości stanowić czynnik prognostyczny ich pojawienia się w otyłości towarzyszącej rozwojowi zespołu metabolicznego (Singhal i inni, 2002). Z drugiej strony wykazano, że leptyna hamuje proliferację mięśni gładkich ściany naczyń (Bohlen i inni, 2007; Rodriguez i inni, 2010) oraz różnicowanie mioblastów (ustna prezentacja, Prof. Arkadiusz Orzechowski, 1st Baltic Stem Cell Meeting, Szczecin, Poland), co może promować patologiczny, charakterystyczny dla nowotworów obraz niepełnowartościowych kapilar.

Adiponektyna podobnie jak leptyna, wykazuje proangiogenne właściwości. Ouchi i współpracownicy (Ouchi i inni, 2004) wykazali, że adiponektyna prezentuje chemotaktyczne właściwości i stymuluje różnicowanie komórek śródbłonka HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) do struktur kapilarnych *in vitro* poprzez indukcję fosforylacji kinazy AMP (AMPK), kinazy Akt i śródbłonkowej syntazy NO. *In vivo* również zaobserwowano proangiogeny wpływ adiponektyny, ponieważ myszy z delecją adiponektyny wykazały zaburzoną odpowiedź angiogenną na niedotlenienie (Shibata i inni, 2004).

Rezystyna również promuje proliferację komórek śródbłónka, ich migrację i formowanie kapilar. W przeciwieństwie do leptyny i adiponektyny, adipokina ta indukuje odpowiedź angiogeną poprzez mechanizm niezależny od NO, a w procesie tym odgrywa rolę kinaza 3-fosfatydylinozitolowa (P13K) i NFκB (*Robertson i inni, 2009; Mu i inni, 2006*).

Angiogeneza jest również regulowana przez inne adipokiny: chemerynę, wisfatynę i apelinę. Chemeryna jest adipokiną, która znacząco pośredniczy w formowaniu naczyń w podobnym stopniu jak VEGF (*Bozaoglu i inni, 2010*). Badania prowadzone przez Kim i współpracowników, wykazały również proangiogenne właściwości wisfatyny. Adipokina ta stymuluje proliferację komórek, aktywuje fazę G1-S cyklu komórkowego poprzez zwiększenie ekspresji cykliny D1 i cdk2 oraz wywołuje wzrost ekspresji genów kodujących: MMP2, MMP9 oraz VEGF (*Kim i inni, 2010*). Apelina z kolei jest silnym aktywatorem proliferacji komórek śródbłónka oraz angiogenezy. Wykazuje ona również działanie chemotaktyczne i antyapoptotyczne dla komórek śródbłónka, a jej ekspresja wzrasta w warunkach niedotlenienia (*Sorli i inni, 2007*). Ponadto, zahamowanie przekazywania sygnału od apeliny podczas rozwoju embrionalnego skutkuje zaburzeniem formowania naczyń (*Cox i inni, 2006*).

Wśród **inhibitorów angiogenezy** wytwarzanych przez tkankę tłuszczową u osób z nadwagą lub otyłością można wyróżnić: endostatynę oraz trombospondynę 1 (TSP-1) (*Voros i inni, 2005*). U osób otyłych wykazano również obecność podwyższonego poziomu PIGF, który hamuje angiogenezę indukowaną przez VEGF poprzez formowanie nieaktywnych heterodimerów (*Voros i inni, 2005; Eriksson i inni, 2002; Inuzuka i inni, 1999*). Wysokie stężenia TGFβ mogą również hamować angiogenezę (*Pepper i inni, 1996*). Ekspresja TSP-1 jest zahamowana w preadipocytach, a wzrasta w zróżnicowanych adipocytach (*Burton i inni, 2004; Okuno i inni, 2002*), co sugeruje, że gdy wzrost tkanki tłuszczowej jest ustabilizowany, wzrasta poziom inhibitorów angiogenezy w celu zahamowania wzrostu naczyń. Zatem endogenne inhibitory angiogenezy są produkowane w celu utrzymania homeostazy tkanki tłuszczowej i przeciwdziałania jej nadmiernej aktywności.



Ryc. 6. Regulacja angiogenezy tkanki tłuszczowej przez różne czynniki (wg Cao, 2007 zmodyfikowane). Ang – angiopoetyna, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu, MMP – metaloproteinaza macierzy, PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu, SDF-1 – czynnik pochodzenia stromalnego 1, TF – czynnik tkankowy, TGF-β - transformujący czynnik wzrostowy β, TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α, VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń.

2.4 Tkanka tłuszczowa a zespół metaboliczny

W celu zwiększenia możliwości buforujących nadmiar dostarczanej energii, adipocyty (oprócz wzmożonej adipogenezy drogą zwiększenia swojej ilości - hiperplazja) powiększają również swoje rozmiary (hipertrofia), co prowadzi do zmiany ich fenotypu i takie adipocyty wykazują ekspresję genów zbliżoną do makrofagów (Heilbronn i Campbell, 2008). W wyniku metabolicznego stresu (nadmiar napływających substratów energetycznych) w takich adipocytach (podobnie jak i w innych komórkach organizmu) indukowany jest stres siateczki endoplazmatycznej (ER-stress) oraz dysfunkcja mitochondriów, czego konsekwencją jest m. in. rozwój insulinooporności i lipotoksyczności (Ryc. 7) (Morino i inni, 2006; Abdul-Ghani i inni, 2008). Niefunkcjonalne mitochondria wykazują zaburzenia w rozpraszaniu

gradientu protonowego, co w konsekwencji indukuje: zwiększoną produkcję wolnych rodników, uszkodzenia białek komórek, mutacje w mitochondrialnym DNA oraz może prowadzić do apoptozy komórek (przy niewydolności procesów reperacyjnych takich jak: ER-stress, autofagia itd.) (Mandl, 2009; Schröder, 2008; Kim 2006).

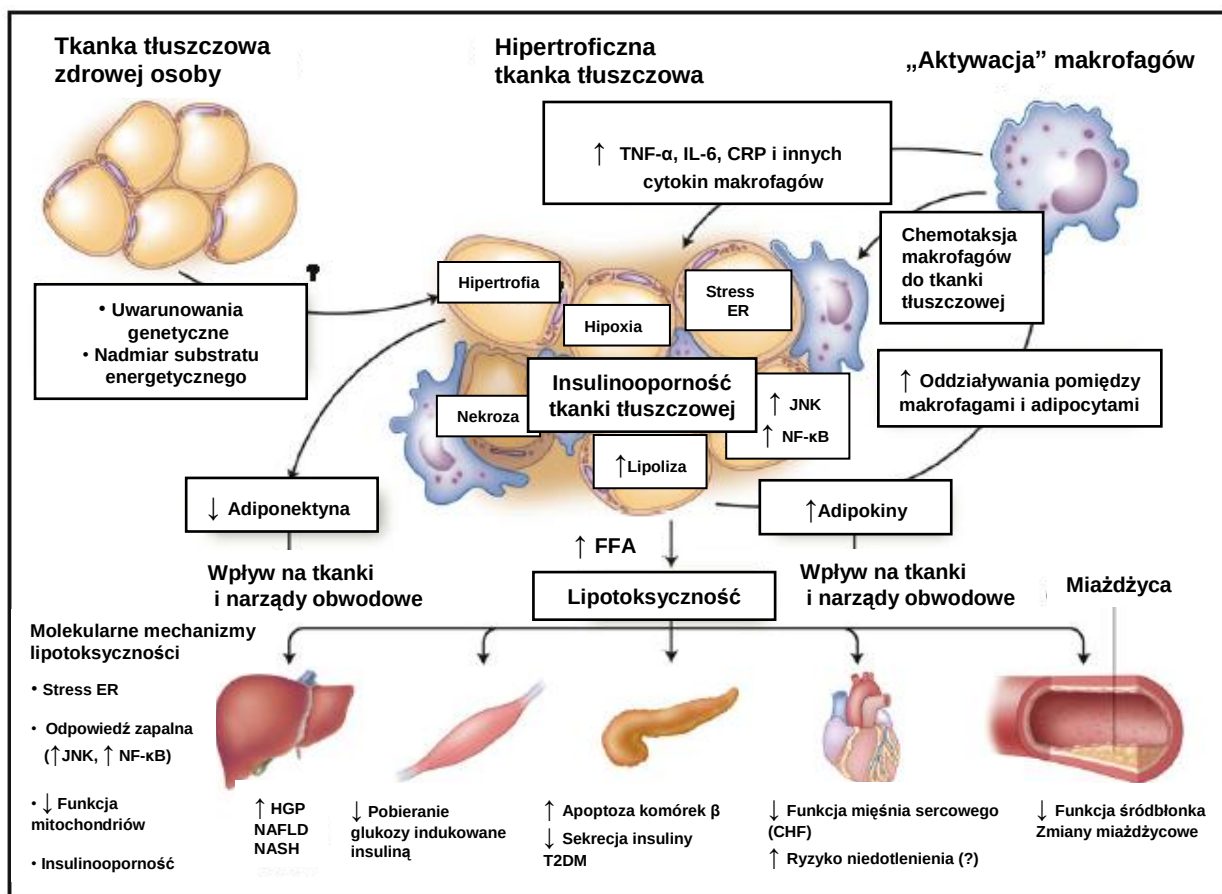
Zaburzone utlenianie kwasów tłuszczowych w mitochondriach przyczynia się, jak wspomniano, do indukcji insulinooporności w adipocytach. Bowiem w tych organellach komórkowych zwiększa się poziom metabolitów lipidowych (np. diacyloglicerolu (DAG), acylo-CoA i ceramidów), które indukują zaburzenia przekazywania sygnału od receptora insulinowego (Pauw i inni, 2009; Gallagher i inni, 2010; Summers, 2006). Stres siateczki endoplazmatycznej aktywuje prozapalne ścieżki w adipocytach, które zaburzają działanie insuliny (JNK-AP-1 i NF- κ B), promując fosforylację reszty serynowej w IRS-1 (*ang. insulin receptor substrate 1*), co uniemożliwia przekazywanie sygnału od receptora insulinowego w adipocytach i stanowi jedną z przyczyn insulinooporności tkanki tłuszczowej. Hipertroficzne adipocyty uwalniają dodatkowo chemoatraktanty (MCP-1, MCSF-1, MIF), które indukują napływ makrofagów w sąsiedztwo hipertroficznych adipocytów, czego konsekwencją jest nasilony proces zapalny (Schenk i inni, 2008).

Insulinooporność i aktywacja syntezy prozapalnych cytokin (np. TNF α) oraz wzrost poziomu leptyny i rezystyny przy obniżonym poziomie adiponektyny prowadzi do nasilonej lipolizy tkanki tłuszczowej (Jaworski i inni, 2007). Wysoki poziom TNF α hamuje bowiem estryfikację kwasów tłuszczowych i transport glukozy do wnętrza adipocyta. Ta prozapalna cytokina zmniejsza również fosforylację receptora insuliny, co aktywuje HSL, a hamuje ekspresję białek otaczających krople lipidowe (tzw. PAT-protein np. perylipiny) i chroniących lipidy przed działaniem lipaz (Cawthorn i Sethi, 2008). Zwiększenie poziomu wolnych kwasów tłuszczowych krążących we krwi w kompleksach z albuminą indukuje: lipotoksyczność w komórkach β trzustki, hepatocytach (stłuszczenie wątroby) i mięśniach szkieletowych (obniżone zużywanie glukozy) oraz prowadzi do dysfunkcji komórek śródbłonna (Ryc. 7) (Guilherme i inni, 2008; Cusi, 2010).

W wątrobie, uwalniane w nadmiarze z tkanki tłuszczowej FFAs, stymulują glikogenolizę i glukoneogenezę, lipogenezę i zwiększenie uwalniania przez wątrobę bogatych w TG lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL). Ponadto, podwyższony poziom FFAs w wątrobie hamuje katabolizm insuliny przyczyniając się do hiperinsulinemii. W późniejszym okresie dochodzi

do uszkodzenia komórek β trzustki przez glukolipotoksyczność, co wraz z upośledzoną produkcją insuliny indukuje rozwój cukrzycy typu 2 (Guilherme i inni, 2008; Cusi, 2010; Gallagher i inni, 2010). W komórkach β trzustki zaburzenie produkcji insuliny może wynikać nie tylko z lipotoksyczności FFAs, ale również z glukotoksyczności związanej z toksycznym wpływem hiperglikemii na komórki beta (Unger i inni, 2001; Poitout i inni, 2008). Podwyższony poziom TG w VLDL indukuje aktywność białka przenoszącego estry cholesterolu - CETP (ang. *cholesterol ester transfer protein*) i białka przenoszącego fosfolipidy PLTP (ang. *phospholipid transfer protein*). Białka te promują przeniesienie TG do lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), a estrów cholesterolu z HDL do VLDL. W wyniku aktywności lipazy wątrobowej, która hydrolizuje TG w LDL, powstają małe, gęste lipoproteiny o małej gęstości LDL (charakterystyczne dla cukrzycy, LDL typu B). Ponadto, wzrasta katabolizm HDL i utrata apolipoproteiny A1 (apoA1) przez nerki, czego konsekwencją jest obniżony poziom HDL (Dullaart i inni, 1994; Taşçılar i inni, 2010).

W hepatocytach, FFAs ulegają wiązaniu przez koenzym A (CoA). Acylowe reszty kwasowe związane z CoA (ang. *Fatty acid CoA*) biorą z kolei udział w syntezie TG. W insulinooporności, insulina może aktywować czynnik SREBP-1 indukujący transkrypcję genów związanych z lipogenezą w wątrobie. Glukoza natomiast, może zwiększać ekspresję czynnika transkrypcyjnego ChREBP (ang. *carbohydrate response element binding protein*), stymulującego ekspresję genów uczestniczących w przemianach glukozy do pirogronianu (glikoliza), z którego w wyniku działania dehydrogenazy pirogronianowej powstaje acetylo-CoA, a w dalszej kolejności – malonylo-CoA uczestniczący w syntezie FFAs. Zatem wyżej opisane zmiany w metabolizmie glukozy i lipidów mogą prowadzić do wzmożonej lipogenezy w wątrobie i do rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD) (Guilherme i inni, 2008; Hwang i inni, 2007; Korenblat i inni, 2008; Sozio i inni, 2010).



Ryc. 7. Zależność między adipocytami, a makrofagami w tkance tłuszczowej, prowadząca do zaburzeń metabolicznych wywołanych lipotoksycznością kwasów tłuszczowych (wg Cusi, 2010).

CHF – przewlekła niewydolność serca, CRP – białko C reaktywne, ER – retikulum endoplazmatyczne, FFA – wolne kwasy tłuszczowe, JNK – c-Jun N terminalna kinaza, NAFLD – niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby, NASH – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby, NF-κB – czynnik jądrowy κB, T2DM – cukrzyca typu 2, TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α.

2.5 Czynniki transkrypcyjne RXR, a zaburzenia metaboliczne

Metabolizm lipidów (w tym kwasów tłuszczowych) jest regulowany przez czynniki transkrypcyjne genów białek (enzymów, hormonów i ich receptorów itd.), które regulują przemiany metaboliczne ustroju. Same kwasy tłuszczowe i ich metabolity mogą modyfikować aktywność tych czynników (Szanto i inni, Duplus i inni, 2000; Nakamura i inni, 2004).

Przykładem czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem się komórek progenitorowych i ich metabolizmem są tzw. receptory aktywowane przez kwas retinoidowy (RXRs, ang. *retinoid X receptors*). Receptory RXR zostały odkryte w 1990r przez Magelsdorfa i współpracowników. Te receptory należą do jądrowych receptorów (czynników transkrypcyjnych) obejmujących: np. tzw. receptory aktywowane przez kwas retinowy (RARs, ang. *retinoic acid receptors*), receptory jądrowe dla hormonów steroidowych, hormon tarczycy, receptory witaminy D, receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPARs), receptory wątrobowe przemian cholesterolu (ksenobiotyków) (LXRs), farnesoidylowy receptor (FXR) (Alaynick, 2008). Receptory te prezentują konserwatywną strukturę ponieważ są zbudowane z: domeny wiążącej DNA, z odcinka HRE (ang. *hormone response element*), z domeny wiążącej ligand oraz z domeny aktywującej transkrypcję (Alaynick, 2008; Rosen i Spiegelman, 2001; Fu i inni, 2001).

Receptory RXR są aktywowane przez związanie z pochodną witaminy A - z kwasem 9-cis retinowym (Ryc. 8). Do naturalnych ligandów tego receptora należą również inne pochodne witaminy A: dihydroretinoidy (syntetyzowane przez saturazę retinolową), aldehyd all-trans retinowy oraz β -apo-14'-karotenal (jeden z produktów asymetrycznego cięcia β -karotenu). Ponadto wykazano, że receptor RXR wiąże również niektóre kwasy tłuszczowe (np. kwas dokozaheksaenowy, kwas oleinowy, kwas fitanowy) (Ryc. 8).

Wyłączenie ekspresji genów kodujących te czynniki transkrypcyjne prowadzi do zaburzeń metabolizmu lipidów oraz glukozy. Stąd ligandy dla tych receptorów mogą stanowić podstawy terapii zespołu metabolicznego czy cukrzycy typu 2 (Li i inni, 2005). Wybrane ligandy dla receptorów RXR przedstawiono na Ryc. 8. Pochodne witaminy A zwane retinoidami indukują insulinowrażliwość i są używane do poprawy parametrów biochemicznych w cukrzycy typu 2 oraz do zmniejszenia otyłości w modelach eksperymentalnych (Faul i Grese, 2002). Retinoidy modulują również wzrost i różnicowanie komórek nowotworowych przez aktywację transkrypcji genów za pośrednictwem heterodimera RXR/RAR. Receptory RAR wiążą wszystkie kwasy trans - retinowe, natomiast RXR tylko kwas-9-cis retinowy. Obydwa występują w trzech różnych formach: α , β , γ . Receptory RXR/RAR odgrywają istotną rolę w procesach: różnicowania komórek, tworzenia organów i rozwoju (od implantacji embrionu do organogenezy), w apoptozie oraz w regulacji fizjologicznych i metabolicznych procesów w dojrzałym organizmie (Mangelsdorf i inni, 1992).

Wyróżnia się trzy podtypy tych receptorów: RXR α , RXR β oraz RXR γ (*Bookout i inni, 2006*). RXR α wykazuje największą ekspresję w wątrobie oraz występuje również w: nerkach, śledzionie, naskórku itp; RXR β występuje powszechnie w niemal każdej tkance podczas gdy RXR γ ulega ekspresji w mięśniach i mózgu (*Szanto i inni, 2004; Alaynick, 2008*).

Delecja genu RXR α jest letalna, embriony umierają z powodu niedorozwoju serca (*Szanto i inni, 2004*). Stwierdzono, że RXR α w hepatocytach odgrywa istotną rolę w podstawowym metabolizmie lipidów i homeostazie cholesterolu (*Montanaro i inni, 2007*). Poziom cholesterolu oraz TG jest bowiem podwyższony u myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach, karmionych nawet standardową paszą (*Wan i inni, 2003*). RXR α w wątrobie reguluje metabolizm: cholesterolu, kwasów tłuszczowych, kwasów żółciowych, steroidów oraz ksenobiotyków (*Sucov i inni, 1994; Kastner i inni, 1994; Gruber i inni, 1996; Krezel i inni, 1996; Brown i inni, 2000*). Hepatocyty wyizolowane z wątroby myszy z wyłączonym genem RXR α prezentują ponadto krótszy czas życia oraz mniejszą zdolność regeneracyjną (*Imai i inni, 2001*).

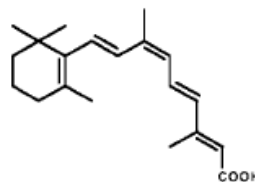
Delecja genu RXR α w tkance tłuszczowej (*Imai i inni, 2001*) prowadzi do zakłócenia dojrzewania preadipocytów oraz do oporności na rozwój otyłości.

Z kolei rezultatem wyłączenia RXR α genu w skórze dorosłych myszy jest utrata owłosienia, cysty skórne oraz hiperprolifracja hepatocytów i zaburzone ich dojrzewanie (*Li i inni, 2000; Li i inni, 2001*).

Wyłączenie tego genu w epitelium prostaty prowadzi do przedrakowego rozrostu (*Huang i inni, 2002*).

Receptory RXR aktywowane ligandem regulują wiele procesów w komórce poprzez tworzone heterodimery z podgrupą innych receptorów jądrowych (*Rastinejad, 2001*). W metabolizmie lipidów istotną rolę odgrywają heterodimery RXR z PPAR, LXR oraz FXR (Ryc. 9). Te heterodimery mogą być aktywowane przez ligandy (lipidy z diety) zarówno dla RXR jak i receptora towarzyszącego. Związanie liganda do każdego z tych receptorów aktywuje kaskadę enzymatyczną, która ma na celu przywrócenie homeostazy lipidów poprzez regulację transkrypcji genów związanych z ich metabolizmem, magazynowaniem, transportem i usuwaniem (*Lefebvre i inni, 2010*).

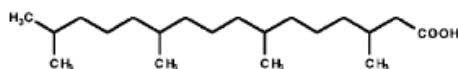
Kwas 9-cis retinowy



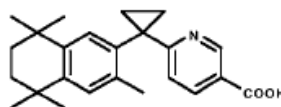
Kwas dokozaheksaenowy



Kwas fitanowy



LG100268



Ryc. 8. Struktura naturalnych i syntetycznych aktywatorów czynnika transkrypcyjnego RXR (ang. *Retinoid Xenobiotic Receptor*) (wg Alaynick, 2008).

Kwas 9-cis retinowy, kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas fitanowy są naturalnymi aktywatorami receptora RXR. Najczęściej używanym syntetycznym agonistą receptora RXR jest LG100268.

2.5.1 Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPARs)

Czynniki transkrypcyjne PPAR biorą udział w utrzymaniu homeostazy przemian węglowodanów i lipidów oraz kontrolują proliferację i różnicowanie się komórek (Rosen i inni, 2000). Są receptorami jądrowymi wiążącymi ligandy będące pochodnymi kwasów tłuszczowych i aktywującymi transkrypcję genów biorących udział w procesach transportu oraz metabolizmu kwasów tłuszczowych i glukozy. Ponadto, istnieją prace dowodzące działania pro i przeciwzapalnego oraz angiogennego tych czynników (Rosen i Spiegelman, 2001; Varga i inni, 2011). Wyróżnia się 3 podtypy tych receptorów: PPAR α , β , γ .

Aktywacja tych receptorów poprzez syntetyczne ligandy prowadzi do poprawy parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej organizmu. Stosowane farmakologiczne ligandy dla PPAR γ – tiazolidinediony (TZDs) (troglitazon, pioglitazon, ciglitazon i rosiglitazon) indukują insulinowrażliwość i obniżają poziom glukozy u pacjentów z cukrzycą typu 2

poprzez: aktywację przekazywania sygnału od receptora insulinowego w adipocytach, redukcję uwalniania kwasów tłuszczowych oraz działanie przeciwzapalne (*Rosen i Spiegelman, 2000; Barish i inni, 2005*). TZDs zwiększają bowiem pobieranie FFAs przez tkankę tłuszczową, co indukuje zużywanie glukozy przez mięśnie szkieletowe. Te syntetyczne ligandy hamują również odpowiedź zapalną oraz proliferację i migrację komórek mięśni gładkich ścian naczyń, zapobiegając w ten sposób rozwojowi miażdżycy (*Takano i Komuro, 2009*). Syntetyczne aktywatory PPAR γ prowadzą jednakże do aktywacji adipogenezy i wzrostu wagi ciała (*Fiévet i inni, 2006; Takano i Komuro, 2009*).

Fibraty natomiast stanowią syntetyczne ligandy dla PPAR α , które indukują poprawę gospodarki lipidowej, poprawiają funkcje komórek β trzustki oraz zmniejszają apetyt i wagę ciała (*Bookout i inni, 2006*). Te syntetyczne ligandy stymulują bowiem utlenianie FFAs w wątrobie, a redukują syntezę i uwalnianie TG, czego konsekwencją jest zwiększony napływ FFAs do wątroby z tkanek obwodowych (mięśnie, tkanka tłuszczowa). Zaletą agonistów PPAR α jest obniżanie apetytu i wagi ciała (*Ravnskjaer i inni, 2005; Fiévet i inni, 2006*).

Stąd dąży się do wprowadzenia syntetycznych ligandów, które wiążą się zarówno do PPAR α jak i PPAR γ . Przykładem takich ligandów są glitazary. Substancje te są agonistami PPAR α/γ , które wykazują silniejszą aktywność (w porównaniu do selektywnych, syntetycznych ligandów PPAR) w poprawie gospodarki lipidowej i węglowodanowej u pacjentów z cukrzycą typu 2 lub objawami zespołu metabolicznego (*Fiévet i inni, 2006*). Ligandy te zwiększają bowiem insulinowrażliwość (ale nie są adipogenne) oraz chronią przed rozwojem miażdżycy, co wykazano w badaniach na zwierzętach (*Rosen i Spiegelman, 2001*).

PPAR α

PPAR α reguluje ekspresję genów w: wątrobie, brunatnej tkance tłuszczowej (BAT), sercu, mięśniach oraz nerkach (*Bookout i inni, 2006*). Ten czynnik transkrypcyjny wiąże mononienasycone oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe, eikozanoidy oraz fibraty (*Crisafulli i Cuzzocrea, 2009*). PPAR α stymuluje β -oksydację kwasów tłuszczowych. Po związaniu fibratów lub kwasów tłuszczowych, ten czynnik transkrypcyjny bierze również udział w kontroli poziomu HDL cholesterolu poprzez regulację ekspresji apolipoprotein HDL: apo A-I i apo A-II. Aktywatory PPAR α obniżają również poziom TG poprzez: zwiększanie lipolizy i usuwanie pozostałych cząstek na drodze zmian w poziomie LPL i apolipoproteiny apo C-III; indukcję

pobierania kwasów tłuszczowych i ich przemiany do pochodnych acyl-CoA (przez aktywację FAT, FATP i ACS); stymulację ekspresji genów kodujących enzymy β oksydacji kwasów tłuszczowych; obniżoną syntezę kwasów tłuszczowych i TG oraz zmniejszenie syntezy VLDL. Aktywacja PPAR α prowadzi również do indukcji ekspresji genów uczestniczących w transporcie kwasów tłuszczowych do peroksysomów (D2 i D3 transportery wiążące ATP) oraz w omega oksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych (cytochrom P-450 4A1 i A3, CYP4A1, CYP4A6) (Desvergne i Wahli 1999; Bookout i inni, 2006; Rosen i Spiegelman, 2001).

Wykazano, że podczas głodzenia, PPAR α jest aktywowany przez kwasy tłuszczowe pochodzące z tkanki tłuszczowej, co prowadzi do tworzenia ciał ketonowych w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie (Sunny i inni, 2010). Myszy z delecją PPAR α podczas głodzenia prezentują hipoglikemię i hipoketonemię, stłuszczenie wątroby i podwyższony poziom niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych, co wskazuje na kluczową rolę ekspresji tego receptora w odpowiedzi hepatocytów na niedobór substratów energetycznych (głodzenie) (Kersten i inni, 1999; Leone i inni, 1999). Z kolei u myszy z delecją PPAR α skarmianych dietą wysokotłuszczową, obserwowano stłuszczenie wątroby przy niezmienionej wadze ciała (w wyniku upośledzenia katalizy kwasów tłuszczowych). W mięśniu sercowym aktywacja PPAR α prowadzi natomiast do obniżenia pobierania glukozy, a zwiększenia utleniania kwasów tłuszczowych.

PPAR γ

PPAR γ ulega ekspresji w adipocytach, makrofagach i mięśniach, gdzie reguluje rozwój, homeostazę lipidów i metabolizm glukozy (Rosen i Spiegelman, 2000; Barish i inni, 2005). Delecja PPAR γ prowadzi do zahamowania rozwoju tkanki tłuszczowej u myszy, a u dorosłych osobników natomiast jest niezbędna do zróżnicowania się i przeżycia adipocytów (Barak i inni, 1999; He i inni, 2003).

Endogennymi ligandami PPAR γ są kwasy tłuszczowe i eikozanoidy (Rosen i Spiegelman, 2000). Zaktywowany przez ligand receptor PPAR γ , aktywuje ekspresję genów biorących udział: w pobieraniu glukozy (transporter glukozy 4, Glut4), w metabolizmie lipidów (receptor zmiatający (scavenger receptor), białko wiążące kwasy tłuszczowe, lipaza lipoproteinowa, acyl-CoA syntetaza, CYP4B1), w rozpraszaniu energii (kinaza glicerynianowa, UCP2 i UCP3) (Rosen i Spiegelman, 2001; Allen i inni, 2006). Zaobserwowano, że u myszy z delecją PPAR γ

w mięśniach szkieletowych, pobieranie glukozy zmniejsza się o 80% (*Hevener i inni, 2003*). Delecja PPAR γ w tkance tłuszczowej i mięśniach u myszy prowadzi również do rozwoju insulinooporności (*Hevener i inni, 2003*).

PPAR δ

PPAR δ ulega powszechnie ekspresji, a jego agonistami są kwasy tłuszczowe. Geny regulowane przez PPAR δ kontrolują β oksydację kwasów tłuszczowych w brunatnej tkance tłuszczowej myszy (długołańcuchowa acyl-CoA syntetaza, długołańcuchowa acyl-CoA dehydrogenaza, acyl-CoA oksydaza). Aktywatory PPAR δ stymulują również rozpraszanie energii (UCP1 i UCP3) i magazynowanie lipidów (*Fürnsinn i inni, 2007*). Delecja PPAR δ w większości przypadków jest letalna, a myszy, które przeżyją, prezentują znacznie mniejszą ilość tkanki tłuszczowej (*Rosen i Spiegelman, 2001; Allen i inni, 2006*).

Indukcja PPAR δ w adipocytach prowadzi do zwiększonej β oksydacji kwasów tłuszczowych i rozpraszania energii w postaci ciepła oraz do oporności na rozwój otyłości indukowanej wysokotłuszczową dietą (*Qin i inni, 2008*).

Nadekspresja PPAR δ w tkance tłuszczowej prowadzi do zwiększonego utleniania lipidów w adipocytach (niedowaga) oraz do nabycia przez białą tkankę tłuszczową pewnych cech charakterystycznych dla brunatnej tkanki tłuszczowej (*Wang i inni, 2003*). Zaburzenie funkcji PPAR δ w kardiomiocytach indukuje z kolei kardiomiopatię i obniżenie ekspresji genów biorących udział w β oksydacji (*Cheng i inni, 2004*).

2.5.2 Receptory wątrobowe (LXRs)

Receptory LXR są czynnikami transkrypcyjnymi regulującymi metabolizm cholesterolu. Są aktywowane poprzez związanie oksysteroli (pochodnych utlenionego cholesterolu) np. 24(S),25-epoksycholesterolu (*Janowski i inni, 1996; Lehmann i inni, 1997; Fu i inni, 2001*). LXR α ulega ekspresji w wątrobie, tkance tłuszczowej, jelicie, makrofagach oraz nerkach, podczas gdy LXR β występuje powszechnie (*Repa i Mangelsdorf, 2000; Bookout i inni, 2006*). Kwasy tłuszczowe są substancjami zwiększającymi ekspresję LXR α . Wysokotłuszczowa dieta lub głodzenie (związane z podwyższonym poziomem kwasów tłuszczowych w osoczu) indukują ekspresję LXR α w wątrobie szczura (*Tobin i inni, 2000*). Krótkołańcuchowe nienasycone kwasy

tłuszczowe są antagonistami LXR, natomiast długołańcuchowe kwasy tłuszczowe wywołują wzrost ekspresji LXR α (Tobin i inni, 2000).

Insulina zwiększa ekspresję LXR α w wątrobie *in vitro* i *in vivo*. Stymulacja lipogenezy w wątrobie przez insulinę może być zatem częściowo indukowana przez receptor LXR (Tobin i inni, 2002). Innym fizjologicznym ligandem LXR jest glukoza i glukozo-6-fosforan (Mitro i inni, 2007). Karmienie myszy glukozą prowadzi bowiem do wzrostu ekspresji genów aktywowanych przez receptor LXR (w wątrobie i jelicie).

W odpowiedzi na wzrost stężenia oksysteroli w komórce, LXR aktywuje ekspresję genów biorących udział w zwrotnym transporcie cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby i w metabolizmie cholesterolu w wątrobie (Tontonoz i Mangelsdorf, 2003; Steffensen i Gustafsson, 2004).

Receptory LXR indukują również ekspresję genów zależnych od ATP-transporterów stymulujących wypływ cholesterolu z makrofagów (ABCA1 i ABCG), promujących zwrotny transport cholesterolu do wątroby (apolipoproteiny A-I, E, białko transportujące fosfolipidy, lipaza lipoproteinowa, CETP), zwiększających rozkład cholesterolu do kwasów żółciowych (CYP7A1), wywołujących wydalanie cholesterolu z żółcią (ABCG5 i ABCG8) oraz hamujących wchłanianie cholesterolu w jelicie (ABCG5, ABCG8 i ABCA1). Receptory te stymulują syntezę kwasów tłuszczowych i TG poprzez stymulację ekspresji czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c. Indukcja receptorów LXR hamuje aktywność czynników zapalenia przez liposacharydy w makrofagach (Fontaine i inni, 2007). Receptory LXR biorą również udział w regulacji ekspresji genów uczestniczących w syntezie hormonów steroidowych, w przekaznictwie sygnałów od czynników wzrostowych oraz w zapaleniu (Stulnig i inni, 2002; Joseph i inni, 2003).

Myszy z delecją LXR α wykazują obecność złogów lipidowych w wątrobie, w wyniku nadmiernej akumulacji estrów cholesterolu (Peet i inni, 1998). Badania prowadzone na modelach zwierzęcych pokazują, że podanie syntetycznych ligandów dla LXR, prowadzi do: obniżonego wchłaniania cholesterolu, a zwiększonego jego uwalniania w żółci oraz do wzrostu poziomu HDL- cholesterolu. U myszy podatnych na rozwój blaszki miażdżycowej, zaobserwowano, że aktywacja receptorów LXR hamuje formowanie blaszki miażdżycowej.

Natomiast delecja LXR β u myszy nie prowadzi do znaczących zaburzeń metabolizmu. Z kolei myszy z wyłączonym genem LXR α oraz LXR β wykazują wyższy poziom cholesterolu

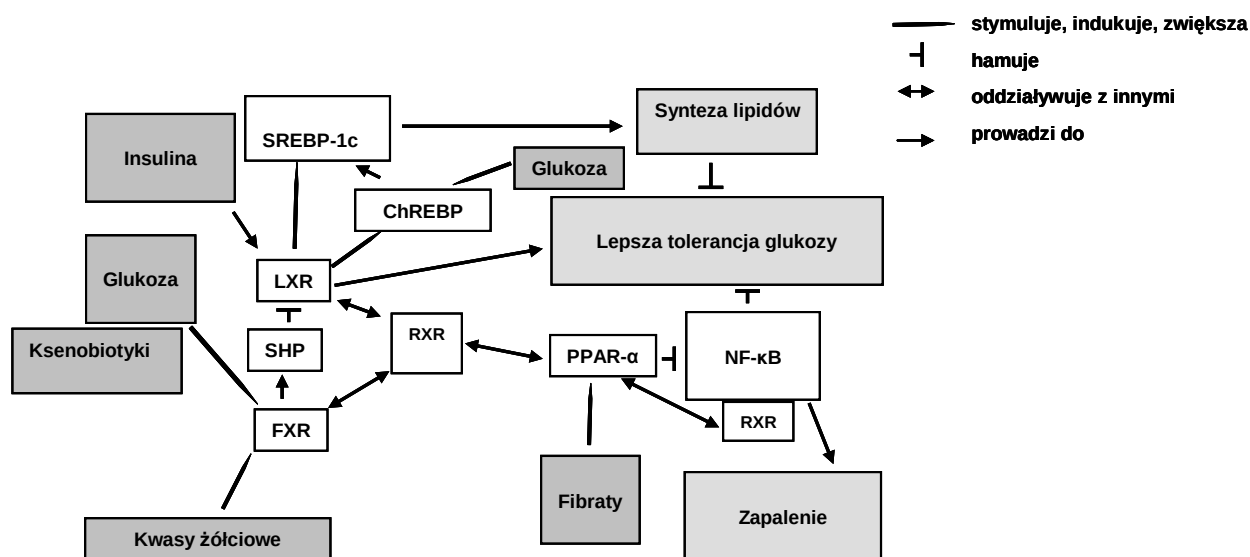
(Alberti i inni, 2001). Farmakologiczna aktywacja receptorów LXR indukuje ekspresję lipogennych genów (SREBP-1c, FAS, SCD-1) i zwiększa poziom TG w wątrobie oraz osoczu (Peet i inni, 1998; Schultz i inni, 2000).

2.5.3 Receptor farnezoidylowy (FXR)

Receptory FXR wykazują ekspresję w wątrobowo-jelitowym systemie, nerkach i nadnerczach. FXR są receptorami dla kwasów żółciowych takich jak: kwas chenodeoksycholowy i kwas cholowy (Lee i inni, 2006; Cariou i Staels, 2007; Zhang i Edwards, 2008; Staels i Kuipers, 2007). Geny regulowane przez FXR wpływają na uwalnianie kwasów żółciowych i fosfolipidów do żółci, reabsorpcję kwasów żółciowych w jelicie oraz pobieranie cholesterolu w wątrobie z HDL surowicy (Yang i inni, 2010). Przy nadmiarze kwasów żółciowych, FXR hamuje syntezę kwasów tłuszczowych poprzez indukcję transkrypcyjnego represora zmniejszającego ekspresję enzymu CYP7A1, który pełni istotną rolę w syntezie kwasów tłuszczowych. Myszy z delecją FXR prezentują wyższy poziom kwasów żółciowych w osoczu krwi. Dlatego też wykazują one wyższy poziom całkowitego cholesterolu HDL i TG w surowicy krwi (Fiorucci i inni, 2007).

Receptor FXR kontroluje również poziom glukozy. U myszy z delecją tego receptora zaobserwowano rozwój insulinooporności i hiperglikemii (Ma i inni, 2006). Aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego prowadzi natomiast do zahamowania ekspresji genów uczestniczących w glukoneogenezie (karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej i glukozo-6-fosfatazy), czego nie obserwowano u myszy z delecją receptora FXR lub SHP. Taki wynik doświadczenia potwierdza zatem, że ścieżka przekazu sygnału FXR/SHP odgrywa rolę w regulacji produkcji glukozy w wątrobie (Ma i inni, 2006). Z kolei u myszy otyłych prezentujących objawy cukrzycy, wykazano zwiększoną insulinowrażliwość i tolerancję glukozy, w wyniku aktywacji receptora FXR (Zhang i inni, 2006).

Stymulacja receptora FXR prowadzi również do obniżenia ekspresji SREBP-1c, do wzrostu ekspresji PPAR α , który promuje β -oksydację kwasów tłuszczowych (Staels i inni, 2007; Fiorucci i inni, 2007). Receptor FXR indukuje również ekspresję receptora dla VLDL i promuje usuwanie TG, stymuluje ekspresję apolipoproteiny apo CII, a hamuje ekspresję apolipoproteiny apo CIII, która stanowi inhibitor lipazy lipoproteinowej (Staels i inni, 2007; Fiorucci i inni, 2007).



Ryc. 9. Interakcje pomiędzy różnymi receptorami biorącymi udział w homeostazie lipidów, węglowodanów i kwasów żółciowych w wątrobie (wg Sanal, 2008).

ChREBP - ang. *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*, FXR - ang. *Farnesoid Xenobiotic Receptor*, LXR - ang. *Liver Xenobiotic Receptor*, NF-κB - ang. *Nuclear Factor κB*, PPAR - ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, RXR - ang. *Retinoid Xenobiotic Receptor*, SHP - ang. *Short Heterodimer Partner*, SREBP - ang. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*.

2.6 Angiogeneza w cukrzycy

W cukrzycy komórki naczyń są narażone na duże stężenia różnych molekuł związanych z: wysoką glikemią, procesem nieenzymatycznej glikacji, lipooksydacji, chronicznym zapaleniem, produkcją wolnych rodników i hiperinsulinemią. Ich konsekwencją są zaburzenia w odpowiedzi angiogennej (Martin i inni, 2003, Creager i inni, 2003). U pacjentów chorych na cukrzycę bowiem z jednej strony obserwuje się wzmożone naczyniotworzenie w nerkach i siatkówce (nefropatia i retinopatia cukrzycowa), a z drugiej strony zahamowanie angiogenezy (upośledzone gojenie ran) (Pradhan i inni, 2009). Mechanizm molekularny tych procesów nie jest do końca poznany.

Fizjologiczny wzrost poziomu glukozy po posiłku indukuje zapalenie poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB (Dickinson i inni, 2008; Costa i inni, 2007). Czynn timeranskrypcyjny NFκB, aktywuje z kolei ekspresję proangiogen nych genów: metaloproteaz, uPA, V-, I-CAM (Charo i Taubman, 2004; Charo i Ransohoff, 2006; Maxwell i inni, 1999; Karin, 2006; Karin i inni, 2002). W zapaleniu, uwalniane są również cytokiny stymulujące

angiogenezę (IL-1, IL-6, CCL5, TNF α). Ponadto, w stanie zapalnym dochodzi również do indukcji cyklooksygenazy-2 (COX-2) promującej angiogenezę poprzez stymulację produkcji VEGF (Dickinson i inni, 2008; Costa i inni, 2007). Dodatkowo, hiperglikemia i dyslipidemia indukują fagocytyzujące makrofagi do produkcji czynników wzrostowych, które stymulują proliferację (VEGF, bFGF) oraz do obniżenia generacji czynników wzrostowych hamujących proliferację (np. PEGF – ang. *Pigment Epithelial Growth Factor*) (Kozawa i inni, 1998; Morishita i inni, 1997; Elayappan i inni, 2009; Yamagishi i inni, 2006). Wysoki poziom glukozy aktywuje również transkrypcję wielu genów związanych z angiogenezą jak np. TGF β w komórkach mięśni gładkich naczyń (Stark i inni, 1998), co prowadzi do wzrostu ekspresji VEGF (Han i inni, 2000; Ziyadeh i inni, 2000).

W cukrzycy, w odpowiedzi na chroniczne zapalenie lub metaboliczne zaburzenia (np. podwyższony poziom glukozy lub kwasów tłuszczowych w osoczu), indukowany jest również stres oksydacyjny (Marfella i inni, 2001). Wolne rodniki są wytwarzane nie tylko przez mitochondria i ER ale również przez błonową NAD(P)H oksydazę oraz indukowalną syntezę NO (iNOS) (Blanchetot i Boonstra 2008; Polytarchou i inni, 2007). Wolne rodniki oraz prozapalne cytokiny przyczyniają się do nasilenia odpowiedzi angiogennej z jednej strony poprzez zwiększenie ekspresji proangiogennych czynników (VEGF, MMP-1, -2, i -9) (Polytarchou i inni, 2007; Thannickal i Fanburg, 2000), a z drugiej strony poprzez aktywację czynnika HIF1 α . Wprowadzenie bowiem plazmidu zawierającego aktywną formę HIF1 α do myszy prezentujących objawy cukrzycy typu 2 (Leprdb/db) prowadzi do wzrostu poziomu VEGF, PIGF, PDGFB i Ang2 w osoczu oraz promuje gojenie ran (Semena i inni, 2009; Liu i inni, 2008).

Pacjenci z cukrzycą typu 2 również wykazują wysoki poziom produktów nieenzymatycznej rodnikowej glikacji białek - AGEs (ang. *advanced glycation end products*) w surowicy. Te czynniki prowadzą do uszkodzenia organów, a w wyniku niedokrwienia tkanek, indukowana jest odpowiedź angiogenna. AGEs aktywują ekspresję różnych proangiogennych białek jak np. IGFBP-rP2 (ang. *Insulin-like growth factor binding protein-2*) w fibroblastach skóry i komórkach mezenchymalnych nerek (Martin i inni, 2003; Twigg i inni, 2001). Wzmoczona angiogeneza jest również związana z glikacją białek. Przykładowo, glikowana albumina stymuluje nadekspresję czynnika HIF1 α i w konsekwencji angiogenezę. Wzrost poziomu AGEs towarzyszy również retinopatii cukrzycowej, w której VEGF (Fonseca i inni,

1996; Singh i inni, 2001, Aiello i inni, 1994) ulega nadekspresji. Z drugiej strony, glikacja proangiogennych czynników (FGF, HGF, PIGF lub PDGF) prowadzi do inaktywacji ich ścieżek sygnałowych, co może tłumaczyć obniżoną odpowiedź angiogenną w niektórych tkankach (Schmidt i inni, 1999) oraz spaczoną angiogenezę i upośledzone gojenie ran u cukrzyków. Insulinooporność aktywuje lipolizę w tkance tłuszczowej i uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu oraz monoacyloglicerolu do osocza, a uwalniany 1-butyryloglicerol indukuje angiogenezę (Martin i inni, 2003).

W cukrzycy obserwuje się również wzrost stężenia substancji ALEs (*ang. advanced lipooxidation end products*). ALEs są białkami nieodwracalnie zmodyfikowanymi przez rodniki lipidowe: rodnik karbonylowy oraz malonyldialdehyd. Zaobserwowano, że obecność ALEs u cukrzyków towarzyszy chronicznemu zapaleniu (Figarola i inni, 2008). ALEs zwiększają bowiem ekspresję czynników prozapalnych: CXCL10, CCL2, COX-2, IL6, IL8 i iNOS w monocytach (Figarola i inni, 2008). Zatem produkty ALEs wykazują również proangiogenne właściwości poprzez stymulację prozapalnych/proangiogennych czynników.

2.6.1 Angiopatia cukrzycowa

Jednym z powikłań cukrzycy jest angiopatia cukrzycowa (retinopatia cukrzycowa, nefropatia cukrzycowa), która charakteryzuje się wzmożoną, ale spaczoną (kruche kapilary typu nowotworowego) angiogenezą (Hammes i inni, 2002; Girach i inni, 2006).

Retinopatia cukrzycowa jest jedną z najczęstszych przyczyn ślepoty (Shah, 2008). W jej przebiegu ściana naczynia krwionośnego staje się przepuszczalna dla składników osocza, co prowadzi do obrzęków i wysięków siatkówki. Zmienione naczynia nie spełniają również swojej funkcji odżywczej. W proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej w siatkówce oka naczynia krwionośne zamykają się, co pobudza wzrost nowych naczyń włosowatych, pojawiających się nad siatkówką i wrastających nawet w ciało szkliste (Merlak i inni, 2008). Takie naczynia są niepełnowartościowe i kruche. Mają bardzo słabą ścianę, co jest przyczyną krwotoków. Tworzy się niefunkcjonalna i łatwo pękająca sieć naczyń charakterystyczna np. dla ukrwienia guza nowotworowego (Hammes i inni, 2002). Razem z naczyniami rozwija się tkanka łączna, która kurcząc się i bliznowaciejąc może "pociągnąć" za sobą siatkówkę. Odwarstwienie siatkówki jest bardzo poważnym, zaawansowanym stadium retinopatii. Hiperinsulinemia (insulina jako czynnik wzrostu) i nadciśnienie powodują wzrost neointymy i pogrubienie ściany

naczyń, które upośledza prawidłowe dostarczanie substratów i tlenu do tkanek (*Shah, 2008; Merlak i inni, 2008*).

Nefropatia cukrzycowa jest przykładowym (obok retinopatii) powikłaniem mikronaczyniowych uszkodzeń i główną przyczyną niewydolności nerek w cukrzycy. Najwcześniejsze zmiany to przerost kłębuszków, pogrubienie błony podstawnej kłębuszków i rozwój macierzy pozakomórkowej; co prowadzi do hiperfiltracji i mikroalbuminurii. W nefropatii cukrzycowej obserwuje się również nadekspresję VEGF oraz TGF β i jego receptora 2 (*Chen i inni, 2008; Sharma i inni, 1995*).

Dlatego poznanie elementów składowych spazzonej angiogenezy w cukrzycy jest tematem intensywnych poszukiwań badawczych.

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W patologicznej angiogenezie towarzyszącej rozwojowi zespołu metabolicznego wiele czynników odgrywa istotną rolę przyczyniając się do indukcji odpowiedzi angiogennej lub jej zahamowania. Szczególną rolę w regulacji tej odpowiedzi odgrywają: hiperglikemia, hiperinsulinemia, dyslipidemia, substancje wytwarzane przez nadmiernie rozrośniętą tkankę tłuszczową (adipokiny), ale również stan zapalny i wolne rodniki indukowane w wyniku nadmiernej tkankowej podaży substratów energetycznych. Ze względu na różnorodność czynników uczestniczących w regulacji odpowiedzi angiogennej, mechanizm tej odpowiedzi w zaburzeniach metabolicznych jest nie do końca poznany. W badaniach zwraca się szczególną uwagę na odpowiedź angiogenną towarzyszącą cukrzycy typu 2 i jej komplikacji w postaci angiopatii cukrzycowej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu wybranych parametrów biochemicznych zespołu metabolicznego (przy braku pełnoobjawowego rozwoju cukrzycy typu 2) na angiogenezę. Użyty w pracy model myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach posłużył do zbadania wpływu zaburzeń metabolicznych w postaci podwyższonego poziomu cholesterolu oraz leptyny w surowicy krwi (przy prawidłowym poziomie insuliny i wyższej tolerancji glukozy u tych myszy) na angiogenezę.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1 Materiały użyte do badań

4.1.1 Pasze używane w hodowli myszy

4.1.1.1 Pasza standardowa dla gryzoni – STD (ang. *standard diet*)

- Gan-rat (Polska, Kraków)

4.1.1.2 Pasza wysokotłuszczowa – HFD (ang. *high fat diet*)

- High Saturated FAT Diet Pelleted (*MP Biomedicals, USA*)

4.1.2 Odczynniki do oznaczeń biochemicznych we krwi

4.1.2.1 Zestaw do oznaczeń glukozy (Liquick Cor-GLUCOSE 60 + wzorzec) (*Cormay, Polska*)

4.1.2.2 Zestaw do oznaczeń triglicerydów (Liquick Cor-TG 30 + wzorzec) (*Cormay, Polska*)

4.1.2.3 Zestaw do oznaczeń cholesterolu (Liquick Cor-CHOL 60 + wzorzec) (*Cormay, Polska*)

4.1.2.4 Zestaw ELISA do oznaczenia poziomu leptyny u myszy (Mouse Leptin Quantikine ELISA Kit) (*R&D Systems, USA*)

4.1.2.5 Zestaw ELISA do oznaczenia poziomu adiponektyny u myszy (Quantikine Mouse Adiponectin/Acrp30 ELISA) (*R&D Systems, USA*)

4.1.2.6 Zestaw ELISA do oznaczeń insuliny u szczura/myszy (Rat / Mouse Insulin ELISA Kit) (*Linco Research, USA*)

4.1.3 Odczynniki używane w ocenie angiogenezy *in vivo*

4.1.3.1 Odczynniki użyte w modelu angiogenezy *in vivo*

- BD Matrigel Basement Membrane Matrix (*BD Biosciences, Kanada*)
- Zasadowy Czynn timer Wzrostu Fibroblastów (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*) (bFGF) (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Czynn timer Wzrostu Śródbłnka Naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) (VEGF) (*Sigma-Aldrich, USA*)

- Pożywka do hodowli komórek śródbłnka (EGM) – Endothelial Growth Medium (*Clonetics, Iowa, USA*)
- 2,5% mieszanina antybiotyków (Penicylina 10 000 U/ml, Streptomycyna 10 mg/ml, Amfoterycyna B 0,025 mg/ml) (*Sigma-Aldrich, USA*)

4.1.3.2 Odczynniki używane do barwienia immunohistochemicznego

4.1.3.2.1 Odczynniki używane do przygotowania preparatów parafinowych

- Utrwalacz cynkowy (IHC Zinc Fixative) (*BD Pharmingen, USA*)
- Etanol 100% (*POCH, Polska*)
- Ksylen (*POCH, Polska*)
- Parafina
- Hematoksylina (*Dako, Polska*)
- Eozyna (*Dako, Polska*)

4.1.3.2.2 Odczynniki używane do barwienia immunohistochemicznego

4.1.3.2.2.1 Przeciwciało szczurze anty - mysie CD31 (*Rat anti-mouse CD31*) (*BD Pharmingen, USA*)

4.1.3.2.2.2 Anty-szczurzy zestaw do detekcji immunoglobulin związanych z peroksydazą chrzanową (*Anti-Rat Ig HRP Detection Kit*) (*BD Biosciences, Kanada*):

- Biotynylowane kozie przeciwciało anty-szczurze (*Biotinylated goat anty rat Ig*)
- Bufor do rozcieńczenia przeciwciał (*Antibody diluent*)
- Peroksydaza chrzanowa sprzężona ze straptawidyną (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*)
- Bufor DAB (*DAB buffer*)
- Barwnik DAB (*DAB chromogen*)

4.1.4 Odczynniki używane do metod biologii molekularnej

4.1.4.1 Odczynniki używane do izolacji RNA

- Trizol (*Invitrogen*)
- Chloroform (*POCH*)
- Alkohol izopropylowy (*POCH*)
- 75% etanol (*POCH*)

- Woda wolna od nukleaz (*Promega*)

4.1.4.2 Odczynniki używane do badania ekspresji genów macierzą oligonukleotydową (Affymetrix Mouse 430A_2).

- Superscript II RT-PCR Kit ze starterem T7-(dT)24 zawierającym sekwencję promotorową dla polimerazy RNA bakteriofaga T7 (*Invitrogen Life Technologies*).
- BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (*Enzo BioArray, Affymetrix*).
- RNeasy Mini Kit columns (*Qiagen*)
- Fragmentation Buffer (*Qiagen*)

4.1.4.3 Odczynniki używane do syntezy cDNA

4.1.4.3.1 SuperScript™ II RTNase H Odwrotna Transkryptaza Kit (*Invitrogen*)

- SuperScript™ II RTNase H Odwrotna Transkryptaza
- 0,1M DTT (ditiotretol)
- 250 mM Tris-HCl- pH-8,3
- 375mM KCl
- 15mM MgCl₂

4.1.4.3.2 Tris-HCl (*Sigma*)

4.1.4.3.3 10mM dNTP (*Promega*)

4.1.4.3.4 oligo (dT)25 (*Sigma*)

4.1.4.3.5 etanol, izopropanol (*POCH*)

4.1.4.3.6 woda wolna od nukleaz (*Promega*)

4.1.4.4 Odczynniki używane do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) (*real-time PCR; quantitative PCR qPCR*)

4.1.4.4.1 QuantiTect™ SYBR®Green PCR Kit (*Qiagen*)

- QuantiTect SYBR Green PCR bufor – pH 8,7
- Tris-Cl
- KCl
- (NH₄)₂SO₄
- 5mM MgCl₂
- SYBR Green I (barwnik fluorescencyjny)

- dNTP mix zawierający: dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP
- HotStarTaq®DNA polimeraza

4.1.4.4.2 woda wolna od nukleaz (*Promega*)

4.1.5 Aparatura używana w realizowaniu badania

- Waga techniczna (*Radwag, Polska*)
- Spektrofotometr Hitachi U-2000 (*Hitachi, Brisbane, CA, USA*)
- Multiscan RC reader (*Labsystem, Helsinki, Finlandia*)
- Mikroskop świetlny Olympus Cx-41 (*Filipiny*)
- Piec hybrydizacyjny GeneChip Hybridisation Oven 640 (*Affymetrix*)
- Agilent 2100 Bioanalyser (*Agilent Technologies*)
- GeneArray Scanner (*Hewlett Packard*)

4.1.6 Grupy zwierząt (myszy) użyte w badaniach

4.1.6.1 Myszy kontrolne WT (krzyżówki myszy C57/Bl6, 129/svEvTac i DBA-2) (otrzymane w ramach współpracy z prof. Yu-Jui Yvonne Wan, Department of Pathology, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, Kalifornia, USA)

4.1.6.2 Myszy transgeniczne: z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach (**RXR α ko**) (otrzymane w ramach współpracy z prof. Yu-Jui Yvonne Wan, Department of Pathology, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, Kalifornia, USA)

4.2 METODY

4.2.1 Użyte w badaniach modele zwierzęce

Badania miały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach UJ (58/OP/2003) i były wykonane według zaleceń wydanych przez lokalną komisję etyczną.

Do badań użyto 15 tygodniowych myszy (samce) w liczbie 20 sztuk. Grupę badaną (n=10) stanowiły myszy transgeniczne z wyłączonym genem $RXR\alpha$ w hepatocytach, natomiast grupę kontrolną (n=10) stanowiły myszy (WT), z których wyprowadzono myszy zmodyfikowane genetycznie (krzyżówki myszy C57/Bl6, 129/svEvTac i DBA-2).

W celu wyłączenia ekspresji genu $RXR\alpha$ w hepatocytach zespół Pani Prof. Yu-Jui Yvonne Wan skonstruował “floxed” allel genu $RXR\alpha$, w którym krótkie sekwencje *lop* włączono do intronów otaczających czwarty egzon genu $RXR\alpha$, który koduje domenę wiążącą się z DNA. Następnie wykonano transfekcję tego genu *in vitro* do zapłodnionego jaja myszy. Wyhodowane myszy (nosiciele tego allelu) skrzyżowano z linią transgeniczną wykazującą ekspresję *cre* rekombinazy pod kontrolą promotora albuminy, której gen ulega ekspresji w wątrobie. Stąd *cre* rekombinacja prowadzi do uszkodzenia egzonu czwartego, a w konsekwencji **uniemożliwia ekspresję genu $RXR\alpha$ specyficznie tylko w hepatocytach** (Wan i Cai, 2000).

Przesłane z USA myszy hodowano w klatkach (po 5 sztuk) w temperaturze 22°C z 12 godzinnym cyklem dnia i nocy oraz wolnym dostępem do pokarmu i wody.

4.2.2 Protokół badań (Ryc. 10)

Kontrolę genotypu myszy przeprowadzano według metody opisanej w punkcie 4.2.3. Zwierzęta **wykazujące ekspresję genu $RXR\alpha$ w wątrobie** zakwalifikowano do **grupy kontrolnej (WT) (n=10)**. Grupę badaną (n=10) stanowiły myszy $RXR\alpha$ ko.

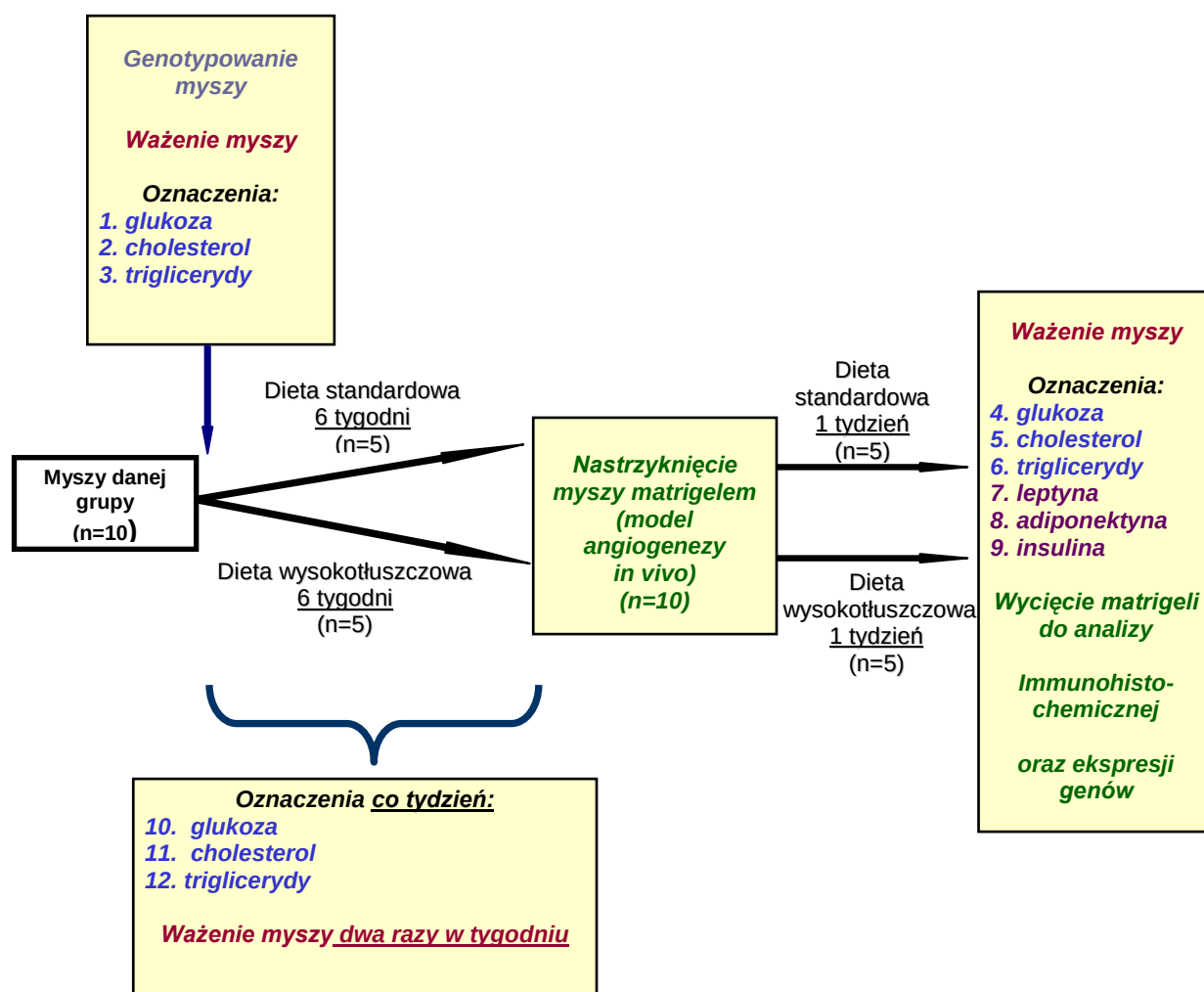
Myszy z delecją genu $RXR\alpha$ w hepatocytach ($RXR\alpha$ ko) jak i myszy kontrolne (WT) podzielono na dwie podgrupy po 5 sztuk na podgrupę. W celu wywołania objawów zespołu metabolicznego jedną podgrupę każdej grupy skarmiano przez 7 tygodni *ad libitum* dietą wysokotłuszczową (HFD) (39% energii paszy stanowił olej kokosowy) (MP Biomedicals, USA). Drugą podgrupę w każdej grupie skarmiano dietą standardową dla gryzoni (3% tłuszczu) (GAM-RAT, Polska, Kraków). Obie diety zawierały standardową, niezbędną dla myszy zawartość witaminy A: 1,400 U/kg.

Ilość spożywanej paszy określano codziennie monitorując ubytek znanej wagi zadawanej paszy. Same myszy **ważono** 2 razy na tydzień.

W czasie trwania eksperymentu raz na tydzień (po 4 godzinach głodzenia) pobierano zwierzętom krew w celu oznaczenia poziomu parametrów biochemicznych w surowicy krwi: **glukozy, cholesterolu i triglicerydów**.

W szóstym tygodniu skarmiania badano **aktywność angiogenną** w modelu angiogenezy *in vivo* według metody (Ohashi i inni, 2004) opisanej w punkcie 4.2.6.

Po 7 tygodniach skarmiania pobierano krew do oznaczeń **poziomu insuliny, leptyny oraz adiponektyny** według metod opisanych w punktach 4.2.5.4 - 4.2.5.6.



Ryc. 10. Schemat wykonanego eksperymentu w każdej z 2 grup (WT oraz myszy transgeniczne).

4.2.3 Kontrolne oznaczenie genotypu myszy

W celu potwierdzenia genotypu myszy kontrolnych WT i myszy RXRa ko przebadano ekspresję genu RXR α w wątrobie u wszystkich n=20 zwierząt po ukończeniu eksperymentu.

4.2.3.1 Izolacja całkowitego RNA

Całkowite RNA wyizolowano z wątroby myszy przy użyciu odczynnika trizol. Próbkki tkanki wątroby (wielkości około 100mg) homogenizowano na lodzie w trizolu przy użyciu szklanego homogenizatora. Do homogenatu dodawano następnie 100% chloroform w proporcji 1:5 (200 μ l chloroformu na 1ml homogenatu), mieszano przez 15 sekund i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbki wirowano (2-8°C, 30 minut, 14000xg), a otrzymaną górną fazę wodną zawierającą rozpuszczone RNA, przenoszono do nowej próbówki. RNA wytrącano przez dodanie 100% izopropanolu i zamrażano w temperaturze -20°C przez noc. Po rozmrożeniu, próbki wirowano (2-8°C, 30 minut, 14000xg). Po usunięciu nadsącza peletkę przemywano 75% etanolem i ponownie wirowano (2-8°C, 15 minut, 14000xg). Następnie nasącz usuwano, peletki RNA wysuszono i rozpuszczono w wodzie wolnej od nukleaz. Wydajność izolacji oceniano przy użyciu spektrofotometru (*Hitachi, Brisbane, CA, USA*), a jakość wyizolowanego RNA sprawdzano oceniając jakość/obecność prążków rRNA 23S i 18S na 2% żelu agarozowym.

4.2.3.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

W celu denaturacji, 1 μ g całkowitego RNA z oligo(dT) (*Sigma*) inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 minut, a następnie mieszaninę szybko schłodzono na lodzie. Następnie, RNA inkubowano w temperaturze 42°C przez 50 min w 40 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 5 x First Strand Buffer, DTT, deoxy-NTPs (*Promega*) i 200 jednostek SUPERScript II odwrotnej transkryptazy (*Invitrogen Life Technologies*). Następnie, reakcję zainaktywowano przez 15 minutowe podgrzewanie w temperaturze 70°C i schłodzono na lodzie. Ilość otrzymanego cDNA oceniano spektrofotometrycznie (*Hitachi, Brisbane, CA, USA*), a jego jakość elektroforetycznie.

4.2.3.3 Reakcja PCR

Mieszanina do reakcji PCR zawierała HotStar polimerazę, bufor, dNTP i startery dla badanego genu oraz genu referencyjnego *Gapdh*, których sekwencje przedstawiono w Tabeli 1. Startery zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3 Input 0.40 w oparciu o informacje o strukturze mRNA genów zawartych w bazie internetowej NCBI.

Startery zaprojektowano w ten sposób, aby w reakcji PCR amplifikowany był egzon 4 genu *Rxr α* (który nie ulega ekspresji u myszy RXRa ko). Specyficzność starterów sprawdzono przy użyciu programu BLAST (Tabela 3).

Reakcję PCR przeprowadzano w następujących warunkach termicznych:

1. aktywacja polimerazy w 95°C przez 15 minut
2. denaturacja w 94°C przez 30 sekund
3. przyłączanie starterów w 59°C przez 45 sekund
4. elongacja w 72°C przez 60 sekund
5. powtórzenie etapów 2-4, 40 razy
6. wyrównywanie odcinków 72 °C przez 10 minut
7. inkubacja 4°C

Produkty reakcji PCR rozdzielono elektroforetycznie na 3% żelu agarozowym.

4.2.4 Pomiary wagi myszy

Dwa razy na tydzień dokonywano pomiaru wagi myszy na wadze technicznej (*Radwag, Polska*).

4.2.5 Badania biochemiczne

Krew do badań (200µl) pobierano do probówek na skrzep, z żyły ogonowej myszy, po 4 godzinach głodzenia myszy.

Po odwirowaniu, surowicę natychmiast porcjowano, zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C (do 6 miesięcy przed oznaczeniami).

4.2.5.1 Oznaczanie stężenia cholesterolu

Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy oznaczano metodą kolorymetryczną, enzymatyczną z esterazą i oksydazą cholesterolu (ChOD/PAP) przy użyciu zestawu firmy Cormay. W użytej metodzie, intensywność produktu oksydacji cholesterolu, a następnie jego peroksydacji jest wprostproporcjonalna do stężenia cholesterolu. Do pomiaru kolorymetrycznego użyto spektrofotometru Hitachi U-2000. Czulość metody wynosi 0,026mmol/l, a współczynnik zmienności wewnątrz serii wynosił 1,1%, a między seriami 1,4%.

4.2.5.2 Oznaczanie stężenia triglicerydów

Pomiaru stężenia triglicerydów w surowicy dokonywano metodą enzymatyczną oksydaza fosfoglicerynianowa (GPO)/peroksydaza (POD) przy użyciu zestawu firmy Cormay. W użytej metodzie, natężenie barwy pochodnej chinonoiminy powstałej w wyniku oksydacji, a następnie peroksydacji triglicerydów jest proporcjonalne do stężenia triglicerydów. Do odczytu kolorymetrycznego użyto spektrofotometru Hitachi U-2000. Czulość metody wynosi 0,023mmol/l, współczynnik zmienności wewnątrz serii wynosił 1,4%, a między seriami 1,6%.

4.2.5.3 Oznaczanie stężenia glukozy

Poziom glukozy w surowicy mierzono metodą kolorymetryczną enzymatyczną oksydaza glukozy (GOD)/peroksydaza (POD) przy użyciu zestawu firmy Cormay. Do odczytu kolorymetrycznego użyto spektrofotometru Hitachi U-2000. Czulość metody wynosi 0,03mmol/l, współczynnik zmienności wewnątrz serii wynosił 0,7%, a między seriami 1,3%.

4.2.5.4 Oznaczanie stężenia insuliny

Stężenie insuliny w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu Rat/Mouse Insulin ELISA kit firmy Linco Research (*Missouri, USA*) według instrukcji dołączonej do testu.

Płytkę opłaszczoną monoklonalnymi przeciwciałami anti-mysia insulina płukano trzykrotnie buforem dołączonym do zestawu. Standardy insuliny, kontrole i próbki przygotowano według instrukcji. Następnie na płycie rozporcjowywano po 10μl buforu do rozcieńczania przeciwciał oraz buforu stanowiącego próbę ślepa dla próbek surowicy.

Dodawano po 10µl standardów insuliny i kontroli szczurzej insuliny oraz próbek surowicy. Po czym próbki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z biotynylowanym przeciwciałem anti-insulinowym. Po inkubacji, próbki usuwano z płytki, którą płukano trzy razy aby odpłukać niezwiązane przeciwciała. Po płukaniu dodawano roztwór enzymu (konjugat streptawidyna-peroksydaza chrzanowa) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu mieszaniny inkubacyjnej, płytkę przepłukano sześć razy i dodawano substratu – roztworu tetrametylbenzydyny. Po 15 minutach reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 0,3M HCl. Absorbancję powstałego produktu mierzono przy długości fali 450nm na czytniku płytek Multiscan RC reader (*Labsystem, Helsinki, Finlandia*). Z otrzymanych wyników pomiaru absorbancji dla standardów insuliny wykreślono krzywą standardową, której równanie posłużyło do obliczenia poziomu insuliny w badanych próbkach surowicy.

Czułość testu wynosi 0,2ng/ml, współczynnik zmienności wewnątrz serii oznaczeń wynosił 8,35%, a między seriami 17,9%.

4.2.5.5 Oznaczanie stężenia leptyny

Pomiaru stężenia leptyny w surowicy krwi dokonywano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu Mouse Leptin Immunoassay firmy R&D Systems (*Minneapolis, USA*).

Na płytkę dołączoną do zestawu, pokrytą poliklonalnymi przeciwciałami specyficznymi do mysiej leptyny i zawierającą bufor do inkubacji białka z przeciwciałami, dodawano po 50µl standardów, kontroli i badanych próbek surowicy. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po czterokrotnym przepłukaniu płytki buforem płuczącym dodawano po 100µl poliklonalnych przeciwciał (anty-mysia leptyna) skonjugowanych z peroksydazą chrzanową. Po dwóch godzinach inkubacji płytkę płukano czterokrotnie. Następnie, rozpoczynano detekcję sygnału poprzez 30 minutową inkubację z mieszaniną tetrametylbenzydyny z nadtlakiem wodoru. Reakcję hamowano przez dodanie 2N kwasu siarkowego. Absorbancję mierzono przy długości fali 450nm na czytniku płytek Multiscan RC reader (*Labsystem, Helsinki, Finlandia*). Krzywą standardową wykreślono z otrzymanych wyników pomiaru absorbancji dla standardów leptyny. Służyła ona do obliczenia poziomu leptyny w badanych próbkach surowicy. Czułość metody wynosi 22pg/ml, współczynnik zmienności wewnątrz serii oznaczeń wynosił 3,8%, a między seriami 5,0%.

4.2.5.6 Oznaczanie stężenia adiponektyny

Pomiaru stężenia adiponektyny w surowicy krwi dokonywano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawu Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay firmy R&D Systems (Minneapolis, USA). Rozcieńczenia standardów adiponektyny i próbek wykonywano według instrukcji dołączonej do testu. Na płytce pokrytej monoklonalnymi przeciwciałami (anty- mysia adiponektyna) rozporcjowywano po 50µl buforu do inkubacji białka z przeciwciałami. Następnie dodawano po 50µl standardów, kontroli i badanych próbek surowicy. Po trzech godzinach inkubacji płytkę płukano pięciokrotnie i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z monoklonalnymi przeciwciałami anty- mysia adiponektyna, skonjugowanymi z peroksydazą chrzanową. Po ponownym przepłukaniu płytki dodawano po 100µl mieszaniny tetrametylbenzydyny z nadtlaniem wodoru. Po upływie 30 minut reakcję zatrzymywano poprzez dodanie kwasu chlorowodorowego. Absorbancję mierzono przy długości fali 450nm na czytniku płytek Multiscan RC reader (Labsystem, Helsinki, Finlandia). Poziom adiponektyny w badanych próbkach surowicy oznaczono korzystając z wykonanej krzywej standardowej.

Czułość metody wynosi 0,003ng/ml, współczynnik zmienności wewnątrz serii oznaczeń wynosił 5,8%, a między seriami 6,4%.

4.2.6 Model angiogenezy *in vivo* (wg Ohasi i inni, 2004)

Badania wykonywano we współpracy z zespołem Zakładu Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej CM UJ, (dr Grzegorz Dyduch) Katedry Patomorfologii w Krakowie kierowanej przez Pana Prof. Jerzego Stachurę a w późniejszych etapach realizacji przez Panią Prof. Romanę Tomaszewską.

4.2.6.1 Opracowanie modelu angiogenezy *in vivo*

W celu opracowania modelu angiogenezy *in vivo* oraz wyznaczenia odpowiedniego stężenia czynnika angiogenego wywołującego silną odpowiedź angiogenną, użyto myszy Balb/c (samice). Myszy były podskórnie nastrzykiwane matrygelem (Matrigel Matrix) (Becton Dickinson), stanowiącym mieszaninę składników substancji międzykomórkowej (kolagen IV, siarczan heparanu, entaktyna itp.). Myszy Balb/c nastrzykiwano dwoma porcjami matrygelu

(2x600 μ l) zawierającymi czynnik proangiogeny. Na myszach Balb/c przetestowano różnice w działaniu czynników proangiogeny takich jak VEGF [1-10nM] (n=5) oraz bFGF [5 - 100nM] (n=5) zawieszonych w 100 μ l pożywki EGM.

Po sześciu dniach od nastrzyknięcia, myszy zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego, a uformowane poduszki matrigelu wycinano. Matrigele wycinano w celu orientacji preparatu wraz z otaczającą skórą, utrwalono w utrwalaczu cynkowym Zinc Fixative (*Becton Bickinson*) do immunohistochemicznej oceny angiogenezy.

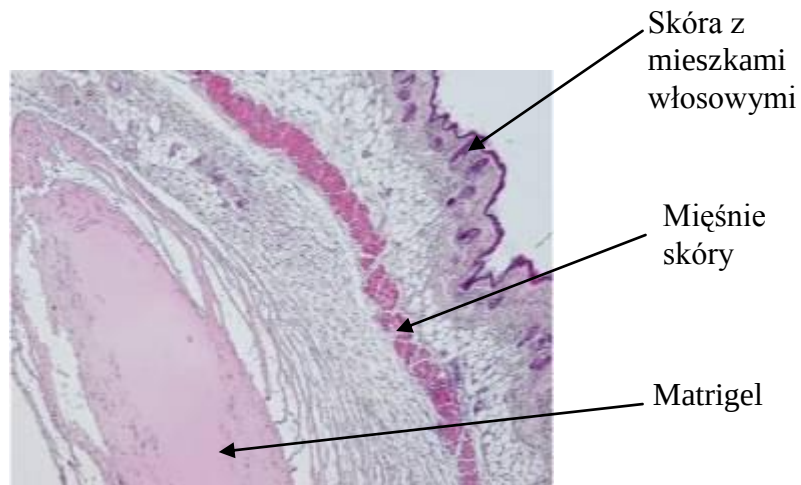
Barwienie hematoksyliną-eozyną umożliwiło topografię matrigelu (Ryc. 11, Ryc. 12), a barwienie immunohistochemiczne preparatów matrigelu za pomocą przeciwciał anti-CD31 umożliwiło uwidocznienie i ocenę ilościową zarówno wrosniętych naczyń jak i pojedynczych komórek śródbłónka (Ryc. 13).

VEGF pomimo stosowania różnych stężeń wykazywał znacznie mniejszą aktywność proangiogeną niż bFGF w badanym układzie modelowym (Ryc. 14, 15).

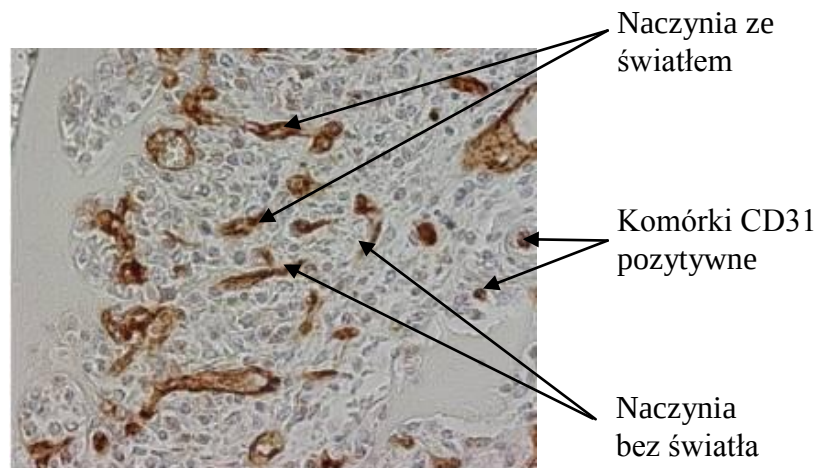
Ze względu na brak zadowalającej i powtarzalnej odpowiedzi angiogennej na VEGF do dalszych badań użyto bFGF w stężeniu 25nM.



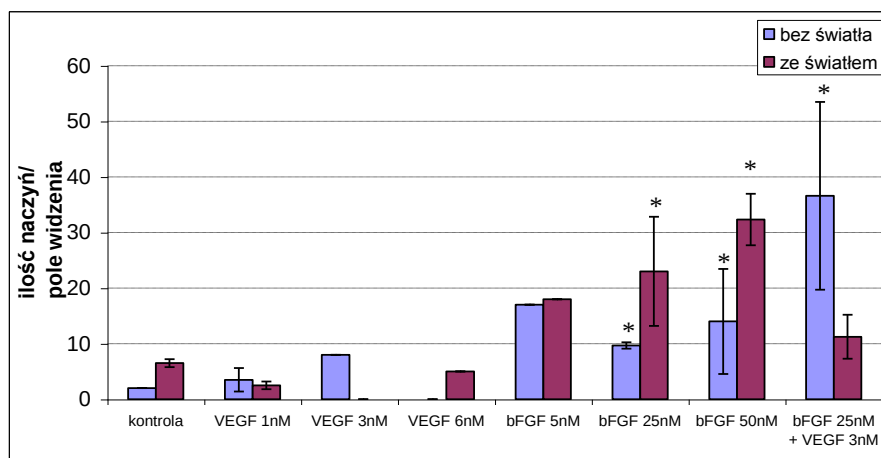
Ryc. 11. Przykładowa fotografia poduszki matrigelu po 6 dniach od podskórnego nastrzyknięcia myszy matrigelem z czynnikiem proangiogenym bFGF [25nM].



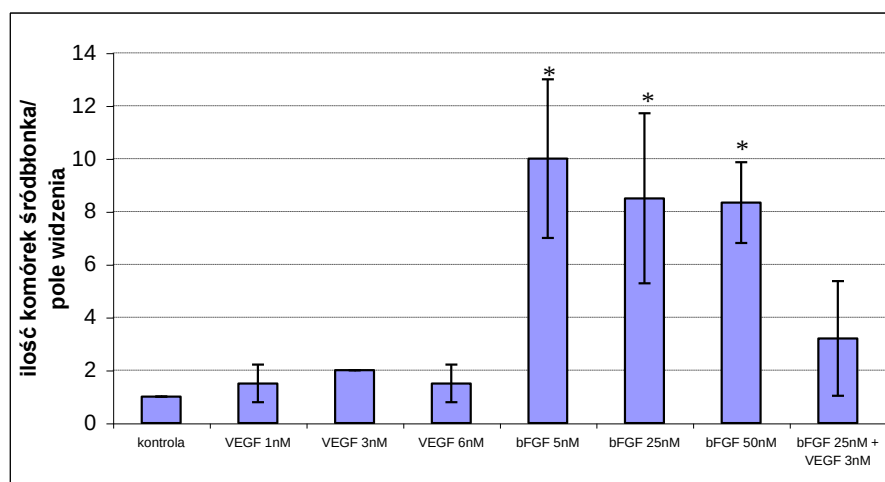
Ryc. 12. Przykładowe zdjęcie preparatu parafinowego matrigelu wraz z otaczającą tkanką, barwienie hematoksyliną i eozyną (obj x 10).



Ryc. 13. Reprezentatywne zdjęcie preparatu parafinowego matrigelu (x 40) wybarwionego anty-CD31 (1:300) przy użyciu zestawu do detekcji z peroksydazą chrzanową.



Ryc. 14. Wpływ bFGF i VEGF na powstawanie naczyń w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy Balb/c (samice) n=5; istotność statystyczna: * $p < 0,05$.



Ryc. 15. Wpływ bFGF i VEGF na chemotaksję komórek śródbłonnka do matrygelu podanego podskórnie myszom Balb/c (samice) n=5; istotność statystyczna: * $p < 0,05$.

4.2.6.2 Analiza immunohistochemiczna odpowiedzi angiogennej

W szóstym tygodniu skarmiania myszy WT i RXRa ko były podskórnie nastrzykiwane dwoma porcjami matrygelu (2x600μl) zawierającego czynnik wzrostowy bFGF [25nM] (*Sigma*) zawieszony w 100μl pożywki EGM.

Po sześciu dniach od nastrzyknięcia myszy zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego, a uformowane poduszki matrygelu wycinano. Jeden z matrygelu wycinano wraz z otaczającą skórą do immunohistochemicznej oceny angiogenezy. Drugą porcję matrygelu

zabezpieczono w Trizol Reagent (*Invitrogen*) i zamrożono w temperaturze -80°C w celu zbadania ekspresji genów w nowoutworzonych w matrigelu strukturach.

Uformowane poduszki matrigelowe wycięte wraz z otaczającą skórą utrwalano w utrwalaczu cynkowym (*Becton Dickinson*) przez 48-godziną inkubację w temperaturze pokojowej. Poduszki matrigelowe odwadniano przez inkubację w etanolu 95%, etanolu 100%, ksylenie, a następnie zatapiano w parafinie. Błoczki parafinowe cięto na mikrotomie na skrawki grubości $4\mu\text{m}$, inkubowano w łaźni wodnej, a następnie przenoszono na szkiełka i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. W celu stopienia parafiny, skrawki parafinowe matrigelu inkubowano w temperaturze 55°C przez 10 minut. Preparaty odwadniano przez kolejne inkubacje w ksylenie, 100% etanolu, 95% etanolu, a następnie zablokowano aktywność endogennej peroksydazy chrzanowej poprzez inkubację preparatów w roztworze 3% H_2O_2 w metanolu przez 10 minut. Po czym preparaty płukano dwukrotnie w buforze PBS i barwiono na obecność antygenu komórek endotelialnych PECAM-1 (*ang. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) (CD31) przy użyciu szczurzego przeciwciała anty CD31 (anty-PECAM1) (*Becton Dickinson*). W tym celu przeciwciała w rozcieńczeniu 1:300 inkubowano z materiałem przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.

Do wizualizacji struktur wybarwionych na skrawkach użyto zestawu do detekcji Anti-Rat HRP Detection Kit (*Becton Dickinson*). Po przepłukaniu roztworem PBS, preparaty inkubowano z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym w rozcieńczeniu 1:50 przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano konjugat streptawidyna-HRP i inkubowano preparaty przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu preparatów w roztworze PBS i ich wysuszeniu, inkubowano je w roztworze substratu dla peroksydazy chrzanowej (DAB) przez około 5 minut, płukano w wodzie destylowanej i wybarwiono jądra komórkowe hematoksyliną.

Analizę angiogenezy w skrawkach parafinowych matrigelu przeprowadzono w oparciu o metodę pomiaru unaczynienia nowotworu (*West, 2001*). W tym celu wybarwione w matrigelu kapilary (ze światłem jak i bez światła) oraz komórki CD31 pozytywne były liczone pod mikroskopem świetlnym Olympus Cx-41 (*Filipiny*) przy użyciu metody „hot spot” w pięciu różnych polach widzenia w każdym z trzech preparatów pochodzących z różnych części każdego matrigelu.

4.2.7 Analiza zmian w ekspresji genów w komórkach i kapilarach matrigelu

Całkowite RNA komórek, które wmigrowały do matrigelu i wytworzyły struktury kapilarne było izolowane przy użyciu odczynnika Trizol Reagent (*Invitrogen Life Technologies*). Wyizolowane całkowite RNA doczyszczano przy użyciu zestawu QIAamp RNA Blood Mini Kit for total RNA isolation (*Qiagen*). Jakość wyizolowanego RNA oceniono przy użyciu aparatu Agilent 2100 Bioanalyser (*Agilent Technologies*). Próbkę, których RIN był powyżej 5, a stężenie RNA wynosiło 10µg użyto do hybrydyzacji na macierzy oligonukleotydowej firmy Affymetrix (Affymetrix Mouse 430A_2), oraz do potwierdzenia ekspresji wybranych genów przy użyciu techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).

4.2.7.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek naciekających matrigel

Wycięte w całości i zamrożone w trizolu matrigele, homogenizowano na lodzie przy użyciu szklanych homogenizatorów. Do homogenatu (1ml) dodawano 100% chloroform (200µl), mieszano przez 15 sekund i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, próbki wirowano (2-8°C, 30 minut, 14000xg), a górną fazę wodną przenoszono do nowej probówki. Rozpuszczone RNA wytrącano poprzez dodanie 100% izopropanolu i inkubację w -20°C przez noc. Po rozmrożeniu, próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie zwirowano (2-8°C, 30 minut, 14000xg). Po usunięciu nadsącza, peletkę RNA rozpuszczano w 75% etanolu i wirowano (2-8°C, 15 minut, 14000xg). Nadsącz usuwano, a wysuszone peletki RNA rozpuszczano w wodzie wolnej od nukleaz. Jakość wyizolowanego RNA oceniano przy użyciu aparatu Agilent 2100 Bioanalyser (*Agilent Technologies*), a wydajność izolacji mierzono spektrofotometrycznie (*Hitachi, Brisbane, CA, USA*).

4.2.7.2 Skreeningowe oznaczenie ekspresji genów. Hybrydyzacja z macierzą oligonukleotydową (Affymetrix Mouse 430A_2)

Hybrydyzacja z macierzą oligonukleotydową została wykonana we współpracy z Zespołem Zakładu Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej w Gliwicach kierowanym przez Panią Prof. dr hab. med. Barbarę Jarząb.

RNA (10µg) wyizolowane z komórek w matrigelu zostało użyte do reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję tą przeprowadzono przy użyciu zestawu do odwrotnej transkrypcji Superscript II RT-PCR Kit (*Invitrogen Life Technologies*) ze starterem T7-(dT)₂₄ zawierającym sekwencję promotorową dla RNA polimerazy bakteriofaga T7.

Otrzymane cDNA posłużyło jako matryca do utworzenia cRNA znakowanego biotyną przy użyciu zestawu BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (*Enzo BioArray, Affymetrix*). Docelowe cRNA oczyszczono na kolumnach RNeasy Mini Kit columns (*Qiagen*). 16µg znakowanego biotyną cRNA pofragmentowano przy użyciu Fragmentation Buffer (*Qiagen*) w 94°C do hybrydyzacji z Affymetrix 430A_2 GeneChips (zawierającymi 22.691 sond do oznaczenia 14.000 genów mysiego genomu).

Hybrydyzację prowadzono przez noc w 45°C przez 16 h w GeneChip Hybridisation Oven 640 (*Affymetrix*). Macierze oligonukleotydowe były skanowane przy użyciu Hewlett Packard GeneArray Scanner, a wyniki analizowano za pomocą Affymetrix Microarray Analysis Suit. Do dalszej analizy brano pod uwagę wyłącznie sondy ze znaczącymi różnicami w intensywności sygnału ($p < 0,05$).

4.2.7.3 Analiza ekspresji genów po hybrydyzacji z macierzą oligonukleotydową

Względną ekspresję genów dla myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach jak również myszy kontrolnych WT (komórki z matrigelu od myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem komórek z matrigelu od myszy skarmianych dietą standardową) liczono przy użyciu programu GeneChip Operating Software (GCOS) 1.4 (*Affymetrix*) dla każdej grupy zwierząt (jako relacja diety wysokotłuszczowej względem diety standardowej). Do analizy przy użyciu programu Genmapp i Metacore wybrano tylko geny z istotną statystycznie zmianą intensywności sygnału $p < 0,05$ i dla których zmiana ekspresji genu była większa od 1,4.

4.2.7.4 Potwierdzenie ekspresji wyselekcjonowanych przez hybrydyzację z mikromacierzą oligonukleotydową genów przy użyciu techniki Real time RT-PCR

4.2.7.4.1 Ilościowa reakcja odwrotnej transkrypcji (qRT-PCR)

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 1000ng całkowitego RNA, który inkubowano przez 10 minut w temperaturze 70°C, a następnie szybko schładzano na lodzie. Następnie do RNA dodawano mieszaninę reakcyjną zawierającą Oligo(dT), dNTP, DTT, bufor, wodę wolną od nukleaz oraz 200 jednostek odwrotnej transkryptazy i inkubowano 50 minut w temperaturze 42°C. W celu inaktywacji reakcji, próbki podgrzewano przez 10 minut w temperaturze 70°C. Wydajność reakcji odwrotnej transkrypcji oceniano spektrofotometrycznie, a czystość otrzymanych próbek cDNA sprawdzano elektroforetycznie.

Ilościową reakcję Real time PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu QuantiTect SYBRGreen PCR Kit, starterów dla badanych genów oraz referencyjnego genu *Gapdh*, których sekwencję zestawiono w Tabeli 3. Startery użyte w reakcji zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3 Input 0.40, korzystając z dostępnych informacji o genach zawartych w internetowej bazie danych GeneBank. Specyficzność starterów zbadano przy użyciu programu BLAST (Tabela 1). Amplifikację przeprowadzono przy zastosowaniu systemu DNA Engine Opticon (*MJ Research Inc., Waltham, USA*). Liczbę powielonych cząsteczek cDNA badanych genów wyznaczano opierając się o kinetykę reakcji Real Time PCR z zastosowaniem detektora sekwencji DNA Engine Opticon (*MJ Research Inc.*) i zestawu zawierającego fluorescencyjny barwnik SybrGreen. Każdą reakcję prowadzono w całkowitej objętości 25µl mieszaniny reakcyjnej.

Reakcję Real Time PCR prowadzono następująco:

1. aktywacja polimerazy w 95°C przez 15 minut,
2. denaturacja w 94°C przez 30 sekund,
3. przyłączanie starterów w 60°C przez 30 sekund,
4. wydłużanie w 72°C przez 30 sekund,
5. odczyt fluorescencji,
6. powtórzenie etapów reakcji 2-5, 45 razy,

7. wyrównywanie odcinków w 72°C przez 2 minuty
inkubacja w 30°C przez 2 minuty
8. krzywa topnienia produktów reakcji w 30°C-90°C
9. Inkubacja w 4°C

Otrzymano wykres sigmoidalny zależności intensywności fluorescencji od liczby cykli. Wartość progowa cyklu – CT (ang. *threshold cycle*) posłużyła do pomiaru liczby startującej matrycy w każdej próbce.

Ekspresję badanego genu dla myszy WT oraz RXRa ko obliczano jako znormalizowana różnica wartości CT pomiędzy próbką kontrolną (dieta standardową) a badaną (dieta wysokotłuszczową) w stosunku do przeprowadzonej reakcji dla referencyjnego genu *Gapdh*. Obliczenia ekspresji genów wykonano przy pomocy programu do liczenia względnej ekspresji w Real time PCR REST-MCS według wzoru (Pfaffl, 2002):

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT target (Mean Control - Mean Sample)}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT ref (Mean Control - Mean Sample)}}$$

gdzie;

Ratio jest względną ekspresją genów,

E_{target} jest wydajnością reakcji PCR badanego genu

E_{ref} jest wydajnością reakcji PCR genu referencyjnego

$\Delta\text{CT target}$ jest różnicą średnich wartości progowych cyklu (CT) badanego genu próbki kontrolnej oraz próbki badanej

$\Delta\text{CT ref}$ jest różnicą średnich wartości progowych cyklu (CT) genu referencyjnego próbki kontrolnej oraz próbki badanej

Tabela 3. Startery użyte w reakcji RT-PCR.

Symbol genu	Nazwa i sekwencja mRNA genu	Sekwencja startera forward	Sekwencja startera reverse
<i>Gapdh</i>	ang. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase NM_008084	5'tcaccaccatggagaaggc3'	5'acaccatcacaaacatgg3'
<i>RXRα</i>	ang. Retinoid X Receptor α NM_011305.3	5'gtttacattgttggcgactt3'	5'ttgtaacagggtcatttgg3'
<i>Fabp4</i>	ang. Fatty acid binding protein 4 NM_024406	5'ggatggaaagtcgaccacaat3'	5'gtggaagtcacgccttcata3'
<i>Lpl</i>	ang. Lipoprotein lipase NM_008509	5'cctgaagactcgctctcagat3'	5'gggtgtgttgccttgcatt3'
<i>Cebpb</i>	ang. (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta) NM_009883	5'tcctctccgacctcttcg3'	5'ggccgagggtcacgtaac3'
<i>Srebf1</i>	ang. Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 NM_011480	5'gagcttccggcctgctat3'	5'tcagactcgatccaggag3'
<i>Adn</i>	ang. Adipsin NM_013459	5'cattaacatgatgtgtgcagaga3'	5'cacgtaaccacacctcgac3'
<i>Slc2a4</i>	ang. Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 NM_009204	5'ggcatgggtttccagtatgt3'	5'agatgaagaagccaagcagg3'
<i>Kdr</i>	ang. Kinase insert domain protein receptor NM_010612	5'tgcctacctcacctgtttcc3'	5'ctcttcgcttactgttctggag3'
<i>Nos3</i>	ang. nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) NM_008713	5'tgcagagaattctggcaaca3'	5'gtggtagcggttgcgatcc3'

4.3 Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki przedstawiono jako wartość średnią wraz z wyznaczonym odchyleniem standardowym SD (ang. *standard deviation*). Wyniki analizowano stosując parametryczny test T-studenta dla prób niezależnych. Różnice uznawano za istotne dla $p < 0,05$.

Korelacje między zmiennymi określano za pomocą korelacji Tau Kendalla.

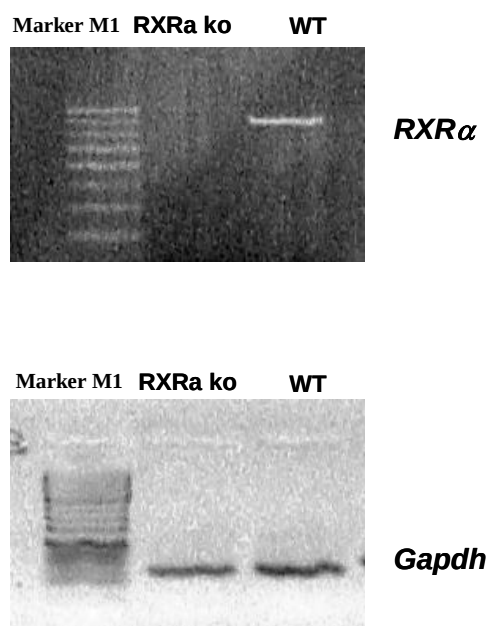
Wyniki uzyskane z reakcji Real-Time PCR analizowano przy użyciu programu REST-MCS (ang. *Relative expression Software Tool*), który służy do porównania i statystycznej analizy wyników ekspresji genów w Real Time PCR.

5. WYNIKI

5.1 Charakterystyka użytego modelu do badań

W celu zakwalifikowania myszy do grupy kontrolnej (WT) czy grupy badanej (RXRa ko), przeprowadzono genotypowanie zwierząt według metody opisanej w rozdziale 4.2.3. Myszy wykazujące ekspresję genu *RXRα* w wątrobie zakwalifikowano do grupy kontrolnej (Ryc. 16).

Myszy z wyłączonym genem *RXRα* w hepatocytach wykazały niższą wagę ciała w porównaniu do myszy kontrolnych. Myszy grupy badanej charakteryzowały się również obniżonym poziomem glukozy w surowicy krwi, podczas gdy stężenie cholesterolu i triglicerydów było wyższe u tych myszy w porównaniu do myszy kontrolnych WT (Tabela 4).



Ryc. 16. Genotypowanie myszy RXRa ko.

RNA izolowano z wątroby myszy kontrolnych WT i myszy RXRa ko. Reakcję RT-PCR przeprowadzono dla genu *RXRα* (startery zaprojektowano w ten sposób, by powielany był w reakcji PCR fragment egzonu czwartego genu) i dla kontroli dla genu *Gapdh*. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie na 3% żelu agarozowym. Dla myszy RXRa ko nie zaobserwowano na rozdziale elektroforetycznym produktu reakcji PCR dla genu *RXRα* w wątrobie.

Tabela 4. Charakterystyka myszy kontrolnych WT (n=10) i myszy z delecją RXR alpha w hepatocytach (RXRa ko) (n=10). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, IS – istotne statystycznie.

	WT n=10	RXR α ko n=10	Test T
Waga myszy [g]	32.2 $\pm$ 2.4	30.7 $\pm$ 1.6*	p=0.035, IS
Glukoza [mmol/l]	8.9 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 0.8**	p=0.003, IS
Cholesterol [mmol/l]	3.0 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.9**	p=0.002, IS
Triglicerydy [mmol/l]	1.4 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.9*	p=0.021, IS

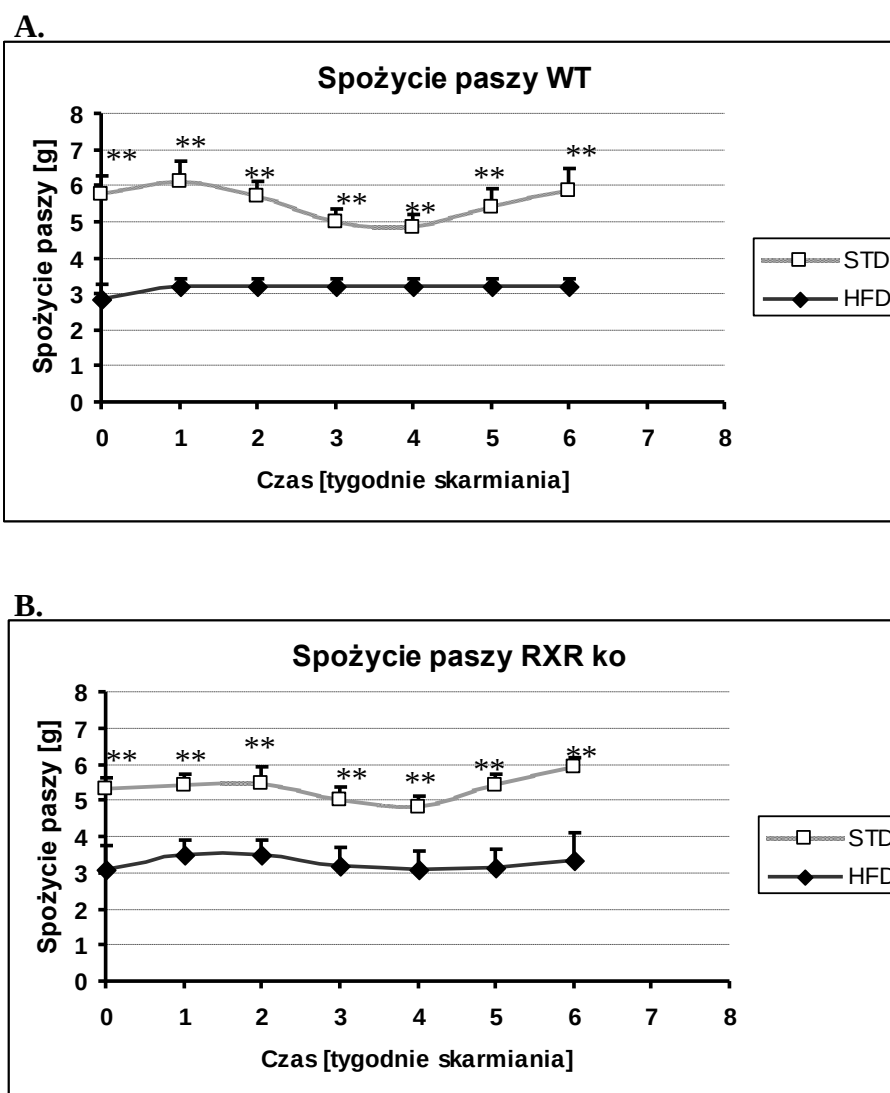
5.2 Wpływ skarmiania dietą wysokotłuszczową na spożycie paszy, wagę ciała oraz parametry biochemiczne surowicy krwi myszy

5.2.1 Spożycie paszy i waga ciała myszy podczas skarmiania dietą wysokotłuszczową

Zarówno myszy kontrolne jak i myszy grupy badanej wykazały znamienne niższe spożycie paszy wysokotłuszczowej w trakcie 7 tygodni skarmiania (Ryc. 17).

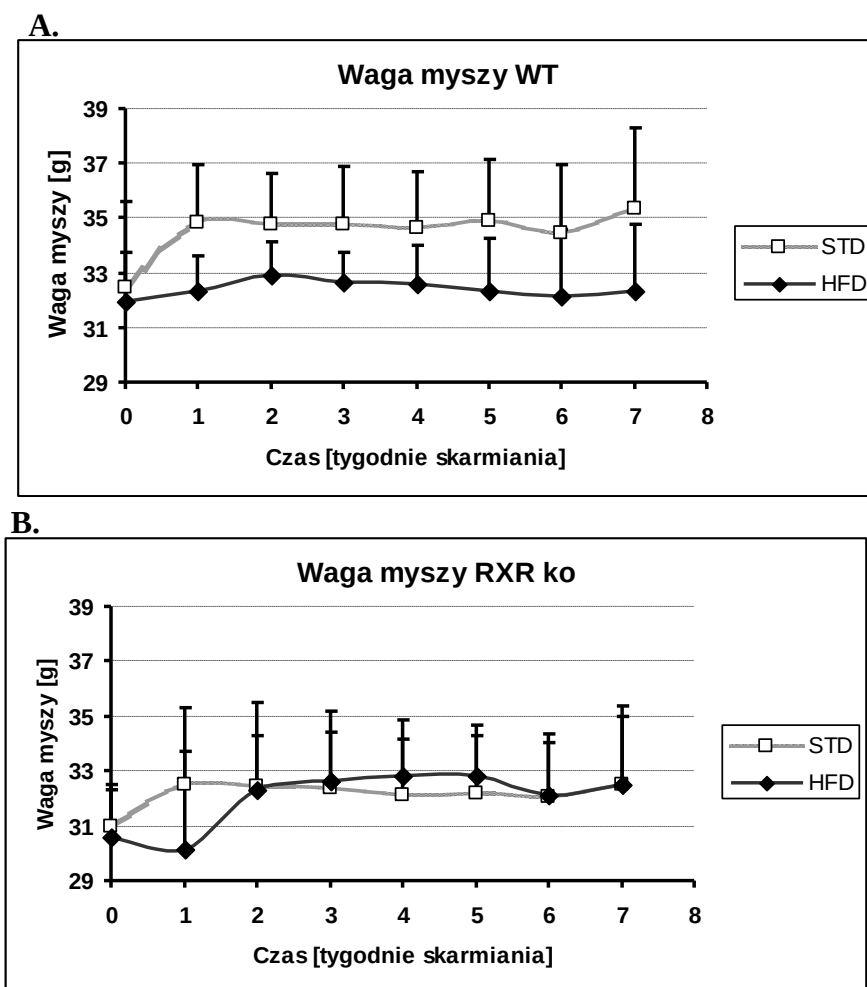
Spożycie paszy wysokotłuszczowej wyniosło około 3-4g/tydzień dla obu grup zwierząt, podczas gdy tygodniowe spożycie paszy standardowej wyniosło około 5-6,5g.

Myszy kontrolne jak i myszy z delecją RXR α w hepatocytach nie wykazały znamienne istotnych różnic w wadze ciała pod wpływem skarmiania dietą wysokotłuszczową w porównaniu do myszy skarmianych dietą standardową (Ryc. 18).



Ryc. 17. Spożycie paszy standardowej (STD) oraz paszy wysokotłuszczowej (HFD) przez myszy kontrolne WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy badane RXRa ko (n=5/pasza).

Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej **p<0,01.



Ryc. 18. Waga myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

5.2.2 Zmiana parametrów biochemicznych krwi podczas skarmiania dietą wysokotłuszczową

5.2.2.1 Poziom glukozy surowicy krwi w trakcie skarmiania

Zarówno u myszy kontrolnych WT jak i myszy RXRa ko podczas skarmiania dietą wysokotłuszczową zaobserwowano wyższy poziom glukozy w porównaniu do myszy skarmianych dietą standardową (Ryc. 19). Pola powierzchni pod krzywymi glukozy dla myszy

skarmianych dietą wysokotłuszczową wykazały istotne statystycznie wyższe wartości względem myszy skarmianych dietą standardową (Tabela 5). Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomie glukozy pomiędzy grupami myszy zarówno na diecie standardowej jak i na diecie wysokotłuszczowej (Tabela 5).

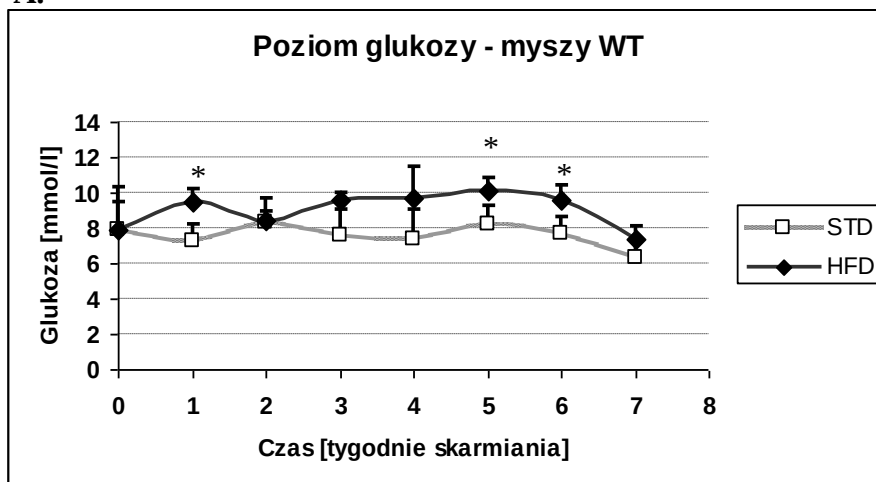
5.2.2.2 Poziom triglicerydów surowicy krwi w trakcie skarmiania

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie triglicerydów podczas skarmiania myszy dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej w obu grupach myszy (Ryc. 20, Tabela 5). Analiza pola powierzchni pod krzywą triglicerydów nie wykazała również różnic pomiędzy obiema grupami myszy zarówno na diecie wysokotłuszczowej jak i na diecie standardowej.

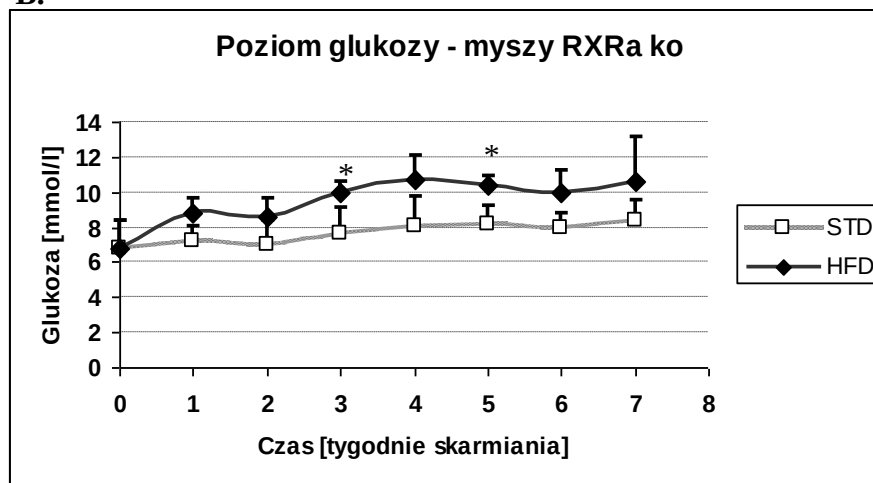
5.2.2.3 Poziom cholesterolu surowicy krwi w trakcie skarmiania

Myszy RXRa ko wykazały już na początku skarmiania znamienne wyższy poziom cholesterolu w porównaniu do myszy WT (Ryc. 21), natomiast analiza pola powierzchni pod krzywą cholesterolu na diecie standardowej nie wskazała na istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną i grupą badaną (Tabela 5). Skarmianie dietą wysokotłuszczową wywołało wzrost stężenia cholesterolu w surowicy krwi w obu grupach myszy w porównaniu do myszy skarmianych dietą standardową (Ryc. 21, Tabela 5). Natomiast analiza pola powierzchni pod krzywą cholesterolu na diecie wysokotłuszczowej pokazała istotne różnice w poziomie cholesterolu pomiędzy myszami RXRa ko oraz myszami kontrolnymi WT (Tabela 5).

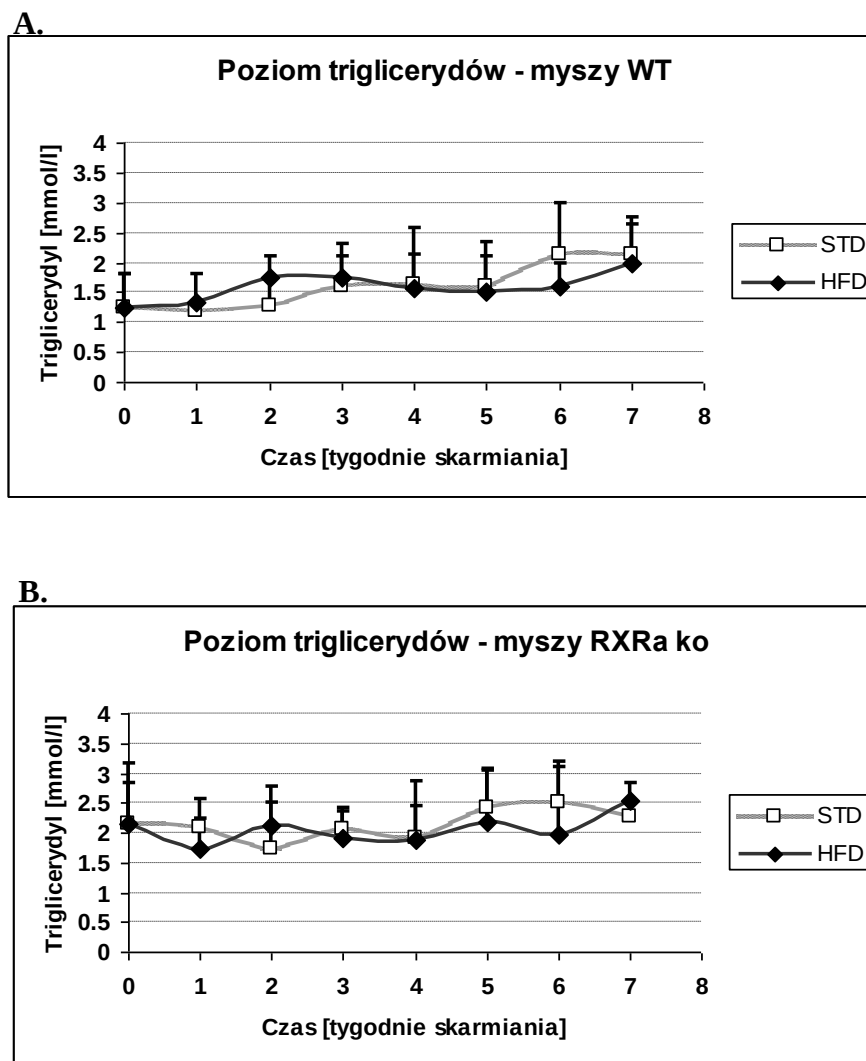
A.



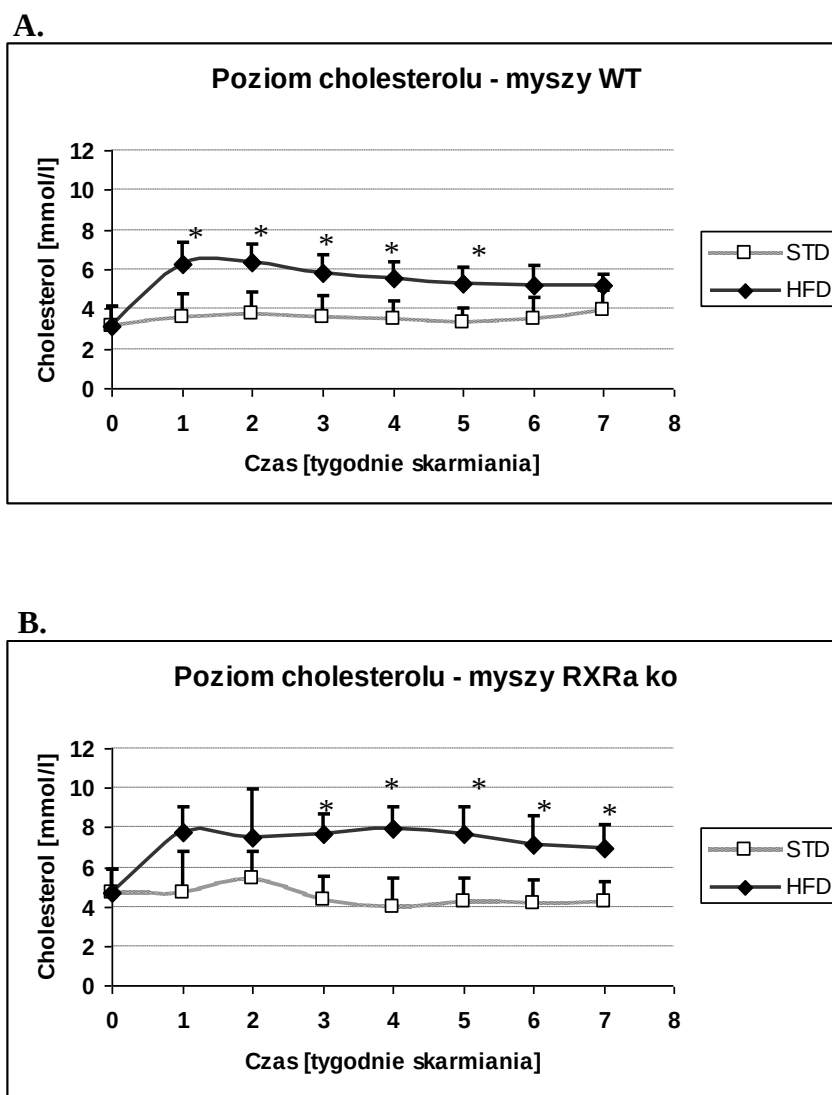
B.



Ryc. 19. Poziom glukozy w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej * $p < 0,05$.



Ryc. 20. Poziom triglicerydów w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



Ryc. 21. Poziom cholesterolu w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej * $p < 0.05$.

Tabela 5. Pole powierzchni pod krzywą (Pppk) glukozy, triglicerydów i cholesterolu dla myszy kontrolnych WT (n=5/pasza) i RXRa ko (n=5/pasza) skarmianych paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD.

	WT		RXRa ko	
	STD n=5	HFD n=5	STD n=5	HFD n=5
Glukoza Pppk	53,95 $\pm$ 6,63	67,07 $\pm$ 4,19 ^{*a}	53,33 $\pm$ 4,05	69,41 $\pm$ 4,07 ^{*a}
Triglicerydy Pppk	12,04 $\pm$ 4,28	11,17 $\pm$ 3,08	14,57 $\pm$ 3,34	14,44 $\pm$ 4,06
Cholesterol Pppk	25,43 $\pm$ 7,27	39,63 $\pm$ 6,25 ^{*a}	31,05 $\pm$ 8,33	53,76 $\pm$ 10,58 ^{*a, *b}

*a = p<0,05 HFD versus STD

*b = p<0,05 HFD RXRa ko myszy versus HFD WT myszy

5.3 Porównanie parametrów po 7 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową

5.3.1 Waga ciała myszy

Po 7 tygodniach skarmiania, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wagą myszy grupy badanej oraz kontrolnej na diecie standardowej czy wysokotłuszczowej. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu wagi u myszy WT jak i u myszy RXRa ko pod wpływem skarmiania dietą wysokotłuszczową (Ryc. 22).

5.3.2 Poziom glukozy i insuliny

Myszy RXRa ko po 7 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową nie wykazały istotnych różnic w poziomie glukozy (Ryc. 23) czy insuliny (Ryc. 24) w porównaniu do myszy WT. Myszy RXRa ko nie zaprezentowały również zarówno na diecie standardowej jak i wysokotłuszczowej statystycznie istotnych różnic w wartościach wskaźników insulinowrażliwości HOMA-IR (Ryc. 25) oraz QUICKI w porównaniu do myszy WT (Ryc. 26).

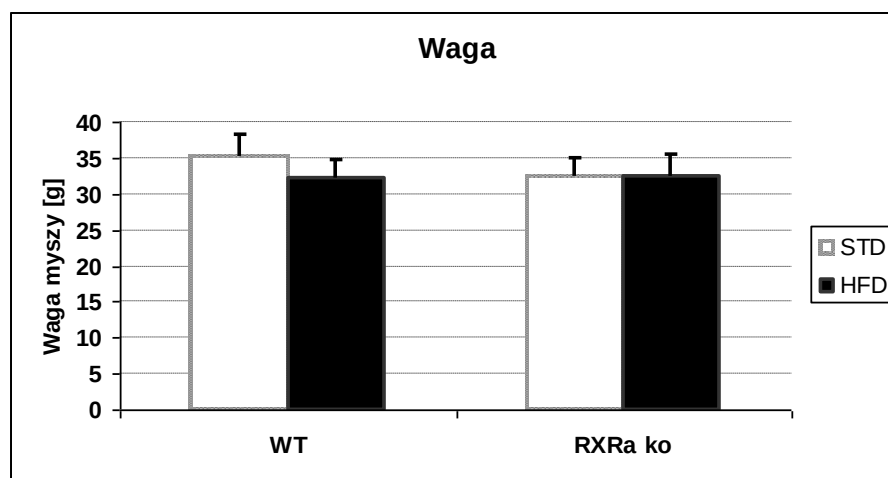
5.3.3 Poziom cholesterolu i triglicerydów

Stężenie cholesterolu po 7 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową wzrosło zarówno u myszy kontrolnych jak i w grupie badanej. Na diecie wysokotłuszczowej poziom cholesterolu był wyższy u myszy RXRa ko w porównaniu do myszy WT (Ryc. 27). Nie zaobserwowano istotnie statystycznie wyższego poziomu triglicerydów na diecie wysokotłuszczowej (Ryc. 28).

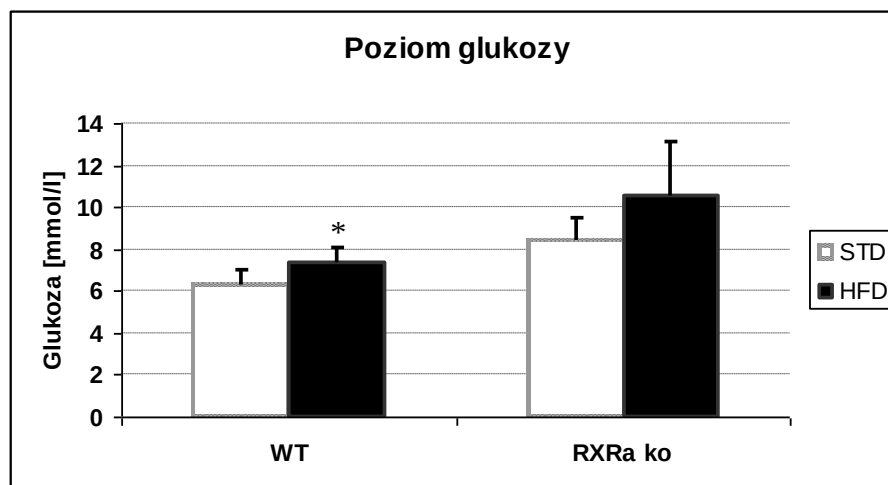
5.3.4 Poziom adipokin

W obu grupach myszy nie zaobserwowano różnic w poziomie adiponektyny po 7 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową w porównaniu do skarmiania dietą standardową. Myszy z delecją RXR α w hepatocytach nie różniły się poziomem adiponektyny w surowicy krwi od myszy kontrolnych WT (Ryc. 29).

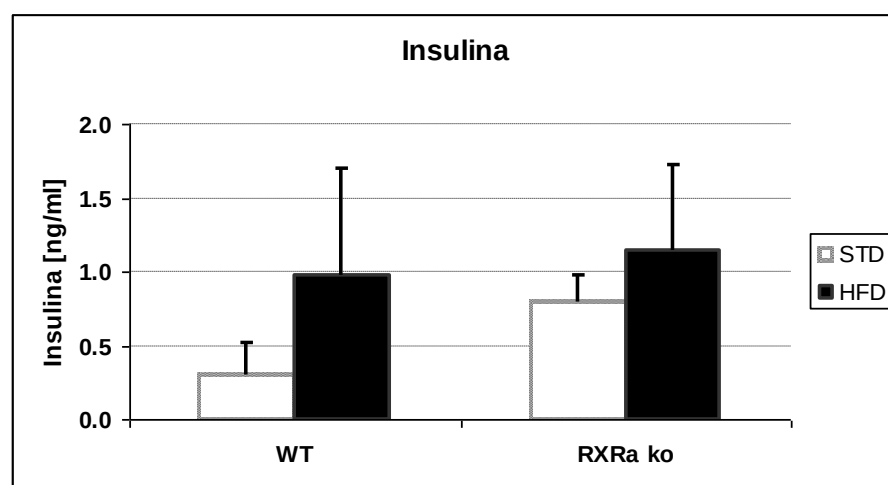
Dieta wysokotłuszczowa wywołała natomiast wzrost poziomu leptyny w surowicy krwi u myszy RXRa ko w porównaniu do myszy skarmianych dietą standardową. Ponadto, zaobserwowano istotny statystycznie wyższy poziom tej adipokiny u myszy RXRa ko w porównaniu do myszy WT na diecie wysokotłuszczowej (Ryc. 30).



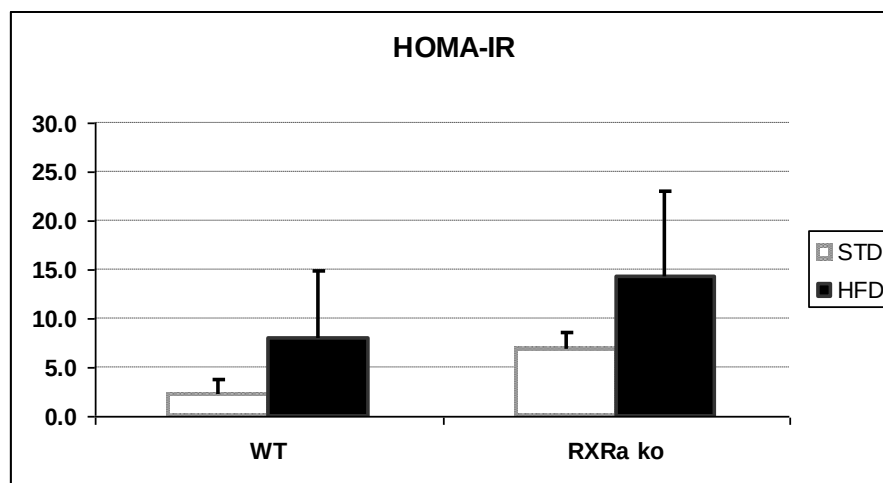
Ryc. 22. Waga myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



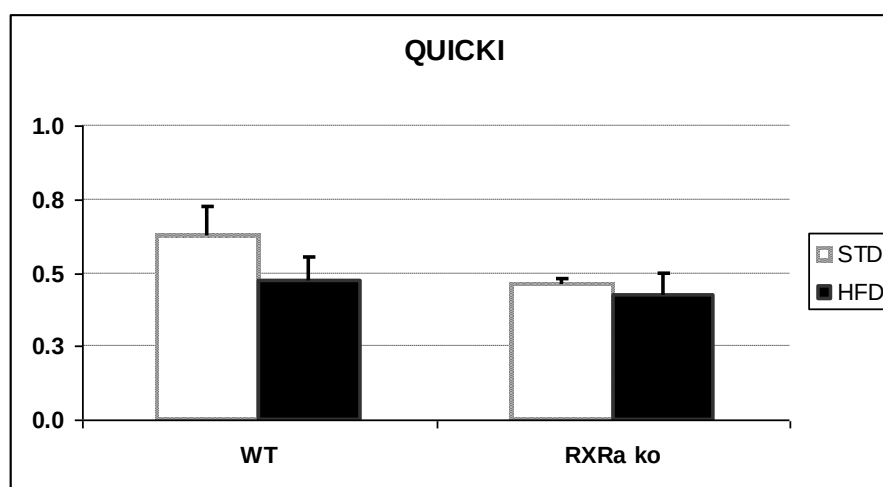
Ryc. 23. Poziom glukozy surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna * $p < 0,05$.



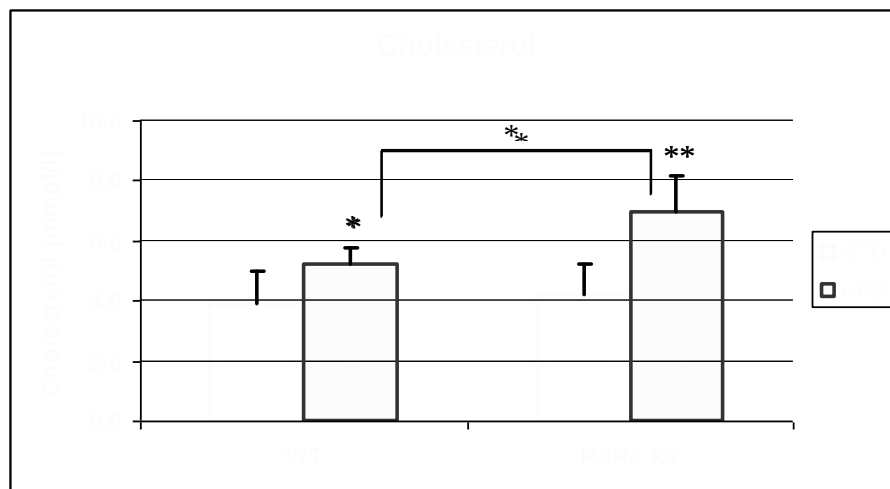
Ryc. 24. Poziom insuliny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



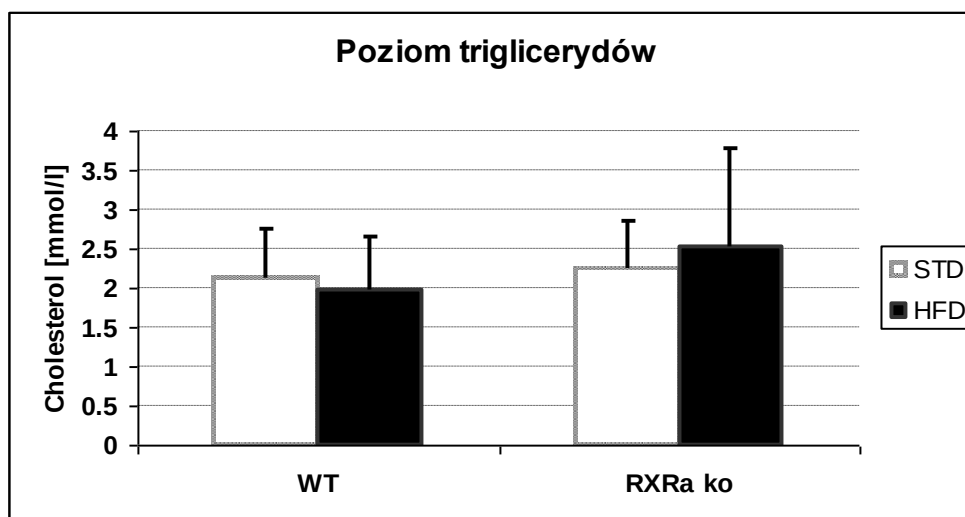
Ryc. 25. Insulinowrażliwość po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wskaźnik HOMA Homeostasis model assessment = $G * I / 22,5$, gdzie I jest to poziom insuliny na czczo ($\mu\text{U/ml}$), a G jest poziomem glukozy na czczo (mmol/l). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



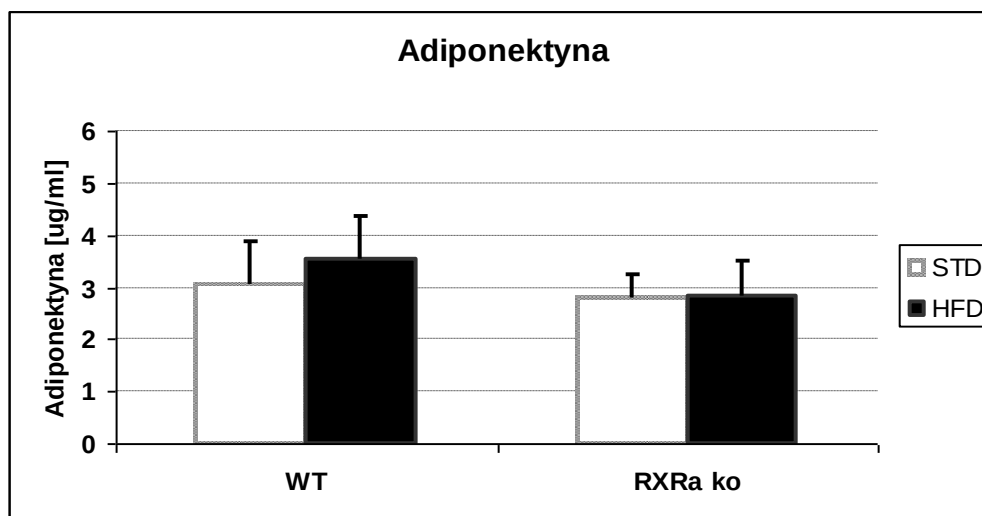
Ryc. 26. Insulinowrażliwość po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wskaźnik QUICKI Quantitative insulin sensitivity check index = $1 / [\log(I) + \log(G)]$, gdzie I jest to poziom insuliny na czczo ($\mu\text{U/ml}$), a G jest poziomem glukozy na czczo (mg/dl). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



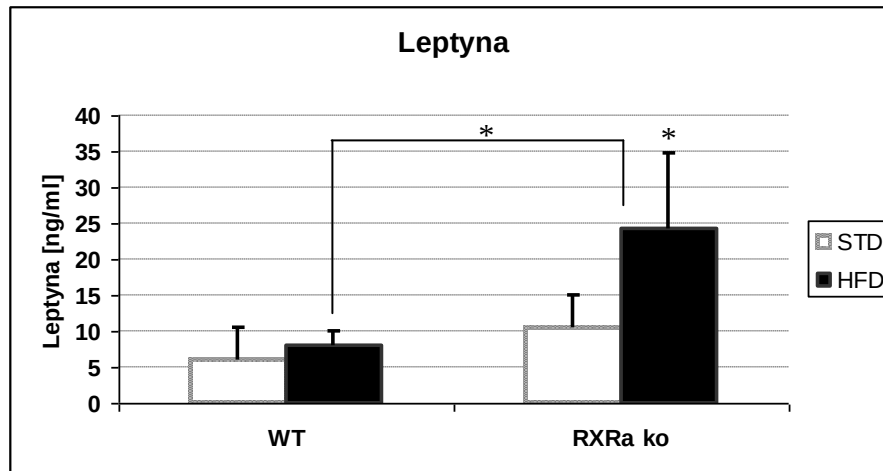
Ryc. 27. Poziom cholesterolu surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Ryc. 28. Poziom triglicerydów surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



Ryc. 29. Poziom adiponektyny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



Ryc. 30. Poziom leptyny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna * $p < 0,05$.

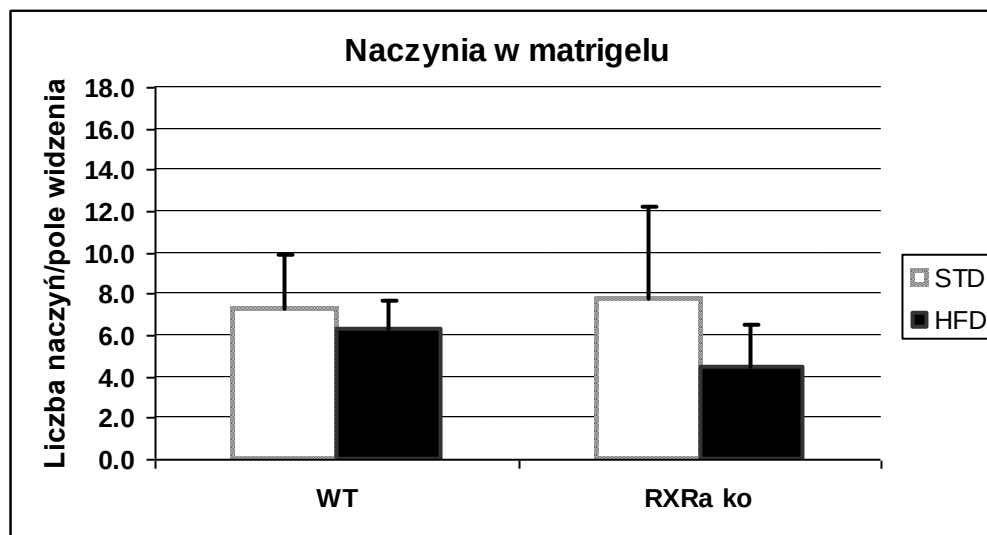
5.4 Wpływ diety wysokotłuszczowej na odpowiedź angiogeną w użytym modelu angiogenezy *in vivo*

5.4.1 Immunohistochemiczna ocena wpływu diety wysokotłuszczowej na angiogenezę

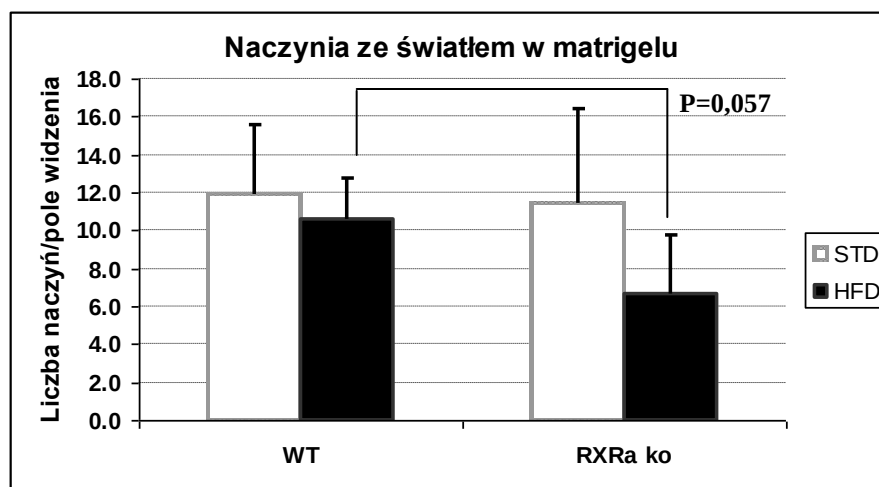
Opracowany na myszach Balb/c model angiogenezy *in vivo* (punkt 4.2.6.1) zastosowano dla myszy RXRa ko i myszy kontrolnych WT.

Ocena angiogenezy w matrigelu, poprzez określenie liczby nowoutworzonych struktur naczyniowych CD31 pozytywnych w matrigelu, zawierającym czynnik proangiogeny bFGF [25nM], wykazała większe różnice w odpowiedzi angiogennej pomiędzy badanymi grupami myszy na diecie wysokotłuszczowej. Zarówno w przypadku myszy WT jak i RXRa ko w matrigelu dominowały naczynia ze światłem. U myszy na diecie wysokotłuszczowej stwierdzono tendencję do słabszej angiogenezy (liczba naczyń w matrigelu) w porównaniu do diety standardowej. Osłabienie angiogenezy było większe w przypadku myszy RXRa ko niż WT. W matrigelu myszy RXRa ko na diecie wysokotłuszczowej zaobserwowano mniejszą liczbę naczyń ze światłem niż u myszy WT (Ryc. 32) (na granicy istotności statystycznej $p=0,057$), podczas gdy na diecie standardowej nie zaobserwowano takiej tendencji. Analiza liczby komórek CD31, które wniknęły do matrigelu oraz naczyń bez światła, nie wykazała istotnych różnic między analizowanymi/badanymi grupami myszy jak i między dietami (Ryc. 31-34).

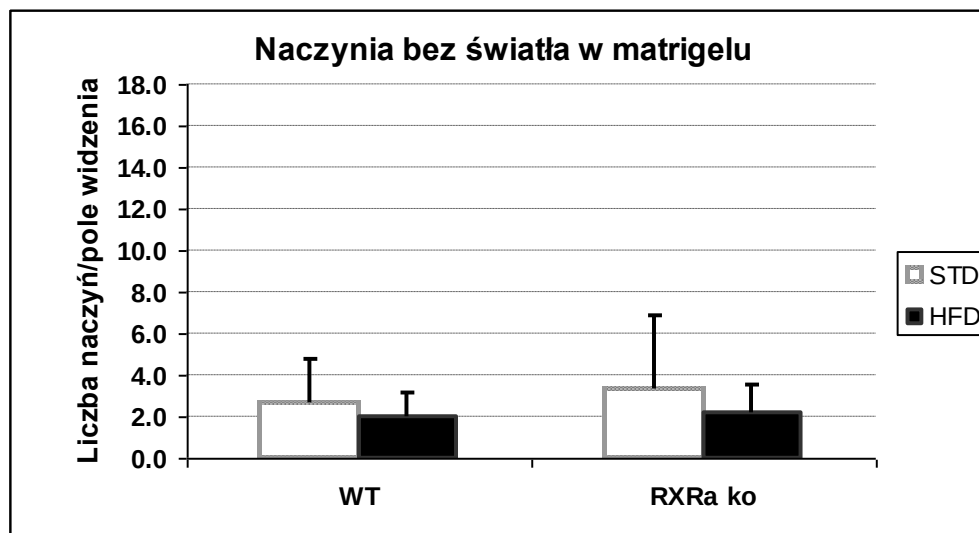
Zaobserwowano natomiast, że liczba komórek CD31 pozytywnych korelowała z poziomem insuliny u myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową (Ryc. 35).



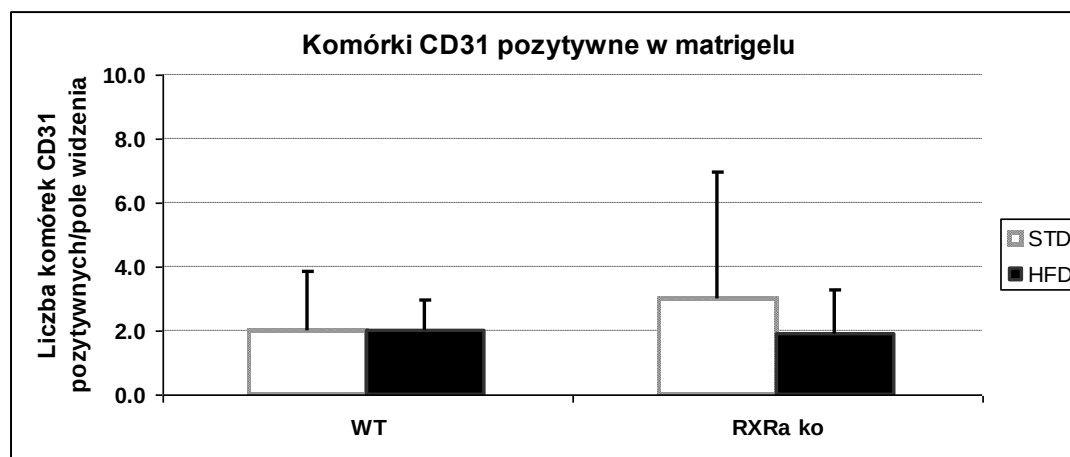
Ryc. 31. Liczba naczyń analizowana w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



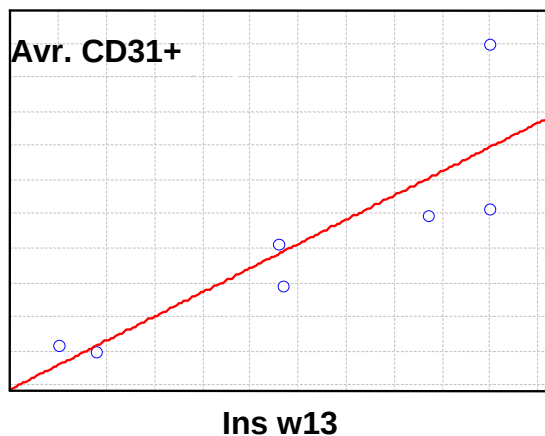
Ryc. 32. Liczba naczyń ze światłem w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD.



Ryc. 33. Liczba naczyń bez światła w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



Ryc. 34. Liczba komórek CD31 pozytywnych w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.



$$\tau = 0,78072 \text{ } p < 0,02, n=7$$

Ryc. 35. Liczba komórek CD31 pozytywnych w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową koreluje z poziomem insuliny. Korelacja Tau-Kendalla: $\tau = 0,78072$ $p < 0,02$, $n=7$.

5.4.2 Analiza ekspresji genów w komórkach matrigelu

5.4.2.1 Wpływ diety wysokotłuszczowej na ekspresję genów w matrigelu - analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową

Analiza wyników ekspresji genów w matrigelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej, wyznaczona przy zastosowaniu mikromacierzy oligonukleotydowej, wykazała znamienny wzrost ekspresji 963 genów oraz zahamowanie ekspresji 1196 genów u myszy RXRa ko. U myszy WT stwierdzono znamienne zwiększoną ekspresję 1238 genów, a zahamowanie ekspresji 1246 genów.

Przy próbie zakwalifikowania genów do grup funkcjonalnych, zaobserwowano wiele przykładów istotnie regulowanej ekspresji genów białek, regulujących funkcje w komórce takie jak: adhezja, reorganizacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, apoptoza, migracja, proliferacja, różnicowanie oraz biorących udział w wewnątrzkomórkowym przekazie sygnału, czy w aktywności czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w regulację genów powyższych procesów. Ze względu na badane zagadnienie, szczególną uwagę zwrócono w tej pracy na ekspresję genów odgrywających istotną rolę w procesie angiogenezy i związanych z: adhezją (Tei i inni, 2002; Garmy-Susini, 2008), reorganizacją białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Papetti i inni, 2002; Rocks i inni, 2008; Jakobsson, 2008), apoptozą (Liu, 2010; Dhaouadi i inni, 2007; Susnow i inni, 2009), migracją (Gerhardt, 2008; Kargiotis i inni, 2008), proliferacją

(Fechner i inni, 2008), oraz z przemianami metabolicznymi, których zaburzenie prowadzi do rozwoju zespołu metabolicznego. Dane zestawiono w Tabeli 6 – 9.

5.4.2.1.1 Analiza ekspresji genów związanych z angiogenezą (Tabela 6)

Skarmianie dietą wysokotłuszczową myszy WT i RXRa ko wpłynęło na znamienne zmiany ekspresji genów regulujących angiogenezę komórek w matrygelu i związanych z: cyklem komórkowym, adhezją komórek oraz przebudową macierzy pozakomórkowej.

Zaobserwowano zahamowanie ekspresji genów fazy G2/M cyklu komórkowego (cykliny i zależne od cyklin kinazy: *Ccnb1*, *Cdc2a*), oraz wzrost ekspresji inhibitora fazy G2/M *Ywhag* w komórkach w matrygelu myszy RXRa ko. Ponadto stwierdzono zahamowanie ekspresji genów biorących udział w replikacji DNA w fazie G1 cyklu komórkowego (*Orc4L*, *Orc6L*, *Rpa3*, *Cdk7*, *Prim1*, *Prim2*).

Z kolei u myszy WT, dieta wysokotłuszczowa wywołała obniżenie ekspresji genów fazy G1 cyklu komórkowego (*Ccnd3* and *Ccnd2*) oraz inhibitorów cyklu komórkowego p53 (*Trp53*) i p21 (*Cdkn1a*). Ekspresja genów związanych z replikacją DNA (*Mcm3*, *Mcm6*, *Mcm7*, *Orc4L*), kodujących cykliny i kinazy fazy G2 cyklu komórkowego (*Ccna2* and *Cdc2a*) była aktywowana, podczas gdy ekspresja inhibitora fazy G2 cyklu komórkowego (*Ywhag*) była zahamowana.

Adhezja odgrywa istotną rolę w modulowaniu proliferacji komórek śródbłonna naczyń oraz w tworzeniu sieci nowych naczyń (Tei i inni, 2002). Analiza mikromacierzy w komórkach matrygelu myszy RXRa ko wykazała wzrost ekspresji genów kodujących integryny pośredniczące w oddziaływaniach komórek z białkami macierzy pozakomórkowej (*Itgam*, *Itgax*, *Itgb2*, *Itgb7*) oraz zahamowanie ekspresji białek macierzy komórkowej takich jak: kolageny (*Col11a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col5a2*).

Geny kodujące niektóre metaloproteinazy (*Mmp9*, *Mmp12*) prezentowały wzrost ekspresji pod wpływem diety wysokotłuszczowej, natomiast ekspresja genów połączeń międzykomórkowych gap-junction (*Gja1*, *Gja4*, *Gjb5*) była zahamowana u myszy RXRa ko.

W komórkach w matrygelu tych myszy zaobserwowano również zahamowanie ekspresji genów kodujących receptory czynników wzrostowych uczestniczących w indukcji angiogenezy: VEGF receptora 2 (*Kdr*) i PDGF receptora (*Pdgfrb*) oraz genu kodującego syntazę tlenku azotu (*Nos3*).

W matrigelu myszy WT pod wpływem diety wysokotłuszczowej stwierdzono głównie zahamowanie ekspresji genów kodujących integryny (*Itgam*, *Itgax*, *Itga9*, *Itga5*, *Itgb1*, *Itgb2*) oraz aktywację ekspresji laminin (*Lama2*, *Lama4*, *Lamb1-1*, *Lamb2*) i kolagenu (*Col3a1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Col5a1*, *Col5a2*, *Col6a2*, *Col1a1*).

5.4.2.1.2 Analiza ekspresji genów związanych z przemianami lipidów i węglowodanów

Heterodimeryzacja czynników transkrypcyjnych RXR α /PPAR α reguluje ekspresję genów biorących udział w **metabolizmie kwasów tłuszczowych** w wątrobie (*Clarke i inni*, 1999; *Kiec-Wilk i inni*, 2005). Zaburzony metabolizm kwasów tłuszczowych w wątrobie może prowadzić do lipotoksyczności i apoptozy hepatocytów (*Chinen i inni*, 2007).

Skarmianie dietą wysokotłuszczową wywołało aktywację ekspresji genów związanych z **apoptozą** w komórkach w matrigelu myszy RXRa ko w przeciwieństwie do myszy WT. Obserwowano aktywację genów kodujących aktywatory kaspazy 3 (*Prf1*, *Gzmb*), pro-apoptotycznych genów Bcl2 (*Bcl2L11*) i receptorów TNF α (*Tnfrsf21*, *Tnfrsf1b*), podczas gdy ekspresja genów kodujących inhibitory apoptozy (*Birc5*, *Birc4*) była zahamowana (Tabela 7).

Przeciwny efekt obserwowano w matrigelu u myszy kontrolnych WT. Ekspresja genów kodujących aktywatory kaspaz (*Prf1*, *Gzmb*), Bcl2 (*Bcl2L11*), NF κ B (*Nfkbie*, *Nfkbia*), kaspazy (*Casp3*, *Casp6*), TNF α (*TNfrsf21*, *Tnfrsf1b*) była zahamowana (Tabela 7) (Ryc. 36).

Ponadto, w matrigelu myszy RXRa ko zaobserwowano obniżoną ekspresję następujących genów biorących udział w **procesach detoksyfikacji** (Tabela 7): oksygenaza hemowa 1 (*Hmox1*), ligaza glutaminianowo-cysteinowa (*Gclc*), reduktaza glutationowa (*Gsr*) i mikrosomalna S- transferaza 1 glutationowa (*Mgst1*), co może świadczyć o obniżonej ochronie przed lipotoksycznością u tych myszy. Natomiast u myszy kontrolnych WT obserwowano zwiększoną ekspresję tych genów.

Skarmianie dietą wysokotłuszczową indukowało ekspresję genów kodujących enzymy **syntezy eikozanoidów** (Tabela 8), które są uznawane jako substancje prozapalne i promujące adipogenezę poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego PPAR γ (*Massiera i inni*, 2003). Analiza mikromacierzy w komórkach w matrigelu u myszy RXRa ko wykazała zwiększoną ekspresję genu syntazy 1 endoperoksydazy prostaglandyny (*Ptgs1*), syntazy prostaglandyny I₂

(prostacykliny) (*Ptgis*), syntazy leukotrienu C₄ (*Ltc4s*), syntazy prostaglandyny E (*Ptges*) oraz 15-lipoksygenazy kwasu arachidonowego (*Alox15*).

U myszy WT natomiast stwierdzono zahamowanie ekspresji genów związanych z syntezą eikozanoidów: syntazy prostaglandyny I₂ (prostacykliny) (*Ptgis*), syntazy prostaglandyny E (*Ptges*), syntazy leukotrienu C₄ (*Ltc4s*), białka aktywującego 5-lipoksygenazę arachidonową (*Alox5ap*), oraz syntazy 2 endoperoksydazy prostaglandyny (*Ptgs2*) (Tabela 8).

Ponadto, ekspresja genów biorących udział w **akumulacji i syntezie triglicerydów** była odmiennie regulowana w komórkach matrigelu myszy RXRa ko i WT (Tabela 8). Ekspresja genów kodujących dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanową (*Gpd1*) i O-acylotransferazę glicerofosforanową (*Gnpat*) była aktywowana w komórkach matrigelu myszy RXRa ko. Myszy WT odpowiadały na skarmianie dietą wysokotłuszczową zahamowaniem ekspresji O-acylotransferazy diacyloglicerolu (*Dgat1*) i zwiększoną ekspresją lipazy lipoproteinowej (*Lpl*).

Dieta wysokotłuszczowa aktywowała również ekspresję czynników transkrypcyjnych istotnych dla **procesu adipogenezy** w komórkach matrigelu myszy RXRa ko (Tabela 8). Ekspresja czynników transkrypcyjnych: *ang.* CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β (*Cebpb*), *ang.* sterol regulatory element binding factor 1 (*Srebf1*) była aktywowana, a geny kodujące markery dojrzałych adipocytów: adiponektyna (*Adipoq*), rezystyna (*Retn*), adypsina (*Adn*) i białko wiążące kwasy tłuszczowe (*Fabp4*) prezentowały obniżoną ekspresję (Ryc. 38).

U myszy WT stwierdzono obniżoną ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne biorące udział w **różnicowaniu adipocytów** (*Cebpb*), a następujące geny charakterystyczne dla dojrzałych adipocytów były aktywowane: adiponektyna (*Adipoq*), adypsina (*Adn*), białko wiążące kwasy tłuszczowe (*Fabp4*), lipaza lipoproteinowa (*Lpl*) (Tabela 8) (Ryc. 37).

Geny biorące udział w **metabolizmie glukozy** były również odmiennie regulowane przez dietę wysokotłuszczową w obu grupach myszy (Tabela 9) (Ryc. 39). U myszy RXRa ko wzrosła ekspresja genów kodujących transportery glukozy: Glut4 (*Slc2a4*) i Glut1 (*Slc2a1*) oraz genów szlaku glikolizy: heksokinazy 1 (*Hk1*), heksokinazy 2 (*Hk2*), izomerazy 1 fosforanu glukozy (*Gpi1*), fosfofruktokinazy mięśniowej (*Pfkm*), fosfofruktokinazy wątrobowej, fosfofruktokinazy B-typu (*Pfkl*), fosfofruktokinazy płytek krwi (*Pfkp*), aldolazy 1 A izoformy (*Aldoa*), izomerazy 1 trifosforanowej (*Tpi1*), mutazy 2 fosfoglicerynowej (*Pgam2*), mięśniowej β enolazy 3, (*Eno3*), neuronalnej enolazy 2 gamma (*Eno2*). Zaobserwowano również aktywację genów PI3K (katalitycznego delta polipeptydu kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, *Pik3cd*),

oraz genów kodujących białka biorące udział w przemianach glikogenu: mięśniowej fosforylasy glikogenu (*Pygm*)), pyrofosforylasy 2 UDP-glukozy (*Ugp2*) i kinazy α 1 fosforylasy (*Phka1*). Dodatkowo, czynniki transkrypcyjne biorące udział w przekazywaniu sygnału od insuliny (*Foxo1*, *Foxo3a*) i czynniki modulujące aktywność insuliny (kinazy białkowe c *Prkcb1*, *Prkcd*, *Prkcq*) wykazały również wzrost ekspresji.

Z kolei u myszy WT, dieta wysokotłuszczowa w komórkach w matrigelu myszy, wywołała obniżenie ekspresji genów kodujących: transportery glukozy Glut4 (*Slc2a4*), Glut1 (*Slc2a1*), enzymy glikolizy (heksokinaza 1 (*Hk1*), heksokinaza 2 (*Hk2*), fosfofruktokinaza mięśniowa (*Pfkm*), fosfofruktokinaza płytek krwi (*Pfkp*), 1 A isoforma aldolazy (*Aldoa*), isoforma 1, C aldolazy (*Aldoc*), mutaza 2-fosfoglicerynianową (*Pgam2*), mutaza 1 - fosfoglicerynianowa (*Pgam1*), enolaza 3 β mięśniowa (*Eno3*), kinaza pirogronianowa, mięśniowa (*Pkm2*)) i enzymy rozkładu glikogenu (*Pygm*, *Phka1*)).

5.4.2.2 Potwierdzenie wpływu diety na ekspresję wybranych genów metodą ilościową (qReal Time PCR)

Ekspresję wyselekcjonowanych po hybrydyzacji z mikromacierzą genów związanych z **angiogenezą i adipogenezą**, potwierdzono przy użyciu techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Analiza ekspresji genów przy użyciu tej techniki w komórkach matrigelu myszy RXRa ko potwierdziła zahamowanie ekspresji genów kodujących markery angiogenezy (*Kdr*, *Nos3*) oraz genów kodujących markery dojrzałych adipocytów (*Fabp4*, *Adn*) pod wpływem diety wysokotłuszczowej. Natomiast aktywowana była ekspresja genów *Srebf1* i *Cebpb*, które biorą udział we wczesnych etapach różnicowania adipocytów (Ryc. 40 B).

Regulacja ekspresji genów w komórkach matrigelu myszy WT skarmianych paszą wysokotłuszczową, była zgodna z wynikami analizy mikromacierzy oligonukleotydowej, jeżeli chodzi o geny związane z: angiogenezą (zahamowanie ekspresji *Kdr*, *Nos3*), adipogenezą (wzrost ekspresji *Adn*, obniżona ekspresja *Cebpb*) oraz transportem glukozy (zahamowanie ekspresji transportera glukozy *Slc2a4*) (Ryc. 40 A).

Tabela 6. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z angiogenezą w matrygelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Gen/Nazwa ścieżki	Symbol	WT HFD vs STD	hRXRa ko HFD vs STD
Cykl komórkowy			
cyklina B1	<i>Ccnb1</i>		-1,87
ang. cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	<i>Cdc2a</i>	1,74	-1,62
ang. origin recognition complex, subunit 4-like (S. cerevisiae)	<i>Orc4l</i>	1,74	-2,00
ang. origin recognition complex, subunit 6-like (S. cerevisiae)	<i>Orc6l</i>	n. c.	-2,00
ang. replication protein A3	<i>Rpa3</i>	n. c.	-2,00
cyklinozależna kinaza 7 (homolog of Xenopus MO15 cdk-activating) kinase)	<i>Cdk7</i>	n. c.	-3,48
DNA prymaza, p49 podjednostka	<i>Prim1</i>	1,52	-1,41
DNA prymaza, p58 podjednostka	<i>Prim2</i>	n. c.	-3,73
cyklina D3	<i>Ccnd3</i>	-1,74	1,32
cyklina D2	<i>Ccnd2</i>	-1,41	n. c.
ang. transformation related protein 53	<i>Trp53</i>	-2,14	n. c.
ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	<i>Cdkn1a</i>	-1,87	n. c.
ang. minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	<i>Mcm3</i>	1,62	n. c.
ang. minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe)	<i>Mcm6</i>	2,30	n. c.
ang. minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	<i>Mcm7</i>	1,87	n. c.
cyklina A2	<i>Ccna2</i>	1,32	n. c.
ang. 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein,	<i>Ywhag</i>	2,46	-2,64
Adhezja komórki			
integryna alfa M	<i>Itgam</i>	-4,59	2,30
integryna alfa X	<i>Itgax</i>	-1,62	1,74
integryna beta 2	<i>Itgb2</i>	-3,73	1,41
integryna beta 7	<i>Itgb7</i>	-1,32	3,73
prokolagen, typ XI, alfa 1	<i>Col11a1</i>	n. c.	-42,22
prokolagen, typ III, alfa 1	<i>Col3a1</i>	4,29	-1,41
prokolagen, typ IV, alfa 1	<i>Col4a1</i>	6,50	-2,14
prokolagen, typ V, alfa 2	<i>Col5a2</i>	1,62	-1,52
prokolagen, typ VI, alfa 2	<i>Col6a2</i>	2,83	1,52
macierzowa metalopeptydaza 9	<i>Mmp9</i>	n. c.	3,73
macierzowa metalopeptydaza 12	<i>Mmp12</i>	-2,00	1,87
ang. gap junction membrane channel protein alpha 1	<i>Gja1</i>	n. c.	-1,41
ang. gap junction membrane channel protein alpha 4	<i>Gja4</i>	n. c.	-1,74
ang. gap junction membrane channel protein beta 5	<i>Gjb5</i>	n. c.	-2,46
ang. kinase insert domain protein receptor	<i>Kdr</i>	n. c.	-1,87
receptor pochodzącego z płytek czynnika wzrostu B, beta polipeptyd	<i>Pdgfrb</i>	n. c.	-1,52
syntaza 3 tlenku azotu, komórki śródbłonna	<i>Nos3</i>	n. c.	-2,64
integryna alfa 9	<i>Itga9</i>	-2,46	n. c.
integryna alfa 5 (receptor alfa fibronektyny)	<i>Itga5</i>	-3,48	n. c.

Gen/Nazwa ścieżki	Symbol	WT HFD vs STD	hRXRa ko HFD vs STD
Adhezja komórki			
integryna beta 1 (receptor beta fibronektyny)	<i>Itgb1</i>	-1,52	n. c.
laminina, alfa 2	<i>Lama2</i>	7,46	n. c.
laminina, alfa 4	<i>Lama4</i>	2,30	n. c.
laminina B1 podjednostka 1	<i>Lamb1-1</i>	2,64	n. c.
laminina, beta 2	<i>Lamb2</i>	2,00	n. c.
prokolagen, typ IV, alfa 2	<i>Col4a2</i>	3,25	n. c.
prokolagen, typ V, alfa 1	<i>Col5a1</i>	2,14	1,52
prokolagen, typ I, alfa 1	<i>Col1a1</i>	2,00	n. c.

Tabela 7. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z apoptozą i odpowiedzią na stres oksydacyjny w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Gen/Nazwa ścieżki	Symbol	WT HFD vs STD	hRXRa ko HFD vs STD
Apoptoza			
perforyna 1	<i>Prf1</i>	-4,29	2,14
granzym B	<i>Gzmb</i>	-5,66	9,85
ang. BCL2-like 11	<i>Bcl2l11</i>	-1,87	1,41
ang. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	<i>Nfkbie</i>	-2,14	4,00
ang. nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	<i>Nfkb1</i>	-1,32	1,52
ang. nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	<i>Nfkbia</i>	-1,52	1,32
ang. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	<i>Tnfrsf21</i>	-1,52	2,00
ang. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	<i>Tnfrsf1b</i>	-2,14	1,87
kaspaza 3	<i>Casp3</i>	-1,62	n. c.
kaspaza 6	<i>Casp6</i>	-1,74	n. c.
ang. Baculoviral IAP repeat-containing 5	<i>Birc5</i>	n. c.	-1,41
ang. Baculoviral IAP repeat-containing 4 (Birc4), mRNA	<i>Birc4</i>	n. c.	-1,52
Odpowiedź na stres oksydacyjny			
oksygenaza hemowa 1	<i>Hmox1</i>	-1,62	-4,92
ligaza glutamilo-cysteinowa, podjednostka katalityczna	<i>Gclc</i>	n. c.	-1,74
reduktaza glutationowa 1	<i>Gsr</i>	n. c.	-2,00
mikrosomalna S-transferaza 1 glutationowa	<i>Mgst1</i>	2,83	-1,74

Tabela 8. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z metabolizmem lipidów i adipogenezą w matrygelu myszy WT (materiał spulowany z trzech myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z trzech myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

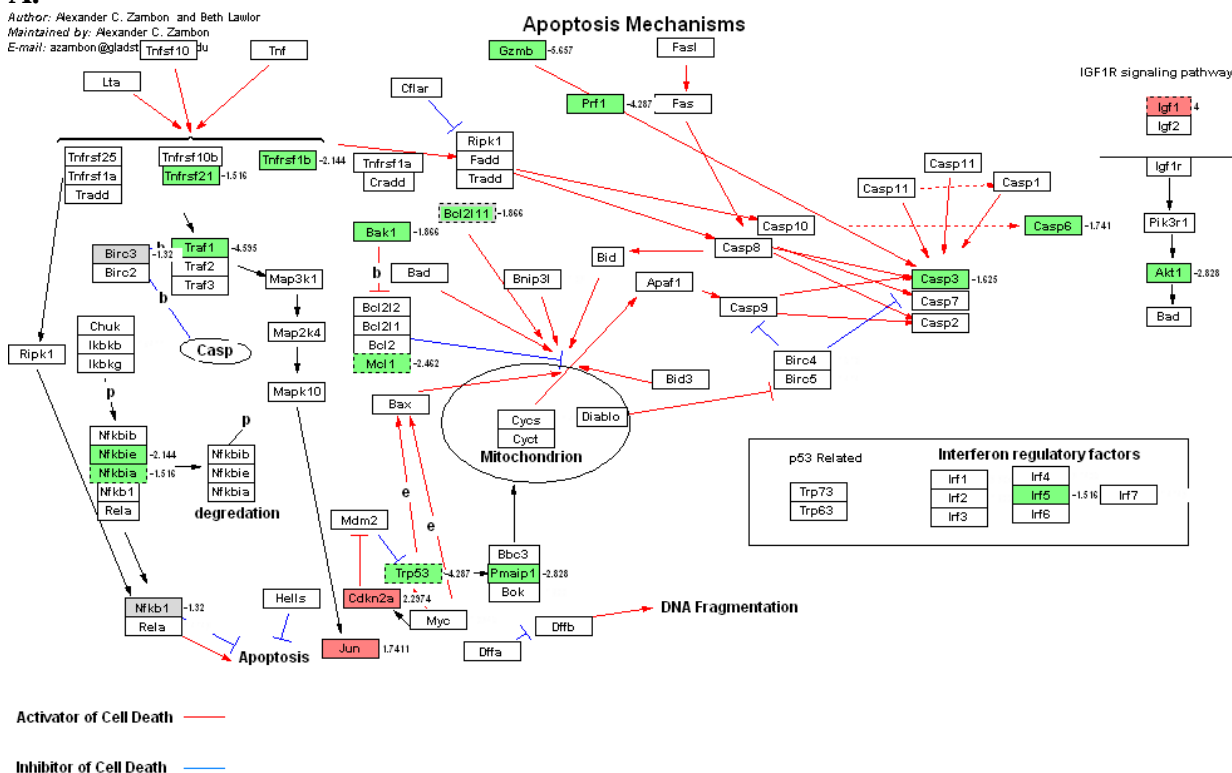
Gen/Nazwa ścieżki	Symbol	WT HFD vs STD	hRXRa ko HFD vs STD
Synteza eikozanoidów			
ang. prostaglandin-endoperoxide synthase 1	<i>Ptgs1</i>	n. c.	2,46
syntaza prostaglandyny I2 (prostacykliny)	<i>Ptgis</i>	-2,14	1,52
syntaza leukotrienów C4	<i>Ltc4s</i>	-2,00	1,62
syntaza prostaglandyny E	<i>Ptges</i>	-1,87	1,62
15-lipooksygenaza arachidonowa	<i>Alox15</i>	n. c.	3,25
ang. arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	<i>Alox5ap</i>	-1,52	n. c.
ang. prostaglandin-endoperoxide synthase 2	<i>Ptgs2</i>	-3,03	n. c.
Synteza triglicerydów			
dehydrogenaza 1 glicerolo-3-fosforanowa	<i>Gpd1</i>	n. c.	2,14
ang. glyceronephosphate O-acyltransferase	<i>Gnpat</i>	n. c.	1,52
O-acyltransferaza 1 diacyloglicerolowa	<i>Dgat1</i>	-1,62	n. c.
Adipogeneza			
ang. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	<i>Cebpb</i>	-3,48	1,74
ang. sterol regulatory element binding factor 1	<i>Srebf1</i>	n. c.	1,74
adiponektyna	<i>Adipoq</i>	3,73	-6,96
rezystyna	<i>Retn</i>	n. c.	-6,06
adypsyna	<i>Adn</i>	7,46	-13,00
białko 4 wiążące kwasy tłuszczowe	<i>Fabp4</i>	1,62	-4,92
lipaza lipoproteinowa	<i>Lpl</i>	3,03	n. c.

Tabela 9. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z metabolizmem glukozy w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Gen/Nazwa ścieżki	Symbol	WT HFD vs STD	hRXRa ko HFD vs STD
Metabolizm glukozy			
ang. solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member	<i>Slc2a4</i>	-2,14	2,64
ang. solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member	<i>Slc2a1</i>	-3,25	2,30
heksokinaza 1	<i>Hk1</i>	-1,87	2,30
heksokinaza 2	<i>Hk2</i>	-1,74	2,64
izomeraza 1 fosforanu glukozy	<i>Gpi1</i>	-1,62	1,52
fosfofruktokinaza, mięśniowa	<i>Pfkm</i>	-2,64	6,50
fosfofruktokinaza, wątrobową, B-typ	<i>Pfkl</i>	-1,32	1,74
fosfofruktokinaza, płytowa	<i>Pfkp</i>	-1,52	1,52
aldolaze 1, A izoforma	<i>Aldoa</i>	-1,62	1,87
aldolaza 3, C izoforma	<i>Aldoc</i>	-2,30	n. c.
izomeraza 1 fosforanu triozy	<i>Tpi1</i>	-1,32	1,41
mutaza 1 fosfoglicerynianowa	<i>Pgam1</i>	-1,41	n. c.
mutaza 2 fosfoglicerynianowa	<i>Pgam2</i>	-4,92	34,30
kinaza pirogronianowa, mięśniowa	<i>Pkm2</i>	-1,41	n. c.
enolaza 3, beta mięśniowa	<i>Eno3</i>	-3,25	17,15
enolaza 2, gamma neuronowa	<i>Eno2</i>	n. c.	6,50
kinaza 3-fosfatydilinozytolu, katalityczny polipeptyd delta	<i>Pik3cd</i>	-1,52	1,52
mięśniowa fosforylaza glikogenu	<i>Pygm</i>	-4,92	51,98
fosforylaza 2 UDP-glukozy	<i>Ugp2</i>	1,41	1,62
kinaza alfa 1 fosforylaza	<i>Phka1</i>	-17,15	2,00
ang. forkhead box O1	<i>Foxo1</i>	n. c.	1,52
ang. forkhead box O3a	<i>Foxo3a</i>	n. c.	1,41
kinaza białkowa C, beta 1	<i>Prkcb1</i>	n. c.	1,62
kinaza białkowa C, delta	<i>Prkcd</i>	-1,74	1,52
kinaza białkowa C, teta	<i>Prkcq</i>	n. c.	5,28

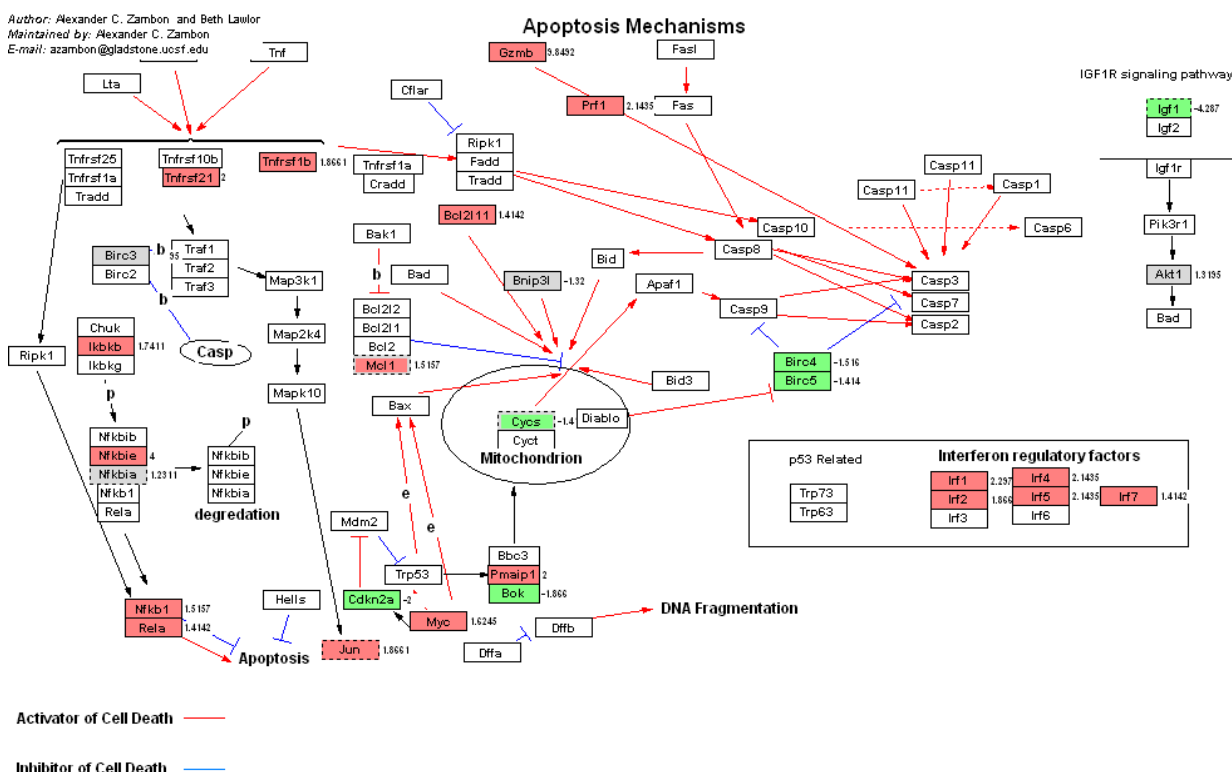
A.

Author: Alexander C. Zambon and Beth Lawlor
 Maintained by: Alexander C. Zambon
 E-mail: azambon@gladst.edu



B.

Author: Alexander C. Zambon and Beth Lawlor
 Maintained by: Alexander C. Zambon
 E-mail: azambon@gladstone.ucsf.edu



Ryc. 36. Analiza wyników ekspresji genów związanych z apoptozą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy WT (A) oraz RXRa ko (B) (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni*, 2007). Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono, Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Preadipocyte

Inhibitors of Preadipocyte to Adipocyte Transition

Dlk1	8
Gata2	-2.462
Gata3	
Gata4	
Wnt1	
Wnt5b	
Wnt10b	
Ndn	-2.6223

Transcription Factors/Modulators

Cebpa		Me2a	
Cebpb	-3.482	Me2b	
Cebpd	2.2974	Me2c	-2
Ppara		Me2d	-2
Pparg		Srebf1	
Ppard		Mbnf1	1.6245
Rxra		Ncoa1	
Rxrg		Nr2f1	
Rara	-3.482	Rora	
Nr1h3		Nrip1	-2
Creb1		Ncor1	
		Ncor2	

Growth Factors/Hormones

Ins1	
Ins2	
Igf1	4
Nr3c1	1.6245
Gh	
Tgfb1	-2
Prlr	

Fully Differentiated Adipocyte Markers

Fabp4	1.6245
Fas	
Slc2a4	-2.144
Plin	
Lpl	2.639
Ppargc1a	
Ucp1	
Lipe	

Miscellaneous

Bmp1		Foxo1		Cntfr		E2f1		Stat1	1.5157	Lif	-3.249
Bmp2	3.031	Foxc2		Lifr		E2f4		Stat2		Mif	-1.32
Bmp3				Il6st		Rb1f			-1.516	Mix1f	
Gdf10	8	Ncoa2		Osm		Rb1z		Stat5a	-2.828	Nsg1	-4.925
Bmp4		Fzd1		Catnb	-1.32	Rb1		Stat5b		Serpine1	-2.144
Klf5				Smad3				Stat6	-1.625	Ptgis	2.649
Klf6	-2	Socs1	4	Dvl1	-1.414	Agrp		Hif1a	-4.925	Scd1	4
Klf7	-1.625	Socs3	-1.741	Tcf1		Ddit3		Cugbp1		Sp1	1.2311
Klf15	-2.237	Trih3	2.237	Frzb		Gadd45a		Ahr		Twist1	6.439
Egr2	1.74	Pck1		Cyp26a1		Gadd45b		D10Ert214e	-1.516	Srp1	
Ebf1	2	Pck2		Cyp26b1		Hmgal1	-1.516	Wwtr1	2.639		
Epas1						Id3	6.9644				

Insulin Action Genes

Irs1	2.4623
LOC384783	
Irs3	
Irs4	

Possible Lipodystrophy Genes

Bsc2l	
Lmna	
Appat2	
Zmpste24	
Lpin1	
Lpin2	
Lpin3	

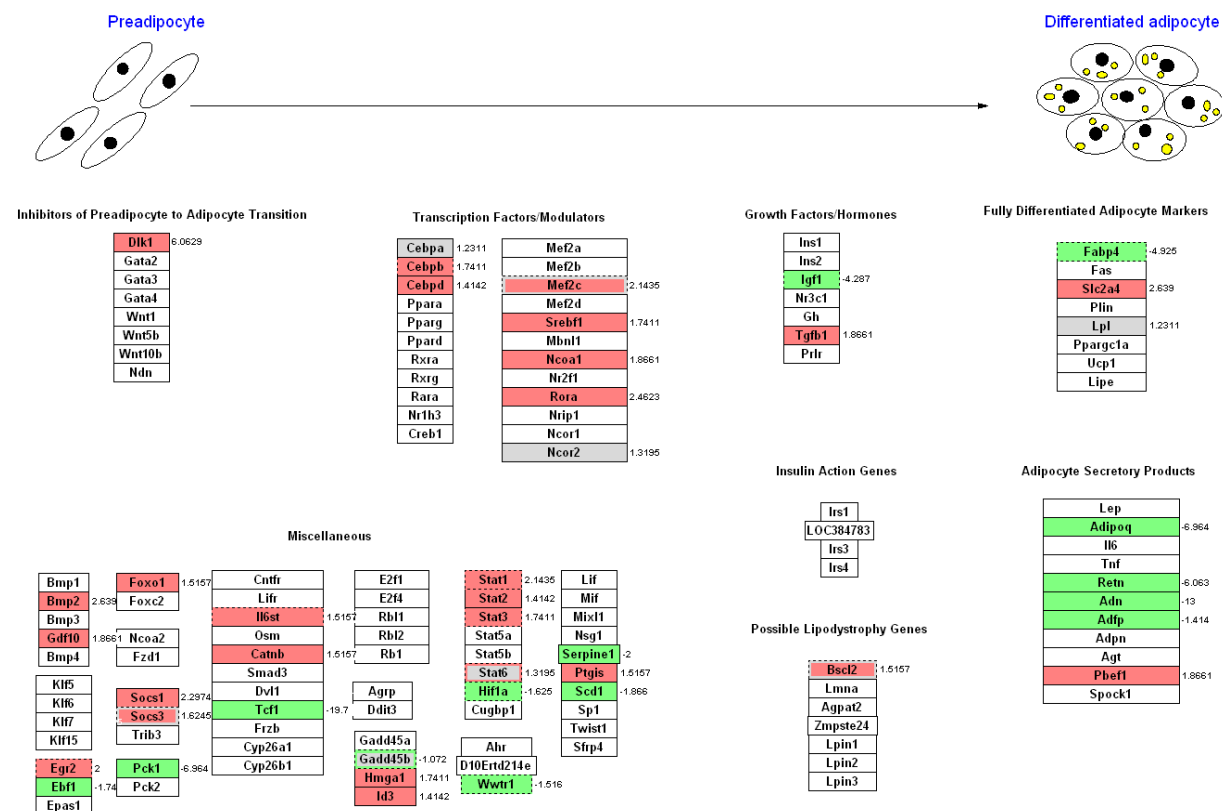
Adipocyte Secretory Products

Lep	
Adipoq	3.7321
Il6	
Tnf	
Retn	
Adn	7.4643
Adfp	-1.32
Adpn	
Agt	
Pbeef1	-1.516
Spock1	

Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono
Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Author: Diabetes Genome Anatomy Project Investigators
 Maintained by: Meagan Lizarazo and Joyclyn Yee
 E-mail: joyclyn.yee@joslin.harvard.edu
 Last modified: 9/29/2005

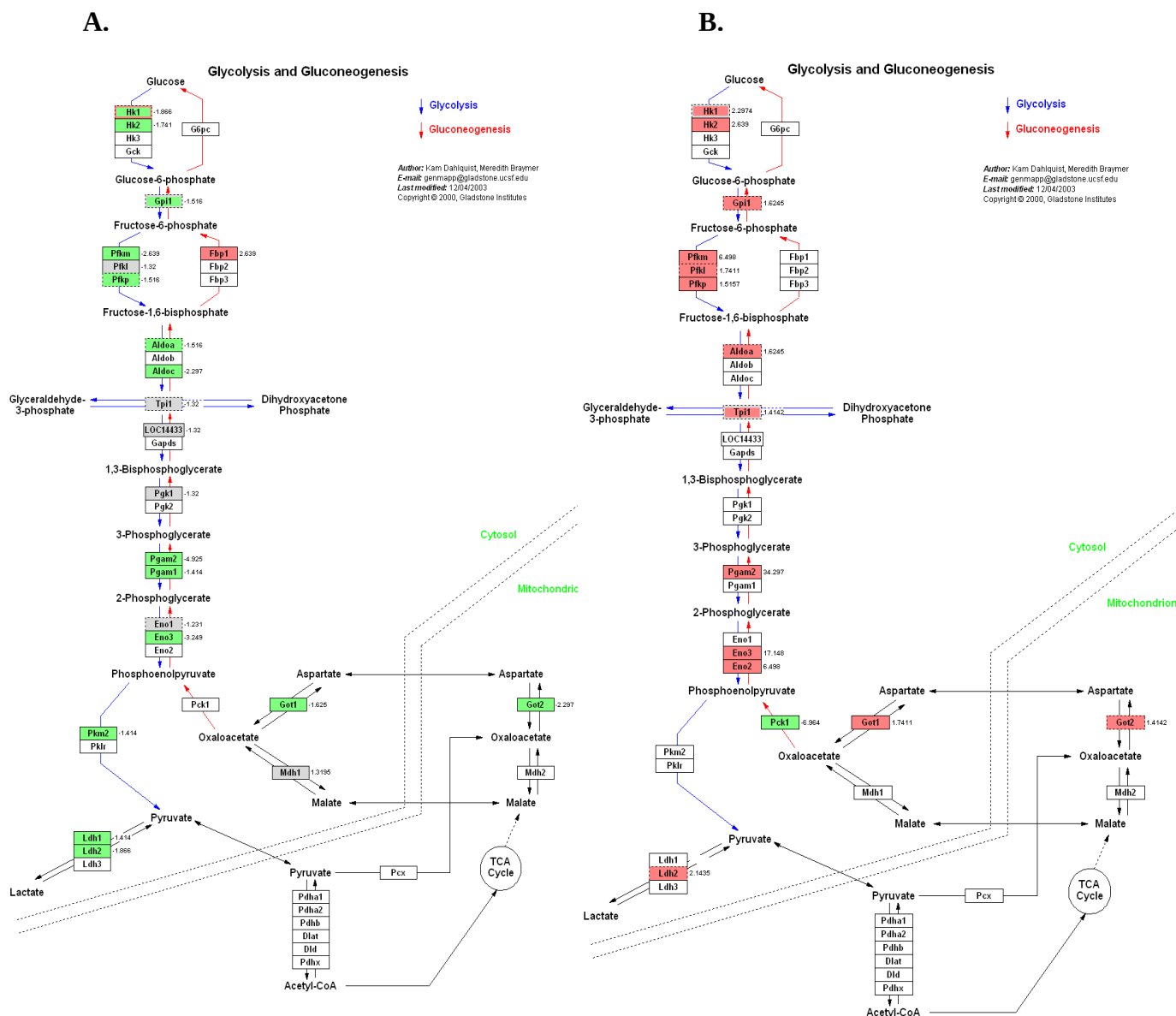
Adipogenesis Mouse



Ryc. 38. Analiza wyników ekspresji genów związanych z adipogenezą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy RXRa ko (wg programu GenMapp, Salomonis i inni, 2007)

Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono

Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

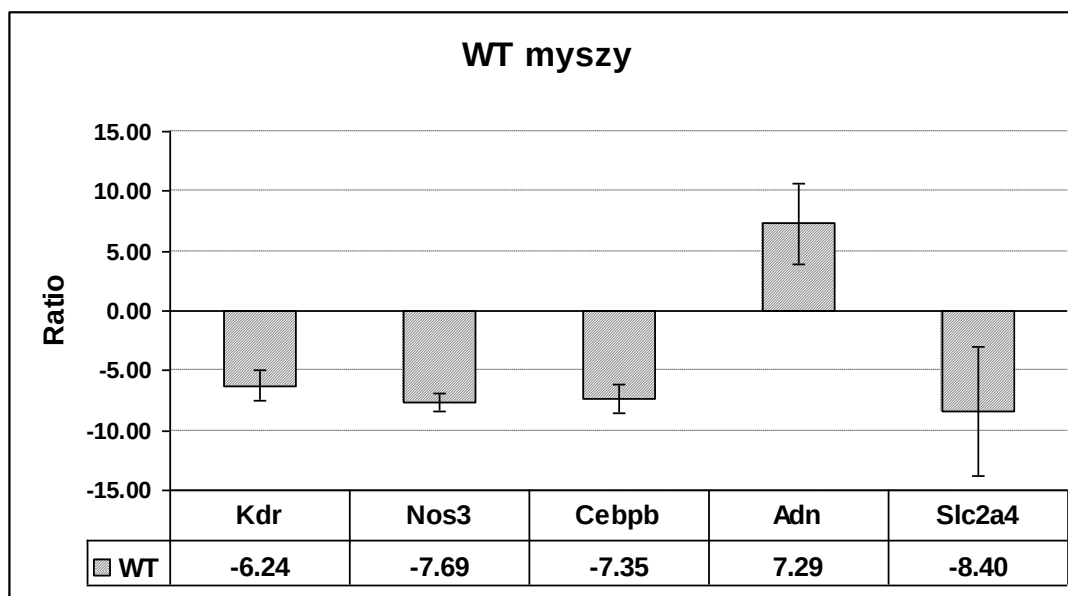


Ryc. 39. Analiza wyników ekspresji genów związanych z glikolizą i glukoneogenezą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy WT (A) oraz RXRα ko (B) (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni*, 2007)

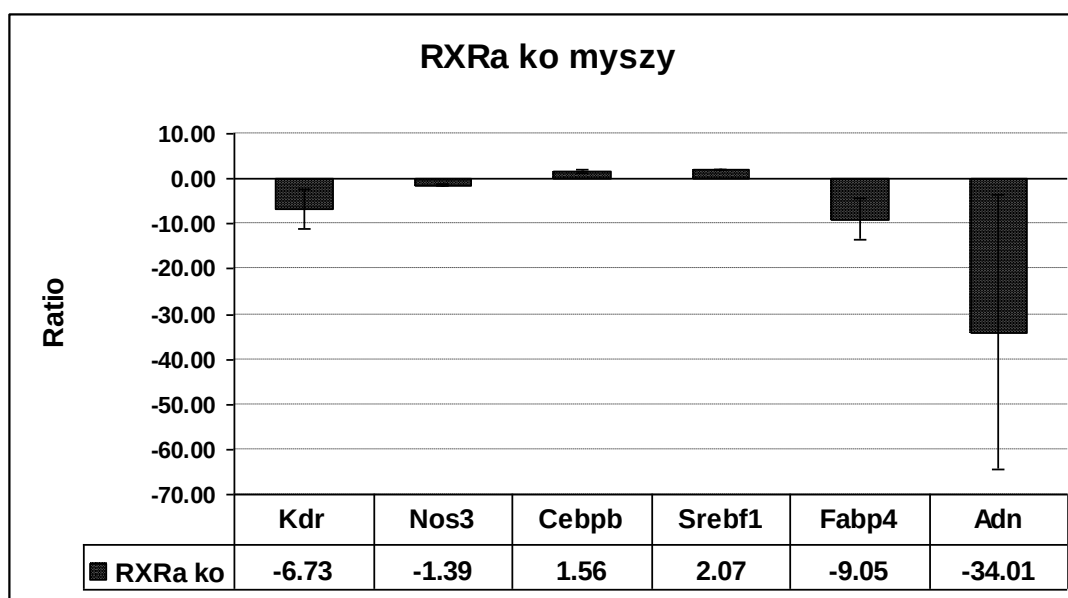
Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono

Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

A.



B.



Ryc. 40. Potwierdzenie względnej ekspresji wybranych genów w matrygelu myszy WT (n=3) (A) oraz RXRa ko (n=3) (B) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD). Do reakcji Real time PCR wybrano geny związane z angiogenezą (VEGF receptor 2: *Kdr*, i *ang.* endothelial nitric oxide synthase: *Nos3*) oraz adipogenezą (*ang.* adiposin: *Adn*, *ang.* fatty acid binding protein 4: *Fabp4*, *ang.* CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β : *Cebpb*, *ang.* sterol regulatory element binding factor 1: *Srebf1*) i transportem glukozy (*Slc2a4*). *Gapdh* użyto jako genu referencyjnego. Istotność statystyczna $p < 0,05$.

5.5 Podsumowanie wyników badań

1. Użyte do badań myszy modelowe z delecją RXR α w hepatocytach w porównaniu do myszy kontrolnych charakteryzowały się takimi parametrami zespołu metabolicznego jak: podwyższonym poziomem triglicerydów i cholesterolu w surowicy krwi.
2. Skarmianie dietą wysokotłuszczową przez 7 tygodni w porównaniu do diety standardowej wywołało w obu grupach myszy (modelowych i kontrolnych) wzrost poziomu glukozy (pole powierzchni pod krzywą), cholesterolu, leptyny oraz tendencję do podwyższonego poziomu insuliny.
3. Na diecie wysokotłuszczowej myszy modelowe wykazały wyższy poziom cholesterolu i leptyny w porównaniu do myszy kontrolnych.
4. Analiza odpowiedzi angiogennej w użytym modelu angiogenezy *in vivo*, mierzona liczbą naczyń w preparatach parafinowych matrigelu, wykazała tendencję do słabszej angiogenezy na diecie wysokotłuszczowej w porównaniu do diety standardowej w obu grupach myszy. Dodatkowo, na diecie wysokotłuszczowej myszy z delecją RXR α w hepatocytach zaprezentowały mniejszą liczbę naczyń ze światłem niż myszy WT w preparatach matrigelowych wybarwionych na obecność antygenu CD31 (na granicy istotności statystycznej $p=0,057$). Nie zaobserwowano natomiast różnic w liczbie komórek CD31 (chemotaksja komórek do matrigelu) między analizowanymi/badanymi grupami myszy oraz dietami.
5. Zaobserwowano zależność pomiędzy poziomem insuliny a odpowiedzią angiogeną. Poziom insuliny na diecie wysokotłuszczowej korelował z liczbą komórek CD31, które wniknęły do matrigelu.
6. Analiza ekspresji genów, przy użyciu macierzy oligonukleotydowej w komórkach w matrigelu, myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej wykazała regulację genów następujących procesów (tabela 10-12):
 - **Angiogeneza:** U myszy WT i RXR α ko ekspresja genów związanych z angiogenezą była zahamowana (Tabela 10).

- **Apoptoza:** U myszy RXRa ko ekspresja genów regulujących apoptozę była aktywowana, u myszy WT obserwowano przeciwny efekt (Tabela 10).
- **Odpowiedź na stres oksydacyjny:** Ekspresja genów biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny była zahamowana u myszy RXRa ko, u myszy WT ekspresja tych genów w różny sposób była regulowana (Tabela 10).
- **Synteza eikozanoidów:** Geny związane z tą ścieżką wykazały wzrost ekspresji u myszy RXRa ko, a u myszy WT ich ekspresja była zahamowana (Tabela 11).
- **Synteza triglicerydów:** Geny biorące udział w syntezie triglicerydów były aktywowane u myszy RXRa ko, u myszy WT obserwowano zahamowanie syntezy triglicerydów (Tabela 11).
- **Adipogeneza:** U myszy RXRa ko obserwowano wzrost ekspresji genów biorących udział we wstępnych etapach adipogenezy, a zahamowanie ekspresji genów kodujących markery dojrzałych adipocytów. U myszy WT obserwowano przeciwne zjawisko (zahamowanie ekspresji czynników transkrypcyjnych wstępnych etapów adipogenezy, a aktywację genów kodujących markery dojrzałych adipocytów) (Tabela 11).
- **Metabolizm glukozy:** U myszy RXRa ko geny kodujące transportery glukozy, biorące udział w glikolizie oraz przekaznictwie sygnału od receptora insulinowego wykazały wzrost ekspresji. U myszy WT ekspresja tych genów była zahamowana. (Tabela 12).

7. Ekspresja wybranych genów w komórkach w matrygelu myszy (z analizy przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowej) została potwierdzona techniką Real Time PCR.

A. W matrygelu myszy RXRa ko techniką Real Time PCR potwierdzono:

- zahamowanie ekspresji genów kodujących markery angiogenezy (*Kdr*, *Nos3*) oraz genów kodujących markery dojrzałych adipocytów (*Fabp4*, *Adn*)
- wzrost ekspresji genów *Srebf1* i *Cebpb* biorących udział we wstępnych etapach różnicowania adipocytów.

B. W matrygelu myszy WT techniką Real Time PCR wykazano:

- zahamowanie ekspresji genów związanych z angiogenezą (*Kdr*, *Nos3*),
- wzrost ekspresji genu kodującego marker dojrzałych adipocytów - adypsyny (*Adn*),

- obniżoną ekspresję genu *Cebpb*,
- zahamowanie ekspresji genu kodującego transporter glukozy *Slc2a4*.

Tabela 10. Geny związane z angiogenezą – analiza mikromacierzy.

	WT HFD vs STD	RXRa ko HFD vs STD
Angiogeneza		
Cykl komórkowy	↓ genów fazy G1 cyklu komórkowego (<i>Ccnd3</i> and <i>Ccnd2</i>) oraz inhibitorów cyklu komórkowego p53 (<i>Trp53</i>) i p21 (<i>Cdkn1a</i>) ↑ genów związanych z replikacją DNA (<i>Mcm3</i>, <i>Mcm6</i>, <i>Mcm7</i>, <i>Orc4L</i>), kodujących cykliny i kinazy fazy G2 cyklu komórkowego (<i>Ccna2</i> and <i>Cdc2a</i>) ↓ ekspresji inhibitora fazy G2 cyklu komórkowego (<i>Ywhag</i> gene)	↓ genów fazy G2/M cyklu komórkowego (cykliny i zależne od cyklin kinazy: <i>Ccnb1</i>, <i>Cdc2a</i>) ↑ inhibitora fazy G2/M <i>Ywhag</i> ↓ ekspresji genów biorących udział w replikacji DNA w fazie G1 cyklu komórkowego (<i>Orc4L</i>, <i>Orc6L</i>, <i>Rpa3</i>, <i>Cdk7</i>, <i>Prim1</i>, <i>Prim2</i>)
Adhezja	↓ ekspresji genów kodujących integryny (<i>Itgam</i>, <i>Itgax</i>, <i>Itga9</i>, <i>Itga5</i>, <i>Itgb1</i>, <i>Itgb2</i>) ↑ ekspresji laminin (<i>Lama2</i>, <i>Lama4</i>, <i>Lamb1-1</i>, <i>Lamb2</i>) ↑ kolagenu (<i>Col3a1</i>, <i>Col4a1</i>, <i>Col4a2</i>, <i>Col5a1</i>, <i>Col5a2</i>, <i>Col6a2</i>, <i>Col1a1</i>)	↑ ekspresji genów kodujących integryny pośredniczące w oddziaływaniach komórek z białkami macierzy pozakomórkowej (<i>Itgam</i>, <i>Itgax</i>, <i>Itgb2</i>, <i>Itgb7</i>) ↓ ekspresji białek macierzy komórkowej takich jak: kolageny (<i>Col11a1</i>, <i>Col3a1</i>, <i>Col4a1</i>, <i>Col5a2</i>) ↑ metaloproteinaz (<i>Mmp9</i>, <i>Mmp12</i>) ↓ międzykomórkowych oddziaływań gap-junction (<i>Gja1</i>, <i>Gja4</i>, <i>Gjb5</i>) ↓ ekspresji genów kodujących receptory czynników wzrostowych w indukcji angiogenezy: VEGF receptora 2 (<i>Kdr</i>) i PDGF receptora (<i>Pdgfrb</i>) oraz genu kodującego syntazę tlenku azotu (<i>Nos3</i>).

	WT HFD vs STD	RXRa ko HFD vs STD
Apoptoza		
	↓ Ekspresji genów kodujących aktywatory kaspaz (<i>Prf1</i> , <i>Gzmb</i>) ↓ Bcl2 (<i>Bcl2L11</i>), ↓ NFκB (<i>Nfkbie</i> , <i>Nfkbia</i>), ↓ kaspazy (<i>Casp3</i> , <i>Casp6</i>), ↓ TNFα (<i>Tnfrsf21</i> , <i>Tnfrsf1b</i>)	↑ genów kodujących aktywatory kaspazy 3 (<i>Prf1</i> , <i>Gzmb</i>) ↑ pro-apoptotycznych genów Bcl2 (<i>Bcl2L11</i>) ↑ receptorów TNFα (<i>Tnfrsf21</i> , <i>Tnfrsf1b</i>), ↓ ekspresji genów kodujących inhibitory apoptozy (<i>Birc5</i> , <i>Birc4</i>)
Opowiedź na stres oksydacyjny		
	↓ oksygenazy hemowej 1 (<i>Hmox1</i>), ↑ mikrosomalnej S- transferazy 1 glutationowej (<i>Mgst1</i>)	↓ oksygenazy hemowej 1 (<i>Hmox1</i>), ↓ ligazy glutaminianowo-cysteinowej (<i>Gclc</i>), ↓ reduktazy glutationowej (<i>Gsr</i>), ↓ mikrosomalnej S- transferazy 1 glutationowej (<i>Mgst1</i>)

Tabela 11. Geny związane z metabolizmem lipidów – analiza mikromacierzy.

	WT HFD vs STD	RXRa ko HFD vs STD
Metabolizm lipidów i adipogeneza		
Synteza eikozanoidów	↓ ekspresji syntazy prostaglandyny I₂ (prostacykliny) (<i>Ptgis</i>), ↓ syntazy prostaglandyny E (<i>Ptges</i>), ↓ syntazy leukotrienu C₄ (<i>Ltc4s</i>), ↓ białka aktywującego 5-lipoksygenazę arachidonową (<i>Alox5ap</i>) ↓ syntazy 2 endoperoksydazy prostaglandyny (<i>Ptgs2</i>)	↑ ekspresji genu syntazy 1 endoperoksydazy prostaglandyny (<i>Ptgs1</i>), ↑ syntazy prostaglandyny I₂ (prostacykliny) (<i>Ptgis</i>), ↑ syntazy leukotrienu C₄ (<i>Ltc4s</i>), ↑ syntazy prostaglandyny E (<i>Ptges</i>) ↑ 15-lipoksygenazy kwasu arachidonowego (<i>Alox15</i>).
Synteza triglicerydów	↓ ekspresji genu O-acyltransferazy diacyloglicerolu (<i>Dgat1</i>) ↑ ekspresji genu lipazy lipoproteinowej (<i>Lpl</i>)	↑ Ekspresji genów kodujących dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanową (<i>Gpd1</i>) ↑ ekspresji genu O-acyltransferazy glicerofosforanowej (<i>Gnpat</i>)
Adipogeneza	↓ ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne biorące udział w różnicowaniu adipocytów (<i>Cebpb</i>) ↑ ekspresji genów charakterystycznych dla dojrzałych adipocytów: (<i>Adipoq</i>), adypsyna (<i>Adn</i>), białko wiążące kwasy tłuszczowe (<i>Fabp4</i>), lipaza lipoproteinowa (<i>Lpl</i>)	↑ Ekspresji czynników transkrypcyjnych: (<i>Cebpb</i>), (<i>Srebf1</i>) ↓ ekspresji genów kodujących markery dojrzałych adipocytów: adiponektyna (<i>Adipoq</i>), rezystyna (<i>Retn</i>), adypsyna (<i>Adn</i>) i białko wiążące kwasy tłuszczowe (<i>Fabp4</i>)

Tabela 12. Geny związane z metabolizmem glukozy – analiza mikromacierzy.

	WT HFD vs STD	RXRa ko HFD vs STD
	Metabolizm glukozy	
	↓ ekspresji genów kodujących transportery glukozy Glut4 (<i>Slc2a4</i>), Glut1 (<i>Slc2a1</i>) ↓ ekspresji genów kodujących enzymy glikolizy (heksokinaza 1 (<i>Hk1</i>), heksokinaza 2 (<i>Hk2</i>), fosfofruktokinazy mięśniowej (<i>Pfkm</i>), fosfofruktokinazy płytek krwi (<i>Pfkp</i>), aldolazy 1 A isoformy (<i>Aldoa</i>), aldolazy 1, C isoformy (<i>Aldoc</i>), mutazy 2 fosfoglicerynianowej (<i>Pgam2</i>), Mutazy 1 fosfoglicerynianowej (<i>Pgam1</i>), enolazy 3 β mięśniowej (<i>Eno3</i>), pirogronianowej kinazy, mięśniowej (<i>Pkm2</i>)) ↓ enzymów rozkładu glikogenu (<i>Pygm</i>, <i>Phka1</i>).	↑ ekspresji genów kodujących transportery glukozy Glut4 (<i>Slc2a4</i>), Glut1 (<i>Slc2a1</i>) ↑ ekspresji genów szlaku glikolizy: heksokinazy 1 (<i>Hk1</i>), heksokinazy 2 (<i>Hk2</i>), izomerazy 1 fosforanu glukozy (<i>Gpi1</i>), fosfofruktokinazy mięśniowej (<i>Pfkm</i>), fosfofruktokinazy wątrobowej, fosfofruktokinazy B-typu (<i>Pfkl</i>), fosfofruktokinazy płytek krwi (<i>Pfkp</i>), aldolazy 1 A isoformy (<i>Aldoa</i>), izomerazy 1 trifosforanowej (<i>Tpi1</i>), mutazy 2 fosfoglicerynowej (<i>Pgam2</i>), mięśniowej β enolazy 3, (<i>Eno3</i>), neuronalnej enolazy 2 gamma (<i>Eno2</i>) ↑ ekspresji genów PI3K (katalitycznego delta polipeptydu 3-kinazy fosfatydyloinozytolu, <i>Pik3cd</i>) ↑ genów kodujących białka biorące udział w przemianach glikogenu: mięśniowej fosforylasy glikogenu (<i>Pygm</i>)), pyrofosforylasy 2 UDP-glukozy (<i>Ugp2</i>) i kinazy α 1 fosforylasy (<i>Phka1</i>) ↑ ekspresji czynników transkrypcyjnych biorących udział w przekazywaniu sygnału od insuliny (<i>Foxo1</i>, <i>Foxo3a</i>) oraz czynników modulujących aktywność insuliny (kinazy białkowe c <i>Prkcb1</i>, <i>Prkcd</i>, <i>Prkcq</i>)

6. DYSKUSJA

Jedną z konsekwencji zespołu metabolicznego i cukrzycy jest patologiczna angiogeneza, która przyczynia się do sercowo-naczyniowych komplikacji (*Hammes i inni, 2002; Girach i inni, 2006*). Angiogeneza jest ważnym elementem przebudowy tkanek, w tym adipogenezy, ponieważ zarówno dostarczenie substratów do tkanki, ich przemiany, powstające metabolity, jak i samo ukrwienie/dotlenienie nowopowstającej tkanki jest czynnikiem regulującym jej wzrost przez regulację ekspresji genów (*Kiess i inni, 2008; Cao, 2007; Hausman i Richardson, 2004*). Są to procesy nakładające się na siebie, stanowiące wieloczynnikowe *continuum*.

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych elementów - parametrów biochemicznych zespołu metabolicznego na proces angiogenezy. W badaniach użyto modelu zwierzęcego zespołu metabolicznego-myszy z wyłączonym wątrobowym receptorem RXR α (RXR α ko).

Czynnik transkrypcyjny RXR α ulegający ekspresji w wątrobie tworząc heterodimery z innymi czynnikami transkrypcyjnymi: PPARs, LXRs oraz FXRs reguluje transkrypcję genów związanych z metabolizmem lipidów, ich magazynowaniem, transportem i usuwaniem (*Villaroya i inni, 2004*) ale też i angiogenezą (*Asano i inni, 2001; Fauconnet i inni, 2002*). Ważnym partnerem dla receptora kwasu 9-cis retinowego RXRs (ang. *Retinoid X Receptors*) oraz dla receptorów kwasów: 9-cis- i/lub all-trans retinowego RARs (ang. *Retinoic Acid Receptors*) jest receptor PPAR, a szczególnie PPAR α (*Anderson i inni, 2004*). Zarówno RXR/RAR jak i PPARs są związane z ekspresją genów białek regulujących angiogenezę (*Wang i inni, 2006; Dembińska-Kieć i inni, 2005*).

PPAR α jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów enzymów zaangażowanych głównie w szlak przemian kwasów tłuszczowych (*Crisafulli i Cuzzocrea, 2009*). Dużą ekspresję PPAR α stwierdzono w wątrobie, będącej miejscem syntezy endogennych lipidów-lipoprotein (*Huang i inni, 2008; Mukherjee i inni, 2008*). Aktywacja PPAR α przez fenofibraty, kwasy tłuszczowe (nasycone i nienasycone) jak i ich metabolity (np. prostacyklina PGI₂, kwas 8-hydroksyeikosatetraenowy HETE i in.) prowadzi do zwiększonej syntezy białek biorących udział w transporcie lipidów w organizmie (lipoproteiny, zależne od ATP – transportery (ABCA1) oraz reguluje transkrypcję genów kodujących enzymy β - oksydacji i ω - oksydacji kwasów tłuszczowych (*Clarke i inni, 1999*).

Myszy z wyłączonym genem PPAR α mają podwyższony poziom cholesterolu, a u starszych zwierząt obserwuje się podwyższony poziom triglicerydów i otyłość (*Peters i inni, 1997*).

Także użyte w tych badaniach zwierzęta modelowe nie wykazujące ekspresji RXR α w wątrobie, charakteryzowały się podwyższonym poziomem cholesterolu i triglicerydów w surowicy krwi w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

W celu wyeksponowania parametrów zespołu metabolicznego, myszy z delecją genu RXR α w hepatocytach oraz myszy kontrolne były skarmiane dietą wysokotłuszczową bogatą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dla porównania paszą standardową. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu potwierdziły, że dieta wysokotłuszczowa powoduje zaburzenia przemian lipidowych w postaci zwiększonego poziomu cholesterolu zarówno u myszy kontrolnych jak i myszy modelowych. Stwierdzono istotnie wyższy wzrost poziomu cholesterolu u myszy z delecją RXR α w hepatocytach względem myszy kontrolnych skarmianych dietą wysokotłuszczową. Tym niemniej, nie zaobserwowano zmian w przyroście wagi pomiędzy myszami modelowymi i kontrolnymi pod wpływem diety wysokotłuszczowej.

Skarmianie dietą wysokotłuszczową wywołało również zgodne z piśmiennictwem (*Lu i inni, 2009; Dunn i Bale, 2009*) zmiany insulinowrażliwości wyrażone wyższym poziomem glukozy u myszy w trakcie skarmiania dietą wysokotłuszczową w porównaniu do skarmiania dietą standardową. I tu nie obserwowano różnic między zwierzętami transgenicznymi i kontrolnymi. Badane zwierzęta z wyłączonym genem RXR α w wątrobie nie wykazały zmian w poziomie insuliny surowicy krwi w porównaniu do myszy kontrolnych. Nie zaobserwowano również istotnych różnic w wartościach wskaźników insulinowrażliwości: HOMA i QUICKI pomiędzy obiema grupami zwierząt, co pokazuje, że u tych zwierząt nie występują dodatkowe zaburzenia w przemianach węglowodanów. Uzyskane wyniki są w zgodzie z publikacjami Prof. Wan – twórczynią tych transgenicznych myszy (*Wan i inni, 2003*).

Natomiast wykazano różnice w poziomie cytokin wytwarzanych przez tkankę tłuszczową w badanych grupach zwierząt. Na diecie wysokotłuszczowej, w porównaniu do diety standardowej myszy z delecją RXR α w wątrobie wykazały wyższe stężenie leptyny w surowicy krwi. Jest to również zgodne z opisywaną dla tych myszy odpowiedzią na dietę wysokotłuszczową (*Wan i inni, 2003*). Chodzi tu mianowicie o zaburzenie syntezy i przemian endogennych lipidów w samej wątrobie, co charakteryzuje się wystąpieniem stłuszczenia wątroby u tych zwierząt (*Wan i An, 2000; Anderson i inni, 2004*).

Czyli użyty do badań model dawał sposobność przebadania wpływu elementów zespołu metabolicznego: hipercholesterolemii oraz hiperleptynemii na proces angiogenezy.

W prezentowanej pracy do badania angiogenezy *in vivo* jako podłoża użyto matrigelu składającego się z białek macierzy pozakomórkowej: lamininy, kolagenu IV oraz proteoglikanów siarczanu heparanu. Matrigel stanowi zatem imitację środowiska tkankowego narządów (Allen i inni, 2011; Hughes i inni, 2010). Badania *in vitro*, udowadniają, że komórki śródbłónka w obecności czynników proangiogennych różnicują się, tworząc niezbędne dla sieci kapilar, struktury tubularne w matrigelu (Passaniti i inni, 1992; Dembinska-Kiec i inni, 2005; Auerbach i inni, 2003; Balwierz i inni, 2008). Podczas opracowywania modelu angiogenezy *in vivo* w naszych badaniach zaobserwowano, że bFGF wywołał silniejszą odpowiedź angiogenną komórek w matrigelu podanym podskórnie myszom, niż VEGF. Może to wynikać m. in. z podatności tej cytokiny na działanie tkankowych enzymów proteolitycznych. Prace prowadzone przez innych badaczy potwierdzają obserwowany silniejszy efekt działania bFGF w eksperymentach tworzenia naczyń *in vivo* (Miao i inni, 2002). Dlatego też w dalszych badaniach używano niewielkich stężeń bFGF dodawanych do matrigelu w celu inicjacji angiogenezy w badaniach *in vivo*.

Analiza immunohistochemiczna preparatów matrigelowych wybarwionych na obecność antygeny komórek endotelialnych CD31 (PECAM-1) wykazała tendencję do słabszej odpowiedzi angiogennej w obu grupach myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową w porównaniu do diety standardowej. Wyniki i innych badań pokazują, iż skarmianie dietą wysokotłuszczową hamuje gojenie ran (i angiogenezę) (Nascimento i inni, 2006). U myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach zaobserwowano jednakże większe zahamowanie angiogenezy pod wpływem diety wysokotłuszczowej w porównaniu z myszami kontrolnymi.

Analiza ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowej jak i techniką Real-Time PCR potwierdziła u myszy RXR α ko zahamowanie ekspresji genów białek kluczowych dla procesu angiogenezy takich jak: *Kdr* i *eNOS*. Zarówno VEGFA jak i NO odgrywają istotną rolę w angiogenezie poprzez promowanie proliferacji komórek śródbłónka oraz tworzenie sieci naczyniowej (Ahmad i inni, 2006, Dembińska-Kiec i inni, 1997). W analizie mikromacierzy u tych myszy obserwowano również zahamowanie ekspresji genu kodującego receptor dla pro-proliferacyjnego czynnika PDGF (*Pdgfrb*) oraz genów biorących udział

w oddziaływaniach komórkowych ważnych też i dla angiogenezy (*gap junction proteins*) (Tei i inni, 2002).

Słabsza odpowiedź angiogenna u myszy RXR α ko na diecie wysokotłuszczowej może być związana z upośledzonym metabolizmem lipidów: kwasów tłuszczowych czy cholesterolu w wątrobie u tych myszy. Może to prowadzić do wzrostu poziomu FFAs w krążeniu, czego konsekwencją może być lipotoksyczność, dysfunkcja komórek śródbłónka i apoptoza tkanek (Chinen i inni, 2007; Artwohl i inni, 2004). Nadmiar kwasów tłuszczowych może indukować lipotoksyczność śródbłónka naczyniowego poprzez zwiększoną de novo syntezę diacyloglicerolu aktywującego izoformy kinazy białkowej C (PKC) (Ragheb i inni, 2009). Jest to związane ze stresem wolnorodnikowym w wyniku aktywacji oksydazy NAD(P)H, zahamowaniem aktywności endotelialnej syntazy tlenku azotu, obniżeniem dostępności NO, jak i z aktywacją NF- κ B i ścieżki prozapalno-apoptotycznej (Inoguchi i inni, 2000; Ragheb i inni, 2008; Piro i inni, 2008). Otrzymane wyniki ekspresji genów w komórkach stwierdzanych w matrigelu myszy z delecją RXR α w hepatocytach wskazują na wyżej opisaną lipotoksyczność, gdyż obserwowano wzrost ekspresji genu kinazy białkowej C (PKC) oraz zahamowanie ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny (*Hmox1*, *Gdc*, *Gsr*, *Mgst1*), jak i zahamowanie *Nos3*, oraz wzrost ekspresji genów ścieżek prozapalnych, w tym i receptorów TNF α (*Tnfrsf21*, *Tnfrsf1b*).

W wielu badaniach wykazano, że w zaburzeniach metabolicznych towarzyszących rozwojowi zespołu metabolicznego występuje zmniejszona obrona antyoksydacyjna wiodąca do nasilenia apoptozy (Hansel i inni, 2004). I rzeczywiście, w przeciwieństwie do myszy kontrolnych, analiza ekspresji badanych mikromacierzą genów w komórkach matrigelu myszy z delecją RXR α w hepatocytach, wykazała wzrost ekspresji proapoptotycznych genów (jak np. wzrost ekspresji aktywatorów caspazy 3: perforyny 1 (gen *Prf1*) oraz granzymu B (gen *Gzmb*), wzrost ekspresji proapoptotycznego białka BCL2 (gen *Bcl2L11*)) i zahamowanie ekspresji genów anty-apoptotycznych (*Birc4*, *Birc5*) pod wpływem skarmiania dietą wysokotłuszczową.

To też aktywacja genów związanych z lipotoksycznością i apoptozą, może tłumaczyć obniżoną odpowiedź angiogenną u tych myszy. Stymulacja apoptozy jest jedną z dróg wykorzystywanych w terapii anty-nowotworowej w celu upośledzenia angiogenezy,

czego konsekwencją jest zahamowanie rozrostu patologicznych tkanek (*Folkman i inni, 2003; Aurello i inni, 2009*).

Słabsza aktywność angiogenna u myszy z delecją RXR α w hepatocytach, może wynikać z ekspozycji komórek, biorących udział w angiogenezie na wysoki poziom kwasów tłuszczowych. Badania *in vitro* pokazują bowiem hamujący wpływ aktywatorów czynników transkrypcyjnych PPAR (m. in. kwasy tłuszczowe i ich metabolity) na angiogenezę (*Kim i inni, 2006*).

Jak opisano wcześniej, angiogeneza jest procesem promującym rozrost tkanki tłuszczowej (*Nishimura i inni, 2007*). Podczas rozwoju płodowego różnicowanie naczyń i synteza białek macierzy zewnątrzkomórkowej poprzedzają różnicowanie się adipocytów (*Hausman i inni, 2004; Cohen i inni, 2001*). Wykazano, że podawanie zwierzętom czynników antyangiogennych (np. przeciwciał anti-VEGF) redukowało odkładanie się tkanki tłuszczowej i indukowało spadek masy ciała, w stopniu zależnym od stosowanej dawki przeciwciała (*Rupnik i inni, 2002*). Zatem obniżona odpowiedź angiogenna u zwierząt RXR α ko na diecie wysokotłuszczowej w badanym modelu angiogenezy *in vivo*, może przyczyniać się do obserwowanego braku różnic w przyroście wagi między grupami myszy, mimo podwyższonego poziomu leptyny, która wykazuje własności proangiogenne (*Polus i inni, 2004; Anagnostoulis i inni, 2008*).

Kawaguchi i współpracownicy (*Kawaguchi i inni, 1998*) zaobserwowali, że podskórne nastrzyknięcie myszy matrigelem zawierającym bFGF (dawka 1 μ g/ml), indukuje nie tylko angiogenezę ale i neoadipogenezę u myszy, poprzez infiltrację i proliferację krążących we krwi komórek prekursorowych adipocytów (*Kawaguchi i inni, 1998*). Zgodnie z wynikami innych (*Kawaguchi i inni, 1998*), analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy oligonukleotydowej, potwierdzona techniką PCR w czasie rzeczywistym, wykazała wzrost ekspresji genów charakterystycznych dla dojrzałych adipocytów, a zahamowanie ekspresji czynników transkrypcyjnych wczesnej adipogenezy w matrigelu myszy WT zawierającym czynnik bFGF. Z kolei w matrigelu myszy RXR α ko zaobserwowano aktywację ekspresji genów uczestniczących we wstępnych etapach adipogenezy: *Srebf1* i *Cebpb* (*Feve, 2009*) oraz zahamowanie ekspresji markerów dojrzałych adipocytów (geny kodujące białko wiążące kwasy tłuszczowe *Fabp4* i adypsyne *Adn*), co może wynikać z podwyższonego poziomu leptyny w surowicy krwi u tych myszy. Ta adipokina hamuje bowiem dojrzewanie preadipocytów,

a promuje angiogenezę (Ambati i inni, 2007; Anagnostoulis i inni, 2008). W naszych badaniach nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy poziomem leptyny, adiponektyny, a badanymi parametrami angiogenezy u myszy.

Ostatnio pojawiły się jednakże doniesienia o hamującym wpływie leptyny na proliferację mięśni gładkich ściany naczyń (Bohlen i inni, 2007; Rodriguez i inni, 2010) oraz na różnicowanie mioblastów (ustna prezentacja, Prof. Arkadiusz Orzechowski, 1st Baltic Stem Cell Meeting, Szczecin, Poland). Możliwe, że zahamowanie tworzenia mięśni gładkich ściany naczyń przez hyperleptynemię, przyczynia się do zaobserwowanego zjawiska upośledzonej angiogenezy w użytym modelu.

Prostanoidy są substancjami aktywującymi PPAR γ i promującymi adipogenezę (Massiera i inni, 2003). W przeprowadzonych badaniach analiza ekspresji genów w komórkach matrigelu myszy RXR α ko wykazała aktywację ekspresji genów kodujących enzymy syntezy eikozanoidów, natomiast u myszy WT obserwowano przeciwny efekt. W matrigelu myszy RXR α ko stwierdzono istotny wzrost ekspresji syntazy prostaglandyny (*Ptgs1*), syntazy prostacykliny (*Ptgis*) i 15-lipooksygenazy (*Alox15*). Badania prowadzone przez Scarfo i współpracowników pokazały, że kwas arachidonowy oraz jego metabolity indukują ekspresję genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie eikozanoidów, co przyczynia się do formowania kropli lipidowych w komórkach (Scarfo i inni, 2001). Także w naszej analizie ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy w matrigelu myszy RXR α ko, wykazano wzrost ekspresji genów, biorących udział w syntezie triglicerydów oraz aktywację ekspresji genów szlaku glikolizy. Z kolei u myszy WT obserwowano przeciwny efekt, co potwierdza zaburzenie przemian lipidowych u zwierząt RXR α ko.

Przyczyną zwiększonej tolerancji glukozy oraz normoinsulinemii u myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach ma być podwyższony poziom IGF1 w surowicy krwi (Wan i inni, 2003). IGF-I jest czynnikiem wykazującym działanie zbliżone do insuliny (Kolaczyński i inni, 1994; Fernandez i inni, 2004). Aktywacja katabolizmu glukozy przez komórki, które wmigrowały do matrigelu myszy RXR α ko (wykazane w badaniach ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy), może wynikać więc z podwyższonego poziomu IGF1 u tych myszy, co jest w zgodzie z wynikami innych (Wan i inni, 2003).

Analiza korelacji odpowiedzi angiogennej z badanymi parametrami biochemicznymi krwi wykazała wprostproporcjonalną zależność pomiędzy ilością komórek PECAM-1 pozytywnych,

które wmigrowały do matrigelu a poziomem insuliny u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową. Wcześniejsze badania potwierdzają stymulujący wpływ insuliny na przeżywalność i tworzenie nowych naczyń (*Spranger i inni, 2001; Bermont i inni, 2001*).

Reasumując, przedstawione wyniki otrzymane dla myszy RXR α ko w użytym modelu angiogenezy *in vivo* dowodzą, że dieta wysokotłuszczowa prowadzi do hipercholesterolemii i hiperleptynemii, oraz do zaburzonej odpowiedzi angiogennej. Słabsza odpowiedź angiogenna u tych myszy może wynikać z aktywacji apoptozy wywołanej lipotoksycznością w komórkach biorących udział w neowaskularyzacji oraz z indukcji wzmożonej adipogenezy - promującej patologiczne odkładanie się lipidów w komórkach (stłuszczenie narządów lecz nie przyrost wagi).

7. WNIOSKI KOŃCOWE

1. Użyte w badaniu zwierzęta z delecją genu RXR α w wątrobie umożliwiły zbadanie wpływu wybranych parametrów zespołu metabolicznego (hipercholesterolemia, hiperleptynemia) przy niezmienionej insulinowrażliwości na angiogenezę. Przeprowadzone badania potwierdzają wzmożony katabolizm glukozy u tych myszy (aktywacja genów szlaku glikolizy nawet w komórkach matrigelu myszy RXRa ko).
2. Pomimo podwyższonego poziomu uważanej za proangiogenną adipokinę - leptyny u myszy RXRa ko, dieta wysokotłuszczowa zmniejszyła odpowiedź angiogenną, co potwierdzono barwieniem immunohistochemicznym na obecność antygenu CD31 w preparatach matrigelowych oraz badaniem ekspresji genów w komórkach w matrigelu. Badania nie wykazały również zależności pomiędzy proangiogenną leptyną a angiogenezą, natomiast zaobserwowano dodatnią korelację między indukowanym dietą wysokolipidową poziomem insuliny w surowicy a odpowiedzią angiogenną (podobną u WT i KO zwierząt), co potwierdza istotną rolę tego hormonu w angiogenezie.
3. Obniżona odpowiedź angiogenna u myszy RXRa ko może być z jednej strony, związana z upośledzonym katabolizmem kwasów tłuszczowych w wątrobie tych myszy, szczególnie na diecie wysokotłuszczowej. Tego konsekwencją może być działanie lipotoksyczne na komórki, w tym komórki śródbłónka. Z drugiej strony, kwasy tłuszczowe będące aktywatorami czynnika transkrypcyjnego PPAR γ mogą promować obserwowane różnicowanie się komórek w matrigelu w kierunku adipocytów (adipogeneza) i przyczyniać się do zahamowania odpowiedzi angiogennej.
 - A. Badania ekspresji genów w matrigelu myszy RXRa ko potwierdzają lipotoksyczny wpływ kwasów tłuszczowych, gdyż w komórkach matrigelu u tych myszy obserwowano aktywację genów biorących udział w apoptozie, oraz zahamowanie ekspresji genów uczestniczących w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

B. Analiza ekspresji genów w matrigelu myszy RXRa ko pokazała również aktywację ekspresji genów regulujących wstępne etapy adipogenezy oraz uczestniczących w syntezie eikozanoidów promujących adipogenezę. Dodatkowo, u myszy modelowych obserwowano aktywację genów biorących udział w syntezie triglicerydów, co potwierdza wzmożoną adipogenezę u myszy RXRa ko.

Przeprowadzone badania nad angiogenezą na modelu mysim z delecją RXR α w wątrobie prezentującym parametry zespołu metabolicznego (hipercholesterolemia, hiperleptynemia) pokazują, że główny wpływ na odpowiedź angiogenną w użytym modelu mają zaburzenia metabolizmu lipidów (ich konsekwencje w postaci: lipotoksyczności, hamowania angiogenezy i aktywacji adipogenezy), a nie proangiogenna leptyna.

Brak przyrostu wagi przy wzroście leptyny i aktywacji genów adipogenezy przemawia za patologicznym stłuszczeniem narządów (lipotoksycznością) kosztem angiogenezy.

8. PIŚMIENNICTWO

- Abdul-Ghani MA**, Muller FL, Liu Y, Chavez AO, Balas B, Zuo P, Chang Z, Tripathy D, Jani R, Molina-Carrion M, Monroy A, Folli F, Van Remmen H, DeFronzo RA. Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295(3):E678-85.
- Adams RH**, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 464–78.
- Adams RH**, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. Roles of ephrin B ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis *Genes Dev.* 1999; 13:295-306.
- Ahima RS**, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11:327–32.
- Ahmad S**, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, Haigh JJ.: Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res.* 2006; 99:715–22.
- Ahmadian M**, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol.* 2007; 2:229–37.
- Aiello LP**, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994; 331:1480-7.
- Ailhaud G**. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol.* 2006; 329(8):570-7.
- Alaynick WA**. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* 2008; 8(4):329-37.
- Alberti S**, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001; 107(5):565–73.
- Alessi MC**, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 1997; 46(5):860-7.

- Al-Hasani H**, Joost HG. Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005; 19(4):589-603.
- Allen T**, Zhang F, Moodie SA, Clemens LE, Smith A, Gregoire F, Bell A, Muscat GE, Gustafson TA. Halofenate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with antidiabetic activity. *Diabetes* 2006; 55(9):2523–33.
- Allen P**, Melero-Martin J, Bischoff J. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5(4):e74-86.
- Ambati S**, Kim H-K, Yang J, Lin J, Della-Fera M, Baile C: Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73:378–84.
- Anagnostoulis S**, Karayiannakis AJ, Lambropoulou M, Efthimiadou A, Polychronidis A, Simopoulos C. Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine* 2008; 42(3):353-7.
- Anderson SP**, Dunn C, Laughter A, Yoon L, Swanson C, Stulnig TM, Steffensen KR, Chandraratna RA, Gustafsson JA, Corton JC. Overlapping transcriptional programs regulated by the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha, retinoid X receptor, and liver X receptor in mouse liver. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(6):1440-52.
- Artwohl M**, Roden M, Waldhäusl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2004; 18(1):146-8.
- Asahara T**, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res.* 1998; 83(3):233-40.
- Asahara T**, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18(14):3964-72.
- Asano A**, Irie Y, Saito M. Isoform-specific regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) family mRNA expression in cultured mouse brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 174(1-2):71-6.
- Attané C**, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D, Carpené C, Castan-Laurell I, Valet P. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol.* 2011; 46(1):21-8.
- Aubert J**, Saint-Marc P, Belmonte N, Dani C, Négrel R, Ailhaud G. Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBP-beta and C/EBP-delta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 160:149–56.

- Auerbach R**, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*. 2003; 49(1):32-40.
- Aurello P**, Bellagamba R, Rossi Del Monte S, D'Angelo F, Nigri G, Cicchini C, Ravaioli M, Ramacciato G. Apoptosis and microvessel density in gastric cancer: correlation with tumor stage and prognosis. *Am Surg*. 2009; 75(12):1183-8.
- Bach TL**, Barsigian C, Chalupowicz DG, Busler D, Yaen CH, Grant DS, Martinez J. VE-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res*. 1998; 238:324-34.
- Baillargeon J**, Rose DP. Obesity, adipokines, and prostate cancer. *Int J Oncol*. 2006; 28:737-45.
- Balconi G**, Spagnuolo R, Dejana E. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(6):1443-51.
- Balestrieri ML**, Balestrieri A, Mancini FP, Napoli C. Understanding the immunoangiostatic CXC Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(2):250-6.
- Balwierz A**, Czech U, Polus A, Filipkowski RK, Mioduszevska B, Proszynski T, Kolodziejczyk P, Skrzeczynska-Moncznik J, Dudek W, Kaczmarek L, Kulig J, Pryjma J, Dembinska-Kiec A. Human adipose tissue stromal vascular fraction cells differentiate depending on distinct types of media. *Cell Prolif*. 2008; 41(3):441-59.
- Barak Y**, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; 4(4):585-95.
- Barbatelli G**, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298(6):E1244-53.
- Barish GD**, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Evans RM. A nuclear receptor atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol*. 2005;19(10):2466-77.
- Bastaki M**, Nelli EE, Dell'Era P, Rusnati M, Molinari-Tosatti MP, Parolini S, Auerbach R, Ruco LP, Possati L, Presta M. Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Angiogenesis Phenotype in Mouse Endothelium. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:454-64.
- Bates SH**, Myers MG. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14(10):447-52.

- Bates SH**, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003; 421(6925):856–9.
- Bays HE**, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008; 6(3):343-68.
- Bazzoni G**, Dejana E, Lampugnani MG. Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:573-81.
- Bermont L**, Lamielle F, Lorchel F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, Adessi GL. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(1):363-8.
- Blanchetot C**, Boonstra J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008; 18:35–45.
- Bogacka I**, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 2005; 54:1392–9.
- Bohlen F**, Kratzsch J, Mueller M, Seidel B, Friedman-Einat M, Witzigmann H, Teupser D, Koerner A, Storck M, Thiery J. Leptin inhibits cell growth of human vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 2007; 46(1):67-71.
- Bouloumie A.**, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes.* 2001; 50:2080–6.
- Bouloumié A**, Lolmède K, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M. Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol* 2002; 63(2 Pt 1):91-5.
- Bookout A.L.**, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006; 126(4):789–99.
- Borradaile NM**, Pickering JG. NAD(+), sirtuins, and cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(1):110-7.
- Bozaoglu K**, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007; 148:4687–94.
- Bozaoglu K**, Curran JE, Stocker CJ, Zaibi MS, Segal D, Konstantopoulos N, Morrison S, Carless M, Dyer TD, Cole SA, Goring HH, Moses EK, Walder K, Cawthorne MA, Blangero J, Jowett JB. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(5):2476-85.

- Brasaemle DL.** Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007; 48:2547–59.
- Brown LF,** Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 1997; 79:233–69.
- Brown NS,** Smart A, Sharma V, Brinkmeier ML, Greenlee L, Camper SA, Jensen DR, Eckel RH, Krezel W, Chambon P, Haugen BR. Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gammadeicient mouse. *J Clin Invest.* 2000; 106:1:73–9.
- Burton, G.R,** Nagarajan R, Peterson CA, McGehee RE. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 2004; 329:167–85.
- Cancello R,** Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2006; 113(10):1141–7.
- Cannon B,** Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84:277–359.
- Cannon B,** Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes.* 2010; 34(Suppl 1):S7–16.
- Cao Z,** Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991; 5:1538–52.
- Cao Y.** Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.* 2007; 117(9):2362–8.
- Cariou B,** Staels B. FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28(5):236–43.
- Carmeliet P,** Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Target deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98:147–57.
- Carmeliet P.** VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nature Med.* 2000; 6:1002–3.
- Carmeliet P.** Cardiovascular biology. Creating unique blood vessels. *Nature* 2001; 412(6850):868–9.
- Cawthorn WP,** Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008; 582(1):117–31.

- Chan JL**, Moschos SJ, Bullen J, Heist K, Li X, Kim YB, Kahn BB, Mantzoros CS. Recombinant methionyl human leptin administration activates signal transducer and activator of transcription 3 signaling in peripheral blood mononuclear cells in vivo and regulates soluble tumor necrosis factor- α receptor levels in humans with relative leptin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(3):1625–31.
- Charo IF**, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004; 95:858–66.
- Charo IF**, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354:610–21.
- Chinen I**, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, Ueda S, Sakanashi M, Takasu N. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology* 2007; 148:160-5.
- Chen F**, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinic Chem.* 1999; 45:7-17.
- Chen S**, Ziyadeh FN. Vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep.* 2008; 8: 470-6.
- Cheng L**, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, Yang Q. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med.* 2004; 10(11):1245–50.
- Choi YH**, Park S, Hockman S, Zmuda-Trzebiatowska E, Svennelid F, Haluzik M, Gavrilova O, Ahmad F, Pepin L, Napolitano M, Taira M, Sundler F, Stenson Holst L, Degerman E, Manganiello VC. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J Clin Invest* 2006; 116:3240–51.
- Christiaens V**, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 318(1-2):2-9.
- Chudek J**, Wiecek A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep.* 2006; 58(Suppl):81–8.
- Cinti S**. The adipose organ. Prostaglandins *Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73:9-15.
- Cinti S**. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297(5): E977-86.
- Clarke SD**, Thuillier P, Baillie RA, Sha X: Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:566-571.

- Cohen AW**, Carbajal JM, Schaeffer RC. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of β -catenin and small pore endothelial barrier dysfunction. *Heart and Circul Physiol*. 1999; 277(5):H2038-49.
- Cohen SL**, Halaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, Hecht R, Collins F. Human leptin characterisation. *Nature* 1996; 382(6592):589.
- Cohen B**, Barkan D, Levy Y, Goldberg I, Fridman E, Kopolovic J, Rubinstein M. Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7697–700.
- Coleman RA**, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*. 2004; 43:134–76.
- Collins T**, Cybulski M. NF κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2001; 107:255-64.
- Conway EM**, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001; 49: 507–21.
- Costa C**, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007; 10:149–66.
- Costford SR**, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church T, Jubrias SA, Conley KE, Smith SR. Skeletal Muscle NAMPT is Induced by Exercise in Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 98:E117-26.
- Cox CM**, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol*. 2006; 296:177–89.
- Cowey S**, Hardy RW. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol*. 2006; 69:1505–22.
- Creager MA**, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease. Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108:1527–32.
- Crisafulli C**, Cuzzocrea S. The role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) in the regulation of inflammation in macrophages. *Shock* 2009; 32(1):62-73.
- Cusi K**. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2010; 10(4):306-15.

- Day TF**, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. 2005; 8(5):739-50.
- Davis GE**, Camarillo CW. An $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res*. 1996; 224:39-51.
- Dedhar S**. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8:657-69.
- DeLisser HM**, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997; 151(3):671-7.
- DeLisser H**, Liu Y, Desprez PY, Thor A, Briasouli P, Handumrongkul C, Wilfong J, Yount G, Nosrati M, Fong S, Shtivelman E, Fehrenbach M, Cao G, Moore DH, Nyack S, Liggitt D, Kashani-Sabet M, Debs R. Vascular endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) regulates advanced metastatic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(43):18616-21.
- de Luis DA**, Aller R, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Izaola O, Perez Castrillon JL, Romero E. Serum visfatin concentrations are related to dietary intake in obese patients. *Ann Nutr Metab*. 2010; 57(3-4):265-70.
- Dembinska-Kiec A**, Dulak J, Partyka L, Krzesz R, Dudek D, Bartus S, Polus M et al.: Induction of nitric oxide synthase (NOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental model of angioplasty and heart ischemia. *Adv Exp Med Biol*. 1997; 433:163-7.
- Dembinska-Kiec A**, Polus A, Kiec-Wilk B, Grzybowska J, Mikolajczyk M, Hartwich J, Razny U, Szumilas K, Banas A, Bodzioch M, Stachura J, Dyduch G, Laidler P, Zagajewski J, Langman T, Schmitz G. Proangiogenic activity of beta-carotene is coupled with the activation of endothelial cell chemotaxis. *BBA* 2005; 1740(2):222-39.
- Demirdögen B**, Elçin AE, Elçin YM. Neovascularization by bFGF releasing hyaluronic acid-gelatin microspheres: in vitro and in vivo studies. *Growth Factors* 2010; 28(6):426-36.
- De Pauw A**, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol*. 2009; 175(3):927-39.
- Després JP**, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:1039-49.
- Desvergne B**, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999; 20(5):649-88.

- Dhaouadi T**, Sfar I, Abelmoula L, Jendoubi-Ayed S, Aouadi H, Ben Abdellah T, Ayed K, Zouari R, Gorgi Y. Role of immune system, apoptosis and angiogenesis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint destruction, a systematic review. *Tunis Med.* 2007; 85(12):991-8.
- Dickinson S** Hancock DP, Petocz P, Ceriello A., Brand- Miller J. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor- kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 1188-93.
- Dimmeler S**, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res.* 2000; 87(6):434-9.
- DiPietro LA**. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS.* 1997; 79:295-314.
- Ducruzeau PH**, Priou M, Weithimer M, Flamment M, Duluc L, Iacobazi F, Soleti R, Simard G, Durand A, Rieusset J, Andriantsitohaina R, Malthiery Y. Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. *J Physiol Biochem.* 2011 Jan 26. [Epub ahead of print].
- Duda DG**, Sunamura M, Lozonschi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.* 2000; 60(4):1111-6.
- Dullaart RP**, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K, Van Tol A. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24(3):188-94.
- Duncan RE**, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:79–101.
- Duncan RE**, Sarkadi-Nagy E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J Biol Chem.* 2008; 283:25428–36.
- Dunn GA**, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology.* 2009 Nov;150(11):4999-5009
- Dunk C**, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.* 2000; 156(6):2185-99.
- Duplus E**, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 2000; 275(40):30749-52.
- Eckel RH**, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415–28.

- Elayappan B**, Ravinarayanan H, Sardar-Pasha SP, Lee KJ, Gurunathan S. PEDF inhibits VEGF- and EPO- induced angiogenesis in retinal endothelial cells through interruption of PI3K/Akt phosphorylation. *Angiogenesis* 2009; 12: 313-24.
- Eliceiri BP**, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest.* 1999; 103(9):1227-30.
- Eriksson A**, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002; 1:99–108.
- Esposito K**, Giugliano D, Nappo F, Marfella L. Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: Campanian Postprandial Hyperglycemia Study Group. *Circulation* 2004; 110:214-19.
- Esteve E**, Ricart W, Fernández-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care* 2009; 32(Suppl 2):S362-7.
- Ettenson DS**, Gotlieb AI. Basic fibroblast growth factor is a signal for the initiation of centrosome redistribution to the front of migrating endothelial cells at the edge of an in vitro wound. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(4):515-21.
- Fain JN**, Bahouth SW, Madan AK. Haptoglobin release by human adipose tissue in primary culture. *The Journal of Lipid Research* 2004; 45:536-42.
- Fan Tai-Ping D**. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of the gene therapy. *TiPS* 1995; 16:57-66.
- Fantuzzi G**, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000; 68(4):437-46.
- Fauconnet S**, Lascombe I, Chabannes E, Adessi GL, Desvergne B, Wahli W, Bittard H. Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(26):23534-43.
- Faul MM**, Grese TA Selective RXR modulators for the treatment of type II diabetes. *Curr Opin Drug Discov Dev.* 2002; 5:974–85.
- Fechner G**, Classen K, Schmidt D, Hauser S, Müller SC. Rapamycin inhibits in vitro growth and release of angiogenetic factors in human bladder cancer. *Urology* 2009; 73(3):665-8.
- Fernandez AM**, Kim JK, Yakar S, Dupont J, Hernandez-Sanchez C, Castle AL, Filmore J, Shulman GI, Le Toith D Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 2001; 15:1926–34.

- Fernández-Real JM**, Vayreda M, Richart C, Gutiérrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:1154–9.
- Fernández-Riejos P**, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:568343-51.
- Ferrara N**. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 1999; 56(3):794-814.
- Ferrara N**. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(4):158-63.
- Fève B**. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005; 19(4):483-99.
- Fiévet C**, Fruchart JC, Staels B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6(6):606-14.
- Fiorucci S**, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med.* 2007; 13(7):298–309.
- Folkman J**. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13(2):159-67.
- Fonseca-Alaniz MH**, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32 (Suppl 7):S39-51.
- Fonseca V**, Munshi M, Merin LM, Bradford JD. Diabetic retinopathy: a review for the primary care physician. *South Med J.* 1996; 89:839-50.
- Fontaine C**, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart JC, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ Res.* 2007; 101(1):40-9.
- Ford ES**. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. *Atherosclerosis* 2004; 173(2):309–314.
- Forman BM**, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83(5):803–12.
- Friedlander M**, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995; 270(5241):1500-2.

- Friedman JM**, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395(6704):763-70.
- Frühbeck G**. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006; 393(1):7-20.
- Fu X**, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem*. 2001; 276(42):38378–87.
- Fukuhara A**, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307(5708):426-30.
- Fürnsinn C**, Willson TM, Brunmair B. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta, a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia* 2007; 50(1):8-17.
- Gagnon A**, Antunes TT, Ly T, Pongsuwan P, Gavin C, Lochnan HA, Sorisky A. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism* 2010; 59(4):547-53.
- Gale NW**, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 1999; 13:1055-66.
- Gallagher EJ**, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77(5):511-23.
- Garmy-Susini B**, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol*. 2008; 6(3-4):155-63.
- Garten A**, Petzold S, Körner A, Imai S, Kiess W. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20:130–8.
- Garten A**, Petzold S, Barnikol-Oettler A, Körner A, Thasler WE, Kratzsch J, Kiess W, Gebhardt R. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 391(1):376-81.
- Gerhardt H**. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* 2008; 4(4):241-6.
- Ghajar CM**, George SC, Putnam A.J. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit Rev. Eukaryot Gene Expr*. 2008; 18:251–78.

- Gil-Campos M**, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr.* 2004; 23:963–74.
- Gimeno RE**, Klamann LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances, *Curr Opin Pharmacol.* 2005; 5:122–8.
- Girach A**, Vignati L. Diabetic microvascular complications—can the presence of one predict the development of another? *Journal of Diabetes and Its Complications* 2006; 20(4):228-237.
- Girard J**, Perdureau D, Fougelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J.* 1994; 8:36–42.
- Gomez DE**, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997; 74(2):111-22.
- Gonzalez-Barroso MD**, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev.* 2000; 1:61–72.
- Goralski KB**, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem.* 2007; 282(38):28175-88.
- Gregoire FM**. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med.* 2001; 226(11):997-1002.
- Gruber PJ**, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest.* 1996; 98:1332–43.
- Grundey SM**, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109(3):433–8.
- Grundey SM**, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112:2735–52.
- Guilherme A**, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(5):367-77.
- Guerra C**, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998; 102(2):412-20.

- Guilherme A**, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(5):367-77.
- Gunnnett CA**, Heistad DD, Faraci FM. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: Role of superoxide. *Diabetes* 2002; 51:1931-7.
- Guo W**, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(2):E576-86.
- Gupta K**, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY, Hebbel RP. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res.* 1999; 247(2):495-504.
- Gupta K**, Zhang J: Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 2005; 81:236–42.
- Guzik TJ**, Mangalat D, Korbust R. Adipocytokines—novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57(4):505-28.
- Hajer GR**, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Edlinger M, Visseren FLJ. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. *Am Heart J.* 2007; 154:750 e1–7.
- Halberg N**, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008; 37(3):753-68.
- Hammes HP**, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, Brownlee M, Deutsch U. Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 2002; 51:3107-3112.
- Han DC**, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN. Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 278:F628-34.
- Handelsman Y**. Metabolic syndrome pathophysiology and clinical presentation. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(1):18-20.
- Hanley AJ**, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005; 54:3140–7.
- Hansel B**, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A: Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:4963–71.
- Hassink S**, Balagopal PB. RBP4: from retinol transporter to biomarker? *J Pediatr.* 2009; 154(1):5-7.

- Hausman GJ**, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci.* 2004; 82(3):925-34.
- He W**, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26):15712–7.
- Heilbronn LK**, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(12):1225-30.
- Hemler ME**. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10:578-85.
- Hevener AL**, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med.* 2003; 9(12):1491–7.
- Himms-Hagen J**. Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity? *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; 2:395–401.
- Hiraoka Y**, Yamashiro H, Yasuda K, Kimura Y, Inamoto T, Tabata Y. In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 2006; 12:1475–87.
- Hirota K**, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 59:15–26.
- Hood J**, Granger HJ. Protein kinase G mediates Vascular Endothelial Growth Factor- induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(36):23504-8.
- Hotamisligil GS**, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091):87-91.
- Huang S**, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 19(7):697-703.
- Huang J**, Powell WC, Khodavirdi AC, Wu J, Makita T, Cardiff RD, Cohen MB, Sucov HM, Roy-Burman P. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res.* 2002; 62(16):4812–19.
- Huang Z**, Zhou X, Nicholson AC, Gotto AM Jr, Hajjar DP, Han J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *Br J Pharmacol.* 2008; 155(4):596-605.
- Huang H**, Lai JY, Do J, Liu D, Li L, Del Rosario J, Doppalapudi VR, Pirie-Shepherd S, Levin N, Bradshaw C, Woodnutt G, Lappe R, Bhat A. Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):1001-11.

- Hughes CS**, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010; 10(9):1886-90.
- Hutley L**, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005; 330 (6):280–9.
- Hwang JH**, Stein DT, Barzilai N, Cui MH, Tonelli J, Kishore P, Hawkins M. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(6):E1663-9.
- Ikeda D**, Sakaue S, Kamigaki M, Ohira H, Itoh N, Ohtsuka Y, Tsujino I, Nishimura M. Knockdown of macrophage migration inhibitory factor disrupts adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 2008; 149(12):6037-42.
- Imai T**, Jiang M, Kastner P, Chambon P and Metzger D. Selective ablation of retinoid X receptor alpha in hepatocytes impairs their lifespan and regenerative capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4581–6.
- Inoguchi T**, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M: High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939–45.
- Inuzuka H**, Nanbu-Wakao R, Masuho Y, Muramatsu M, Tojo H, Wakao H. Differential regulation of immediate early gene expression in preadipocyte cells through multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265:664–8.
- Isner JM**, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999; 103(9):1231-6.
- Jakobsson L**, Claesson-Welsh L. Vascular basement membrane components in angiogenesis--an act of balance. *Scientific World Journal* 2008; 8:1246-9.
- Janowski BA**, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; 383(6602):728–31.
- Jaworski K**, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G1–4.
- Jaworski K**, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, de Val S, Kang C, Sul HS. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med.* 2009; 15:159–68.
- Jin D**, Guo H, Bu SY, Zhang Y, Hannaford J, Mashek DG, Chen X. Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure. *FASEB J.* 2011; 25(2):754-64.

- Jobgen WS**, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem*. 2006; 17(9):571-88.
- Joseph SB**, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*. 2003; 9:213–19.
- Juge-Aubry CE**, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19(4):547-66.
- Kadowaki T**, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005; 26(3):439–51.
- Kahn R**, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28(9):2289–2304.
- Kara stergiou K**, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 318(1-2):69-78.
- Kargiotis O**, Chetty C, Gogineni V, Gondi CS, Pulukuri SM, Kyritsis AP, Gujrati M, Klopfenstein JD, Dinh DH, Rao JS. uPA/uPAR downregulation inhibits radiation-induced migration, invasion and angiogenesis in IOMM-Lee meningioma cells and decreases tumor growth in vivo. *Int J Oncol*. 2008; 33(5):937-47.
- Karin M**, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:301–10.
- Karin M**. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441:431–6.
- Karsan A**, Yee E, Poirier GG, Zhou P, Craig R, Harlan JM. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am J Pathol*. 1997; 151(6):1775-84.
- Kastner P**, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dolle P, Chambon P. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 1994; 786:987–1003.
- Kawaguchi N**, Toriyama K, Nicodemou-Lena E, Inou K, Torii S, Kitagawa Y. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(3):1062-6.
- Kersten S**, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999; 103(11):1489–98.

- Kim I**, Moon S, Kim SH, Kim HJ, Koh JS, Koh GY. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear FactorB Activation in Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2001; 276:7614-20.
- Kim HK**, Della-Fera M, Lin J, Baile CA. Baile Docosahexaenoic Acid Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J Nutr*. 2006; 136(12):2965-9.
- Kim KY**, Cheon HG: Antiangiogenic effect of rosiglitazone is mediated via peroxisome proliferator-activated receptor γ -activated maxi-K channel opening in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006; 281: 13503–12.
- Kim JY**, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007; 117(9):2621–37.
- Kim JG**, Kim EO, Jeong BR, Min YJ, Park JW, Kim ES, Namgoong IS, Kim YI, Lee BJ. Visfatin stimulates proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cells* 2010; 30(4):341-5.
- Kiec-Wilk B**, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K: The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56:149-62.
- Kiec-Wilk B**, Kiec-Klimczak M, Dembinska-Kiec A. Różnicowanie się Komorek tkanki tłuszczowej a odpowiedź siateczki endoplazmatycznej (ER) i ich rola w ochronie przed zniszczeniem komórek beta trzustki oraz rozwojem cukrzycy typu 2. *Czynniki Ryzyka* 3/2009.
- Kiess W**, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*. 1998; 138:482–91.
- Kiess W**, Petzold S, Töpfer M, Garten A, Blüher S, Kapellen T, Körner A, Kratzsch J. The adipose organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(1):135-53.
- Klein S**, Giancotti FG, Presta M, Albelda SM, Buck CA, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 1993; 4:973-82.
- Klein S**, Allison DB, Heymsfield SB, Kelley DE, Leibel RL, Nonas C, Kahn R. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: association for weight management and obesity prevention; NAASO, the obesity society; the American society for nutrition; and the American diabetes association. *Diabetes Care* 2007; 30(6):1647–52.

- Klötting N**, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339(1):430-6.
- Kolditz CI**, Langin D. Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(4):377-81.
- Kopff B**, Jegier A. Adipokines: adiponectin, leptin, resistin and coronary heart disease risk. *Przegl Lek*. 2005; 62 (Suppl 3):69-72.
- Korenblat KM**, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 2008; 134(5):1369-75.
- Kozawa T**, Sone H, Okuda Y, Kawakami Y, Sekine Y, Imai M, Hommura S, Inatomi M, Yaguchi S, Matsuo K, Segawa T, Suzuki H, Yamashita K. Vascular endothelial growth factor levels in the aqueous and serum in diabetic retinopathy with or without neovascular glaucoma. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1998; 102(11):731-8.
- Krezel W**, Dupe V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 9317:9010-14.
- Kroll J**, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 252(3):743-6.
- Kroon ME**, Koolwijk P, van der Vecht B, van Hinsbergh VW. Hypoxia in combination with FGF-2 induces tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix: involvement of at least two signal transduction pathways. *J Cell Sci*. 2001; 114:825-33.
- Kuo LE**, Zukowska Z. Stress, NPY and vascular remodeling: Implications for stress-related diseases. *Peptides* 2007; 28:435-40.
- Kuo LE**, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetňanský R, Zukowska Z. Chronic Stress, Combined with a High-Fat/High-Sugar Diet, Shifts Sympathetic Signaling toward Neuropeptide Y and Leads to Obesity and the Metabolic Syndrome. *N Y Acad Sci*. 2008; 1148:232-7.
- Kusminski CM**, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and type II diabetes. *Clinical Science* 2005; 109(3):243-56.
- Lafontan M**. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32 (Suppl 7):S39-51.
- Lago F**, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3(12):716-24.

- Lago F**, Gómez R, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34(10):500-10.
- Lamoreaux WJ**, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* 1998; 55:29-42.
- Lampugnani MG**, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:674-82. **Mangi MH**, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2000; 111(1): 43-51.
- Large V**, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 2004; 30(4):294-309.
- Lass A**, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* 2011; 50(1):14-27.
- Lau KS**, Juchheim AM, Cavaliere KR, Philips SR, Lauffenburger DA, Haigis KM. In Vivo Systems Analysis Identifies Spatial and Temporal Aspects of the Modulation of TNF- α -Induced Apoptosis and Proliferation by MAPKs. *Sci Signal.* 2011; 4(165):ra16.
- Lee Y**, Yu X, Gonzales F, Mangelsdorf DJ, Wang MY, Richardson C, Witters LA, Unger RH. PPAR α is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(18):11848-53.
- Lee FY**, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31:572-80.
- Lee JM**, Kim SR, Yoo SJ, Hong OK, Son HS, Chang SA. The relationship between adipokines, metabolic parameters and insulin resistance in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J Int Med Res.* 2009; 37(6):1803-12.
- Lefebvre P**, Benomar Y, Staels B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 ; 21(11):676-83.
- Lehmann JM**, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997; 272(6):3137-40.
- Leibovich SJ**, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α . *Nature* 1987; 329(6140):630-2.

- Leone TC**, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(13):7473–8.
- Li M**, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S, Metzger D, Chambon P. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* 2000; 4076804: 633–6.
- Li M**, Chiba H, Warot X, Messaddeq N, Gerard C, Chambon P and Metzger D. RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* 2001; 1285:675–88.
- Li J**, Yu X, Pan W, Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282:E1334–41.
- Li X**, Hansen PA, Xi L, Chandraratna RA, Burant CF. Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. *J Biol Chem.* 2005; 280(46):38317-27.
- Li WW**, Hutnik M, Li V. Angiogenesis-based medicine: principles and practice for disease prevention and intervention. In: Maragoudakis ME; Papadimitriou E. *Angiogenesis. Basic science and clinical applications, 1st edn. Transworld Research Network* 2007; 377–417.
- Lijnen HR**, Christiaens V, Scroyen I, Voros G, Tjwa M, Carmeliet P, Collen D. Impaired adipose tissue development in mice with inactivation of placental growth factor function. *Diabetes* 2006; 55:2698–704.
- Lindsay RS**, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360:57–8.
- Lindsay RS**, Resnick HE, Zhu J, Tun ML, Howard BV, Zhang Y, Yeh J, Best LG. Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(3):e15–6.
- Liu L**, Marti GP, Wei X, Zhang X, Zhang H, Liu YV, Nastai M, Semenza GL, Harmon JW. Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J Cell Physiol.* 2008; 217:319-27.
- Liu K**. Role of apoptosis resistance in immune evasion and metastasis of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(11):399-406.
- Liu Q**, Gauthier MS, Sun L, Ruderman N, Lodish H. Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acsl1 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. *FASEB J.* 2010; 24(11):4229-39.

- Long YC**, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1776–83.
- López-Novoa JM**, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Oct;299(4):H959-74.
- Lu Z**, Wang Z, Wang X, Diao B, Feng X, He F, Zou Q, Gan L. Protection from high-fat-diet-induced impaired glucose tolerance in female Sprague-Dawley rats. *Gynecol Endocrinol.* 2009 Jul;25(7):464-71.
- Lyden D**, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001; 7(11):1194-201.
- Ma K**, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2006; 116(4):1102-9.
- Madsen L**, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740(2):266-86.
- Magnusson PU**, Looman C, Ahgren A, Wu Y, Claesson-Welsh L, Heuchel RL. Platelet-derived growth factor receptor-beta constitutive activity promotes angiogenesis in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(10):2142-9.
- Maisonpierre PC**, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277(5322):55-60.
- Majumdar ID**, Weber HC. Gastrointestinal regulatory peptides and their effects on fat tissue. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17(1):51-6.
- Mandl J**, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(4):194-201.
- Mangelsdorf DJ**, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 1992; 63:329–44.
- Marfella R**, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest.* 2001; 108:635–6.
- Martin A**, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev.* 2003; 23:117–45.

- Maslowska M**, Vu H, Phelis S, Sniderman AD, Rhode BM, Blank D, Cianflone K. Plasma acylation stimulating protein, adipsin and lipids in non-obese and obese populations. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(8):679-86.
- Massiera F**, Saint-Marc P, Seydoux J, Murata T, Kobayashi T, Narumiya S, Guesnet P, Amri EZ, Negrel R, Ailhaud G. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J Lipid Res*. 2003; 44:271-9.
- Masson V**, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, Blacher S, Roland G, Chang Y, Fong T, Carmeliet P, Foidart JM, Noël A. Mouse aortic ring assay: a new approach of the molecular genetics of angiogenesis. *Biol Proced Online* 2002; 4:24-31.
- Matsuda M**, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maedaet N. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*. 2002; 277:37487-91.
- Matsumoto T**, Mugishima H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 2006; 13:130-5.
- Matsumura T**, Wolff K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interaction with filamentous actin. *J Immunol*. 1997; 158:3408-416.
- Maury E**, Noël L, Detry R, Brichard SM. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor- α contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(4):1393-400.
- McMahon G**. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5(1):3-10.
- McTernan PG**, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17(2):170-5.
- Meng K**, Lee CH, Saremi F. Metabolic syndrome and ectopic fat deposition: what can CT and MR provide? *Acad Radiol*. 2010; 17(10):1302-12.
- Merlak M**, Kovacević D, Balog T, Marotti T, Misljenović T, Mikulčić M, Dekaris I. Expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Coll Antropol*. 2008; 32 (Suppl 2):39-43.
- Mertens I**, Van Gaal LF. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev*. 2002; 3(2):85-101.
- Mick GJ**, Wang X, McCormick K. White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin. *Endocrinology* 2002; 143(3):948-53.
- Mitro N**, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreusch A, Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007; 445:219-23.

- Miyazawa-Hoshimoto S**, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Saito Y. Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia* 2003; 46(11):1483-8.
- Miyazono K**, Usuki K, Heldin CH. Platelet-derived endothelial cell growth factor. *Prog Growth Factor Res.* 1991; 3:207–17.
- Mody N**, Graham TE, Tsuji Y, Yang Q, Kahn BB. Decreased clearance of serum retinol-binding protein and elevated levels of transthyretin in insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294:E785–93.
- Montanaro MA**, González MS, Bernasconi AM, Brenner RR. Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor alpha on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids* 2007; 42(3):197-210.
- Morbidelli L**, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effects of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* 1996; 270(1):411-15.
- Moreno-Navarrete JM**, Catalán V, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr Metab (Lond).* 2010; 7:27.
- Morino K**, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2006; 55(Suppl. 2):S9–S15.
- Morishita R**, Nakamura S, Nakamura Y, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogoihara T. Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes* 1997; 46:138-42.
- Mosch B**, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol.* 2010; 2010:135285.
- Moschen AR**, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and Liver Expression of IL-1 Family Members in Morbid Obesity and Effects of Weight Loss. *Mol Med.* 2011 Mar 2. doi: 10.2119/molmed.2010.00108. [Epub ahead of print].
- Moses MA**, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(6):2645-50.
- Myers MG**, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2008; 70:537–56.
- Mu H**, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 70:146–57.

- Mukherjee R**, Locke KT, Miao B, Meyers D, Monshizadegan H, Zhang R, Search D, Grimm D, Flynn M, O'Malley KM, Zhang L, Li J, Shi Y, Kennedy LJ, Blonar M, Cheng PT, Tino J, Srivastava RA. Novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists lower low-density lipoprotein and triglycerides, raise high-density lipoprotein, and synergistically increase cholesterol excretion with a liver X receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 327(3):716-26.
- Muller WA**. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 1995; 57(4):523-8.
- Mund JA**, Case J. The Role of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Tumor Angiogenesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Dec 29.
- Munzberg H**, Myers MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*. 2005; 8:566–70.
- Nakamura MT**, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* 2004; 39(11):1077-83.
- Nascimento AP**, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr*. 2006; 96(6):1069-77.
- Näslund I**, Norrby K. NO and de novo mammalian angiogenesis: further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF165-induced angiogenesis. *APMIS*. 2000; 108(1):29-37.
- Newman PJ**, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(6):953-64.
- Nishimura S**, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M et al.: Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 2007; 56:1517–26.
- Nisoli E**, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47):16507-12.
- Norrby K**, Ostergaard P. Basic-fibroblast-growth-factor-mediated de novo angiogenesis is more effectively suppressed by low-molecular-weight than by high-molecular-weight heparin. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1996; 16(1):8-15.
- O'Brien CD**, Cao G, Makrigiannakis A, DeLisser HM. Role of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of PECAM-1 in PECAM-1-dependent cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(4):C1103-13.

- Ohashi K**, Yokoyama T, Nakajima Y, Kosovsky M. Methods for Implantation of BD Matrigel™ Matrix into Mice and Tissue Fixation BD Biosciences. Discovery Labware 2004; Technical Bulletin #455.
- Ohnishi T**, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues. *Arch Oral Biol.* 2003; 48:797–804.
- Ohta H**, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2005;180(1):11-7.
- Okuno M**, Arimoto E, Nishizuka M, Nishihara T, Imagawa M. Isolation of up- or down-regulated genes in PPARgamma-expressing NIH-3T3 cells during differentiation into adipocytes. *FEBS Lett.* 2002; 519(1-3):108-12.
- Oller do Nascimento CM**, Ribeiro EB, Oyama LM. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *An Acad Bras Cienc.* 2009; 81(3):453-66.
- O'Reilly MS**, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79(2):315-28.
- O'Reilly MS**, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999; 285(5435):1926-8.
- O'Rourke L**, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem.* 2002; 277(45):42557–62.
- Orzechowski A**. Prezentacja ustna: Leptin targets skeletal muscle progenitor cells – a new challenge in cancer cachexia. 1st Baltic Stem Cell Meeting, 27-29 May 2011, Szczecin, Poland.
- Ou HY**, Wu HT, Yang YC, Wu JS, Cheng JT, Chang CJ. Elevated Retinol Binding Protein 4 Contributes to Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats. *Horm Metab Res.* 2011; 43(5):312-8.
- Ouchi N**, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(2):1304-9.
- Ouchi N**, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 2010; 329(5990):454-7.
- Ouchi N**, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(2):85-97.

- Paglialunga S**, Fisette A, Yan Y, Deshaies Y, Brouillette JF, Pekna M, Cianflone K. Acylation-stimulating protein deficiency and altered adipose tissue in alternative complement pathway knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(3):E521-9.
- Papetti M**, Herman IM: Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282:947-70.
- Parenti A**, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem.* 1998; 273(7):4220-6.
- Park HY**, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park B.E, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med.* 2001; 33(2):95–102.
- Pasquale EB**. The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:608-15.
- Passaniti A**, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992; 67(4):519-28.
- Patan S**, Munn LL, Tanda S, Roberge S, Jain RK, Jones RC. Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy. *Circ Res.* 2001; 89(8):723-31.
- Pedram A**, Razandi M, Levin E. ERK / JUN kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 1998; 273:26722-8.
- Peet DJ**, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93(5):693–704.
- Pénicaud L**, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000; 16(10):903-8.
- Pepper MS**, Ferrara N, Orci L, Montesano R Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189(2):824-31.
- Pepper MS**, Mandriota S, Vassalli J-D, Orci L, Montesano R. Angiogenesis regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 213:31-67.
- Perletti G**, Concarì P, Giardini R, Marras E, Piccinini F, Folkman J, Chen L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res.* 2000; 60(7):1793-6.

- Perollet C**, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998; 91(9):3289-99.
- Peters JM**, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice *J Biol Chem*. 1997; 272(43):27307-12.
- Petersen KF**, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2002; 109:1345–50.
- Pfaffl MW**, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(9):e36.
- Phillips LK**, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2008; 10(2):156-64.
- Pipili-Synetos E**, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol*. 1993; 108:855-7.
- Piro S**, Spampinato D, Spadaro L, Oliveri CE, Purrello F, Rabuazzo AM. Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; 18(2):96-104.
- Pittelli M**, Formentini L, Faraco G, Lapucci A, Rapizzi E, Cialdai F, Romano G, Moneti G, Moroni F, Chiarugi A. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *J Biol Chem*. 2010; 285(44):34106-14.
- Poitout V**, Tanaka Y, Reach G, Robertson RP. Oxidative stress, insulin secretion, and insulin resistance. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*. 2001:75-86.
- Polus A**, Grzybowska J, Pryjma J, Dembińska-Kieć A. Leptin-induced differentiation of HUVEC. *Acta Cardiol*. 2004; 59(2):229-30.
- Polytarchou C**, Hatzia Apostolou M, Poimenidi E, Papadimitriou E. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling. In: Maragoudakis ME, Papadimitriou E. *Angiogenesis Basic science and clinical applications, 1st edn. Transworld Research Network* 2007; 207–27.
- Polverini PJ**. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ*. 2002; 66:962–75.

- Popko K**, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, Pyrzak B, Demkow U. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res*. 2010; 15 (Suppl 2):120-2.
- Pradhan L**, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11:e2.
- Presta M**, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16:159–78.
- Puri MC**, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J*. 1995; 14(23):5884-91.
- Qin X**, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008; 48(2):432-41.
- Raclot T**, Oudart H. Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58(3): 633-46.
- Ragheb R**, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG. Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NFkappaB activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 370(1):134-9.
- Ragheb R**, Shanab GM, Medhat AM, Seoudi DM, Adeli K, Fantus IG. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 389(2):211-6.
- Ramjaun AR**, Hodivala-Dilke K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(3):521-30.
- Rastinejad F**. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol*. 2001; 11:33–8.
- Ravnskjaer K**, Boergesen M, Rubi B, Larsen JK, Nielsen T, Fridriksson J, Maechler P, Mandrup S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2005; 146:3266-76.
- Reaven GM**. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595–607.

- Reaven GM**, Chen YD, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest.* 1993; 92:141–6.
- Rega G**, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, Kastl SP, Speidl WS, Weiss TW, Breuss JM, Furnkranz A, Uhrin P, Zaujec J, Zilberfarb V, Frey M, Roehle R, Maurer G, Huber K, Wojta J. Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(7):1587-95.
- Rehman J**, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10):1292–8.
- Repa JJ**, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:459–81.
- Reusch JE**, Colton LA, Klemm DJ. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:1008–20.
- Revollo JR**, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, Milbrandt J, Kiess W, Imai S. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.* 2007; 6(5):363-75.
- Ribatti D**, Belloni AS, Nico B, Di Comite M, Crivellato E, Vacca A. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides* 2008; 29(9):1596-602.
- Ribatti D**, Nico B, Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; 12(2):101-11.
- Richter WO**, Robl H, Schwandt P. Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. *Peptides* 1989; 10(2):333-5.
- Richardson TP**, Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. *J Biol Chem.* 1999; 274(19):13534-40.
- Risau W**. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
- Robertson SA**, Rae CJ, Graham A. Induction of angiogenesis by murine resistin: putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways. *Regul Pept.* 2009; 152(1-3):41-7.
- Rocha A**, Azevedo I, Soares R. Anti-angiogenic effects of imatinib target smooth muscle cells but not endothelial cells. *Angiogenesis* 2007; 10:279–86.

- Rocks N**, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Munaut C, Gonzalez ML, Gueders M, Hacha J, Gilles C, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res.* 2008; 68(22):9541-50.
- Rodriguez AM**, Elabd C, Amri Ez-Z, Alhaid G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87:125–8.
- Rodríguez A**, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Fortuño A, Frühbeck G. Leptin inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II through nitric oxide-dependent mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:105489.
- Roh SG**, Song SH, Choi KC, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 362(4):1013-8.
- Rosen ED**, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest.* 2000; 106(5):629-31.
- Rosen ED**, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:145–71.
- Rosen ED**, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006; 444:847–53.
- Ruiz-Grande C**, Alarcón C, Mérida E, Valverde I. Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 1992; 13(1):13-6.
- Rundhaug JE**. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005; 9:267–85.
- Rupnick MA**, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10730–5.
- Rutkowski JM**, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J.* 2009; 276(20):5738-46.
- Sabio G**, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008; 322(5907):1539-43.
- Sacewicz I**, Wiktorska M, Wysocki T, Niewiarowska J. Mechanisms of cancer angiogenesis. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009; 63:159-68.
- Saely CH**, Geiger K, Drexel H. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology.* 2010 Dec 7. [Epub ahead of print]

- Sahu A.** Effects of chronic central leptin infusion on proopiomelanocortin and neurotensin gene expression in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2008; 440(2):125-9.
- Saiki A,** Watanabe F, Murano T, Miyashita Y, Shirai K. Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Int J Obes.* 2006; 30:1676–84.
- Saito M,** Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009; 58:1526–31.
- Salomonis N,** Hanspers K, Zambon AC, Vranizan K, Lawlor SC, Dahlquist KD, Doniger SW, Stuart J, Conklin BR, Pico AR. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:217.
- Samad F,** Pandey M, Loskutoff DJ. Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1998; 95:7591–6.
- Sanal MG.** The blind men 'see' the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(6):831-44.
- Sari A,** Gurbuz O, Yilmaz N, Eskandari G, Tasdelen B, Basterzi Y. Granulocyte-colony stimulating factor improves the survival of ischaemic skin flaps by the induction of angiogenesis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009; 62(8):1035-41.
- Scarfo LM,** Weller PF, Farber HW: Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:294–301.
- Schenk S,** Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008; 118(9):2992-3002.
- Schmidt AM,** Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 84: 489-97.
- Schoelch C,** Kuhlmann J, Gossel M, Mueller G, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Biemer-Daub G, Kramer W, Juretschke HP, Herling AW. Characterization of adenosine-A1 receptor-mediated antilipolysis in rats by tissue microdialysis, 1H-spectroscopy, and glucose clamp studies. *Diabetes* 2004; 53(7):1920-6.
- Schreiber AB,** Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 232(4755):1250-3.
- Schröder M.** Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(6):862-94.

- Schultz JR**, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14(22):2831–8.
- Seifert EL**, Estey C, Xuan JY, Harper ME. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010; 285:5748–58.
- Sell H**, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18(3):258-62.
- Semenza GL**, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp.* 2006; 272:2–8.
- Semenza GL**. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1177: 2-8.
- Semple RK**, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28(1):176-9.
- Serrero G**, Lepak NM, Goodrich SP. Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin-F₂- α inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 1992; 131:2545–51.
- Sethi JK**, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 2007; 48(6):1253-62.
- Shah CA**. Diabetic retinopathy: A comprehensive review. *Indian J Med Sci.* 2008; 62(12):500-19.
- Shanmugam N**, Figarola JL, Li Y, Swiderski PM, Rahbar S, Natarajan R. Proinflammatory effects of advanced lipoxidation end products in monocytes. *Diabetes* 2008; 57:879-88.
- Sharma K**, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44:1139-46.
- Shibata R**, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2004; 279(27):28670-4.
- Silvestre JS**, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res.* 2000; 87(6):448-52.

- Singh R**, Barden A., Mori T, Beilin L. Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia* 2001; 44:129-46.
- Singhal A**, Farooqi IS, Cole TJ, O'Rahilly S, Fewtrell M, Kattenhorn M, Lucas A, Deanfield J. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation* 2002; 106(15):1919-24.
- Sironi AM**, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Positano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, Ferrannini E. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. *Hypertension* 2004; 44:127-33.
- Smas CM**, Chen L, Zhao L, Latasa M-J, Sul HS. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1999; 274:12632-41.
- Soldi R**, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 1999; 18:882-92.
- Sorli SC**, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 2007; 26:7692-9.
- Sozio MS**, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(4):378-90.
- Spalding KL**, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453(7196):783-7.
- Spranger J**, Pfeiffer AF. New concepts in pathogenesis and treatment of diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109(Suppl 2):S438-50.
- Staels B**, Kuipers F. Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2007; 67(10):1383-92.
- Steffensen KR**, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 2004; 53 (Suppl 1):S36-42.
- Stark J**, Baffour R, Garb JL, Kaufman J, Berman J, Rhee S, Norris MA, Friedmann P. Basic fibroblast growth factor stimulates angiogenesis in the hindlimb of hyperglycemic rats. *J Surg Res.* 1998; 79: 8-12.
- Stefan N**, Stumvoll M. Adiponectin — its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res.* 2002; 34: 469-74.
- Steinberg MS**, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:554-60.

- Stich V**, De Glisezinski I, Crampes F, Hejnova J, Cottet-Emard JM, Galitzky J, Lafontan M, Rivière D, Berlan M. Activation of alpha(2)-adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in SCAT of obese subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279(2):R499-504.
- Stocker CJ**, Cawthorne MA. The influence of leptin on early life programming of obesity. *Trends Biotechnol*. 2008; 26(10):545–51.
- Strieter RM**, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995; 270(45):27348-57.
- Strömblad S**, Cheresh DA. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol*. 1996; 3(11):881-5.
- Stulnig TM**, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K, Schuster GU, Gustafsson JÅ. Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol Pharmacol*. 2002; 62:1299–305.
- Sucov HM**, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev*. 1994; 89:1007–18.
- Summers SA**. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006; 45:42–72.
- Sun X**, Iida S, Yoshikawa A, Senbonmatsu R, Imanaka K, Maruyama K, Nishimura S, Inagami T, Senbonmatsu T. Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens Res*. 2011; 34(6):701-6.
- Sund M**, Zeisberg M, Kalluri R. Endogenous stimulators and inhibitors of angiogenesis in gastrointestinal cancers: basic science to clinical application. *Gastroenterology* 2005; 129(6):2076-91.
- Sunny NE**, Satapati S, Fu X, He T, Mehdibeigi R, Spring-Robinson C, Duarte J, Potthoff MJ, Browning JD, Burgess SC. Progressive adaptation of hepatic ketogenesis in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298(6):E1226-35.
- Susnow N**, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(1):42-9.
- Szanto A**, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ*. 2004; 11(Suppl 2):S126-43.
- Tang QQ**, Jiang MS, Lane MD. Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:4855–65.

- Taniguchi A**, Kataoka K, Kono T, Oseko F, Okuda H, Nagata I, Imura H. Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 1987; 28(5):490-4.
- Taşcılar ME**, Ozgen T, Cihan M, Abacı A, Yeşilkaya E, Eker I, Serdar M. The effect of insulin resistance and obesity on low-density lipoprotein particle size in children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2010; 2(2):63-6.
- Takahashi T**, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999; 5(4):434-8.
- Takano H**, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009; 73(2):214-20.
- Tei K**, Kawakami-Kimura N, Taguchi O, Kumamoto K, Higashiyama S, Taniguchi N, Toda K, Kawata R, Hisa Y, Kannagi R. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer Res.* 2002; 62:6289-96.
- Thannickal VJ**, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279:L1005-28.
- Tigno XT**, Selaru IK, Angeloni SV, Hansen BC. Is microvascular flow rate related to ghrelin, leptin and adiponectin levels? *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003; 29:409–16.
- Tirziu D**, Moodie KL, Zhuang ZW, Singer K, Helisch A, Dunn JF, Li W, Singh J, Simons M. Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2005; 112(16):2501-9.
- Tobin KA**, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J, Gustafsson JA, Nebb HI. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor- α . *Mol Endocrinol.* 2000; 14:741–52.
- Tobin KA**, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andresen SM, Gustafsson JA, Nebb HI. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem.* 2002; 277:10691–7.
- Tokuda F**, Sando Y, Matsui H, Koike H, Yokoyama T. Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med.* 2008; 47(21):1843–9.
- Tomanek RJ**, Hansen HK, Christensen LP. Temporally expressed PDGF and FGF-2 regulate embryonic coronary artery formation and growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(7):1237-43.
- Tontonoz P**, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003; 17:985–93.

- Twigg SM**, Chen MM, Joly A.H, Chakrapani SD, Tsubaki J, Kim HS, Oh Y, Rosenfeld RG. Advanced glycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in diabetes mellitus. *Endocrinology* 2001; 142:1760-9.
- Unger RH**, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl1):S118-21.
- Valet P**, Berlan M, Beauville M, Crampes F, Montastruc JL, Lafontan M. Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest.* 1990; 85(1):291-5.
- Valet P**, Tavernier G, Castan-Laurell I, Saulnier-Blache JS, Langin D. Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res.* 2002; 43(6):835-60.
- van Wijk JP**, Cabezas MC, de Koning EJ, Rabelink TJ, van der Geest R, Hoepelman IM. In vivo evidence of impaired peripheral fatty acid trapping in patients with human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(6):3575-82.
- Varga T**, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(8):1007-22.
- Villarroya F**, Iglesias R, Giralt M: Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem.* 2004; 11:795–805.
- Villena JA**, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 2004; 279:47066–75.
- Voest EE**, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(8):581-6.
- Vona-Davis L**, Howard-McNattM, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev.* 2007; 8:395–408.
- Voros G**, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D, Lijnen HR Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* 2005; 146:4545–54.
- Wafai R**, Tudor EM, Angus JA, Wright CE. Vascular effects of FGF-2 and VEGF-B in rabbits with bilateral hind limb ischemia. *J Vasc Res.* 2009; 46(1):45-54.

- Wan YJ**, Cai Y, Lungo W, Fu P, Locker J, French S, Sucov HM. Peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor α -deficient mice. *J Biol Chem*. 2000; 275:28285-90.
- Wan YJ**, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po, Chen T, Flores M et al.: Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor α as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:4436–44.
- Wan YJ**, Han G, Cai Y, Dai T, Konishi T, Leng AS: Hepatocyte retinoid X receptor- α -deficient mice have reduced food intake, increased body weight, and improved glucose tolerance. *Endocrinology* 2003; 144:605–11.
- Wang GL**, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995; 270: 1230-7.
- Wang HU**, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin B2 and its receptor EphB4. *Cell* 1998; 93:741-53.
- Wang YX**, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003;113(2):159–70.
- Wang T**, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 58(1):1-14.
- Wang JH**, Wang F, Yang MJ, Yu DF, Wu WN, Liu J, Ma LQ, Cai F, Chen JG. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience* 2008; 156(1):89-98.
- Wang Y**, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Lüthi U, Barberis A, Benjamin LE, Mäkinen T, Nobes CD, Adams RH. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; 465(7297):483-6.
- Wei L**, Hou X, Tatemoto K. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept*. 2005; 132:27 e32.
- Wellen KE**, Hotamisligil GS. Obesity- induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112:1785–8.
- Wellen KE**, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115:1111–19.
- West CML**, Cooper RA, Lancaster JA, Wilks DP, Bromley M. Tumor Vascularity: A Histological Measure of Angiogenesis and Hypoxia. *Cancer Res*. 2001; 61:2907–10.

- Wozniak SE**, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(9):1847-56.
- Wu Z**, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP-beta, C/EBP-delta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*. 1996; 64:251-60.
- Yamagishi S**, Adachi H, Abe A, Yashiro T, Enomoto M, Furuki K, Hino A, Jinnouchi Y, Takenaka K, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T. Elevated serum levels of pigment epithelium-derived factor in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:2447-50.
- Yan HC**, Baldwin HS, Sun J, Buck CA, Albelda SM, DeLisser HM. Alternative splicing of a specific cytoplasmic exon alters the binding characteristics of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). *J Biol Chem*. 1995; 270(40):23672-80.
- Yancopoulos GD**, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-8.
- Yang RZ**, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290:E1253-61.
- Yang ZX**, Shen W, Sun H. Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2010; 4(4):741-8.
- Yu T**, Luo G, Zhang L, Wu J, Zhang H, Yang G. Leptin promotes proliferation and inhibits differentiation in porcine skeletal myoblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(1):13-21.
- Yuan A**, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(5):1957-63.
- Zachary I**, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*. 2001; 49:568-81.
- Zachary I**, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: a novel, non-angiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1512-20.
- Zhang Y**, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1006-11.
- Zhang Y**, Edwards PA. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett*. 2008; 582(1):10-18.

- Zhang J**, Cao R, Zhang Y, Jia T, Cao Y, Wahlberg E. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *FASEB J*. 2009; 23(1):153-63.
- Zhou H**, Song X, Briggs M, Violand B, Salsgiver W, Gulve EA, Luo Y. Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338(2):793-9.
- Ziyadeh FN**, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8015-20.
- Zielonka T**. Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2003; 8(4):169-74.
- Zielonka T**. Angiogeneza – Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2004; 9(1):25-31.
- Zukowska Z**, Grant DS, Lee EW. Neuropeptide Y: a novel mechanism for ischemic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(2):86-92.

9. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Schemat zmian zachodzących w tkance tłuszczowej podczas zwiększania jej rozmiarów (wg Karastergiou, 2010).

Podczas przyjmowania nadmiaru substratów energetycznych tkanka tłuszczowa rozrasta się, co prowadzi do hipertrofii i apoptozy adipocytów oraz do uwalniania chemotaktycznych adipokin (np. MCP-1), czego rezultatem jest stymulacja infiltracji makrofagów do tkanki i wzrost jej odpowiedzi prozapalnej. Zmianom w poziomie wytwarzanych adipokin towarzyszy wzrost insulinooporności i niedotlenienia.

COX – cyklooksygenaza, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów, MIF – czynnik zahamowania migracji monocytów, MMP – metaloproteinaza, NGF – czynnik wzrostu neuronów, NOS – syntaza tlenku azotu, PAI-1 – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu, RANTES (ang. *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), RAS – układ renina-angiotensyna, SAA – surowiczy amyloid A, TGF β – transformujący czynnik wzrostowy β , TNF α – czynnik martwicy nowotworów α , VEGF – czynnik wzrostu śródbłoka naczyń.

Ryc. 2. Metabolizm lipidów w adipocytach (wg Sethi, 2007). Opis w tekście.

AC-cyklaza adenyłowa, ACS – syntetaza acylo-CoA, aP2 – białko transportujące kwasy tłuszczowe, AQP7 – akwaporyna, AR – receptor adrenergiczny, FFA – wolny kwas tłuszczowy, HSL – lipaza hormonozależna, IR – receptor insulinowy, P13K – kinaza 3-fosfatydylinozytolu, PKA – kinaza białkowa A.

Ryc. 3. Ścieżki lipolizy w adipocytach (wg Lafontan, 2008).

Przebieg sygnału w adipocytach od katecholamin (poprzez receptory β i α_2 adrenergiczne), od peptydów natriuretycznych (poprzez receptor A NPR-A) oraz od insuliny (poprzez receptor IRS-1). Wewnątrzkomórkowy poziom cAMP jest kontrolowany poprzez: katecholaminy (epinefrynę i norepinefrynę) poprzez związanie z receptorem β adrenergicznym i aktywację cyklazy adenyłowej, aktywację receptorów zmniejszających poziom cAMP (α_2 adrenergiczny receptor, adenozyne, prostaglandyny, neuropeptyd Y, kwas nikotynowy oraz insulinę (poprzez aktywację fosfodiesterazy 3B)). Czynniki natriuretyczne zwiększają aktywność cyklazy

guanylowej zależnej od receptora NPR-A i syntezę cGMP. cAMP i cGMP uczestniczą w zależnej od kinaz (PKA i PKG) fosforylacji HSL i perylipiny. Ufosforylowana perylipina umożliwia hydrolizę TG przez HSL i translokację tego enzymu z cytozolu na powierzchnię kropli lipidowych. Kinazy PKA i PKG fosforylują enzymy i czynniki transkrypcyjne oraz mogą wpływać na uwalnianie różnych molekuł przez adipocyty. Stymulacja receptorów insulinowych przeciwdziała produkcji cAMP poprzez aktywację fosfodiesterazy 3B. Produkty hydrolizy TG (FFA i glicerol) są uwalniane z adipocytów. FFA wiążą się z FABP4, są transportowane do błony komórkowej i przenoszone na zewnątrz komórki przez białko transportujące kwasy tłuszczowe FATP. Glicerol jest transportowany poza komórkę przez białka akwagliceroporyny (akwaporynę 7 AQP7) obecne na błonie komórkowej adipocytów.

AC - cyklaza adenylova, A1 adenosine-R - A1 receptor adenozy, ATGL - lipaza triglicerydów, AQP-7 - akwaporyna-7, AR - receptor adrenergiczny, EP3-PGR - receptor prostagladyny EP3, FABP4 – białko 4 wiążące kwasy tłuszczowe, FFA - wolny kwas tłuszczowy, GC - cyklaza guanylowa, Gi - hamujące białko wiążące GTP, Gs - stymulatorowe białko wiążące GTP, HSL - hormonozależna lipaza, IRS-1 - białko substratowe 1 receptora insulinowego, MGL - lipaza monoglicerydowa, NPR-C - receptor peptydu natriuretycznego C, NPY-Y1-R - receptor neuropeptydu Y1, PR-A - receptor peptydu natriuretycznego A, PDE-3B - cykliczny nukleotyd fosfodieesterazy 3B, PI3-K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PKA - kinaza białkowa A, PKB - kinaza białkowa B/Akt, PKG (cGK-I) - kinaza białkowa G, PUMA-G/HM74a-R - receptor kwasu nikotynowego.

Ryc. 4. Transkrypcyjna regulacja adipogenezy (wg Valet i inni, 2002).

C/EBP α , β , γ - ang. *CCAAT/Enhancer Binding Protein*, FOXC2 - ang. *Forkhead box protein C2*, PPAR γ - ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* , SREBP-1c - ang. *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*.

Ryc. 5. Mechanizmy fizjologicznej angiogenezy (wg Papetti i Herman, 2002).

Angiogeneza obejmuje niżej opisane etapy: destabilizację naczyń przez angiopoetynę 2 (Ang2) (1); indukowaną VEGF przepuszczalność naczyń (2); proliferację komórek śródbłonna (3) i ich migrację (4) przez przebudowaną macierz (5); formowanie tubul przez które płynie krew (6); proliferację i migrację komórek mezenchymalnych do nowoutworzonego naczyń (7) i ich

różnicowanie w kierunku perycytów (8); utworzenie oddziaływań komórka-komórka i oddziaływań z macierzą pozakomórkową w celu stabilizacji naczyń (9).

Ang – angiopoetyna, EGF – naskórkowy czynnik wzrostu, Eph-2A – efryna 2A, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, PDGF – pochodzący z płytek czynnik wzrostu, TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β , TNF- α - czynnik martwicy nowotworów α , VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń.

Ryc. 6. Regulacja angiogenezy tkanki tłuszczowej przez różne czynniki (wg Cao, 2007 zmodyfikowane).

Ang – angiopoetyna, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, HGF – czynnik wzrostu hepatocytów, IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu, MMP – metaloproteinaza macierzy, PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu, SDF-1 – czynnik pochodzenia stromalnego 1, TF – czynnik tkankowy, TGF- β - transformujący czynnik wzrostowy β , TNF- α - czynnik martwicy nowotworów α , VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń.

Ryc. 7. Zależność między adipocytami a makrofagami w tkance tłuszczowej, prowadząca do zaburzeń metabolicznych wywołanych lipotoksycznością kwasów tłuszczowych (wg Cusi, 2010). CHF – przewlekła niewydolność serca, CRP – białko C reaktywne, ER – retikulum endoplazmatyczne, FFA – wolne kwasy tłuszczowe, JNK – c-Jun N terminalna kinaza, NAFLD – niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby, NASH – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby, NF- κ B – czynnik jądrowy κ B, T2DM – cukrzyca typu 2, TNF- α - czynnik martwicy nowotworów α .

Ryc. 8. Struktura naturalnych i syntetycznych aktywatorów czynnika transkrypcyjnego RXR (ang. *Retinoid Xenobiotic Receptor*) (wg Alaynick, 2008).

Kwas 9-cis retinowy, kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas fitanowy są naturalnymi aktywatorami receptora RXR. Najczęściej używanym syntetycznym agonistą receptora RXR jest LG100268.

Ryc. 9. Interakcje pomiędzy różnymi receptorami biorącymi udział w homeostazie lipidów, węglowodanów i kwasów żółciowych w wątrobie (wg Sanal,2008).

ChREBP - ang. *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*, FXR - ang. *Farnesoid Xenobiotic Receptor*, LXR - ang. *Liver Xenobiotic Receptor*, NF- κ B - ang. *Nuclear Factor κ B*, PPAR - ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, RXR - ang. *Retinoid Xenobiotic Receptor*, SHP - ang. *Short Heterodimer Partner*, SREBP - ang. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*.

Ryc. 10. Schemat wykonanego eksperymentu w każdej z 2 grup (WT oraz myszy transgeniczne).

Ryc. 11. Przykładowa fotografia poduszki matrigelu po 6 dniach od podskórnego nastrzyknięcia myszy matrigelem z czynnikiem proangiogennym bFGF [25nM].

Ryc. 12. Przykładowe zdjęcie preparatu parafinowego matrigelu wraz z otaczającą tkanką, barwienie hematoksyliną i eozyną; (obj x 10).

Ryc. 13. Reprezentatywne zdjęcie preparatu parafinowego matrigelu (x 40) wybarwionego anty-CD31 (1:300) przy użyciu zestawu do detekcji z peroksydazą chrzanową.

Ryc. 14. Wpływ bFGF i VEGF na powstawanie naczyń w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy Balb/C (samice) n=5, istotność statystyczna *p<0,05.

Ryc. 15. Wpływ bFGF i VEGF na chemotaksję komórek śródbłónka do matrigelu podanego podskórnym myszom Balb/C (samice) n=5, istotność statystyczna *p<0,05.

Ryc. 16. Genotypowanie myszy RXRa ko. RNA izolowano z wątroby myszy kontrolnych WT i myszy RXRa ko. Reakcję RT-PCR przeprowadzono dla genu *RXR α* (startery zaprojektowano w ten sposób, by powielany był w reakcji PCR fragment egzonu czwartego genu) i dla kontroli dla genu *Gapdh*. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie na 3% żelu agarozowym. Dla myszy RXRa ko nie zaobserwowano na rozdziale elektroforetycznym produktu reakcji PCR dla genu *RXR α* w wątrobie.

Ryc. 17. Spożycie paszy standardowej (STD) oraz paszy wysokotłuszczowej (HFD) przez myszy kontrolne WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy badane RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej **p<0,01.

Ryc. 18. Waga myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 19. Poziom glukozy w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej * p<0,05.

Ryc. 20. Poziom triglicerydów w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 21. Poziom cholesterolu w surowicy krwi myszy WT (A) (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) podczas skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna względem diety standardowej * p<0,05.

Ryc. 22. Waga myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza) po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 23. Poziom glukozy surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna *p<0,05.

Ryc. 24. Poziom insuliny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 25. Insulinowrażliwość po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wskaźnik HOMA Homeostasis model assessment = $G * I / 22,5$, gdzie I jest to poziom insuliny na czczo (μ U/ml), a G jest poziomem glukozy na czczo (mmol/l). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 26. Insulinowrażliwość po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wskaźnik QUICKI Quantitative insulin sensitivity check index = $1 / [\log(I) + \log(G)]$, gdzie I jest to poziom insuliny na czczo (μ U/ml), a G jest poziomem glukozy na czczo (mg/dl). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 27. Poziom cholesterolu surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ryc. 28. Poziom triglicerydów surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 29. Poziom adiponektyny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 30. Poziom leptyny surowicy krwi po 7 tygodniach skarmiania paszą standardową (STD) oraz paszą wysokotłuszczową (HFD) myszy WT (n=5/pasza) oraz myszy RXRa ko (n=5/pasza). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, istotność statystyczna * $p < 0,05$.

Ryc. 31. Liczba naczyń analizowana w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 32. Liczba naczyń ze światłem w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 33. Liczba naczyń bez światła w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 34. Liczba komórek CD31 pozytywnych w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy WT (n=5/pasza) oraz RXRa ko (n=5/pasza) skarmianym paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD) przez 7 tygodni. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD; brak istotności statystycznej.

Ryc. 35. Liczba komórek CD31 pozytywnych w modelu angiogenezy *in vivo* u myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową koreluje z poziomem insuliny. Korelacja Tau-Kendalla: $\tau = 0,78072$ $p < 0,02$, $n = 7$.

Ryc. 36. Analiza wyników ekspresji genów związanych z apoptozą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy WT (A) oraz RXRa ko (B) (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni, 2007*) Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono, Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Ryc. 37. Analiza wyników ekspresji genów związanych z adipogenezą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy WT (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni*, 2007).

Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono

Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Ryc. 38. Analiza wyników ekspresji genów związanych z adipogenezą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy RXRa ko (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni*, 2007).

Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono

Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Ryc. 39. Analiza wyników ekspresji genów związanych z glikolizą i glukoneogenezą (analiza wyników hybrydyzacji z mikromacierzą oligonukleotydową) przy użyciu programu Genmapp w matrygelu myszy skarmianych dietą wysokotłuszczową względem diety standardowej u myszy WT (A) oraz RXRa ko (B) (wg programu GenMapp, *Salomonis i inni*, 2007).

Geny, których ekspresja wzrosła oznaczono na czerwono

Geny, których ekspresja uległa zahamowaniu oznaczono na zielono.

Ryc. 40. Potwierdzenie względnej ekspresji wybranych genów w matrygelu myszy WT (n=3) (A) oraz RXRa ko (n=3) (B) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD). Do reakcji Real time PCR wybrano geny związane z angiogenezą (VEGF receptor 2: *Kdr*, *ang.* endothelial nitric oxide synthase: *Nos3*) oraz adipogenezą (*ang.* adipisin: *Adn*, *ang.* fatty acid binding protein 4: *Fabp4*, *ang.* CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β : *Cebpb*, *ang.* sterol regulatory element binding factor 1: *Srebf1*) i transportem glukozy (*Slc2a4*). *Gapdh* użyto jako genu referencyjnego. $p < 0,05$.

10. SPIS TABEL

Tabela 1. Definicja zespołu metabolicznego opracowana przez IDF (wg *Handelsman, 2009*).

Tabela 2. Funkcje adipokin.

Tabela 3. Startery użyte w reakcji RT- PCR.

Tabela 4. Charakterystyka myszy kontrolnych WT (n=10) i myszy z delecją RXR α w hepatocytach (RXRa ko) (n=10). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD, IS – istotne statystycznie.

Tabela 5. Pole powierzchni pod krzywą (Pppk) glukozy, triglicerydów i cholesterolu dla myszy kontrolnych WT (n=5/pasza) i RXRa ko (n=5/pasza) skarmianych paszą standardową (STD) oraz wysokotłuszczową (HFD). Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD.

Tabela 6. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z angiogenezą w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Tabela 7. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z apoptozą i odpowiedzią na stres oksydacyjny w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Tabela 8. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z metabolizmem lipidów i adipogenezą w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z trzech myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z trzech myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Tabela 9. Zmiany w ekspresji genów (analiza mikromacierzy) związanych z metabolizmem glukozy w matrigelu myszy WT (materiał spulowany z 3 myszy) oraz RXRa ko (materiał spulowany z 3 myszy) skarmianych dietą wysokotłuszczową (HFD) względem myszy skarmianych dietą standardową (STD).

Tabela 10. Geny związane z angiogenezą – analiza mikromacierzy.

Tabela 11. Geny związane z metabolizmem lipidów – analiza mikromacierzy.

Tabela 12. Geny związane z metabolizmem glukozy – analiza mikromacierzy.

11. STRESZCZENIE (j. polski)

Powikłaniami zespołu metabolicznego, oprócz rozwoju cukrzycy typu 2, jest wystąpienie chorób sercowo-naczyniowych, czego przyczyną jest: uszkodzenie śródbłonna, zaburzenie jego funkcji oraz patologiczna angiogeneza manifestująca się w postaci nadciśnienia czy mikro i makroangiopatii cukrzycowej. W regulacji odpowiedzi angiogennej towarzyszącej rozwojowi zespołu metabolicznego wiele czynników odgrywa istotną rolę (hiperglikemia, hiperinsulinemia, adipokiny wytwarzane przez tkankę tłuszczową, stan zapalny, wolne rodniki itp.).

Użyty w pracy model myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach (hRXR α ko) umożliwił zbadanie wpływu zaburzeń metabolicznych w postaci podwyższonego poziomu cholesterolu oraz leptyny w surowicy krwi (przy braku pełnoobjawowej cukrzycy: przy prawidłowym poziomie insuliny i wyższej tolerancji glukozy u tych myszy) na angiogenezę.

W celu wyeksponowania parametrów zespołu metabolicznego myszy hRXR α ko i kontrolne były skarmiane paszą wysokotłuszczową przez 7 tygodni i dla kontroli paszą standardową. Podczas skarmiania zwierzęta były ważone i miały mierzone parametry biochemiczne we krwi. W celu zbadania odpowiedzi angiogennej, w 6 tygodniu skarmiania zwierzęta zostały nastrzyknięte podskórnie matrigelem zawierającym bFGF [25nM] na okres 6 dni. Odpowiedź angiogenna była oceniana w preparatach parafinowych matrigelu wybarwionych immunohistochemicznie na obecność antygeny CD31. W komórkach, które wniknęły do matrigelu została również przeprowadzona analiza ekspresji genów.

Skarmianie dietą wysokotłuszczową wywołało wzrost poziomu cholesterolu i leptyny w surowicy krwi oraz tendencję do obniżonej odpowiedzi angiogennej (liczba naczyń ze światłem w matrigelu) u myszy hRXR α ko. Analiza ekspresji genów w matrigelu tych myszy wykazała zahamowanie ekspresji genów związanych z angiogenezą, wzrost ekspresji genów stymulujących apoptozę, aktywację ekspresji prozapalnych genów oraz wzrost ekspresji genów kodujących wstępne etapy adipogenezy.

Uzyskane wyniki sugerują, że odpowiedź angiogenna u myszy hRXR α ko jest głównie regulowana przez zaburzenia metabolizmu lipidów a nie proangiogenną leptynę. Słabsza odpowiedź angiogenna może wynikać z aktywacji apoptozy wywołanej lipotoksycznością w komórkach biorących udział w neowaskularyzacji oraz z indukcji wzmożonej adipogenezy.

Słowa kluczowe: zespół metaboliczny, angiogeneza, RXR, adipogeneza.

12. STRESZCZENIE (j. angielski)

Metabolic syndrome complications beside type 2 diabetes include cardiovascular disease, which could be caused by: vascular injury, endothelium disfunction and pathological angiogenesis (hypertension, diabetic micro and macroangiopathy). Many factors play an important role in angiogenic response associating metabolic syndrome disease (high glucose and insulin level, adipokines secreted by adipose tissue, inflammatory state, free radicals and etc.).

The model used in the study – mice with deletion of RXR α gene in hepatocytes (hRXR α ko) made it possible to investigate the effect of metabolic disturbances - higher cholesterol and leptin level in the blood (without diabetes development: normal insulin level and improved glucose tolerance) on angiogenesis.

In order to expose metabolic syndrome parameters, hRXR α ko and wild type mice were fed either high fat diet or control, standard diet for 7 weeks. During feeding mice were weighted and biochemical parameters were measured in the blood. To estimate angiogenic response, in 6th week of feeding, animals were subcutaneously injected with matrigel containing bFGF [25nM] for 6 days. Angiogenic response was assessed in matrigel paraffin sections stained immunohistochemically against CD31 antigen. In matrigel plug cells, gene expression was also analysed.

High fat diet feeding resulted in higher cholesterol and leptin level in serum and also in the tendency to decreased angiogenic response (number of vessels with lumen) in hRXR α ko mice. Gene expression analysis in matrigel plugs from hRXR α ko mice showed inhibition of genes related to angiogenesis as well as activation of: apoptosis inducers, proinflammatory genes and genes connected with initial steps of adipogenesis.

Presented results suggest that angiogenic response in hRXR α ko mice is mainly regulated by disturbances of lipid metabolism, but not by proangiogenic leptin. The reason of weaker angiogenic response in these mice could be activation of apoptosis which is caused on the one hand, by lipotoxicity in cells participating in neovascularisation and on the other hand, by induction of adipogenesis.

Key words: metabolic syndrome, angiogenesis, RXR, adipogenesis.