

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU**

**Marek Szolkiewicz**

**MOLEKULARNE PODSTAWY ZWIĘKSZONEJ  
BIOSYNTETY LIPIDÓW W PRZEWLEKŁEJ  
NIETYDOLNOŚCI NEREK**

**Rozprawa habilitacyjna**

Gdańsk 2007

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*  
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*  
*ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,*  
*Zlecenie KW/422/07*

# SPIS TREŚCI

|  |           |
|--|-----------|
| <b>WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>WYKAZ SKRÓTÓW I ENZYMÓW STOSOWANYCH W PRACY.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1. WSTĘP.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2. CEL BADAŃ .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA .....</b>  | <b>18</b> |
| 3.1. EKSPRESJA GENU REDUKTAZY HMG-CoA ORAZ SZYBKOŚĆ ZACHODZĄCEJ IN VIVO CHOLESTEROLOGENEZY W WĄTROBIE SZCZURÓW Z PRZEWLEKŁĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ NEREK .....   | 18        |
| 3.2. EKSPRESJA GENÓW KARBOKSYLAZY ACETYLO-CoA, SYNTAZY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH ORAZ INNYCH ENZYMÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W SYNTEZIE TRIGLICERYDÓW W WĄTROBIE I BIAŁEJ TKANCE TŁUSZCZOWEJ SZCZURÓW Z PRZEWLEKŁĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ NEREK. BADANIA IN VIVO: SEKRECJA TRIGLICERYDÓW Z WĄTROBY ORAZ SZYBKOŚĆ LIPOGENEZY W BIAŁEJ TKANCE TŁUSZCZOWEJ ..... | 19        |
| 3.3. AKTYWNOŚĆ PRZEMIAN GLUKOZY W WARUNKACH PNN NA PRZYKŁADZIE TKANKI TŁUSZCZOWEJ. EKSPRESJA GENU TRANSLOKATORA GLUKOZY GLUT4 .....  | 22        |
| 3.4. CZYNNIKI ODPOWIEDZIALNE ZA ZWIĘKSZONĄ AKTYWNOŚĆ LIPOGENNĄ I CHOLESTEROLOGENNĄ W WĄTROBIE I TKANCE TŁUSZCZOWEJ SZCZURÓW Z PRZEWLEKŁĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ NEREK. EKSPRESJA GENU CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO SREBP-1 .....  | 23        |
| <b>4. WNIOSKI .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>5. PIŚMIENNICTWO.....</b>   | <b>36</b> |



## Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

1. Szołkiewicz M, Sucajtys E, Chmielewski M, Wołyniec W, Rutkowski P, Bogusławski W, Świerczyński J, Rutkowski B: Increased rate of cholesterologenesis – a possible cause of hypercholesterolemia in experimental chronic renal failure in rats. *Horm Metab Res* 2002, 34: 234-237
2. Szołkiewicz M, Niewęglowski T, Korczyńska J, Sucajtys E, Stelmańska E, Goyke E, Świerczyński J, Rutkowski B: Upregulation of fatty acid synthase gene expression in experimental chronic renal failure. *Metabolism* 2002, 51: 1605-1610
3. Rutkowski B, Szołkiewicz M, Korczyńska J, Sucajtys E, Stelmańska E, Niewęglowski T, Świerczyński J: The role of lipogenesis in the development of uremic hyperlipidemia. *Am J Kidney Dis* 2003, 41: S84-S88
4. Korczyńska J, Stelmańska E, Nogalska A, Szołkiewicz M, Goyke E, Świerczyński J, Rutkowski B: Upregulation of lipogenic enzymes genes expression in white adipose tissue of rats with chronic renal failure is associated with higher level of sterol regulatory element binding protein-1. *Metabolism* 2004, 53: 1060-1065
5. Szołkiewicz M, Sucajtys E, Wołyniec W, Rutkowski P, Stelmańska E, Korczyńska J, Świerczyński J, Rutkowski B: Mechanisms of enhanced carbohydrate and lipid metabolism in adipose tissue in uremia. *J Renal Nutr* 2005, 15: 166-172
6. Szołkiewicz M: Zwiększona ekspresja genu karboksylazy acetylo-CoA w tkankach lipogennych szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek. *Nefrol Dial Pol* 2007, 11: 53-57
7. Szołkiewicz M, Chmielewski M, Nogalska A, Stelmańska E, Świerczyński J, Rutkowski B: The potential role of sterol regulatory element binding protein transcription factors in the renal injury. *J Renal Nutr* 2007, 17: 62-65

Skumulowany IF dla prezentowanych prac – 13,837

Liczba punktów KBN (do 2004) i MEiN (od 2005) dla prezentowanych prac – 79,0

Ilość punktów wyliczona przez pracowników Biblioteki Głównej AMG na podstawie bazy JCR za 2006 r.

## Wykaz skrótów i enzymów stosowanych w pracy

### Wykaz skrótów

|                   |   |
|-------------------|---|
| PNN               | – przewlekła niewydolność nerek   |
| WAT               | – biała tkanka tłuszczowa   |
| VLDL              | – frakcja pre- $\beta$ lipoprotein osocza                                   |
| IDL               | – frakcja pośrednia lipoprotein osocza                                      |
| LDL               | – frakcja $\beta$ lipoprotein osocza  |
| HDL               | – frakcja $\alpha$ lipoprotein osocza                                       |
| TG                | – triglicerydy, trójacyloglicerole, triacyloglicerole                       |
| HTG               | – hipertriglicerydemia  |
| CH                | – cholesterol   |
| HCH               | – hipercholesterolemia  |
| SREBP             | – <i>sterol regulatory element binding protein</i> (czynnik transkrypcyjny) |
| WKT               | – wolne kwasy tłuszczowe  |
| CoA               | – koenzym A   |
| HMG-CoA           | – 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzym A                                    |
| acetylo-CoA       | – acetylo koenzym A   |
| malonylo-CoA      | – malonylo koenzym A  |
| ATP               | – kwas adenzynotrójfosforowy  |
| NADP <sup>+</sup> | – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona)           |
| NADPH             | – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)         |
| PDGF              | – <i>platelet derived growth factor</i>                                     |
| TGF- $\beta$      | – <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>                      |
| IGF-1             | – <i>insulin-like growth factor-1</i>                                       |
| ICAM-1            | – <i>inter-cell adhesion molecule-1</i>                                     |
| MCP-1             | – <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>                                 |
| TNF- $\alpha$     | – <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>                          |

### Wykaz enzymów

Dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa [2-oksydoreduktaza 6-fosfo-D-glukonian:NADP<sup>+</sup> (dekarboksylująca)] – EC 1.1.1.44

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa [1-oksydoreduktaza D-glukozy-6-fosforan: NADP<sup>+</sup> (dekarboksylująca)] – EC 1.1.1.49

Enzym jabłczanowy [oksydoreduktaza L-jabłczan:NAD<sup>+</sup> (dekarboksylująca szczawiooctan)] – EC 1.1.1.40

Karboksylaza acetylo-CoA [ligaza acetyloCoA:CO<sub>2</sub> (tworząca ADP)] – EC 6.4.1.2

Liaza ATP-cytrynianowa [*pro*-3S-CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> → acetyloCoA liaza cytrynianowa (defosforylująca ATP)] – EC 2.3.3.8

Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutaryloCoA [oksydoreduktaza mewalonian:NADP<sup>+</sup> (CoA acylująca)] – EC 1.1.1.34

Syntaza kwasów tłuszczowych – EC 2.3.1.85

# 1. WSTĘP

Wysokie stężenie lipidów w surowicy krwi jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Od wielu lat, w sposób nieprzerwany prowadzi się badania kliniczne i doświadczalne mające na celu dogłębne poznanie przyczyn hiperlipidemii, możliwości jej zapobiegania i leczenia. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań pozwoliły między innymi względnie precyzyjnie opisać przemiany, jakim w warunkach fizjologicznych podlegają lipidy w organizmie ludzkim i ustalić zasady ich regulacji, sprecyzować mechanizmy, w następstwie których ilościowe i jakościowe zaburzenia lipoprotein osocza przyczyniają się do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, określić niezbędne postępowanie zapobiegawcze oraz wdrożyć skuteczne leczenie hipolipemizujące. Niemniej, choroby układu sercowo-naczyniowego pochłaniają rocznie na całym świecie miliony ofiar, a to oznacza, że dalsze badania nad hiperlipidemią, podobnie jak i nad innymi czynnikami ryzyka rozwoju tych chorób są niezbędne [1].

Zaburzenia przemian lipidów są stałym elementem obrazu klinicznego przewlekłej niewydolności nerek (PNN) [2,3,4]. Mają one charakter ilościowy i jakościowy, a ich skala i rodzaj nie tyle są zależne od czynnika etiologicznego, który doprowadził do rozwoju tej choroby, ile od stopnia zaawansowania PNN (i/lub rodzaju ewentualnie prowadzonego leczenia nerkozastępczego). Jest to bowiem zespół chorobowy, którego obraz kliniczny jest przede wszystkim zdeterminowany postępującym spadkiem filtracji kłębuszkowej oraz upośledzeniem funkcji wydalniczej i wydzielniczej nerek. Obecnie potrafimy wskazać najważniejszą przyczynę towarzyszącą PNN niedokrwistości (niedobór erytropoetyny), nadciśnienia tętniczego (aktywacja układu RAA), zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej (upośledzenie wydalania fosforanów, niedobór aktywnej postaci witaminy D<sub>3</sub>) i kwasowo-zasadowej (upośledzone wydalanie jonu wodorowego). Potrafimy również wdrożyć określone postępowanie, które ma na celu skutecznie te zaburzenia skorygować, spowolnić postęp choroby, poprawić komfort życia pacjentów i ostatecznie wydłużyć ich życie. Badania nad hiperlipidemią towarzyszącą przewlekłej niewydolności nerek trwają już prawie 40 lat. W tym czasie poznaliśmy niektóre powody, dla których się ona rozwija i niektóre mechanizmy, które leżą u jej podłoża [5]. Niemniej, biorąc pod uwagę skalę problemu w populacji osób z PNN, jak i jego następstwa, nasza wiedza w tym zakresie wydaje się być dalece niewystarczająca.

Hipertriglicerydemia (HTG) jest obecna u ponad 70% pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, natomiast hipercholesterolemia (HCH) jest obecna u około 20% pacjentów z tą chorobą. Warto zaznaczyć, że stężenie cholesterolu jest podwyższone zwłaszcza u tych pacjentów, u których równocześnie notuje się bardzo wysokie stężenia triglicerydów. Stężenie triglicerydów jest zwiększone zarówno we frakcji lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL), we frakcji pośredniej (IDL), jak i we frakcji o gęstości niskiej (LDL). Stężenie cholesterolu (CH) jest natomiast zwiększone we frakcji VLDL i IDL, zwykle niezmiennione we frakcji LDL i zawsze obniżone we frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Zmiany ilościowe dotyczą także apolipoprotein (Apo). W sposób istotny obniżone jest stężenie Apo-A I i Apo-A II, natomiast wyraźnie podwyższone jest stężenie Apo-B 48, Apo-B 100 i Apo-C III. Stężenie Apo-C II zwykle nie rośnie, natomiast dane dotyczące stężenia Apo-E w osoczu pacjentów z PNN są często ze sobą sprzeczne. Należy wyraźnie podkreślić, iż o ile odsetek pacjentów z PNN, u których stwierdza się HTG jest znacznie wyższy, aniżeli w populacji ogólnej, o tyle odsetek pacjentów z PNN, u których obecna jest HCH jest zbliżony do populacji ogólnej. Niemniej, w tej grupie pacjentów stwierdza się niekorzystne przesunięcia cholesterolu w obrębie poszczególnych lipoprotein osocza. Pomimo prawidłowego stężenia cholesterolu w surowicy, jego stężenie w VLDL wyraźnie wzrasta, a w HDL ulega wyraźnemu obniżeniu. Nie jest wykluczonym, że w populacji pacjentów z PNN właśnie jakościowe zmiany w obrębie lipoprotein osocza decydują o skali i czasie rozwoju powikłań wynikających z towarzyszących zaburzeń gospodarki lipidowej.

Podobnie jak w populacji ogólnej, hiperlipidemia obecna u pacjentów z PNN jest zjawiskiem ze wszech miar niekorzystnym. Jest faktem udokumentowanym, iż nadmiar lipidów w surowicy działa nefrotoksycznie i sprzyja progresji toczącej się choroby nerek. Istnieją przynajmniej dwa dobrze poznane mechanizmy, w następstwie których hiperlipidemia wywołuje swoje niekorzystne działania w obrębie nerek. Pierwszy polega na bezpośrednim oddziaływaniu krążących lipidów na komórki i macierz mezangium, co prowadzi do ich rozplemienia, a następnie niszczenia struktur kłębuszka nerkowego. Jedną z pierwszych prac wskazujących na nefrotoksyczność lipidów opublikował Moorhead w 1982 roku [6]. Uważał on, iż cząstki lipidów uszkadzają nie tylko kłębuszki, ale przede wszystkim prowadzą do zmian cewkowo-śródmiąższowych. Jego poglądy znalazły potwierdzenie także w pracach innych autorów [7,8]. Badania eksperymentalne dowiodły, że lipoproteiny dodane do hodowli linii komórkowych mezangium prowadzą do wzmożenia ich proliferacji, nadmiernej produkcji cytokin (np. IL-2, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1), a także wzrostu stężenia czynników stymulujących migrację



monocytów (ICAM-1, MCP-1) [9,10]. W efekcie prowadzi to do rozwoju miejscowych procesów zapalnych, włóknienia śródmiąższu, szkliwienia kłębuszków nerkowych i progresji choroby. Drugi mechanizm jest związany z nadmierną filtracją krążących lipidów w obrębie kłębuszka nerkowego i co za tym idzie zwiększoną ich reabsorpcją przez komórki cewki bliższej nefronu. W następstwie tego procesu komórki te ulegają degradacji, uwalniając cytokiny (np. PDGF, TGF- $\beta$ ) o silnych właściwościach chemotaktycznych dla fibroblastów, które są odpowiedzialne za postępujące włóknienie śródmiąższu. Rozważając jednakże wpływ hiperlipidemii na funkcję nerek, nie można nie podkreślić faktu, iż w populacji ogólnej obecność zaburzeń lipidowych jest powszechna, natomiast choroba nerek rozwija się tylko u niektórych. Przemawia to za koniecznością współistnienia jeszcze innych czynników, niezbędnych do tego, aby wywołać i/lub nasilić zależne od hiperlipidemii uszkodzenie nerek. Takim czynnikiem może być na przykład nadciśnienie tętnicze, jednak wydaje się, że efekt nefrotoksyczny hiperlipidemii ujawnia się przede wszystkim u osób z istniejącą już nefropatią i zależnymi od niej uwarunkowaniami (stres oksydacyjny, przewlekły stan zapalny) [11].

Najbardziej widocznym aspektem niekorzystnego oddziaływania zaburzeń lipidowych u pacjentów z PNN jest ich wpływ na proces miażdżycy naczyń. Choroby układu sercowo-naczyniowego są bezsprzecznie główną i podstawową przyczyną zgonów pacjentów z PNN, i to zarówno tych leczonych zachowawczo, jak i tych leczonych nerkozastępczo. W populacji ogólnej jest podobnie, jednak u pacjentów z PNN procesy te nabierają gwałtownego przyspieszenia i przebiegają wielokrotnie szybciej. Dzieje się tak, ponieważ u pacjentów z PNN obok tzw. klasycznych czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego (hiperlipidemia, nadciśnienie), występuje szereg czynników w istotnym stopniu zwiększających to ryzyko, a nie należących do tej grupy. Takimi czynnikami są między innymi niedożywienie, przewlekły stan zapalny, stres oksydacyjny, nieprawidłowe przemiany lipidów i węglowodanów [12]. Badania kliniczne dowodzą, iż skuteczne leczenie hipolipemizujące (statyny, fibraty) spowalnia postęp zmian naczyniowych i poprawia rokowanie w tej grupie pacjentów [13]. Ale korzystne efekty podawania np. statyn w tej grupie chorych nie muszą wynikać li tylko z obniżenia stężenia cholesterolu i triglicerydów, ale być może przede wszystkim z ich działania plejotropowego, w tym zwłaszcza przeciwzapalnego.

Pochodzenie lipidów jest w organizmie ludzkim dwojakie. Są one dostarczane z pokarmem lub syntetyzowane endogennie. W następstwie przemian w przewodzie pokarmowym triglicerydy, estry cholesterolu i fosfolipidy wraz z odpowiednimi apolipoproteinami (Apo-B 48, Apo-A I, Apo-A II) tworzą chylomikrony, które układem naczyń limfatycznych przedostają się

do krwi. Tam, zawarte w chylomikronach triglicerydy podlegają hydrolizie pod wpływem lipazy lipoproteinowej (LPL), która znajduje się na powierzchni śródbłonka naczyniowego. Powstałe tą drogą kwasy tłuszczowe są albo odkładane w tkance tłuszczowej w postaci triglicerydów albo zużywane jako źródło energii. Natomiast chylomikrony ulegają przekształceniu w chylomikrony resztkowe, które są poprzez receptor LRP wychwytywane przez wątrobę. Zawarty w nich cholesterol może być włączony w przemiany cholesterolu endogennego, magazynowany w postaci estrów lub wydalany z żółcią.

Ponad połowa wewnątrzustrojowego cholesterolu jest syntetyzowana endogennie, a proces ten, choć najintensywniej zachodzi w wątrobie, skórze i jelitach, to teoretycznie może przebiegać w każdym narządzie. Głównym substratem dla syntezy cholesterolu jest acetylo-CoA, powstały z pirogronianu (produkt glikolizy) i/lub degradacji kwasów tłuszczowych. Kluczowym etapem biosyntezy cholesterolu jest reakcja katalizowana przez reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (reduktaza HMG-CoA), w wyniku której powstaje kwas mewalonowy. Liczne badania pokazują, że właśnie na tym etapie skupiają się mechanizmy regulujące szybkość procesu cholesterologenezy. Czynniki, które zwiększają lub zmniejszają aktywność reduktazy HMG-CoA, wpływają jednocześnie na aktywność całego procesu biosyntezy cholesterolu. Zsyntetyzowany tą drogą cholesterol, w części ulega wydaleniu z żółcią w formie wolnej lub w formie kwasów tłuszczowych, których jest prekursorem, a w większości jest wbudowywany do cząsteczek VLDL, z którymi dostaje się do krwiobiegu.

Endogenna synteza triglicerydów zachodzi najintensywniej w wątrobie i w tkance tłuszczowej, a podstawowym substratem dla ich syntezy jest glukoza, będąca głównym źródłem acetyl-CoA. Liczne badania wskazują, iż przede wszystkim aktywność dwóch enzymów lipogennych decyduje o szybkości zachodzącej lipogenezy. Pierwszym jest karboksylaza acetylo-CoA (ACC), posiadająca dwie izoformy: ACC<sub>1</sub> obecną głównie w tkankach lipogennych (wątroba, tkanka tłuszczowa) oraz ACC<sub>2</sub> obecną głównie w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych. Enzym ten katalizuje reakcję, w wyniku której powstają cząsteczki malonylo-CoA, wykorzystywane w kolejnym etapie lipogenezy do produkcji kwasu palmitynowego. Etap ten jest katalizowany przez syntazę kwasów tłuszczowych (FAS), która jest drugim, kluczowym enzymem lipogenezy, podlegającym licznym mechanizmom regulacyjnym, determinującym szybkość tego procesu. Zsyntetyzowane cząsteczki kwasu palmitynowego ulegają następnie procesowi elongacji, a powstałe tą drogą kwasy tłuszczowe są wykorzystywane do syntezy triglicerydów i fosfolipidów.

Powstałe w wyniku biosyntezy triglicerydy i cholesterol razem z fosfolipidami i apolipoproteinami (Apo-B 100, Apo-E) tworzą cząsteczki VLDL i w tej postaci ulegają sekrecji do krwiobiegu. Część VLDL jest wychwytywana bezpośrednio przez receptory VLDL znajdujące się w tkankach obwodowych. Większość natomiast podlega dalszym przemianom. Zawarte w VLDL triglicerydy są degradowane pod wpływem LPL, a także lipazy wątrobowej (LH), co prowadzi do przekształcania się VLDL w IDL (zwane także resztkowymi VLDL), a następnie LDL. Cząsteczki LDL są głównym nośnikiem cholesterolu do tkanek „docelowych”. Ponad połowa krążących LDL jest wychwytywana przez wątrobę, a zawarty w nich cholesterol może być włączony w przemiany cholesterolu endogennego, magazynowany w postaci estrów lub wydalany z żółcią. Pozostała część krążących LDL jest wychwytywana przez komórki tkanek obwodowych posiadających receptory dla LDL (np. fibroblasty, miocyty). Zawarty w nich cholesterol jest wykorzystywany m.in. jako składnik błon komórkowych. Jego nadmiar jest natomiast transportowany zwrótnie do wątroby jako składnik HDL. Sprawność tego procesu jest w znacznej mierze zależna od aktywności acylotransferazy lecytyna-cholesterol (LCAT), enzymu odpowiedzialnego za estryfikację wolnego cholesterolu. Niska aktywność tego enzymu uniemożliwia prawidłowe dojrzewanie HDL i upośledza ich zwrótny transfer do wątroby.

Przemiany lipidów w organizmie ludzkim podlegają określonym procesom regulacji. Istnieje szereg czynników, które mogą wpływać na ekspresję genów kluczowych enzymów lipogenezy (ACC, FAS) i cholesterologenezy (reduktaza HMG-CoA), prowadząc do zmiany aktywności tych procesów w zależności od potrzeb organizmu. Ważnym mechanizmem regulacji jest regulacja pokarmowa [14,15]. Głodzenie obniża ekspresję genu reduktazy HMG-CoA, a także ACC i FAS, prowadząc do spadku aktywności wymienionych enzymów i zahamowania procesu syntezy zarówno cholesterolu, jak i triglicerydów. Natomiast karmienie, zwłaszcza dietą bogatą w węglowodanową wywołuje efekt przeciwny. Podobną rolę w tych procesach odgrywa regulacja hormonalna. Ekspresja genów i aktywność enzymatyczna kluczowych enzymów lipogenezy i cholesterologenezy rośnie pod wpływem działania insuliny i hormonów tarczycy, a obniża się w następstwie działania glukagonu, czy katecholamin [14,16]. Ponieważ zarówno regulacja pokarmowa, jak i regulacja hormonalna odbywają się na poziomie transkrypcji genów, mają one przez to charakter długofalowy i adaptacyjny. Ale wymienione wyżej czynniki hormonalne mają także zdolność niemal natychmiastowego wpływu na aktywność kluczowych enzymów biosyntezy cholesterolu i triglicerydów. Dzieje się tak, ponieważ ACC, podobnie jak i reduktaza HMG-CoA podlega tzw. regulacji szybkiej,

krótkoterminowej, polegającej na fosforylacji i defosforylacji cząsteczki enzymu, a przez to szybkiej zmianie jego aktywności [14,16]. Kinaza białkowa aktywowana AMP (AMPK) pod wpływem różnych czynników (hormony, cytokiny, stany zapalne, wysiłek fizyczny, stres) katalizuje fosforylację enzymu, który w tej formie jest nieaktywny. Defosforylacja enzymu (aktywacja) wymaga hydrolitycznego odszczepienia fosforanu przy pomocy fosfataz fosfoproteinowych. Ponadto, aktywność kluczowych enzymów syntezy triglicerydów i cholesterolu podlega także regulacji allosterycznej, w której decydującą rolę odgrywa stężenie niektórych substratów i produktów związanych z tymi procesami. I tak aktywność reduktazy HMG-CoA obniża się, gdy rośnie wewnątrzkomórkowe stężenie mewalonianu. Natomiast aktywność ACC rośnie pod wpływem wyższego stężenia cytrynianu, który (podobnie jak fosforany) promuje proces polimeryzacji struktury enzymu, a obniża ją natomiast wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, który to destabilizuje proces polimeryzacji cząsteczki enzymu prowadząc do powstawania licznych protomerów.

Jednak badania ostatnich lat pokazały, że podstawową rolę w regulacji biosyntezy cholesterolu i triglicerydów odgrywają specyficzne wewnątrzkomórkowe białka – czynniki transkrypcyjne, które kontrolują transkrypcję genów enzymów związanych z tymi procesami [17]. Należą one do rodziny białek określanych mianem SREBP (z *ang.*: *sterol regulatory element binding protein*). Ich decydująca rola w regulacji metabolizmu lipidów wynika z ich bezpośredniego wpływu na ekspresję genów wielu enzymów związanych z syntezą cholesterolu, kwasów tłuszczowych, triglicerydów i fosfolipidów. Dotychczas zidentyfikowano trzy główne czynniki transkrypcyjne z tej grupy: SREBP-1a, SREBP-1c oraz SREBP-2. Czynniki SREBP-1a jest najbardziej aktywny biologicznie, jednakże ulega ekspresji głównie w śledzionie i jelicie (narządy o dużej zdolności proliferacyjnej komórek) oraz w hodowlach linii komórkowych. Natomiast SREBP-1c oraz SREBP-2 ulegają ekspresji w większości tkanek i narządów, a zwłaszcza w tkankach lipogennych, czyli wątrobie i tkance tłuszczowej. Wszystkie czynniki transkrypcyjne należące do rodziny SREBP są syntetyzowane w formie nieaktywnych prekursorów, które są ściśle związane z błonami retikulum endoplazmatycznego i których regulacja odbywa się zarówno na etapie transkrypcji, jak i posttranslacyjnej modyfikacji. Regulacja ekspresji genów SREBP-1 oraz SREBP-2 odbywa się głównie poprzez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia cholesterolu (w rzeczywistości - zmiany stężenia oksysteroli, które są produktami hydroksylacji cholesterolu). Niskie stężenie cholesterolu w komórce stymuluje syntezę ich nieaktywnych, mikrosomalnych prekursorów, które będąc związanymi z białkiem aktywującym proteolizę (SCAP – z *ang.* *cleavage activating protein*)

są transportowane do aparatu Golgiego. Tam odbywa się posttranslacyjna modyfikacja. Białko SCAP aktywuje proces częściowej, dwuetapowej proteolizy SREBP, katalizowanej przez specyficzne proteazy (S1P i S2P), którego efektem jest pełna aktywacja czynników transkrypcyjnych. W kolejnym etapie ulegają one translokacji do jądra komórkowego, gdzie łączą się z określonymi sekwencjami DNA docelowych genów, kontrolując ich aktywność transkrypcyjną. W przypadku SREBP-2 są to przede wszystkim geny kodujące enzymy cholesterologenne, w tym zwłaszcza reduktazę HMG-CoA. Gdy w komórce jest wysokie stężenie cholesterolu, to wówczas związane z SREBP białko aktywujące proteolizę (SCAP) tworzy kompleks z innym białkiem znajdującym się w błonie retikulum endoplazmatycznego zwanym INSIG (z ang. *insulin induced gene*), co uniemożliwia translokację SREBP do aparatu Golgiego i ich aktywację. Mechanizm regulacji ekspresji genu SREBP-1 wygląda podobnie, jednakże to insulina i glukagon, a nie stężenie wewnątrzkomórkowego cholesterolu odgrywają tu rolę decydującą. Badania dowiodły, że insulina powoduje wzrost ekspresji genu SREBP-1, natomiast glukagon poprzez cAMP ekspresję tę obniża. Shimomura *i wsp.* wykazali, że ilość mRNA SREBP-1c w wątrobie szczurów wyraźnie się obniża po podaniu streptozocyny, która uniemożliwia sekrecję insuliny i rośnie, gdy insulinę podano ponownie. Przypuszcza się, iż insulina kontroluje ekspresję genu białka INSIG i przez to wpływa na transkrypcję i aktywację SREBP-1c, który w przeciwieństwie do SREBP-2, po translokacji do jądra komórkowego przyłącza się do sekwencji DNA kodujących enzymy biorące udział przede wszystkim w syntezie kwasów tłuszczowych i metabolizmie triglicerydów (w tym liaza cytrynianowa ATP-zależna, ACC, FAS, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego dostarczające NADPH). Biorąc pod uwagę istotną rolę, jaką insulina i glukagon odgrywają także w szybkiej regulacji aktywności ACC w mechanizmie fosforylacji/defosforylacji, nie sposób oprzeć się stwierdzeniu, że rola tych dwóch hormonów w regulacji metabolizmu lipidów jest olbrzymia.

Szczegółowe badania nad etiopatogenezą hipertriglicydemii towarzyszącej PNN przebiegającej bez białkomoczu prowadzone są od prawie 40 lat, kiedy to Bagdade *i wsp.* po raz pierwszy opisali hipertriglicydemie i uznali ją za metaboliczną konsekwencję choroby [18]. Powszechnie zakłada się, że możliwe są trzy scenariusze zdarzeń prowadzące do wzrostu stężenia triglicerydów we krwi pacjentów z PNN. Może to być następstwo wzmożonej ich biosyntezy, upośledzonej degradacji albo obu tych procesów jednocześnie. Przy obecnym stanie wiedzy wydaje się, iż oba te procesy rzeczywiście ze sobą współistnieją. Należy jednak podkreślić, że o ile dowody na tezę, że degradacja triglicerydów w PNN jest istotnie upośledzona

były zbierane latami można ją obecnie uznać za dobrze udokumentowaną, o tyle zakres prac nad biosyntezą triglicerydów w PNN i jej rolą w rozwoju HTG towarzyszącej tej chorobie wydaje się być niewystarczający. Można nawet pokusić się o stwierdzenie, że głoszenie poglądów o istotnej roli jaką odgrywa lipogeneza w rozwoju HTG u pacjentów z PNN jest co najmniej kontrowersyjne. Jak już wcześniej wspomniano, głównymi enzymami odpowiedzialnymi za katabolizm triglicerydów są LPL i LH. Już ponad 20 lat temu stwierdzono ich obniżoną aktywność w surowicy pacjentów z PNN, a w późniejszych latach wynik ten został wielokrotnie potwierdzony i nie budzi obecnie najmniejszych wątpliwości. Co więcej, aktywność LPL jest obniżona również w tkankach nielipogennych np. mięśniach, co oznacza, iż wpływ PNN na aktywność LPL jest niespecyficzny. Istnieje nawet pogląd, iż niska aktywność LPL w mięśniach chorych z PNN jest częściowo odpowiedzialna za szybką męczliwość i niską tolerancję wysiłku tych pacjentów, ponieważ zmniejszony jest dowóz głównego źródła energetycznego dla mięśni, czyli wolnych kwasów tłuszczowych. Badania kliniczne i doświadczalne dowiodły, że istnieją dwa główne powody niskiej aktywności LPL i LH w warunkach PNN. Pierwszym jest obecność wysokiego stężenia czynników hamujących aktywność LPL, a także LH. Należy do nich między innymi apolipoproteina Apo-C III, która jest powszechnie uznanym inhibitorem LPL. Jej stężenie w osoczu chorych z PNN jest wysokie [3]. Wysoki jest również stosunek Apo-C III/Apo-C II [3]. Innym inhibitorem aktywności LPL oraz LH obecnym w osoczu chorych z PNN jest cząsteczka składająca się w 97% z Apo-A I (free Apo-A I) i w 3% z fosfolipidów. Jest to tzw. pre $\beta$ -HDL inhibitor i należy on do pozalipoproteinowej frakcji osocza [19]. Jednak podstawowym powodem niskiej aktywności LPL i LH w warunkach PNN jest ich obniżona synteza. Badania doświadczalne potwierdziły niską ekspresję genów tych enzymów [20,21]. I najpewniej główną tego przyczyną jest towarzysząca PNN wtórna nadczynność przytarczyc. Już pod koniec lat 70-tych spostrzeżono, że paratyreidektomia wykonana u zwierząt z nadczynnością przytarczyc częściowo normalizowała towarzyszące jej zaburzenia lipidowe. Zakładano wówczas, iż parathormon może bezpośrednio redukować syntezę LPL i LH, może interferować z ich aktywatorami, może oddziaływać jako ich inhibitor i/lub stymulować syntezę tych inhibitorów. W kolejnych latach najpierw wykazano, że paratyreidektomia wykonana u zwierząt z PNN i wtórną nadczynnością przytarczyc przywraca prawidłową poheparynową aktywność LPL [22], a potem dowiedziono, że zabieg taki przywraca także prawidłową ekspresję genów LPL [23] i LH [21], normalizując jednocześnie ich aktywność. Ale co niezmiernie ciekawe, normalizacja aktywności LPL i LH nie normalizowała w pełni stężenia triglicerydów. A to oznacza, że muszą istnieć i inne czynniki prowadzące do HTG. Takim czynnikiem może być obniżenie ekspresji genu receptora

VLDL również obserwowane w badaniach eksperymentalnych prowadzonych u zwierząt z PNN [24]. Jest to o tyle prawdopodobne, że w tym przypadku paratyreidektomia nie normalizuje ekspresji genu tego receptora [24].

Jak już wcześniej wspomniałem, zakres prac dotyczących roli biosyntezy triglicerydów w rozwoju HTG towarzyszącej PNN wydaje się być niewystarczający. W rzeczywistości badania nad tą problematyką zostały wstrzymane w 1978 roku, kiedy to Bagdade *i wsp.* opublikowali rezultaty swoich doświadczeń, z których wynikało, że aktywność ACC w wątrobie szczurów z PNN jest obniżona, a sekrecja triglicerydów z wątroby nie jest zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną [25]. Na tej podstawie postawiono tezę, iż proces biosyntezy triglicerydów nie przyczynia się do rozwoju HTG obserwowanej u pacjentów z PNN. I chociaż wcześniej pojawiły się publikacje, w których stawiano wnioski odmienne, to jednak argumenty przedstawione w pracy Bagdade *i wsp.* okazały się trudne do odparcia. W pracy doktorskiej, przedstawiłem dane, które w części przywracały zasadność ponownego zajęcia się tym problemem. Z przeprowadzonych wówczas doświadczeń wynikało, iż aktywność wielu enzymów biorących udział w lipogenezie (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego dostarczające NADPH) jest w wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów z PNN podwyższona. Należy jednak podkreślić, iż w przytoczonej pracy nie oznaczałem aktywności ACC, a aktywność FAS i w wątrobie i w tkance tłuszczowej, choć wykazywała tendencje wzrostową w grupie zwierząt z PNN, to w porównaniu z grupą kontrolną obserwowana różnica nie osiągnęła wartości statystycznie znamiennej. Niemniej, podjąłem decyzję o kontynuacji tych badań. W niniejszej rozprawie habilitacyjnej przedstawiam cykl własnych publikacji, w których przedstawiłem wyniki doświadczeń określających przede wszystkim ekspresję genów kluczowych enzymów lipogennych (ACC, FAS) i cholesterologennych (reduktaza HMG-CoA) zarówno w wątrobie, jak i tkance tłuszczowej szczurów z PNN oraz ekspresję genów czynników transkrypcyjnych (SREBP), kontrolujących transkrypcję genów enzymów związanych z lipogenezą. Przedstawiłem również ekspresję genów innych enzymów biorących udział w tych procesach (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego). W badaniach prowadzonych *in vivo* porównałem szybkość sekrecji triglicerydów z wątroby, a także szybkość cholesterologenezy w tym narządzie przebiegających u zwierząt z PNN i zwierząt kontrolnych. Dodatkowo określiłem również natężenie przemian glukozy w tkance tłuszczowej szczurów z PNN oznaczając między innymi ekspresję genu translokatora glukozy *GLUT4*. Wyniki tych doświadczeń dowodzą, iż w warunkach PNN przemiany glukozy ulegają intensyfikacji, a biosynteza trigli-

cerydów i cholesterolu jest zwiększona, co niewątpliwie przyczynia się do rozwoju HTG i HCH obserwowanej w tej chorobie. W dyskusji przedstawiłem także przypuszczalne powody, dla których Bagdade *i wsp.* uzyskali wyniki, które w swej istocie nie korespondują z wynikami przedstawionymi przeze mnie.



## 2. CEL BADAŃ

Celem przeprowadzonych badań było określenie roli, jaką odgrywa lipogeneza i cholesterologeneza w rozwoju hiperlipidemii towarzyszącej doświadczalnej przewlekłej niewydolności nerek ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji genów enzymów biorących udział w tych procesach. Przed rozpoczęciem badań postawiłem sobie następujące pytania:

1. Czy w wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek wzrasta ekspresja genów enzymów lipogenicznych i cholesterologenicznych?
2. Czy w warunkach *in vivo* u szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek wzrasta szybkość sekrecji triglicerydów z wątroby i produkcji cholesterolu w wątrobie oraz szybkość lipogenezy w tkance tłuszczowej?
3. Czy w tkance tłuszczowej szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek wzrasta ekspresja genu czynnika transkrypcyjnego SREBP-1, jakie czynniki mogą na tę ekspresję wpływać i jaka jest jego potencjalna rola w rozwoju hipertriglicydemii?
4. Czy w adipocycie szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek wzrasta ekspresja genu translokatora glukozy *GLUT4* i jaka jest aktywność przemian glukozy w tkance tłuszczowej tych zwierząt?

### 3. WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

#### 3.1. Ekspresja genu reduktazy HMG-CoA oraz szybkość zachodzącej *in vivo* cholesterologenezy w wątrobie szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek

W pracy nr 1 przedstawiłem wyniki doświadczeń dotyczących przebiegu procesu biosyntezy cholesterolu w wątrobie szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN). Badania dotyczyły zarówno ekspresji genu kluczowego dla tego procesu enzymu jakim jest reduktaza HMG-CoA, jak i szybkości *in vivo* zachodzącej w tym narządzie cholesterologenezy. Wyniki tych badań są spójne i jednoznaczne. Ekspresja genu reduktazy HMG-CoA (mierzona na poziomie mRNA i aktywności enzymatycznej) jest w wątrobie szczurów z PNN wyraźnie wyższa w porównaniu z ekspresją tego genu w wątrobie szczurów grupy kontrolnej. Także szybkość biosyntezy cholesterolu *in vivo* mierzona szybkością inkorporacji wody znakowanej trytem, okazała się być wyższa w wątrobie szczurów z PNN, aniżeli w grupie kontrolnej. Potwierdza to słuszność twierdzenia, że cholesterologeneza przyczynia się do rozwoju HCH obserwowanej w tej chorobie. Jest to pierwsze opracowanie, w którym udało się wykazać zwiększoną ekspresję genu reduktazy HMG-CoA w niewydolności nerek i pierwsze, w którym ocenie podlegałaby szybkość zachodzącej *in vivo* cholesterologenezy. Można natomiast znaleźć pojedyncze wcześniejsze publikacje, w których w wątrobie szczurów z PNN oznaczano aktywność reduktazy HMG-CoA i w których podjęto próbę oceny ekspresji genu tego enzymu. Po raz pierwszy tym problemem zajęli się Heuck *i wsp.* W 1978 roku w pracy dotyczącej hiperlipoproteinemii w doświadczalnej, przewlekłej niewydolności nerek wykazali nieznaczny spadek aktywności tego enzymu w wątrobie szczurów z PNN [26]. Ale już w pracach z lat 90-tych uzyskano odmienne rezultaty. Z pracy Pandak'a *i wsp.* wynika, iż aktywność tego kluczowego dla syntezy cholesterolu enzymu wzrosła, lecz nie towarzyszył temu wzrost poziomu mRNA tego enzymu [27]. Oznaczałoby to, że enzym ten podlega pewnym, istotnym mechanizmom regulacji na etapie posttranskrypcyjnym. Natomiast Liang *i wsp.* opublikowali wyniki swoich doświadczeń, w których nie obserwowali zmian ani w poziomie mRNA, ani też w aktywności reduktazy HMG-CoA [28]. Przedstawione wyniki badań innych autorów dotyczące ekspresji genu reduktazy HMG-CoA i jej aktywności w wątrobie szczurów z PNN są w dominującej części sprzeczne z zaprezentowanymi przeze mnie w pracy nr 1. Jednakże warto w tym miejscu podkreślić, iż w warunkach PNN wykazaliśmy nie tylko wzrost ekspresji genu reduktazy HMG-CoA, ale także wzrost ekspresji genów innych enzymów biorących udział w cholesterologenezie, a których zadaniem jest między innymi dostarczanie

NADPH niezbędnego dla tego procesu (enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego). Co więcej, w kolejnych latach uzyskany przeze mnie wynik dotyczący wzrostu ekspresji genu reduktazy HMG-CoA w wątrobie został kilkakrotnie potwierdzony, a Chmielewski *i wsp.* dowiedli także, iż zwiększona ekspresja genu tego enzymu w wątrobie wiąże się ze zwiększoną ekspresją czynnika transkrypcyjnego SREBP-2 [29]. Jak wspomniałem we wstępie, SREBP-2 kontroluje transkrypcję genów kodujących syntezę enzymów biorących udział w cholesterologenezie. Dlatego też, na podstawie całości dostępnego materiału można jednoznacznie wnioskować, iż proces biosyntezy cholesterolu jest w wątrobie szczurów z PNN nasilony i przyczynia się do HCH towarzyszącej tej chorobie.

Warto jednak w tym miejscu przypomnieć, że HCH występuje u prawie 100% szczurów z PNN, wobec jedynie 20% pacjentów z tą chorobą. Pomimo, że model szczurzy PNN jest powszechnie akceptowany w badaniach nad etiopatogenezą zaburzeń lipidowych, to jednak zwłaszcza w aspekcie dotyczącym zaburzeń metabolizmu cholesterolu, nie można sobie pozwolić na proste przenoszenie wypływających z tych badań wniosków do patologii ludzkiej.

### **3.2. Ekspresja genów karboksylazy acetylo-CoA, syntazy kwasów tłuszczowych oraz innych enzymów biorących udział w syntezie triglicerydów w wątrobie i białej tkance tłuszczowej szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek. Badania *in vivo*: sekrecja triglicerydów z wątroby oraz szybkość lipogenezy w białej tkance tłuszczowej**

W pracach nr 2 – 6 przedstawiłem wyniki doświadczeń określających przebieg procesu biosyntezy triglicerydów w wątrobie i białej tkance tłuszczowej (WAT) szczurów z PNN. Badania dotyczyły ekspresji genów kluczowych dla tego procesu enzymów jakimi są FAS i ACC, sekrecji triglicerydów z wątroby oraz szybkości procesu lipogenezy w WAT w warunkach *in vivo*. Załączony cykl publikacji jest jak dotychczas jedynym, w którym poddano ocenie ekspresję genów enzymów biorących udział w lipogenezie w warunkach PNN. Wyniki tych badań potwierdzają wcześniej wysuniętą tezę, iż produkcja triglicerydów w wątrobie i w WAT jest u szczurów z PNN zwiększona i najpewniej przyczynia się w części do obserwowanej w przebiegu tej choroby HTG. W badaniach nad aktywnością lipogenną WAT w warunkach PNN dowiodłem, iż ekspresja genów ACC i FAS (na poziomie mRNA, ilości białka oraz aktywności enzymatycznej) jest zwiększona i wzrost ten jest niezależny od ilości spożytego pokarmu. W tych samych warunkach rośnie ekspresja genów (na poziomie mRNA i aktywności enzymatycznej) innych enzymów biorących istotny udział w syntezie kwasów tłuszczowych i triglicerydów (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy,

dehydrogenazy cyklu pentozowego). Ponadto, szybkość biosyntezy triglicerydów *in vivo* mierzona szybkością inkorporacji wody znakowanej trytem, okazała się być wyższa w WAT szczurów z PNN, aniżeli w grupie kontrolnej. I co najważniejsze, towarzyszył temu także znaczny wzrost stężenia triglicerydów w surowicy badanych zwierząt. Przedstawione wyniki pokazują dużą aktywność lipogenną WAT szczurów z PNN. Ale zsyntetyzowane tam triglicerydy nie podlegają sekrecji. Nie ma więc dowodów na to, że zwiększona aktywność lipogenna tej tkanki prowadzi do HTG. Istnieje jednak spójny, a w warunkach PNN bardzo prawdopodobny mechanizm, w następstwie którego nadmierna synteza triglicerydów w WAT może przyczyniać się do rozwoju HTG. Stała nadprodukcja triglicerydów w tkance tłuszczowej powinna skutkować otyłością. Jednak, wraz z postępem choroby masa ciała zwierząt z PNN systematycznie się zmniejsza, a w zaawansowanym stadium choroby ilość ich tkanki tłuszczowej jest znikoma. Może to oznaczać, że w WAT szczurów z PNN triglicerydy nie tylko są w nadmiarze produkowane, ale równocześnie podlegają one intensywnej hydrolizie uwalniając do krwiobiegu znaczne ilości wolnych kwasów tłuszczowych. Uwolnione z WAT kwasy tłuszczowe mogą być następnie wychwytywane przez wątrobę i z pominięciem zachodzącej w tym narządzie endogennej biosyntezy kwasów tłuszczowych wykorzystywane do produkcji triglicerydów. To jednak tylko hipoteza, która może być uzupełnieniem zaprezentowanych wyników. Wyniki te bowiem pokazują dużą aktywność lipogenną WAT w PNN, ale nie dowodzą, że prowadzi ona do HTG. Udowodnienie tej hipotezy stanowi niewątpliwie ciekawy kierunek dalszych badań nad przyczynami i mechanizmami zaburzonego metabolizmu lipidów w niewydolności nerek.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań w wątrobie również wskazują na zwiększoną aktywność lipogenną tego narządu w warunkach PNN. W załączonych pracach dowiodłem zwiększonej ekspresji genów ACC (na poziomie mRNA i ilości białka) oraz FAS (na poziomie mRNA, ilości białka i aktywności enzymatycznej) w wątrobie szczurów z tą chorobą. Dowiodłem również zwiększonej ekspresji genów innych enzymów biorących udział w lipogenezie (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego). Tym większym zaskoczeniem był brak istotnego wzrostu aktywności enzymatycznej ACC. Był to wynik, który trudno było w racjonalny sposób zinterpretować, zwłaszcza, że uzyskałem wiele dowodów świadczących o zwiększonej aktywności lipogennej i wątroby i tkanki tłuszczowej u szczurów z PNN. W warunkach tych notuje się zwiększoną ekspresję genów (na poziomie mRNA, ilości białka i aktywności enzymatycznej) praktycznie wszystkich enzymów zaangażowanych w proces lipogenezy i tylko w przypadku aktywności

enzymatycznej ACC w wątrobie (ale już nie w WAT) wynik okazuje się być negatywny. W tym miejscu należy wspomnieć, że w zakresie pomiaru aktywności enzymatycznej ACC w wątrobie szczurów z PNN wynik ten był zbieżny z wynikiem uzyskanym przed laty przez Bagdade *i wsp.* (autor ten nie badał ekspresji genu ACC w wątrobie) [25]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń uznał on, iż biosynteza triglicerydów w wątrobie w PNN nie jest zwiększona i tym samym nie przyczynia się ona do rozwoju HTG obserwowanej w przebiegu tej choroby. Wobec głębokiego przekonania o nieprawdziwości tej tezy, zmierzyłem szybkość sekrecji triglicerydów z wątroby w warunkach *in vivo*. I okazało się, że w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych po zabiegu pozorowanym, sekrecja triglicerydów z wątroby szczurów z PNN jest znamienne zwiększona. Jak wytłumaczyć brak zmian w aktywności enzymatycznej ACC, przy jednocześnie zwiększonej ekspresji genu tego enzymu (na poziomie mRNA i ilości białka) i zwiększonej sekrecji triglicerydów z wątroby? Oczywiście teoretycznie można sobie wyobrazić, że istnieje jakaś, szeroko pojęta toksyna mocznicowa, która wybiórczo hamuje aktywność ACC w wątrobie. Można również założyć, że zwiększona sekrecja triglicerydów z wątroby to efekt ich nadprodukcji, ale z wykorzystaniem zwiększonego napływu wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych z tkanki tłuszczowej. Jednak dogłębna analiza zebranego materiału i świadomość mechanizmów regulacji ACC, skłoniły mnie do wysnucia innej hipotezy. Zakładała ona, iż wbrew uzyskanym wynikom, w rzeczywistości aktywność enzymatyczna ACC w wątrobie wzrasta, jednak w trakcie przygotowywania ekstraktów tkankowych do pomiarów, enzym ten ulega częściowej proteolizie, co doprowadza do spadku jego aktywności. Proces ten mógłby następować pod wpływem niespecyficznych proteaz, wysoce aktywnych w wątrobie, a praktycznie nieaktywnych w WAT. Prawdziwości tej hipotezy dowiodłem w pracy nr 6. Wynika z niej, że częściowa proteoliza ACC nie występuje jedynie w tych przypadkach, w których do buforu dodano inhibitory proteaz, a otrzymany ekstrakt tkankowy zamrożono natychmiast po przygotowaniu. Można przypuszczać, że z tych samych powodów aktywność ACC nie wzrosła w pracy Bagdade *i wsp.* Dopiero badania nad ekspresją genu ACC poddały w wątpliwość uzyskany przez niego wynik i nakazały ponownie się zastanowić nad prawdziwością dokonanych pomiarów aktywności enzymatycznej ACC uzyskiwanych w wątrobie. Po udanej próbie ustalenia przyczyn tej niespójności, możemy z całą stanowczością podtrzymać tezę, że biosynteza kwasów tłuszczowych i produkcja triglicerydów są w wątrobie szczurów z PNN wzmożone i przyczyniają się w części do rozwoju HTG obserwowanej w przebiegu tej choroby.

Tematem otwartym pozostaje kwestia, czy wnioski wypływające z obserwacji aktywności biosyntezy kwasów tłuszczowych i produkcji triglicerydów dokonanych na modelu szczurzym można przenieść wprost do patologii ludzkiej. O ile istnieje raczej powszechna akceptacja dla takiego postępowania w przypadku badań nad aktywnością lipogenną wątroby, o tyle w przypadku aktywności lipogennej tkanki tłuszczowej postępowanie takie wzbudza pewne kontrowersje. Aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej u szczura już w warunkach fizjologicznych w sposób istotny wpływa na przemiany lipidów. Natomiast według wielu badaczy, aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej człowieka w warunkach fizjologicznych nie odgrywa istotnej roli. Badania dowodzą bardzo niskiej ekspresji genów enzymów lipogennych w tej tkance. To niewątpliwie może być efekt wywołany dużą ilością tłuszczów zawartych w typowej diecie spożywanej przez człowieka. Jednak istnieją również badania pokazujące, że w określonych stanach klinicznych aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej u człowieka znacząco wzrasta. Takim stanem jest właśnie PNN. Berndt *i wsp.* wykazali nawet istnienie znamiennej korelacji pomiędzy stężeniem kreatyniny, a ekspresją genu FAS w tkance tłuszczowej [30]. Może jest to spowodowane dietą bogatą w węglowodany, którą zaleca się pacjentom z PNN. Może jest to efekt stanu zapalnego, który towarzyszy niewydolności nerek i prolipogennego działania określonych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-6, PDGF, IGF-1). Niemniej, aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej u człowieka może w niektórych stanach istotnie wzrastać i odgrywać taką samą rolę w przemianach lipidów, jaką tkanka ta odgrywa u szczura.

### **3.3. Aktywność przemian glukozy w warunkach PNN na przykładzie tkanki tłuszczowej. Ekspresja genu translokatora glukozy GLUT4**

W pracy nr 5 przedstawiłem wyniki doświadczeń określających aktywność przemian glukozy w WAT szczurów z PNN. Glukoza jest jednym z podstawowych źródeł acetylo-CoA, głównego substratu biosyntezy kwasów tłuszczowych i produkcji triglicerydów. W obliczu udowodnionej nadprodukcji triglicerydów w tkankach lipogennych, można więc było także się spodziewać intensyfikacji przemian glukozy w tych tkankach. Transport glukozy do komórek i tkanek podlega ściślejszej regulacji, a biorą w nim udział specyficzne białka translokatorowe zwane *GLUT*. Wychwyt glukozy w tkance tłuszczowej, zwłaszcza insulinozależny jest kontrolowany przez isoformę *GLUT4*. Prezentowane przeze mnie badania dotyczyły ekspresji genu translokatora *GLUT4*, wychwytu glukozy przez komórki tkanki tłuszczowej oraz szybkości jej przemiany do CO<sub>2</sub> (badania *in vitro*). Wyniki tych badań potwierdzają obserwacje innych autorów, że przemiany glukozy w tkance tłuszczowej w warunkach PNN są istotnie nasilone. W opracowaniu potwierdziłem, że zwiększony jest zarówno wychwyt glukozy przez

komórki tkanki tłuszczowej, jak i jej przemiana do CO<sub>2</sub>. Co więcej, ekspresja genu (na poziomie mRNA) translokatora *GLUT4* jest także zwiększona. Prezentowane wyniki badań nad aktywnością przemian glukozy w warunkach PNN stanowią uzupełnienie dotychczasowych badań nad przyczynami hiperlipidemii w PNN.

### **3.4. Czynniki odpowiedzialne za zwiększoną aktywność lipogenną i cholesterologenną w wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek. Ekspresja genu czynnika transkrypcyjnego SREBP-1**

W każdej z załączonych publikacji starałem się wskazać główne czynniki, które mogłyby być odpowiedzialne za uzyskane wyniki. Jest oczywistym, że zwiększona aktywność lipogenna i cholesterologenna wątroby i tkanki tłuszczowej prowadząca do hiperlipidemii w PNN nie jest efektem działania pojedynczego czynnika. Tych czynników jest wiele, często wzajemnie na siebie oddziałujących. Zmieniają one metabolizm lipidów wpływając zarówno na ich syntezę, jak i ich degradację.

Jak już wspomniałem we wstępie, podstawową rolę w regulacji procesów biosyntezy triglicerydów i cholesterolu odgrywają specyficzne wewnątrzkomórkowe białka – czynniki transkrypcyjne (SREBP), które kontrolują transkrypcję genów enzymów związanych z tymi procesami [17]. Mają one bezpośredni wpływ na ekspresję genów wielu enzymów związanych z syntezą cholesterolu, kwasów tłuszczowych, triglicerydów i fosfolipidów. W pracy nr 5 przedstawiłem wynik badań nad ekspresją genu czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 w tkance tłuszczowej szczurów z PNN. Jest to pierwsze opracowanie, w którym oceniono aktywność transkrypcyjną genu SREBP-1. Ekspresja tego genu (na poziomie mRNA i ilości białka) jest zwiększona w WAT szczurów z PNN. Jest to najpewniej główny powód zwiększonej ekspresji genów zarówno kluczowych (*ACC*, *FAS*), jak i pomocniczych (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego) enzymów biorących udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych i produkcji triglicerydów. Co więcej, dowiedziono niedawno, że również aktywność transkrypcyjna genu SREBP-2 jest zwiększona w wątrobie szczurów z PNN [29]. To z kolei może być podstawowy powód zwiększonej ekspresji kontrolowanych przez ten czynnik genów kodujących enzymy cholesterologenne, w tym reduktazy HMG-CoA. W ten sposób uzyskane wyniki wskazują przyczyny i w pełni uzasadniają obserwowaną zwiększoną aktywność lipogenną i cholesterologenną w PNN. Nie wiemy, co jest czynnikiem wywołującym nadprodukcję SREBP. Może być nim insulina. Jest to hormon, którego stężenie w warunkach PNN jest podwyższone. Dowiedziono, że insulina

zwiększa ekspresję genów enzymów lipogennych [31] i cholesterologennych [32], nasilając biosyntezę kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu. Może to być spowodowane zwiększoną syntezą SREBP. Istnieją publikacje dowodzące, że insulina zwiększa ekspresję genu SREBP-1c w wątrobie [33,34]. Ale istnieją również opracowania, w których wykazano, że stymulacja ekspresji genu FAS w adipocytach wywołana insuliną nie wiąże się ze wzrostem ekspresji genów czynników transkrypcyjnych [35]. Niezależnie jednak od tego, czy insulina zwiększa aktywność lipogenną i cholesterologenną wątroby i tkanki tłuszczowej poprzez białka SREBP, czy też w innym mechanizmie, jej potencjalna rola w rozwoju hiperlipidemii towarzyszącej PNN nie może zostać niedostrzeżona.

Nie tylko insulina może zwiększać ekspresję genu SREBP i poprzez ten mechanizm nasilać aktywność lipogenezy i cholesterologenezy w PNN. Podobnie oddziałują i inne hormony (androgeny, progesteron) [36,37], a nawet dieta bogatowęglowodanowa [34]. Szczególną uwagę należy jednak zwrócić na możliwy wpływ mediatorów stanu zapalnego i cytokin. PNN jest zespołem chorobowym, w którym utrzymuje się przewlekły stan zapalny z udokumentowanym wzrostem stężenia wielu substancji o udowodnionym, prozapalnym efekcie działania [38,39]. Wykazano, że w osoczu pacjentów z PNN utrzymuje się podwyższone stężenie między innymi TNF- $\alpha$ , czy IL-6 [38,39]. Faktem już powszechnie uznanym jest, że ten utrzymujący się przewlekle stan zapalny sprzyja zaburzeniom funkcji śródbłonna naczyniowego i jest czynnikiem współodpowiedzialnym za wysoką śmiertelność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego obserwowaną w populacji osób z PNN [12,38]. Ale ten sam stan zapalny może również przyczyniać i/lub pogłębiać obserwowane w przebiegu PNN zaburzenia metabolizmu lipidów. Zmienia on między innymi strukturę i funkcję HDL osłabiając ich przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe właściwości [12]. Istnieją także raporty dowodzące zwiększonej syntezy czynników transkrypcyjnych SREBP pod wpływem TNF- $\alpha$ , IL-6, PDGF, IGF-1 - cytokin o wyraźnie prozapalnym efekcie działania [40-43]. Jest prawdopodobnym, że w tym mechanizmie cytokiny mogą zmieniać ekspresję genów enzymów lipogennych i/lub cholesterologennych i w ten sposób przyczyniać się do rozwoju hiperlipidemii w PNN.

Nie można także wykluczyć, że zwiększona endogenna synteza kwasów tłuszczowych to efekt kompensacyjny, mający służyć zwiększonej produkcji TG i powstrzymaniu postępującego spadku masy tkanki tłuszczowej. W ten sposób tkanka tłuszczowa mogłaby reagować na niedostateczny napływ do adipocyta gotowych kwasów tłuszczowych dostarczonych wraz z pokarmem lub zsyntetyzowanych w wątrobie. Powodem niedostatecznego napływu kwasów



tłuszczowych do adipocyta jest udokumentowana niska aktywność LPL i wynikająca z tego upośledzona hydroliza triglicerydów zawartych w lipoproteinach osocza. Taki mechanizm został udowodniony w badaniach doświadczalnych, przeprowadzonych na myszach pozbawionych genu LPL w tkance tłuszczowej [44]. Pierwotny niedobór LPL wywołał hiperinsulinemię i zwiększony wychwyty glukozy przez adipocyty, zwiększoną ekspresję genów kluczowych (ACC, FAS) i pomocniczych (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego) enzymów lipogennych oraz zwiększoną biosyntezę kwasów tłuszczowych. W procesach tych pośredniczyły czynniki transkrypcyjne (SREBP-1), których ekspresja genu w tkance tłuszczowej była również zwiększona. I co najważniejsze, u wszystkich badanych zwierząt obserwowano HTG. Nie ulega wątpliwości, że obraz zaburzeń metabolicznych obecnych u myszy pozbawionych LPL jest praktycznie identyczny z obrazem typowym dla PNN [44]. Ta uderzająca zbieżność nakazuje przynajmniej rozważyć hipotezę zakładającą, iż pierwotną przyczyną zaburzeń metabolizmu węglowodanów i lipidów w PNN jest niedobór LPL, który uruchamia pewien ciąg zdarzeń prowadzących w efekcie do hiperlipidemii. Warto jednak przypomnieć, że główną przyczyną niedoboru LPL w PNN jest towarzysząca tej chorobie nadczynność przytarczyc, a paratyreidektomia, choć normalizowała ekspresję genu i aktywność LPL (i LH) to nie normalizowała w pełni stężenia triglicerydów [23]. Przytoczona hipoteza jest niewątpliwie wyjątkowo interesująca, ale i ona nie wyjaśnia w pełni przyczyn hiperlipidemii związanej z PNN.

W pracach dotyczących zaburzeń lipidowych w PNN, a opublikowanych w ostatnich latach wymienia się i inne czynniki, które mogą, a często i mają udokumentowany wpływ na metabolizm lipidów, jednak ich ewentualna rola w rozwoju hiperlipidemii towarzyszącej PNN nie została precyzyjnie ustalona. Takim czynnikiem jest np. leptyna. Dowiedziono jej hamującego wpływu na ekspresję genu FAS i ACC poprzez modyfikację ekspresji genu SREBP-1 w tkance tłuszczowej [45,46], jak i wykazano, że jej brak prowadzi do zwiększonej syntezy triglicerydów w wątrobie [47]. Prowadzone przez nas badania pokazały, że ekspresja genu leptyny (na poziomie mRNA) w WAT szczurów z PNN jest wyraźnie obniżona [48]. Wyniki takie mogą sugerować jej potencjalny wpływ także na rozwój HTG w tej chorobie, choć jednoznacznych dowodów na istnienie takiego związku nie ma. Inną grupą związków, których stężenie jest w PNN podwyższone i jednocześnie mogących potencjalnie zwiększać aktywność lipogenezy są poliaminy (spermina, spermidyna). Istnieją doniesienia, że poliaminy zwiększają syntezę triglicerydów aktywując niektóre enzymy biorące udział w lipogenezie [49]. Jednak także i w tym przypadku nie mamy dowodów, że związki te mają bezpośredni

wpływ na rozwój zaburzeń lipidowych w PNN. Zresztą związków biorących czynny udział w przemianach lipidowych jest na pewno znacznie więcej. W kolejnych latach zostaną najpewniej odkryte nowe, które być może pozwolą nam jeszcze bardziej precyzyjnie określić przyczyny i mechanizmy prowadzące do hiperlipidemii towarzyszącej PNN.

W pracy nr 7 przedstawiłem przykład interesującego zagadnienia, które pojawiło się w trakcie badań nad mechanizmami prowadzącymi do hiperlipidemii w PNN. Z analizy tej pracy wynika, że zwiększona aktywność czynników transkrypcyjnych może skutkować miejscowym wzrostem biosyntezy lipidów, bez istotnego zwiększania ich stężenia w surowicy. W efekcie, produkowane w nadmiarze lipidy odkładają się w tkankach i narządach prowadząc do ich destrukcji. Takie zjawisko zostało zaobserwowane i udokumentowane w nerkach. Zarówno w przypadku eksperymentalnie wywołanej cukrzycy, jak i otyłości wykazano zwiększoną ekspresję genów czynników transkrypcyjnych w nerkach i będące tego następstwem zwiększone odkładanie się w tych narządach nadmiernie produkowanych lipidów. W nerkach rozwijały się zmiany typowe dla nefropatii cukrzycowej, czy też zespołu metabolicznego, pomimo, że nie obserwowano jawnej hiperlipidemii. Podobne zmiany zaobserwowano także w przypadku nefropatii związanej z procesem starzenia się. Ekspresja genów czynników transkrypcyjnych w nerkach zwiększała się wraz z wiekiem badanych zwierząt. Towarzyszyła temu lokalna nadprodukcja i odkładanie się lipidów, prowadzące do stwardnienia i szkliwienia kłębuszków nerkowych. Jest to niewątpliwie zjawisko intrygujące, które odsłania nieznane dotąd aspekty zaburzonego metabolizmu lipidów w przebiegu PNN i które wyznacza nowe kierunki prowadzenia badań klinicznych i eksperymentalnych.

Przedstawione przeze mnie wyniki badań dostarczają dowodów potwierdzających tezę o czynnym udziale lipogenezy i cholesterologenezy w rozwoju hiperlipidemii towarzyszącej PNN. W żadnym stopniu nie umniejszają one dobrze udokumentowanej roli, jaką w tym procesie odgrywa upośledzona degradacja lipidów. Dowodzą one jedynie, iż zwiększona biosynteza lipidów jest również częścią tego procesu. Równocześnie pozwalają one dostrzec nowe kierunki prowadzenia badań nad zaburzeniami gospodarki lipidowej w warunkach PNN. Niewątpliwie precyzyjnego wyjaśnienia wymaga rola, jaką w powstawaniu hiperlipidemii odgrywa zwiększona aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej. Równie interesującym jest szczegółowe poznanie mechanizmów, w następstwie których zwiększona aktywność czynników transkrypcyjnych przyczynia się do progresji niewydolności nerek. Oba te zagadnienia będą stanowiły główne tematy dalszych badań prowadzonych w naszym ośrodku w najbliższych latach.

## 4. WNIOSKI

1. Biosynteza cholesterolu jest w wątrobie szczurów z PNN zwiększona i przyczynia się do rozwoju hipercholesterolemii, która towarzyszy tej chorobie. Świadczy o tym zwiększona ekspresja genów kluczowych (reduktaza HMG-CoA), jak i pomocniczych (enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego) enzymów cholesterologennych oraz zwiększona szybkość cholesterologenezy w wątrobie w warunkach *in vivo*.
2. Hipertriglicydemia obecna u szczurów z PNN jest nie tylko efektem upośledzonej degradacji triglicerydów, ale także zwiększonej ich biosyntezy. Dowodzi tego zwiększona ekspresja genów kluczowych (karboksylaza acetylo-CoA, syntaza kwasów tłuszczowych), jak i pomocniczych (liaza cytrynianowa ATP-zależna, enzym jabłczanowy, dehydrogenazy cyklu pentozowego) enzymów lipogennych, zwiększona sekrecja triglicerydów z wątroby oraz zwiększona szybkość lipogenezy w tkance tłuszczowej w warunkach *in vivo*.
3. W rozwoju hiperlipidemii towarzyszącej PNN pośredniczą czynniki transkrypcyjne z rodziny SREBP. Wskazuje na to zwiększona ekspresja genu SREBP-1 w tkance tłuszczowej, a także zwiększona ekspresja genu SREBP-2 w wątrobie szczurów z tą chorobą.
4. Hiperlipidemii obecnej w PNN towarzyszy zwiększona aktywność przemian glukozy w tkance tłuszczowej. Przemawia za tym zwiększona ekspresja genu translokatora glukozy *GLUT-4*, zwiększony wychwyty glukozy przez adipocyty oraz zwiększona szybkość jej przemiany do CO<sub>2</sub>.

## 5. PIŚMIENNICTWO

1. Ritz E: Total cardiovascular risk management. *Am J Cardiol* 2007, 100: 53J-60J
2. Bagdade JD, Porte D Jr, Biermann EL: Hypertriglyceridemia: A metabolic consequence of chronic renal failure. *N Engl J Med* 1968, 279: 181-185
3. Attman PO, Alaupovic P, Tavella M, Knight-Gibson C: Abnormal lipid and apolipoprotein composition of major lipoprotein density classes in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11: 63-69
4. Kimak E, Książek A, Solski J: Disturbed lipoprotein composition in non-dialyzed, hemodialysis, continuous ambulatory peritoneal dialysis and post-transplant patients with chronic renal failure. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44: 64-69
5. Vaziri ND: Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 290: 262-272
6. Moorhead JF, El-Nahas M, Chan MK, Varghese Z: Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982, 2:1309-1312
7. Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ: Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* 2000, 58: 293-301
8. Abrass CK: Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol* 2004, 24: 46-53
9. Kamanna VS, Pai R, Roh DD, Kirschenbaum MA: Oxidative modification of low-density lipoprotein enhances the murine mesangial cell cytokines associated with monocyte migration, differentiation, and proliferation. *Lab Invest* 1996, 74: 1067-1079
10. Nishida Y, Oda H, Yorioka N: Effect of lipoproteins on mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 1999, 71: S51-S53
11. Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C, Attman PO, Kron B, Larsson R, Weiss L, Wedel H, Alaupovic P: Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 1997, 12: 1908-1915
12. Kaysen GA, Eiserich JP: The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal function. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 538-548
13. Steinmetz OM, Panzer U, Stahl RA, Wenzel UO: Statin therapy in patients with chronic kidney disease: to use or not to use. *Eur J Clin Invest* 2006, 36: 519-527
14. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM: Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006, 34: 223-227
15. White LW, Rudney H: Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutarate nad mevalonate biosynthesis by rat liver homogenates. Effects of fasting, cholesterol feeding and triton administration. *Biochemistry* 1970, 9: 2725-2731

16. Ness GC, Chambers CM: Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, 224: 8-19
17. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002, 109: 1125-1131
18. Bagdade JD, Porte D Jr, Biermann EL: Hypertriglyceridemia: A metabolic consequence of chronic renal failure. *N Engl J Med* 1968, 279:181-185
19. Cheung AK, Parker CJ, Ren K, Iverius PH: Increased lipase inhibition in uremia: Identification of pre- $\beta$ -HDL as a major inhibitor in normal and uremic plasma. *Kidney Int* 1996, 49: 1360-1371
20. Vaziri ND, Liang K: Down-regulation of tissue lipoprotein lipase expression in experimental chronic renal failure. *Kidney Int* 1996, 50: 1928-1935
21. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1996, 97: 2167-2173
22. Akmal M, Kasim SE, Soliman AR, Massry SG: Excess parathyroid hormone adversely affects lipid metabolism in chronic renal failure. *Kidney Int* 1990, 37: 854-858
23. Vaziri ND, Wang XQ, Liang K: Secondary hyperparathyroidism downregulates lipoprotein lipase expression in chronic renal failure. *Am J Physiol* 1997, 273: F925-F930
24. Vaziri ND, Liang K: Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. *Kidney Int* 1997, 51: 913-919
25. Bagdade JD, Yee E, Wilson DE, Shafrir E: Hyperlipidemia in renal failure: studies of plasma lipoproteins, hepatic triglyceride production and tissue lipoprotein lipase in chronically uremic rat model. *J Lab Clin Med* 1978, 81: 176-186
26. Heuck CC, Liersch M, Ritz E, Stegmeier K, Wirth A, Mehls O: Hyperlipoproteinemia in experimental chronic renal insufficiency in the rat. *Kidney Int* 1978, 14: 142-150
27. Pandak WM, Vlahcevic ZR, Heuman DM, Krieg RJ, Hanna JD, Chan JCM: Post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int* 1994, 46: 358-364
28. Liang K, Vaziri ND: Gene expression of LDL receptor, HMG-CoA reductase and cholesterol-7 alpha-hydroxylase in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1997, 12: 1381-1386
29. Chmielewski M, Sucajtys-Szulc E, Kossowska E, Świerczyński J, Rutkowski B, Bogusławski W: Increased gene expression of liver SREBP-2 in experimental chronic renal failure. *Atherosclerosis* 2007, 191: 326-332
30. Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Klötting N, Fasshauer M, Schön MR, Körner A, Stumvoll M, Blüher M: Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007, 50: 1472-1480
31. Girard J, Ferre P, Foufelle F: Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* 1997, 17: 325-352
32. Parker RA, Miller SJ, Gibson DM: Phosphorylation state of HMG CoA reductase affects its catalytic activity and degradation. *Adv Enzyme Regul* 1986, 25: 329-343

33. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Foufelle F: Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 2000, 350: 389-393
34. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 12737-12742
35. Palmer DG, Rutter GA, Tavare JM: Insulin-stimulated fatty acid synthase gene expression does not require increased sterol response element binding protein 1 transcription in primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 291: 439-443
36. Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I: Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem* 2001, 276: 11512-11516
37. Heemers H, Vanderhoydonc F, Roskams T, Shechter I, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV: Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 2003, 205: 21-31
38. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G: Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease. *Blood Purif* 2003, 21: 29-36
39. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: Il-10, Il-6 and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia – the good, the bad and the ugly. *Kidney Int* 2005, 67: 1216-1233
40. Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H: TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med* 2007, 232: 614-621
41. Smith TM, Cong Z, Gilliland KL, Clawson GA, Thiboutot DM: Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. *J Invest Dermatol* 2006, 126: 1226-1232
42. Gierens H, Nauck M, Roth M, Schinker R, Schurmann C, Scharnagl H, Neuhaus G, Wieland H, Marz W: Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1777-1783
43. Demoulin JB, Ericsson J, Kallin A, Rorsman C, Ronnstrand L, Heldin CH: Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 2004, 279: 35392-35402
44. Wagner EM, Kratky D, Haemmerle G, Hrzenjak A, Kostner GM, Steyrer E, Zechner R: Defective uptake of triglyceride-associated fatty acid in adipose tissue causes the SREBP-1c-mediated induction of lipogenesis. *J Lipid Res* 2004, 45: 356-365
45. Nogalska A, Sucajtys-Szulc E, Świerczyński J: Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism* 2005, 54: 1041-1047
46. Nogalska A, Świerczyński J: The age-related differences in obese and fatty acid synthase gene expression in white adipose tissue of rat. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1533: 73-80

47. Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Okazaki H, Ohashi K, Harada K, Matsuzaka T, Sone H, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 2001, 276: 37402-37408
48. Świerczyński J, Korczyńska J, Szólkiewicz M, Karbowska J, Kochan Z, Niewęglowski T, Kusiak E, Rutkowski B: Low leptin mRNA level in adipose tissue and normoleptinemia in experimental chronic renal failure. *Exp Nephrol* 2001, 9: 54-59
49. Jamdar SC, Cao WF, Samaniego E: Relationship between adipose polyamine concentrations and triacylglycerol synthetic enzymes in lean and obese Zucker rats. *Enzyme Protein* 1996, 49: 222-230