

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXIX
2009
SUPPLEMENT 6**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Zdzisław Kochan

**REGULACJA WYDZIELNICZEJ I METABOLICZNEJ
FUNKCJI TKANKI TŁUSZCZOWEJ PODCZAS
WIELOKROTNEGO GŁODZENIA I KARMIENIA**

*Regulation of endocrine and metabolic function of adipose
tissue during multiple cycles of starvation and refeeding*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. Julian Świerczyński

Gdańsk 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Zbigniew Machaliński,
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Zdzisław Bereznowski, prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Praca była finansowana z projektów
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
(3P05A 098 23 i 2P05A 019 30)
oraz przez Gdański Uniwersytet Medyczny
(W-138 i ST-41)

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	9
1. Wstęp	11
1.1. Tkanka tłuszczowa i jej główne funkcje.....	11
1.2. Leptyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki.....	13
1.3. Adiponektyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki.....	14
1.4. Rezystyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki.....	17
1.5. Regulacja metabolizmu węglowodanów i lipidów w tkance tłuszczowej.....	20
1.6. Udział receptorów PPAR w regulacji wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej.....	22
1.7. Dieta a funkcje tkanki tłuszczowej.....	23
2. Cel pracy.....	27
3. Materiały i metody.....	28
3.1. Zwierzęta doświadczalne.....	28
3.2. Pomiar stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów.....	29
3.3. Izolacja i hodowla adipocytów.....	29
3.4. Pomiar ekspresji genów metodą real-time RT-PCR.....	30
3.4.1. Izolacja całkowitego RNA z prób.....	30
3.4.2. Pomiar ilości mRNA metodą real-time RT-PCR.....	30
3.5. Pomiar ilości białka metodą Western-blot.....	33
3.6. Metody statystyczne.....	34
4. Wyniki.....	35
4.1. Zmiany masy ciała i masy tkanki tłuszczowej u szczurów głodzonych i karmionych.....	35
4.2. Zmiany stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów.....	36
4.3. Zmiany wielkości adipocytów obserwowane po wielokrotnie powtarzanym, naprzemiennym głodzeniu i karmieniu.....	40
4.4. Zmiany ekspresji genów kodujących leptynę i receptor leptyny.....	42
4.4.1. Zmiany ekspresji genu kodującego leptynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach.....	42
4.4.2. Zmiany wydzielania leptyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej.....	44
4.4.3. Zmiany ekspresji genu kodującego receptor leptyny w tkance tłuszczowej.....	44
4.5. Zmiany ekspresji genów kodujących adiponektynę i receptor adiponektyny.....	45
4.5.1. Zmiany ekspresji genu kodującego adiponektynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach.....	45
4.5.2. Zmiany wydzielania adiponektyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej.....	47
4.5.3. Zmiany ekspresji genów kodujących izoforny receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej.....	47

4.6.	Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę	49
4.6.1.	Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach	49
4.6.2.	Zmiany wydzielania rezystyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej	50
4.7.	Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmiany metabolizmu lipidów w tkance tłuszczowej	51
4.7.1.	Zmiany ekspresji genów kodujących enzymy i inne białka związane z syntezą lipidów w WAT	51
4.7.2.	Zmiany ekspresji genów kodujących enzymy i inne białka związane z lipolizą w WAT	54
4.7.3.	Zmiany szybkości lipolizy w adipocytach.....	54
4.8.	Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmian ekspresji genów kodujących receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne	55
4.8.1.	Zmiany ekspresji genów kodujących receptory jądrowe PPAR, LXR i RXR oraz ich koaktywator PGC1 α w tkance tłuszczowej	55
4.8.2.	Zmiany ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne SREBP-1, ChREBP i C/EBP α w tkance tłuszczowej.....	60
5.	Dyskusja.....	63
5.1.	Zmiany masy ciała i masy tkanki tłuszczowej u szczurów głodzonych i karmionych.....	63
5.2.	Zmiany stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów.....	63
5.3.	Zmiany ekspresji genów kodujących leptynę i receptor leptyny w tkance tłuszczowej	66
5.4.	Zmiany ekspresji genów kodujących adiponektynę i obie izoformy receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej	67
5.5.	Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej	70
5.6.	Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmian ekspresji genów kodujących białka, w tym enzymy, związane z przemianami węglowodanów i lipidów.....	72
5.7.	Zmiany ekspresji genów kodujących receptory PPAR i ich koaktywator PGC1 α w tkance tłuszczowej	76
5.8.	Zmiany ekspresji genów kodujących receptory LXR α i RXR α w tkance tłuszczowej	79
5.9.	Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny SREBP-1 w tkance tłuszczowej	80
5.10.	Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny ChREBP w tkance tłuszczowej	81
5.11.	Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny C/EBP α w tkance tłuszczowej	82
5.12.	Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie uruchamia mechanizmy regulacyjne właściwe tylko dla tkanki tłuszczowej	83
6.	Wnioski	86
7.	Piśmiennictwo	87
8.	Streszczenie.....	103
9.	Summary	106

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 6PGDH – dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa / *6-phosphogluconate dehydrogenase* (EC 1.1.1.44);
- ACC – karboksylaza acetylo-CoA / *acetyl-CoA carboxylase* (EC 6.4.1.2);
- ACL – ATP-liaza cytrynianowa / *ATP-citric lyase* (EC 2.3.3.8);
- adiponektyna HMW – multimeryczna postać adiponektyny o dużej masie cząsteczkowej / *high-molecular weight adiponectin*;
- AdipoR – receptor adiponektyny / *adiponectin receptor*;
- aFABP – adipocytarne białko wiążące kwasy tłuszczowe / *adipocyte fatty acid binding protein* (aP2, FABP4);
- AMPK – kinaza białkowa zależna od AMP / *AMP-activated protein kinase*;
- AMV – wirus mieloblastozy ptasiej / *avian myeloblastosis virus*;
- ATGL – lipaza triacyloglicerolowa, specyficzna dla adipocytów / *adipose triglyceride lipase* (EC 3.1.1.3);
- BAT – brunatna tkanka tłuszczowa / *brown adipose tissue*;
- BMI – wskaźnik masy ciała / *body mass index*;
- cAMP – cykliczny AMP / *cyclic AMP*;
- C – szczury z grupy kontrolnej / *control rats*;
- C/EBP – białko wiążące się z sekwencją wzmacniającą CCAAT / *CCAAT enhancer binding protein*;
- ChREBP – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na węglowodany / *carbohydrate response element binding protein*;
- CRH – kortykoliberyna / *corticotropin releasing hormone*;
- FAS – syntaza kwasów tłuszczowych / *fatty acid synthase* (EC 2.3.1.85);
- FAT/CD36 – transporter kwasów tłuszczowych / *fatty acid transporter*;
- G3PD1 – dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa, izoforma cytosolowa / *cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase* (EC 1.1.1.8);
- G6PD – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa / *glucose 6-phosphate dehydrogenase* (EC 1.1.1.49);
- GLUT4 – transporter glukozy GLUT4 / *glucose transporter GLUT4*;
- GPAT – acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa / *glycerol-3-phosphate acyltransferase* (EC 2.3.1.15);
- GyK – kinaza glicerolowa / *glycerol kinase* (EC 2.7.1.30);
- HK2 – heksokinaza 2 / *hexokinase 2* (EC 2.7.1.1);
- HSL – lipaza zależna od hormonów / *hormone-sensitive lipase* (EC 3.1.1.79);
- IL-6 – interleukina 6 / *interleukin 6*;
- JAK – kinaza białkowa Janusa / *Janus protein kinase*;
- LCPT1 – palmitoilotransferaza karnitynowa I, izoforma wątrobowa / *liver isoform of carnitine palmitoyltransferase 1* (EC 2.3.1.21);
- LepR – receptor leptyny / *leptin receptor*;
- LPA – kwas lizofosfatydowy / *lysophosphatidic acid*;
- LPL – lipaza lipoproteinowa / *lipoprotein lipase* (EC 3.1.1.34);
- LXR – wątrobowy receptor X / *liver X receptor*;
- MEC – enzym jabłczanowy, forma cytosolowa / *cytosolic malic enzyme* (EC 1.1.1.40);

- MSR – szczury poddane 8 cyklom naprzemiennego głodzenia i karmienia (trwającym w sumie 48 dni), z których każdy składał się z 72 godz. głodzenia i 72 godz. karmienia / *rats subjected to eight cycles of 72-hour food deprivation and 72-hour refeeding (for 48 days)*;
- PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy / *polymerase chain reaction*;
- PDK4 – kinaza dehydrogenazy pirogronianowej, izoforma 4 / *pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4* (EC 2.7.11.2);
- PEPCK – karboksykinaza fosfoenolpirogronianowa, izoforma cytosolowa / *cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase* (EC 4.1.1.32);
- PF – grupa szczurów spożywających przez 48 dni codzienną porcję odważonej paszy o masie odpowiadającej średniej masie paszy spożytej przez szczury z grupy MSR w ciągu poprzedniego sześciodniowego cyklu głodzenia i karmienia / *pair-fed group – rats were given everyday, for 48 days, weighed amount of food which was equal to the average amount of food consumed by the MSR rats for the period of the previous 6-day cycle of food deprivation and refeeding*;
- PGC1 – koaktywator-1 PPAR γ / *PPAR γ coactivator-1*;
- PKA – kinaza białkowa A / *protein kinase A*;
- PLIN – perylipiny / *perilipins*;
- PPRE – element odpowiedzi na proliferatory peroksysomów / *peroxisome proliferator response element*;
- PPAR – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów / *peroxisome proliferator activated receptor*;
- RFU – względna fluorescencja prób / *relative fluorescence units*;
- RT – odwrotna transkrypcja / *reverse transcription*;
- RXR – receptor kwasu 9-*cis*-retinoidowego / *retinoid X receptor*;
- S – grupa szczurów głodzonych przez 72 godz. / *rats deprived of food for 72 hours*;
- SR – grupa szczurów głodzonych przez 72 godz., a następnie karmionych przez kolejne 72 godz. / *rats subjected to 72-hour food deprivation and subsequently refed for 72 hours*;
- SCD1 – desaturaza stearoilo-CoA 1 / *stearoyl-CoA desaturase 1* (EC 1.14.19.1);
- SRE – element odpowiedzi na sterole / *sterol regulatory element*;
- SREBP – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na sterole / *sterol response element binding protein*;
- STAT – czynnik transkrypcyjny STAT / *STAT transcription factor (signal transducers and activators of transcription)*;
- TZD – tiazolidinediony / *thiazolidinediones*;
- TNF α – czynnik martwicy nowotworu α / *tumour necrosis factor α* ;
- WAT – biała tkanka tłuszczowa / *white adipose tissue*;

1. WSTĘP

1.1. Tkanka tłuszczowa i jej główne funkcje

W tkance tłuszczowej dominują charakterystyczne dla tej tkanki komórki tłuszczowe – adipocyty. Głównym składnikiem adipocytów są triacyloglicerole, które mogą stanowić do około 90% ich objętości. Dzięki dużej zawartości triacylogliceroli adipocyty mogą pełnić funkcję „magazynu energii”. Poza adipocytami w tkance tłuszczowej występują również komórki ścian naczyń krwionośnych, preadipocyty, fibroblasty, granulocyty, limfocyty, makrofagi i komórki tuczne [26, 54].

Biała tkanka tłuszczowa (WAT) jako magazyn lipidów ma bardzo duże możliwości zwiększania swojej masy. Może to być osiągnięte poprzez wzrost ilości triacylogliceroli przechowywanych w każdej komórce. Substratami do syntezy triacylogliceroli mogą być kwasy tłuszczowe powstałe *de novo* z glukozy w adipocytach, pochodzące z wątroby czy też ze spożytego pokarmu. Ponadto masa tkanki tłuszczowej może ulec zwiększeniu poprzez wzrost ilości adipocytów powstających w wyniku podziałów i różnicowania komórek. Możliwość przechowywania nadmiaru spożytej energii niewątpliwie zwiększa szanse przeżycia organizmu, jednak nadmierne magazynowanie energii w dłuższej skali czasowej wiąże się z otyłością i niektórymi schorzeniami metabolicznymi, głównie cukrzycą typu 2 i chorobami układu krążenia.

Podstawową funkcją tkanki tłuszczowej jest synteza lipidów, a masa tej tkanki, zależna od ilości zgromadzonych lipidów, jest kontrolowana zarówno podczas nadmiernej, jak i niewystarczającej podaży pochodzących z pożywienia kwasów tłuszczowych, niezbędnych do syntezy triacylogliceroli. Aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej jest regulowana głównie przez insulinę, jednak wewnątrzkomórkowe mechanizmy przekazywania sygnału insuliny, a także innych hormonów oraz udział różnych czynników transkrypcyjnych w regulacji szlaków metabolicznych w adipocytach nie zostały jeszcze w pełni poznane. Procesy regulujące ilość energii zmagazynowanej w postaci lipidów są precyzyjnie kontrolowane i u dorosłego, dojrzałego płciowo osobnika prowadzą do ustalenia się stałej masy tkanki tłuszczowej i stałego stężenia adipokin we krwi, co wpływa także na stężenie insuliny we krwi. Przykładowo, myszy pozbawione lipazy lipoproteinowej (LPL) w tkance tłuszczowej utrzymują normalną masę tej tkanki dzięki wzmożonej syntezie kwasów tłuszczowych *de novo* [201]. Sugeruje to, że utrzymanie stałej masy tkanki tłuszczowej ma duże znaczenie dla organizmu, i że istnieje wewnętrzny mechanizm kompensacyjny regulujący masę tej tkanki. W doświadczalnych modelach zwierzęcych przypominających lipodystrofię, takich jak transgeniczne myszy, u których występuje brak lub zmniejszenie ilości WAT, zaobserwowano wzrost stężenia insuliny i glukozy oraz wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli we krwi [122]. Wszczepienie białej tkanki tłuszczowej takim myszom obniża stężenie insuliny i glukozy we krwi oraz zwiększa wrażliwość mięśni na insulinę [43].

Zmiany masy tkanki tłuszczowej następują poprzez wzrost liczby dojrzałych adipocytów różnicujących z preadipocytów oraz poprzez zmiany ilości triacylogliceroli zmagazynowanych w poszczególnych adipocytach [26]. W przypadku ujemnego bilansu energetycznego spada masa tkanki tłuszczowej, co jest wywołane malejącymi zasobami triacylogliceroli zmagazynowanych w adipocytach. Natomiast w przypadku dodatniego bilansu energetycznego rośnie masa tkanki tłuszczowej, co wynika ze zwiększonej akumulacji triacylogliceroli w adipocytach. Zakłada się, że adipocyty mogą mieć pewną

maksymalną objętość, powyżej której nie rosną [32, 47]. Pojawiające się duże adipocyty mogą wywoływać różnicowanie preadipocytów w kierunku dojrzałych adipocytów. Wzrost masy tkanki tłuszczowej może przebiegać z przewagą wzrostu objętości komórek lub z przewagą wzrostu liczby dojrzałych adipocytów, w zależności od lokalizacji tej tkanki [32]. Uważa się, że w różnicowaniu preadipocytów w kierunku adipocytów dominującą rolę odgrywają receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) i białko wiążące się z sekwencją wzmacniającą CCAAT (C/EBP) [47, 97].

Z trzech znanych izoform receptorów PPAR w tkance tłuszczowej ilościowo dominuje PPAR γ , który obok C/EBP α jest jednym z głównych czynników transkrypcyjnych regulujących proces różnicowania adipocytów [181]. PPAR γ jest niezbędny do prawidłowego rozwoju tkanki tłuszczowej, bowiem brak tego receptora u homozygotycznych myszy pozbawionych obu alleli genu kodującego PPAR γ prowadzi do śmierci w okresie zarodkowym, natomiast u heterozygot obserwuje się zahamowanie procesu adipogenezy [8, 95, 149]. Z kolei sztucznie wywołana nadekspresja PPAR γ w fibroblastach prowadzi do różnicowania tych komórek w dojrzałe adipocyty [180].

W procesie adipogenezy poza receptorem jądrowym PPAR γ istotną rolę odgrywają również czynniki transkrypcyjne z rodziny C/EBP [97, 142, 149]. Czynniki C/EBP β i C/EBP δ , indukowane podczas dojrzewania adipocytów, mogą wywoływać wzrost ekspresji genów kodujących C/EBP α i PPAR γ – najważniejszych, obok SREBP-1, czynników transkrypcyjnych w dojrzałych adipocytach [142]. Zarówno czynnik C/EBP α , jak i receptor jądrowy PPAR γ mogą indukować proces adipogenezy; jednak C/EBP α wymaga obecności PPAR γ , natomiast PPAR γ może wywołać proces adipogenezy nawet w komórkach pozbawionych C/EBP α [150]. Geny, których ekspresja zachodzi w adipocytach są bezpośrednio lub pośrednio regulowane przez C/EBP α i PPAR γ i z reguły zawierają w swoich regionach promotorowych elementy odpowiedzi rozpoznawane przez te białka [53, 135, 157].

Tkanka tłuszczowa jest nie tylko miejscem przechowywania zgromadzonych w postaci lipidów zasobów energetycznych, ale również narządem wydzielniczym syntetyzującym różne, aktywne biologicznie białka takie jak: leptyna, adiponektyna i rezystyna oraz wiele innych określanых wspólnym mianem „adipokiny” [54, 90]. W tkance tłuszczowej powstają cytokiny, takie jak czynnik martwicy nowotworu α (TNF α) i interleukiny oraz szereg białek związanych z krzepnięciem krwi i innymi funkcjami układu krążenia [90]. Łącznie w tkance tłuszczowej powstaje kilkadziesiąt wydzielanych do środowiska zewnątrzkomórkowego białek. Część z wydzielanych przez tkankę tłuszczową białek, między innymi TNF α i interleukina 6 (IL-6), może odgrywać rolę w patogenezie cukrzycy typu 2. Proponowano udział zwiększonej syntezy TNF α , obserwowanej w tkance tłuszczowej osób otyłych, w rozwoju oporności na insulinę [54]. Jednak ilość TNF α wydzielanego przez tkankę tłuszczową człowieka jest niewielka, w związku z tym przypuszcza się, że odgrywa on raczej rolę auto- lub parakrynną i nie jest uwalniany do krwi [121]. Stężenie IL-6 w surowicy krwi rośnie wraz ze wzrostem masy ciała i masy tkanki tłuszczowej oraz wykazuje ujemną korelację z wrażliwością na insulinę [9].

W regulacji równowagi energetycznej organizmu główną rolę odgrywają trzy adipokiny: leptyna, adiponektyna i rezystyna. Z tego względu ich struktura i funkcje zostaną szerzej omówione w dalszej części rozprawy.

1.2. Leptyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki

Leptyna jest jednym z ważniejszych i jednocześnie najlepiej poznanym białkiem wydzielanym przez adipocyty. Została ona odkryta w 1994 roku i nazwana leptyną od greckiego słowa λεπτός (gr. drobny, szczupły) [208]. U człowieka, tak jak u innych ssaków, leptyna powstaje głównie w dojrzałych adipocytach tkanki tłuszczowej [54, 90]. Mniejsze ilości tego białka są syntetyzowane także w innych narządach lub tkankach, np. w łożysku, mózgu, żołądku i gruczole mlekowym [90]. Wyjątkowo u ptaków głównym miejscem powstawania leptyny jest wątroba [91].

Zarówno u człowieka, jak i gryzoni leptyna jest syntetyzowana jako białko składające się ze 167 aminokwasów, z których 21 stanowi sekwencję sygnałową. Po odcięciu sekwencji sygnałowej leptyna wydzielana jest na zewnątrz komórki jako białko o masie około 16 kDa [208].

Biosynteza leptyny w tkance tłuszczowej jest regulowana głównie przez insulinę. Insulina indukuje transkrypcję genu *Lep* (u człowieka *LEP*) wywołując długotrwałe zmiany ekspresji tego genu w adipocytach [101, 137, 153] oraz wpływa na tempo translacji [96]. Niezależnie od insuliny działa glukoza, która w krótkim czasie wywołuje wzrost stężenia mRNA leptyny i może odgrywać główną rolę w szybkiej regulacji zmian ekspresji genu *Lep* [120, 125]. Wzrost ekspresji genu kodującego leptynę, zarówno *in vivo* w tkance tłuszczowej, jak i w hodowli komórkowej adipocytów, wywołują także glukokortykosteroidy [96, 167]. W inkubowanych skrawkach tkanki tłuszczowej człowieka działanie insuliny i glukokortykosteroidów jest addytywne lub synergistyczne w zależności od miejsca pobrania tkanki tłuszczowej [96, 151]. Przeciwnie działanie wykazuje glukagon, który poprzez wzrost stężenia cAMP obniża poziom mRNA leptyny w adipocytach [167]. Aktywatory receptorów PPAR obniżają ekspresję genu kodującego leptynę [31, 66, 86].

Wrażliwość genu *Lep* na insulinę i glukagon sugeruje, że jego ekspresja może ulegać zmianom pod wpływem diety. Z naszych wcześniejszych badań wynika, że cykliczne zmiany podaży pokarmu wywołują spadek stężenia leptyny w surowicy krwi szczurów [92]. W otyłości, zarówno u człowieka, jak i u gryzoni, obserwuje się podwyższone stężenie leptyny w krążeniu, które spada po zastosowaniu diety redukcyjnej i obniżeniu masy ciała [82, 90]. Z badań nad obniżaniem masy ciała otyłych pacjentów wynika, że leptyna jest jedyną adipokininą, której stężenie we krwi spada we wszystkich strategiach obniżania masy ciała, niezależnie od rodzaju zastosowanej diety redukcyjnej [82].

Wydzielanie leptyny przez adipocyty jest również regulowane przez hormony. Leptyna jest gromadzona w adipocytach, a następnie pod wpływem insuliny może być wydzielana poza komórkę [15, 96]. Pod kontrolą insuliny jest więc nie tylko synteza leptyny w adipocytach, lecz również jej uwalnianie przez komórki tkanki tłuszczowej. Glukagon natomiast obniża wydzielanie leptyny do środowiska [167].

Leptyna może wpływać na funkcje komórek poprzez receptor leptyny zlokalizowany w błonie komórkowej. Receptory leptyny przekazują sygnał do wnętrza komórki poprzez aktywację kinaz Janusa (JAK) i czynników transkrypcyjnych STAT. Zablockowanie drogi sygnałowej leptyny może być skutkiem syntezy niefunkcjonalnej leptyny lub braku jej receptora (np. u myszy *ob/ob* lub *db/db* i u szczurów *fa/fa*), jak również nabytej oporności na leptynę u osób otyłych [90]. Działanie tego hormonu jest związane z regulacją metabolizmu energetycznego organizmu. Zarówno u młodych, jak i dojrz-

łych płciowo osobników ilość leptyny wydzielanej przez adipocyty zależy od masy tkanki tłuszczowej i odzwierciedla ilość zasobów energetycznych przechowywanych w tej tkance [89, 209]. Receptor leptyny występuje także w adipocytach, dzięki czemu leptyna może wykazywać działanie auto- lub parakryjne [15, 75]. Pod wpływem aktywacji receptora leptyny w tkance tłuszczowej rośnie aktywność kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK), która z kolei może wpływać na lipolizę stymulowaną przez katecholaminy [106].

Rola leptyny w regulacji masy tkanki tłuszczowej i utrzymaniu równowagi energetycznej u człowieka nie jest jednoznacznie określona. U ludzi o takiej samej masie tkanki tłuszczowej stwierdzono wielokrotne różnice stężenia tego hormonu w surowicy krwi i często brak reakcji na podaną rekombinowaną leptynę [20]. Leptyna poza wieloma innymi funkcjami uczestniczy w regulacji wrażliwości tkanek na insulinę, czego przykładem może być spadek oporności na insulinę po podaniu leptyny w lipodystrofi [136, 164].

Wydzielana do krwi leptyna dociera do mózgu i wiąże się ze swoimi receptorami w podwzgórzu wywołując takie zmiany jak: zmniejszenie spożycia pokarmu, obniżenie masy tkanki tłuszczowej i zwiększenie ilości wydatkowanej energii; w sumie przyczyniając się do spadku masy ciała [50, 156]. Pod wpływem leptyny dochodzi między innymi do supresji genów kodujących neuropeptyd Y (NPY) i galaninę oraz do indukcji genu kodującego kortykoliberynę (CRH) w podwzgórzu, co prowadzi do obniżenia łaknienia [50, 152, 156, 172]. Poza podwzgórzem odnotowano również obecność receptora leptyny i działanie tego hormonu na trzustkę, wątrobę, mięśnie szkieletowe i jelito [108, 160, 194, 195]. Niewątpliwie leptyna uczestniczy nie tylko w regulacji pobierania pokarmu i tempa podstawowej przemiany materii, lecz także w regulacji funkcjonowania systemu immunologicznego, układu krwionośnego, płodności i w regulacji wielu innych funkcji organizmu [25, 90, 107, 166], których nie omówiono szczegółowo, ponieważ nie mają bezpośredniego związku z głównym tematem rozprawy habilitacyjnej.

1.3. Adiponektyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki

Spośród wielu pochodzących z tkanki tłuszczowej adipokin na szczególną uwagę zasługuje adiponektyna – swoiste dla adipocytów białko, wydzielane w dużych ilościach przez tkankę tłuszczową. Adiponektyna została odkryta i opisana jako charakterystyczne dla tkanki tłuszczowej białko o masie około 30 kDa [54]. Synteza adiponektyny zachodzi niemal wyłącznie w tkance tłuszczowej, a mRNA kodujące to białko jest transkrypcyjnie występującym w największej ilości kopii w adipocytach [110]. Stężenie adiponektyny we krwi mieści się w zakresie od kilku do kilkunastu $\mu\text{g/ml}$, tak jak wielu białek niehormonalnych [3]. Wykazano, że synteza adiponektyny w tkance tłuszczowej oraz jej stężenie we krwi obniża się wraz z rozwojem otyłości u ludzi oraz w cukrzycy typu 2 [3]. Sugeruje to, że zaburzona synteza i wydzielanie adiponektyny może być jedną z przyczyn rozwoju oporności na insulinę i cukrzycy typu 2, związanych z otyłością.

Adiponektyna u człowieka jest zbudowana z 244 aminokwasów, z których 17 stanowi sekwencję sygnałową [58]. Po odcięciu sekwencji sygnałowej powstaje białko o masie 28 kDa. Dojrzała adiponektyna ma charakterystyczną strukturę. Można w niej wyróżnić domenę o zmiennej sekwencji, znajdującą się na końcu aminowym; domenę

włóknistą, która budową przypomina kolagen typu VIII i X oraz położoną na końcu karboksylowym domenę globularną, której sekwencja wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji jednego z białek systemu dopełniacza – C1q [110]. Adiponektyna dzięki swej budowie może tworzyć multimery – globularne i włókniste domeny adiponektyny umożliwiają łączenie się cząsteczek w homotrimery, natomiast dzięki domenie o zmiennej sekwencji powstają struktury wyższego rzędu składające się z 12, 18 i większej liczby cząsteczek adiponektyny [71, 72, 193]. Powstawanie heksamerów i multimerycznych form adiponektyny o większej liczbie cząsteczek jest zależne od modyfikacji posttranslacyjnych zachodzących w domenie włóknistej [134]. Proporcje ilościowe między poszczególnymi formami multimerycznymi adiponektyny we krwi zależą od wielu czynników. Istotne różnice, zależne od płci i stopnia otyłości, dotyczą przede wszystkim stężenia multimerów oznaczanych jako HMW. Zaobserwowano wcześniej, że stężenie adiponektyny jest wyższe u kobiet niż u mężczyzn [3, 28]. Obecnie uważa się, że różnice te dotyczą nie tylko całkowitego stężenia adiponektyny, lecz również proporcji ilościowych poszczególnych form tego hormonu, ponieważ u kobiet jest wyższe niż u mężczyzn stężenie formy HMW adiponektyny [193]. Wiadomo także, że stężenie adiponektyny w osoczu osób otyłych jest znacznie niższe niż u osób szczupłych [3]. Ponadto u osób otyłych stężenie formy HMW adiponektyny jest niższe niż u osób szczupłych, podczas gdy stężenie heksamerów i trimerów adiponektyny jest takie samo lub wyższe [83].

Regulacja ekspresji genu kodującego adiponektynę nie została jeszcze w pełni poznana; wiadomo jednak, że może w niej brać udział wiele czynników hormonalnych. Ekspresja genu kodującego adiponektynę wzrasta, gdy masa tkanki tłuszczowej ulega obniżeniu oraz pod wpływem IGF-1; maleje natomiast wraz z rozwojem otyłości oraz pod wpływem glukokortykosteroidów, TNF α i agonistów receptorów β -adrenergicznych [3, 38, 39, 51]. W regulacji ekspresji genu kodującego adiponektynę bierze również udział insulina, jednak jej rola pozostaje niewyjaśniona. Jak dotąd zaobserwowano wywołany przez insulinę wzrost ekspresji genu kodującego adiponektynę w eksplantach z trzewnej tkanki tłuszczowej człowieka [51] oraz obniżenie ekspresji tego genu w hodowli komórkowej adipocytów po podaniu insuliny [39]. U zdrowych osób podanie insuliny prowadzi do spadku ilości mRNA adiponektyny w tkance tłuszczowej, jak i do spadku stężenia adiponektyny we krwi; natomiast u osób charakteryzujących się mniejszą wrażliwością na insulinę hormon ten nie zmienia poziomu mRNA adiponektyny w tkance tłuszczowej, jednak obniża stężenie adiponektyny we krwi [105]. Wydaje się, że insulina może regulować ekspresję genu kodującego adiponektynę w tkance tłuszczowej, hamując jego transkrypcję lub obniżając stabilność mRNA, a także regulować stężenie adiponektyny we krwi, przyspieszając jej usuwanie z krwiobiegu. Ligandy receptorów jądrowych PPAR zwiększają ekspresję genu kodującego adiponektynę oraz jej stężenie w surowicy krwi [54, 111]. Podanie myszom fenofibratu, aktywatora receptora PPAR α , zwiększa stężenie adiponektyny w surowicy krwi, jednak nie zmienia poziomu mRNA adiponektyny w tkance tłuszczowej [52].

U myszy rodzaj diety nie wpływa na stężenie adiponektyny w surowicy krwi [52, 175]. Natomiast u szczurów wykazano niewielki spadek stężenia tej adipokiny w surowicy krwi po zmianie diety na wysokotłuszczową [145]. Zastosowanie różnych diet redukcyjnych podnosi lub jest bez wpływu na stężenie adiponektyny we krwi. W badaniach Combs i wsp. [28] oraz Varady i wsp. [189] z zastosowaniem diet redukcyjnych odnotowano podwyższone stężenie adiponektyny w surowicy krwi chudych myszy. Obniżanie masy ciała u otyłych pacjentów po zastosowaniu różnych diet redukcyjnych

zwykle nie zmienia stężenia adiponektyny [82]. Postuluje się jednak, że dieta redukcyjna może zmienić proporcje poszczególnych frakcji adiponektyny poprzez zwiększenie stężenia frakcji HMW we krwi [83].

Wykazano, że adiponektyna łączy się ze swoistym receptorem błonowym występującym w postaci dwóch izoform: AdipoR1 i AdipoR2, obecnych głównie w mięśniach szkieletowych i w wątrobie [205]. Obie formy receptora adiponektyny występują również w WAT [73]. Regulacja ekspresji genów kodujących receptory adiponektyny nie jest jeszcze dobrze poznana. Wiadomo, że zmiana diety ze standardowej na wysokowęglowodanową obniża u myszy ekspresję genu kodującego AdipoR1 w tkance tłuszczowej i słabo obniża lub nie wpływa na ekspresję genu kodującego AdipoR2 [52]. Podobnych zmian ekspresji AdipoR1 i AdipoR2 nie zaobserwowano ani w mięśniach szkieletowych, ani w wątrobie [52].

W różnych modelach otyłości zaobserwowano, że ekspresja genów kodujących receptor adiponektyny w WAT otyłych zwierząt jest niższa niż u szczupłych osobników lub też, że nie ma zmian w porównaniu do zwierząt chudych. Ekspresja genu kodującego receptor AdipoR1 w tkance tłuszczowej otyłych szczurów *fa/fa* była niższa niż u szczupłych szczurów w badaniach Oana i wsp. [128], podczas gdy grupa Beylot i wsp. [12] wykazała niższą ekspresję genu kodującego AdipoR2 u otyłych szczurów. Podobnie u otyłych myszy szczepu *ob/ob* i *KKy* ekspresja obu genów kodujących receptor adiponektyny jest niższa niż u myszy chudych [185, 186].

Adiponektyna odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów, jednak jej szlak sygnałowy nie został jeszcze w pełni poznany. Wewnątrz komórki w ścieżce sygnałowej adiponektyny uczestniczy najprawdopodobniej jądrowy receptor PPAR α i AMPK, która ulega fosforylacji pod wpływem adiponektyny [106, 205]. Adiponektyna reguluje przemiany węglowodanów i kwasów tłuszczowych w różny sposób w poszczególnych narządach i tkankach. Istotną rolę w mechanizmie jej działania odgrywa zdolność do tworzenia multimerów. Od stopnia oligomeryzacji adiponektyny zależy swoistość jej oddziaływania z receptorami, a następnie aktywacja odpowiednich ścieżek sygnałowych oraz wpływ na zmiany metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych [184, 204, 205]. W mięśniach szkieletowych, w których dominuje postać AdipoR1 receptora adiponektyny, trimery adiponektyny przez aktywację ścieżki sygnałowej z udziałem AMPK zwiększają pobieranie i utlenianie glukozy, a po obniżeniu aktywności karboksylazy acetylo-CoA (ACC), wywołują wzrost utleniania kwasów tłuszczowych [204, 205]. W dojrzałych izolowanych adipocytach, gdzie występują obie formy receptora adiponektyny, globularna forma adiponektyny zwiększa aktywność AMPK [73, 106]. Natomiast w wątrobie, gdzie przeważa postać AdipoR2 receptora, regulacja przemian glukozy i kwasów tłuszczowych zachodzi głównie pod wpływem multimerów adiponektyny (HMW) [74, 204, 205]. Wiązanie HMW z receptorem AdipoR2 aktywuje w hepatocytach, podobnie jak w miocytach, ścieżkę sygnałową z udziałem AMPK, co z kolei prowadzi do obniżenia aktywności ACC i do stymulacji utleniania kwasów tłuszczowych [204]. Ponadto po związaniu HMW przez AdipoR2 obserwuje się w wątrobie zahamowanie glukoneogenezy [27, 204]. Pod wpływem adiponektyny dochodzi więc do zwiększenia zużycia glukozy i kwasów tłuszczowych w mięśniach oraz do zwiększonego utleniania kwasów tłuszczowych i zahamowania syntezy glukozy w wątrobie. Zaburzenia w powstawaniu multimerów i w wydzielaniu adiponektyny do krwi, będące wynikiem mutacji w genie adiponektyny, oraz towarzysząca hipoadiponektynemia są związane ze zmniejszonym zużyciem glukozy i rozwojem cukrzycy typu 2 [72]. Adiponektyna bierze również udział w hamowaniu procesu powstawania zmian miażdżycowych –

gromadzi się w przestrzeni podśródbłonkowej uszkodzonej tętnicy, hamuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonka naczyń i powstrzymuje rozwój odczynu zapalnego, hamuje także akumulację lipidów w makrofagach oraz transformację makrofagów w komórki piankowe [71].

1.4. Rezystyna – regulacja biosyntezy w tkance tłuszczowej i udział w regulacji funkcji tej tkanki

Rezystyna, nazywana również ADSF (ang. adipocyte-specific secretory factor) i FIZZ3 (ang. found in inflammatory zone 3), jest białkiem zbudowanym ze 108 aminokwasów u ludzi, natomiast u myszy i szczura ze 114 aminokwasów [58, 80, 173]. Białko to jest kodowane przez gen *Retn* (u człowieka *RETN*). Charakterystyczną cechą rezystyny jest duża liczba reszt cysteiny w łańcuchu polipeptydowym [6, 80, 173]. W domenie karboksylowej rezystyny znajduje się 10 reszt cysteiny, między którymi powstaje pięć wiązań dwusiarczkowych, istotnych w procesie poprawnego fałdowania tej, przyjmującej globularny kształt, części białka [133]. Z kolei w domenie N-końcowej znajduje się jedna reszta cysteiny, która pozwala na utworzenie połączonych wiązaniem dwusiarczkowym homodimerów rezystyny [6, 133]. W wyniku wzajemnego łączenia się trzech pojedynczych cząsteczek rezystyny – protomerów – powstają trimery, natomiast połączenie trzech dimerów rezystyny prowadzi do powstania heksamerów rezystyny. Rezystyna występuje we krwi w obu postaciach, z przewagą heksamerów, które stanowią 80-90% [133]. Wymienione postaci oligomeryczne rezystyny różnią się aktywnością biologiczną – trimery w znacznie większym stopniu obniżają wrażliwość wątroby na insulinę. Wydaje się, że do osiągnięcia pełnej aktywności biologicznej rezystyna wymaga przekształcenia z postaci heksameru do trimeru [133].

Ekspresję genu kodującego rezystynę wykazano początkowo w tkance tłuszczowej myszy [173]. W wyniku kolejnych badań ekspresję genu *Retn* wykazano w mózgu myszy – w podwzgórzu i korze, a w okresie dojrzewania również w przysadce mózgowej [124]. Z kolei u szczura wykryto obecność mRNA rezystyny w białej i brunatnej tkance tłuszczowej, a także w żołądku, jelicie, nadnerczach i w mięśniach szkieletowych [80, 127]. Wśród komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej szczura gen kodujący rezystynę ulega ekspresji tylko w dojrzałych adipocytach; natomiast w preadipocytach mRNA rezystyny jest początkowo niewykrywalny – pojawia się dopiero w późnym stadium różnicowania w kierunku adipocytów, podobnie jak inne transkrypty charakterystyczne dla dojrzałych adipocytów: mRNA receptora PPAR γ , adipocytarne białko wiążące kwasy tłuszczowe (aFABP) i desaturaza stearoilo-CoA 1 (SCD1) [80]. W badaniach przeprowadzonych na skrawkach ludzkiej tkanki tłuszczowej najwyższy poziom mRNA rezystyny oraz największą ilość tego białka zaobserwowano w podskórnej tkance tłuszczowej, pobranej z okolic brzucha, oraz w brzusznej tkance tłuszczowej [116, 117, 154]. Gen *RETN* ulega ekspresji w preadipocytach i dojrzałych adipocytach, jednak w dojrzałych adipocytach izolowanych zarówno z brzusznej, jak i podskórnej tkanki tłuszczowej pacjentów poziom mRNA rezystyny był bardzo niski [64, 117]. Wielokrotnie wyższy poziom mRNA i samej rezystyny zaobserwowano w preadipocytach izolowanych z tych samych tkanek [64, 117]. Ludzkie preadipocyty wydzielają również znacznie więcej rezystyny niż dojrzałe adipocyty [117]. Obecność mRNA rezystyny wykryto u człowieka również w monocytach i w łożysku [154, 207].

Regulacja ekspresji genu kodującego rezystynę nie została jeszcze poznana. W linii komórkowej adipocytów mysich 3T3-L1 biosynteza i wydzielanie rezystyny zależą od stopnia dojrzałości komórek. W preadipocytach linii 3T3-L1 nie zachodzi ekspresja genu kodującego rezystynę, mRNA rezystyny pojawia się dopiero w trzecim i czwartym dniu od rozpoczęcia różnicowania komórek w kierunku adipocytów, nieznacznie później niż mRNA PPAR γ , C/EBP α i SREBP-1 [80, 157, 173]. Wydaje się, że indukcja transkrypcji genu *Retn* w dojrzewających komórkach linii 3T3-L1 zachodzi głównie pod wpływem C/EBP α [53]. Preadipocyty tej linii nie wydzielają rezystyny do środowiska wzrostowego, natomiast dojrzałe komórki uwalniają rezystynę w postaci homodimerów [6].

W odróżnieniu od dość dobrze poznanego wpływu receptora PPAR γ na ekspresję genu *Retn* w dojrzewających adipocytach linii 3T3-L1, rola tego receptora w regulacji ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej zwierząt i człowieka jest mniej określona. Wyniki pierwszych badań wskazywały, że aktywacja receptora PPAR γ przez podanie rosiglitazonu prowadzi do spadku poziomu rezystyny w surowicy krwi chudych myszy FVB/N [173]. W badaniach opublikowanych w tym samym roku przez inną grupę badawczą wykazano jednak, że ekspresja genu *Retn* wzrasta w tkance tłuszczowej myszy *ob/ob* i cukrzycowych szczurów ZDF, którym podano rosiglitazon lub inne związki aktywujące receptor PPAR γ [200]. Wzrost ilości mRNA rezystyny zaobserwowano również w tkance tłuszczowej myszy, zarówno chudych, jak i otyłych, karmionych dietą zawierającą różne związki z grupy tiazolidinedionów [42]. Wyniki nowszych badań przeprowadzonych na grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 wskazują, że długotrwała terapia rosiglitazonem (aktywatorem receptora PPAR γ) prowadzi do znacznego spadku ilości mRNA rezystyny w podskórnej tkance tłuszczowej badanych osób [93]. Niewiele wiadomo o możliwym udziale receptorów PPAR α w regulacji ekspresji genu kodującego rezystynę. U myszy, którym podawano fenofibrat, stężenie rezystyny w surowicy krwi było wyższe niż w grupie kontrolnej [52]. Podobnie wzrósł poziom mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej.

Ekspresja genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej podlega regulacji hormonalnej. Istotną rolę w tej regulacji niewątpliwie odgrywa insulina, jednak jej wpływ na biosyntezę rezystyny nie jest jeszcze dobrze poznany. Badania przeprowadzone dotychczas na linii komórkowej mysich adipocytów 3T3-L1 oraz na modelach zwierzęcych dostarczyły sprzecznych wyników. W adipocytach linii 3T3-L1 insulina obniża ekspresję genu *Retn* i ilość rezystyny [165]. Z kolei w badaniach *in vivo* insulina wyraźnie indukuje ekspresję genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej zwierząt [80, 200]. U myszy z cukrzycą wywołaną podaniem streptozotocyny poziom mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej jest bardzo niski, jednak po podaniu insuliny obserwuje się wielokrotny (23-krotny po 30 minutach od podania insuliny) wzrost ilości tego mRNA [80]. Podobne zmiany ekspresji genu *Retn* zaobserwowano w tkance tłuszczowej cukrzycowych szczurów ZDF po 6 godzinach od podania insuliny [200]. Wyniki powyższych badań wskazują na istnienie istotnych różnic w regulacji ekspresji genów między linią komórkową adipocytów 3T3-L1 a dojrzałymi adipocytami izolowanymi z tkanki tłuszczowej. Glukokortykosteroidy, nawet w niskim stężeniu, znacznie zwiększają ekspresję genu kodującego rezystynę, zarówno w adipocytach 3T3-L1, jak i w tkance tłuszczowej myszy [165]. Z kolei TNF α silnie hamuje ekspresję genu kodującego rezystynę w komórkach 3T3-L1, znosząc nawet stymulujący wpływ glukokortykosteroidów [165]. Katecholaminy również obniżają ekspresję genu *Retn* w adipocytach linii 3T3-L1 [165].

Myszy karmione dietą bogatą w węglowodany mają niższe stężenie rezystyny w surowicy krwi oraz niższy poziom mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej [52, 175]. U myszy karmionych dietą wysokotłuszczową i wysokobiałkową stężenie rezystyny w surowicy krwi jest wyższe niż u zwierząt karmionych dietą wysokowęglowodanową [175]. Podobnie, w otyłości wywołanej dietą wysokotłuszczową u szczurów zaobserwowano wzrost poziomu mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej z najadrzy [81].

Działanie rezystyny jako hormonu mimo kilku lat badań nie zostało bliżej poznane. Rezystyna została przez jej odkrywców opisana jako hormon peptydowy, wydzielany do krwi przez adipocyty i zwiększający oporność organizmu na insulinę [173]. Proponowano w związku z tym, że rezystyna może być długo poszukiwanym czynnikiem łączącym otyłość z patogenezą cukrzycy typu 2. Wyniki pierwszych badań zdawały się potwierdzać tę tezę – wykazano, że stężenie rezystyny w surowicy krwi wzrasta podczas wywołanej dietą otyłości oraz w genetycznych modelach otyłości i oporności na insulinę [173]. U otyłych myszy, wykazujących oporność na działanie insuliny, neutralizacja rezystyny za pomocą przeciwciał zmniejszała hiperglikemię, między innymi dzięki zwiększeniu wrażliwości na insulinę, a w hodowli adipocytów linii 3T3-L1 powodowała zwiększenie stymulowanego przez insulinę pobierania glukozy [173]. Natomiast podawanie rekombinowanej rezystyny mimo, że nie miało wpływu na poziom insuliny, zaburzało tolerancję glukozy i obniżało wrażliwość na działanie insuliny *in vivo* u myszy oraz *in vitro* w linii komórkowej adipocytów [173]. Rezystyna osłabia działanie insuliny na wątrobę, obniżając hamujący wpływ insuliny na glukoneogenezę wątrobową i zwiększając tempo rozkładu glikogenu [133, 140]. Wskazuje to na udział rezystyny w powstawaniu poposiłkowej hiperglikemii. Ponadto u myszy z przewlekłą hiperrezystynią zaobserwowano podwyższone stężenie glukozy we krwi wynikające ze zwiększonej glukoneogenezy wątrobowej [143]. Z kolei myszy pozbawione genu kodującego rezystynę wykazują niski poziom glukozy po głodzeniu spowodowany najprawdopodobniej obniżoną glukoneogenezą wątrobową. Również obniżenie stężenia rezystyny we krwi wywołuje spadek stężenia glukozy u głodzonych myszy spowodowany zahamowaniem wątrobowej glukoneogenezy [7]. Mysia i ludzka rezystyna w postaci oligomerycznej zmniejsza pobieranie i transport przez błonowy glukozy w kardiomiocytach [46]. Ponadto wykazano, że stężenie rezystyny we krwi zmienia się wraz ze zmianami stężenia glukozy i insuliny [141].

Wyniki badań opublikowane przez inne zespoły dowodzą, że rezystyna może być inhibitorem różnicowania adipocytów regulowanym przez zasoby energetyczne organizmu i przeciwdziałającym rozrostowi tkanki tłuszczowej [80, 89, 190]. Rezystyna hamuje dojrzewanie adipocytów linii 3T3-L1 – w jej obecności różnicowanie preadipocytów linii 3T3-L1 w kierunku adipocytów zachodzi mniej wydajnie, obserwuje się przy tym znaczny spadek ekspresji genów kodujących PPAR γ , aFABP i syntazę kwasów tłuszczowych (FAS) – transkryptów charakterystycznych dla dojrzałych adipocytów [80]. Z uwagi na znaczny wzrost ekspresji genu kodującego rezystynę w późnym stadium adipogenezy oraz jego indukcję w tkance tłuszczowej podczas głodzenia i karmienia wydaje się, że rezystyna może pełnić funkcję czujnika stanu odżywienia organizmu, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego działa jako czynnik hamujący dojrzewanie adipocytów i ograniczający rozrost tkanki tłuszczowej [80]. Ludzka rezystyna, w odróżnieniu od mysiej, zwiększa lipolizę w hodowli ludzkich adipocytów oraz w skrawkach tkanki tłuszczowej myszy [130].

Nie poznano jeszcze receptora rezystyny ani narządów i tkanek docelowych tego hormonu. Właściwa rola rezystyny w organizmie jest nadal niejasna, a jej poznanie wymaga dalszych badań.

1.5. Regulacja metabolizmu węglowodanów i lipidów w tkance tłuszczowej

Główne szlaki metaboliczne zachodzące w tkance tłuszczowej są związane z przemianami węglowodanów i lipidów. Synteza lipidów zapasowych w formie triacylogliceroli zależy od stanu odżywienia organizmu oraz od stężenia insuliny i glukozy we krwi [44, 63]. W przerwach pomiędzy posiłkami w tkance tłuszczowej może zachodzić lipoliza, w czasie której ze zgromadzonych triacylogliceroli uwolnione zostają wolne kwasy tłuszczowe i glicerol. Większość z nich opuszcza tkankę tłuszczową i pojawia się w krążeniu, natomiast część kwasów tłuszczowych podlega powtórnej reestryfikacji. Lipogeneza prowadząca do syntezy triacylogliceroli w tkance tłuszczowej w czasie dobrego odżywienia oraz lipoliza, dzięki której zmagazynowane w triacyloglicerolach kwasy tłuszczowe mogą stać się substratem energetycznym organizmu pozwalają zachować równowagę energetyczną, która jest konieczna do harmonijnego wzrostu i rozwoju organizmu oraz do utrzymania go w zdrowiu. Równowaga ta utrzymywana jest dzięki złożonemu układowi wielu procesów regulujących syntezę i rozkład triacylogliceroli. Najbardziej efektywnym mechanizmem kontroli tak złożonego układu jest regulacja transkrypcji genów kodujących najważniejsze białka biorące w nim udział. W regulacji ekspresji genów kluczową rolę odgrywają receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne, które poprzez oddziaływanie z odpowiednimi sekwencjami w DNA, tak zwanymi elementami odpowiedzi znajdującymi się zwykle w regionie promotorowym genu, mogą indukować lub, rzadziej, hamować ekspresję genu. Te procesy regulacyjne są precyzyjnie kontrolowane i prowadzą do ustalenia się stałej masy tkanki tłuszczowej.

Dosyć dobrze zostały poznane czynniki transkrypcyjne oraz wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe aktywowane w procesie adipogenezy, a także wzajemne zależności pomiędzy nimi. W procesie różnicowania adipocytów ważną rolę odgrywa insulina, ponieważ brak substratów receptora insuliny, IRS-1 i IRS-2 – przekaźników sygnału insuliny, uniemożliwia różnicowanie tych komórek [118, 149]. W warunkach zablokowania ścieżki sygnałowej insuliny obserwuje się również obniżoną ekspresję genów kodujących PPAR γ i C/EBP α [118]. Uważa się, że głównym czynnikiem transkrypcyjnym, który może pośredniczyć w przekazywaniu sygnału insuliny i regulować ekspresję genów związanych z przemianami węglowodanów i lipidów w różnicujących adipocytach jest SREBP-1 [14, 162]. Pozostaje pytanie, czy podobne zależności zachodzą w dojrzałych adipocytach i jaki jest udział poszczególnych receptorów jądrowych i czynników transkrypcyjnych w regulacji funkcji tkanki tłuszczowej.

Jądrowe receptory hormonów reagują na stan metaboliczny komórki wiążąc się z substratami, związkami pośrednimi lub produktami końcowymi różnych szlaków metabolicznych. Do najważniejszych czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji ekspresji genów kodujących białka związane z metabolizmem węglowodanów i lipidów w adipocytach należą receptory jądrowe PPAR oraz czynnik transkrypcyjny SREBP-1 [77, 183]. Do tej grupy receptorów jądrowych dodano ostatnio wątrobowy receptor X (LXR), który uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących

enzymy związane z przemianami lipidów. W regulacji transkrypcji genów przez opisane wyżej receptory jądrowe bierze udział także receptor kwasu 9-*cis*-retinowego (RXR). Receptor ten może wiązać pochodne kwasu retinowego, a jego obecność jest niezbędna do utworzenia aktywnego transkrypcyjnie heterodimeru PPAR-RXR oraz heterodimeru LXR-RXR.

Białka SREBP, wiążące się z elementem odpowiedzi na sterole (SRE), odgrywają istotną rolę w regulacji metabolizmu lipidów i cholesterolu [174]. Rodzinę białek SREBP tworzą kodowane przez jeden gen i powstające dzięki alternatywnemu składaniu transkryptów białka SREBP-1a i SREBP-1c oraz kodowane przez inny gen białko SREBP-2 [174]. W obrębie genu kodującego SREBP-1 znajdują się dwa regiony promotorowe, w których może rozpocząć się transkrypcja. Dzięki temu w wyniku transkrypcji powstają dwa rodzaje mRNA różniące się pierwszym eksonem. Powstające następnie białka, nazywane formą 1a i 1c, zawierają różne sekwencje aminokwasów na N-końcu, pozostała część białka jest jednakowa [163].

Wszystkie trzy izoformy SREBP pełnią podobne funkcje i regulują syntezę lipidów w tkankach ssaków. Główną rolą SREBP-2 jest regulacja ekspresji genów związanych ze szlakiem syntezy cholesterolu, natomiast SREBP-1a i SREBP-1c są bardziej specyficzne wobec genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych [14, 132, 162]. Obydwie izoformy SREBP-1 wykazują nietypową specyficzność wiązania DNA i wiążą się zarówno z SRE-1, jak i z palindromowymi sekwencjami nazywanymi E-box, które występują w regionach promotorowych genów enzymów lipogennych [174].

Do grupy ważnych w regulacji metabolizmu czynników transkrypcyjnych należą również białka wiążące się z sekwencją wzmacniającą CAAT (C/EBP), a także białko wiążące się z elementem odpowiedzi na węglowodany (ChREBP), regulujące przemiany węglowodanów i lipidów [30, 44, 150, 187]. Pod wpływem czynników dietetycznych i/lub metabolitów powstających w organizmie dochodzi do aktywacji wymienionych czynników transkrypcyjnych, te z kolei modulują ekspresję regulowanych przez nie genów i uruchamiają w ten sposób szereg procesów odpowiadających za dostosowanie metabolizmu komórek, narządów i całego organizmu do aktualnych warunków.

Lipoliza, proces hydrolizy triacylogliceroli zmagazynowanych w tkance tłuszczowej, zachodzi dzięki aktywności lipaz, głównie specyficznej dla adipocytów lipazy triacyloglicerolowej (ATGL) i lipazy zależnej od hormonów (HSL) [212]. Do niedawna za najważniejszy enzym lipolizy uważana była HSL. Wiadomo jednak, że u myszy *Hsl*^{-/-} lipoliza w tkance tłuszczowej zachodzi mimo braku tego enzymu [131, 197]. Obecnie wydaje się, że to raczej ATGL jest główną lipazą odpowiedzialną za hydrolizę triacylogliceroli w tkance tłuszczowej [168, 212]. Regulacja ekspresji genu kodującego ATGL nie została jeszcze poznana; jednak z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że odbywa się ona głównie na etapie transkrypcji [212]. Wiadomo, że ilość mRNA ATGL rośnie podczas głodzenia i spada podczas następującego po nim karmienia [191]. W hodowli adipocytów 3T3-L1 ATGL jest indukowana przez glukokortykosteroidy, jednak molekularny mechanizm tej regulacji nie jest znany [191]. Niedawno wykazano, że aktywatory receptora PPAR γ wywołują indukcję genu kodującego ATGL, zarówno *in vitro* w hodowli adipocytów 3T3-L1, jak i *in vivo* w tkance tłuszczowej myszy *ob/ob* [76]. Wiadomo również, że enzym ten nie jest regulowany przez fosforylację zależną od kinazy białkowej A (PKA), lecz prawdopodobnie ulega fosforylacji przy udziale innej, nie poznanej jeszcze kinazy [191, 212].

Ponieważ uważa się, że głównymi receptorami jądrowymi regulującymi różnicowanie adipocytów, wydzielanie adipokin oraz metabolizm węglowodanów i lipidów

w tkance tłuszczowej są receptory PPAR, ich udział w regulacji funkcjonowania adipocytów będzie przedstawiony w odrębnym rozdziale.

1.6. Udział receptorów PPAR w regulacji wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej

We wczesnych badaniach nad receptorami PPAR wykazano, że są one aktywowane przez związki wywołujące proliferację peroksyosomów w wątrobie gryzoni [155]. Dało to początek stosowanej do dzisiaj nazwie tej grupy receptorów: „receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów”. Receptory PPAR są czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny jądrowych receptorów hormonów [183]. Ponieważ mimo wieloletnich badań nie udało się znaleźć hormonów, które byłyby specyficznymi ligandami tych receptorów, PPAR były określane mianem „receptorów sierocych” (ang. *orphan receptors*). Obecnie uważa się, że receptory PPAR działają raczej jako czujniki metaboliczne, wrażliwe na zmiany stężenia kwasów tłuszczowych i innych metabolitów, a nie jak typowe receptory hormonów. Wiązanie liganda prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej receptora PPAR. Aktywowane PPAR regulują ekspresję szeregu genów związanych z wieloma szlakami metabolicznymi, dopasowując intensywność poszczególnych szlaków do zmieniających się warunków fizjologicznych, o których informują zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia kwasów tłuszczowych i eikozanoidów.

Znane są trzy podstawowe izoformy PPAR: PPAR α , PPAR γ i PPAR δ [155]. Ich aktywność może być regulowana farmakologicznie przez wiele związków, z których najważniejsze są fibraty aktywujące receptor PPAR α i tiazolidinediony (TZD) aktywujące PPAR γ [98, 155]. Receptory jądrowe PPAR tworzą heterodimery z receptorem RXR, a następnie wiążą się z docelową sekwencją w promotorach różnych genów nazywaną elementem odpowiedzi na proliferatory peroksyosomów (PPRE) [155]. Z heterodimerem PPAR-RXR wiążą się różne koaktywatory lub korepresory odpowiednio modyfikując aktywność transkrypcyjną heterodimeru. PPAR mogą być dodatkowo regulowane przez fosforylację, ponadto na aktywność heterodimeru PPAR-RXR wpływają także ligandy RXR. Poszczególne izoformy PPAR odgrywają kluczową rolę w homeostazie lipidowej. Ponadto receptory te uczestniczą w homeostazie węglowodanów, wpływają na proliferację i różnicowanie komórek, regulują ekspresję genów kodujących adipokiny oraz biorą udział w hamowaniu procesów zapalnych [18, 77, 155, 170].

W tkance tłuszczowej dominuje receptor PPAR γ , który występuje również w niewielkim stężeniu w wielu innych tkankach ssaków [16]. U człowieka ekspresja genu kodującego PPAR γ może być regulowana przez cztery różne regiony promotorowe. Na matrycy powstających transkryptów są syntetyzowane dwie formy białka różniące się długością: krótsza odpowiadająca transkryptom PPAR γ 1, PPAR γ 3 i PPAR γ 4 oraz forma dłuższa odpowiadająca transkryptowi PPAR γ 2. Izofoma PPAR γ 1 występuje w największej ilości w tkance tłuszczowej i w jelicie grubym, natomiast w mniejszej ilości w nerce, wątrobie, mięśniach szkieletowych i gładkich, trzustce i w jelicie cienkim [4, 35, 60, 109]. Izofoma PPAR γ 2 jest charakterystyczna dla tkanki tłuszczowej [36]. Jak dotąd nie znaleziono zdecydowanych różnic w aktywności transkrypcyjnej tych dwóch izoform receptora PPAR γ , wiadomo jednak, że PPAR γ 2 najprawdopodobniej odpowiada za regulację adipogenezy [19].

Tkanka tłuszczowa syntetyzuje i wydziela wiele hormonów, cytokin i innych białek, które wpływają na przemiany energetyczne organizmu. Powstające w tkance tłuszczowej cząsteczki sygnałowe mogą modulować działanie insuliny zarówno bezpośrednio w tkance tłuszczowej, jak i pośrednio w innych tkankach i narządach np. w mięśniach szkieletowych i wątrobie. Spośród hormonów syntetyzowanych w tkance tłuszczowej wiele może wpływać na wrażliwość komórek na insulinę, lecz niewątpliwie do najważniejszych i charakterystycznych dla tej tkanki należy zaliczyć leptynę, adiponektynę i rezystynę. W różnych modelach doświadczalnych biosynteza i wydzielanie tych hormonów jest regulowana przez leki z grupy TZD – aktywatory receptora PPAR γ zwiększające wrażliwość komórek na insulinę [54, 66, 90, 93, 206]. Biorąc pod uwagę, że ligandy PPAR γ obniżają ekspresję genu kodującego leptynę, hormon ten raczej nie jest czynnikiem zwiększającym wrażliwość tkanek na insulinę po podaniu TZD [31, 66]. Adiponektyna, uważana za hormon zwiększający wrażliwość na insulinę jest indukowana w adipocytach przez PPAR γ pod wpływem TZD [28, 54, 206]. Z kolei rezystyna, która może zwiększać oporność komórek na insulinę oraz hamować różnicowanie i dojrzewanie adipocytów, ulega w tkance tłuszczowej represji pod wpływem PPAR γ i indukcji pod wpływem PPAR α [89, 93, 165, 173]. U myszy z wyłączonym genem PPAR γ w tkance tłuszczowej zaobserwowano spadek stężenia adipokin we krwi (autorzy zmierzili stężenie leptyny i adiponektyny), towarzyszący temu spadek wrażliwości tkanek na insulinę i wzrost syntezy glukozy w wątrobie [55].

Przytoczone wyżej dane mogą świadczyć o tym, że aktywacja receptorów PPAR γ w tkance tłuszczowej może pośrednio, poprzez wzrost syntezy i wydzielania niektórych adipokin, wpływać na wrażliwość różnych komórek na insulinę.

1.7. Dieta a funkcje tkanki tłuszczowej

Od wielu lat uważano, że lipogeneza *de novo* u człowieka przebiega głównie w wątrobie, zupełnie pomijając przy tym rolę tkanki tłuszczowej w tym procesie. Z badań przeprowadzonych przez Marin i wsp. [113] wynika, że tkanka tłuszczowa człowieka pobiera niewielkie ilości glukozy. W badaniach tych zaobserwowano również, że atomy węgla pochodzące z glukozy znajdują się głównie w składniku glicerolowym triacylogliceroli, co wskazuje, że synteza kwasów tłuszczowych zachodząca *de novo* w ludzkiej tkance tłuszczowej ma niewielkie znaczenie. Mimo nadal panującego przekonania, że w całkowitej syntezie lipidów u człowieka udział lipogenezy zachodzącej w tkance tłuszczowej jest mniejszy niż tej przebiegającej w wątrobie, w ostatnich latach ludzka tkanka tłuszczowa budzi coraz większe zainteresowanie jako miejsce biosyntezy lipidów. Wykazano, że w ludzkiej tkance tłuszczowej obecne są wszystkie aktywności enzymatyczne niezbędne do syntezy kwasów tłuszczowych [177]. Ponadto u pacjentów z defektem LPL nie obserwuje się zmian w ilości tkanki tłuszczowej, co może sugerować, że w ludzkiej tkance tłuszczowej wobec braku napływu kwasów tłuszczowych z krwiobiegu może następować ich synteza *de novo* [17]. Zdolność do syntezy kwasów tłuszczowych w adipocytach jest obniżona u osób otyłych [33]. Również ekspresja genu kodującego SREBP-1, główny czynnik transkrypcyjny regulujący syntezę lipidów, jest obniżona w tkance tłuszczowej osób otyłych, co jest skorelowane ze spadkiem ilości mRNA FAS i ACC, kluczowych enzymów lipogennych [33, 129]. Letexier i wsp. [102] wykazali, że w trzewnej tkance tłuszczowej poziom mRNA innego czynnika transkryp-

cyjnego związanego z syntezą lipidów, ChREBP, również jest niższy u osób otyłych niż u szczupłych. Sugeruje to istnienie mechanizmów regulujących masę tkanki tłuszczowej, które ograniczają syntezę lipidów przy wzroście masy tej tkanki.

Aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej człowieka jest niższa niż u szczura, niższy jest także poziom mRNA FAS i ACC [119, 177]. Główną przyczyną tych różnic może być inny skład diety – w diecie człowieka jest zwykle dużo lipidów, natomiast podstawowym składnikiem standardowej paszy, którą karmione są szczury laboratoryjne, są węglowodany. Gdy porównano lipogenezę w tkance tłuszczowej człowieka i szczura karmionego dietą wysokotłuszczową, różnice te były mniejsze [102, 177]. Ponadto zmiana diety na wysokowęglowodanową prowadzi do stymulacji lipogenezy w tkance tłuszczowej [59]. Ilość mRNA SREBP-1c w ludzkiej i szczurzej tkance tłuszczowej jest podobna, natomiast stężenie białka tego czynnika transkrypcyjnego jest niższe w ludzkiej tkance tłuszczowej w porównaniu z tkanką tłuszczową szczura [102]. Także poziom mRNA czynnika ChREBP jest niższy w ludzkiej niż w szczurzej tkance tłuszczowej. W oparciu o te wyniki wydaje się, że różnice w intensywności lipogenezy obserwowane między tymi dwoma gatunkami mogą również wynikać z mniejszej ilości czynników transkrypcyjnych SREBP-1 i ChREBP u człowieka. Pomimo różnic w intensywności lipogenezy obecność takich samych czynników transkrypcyjnych sugeruje, że w ludzkiej i szczurzej tkance tłuszczowej mogą funkcjonować podobne mechanizmy regulujące przemianę lipidów, oraz że ilościowe zmiany diety, podobne do opisanych w niniejszej rozprawie, mogą powodować analogiczne do opisanych zmiany regulacji metabolizmu lipidów w tkance tłuszczowej człowieka. Wyniki przeprowadzonych badań i wyciągnięte na ich podstawie wnioski mogą zatem mieć odniesienie do mechanizmów regulacyjnych zachodzących w ludzkiej tkance tłuszczowej.

Nadmierny wzrost masy tkanki tłuszczowej prowadzi do otyłości, z którą wiąże się wiele procesów patologicznych, takich jak zespół metaboliczny, oporność na insulinę, nietolerancja glukozy i cukrzyca typu 2. W terapii otyłości stosuje się metody chirurgiczne, farmakologiczne oraz dietetyczne. Metodą z wyboru w leczeniu zaawansowanych stadiów otyłości jest postępowanie chirurgiczne. W mniejszym stopniu otyłości zaleca się postępowanie farmakologiczne i/lub zmianę diety pacjenta oraz aktywność fizyczną. Czasami, w nieudanych próbach leczenia otyłości u pacjentów, którzy wbrew zaleceniom prowadzącego lekarza lub dietetyka po okresach głodówki wpadali w okres „objadania się”, dochodzi do gwałtownego wzrostu masy ciała. Zjawisko to, jak najbardziej niepożądane i dające wyniki odwrotne od oczekiwanych, określane jest jako „efekt jo-jo”. Molekularne mechanizmy regulacyjne związane ze zmianami masy ciała i masy tkanki tłuszczowej u pacjentów podczas różnych manipulacji dietetycznych są stale przedmiotem badań.

Modele zwierzęce są niezbędne w badaniach wpływu różnych manipulacji dietetycznych na organizm i jego poszczególne tkanki, między innymi z powodu późnego ujawniania się niektórych zmian wywołanych dietą. Zmiany wywołane dietą są możliwe do zmierzenia w populacji ludzkiej, jeśli zachodzą w stosunkowo krótkim czasie; jednak zmiany długoterminowe, zarówno korzystne, jak i niekorzystne, są trudne do oszacowania u ludzi, przede wszystkim z powodu długiego czasu życia człowieka. Badanie mechanizmów, które są uruchamiane podczas stosowania diety, ale ujawniają się z opóźnieniem, jest możliwe w modelach doświadczalnych z udziałem zwierząt laboratoryjnych, ponieważ ich czas życia jest stosunkowo krótki. Doświadczenia trwające kilka tygodni u szczurów zajmują niemal 1/10 ich czasu życia. Gdyby te same badania miały być przeprowadzone w populacji ludzkiej, musiałyby trwać kilka lat. Spośród różnych

zwierzęcych modeli doświadczalnych na uwagę zasługują badania wykonywane z zastosowaniem szczurów rasy Wistar, ponieważ ta rasa gryzoni dobrze odpowiada na różne manipulacje dietetyczne [169].

Główne szlaki metaboliczne, które zachodzą w tkance tłuszczowej obejmują przemiany węglowodanów oraz lipidów prowadzące do biosyntezy oraz hydrolizy triacylogliceroli. Intensywność tych przemian metabolicznych zależy w dużym stopniu od stanu odżywienia organizmu. Głodzenie, nawet krótkotrwałe, z reguły wiąże się ze spadkiem aktywności enzymów lipogennych, spowodowanym obniżoną ekspresją kodujących je genów [63, 182]. Z kolei restrykcja kaloryczna, związana ze spadkiem stężenia glukozy i insuliny we krwi, prowadzi do spadku masy tkanki tłuszczowej [63, 171, 182]. Wielokrotne głodzenie i karmienie, jak wynika z naszych wcześniejszych badań na szczurach, prowadzi do zahamowania wzrostu masy ciała i masy tkanki tłuszczowej oraz do spadku stężenia triacylogliceroli w surowicy krwi badanych zwierząt [85, 87, 92]. W opracowanym przez nas modelu doświadczalnym cyklicznego, naprzemiennego głodzenia i karmienia dochodzi jednocześnie do wielokrotnego wzrostu aktywności i ilości mRNA enzymów lipogennych w tkance tłuszczowej oraz wzrostu szybkości syntezy lipidów, który jest specyficzny dla tej tkanki, ponieważ w wątrobie i w brunatnej tkance tłuszczowej nie obserwuje się tak dużych zmian [70, 85, 87, 92]. Ponadto w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu wykazaliśmy metodą Western-blot wzrost ilości czynnika transkrypcyjnego SREBP-1, który odpowiadał wzrostowi ilości białka syntazy kwasów tłuszczowych (FAS) – głównego enzymu odpowiedzialnego za syntezę kwasów tłuszczowych *de novo* [84]. Zaobserwowaliśmy, że aktywność FAS w tkance tłuszczowej szczurów poddanych uprzednio wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu po 12 dniach karmienia *ad libitum* była nadal istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Natomiast u szczurów głodzonych przez 3 dni aktywność FAS w WAT spadła do wartości kontrolnych już w szóstym dniu karmienia *ad libitum* [92]. Świadczy to o tym, że wielokrotne głodzenie i karmienie wywołuje specyficzne dla tkanki tłuszczowej zmiany ekspresji genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych *de novo* i te zmiany utrzymują się przez co najmniej kilkanaście dni.

Molekularne mechanizmy regulacji wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej w trakcie głodzenia i następującego po nim karmienia nie są wyjaśnione, dlatego też w ramach niniejszej rozprawy postanowiono zbadać na zwierzęcym modelu doświadczalnym, jakie zmiany zachodzą w tkance tłuszczowej podczas cyklicznej podaży pokarmu i czy zmiany te są inne niż przy ograniczonej podaży pokarmu (dieta redukcyjna). W tym celu szczury poddano ośmiu cyklom naprzemiennego głodzenia i karmienia, z których każdy składał się z 3 dni głodzenia i 3 dni karmienia; trwającym w sumie 48 dni. Wybrano liczbę ośmiu cykli głodzenia i karmienia, ponieważ we wcześniejszych badaniach po ośmiu cyklach zaobserwowaliśmy najwyższe aktywności enzymów lipogennych w WAT szczurów i po kolejnych cyklach te aktywności już nie rosły [84]. Regulacja wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej odbywa się głównie na etapie transkrypcji genów, w związku z tym skupiono się na badaniach regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej badanych szczurów – wykonano pomiary, które pozwalają odpowiedzieć na pytanie, czy w tym modelu doświadczalnym dochodzi do zmian ekspresji genów i wydzielania leptyny, adiponektyny i rezystyny; zmian ekspresji genów kodujących główne białka, w tym enzymy, związane z przemianami węglowodanów i lipidów w tkance tłuszczowej oraz zmian ekspresji genów najważniejszych w regulacji funkcji tkanki tłuszczowej receptorów jądrowych i czynników transkrypcyjnych.

Otrzymane wyniki wskazują, które procesy ulegają w tkance tłuszczowej największym zmianom podczas wielokrotnego głodzenia i karmienia. Procesy najbardziej wrażliwe na manipulacje dietetyczne mogą być potencjalnym celem nowych metod terapii otyłości, opartych zarówno na zastosowaniu środków farmakologicznych, jak i na zmianie zachowań żywieniowych pacjentów.

2. CEL PRACY

W ramach niniejszej rozprawy podjęto badania, których celem było wyjaśnienie, czy podczas wielokrotnie powtarzanych cykli głodzenia i karmienia w tkance tłuszczowej szczura dochodzi do zmian:

1. biosyntezy i wydzielania niektórych adipokin (leptyny, adiponektyny i rezystyny);
2. ekspresji genów kodujących białka, w tym enzymy, związane z metabolizmem węglowodanów (transport glukozy do komórek i przemiany glukozy do acetylo-CoA, biosynteza glicerolo-3-fosforanu i glicerologeneza) i lipidów (biosynteza kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli, lipoliza, utlenianie kwasów tłuszczowych);
3. ekspresji genów kodujących niektóre receptory jądrowe (PPAR, LXR i RXR) i ich koaktywator (PGC1 α) oraz czynniki transkrypcyjne (SREBP-1, ChREBP i C/EBP α).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Do badań wykorzystano szczury rasy Wistar (samce) o masie ok. 230-250 g na początku doświadczenia. Szczury hodowano pojedynczo w metalowych klatkach i karmiono zrównoważoną paszą laboratoryjną o składzie podanym wcześniej [84]. Co trzy dni ważono zwierzęta oraz paszę w każdej klatce w celu obliczenia ilości spożytego pokarmu. Szczury poddano głodzeniu przez 72 godz. (grupa S), głodzeniu i następującemu po nim karmieniu przez 72 godz. (grupa SR) lub 8 cyklom naprzemiennego głodzenia i karmienia (trwającym w sumie 48 dni), z których każdy składał się z 72 godz. głodzenia i 72 godz. karmienia (grupa MSR). Grupa szczurów PF otrzymywała przez 48 dni codzienną porcję odważonej paszy o masie odpowiadającej średniej masie paszy spożytej przez szczury z grupy MSR w ciągu poprzednich sześciu dni doświadczenia. Zwierzęta z grupy kontrolnej (grupa C) miały nieograniczony dostęp do paszy przez cały czas trwania doświadczenia (tabela 1). Wszystkie szczury miały stały dostęp do wody.

Do analiz pobierano WAT i krew, z której wyizolowano surowicę, rozporcjowano i przechowywano w temp. -80°C do czasu analiz. Pobrane próby przeznaczone do analizy ilości poszczególnych białek (Western-blot) lub analizy ilości mRNA (real-time RT-PCR) zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C . Część pobranego materiału, przeznaczoną do pomiaru aktywności enzymatycznych lub do izolacji komórek, analizowano natychmiast po pobraniu.

Wszystkie badania wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (1/2002, 2/2002, 37/04).

Tabela 1. Grupy doświadczalne szczurów

Table 1. Experimental rat groups

Grupa <i>Group</i>	Traktowanie <i>Treatment</i>	n
C	Grupa kontrolna. <i>Control group.</i>	14
S	Szczury głodzone przez 72 godz. <i>Rats deprived of food for 72 hours</i>	6
SR	Szczury głodzone przez 72 godz. i następnie karmione przez 72 godz. <i>Rats subjected to 72-hour food deprivation and subsequently refeed for 72-hours</i>	6
MSR	Szczury poddane 8 cyklom naprzemiennego głodzenia i karmienia (trwającym w sumie 48 dni), z których każdy składał się z 72 godz. głodzenia i 72 godz. karmienia <i>Rats subjected to eight cycles of 72 hour food deprivation and 72 hour refeeding (for 48 days).</i>	14
PF	Grupa szczurów, która przez 48 dni otrzymywała codzienną porcję odważonej paszy o masie odpowiadającej średniej masie paszy spożytej przez szczury z grupy MSR w ciągu poprzedniego sześciodniowego cyklu głodzenia i karmienia. <i>Pair-fed group – rats were given everyday, for 48 days, weighed amount of food which was equal to the average amount of food consumed by the MSR rats for the period of the previous 6-day cycle of food deprivation and refeeding.</i>	6

3.2. Pomiar stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów

Stężenie glukozy oznaczano spektrofotometrycznie metodą enzymatyczną z heksokinazą i dehydrogenazą glukozy-6-fosforanową (Alpha Diagnostics). Stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi oznaczano metodą enzymatyczną (Roche Diagnostics). Stężenie adiponektyny, leptyny i insuliny oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) zestawami specyficznymi wobec szczurzycy białek (Linco Research). Stężenie rezystyny oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) zestawem specyficznym wobec szczurzej rezystyny (BioVendor Laboratory Medicine). Radioaktywność w próbach mierzono z wykorzystaniem licznika scyntylicyjnego LS6000 (Beckman). Absorbancję mierzono z wykorzystaniem spektrofotometru DU68 (Beckman) i fotometru do mikropłytek MR3600UV (Bio-Rad).

3.3. Izolacja i hodowla adipocytów

Adipocyty były izolowane według zmodyfikowanej metody Rodbella [147]. Skrawki tkanki tłuszczowej (około 1 g) z okolic najądrzy szczurów były inkubowane w środowisku Hanksa (Hank's Balanced Salt Solution; Invitrogen) zawierającym 1 mg/ml kolagenazy H (Roche Molecular Biochemicals) w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 37 °C. Po 30 minutach inkubacji adipocyty były filtrowane przez siatkę nylonową, a następnie płukane trzykrotnie w 10 ml środowiska Hanksa. Do hodowli i pomiarów średnicy komórek użyto tych adipocytów, które pływały na powierzchni środowiska inkubacyjnego po wirowaniu przez 1 min przy 500 x g. Część komórek była fotografowana w mikroskopie odwróconym przy powiększeniu obiektywu 20x w celu zmierzenia ich średnicy. Zdjęcia komórek były analizowane z wykorzystaniem programu komputerowego NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Otrzymane wyniki reprezentują średnie wartości średnicy z około 100-200 adipocytów z każdego preparatu (szczura). Analiza ilości poszczególnych frakcji adipocytów została wykonana programem PeakFit (Jandel Scientific).

Hodowla adipocytów była prowadzona w środowisku M199 (Invitrogen) w 37 °C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki były inkubowane w zawiesinie, po około 100 000 komórek w naczyniu. Po 24 godzinach w środowisku inkubacyjnym, oddzielonym od komórek, mierzono stężenie adipokin metodą RIA lub ELISA z wykorzystaniem tych samych zestawów, jakich użyto do pomiarów stężenia adipokin w surowicy krwi szczurów (Linco Research i BioVendor Laboratory Medicine). W celu wyznaczenia szybkości lipolizy adipocyty były inkubowane przez 1 godzinę, a następnie środowisko było oddzielone od komórek i zostało w nim oznaczone stężenie glicerolu (Roche).

3.4. Pomiar ekspresji genów metodą real-time RT-PCR

3.4.1. Izolacja całkowitego RNA z prób

Skrawki WAT z okolic najądrzy szczurów były homogenizowane w buforze izolacyjnym, a następnie całkowity RNA został wyekstrahowany według metody opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi [23]. Czystość otrzymanego RNA była wyznaczana spektrofotometrycznie stosunkiem absorbancji A260/A280, który dla wszystkich badanych prób wynosił 1,8-2,0.

3.4.2. Pomiar ilości mRNA metodą real-time RT-PCR

Zmiany ilości mRNA badanych genów analizowano dwu-etapową metodą real-time RT-PCR. Synteza cDNA była przeprowadzona na matrycy 1 µg całkowitego RNA z odwrotną transkryptazą AMV (Roche Molecular Biochemicals) z zastosowaniem termocyklera Mastercycler (Eppendorf) lub MyCycler (Bio-Rad). Następnie 10% mieszaniny było przenoszone do mieszaniny reakcyjnej zawierającej QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) lub iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) i 0,3-0,9 µmol/l (w zależności od użytej pary) starterów. Sekwencje starterów podano w tabeli 2. Zmiany ekspresji genów mierzono metodą real-time RT-PCR z zastosowaniem termocyklera LightCycler (Roche Diagnostics), iCycler (Bio-Rad) lub MiniOpticon (Bio-Rad).

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do reakcji real-time RT-PCR

Table 2. Primer sequences used for the real-time RT-PCR

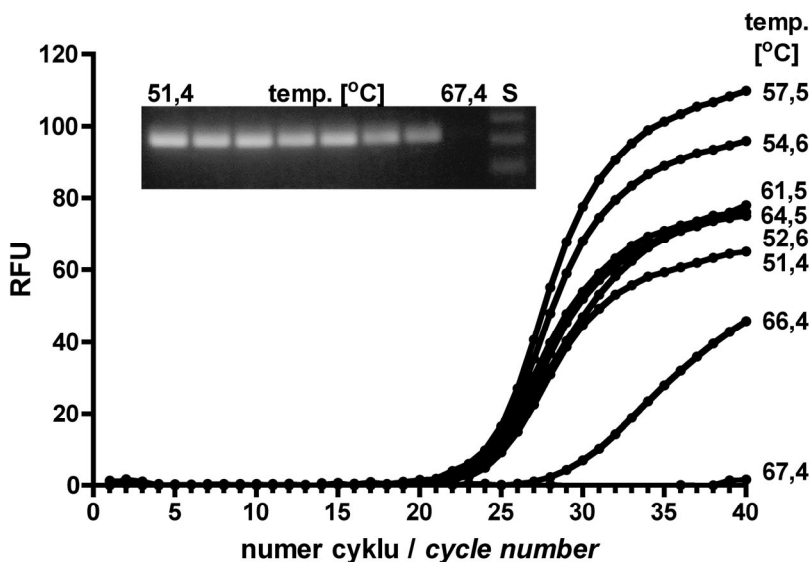
Nazwa <i>Name</i>	Starter sensowny <i>Sense primer</i>	Starter antysensowny <i>Antisense primer</i>	Produkt (pz) <i>Product</i> (bp)
Leptyna/ <i>Leptin</i>	ctcatcaagaccattgtcacc	aggctctcgcaggttctcc	221
LepR	agaaatgtcaccttgcttgg	attgtgggcagtagcatgc	93
Adiponektyna/ <i>Adiponectin</i>	tggcagagatggcactcc	cttccgtctctgtcattcc	101
AdipoR1	cctctccatcgtctgtgtcc	cacagccatgaggaagaacc	211
AdipoR2	cacaacctggctcatctacc	tgagcattagccagcctatc	222
Rezystyna/ <i>Resistin</i>	ctacattgctggtcagctctcc	gctgtccagctctatgcttcc	154
PPAR α	catcgagtgtcgaatatgtgg	gcagfactggcatttgttcc	172
PPAR γ	gatttgaagaagctgtgaacc	gaaatcaaccgttgtaaagg	197
PPAR δ	agagcacacccttctctcc	cgcacttctcgtacttgagc	236
PGC1 α	ccaaccagtacaacaatgagc	acgtctccatctgtcagtgcc	154
RXR α	cctgatcgacaagagacagc	ccacgtatgtctcagcttgg	221
LXR α	tacaaccgggaagacttgc	tgcagagaagatgctgatgg	141
SREBP-1	acaagattgtggagctcaagg	actgccacaagctgacacc	194
C/EBP α	aagtcggtggataagaacagc	tcaactccaacaccttctgc	127
ChREBP	catcgatcgcacactcacc	ggctcttctccgttgc	179
aFABP (aP2)	ctggtacatgtgcagaagtgg	atgacacattccaccaccag	86

Nazwa <i>Name</i>	Starter sensowny <i>Sense primer</i>	Starter antysensowny <i>Antisense primer</i>	Produkt (pz) <i>Product</i> (bp)
LPL	cgctggtcgaagtattgg	aatctcgaaggcctggttg	203
GLUT4	cagatcggtctggaagatgg	cagccaagttgcattgtagc	165
HK2	gaccgagagatcgacatgg	aacaacagctctgccttgg	128
PDK4	cggtgacgttccttcacacc	cggtgaattgtccatcacagg	246
G3PD1	catcaccgtggtacaagagg	ccactgcagaagagcttgg	174
PEPCK1	agaccacagatgaggaacc	gccagctgagagcttcg	178
GyK	cacaatggagcgggttcg	ccaatggacttcacacagc	90
G6PDH	ctgttctacctggccttgc	acagagaggagatgtggttcg	163
6PGDH	tggaggaattctgaataccg	cacttgcccagtcacagc	227
MEC	gcaacaactctatgtgtcc	agccggccttctctagg	142
ACL	ttacctaccttgagatcaacc	gcaatgtaggctcctctgg	173
ACC	catcgacatgtatggacacc	ccttaagctggcgtatgc	197
FAS	agcaggcacacacaatgg	tctcaggatctctgctcagg	168
SCD1	gaggaacatcatcctcatgg	gagccttgtaagtctgtgg	173
GPAT	tgcacaggtaccttctcacc	gggtcctcagttctaagacagacg	158
PLIN	gcctccaaggatgagaacc	tcttctgcacgggtgttacc	169
HSL	ctctcatggctcaactcc	actcctgcgatagactcc	124
ATGL	gagcttatccaggccaatg	atgttggtgagctgtcttg	197
β -aktyna/ β -actin	tacaatgagctgcgtgtgg	tgggtggaagctgtagcc	337
36B4	gcgacctggaagtccaactac	tctgctgcatctgcttgg	109

Próby były wstępnie preinkubowane w temp. 95 °C przez 5 lub 15 min (aktywacja polimerazy), a następnie cDNA był powielany w 40 cyklach reakcji PCR, z których każdy składał się z inkubacji 95 °C przez 20 s, 55-60 °C (w zależności od użytej pary starterów) przez 20 s i 72 °C przez 40 s. Fluorescencja barwnika SYBR Green I była mierzona w czasie reakcji PCR, a następnie dla każdej z prób została wyznaczona ilość poszczególnych mRNA poprzez obliczenie parametrów punktów przecięcia krzywej fluorescencji z linią progową (Ct). Analiza ilości mRNA była wykonana metodą $\Delta\Delta C_t$ [203] lub z zastosowaniem krzywej wzorcowej. Każdorazowo przeprowadzano analizę negatywnych prób kontrolnych bez etapu odwrotnej transkrypcji i bez matrycy. Względna ilość poszczególnych cząsteczek mRNA w próbach była wyznaczana wobec mRNA białka rybosomalnego 36B4 i β -aktyny jako standardów. Prezentowane w rozprawie wyniki przeliczone zostały tak, aby średnia wartość ilości mRNA w próbach kontrolnych wynosiła 1. Specyficzność reakcji PCR była weryfikowana poprzez wykonanie elektroforezy agarozowej i analizę krzywej topnienia produktów reakcji PCR. Obliczenia ilości mRNA w próbach zostały przeprowadzone z wykorzystaniem następujących programów komputerowych: iQ5 i Opticon Monitor (Bio-Rad) oraz Excel (Microsoft).

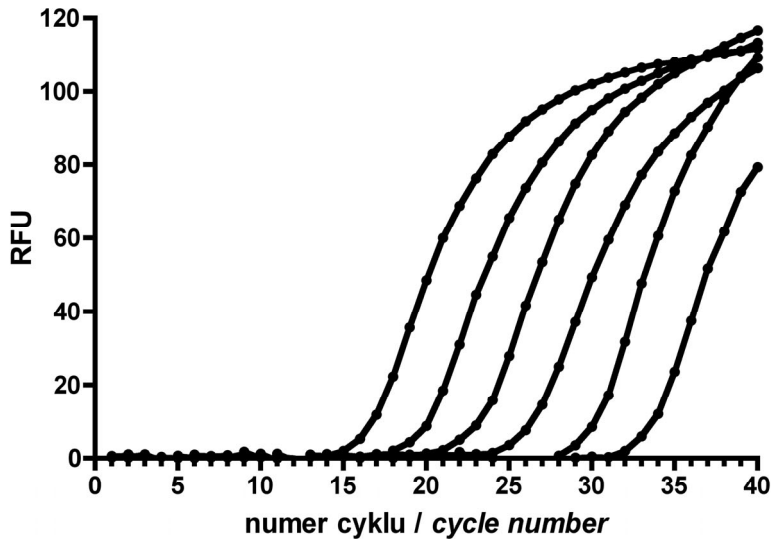
Dla każdej badanej sekwencji mRNA (pary starterów do reakcji PCR) wykonano optymalizację metody polegającą na dobraniu najlepszych parametrów pomiaru. W szczególności optymalizacji dokonywano dla temperatury hybrydyzacji starterów z sekwencją docelową, stężenia starterów i stężenia matrycy (cDNA) w reakcji PCR. Sekwencje wszystkich starterów użytych w oznaczeniach były tak dobierane, aby optymalna temperatura hybrydyzacji była w zakresie 55-60 °C (ryc. 1). Sekwencje starterów zostały zaprojektowane przy użyciu programu Sequence Analysis (Informagen) w opar-

ciu o sekwencji genów zdeponowanych w ENSEMBL (www.ensembl.org). Specyficzność hybrydizacji każdego ze starterów z odpowiednią sekwencją w cząsteczce mRNA była weryfikowana programem BLAST [2]. Wydajność reakcji PCR wyznaczano stosując seryjne rozcieńczenia cDNA próby kalibrującej, za którą uznano cDNA otrzymane z WAT jednego ze szczurów kontrolnych. We wszystkich oznaczeniach wydajność reakcji PCR była w zakresie 95-100% (ryc. 2-3). Kalibrację metody oznaczania ilości cDNA (krzywe wzorcowe) wykonano z zastosowaniem seryjnych rozcieńczeń (w zakresie ilości matrycy od 10 do 10^7 kopii w próbce) oczyszczonego DNA zawierającego badane sekwencje. Po każdej analizie ilości mRNA metodą real-time RT-PCR wykonywano krzywą topnienia produktów reakcji i uznano, że powstały właściwe produkty jeśli temperatura topnienia była w zakresie $\pm 0,3$ °C w stosunku do temperatury topnienia wyznaczonej w czasie optymalizacji pomiaru.



Ryc. 1. Optymalizacja temperatury hybrydizacji w reakcji PCR dla przykładowej pary starterów specyficznych wobec sekwencji genu kodującego adiponektynę szczura. Na wykresie przedstawiono zależność względnej fluorescencji prób (RFU) wobec numeru cyklu reakcji PCR dla podanej temperatury hybrydizacji. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty DNA – produkty reakcji PCR przeprowadzonych w gradiencie temperatury od 51,4 °C do 67,4 °C, rozdzielone metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Prawa skrajna ścieżka zawiera standardy masowe DNA (S)

Fig. 1. Optimization of the hybridisation temperature for a pair of primers specific to the rat adiponectin gene coding sequence. Relative fluorescence units (RFU) vs. cycle number are presented in the figure. The inserted photograph presents DNA fragments – products of the PCR reactions performed in temperature gradient (temp.) from 51.4 °C to 67.4 °C, resolved in agarose gel electrophoresis. Mass standard bands are presented on the right (S)

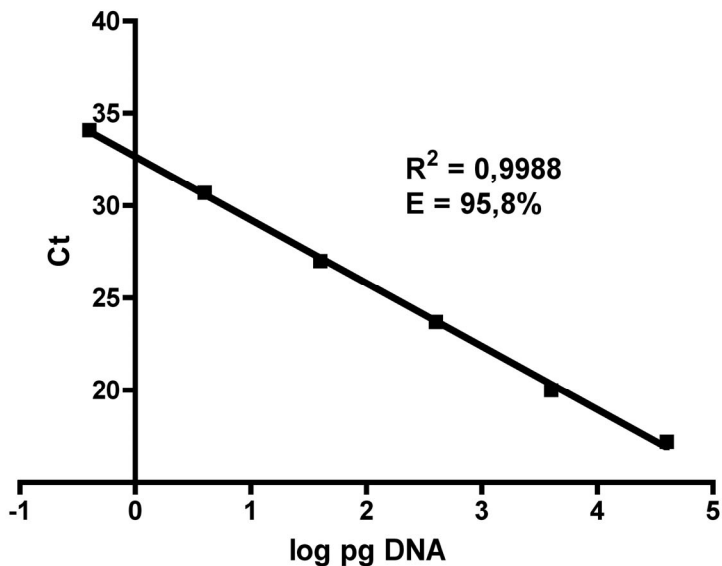


Ryc. 2. Przykładowa analiza wydajności reakcji PCR dla pary starterów specyficznych wobec sekwencji genu kodującego adiponektynę szczura. Na wykresie przedstawiono zależność względnej fluorescencji prób (RFU) wobec numeru cyklu reakcji PCR

Fig. 2. PCR reaction temperature efficiency analysis for a pair of primers specific to the rat adiponectin gene coding sequence. Relative fluorescence units (RFU) vs. cycle number are presented in the figure

3.5. Pomiar ilości białka metodą Western-blot

Próby homogenizowano w buforze z dodatkiem inhibitorów proteaz i rozdzielano elektroforetycznie w żelach poliakrylamidowych (Invitrogen lub ICN). Rozdzielone białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Amersham Pharmacia Biotech) i przeprowadzano detekcję z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych lub poliklonalnych. Przeciwciała skierowane przeciwko β -aktynie, PPAR γ i SREBP-1 oraz przeciwciała wywołujące pochodziły z Santa Cruz Biotechnology lub Sigma. Detekcję sygnału przeprowadzano z substratem chemiluminescencyjnym (Pierce), eksponując membranę wobec kliszy fotograficznej Kodak XAR (Eastman Kodak). Zaczernienia powstałe na kliszy poddano analizie densytometrycznej z zastosowaniem oprogramowania NIH-Image lub QuantityOne (Bio-Rad).



Ryc. 3. Przykładowa analiza wydajności reakcji PCR (E) dla pary starterów specyficznych wobec sekwencji genu kodującego adiponektynę szczura. Na wykresie przedstawiono zależność cyklu progowego (Ct) – wartości punktów przecięcia krzywych fluorescencji z linią progową od początkowej ilości matrycy (log pg DNA)

Fig. 3. The efficiency (E) of the PCR reaction analysis for a pair of primers specific to the rat adiponectin gene coding sequence. Threshold cycles (Ct) – the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses the threshold vs. the logarithm of the initial DNA quantity (log pg DNA) are presented in the figure

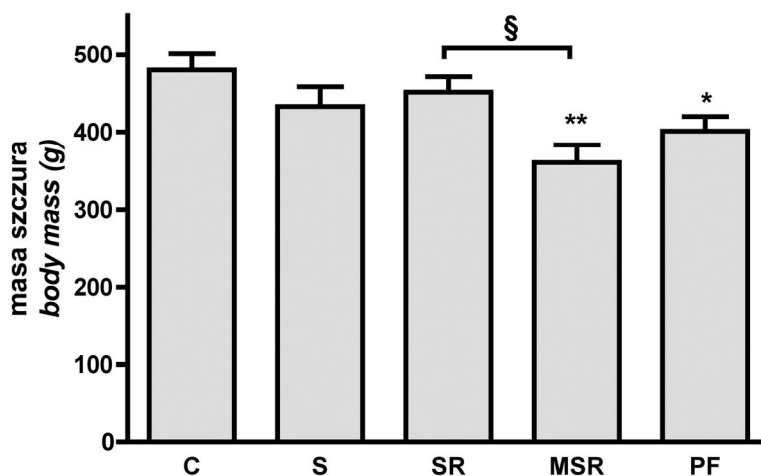
3.6. Metody statystyczne

Wartości liczbowe przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy średniej dla prób liczących 6-14 szczurów. Analiza statystyczna danych została wykonana przy użyciu programu SYSTAT (Systat Software) lub GraphPad Prism (GraphPad Software). Istotność statystyczna różnic pomiędzy grupami została oszacowana przez analizę wariancji (ANOVA) testem post-hoc Dunnetta i testami t-Studenta lub Kruskala-Wallisa. Przy wyznaczaniu zależności pomiędzy badanymi wartościami wykonywano analizę regresji liniowej oraz obliczano współczynnik korelacji Pearsona lub Spearmana. Różnice pomiędzy grupami uznano za istotne, gdy $P < 0,05$. Na rycinach i w tabelach istotność statystyczną różnic wartości średnich z grup S, SR, MSR i PF w porównaniu do grupy C oznaczono jako *, ** lub *** ($P < 0,05$ oznaczono jako *; $P < 0,01$ jako **; natomiast $P < 0,001$ jako ***). W tabelach oraz klamrami na rycinach oznaczono ewentualną istotność statystyczną różnic wartości średnich pomiędzy grupami MSR i PF ($P < 0,05$ oznaczono jako #; $P < 0,01$ jako ##; natomiast $P < 0,001$ jako ###) lub MSR i SR ($P < 0,05$ oznaczono jako §; $P < 0,01$ jako §§; natomiast $P < 0,001$ jako §§§).

4. WYNIKI

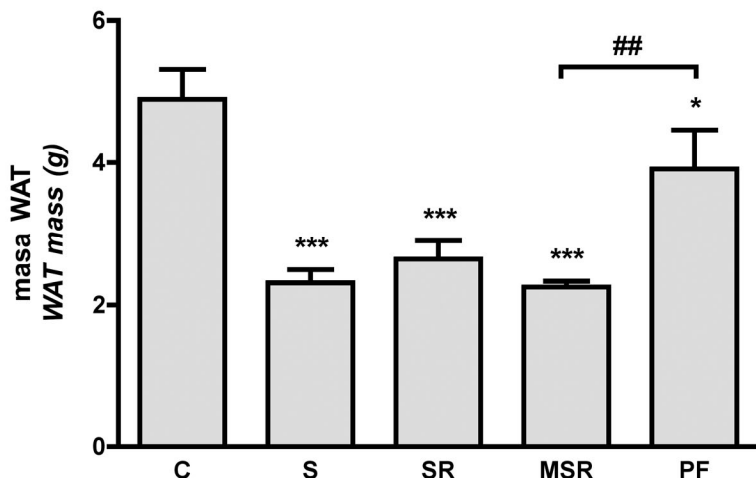
4.1. Zmiany masy ciała i masy tkanki tłuszczowej u szczurów głodzonych i karmionych

U szczurów głodzonych przez 72 godz. obserwuje się spadek masy ciała i spadek masy tkanki tłuszczowej, które następnie rosną po karmieniu (ryc. 4-5). Wielokrotne, naprzemienne głodzenie i karmienie prowadzi do zahamowania wzrostu masy ciała i zahamowania wzrostu masy tkanki tłuszczowej badanych zwierząt. Szczury z grupy kontrolnej spożywały średnio $22,5 \pm 2,7$ g paszy dziennie, podczas gdy szczury z grupy MSR w pierwszym cyklu spożyły $22,7 \pm 3,0$ g paszy, w drugim cyklu w przeliczeniu na dzień karmienia $27,1 \pm 3,3$ g paszy. Od trzeciego cyklu głodzenia i karmienia szczury z grupy MSR spożywały średnio w przeliczeniu na dzień karmienia $36,2 \pm 4,3$ g paszy, co oznacza, że te szczury w dniu karmienia spożywały o 60,9% więcej paszy niż szczury z grupy kontrolnej. W czasie sześciodniowego cyklu składającego się z trzech dni karmienia i trzech dni głodzenia szczury z grupy MSR spożywały 80,4% ilości paszy spożytej przez szczury z grupy kontrolnej. Szczury z grupy PF otrzymywały codziennie 18 g paszy, co odpowiada średniemu spożyciu paszy przez szczury z grupy MSR w czasie sześciodniowego cyklu głodzenia i karmienia.



Ryc. 4. Masa szczurów z grupy C (n=14), S (n=6), SR (n=6), MSR (n=14) i PF (n=6). Na rycinie przedstawiono średnie oraz błąd standardowy średniej. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ w porównaniu do grupy C. Klamrą zaznaczono istotność statystyczną różnic wartości średnich pomiędzy poszczególnymi grupami szczurów (§ $P < 0,05$ MSR wobec SR). Inne oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 4. Body mass of rats from group C (n=14), S (n=6), SR (n=6), MSR (n=14) i PF (n=6). Data are reported as means \pm S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control. Horizontal bar shows statistical difference between groups (§ $P < 0.05$ MSR vs. SR). All other data are presented as described in section 3.6



Ryc. 5. Masa WAT z okolic najądrzy szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 5. Epididymal WAT mass of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.2. Zmiany stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów

Głodzenie wywołuje spadek stężenia glukozy (ryc. 6) i triacylogliceroli we krwi szczurów (ryc. 7). U szczurów z grupy SR oraz MSR stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi również było niższe niż u szczurów kontrolnych (ryc. 7). U szczurów z grupy PF zaobserwowano tendencję do obniżania stężenia triacylogliceroli, jednak różnica wobec kontroli nie była istotna statystycznie (ryc. 7).

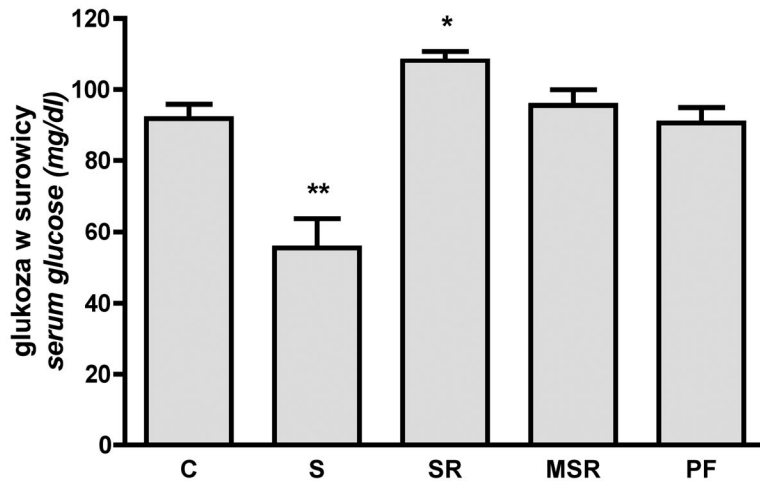
Zaobserwowano istotne zmiany stężenia insuliny w surowicy krwi szczurów (ryc. 8). U szczurów z grupy S stężenie insuliny było istotnie niższe, natomiast w grupach SR, MSR i PF stężenie insuliny było istotnie wyższe od wartości zaobserwowanych u szczurów z grupy kontrolnej.

Stężenie leptyny w surowicy krwi szczurów było niższe zarówno u szczurów z grupy S ($1,24 \pm 0,23$ ng/ml; $P < 0,01$), jak i u szczurów z grupy SR ($1,69 \pm 0,06$ ng/ml; $P < 0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną ($2,96 \pm 0,54$ ng/ml). Podobnie, długotrwałe obniżenie ilości spożywanego pokarmu obniżyło stężenie leptyny w surowicy krwi ($1,98 \pm 0,16$ ng/ml w grupie MSR i $2,02 \pm 0,35$ ng/ml w grupie PF; odpowiednio $P < 0,05$ i $P < 0,05$ w stosunku do kontroli) (ryc. 9). Stężenie leptyny w surowicy krwi szczurów ze wszystkich grup jest dodatnio skorelowane z masą WAT ($r = 0,8566$ $P < 0,01$) oraz z wielkością adipocytów izolowanych z WAT ($r = 0,6706$ $P < 0,05$).

Wielokrotne cykle głodzenia i karmienia wywołały wzrost stężenia adiponektyny w surowicy krwi w grupie MSR ($29,31 \pm 2,47$ μ g/ml; $P < 0,001$ wobec kontroli $18,64 \pm 2,83$ μ g/ml) (ryc. 10). W grupie PF nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia adiponektyny w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie adiponektyny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR było istotnie wyższe, zarówno w porównaniu

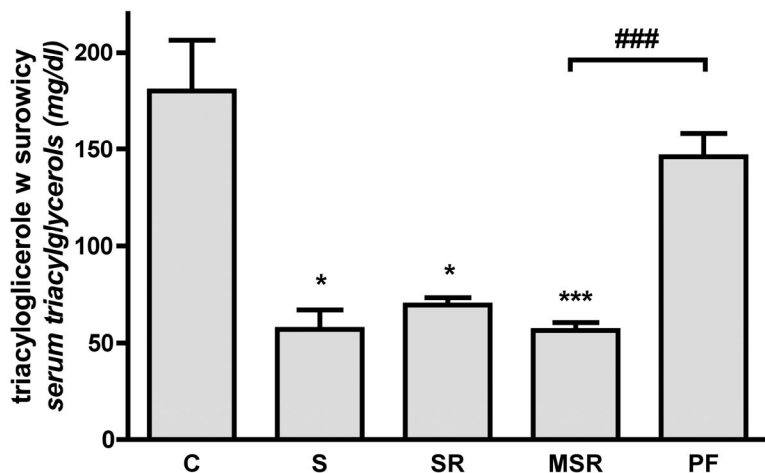
do grupy SR ($P < 0,05$), jak i PF ($P < 0,05$). Stężenie adiponektyny w surowicy krwi szczurów ze wszystkich grup jest ujemnie skorelowane z masą WAT ($r = -0,7477$ $P < 0,05$) oraz z wielkością adipocytów izolowanych z WAT ($r = -0,8549$ $P < 0,05$).

Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało wzrost stężenia rezystyny w surowicy krwi, które w grupie MSR wynosiło $26,22 \pm 1,72$ ($P < 0,01$ wobec kontroli $17,89 \pm 1,53$ ng/ml oraz $P < 0,01$ wobec grupy PF $12,35 \pm 1,82$) (ryc. 11). W grupie PF stężenie rezystyny w surowicy krwi było istotnie niższe niż w kontroli ($P < 0,05$). Stężenie rezystyny w surowicy krwi szczurów ze wszystkich grup nie jest skorelowane z masą WAT ($r = -0,1086$ $P > 0,05$).



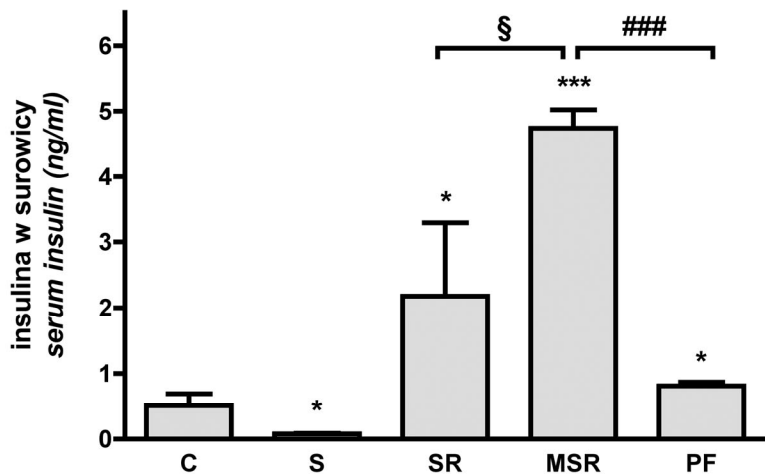
Ryc. 6. Stężenie glukozy w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 6. Serum glucose levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



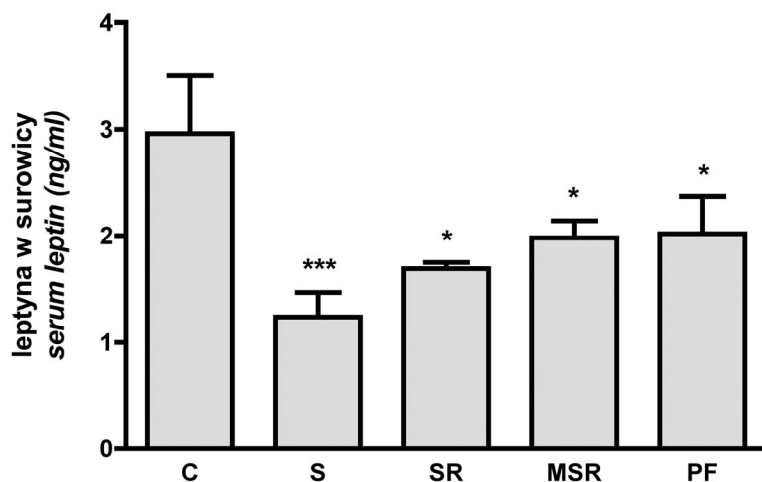
Ryc. 7. Stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 7. Serum triacylglycerol levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



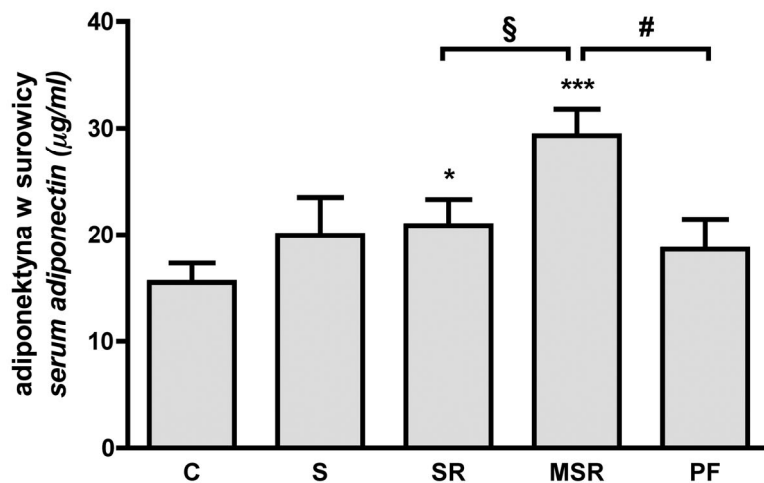
Ryc. 8. Stężenie insuliny w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 8. Serum insulin levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



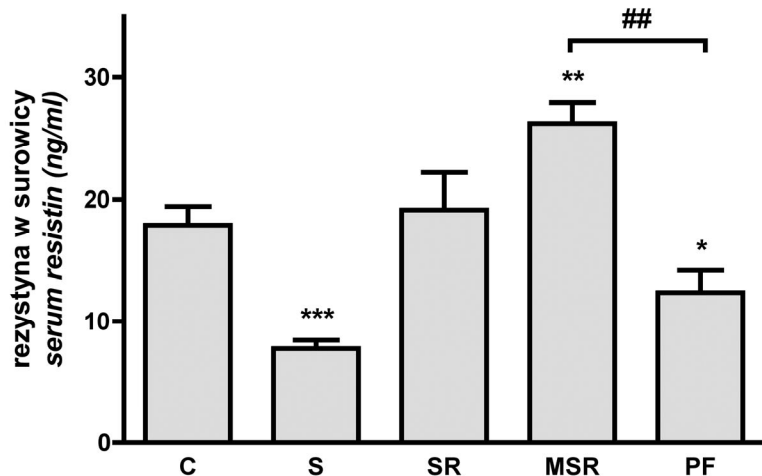
Ryc. 9. Stężenie leptyny w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 9. Serum leptin levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



Ryc. 10. Stężenie adiponektyny w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 10. Serum adiponectin levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

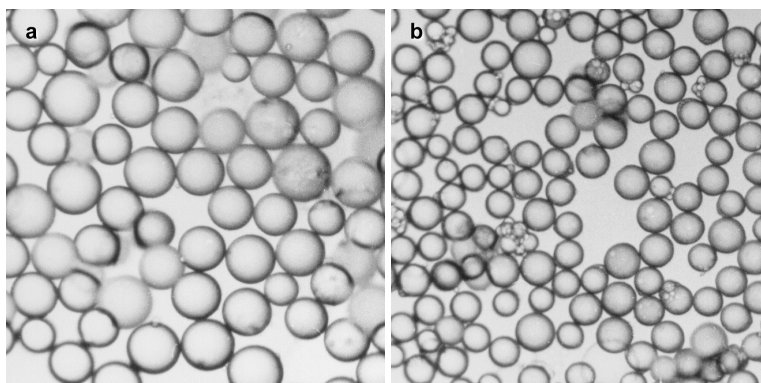


Ryc. 11. Stężenie rezystyny w surowicy krwi szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

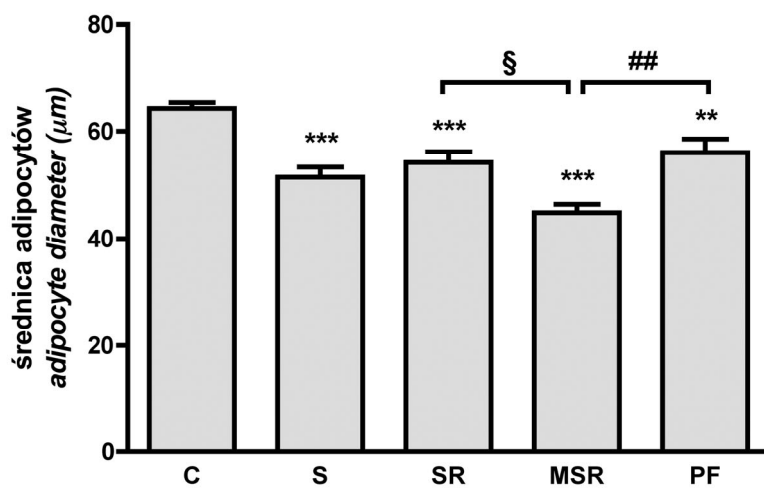
Fig. 11. Serum resistin levels. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.3. Zmiany wielkości adipocytów obserwowane po wielokrotnie powtarzanym, naprzemiennym głodzeniu i karmieniu

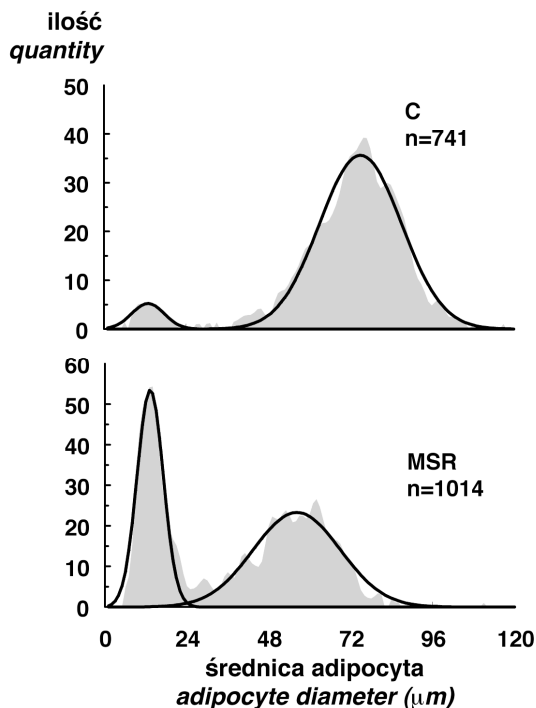
Z tkanki tłuszczowej szczurów ze wszystkich grup doświadczalnych wyizolowano adipocyty poprzez inkubację skrawków tkanki w środowisku zawierającym kolagenazę. Obraz mikroskopowy wskazuje na to, że średnica adipocytów w WAT szczurów z grupy MSR była znacząco mniejsza ($44,83 \pm 1,61 \mu\text{m}$, $P < 0,001$) niż średnica adipocytów izolowanych z WAT szczurów z grupy C ($64,21 \pm 1,14 \mu\text{m}$) (ryc. 12-13). Zaobserwowano również, że w preparatach adipocytów izolowanych z WAT szczurów, niezależnie od grupy doświadczalnej, znajdowały się dwie frakcje komórek różniące się średnicą (ryc. 14). We frakcji mniejszych adipocytów komórki miały średnicę około $13 \mu\text{m}$ ($12,8 \pm 1,17 \mu\text{m}$ w grupie C i $13,9 \pm 1,74 \mu\text{m}$ w grupie MSR). W drugiej frakcji adipocytów komórki pochodzące z WAT szczurów z grupy MSR były istotnie mniejsze ($74,6 \pm 3,77 \mu\text{m}$ w grupie C i $58,23 \pm 4,33 \mu\text{m}$ w grupie MSR, $P < 0,001$). Średnice adipocytów izolowanych z WAT szczurów z grupy S, SR i PF były mniejsze od średnicy komórek izolowanych z WAT szczurów z grupy kontrolnej, jednak różnica ta była mniejsza niż w przypadku adipocytów izolowanych z WAT szczurów z grupy MSR (ryc. 13). Ponadto średnica adipocytów z grupy MSR była istotnie mniejsza w porównaniu z grupą PF ($P < 0,01$) i SR ($P < 0,05$).



Ryc. 12. Adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej szczurów. Fotografie przedstawiają przykładowe preparaty komórek izolowanych z WAT szczurów z grupy C (a) i z grupy MSR (b)
Fig. 12. Adipocytes isolated from rat adipose tissue. Photographs show representative samples of adipocytes isolated from WAT of control (a) and MSR rats (b)



Ryc. 13. Średnica adipocytów izolowanych z WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6
Fig. 13. Diameter of adipocytes isolated from WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



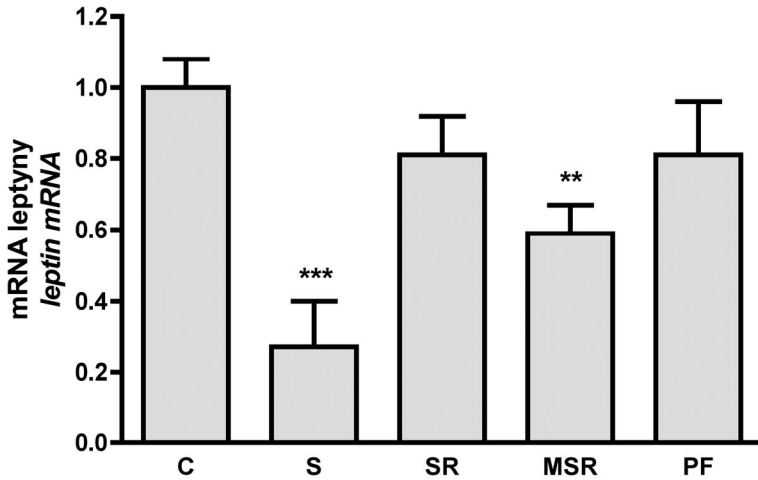
Ryc. 14. Analiza średnicy adipocytów izolowanych z WAT szczurów z grupy C (n=741) i MSR (n=1014)

Fig. 14. Diameter of adipocytes isolated from WAT of control (C, n=741) and MSR (n=1014) rats

4.4. Zmiany ekspresji genów kodujących leptynę i receptor leptyny

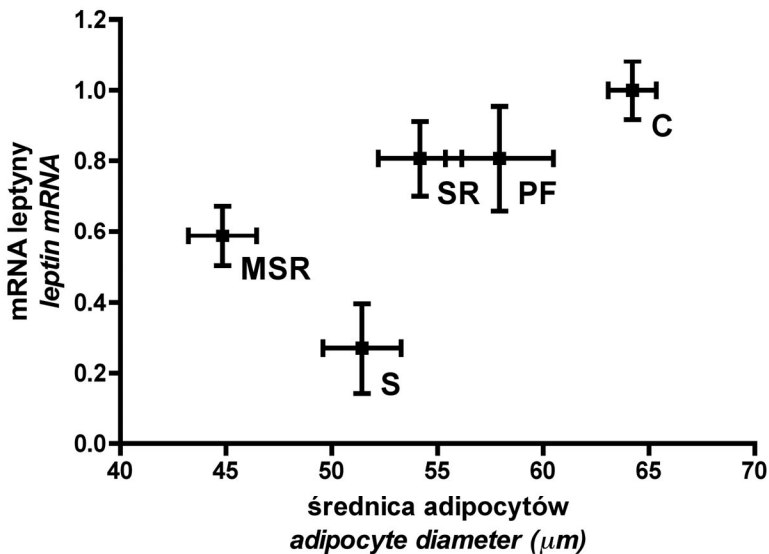
4.4.1. Zmiany ekspresji genu kodującego leptynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach

W WAT szczurów z grupy S, jak i z grupy SR zaobserwowano spadek ilości mRNA leptyny w stosunku do kontroli ($0,27 \pm 0,13$ $P < 0,001$ w grupie S oraz tendencję spadkową w grupie SR $0,81 \pm 0,11$ wobec $1,00 \pm 0,08$ w grupie kontrolnej) (Ryc. 15). Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie obniżyło ekspresję genu kodującego leptynę w tkance tłuszczowej badanych zwierząt ($0,59 \pm 0,08$; $P < 0,01$ w stosunku do kontroli). Odnotowano również tendencję spadkową ekspresji tego genu w WAT szczurów z grupy PF ($0,81 \pm 0,15$ w stosunku do kontroli). Ekspresja genu kodującego leptynę może być zależna od wielkości adipocytów. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono analizę zależności ilości mRNA leptyny od wielkości adipocytów (ryc. 16). W WAT szczurów, u których wyizolowane adipocyty były mniejsze zaobserwowano mniejszą ilość mRNA leptyny. Ilość mRNA leptyny w WAT szczurów jest dodatnio skorelowana z masą WAT ($r = 0,7846$ $P < 0,05$) oraz ze średnicą adipocytów ($r = 0,6921$ $P < 0,05$). Nie odnotowano natomiast korelacji pomiędzy poziomem mRNA leptyny a poziomem mRNA PPAR γ w WAT badanych szczurów ($r = -0,04594$ $P > 0,05$).



Ryc. 15. Ilość mRNA leptyny w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 15. Leptin mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

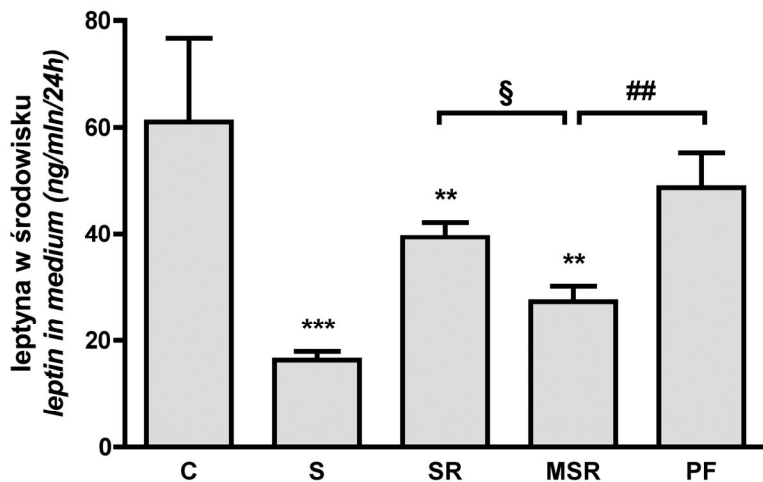


Ryc. 16. Zależność ilości mRNA leptyny w WAT szczurów od średnicy adipocytów w poszczególnych grupach szczurów. Na wykresie przedstawiono średnie \pm błąd standardowy średniej. Współczynnik korelacji dla wszystkich grup szczurów wynosi $r=0,6921$ ($P<0,05$)

Fig. 16. Leptin mRNA levels in WAT vs. adipocyte diameter in given groups of rats. Means \pm S.E.M. are presented in the figure. Correlation coefficient for all groups of rats $r=0.6921$ ($P<0.05$)

4.4.2. Zmiany wydzielania leptyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej

Adipocyty izolowane z WAT szczurów z grupy S, SR i MSR wydzielały mniej leptyny niż adipocyty pochodzące z WAT szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 17). Stężenie leptyny w środowisku inkubacyjnym jest dodatnio skorelowane ze średnicą adipocytów ($r=0,8297$ $P<0,01$).

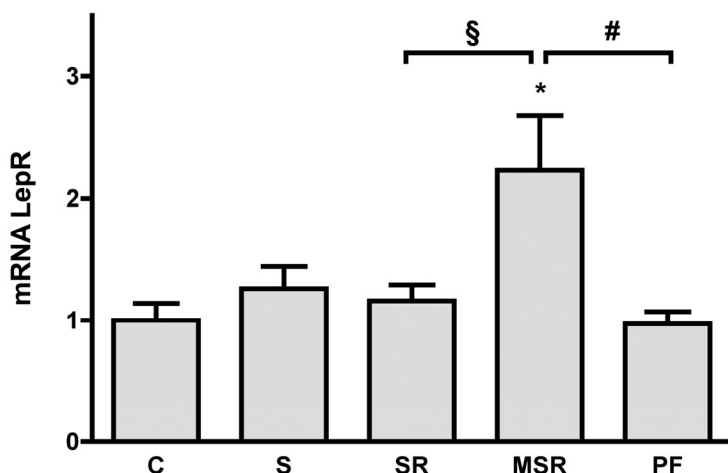


Ryc. 17. Wydzielanie leptyny przez inkubowane adipocyty. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 17. Leptin secretion from adipocytes in culture. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.4.3. Zmiany ekspresji genu kodującego receptor leptyny w tkance tłuszczowej

W WAT szczurów z grupy S, SR i PF nie zaobserwowano istotnych zmian ilości mRNA receptora leptyny w stosunku do kontroli (ryc. 18). Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało ponad dwukrotny ($P<0,05$) wzrost ilości mRNA kodującego receptor leptyny. Zmiany ekspresji genu kodującego receptor leptyny są dodatnio skorelowane ze zmianami ekspresji PPAR α ($r=0,8020$ $P>0,001$) oraz PPAR γ ($r=0,6172$ $P>0,001$) w WAT wszystkich badanych szczurów.



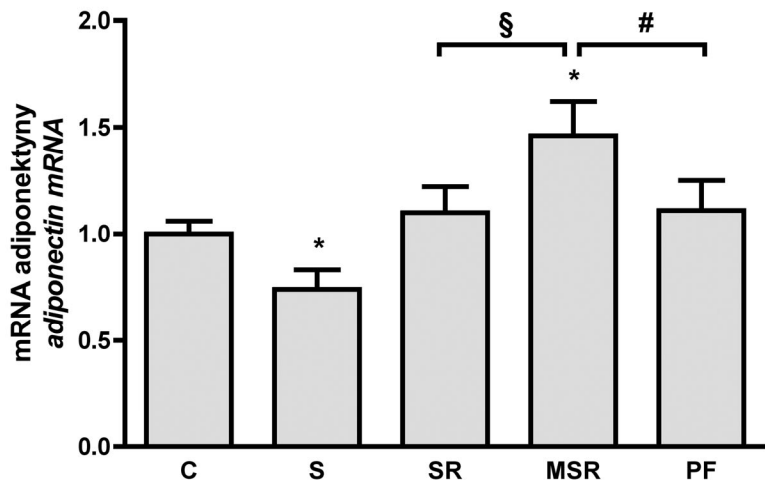
Ryc. 18. Ilość mRNA LepR w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 18. *LepR* mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.5. Zmiany ekspresji genów kodujących adiponektynę i receptor adiponektyny

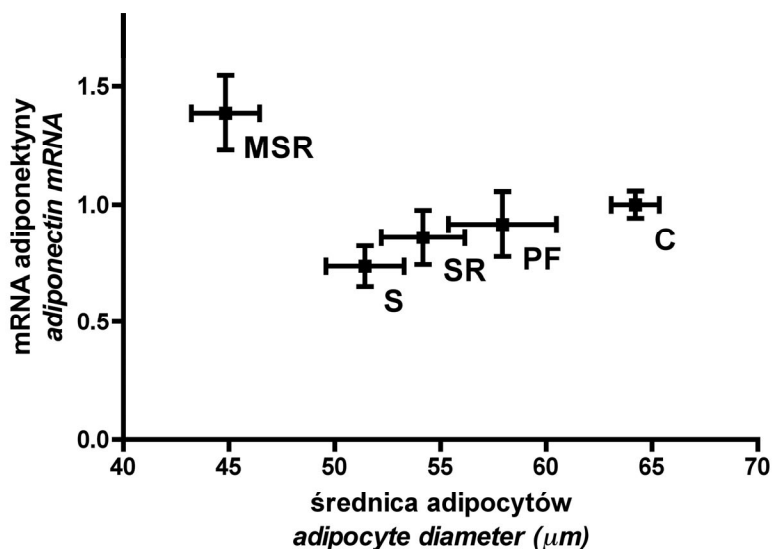
4.5.1. Zmiany ekspresji genu kodującego adiponektynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach

W WAT szczurów z grupy S zaobserwowano spadek, natomiast w grupie SR nie zaobserwowano istotnych zmian ilości mRNA adiponektyny w stosunku do kontroli (ryc. 19). Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało około 50% wzrost ekspresji genu kodującego adiponektynę ($1,46 \pm 0,15$ wobec $1,00 \pm 0,07$ w grupie kontrolnej, $P < 0,05$) (ryc. 19). Ilości mRNA adiponektyny w WAT szczurów nie jest skorelowana ze średnicą adipocytów (ryc. 20) i nie jest skorelowana z masą WAT.



Ryc. 19. Ilość mRNA adiponektyny w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 19. Adiponectin mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

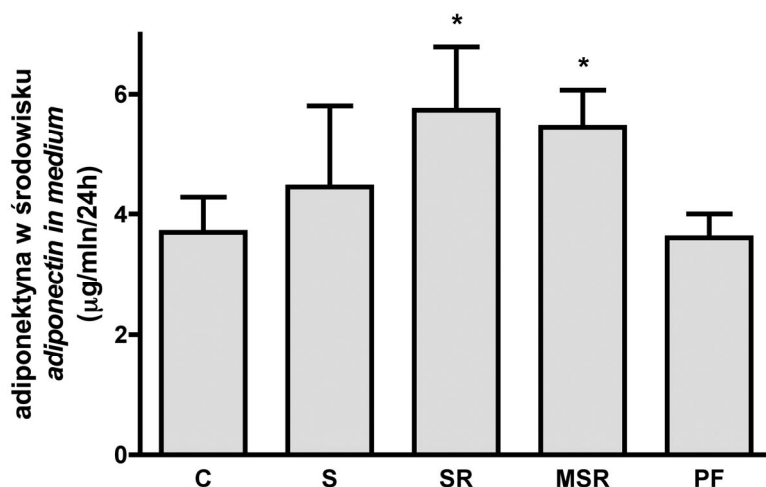


Ryc. 20. Zależność ilości mRNA adiponektyny w WAT szczurów od średnicy adipocytów w poszczególnych grupach szczurów. Na wykresie przedstawiono średnie \pm błąd standardowy średniej. Współczynnik korelacji dla wszystkich grup szczurów wynosi $r=-0,4375$ ($P>0,05$)

Fig. 20. Adiponectin mRNA levels in WAT vs. adipocyte diameter in given groups of rats. Means \pm S.E.M. are presented in the figure. Correlation coefficient for all groups of rats $r=-0,4375$ ($P>0,05$)

4.5.2. Zmiany wydzielania adiponektyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej

Po 24 godzinach hodowli izolowanych adipocytów zaobserwowano zwiększone wydzielanie adiponektyny do środowiska inkubacyjnego w preparatach adipocytów pochodzących z WAT szczurów z grup SR i MSR (ryc. 21).

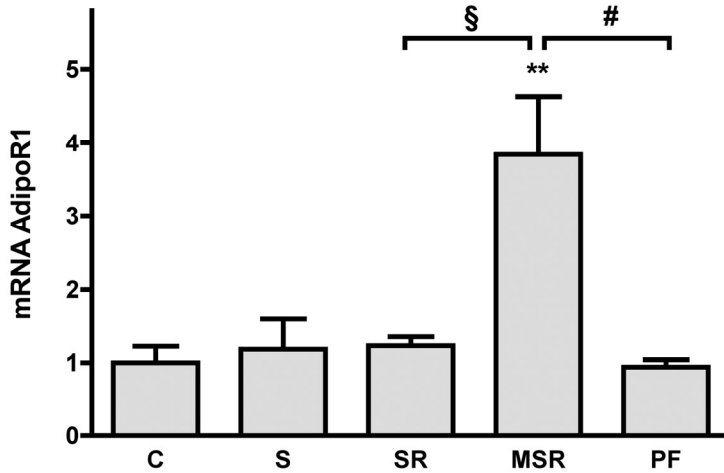


Ryc. 21. Wydzielanie adiponektyny przez inkubowane adipocyty. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 21. Adiponectin secretion from adipocytes in culture. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

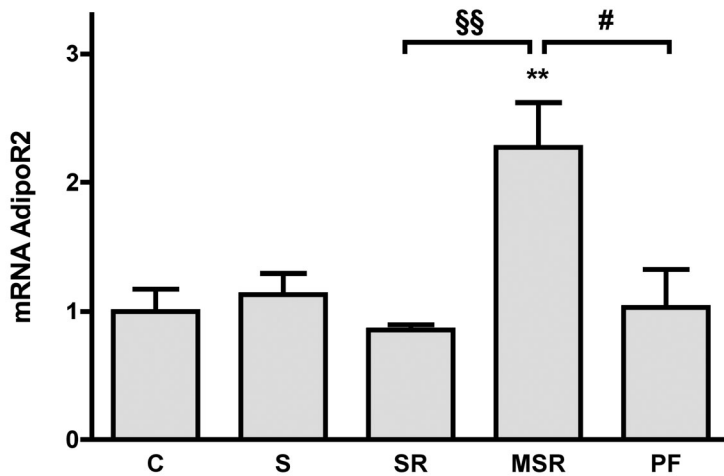
4.5.3. Zmiany ekspresji genów kodujących izoforny receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej

Zarówno jednorazowe głodzenie, jak i pojedynczy cykl głodzenia i karmienia nie wywołały istotnych zmian ilości mRNA AdipoR1 i AdipoR2 w WAT szczurów w stosunku do kontroli (ryc. 22-23). Natomiast wielokrotne głodzenie i karmienie spowodowało ponad trzykrotny wzrost ekspresji genu kodującego AdipoR1 ($P < 0,01$) i ponad dwukrotny wzrost ilości mRNA AdipoR2 ($P < 0,01$) (ryc. 22-23). W grupie PF nie zaobserwowano istotnych zmian ekspresji tych genów w porównaniu z grupą kontrolną. Ilość mRNA obu izoform receptora adiponektyny w WAT wszystkich grup szczurów jest dodatnio skorelowana z ilością mRNA receptorów PPAR α (AdipoR1 $r = 0,8609$ $P < 0,001$ i AdipoR2 $r = 0,8658$ $P < 0,001$) i PPAR γ (AdipoR1 $r = 0,7089$ $P < 0,001$ i AdipoR2 $r = 0,7621$ $P < 0,001$).



Ryc. 22. Ilość mRNA AdipoR1 w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 22. *AdipoR1* mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



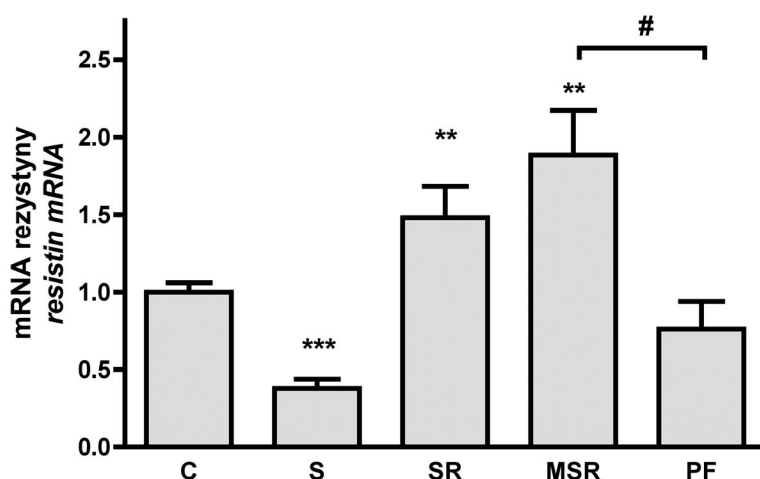
Ryc. 23. Ilość mRNA AdipoR2 w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 23. *AdipoR2* mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.6. Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę

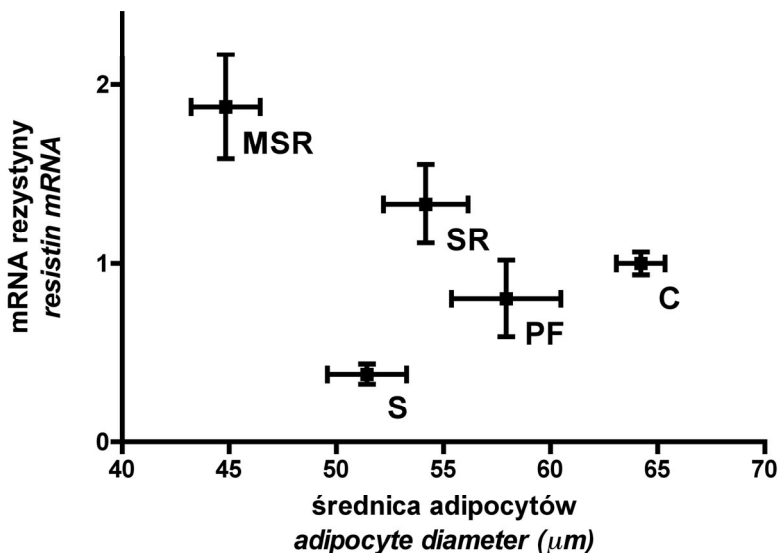
4.6.1. Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej i w izolowanych adipocytach

Ekspresja genu kodującego rezystynę spadła o przeszło 50% w WAT szczurów głodzonych przez 3 dni ($0,38 \pm 0,06$ w grupie S, $P < 0,001$ wobec grupy C), a następnie wzrosła po trzech kolejnych dniach spożywania pokarmu (ryc. 24). Wielokrotnie powtarzane cykle głodzenia i karmienia wywołały około dwukrotny wzrost ekspresji genu kodującego rezystynę ($1,88 \pm 0,29$ w grupie MSR, $P < 0,01$ wobec grupy C) (ryc. 24). Ilość mRNA rezystyny w WAT wszystkich grup szczurów jest dodatnio skorelowana z ilością mRNA czynnika transkrypcyjnego ChREBP ($r = 0,6286$ $P < 0,001$) oraz SREBP-1 ($r = 0,4889$ $P < 0,05$), lecz nie jest skorelowana z wielkością adipocytów (ryc. 25).



Ryc. 24. Ilość mRNA rezystyny w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 24. Resistin mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

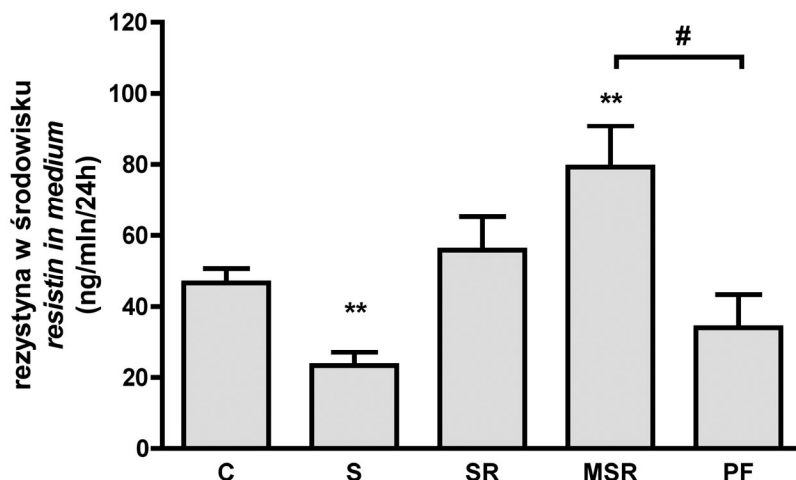


Ryc. 25. Zależność ilości mRNA rezystyny w WAT szczurów od średnicy adipocytów w poszczególnych grupach szczurów. Na wykresie przedstawiono średnie \pm błąd standardowy średniej. Współczynnik korelacji dla wszystkich grup szczurów wynosi $r=-0,4293$ ($P>0,05$)

Fig. 25. Resistin mRNA levels in WAT vs. adipocyte diameter in given groups of rats. Means \pm S.E.M. are presented in the figure. Correlation coefficient for all groups of rats $r=-0.4293$ ($P>0.05$).

4.6.2. Zmiany wydzielania rezystyny przez adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej

Adipocyty izolowane z WAT szczurów z grupy MSR wydzielają więcej rezystyny, zarówno w porównaniu z adipocytami izolowanymi z WAT szczurów z grupy kontrolnej, jak i z grupy PF (ryc. 26).



Ryc. 26. Wydzielanie rezystyny przez inkubowane adipocyty. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 26. Resistin secretion from adipocytes in culture. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.7. Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmiany metabolizmu lipidów w tkance tłuszczowej

4.7.1. Zmiany ekspresji genów kodujących enzymy i inne białka związane z syntezą lipidów w WAT

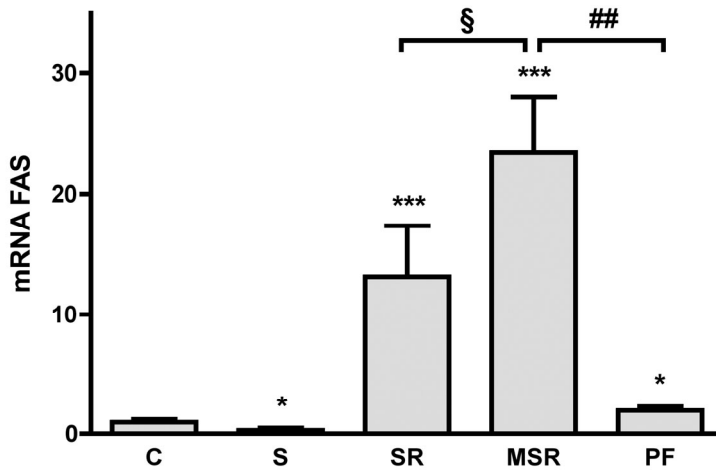
W tkance tłuszczowej szczurów poddanych głodzeniu i następującemu po nim karmieniu (grupa SR) ekspresja genu kodującego LPL wzrosła około dwukrotnie (tabela 3), podczas gdy stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi pozostało na niskim poziomie, podobnym do tego obserwowanego u zwierząt głodzonych (ryc. 7). Podobnie, w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu ekspresja genu kodującego LPL wzrosła około dwukrotnie w stosunku do kontroli (tabela 3).

Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie doprowadziło do znacznego wzrostu ekspresji genów kodujących główne enzymy lipogenne: FAS i acylotransferazę glicerolo-3-fosforanową (GPAT) (ryc. 27-28, tabela 3). Ilość mRNA innych enzymów lipogennych: ACC, dehydrogenazy glukozy 6-fosforanowej (G6PDH), dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (6PGDH), enzymu jabłczanowego (MEC), liazy ATP-cytrynianowej (ACL) i desaturazy stearoilo-CoA (SCD1) uległa podobnym zmianom, jak w przypadku FAS i GPAT, tzn. była niższa w grupie S, wzrosła kilkakrotnie w grupie SR oraz wzrosła wielokrotnie w WAT szczurów z grupy MSR w porównaniu z kontrolą (nie przedstawiono). Zaobserwowano również wzrost ilości mRNA transportera glukozy GLUT4 i heksokinazy 2 (tabela 3). W WAT szczurów z grupy PF wyższą niż w kontroli ilość mRNA odnotowano dla GLUT4 i FAS (tabela 3 i ryc. 27) oraz innych enzymów lipogennych (G6PDH, 6PGDH, ACC, MEC, ACL, SCD1 – nie przedstawiono).

Ekspresja genu kodującego kinazę dehydrogenazy pirogronianowej (PDK4), enzymu regulującego aktywność dehydrogenazy pirogronianowej, była wyższa w tkance tłuszczowej szczurów głodzonych, natomiast u szczurów z grupy SR, MSR i PF była niższa niż w grupie kontrolnej (tabela 3). Spośród enzymów uczestniczących w przemianach glicerolu odnotowano wzrost ilości mRNA cytosolowej izoformy dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej (G3PD1) i kinazy glicerolowej (GyK) oraz spadek ilości mRNA cytosolowej karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej (PEPCK) w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR w stosunku do grupy kontrolnej.

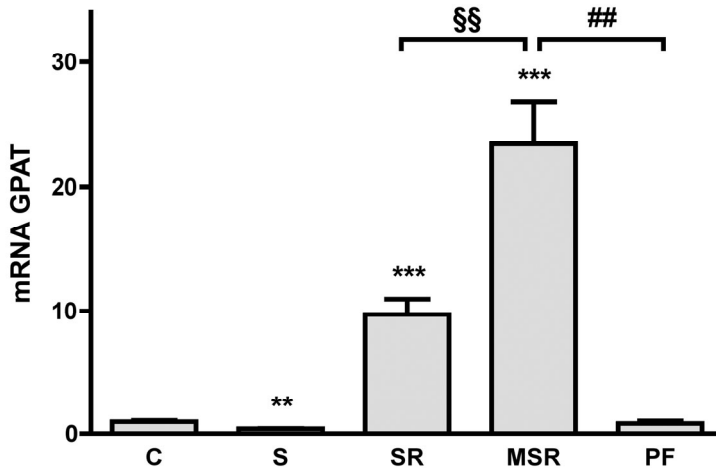
Tabela 3. Ilość mRNA enzymów i białek związanych z przemianami węglowodanów i lipidów oznaczona w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 3.6
Table 3. Expression levels of genes encoding enzymes and other proteins involved in carbohydrate and lipid metabolism determined in rat WAT. Data are presented as described in the section 3.6

Nazwa Name	Traktowanie / Treatment				
	C	S	SR	MSR	PF
LPL	1,00±0,19	0,53±0,27*	2,64±0,55**	2,20±0,43*	1,19±0,23
FAS	1,00±0,20	0,23±0,13**	11,13±3,23***	28,58±5,03*** § ##	3,88±1,10*
GPAT	1,00±0,12	0,43±0,02**	9,72±1,24***	23,44±3,38*** §§ ##	0,86±0,21
GLUT4	1,00±0,12	0,29±0,06*	1,95±0,35**	9,15±1,32*** §§ ##	1,40±0,21*
HK2	1,00±0,10	0,58±0,07*	2,72±0,56**	5,09±1,13** ##	0,51±0,06**
G3PD1	1,00±0,26	0,55±0,12*	2,16±0,32*	9,95±1,93*** §§ ##	1,20±0,20
GyK	1,00±0,13	0,81±0,29	1,07±0,10	4,70±0,94*** §§ ##	1,20±0,28
PEPCK	1,00±0,21	1,46±0,23	0,40±0,06**	0,31±0,12*** ##	1,00±0,18
ATGL	1,00±0,14	1,22±0,16	0,62±0,05*	2,39±0,27*** §§ ##	1,12±0,10
HSL	1,00±0,22	1,01±0,10	0,70±0,10	2,35±0,39** §§ #	1,11±0,14
PLIN	1,00±0,09	1,11±0,43	1,40±0,46	1,75±0,47* #	0,84±0,11
LCPT1	1,00±0,26	1,55±0,13*	0,65±0,10	1,84±0,45* § #	0,89±0,10
aFABP (aP2)	1,00±0,07	1,06±0,11	0,89±0,14	0,89±0,08	1,01±0,09
PDK4	1,00±0,13	8,33±1,48***	0,51±0,02*	0,35±0,05*** ##	0,71±0,08*



Ryc. 27. Ilość mRNA FAS w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 27. FAS mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

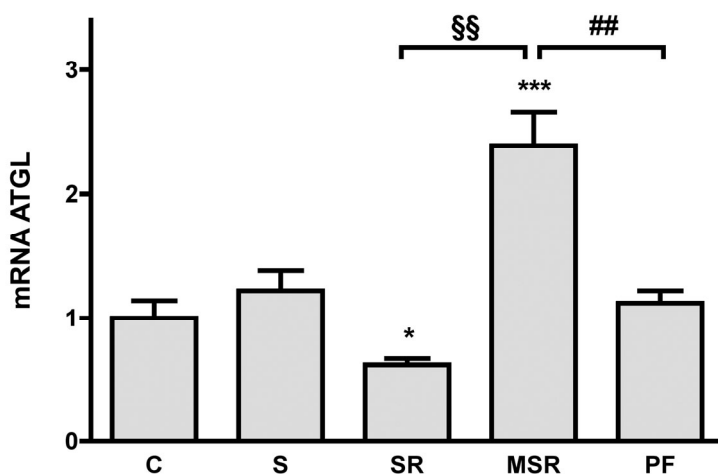


Ryc. 28. Ilość mRNA GPAT w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 28. GPAT mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.7.2. Zmiany ekspresji genów kodujących enzymy i inne białka związane z lipolizą w WAT

W WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano około dwukrotny w stosunku do kontroli wzrost ilości mRNA ATGL ($2,39 \pm 0,27$ w grupie MSR i $1,00 \pm 0,13$ w grupie kontrolnej, $P < 0,001$) (ryc. 29) oraz ponad dwukrotny wzrost ekspresji genu kodującego HSL (tabela 3). Nie zaobserwowano zmian ekspresji obu tych genów w tkance tłuszczowej szczurów z grupy PF. W WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano również wzrost ilości mRNA kodującego perylipiny o 75% stosunku do kontroli (tabela 3). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian ekspresji tego genu w tkance tłuszczowej szczurów z innych grup.

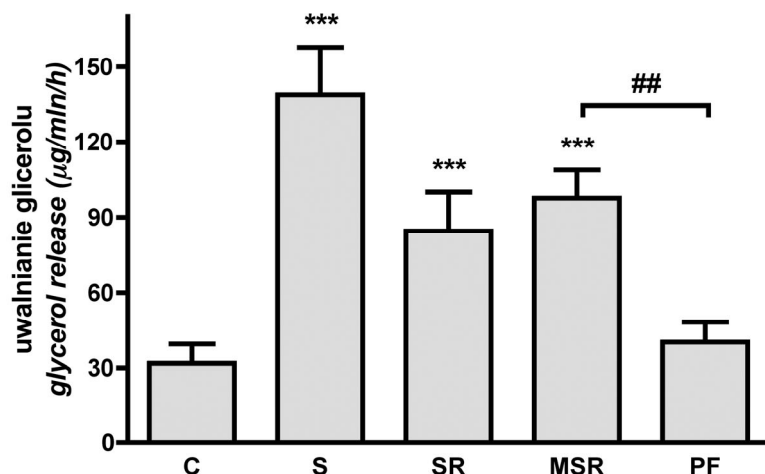


Ryc. 29. Ilość mRNA ATGL w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 29. ATGL mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.7.3. Zmiany szybkości lipolizy w adipocytach

W adipocytach izolowanych z tkanki tłuszczowej głodzonych szczurów (S) zaobserwowano ponad czterokrotny wzrost szybkości lipolizy mierzonej ilością uwalnianego glicerolu ($138,7 \pm 18,9$ μg glicerolu/mln komórek/h; $P < 0,001$) w stosunku do kontroli ($31,8 \pm 7,66$ μg /mln komórek/h) (ryc. 30). Adipocyty pochodzące od szczurów z grupy SR uwalniały ponad dwukrotnie więcej glicerolu ($84,5 \pm 15,5$ μg /mln komórek/h; $P < 0,001$), niż adipocyty izolowane z WAT szczurów kontrolnych. W tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu lipoliza mierzona ilością uwalnianego przez adipocyty glicerolu wzrosła ponad trzykrotnie w stosunku do kontroli ($97,69 \pm 11,09$ μg /mln komórek/h; $P < 0,001$); natomiast u szczurów z grupy PF nie zaobserwowano istotnych zmian ilości uwalnianego glicerolu w porównaniu z kontrolą ($40,2 \pm 7,98$ μg /mln komórek/h; $P > 0,05$).



Ryc. 30. Uwalnianie glicerolu przez inkubowane adipocyty. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 30. Glycerol release from adipocytes in culture. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

4.8. Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmian ekspresji genów kodujących receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne

4.8.1. Zmiany ekspresji genów kodujących receptory jądrowe PPAR, LXR i RXR oraz ich koaktywator PGC1α w tkance tłuszczowej

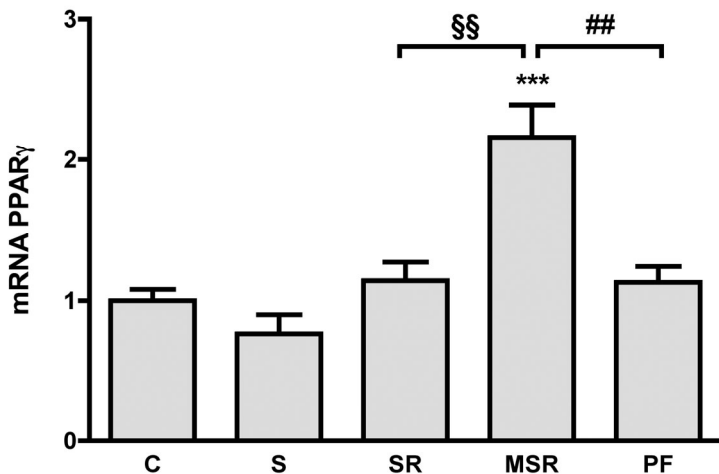
Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie indukowało ekspresję genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej badanych zwierząt. U szczurów z grupy MSR zaobserwowano około dwukrotny wzrost ekspresji tego genu ($2,16 \pm 0,23$; $P < 0,001$ wobec $1,00 \pm 0,08$ w grupie kontrolnej) (ryc. 31). Wzrostu ekspresji genu kodującego PPAR γ nie zaobserwowano w żadnej z pozostałych grup szczurów. W tkance tłuszczowej szczurów poddanych restrykcji kalorycznej (PF) ekspresja genu kodującego PPAR γ nie uległa zmianie ($1,07 \pm 0,10$) w stosunku do kontroli. Ponieważ PPAR γ jest uważany za najważniejszy receptor jądrowy regulujący funkcje tkanki tłuszczowej, indukcję genu kodującego PPAR γ w WAT szczurów z grupy MSR potwierdzono również metodą Western-blot (ryc. 32). Poziom białka PPAR γ w WAT szczurów z tej grupy był około trzykrotnie wyższy niż w kontroli.

Ekspresja genu kodującego PPAR α wzrosła w tkance tłuszczowej szczurów poddanych naprzemiennemu głodzeniu i karmieniu i była około trzykrotnie wyższa od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 33). Podobne zmiany zaobserwowano w przypadku genu kodującego PPAR δ , którego ekspresja w WAT szczurów poddanych naprzemiennemu głodzeniu i karmieniu również wzrosła i była trzykrotnie wyższa od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 34). Natomiast w WAT

szczurów z grup S, SR i PF nie zaobserwowano istotnych różnic w porównaniu z kontrolą ani w przypadku genu kodującego PPAR α , ani PPAR δ .

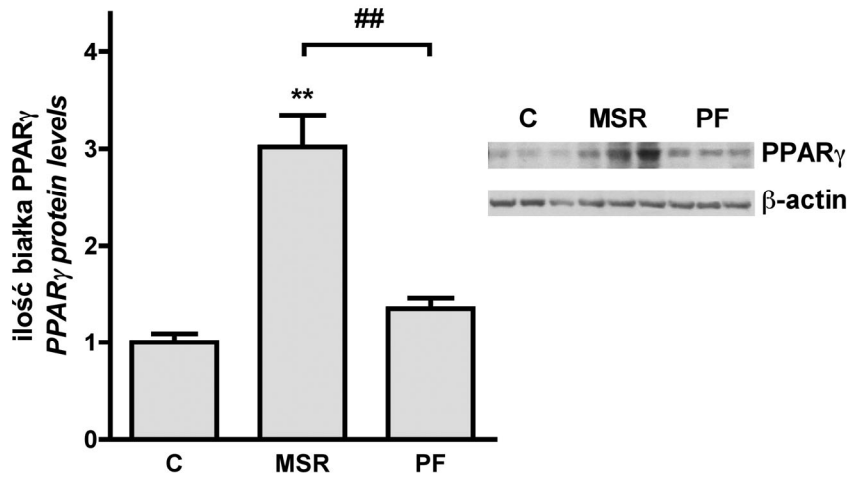
Ekspresja genu kodującego LXR α w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR była ponad dwukrotnie wyższa ($2,62 \pm 0,41$; $P < 0,001$) od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 35). Z kolei ekspresja genu kodującego RXR α w WAT szczurów z grupy MSR była niemal dwukrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej ($1,91 \pm 0,29$ $P < 0,05$ w grupie MSR wobec $1,00 \pm 0,11$ w grupie kontrolnej) (ryc. 36).

Ekspresja genu kodującego PGC1 α (koaktywator receptorów PPAR) w tkance tłuszczowej szczurów z grupy SR była przeszło dwukrotnie wyższa ($2,74 \pm 0,88$; $P < 0,05$), natomiast w WAT szczurów poddanych naprzemiennemu głodzeniu i karmieniu – pięciokrotnie wyższa ($5,06 \pm 1,23$; $P < 0,001$) od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej ($1,00 \pm 0,16$) (ryc. 37). W grupie PF nie zaobserwowano istotnych zmian ekspresji genu PGC1 α ($1,12 \pm 0,23$) w porównaniu ze szczurami z grupy kontrolnej.



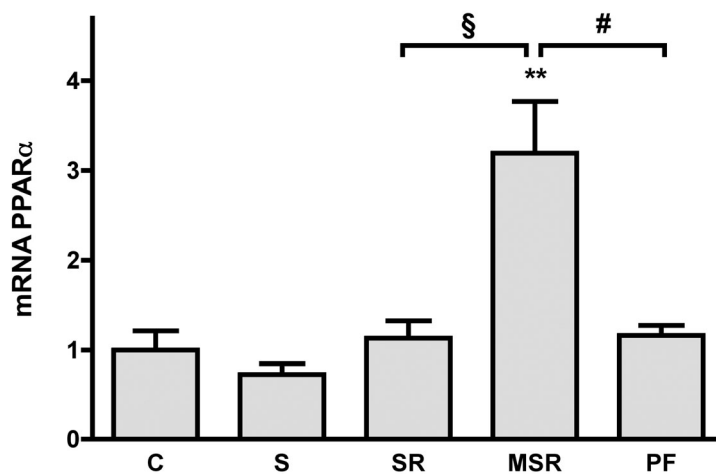
Ryc. 31. Ilość mRNA PPAR γ w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 31. PPAR γ mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



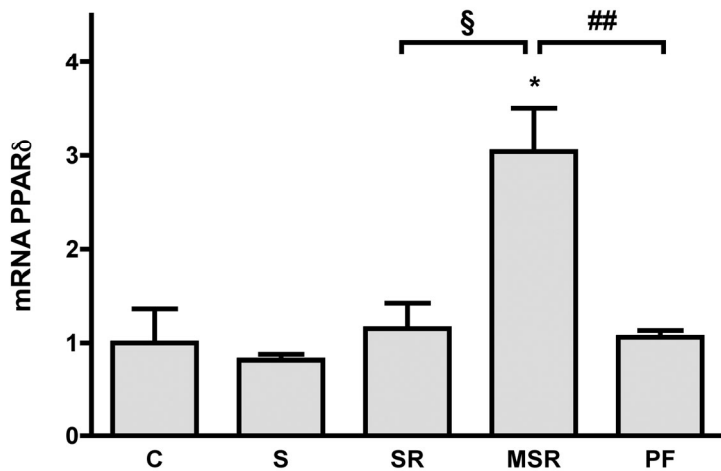
Ryc. 32. Poziom białka PPAR_γ w WAT szczurów wyznaczony metodą Western-blot. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 32. PPAR_γ protein levels in WAT of rats determined by Western-blot. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



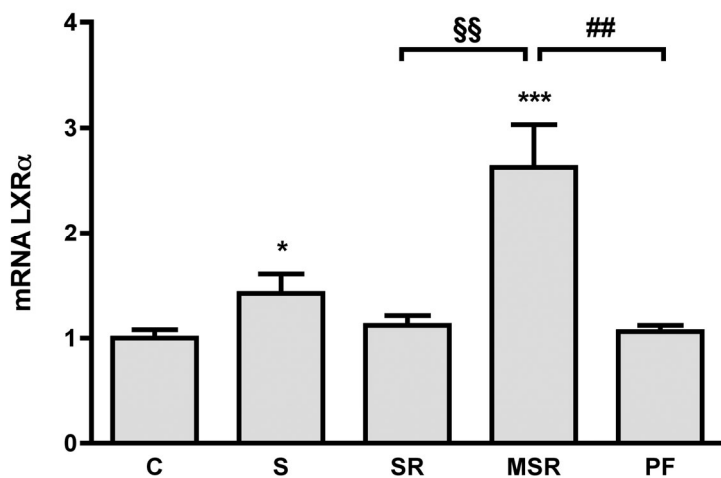
Ryc. 33. Ilość mRNA PPAR_α w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 33. PPAR_α mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



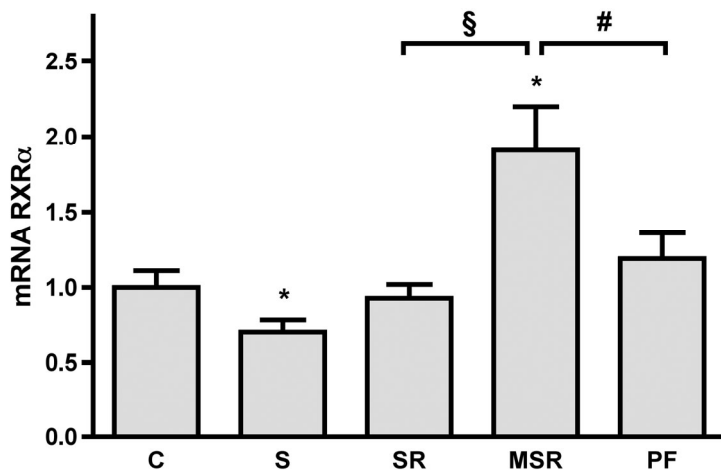
Ryc. 34. Ilość mRNA PPAR δ w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 34. PPAR δ mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



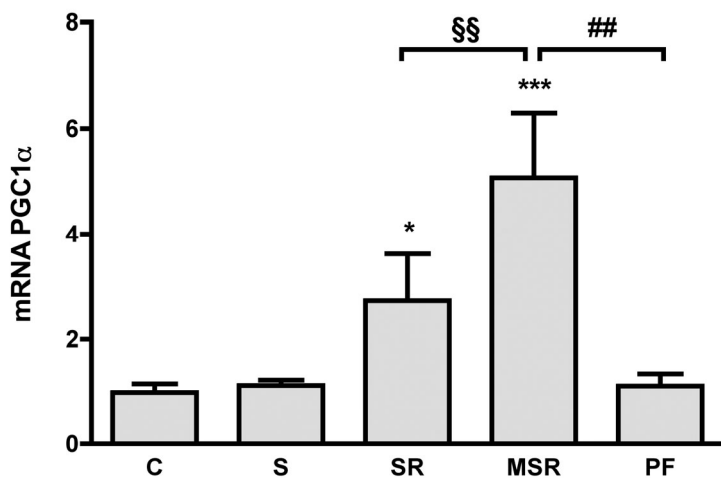
Ryc. 35. Ilość mRNA LXR α w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 35. LXR α mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



Ryc. 36. Ilość mRNA RXR α w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 36. RXR α mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

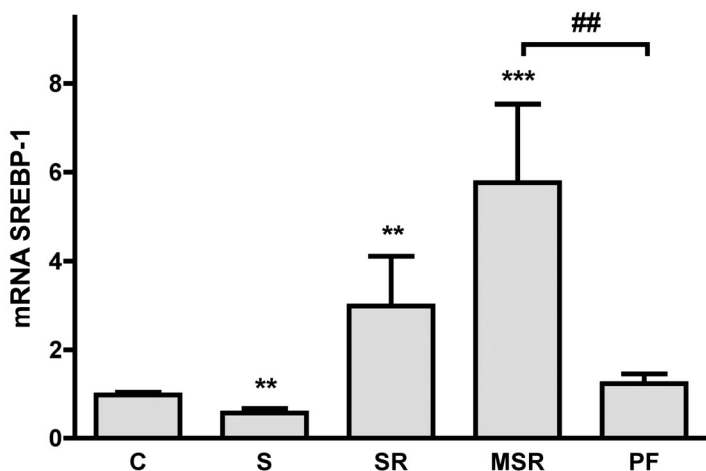


Ryc. 37. Ilość mRNA PGC1 α w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 37. PGC1 α mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

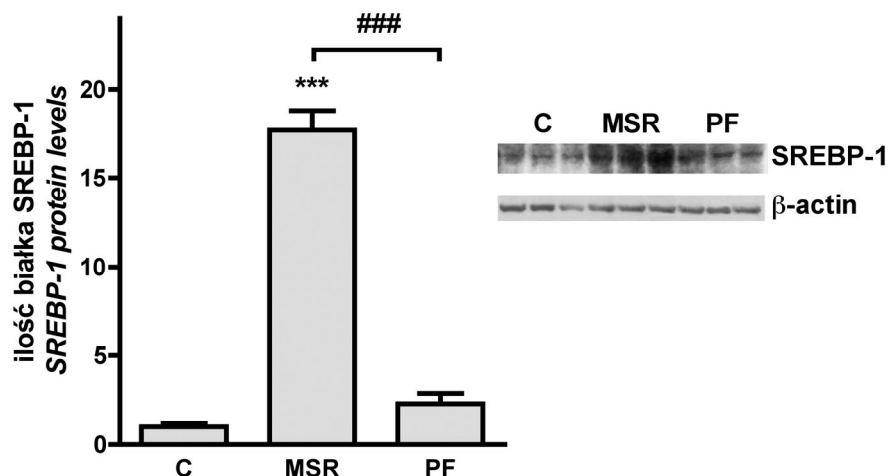
4.8.2. Zmiany ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne *SREBP-1*, *ChREBP* i *C/EBP α* w tkance tłuszczowej

Ekspresja genu kodującego czynnik transkrypcyjny SREBP-1 spadała w tkance tłuszczowej głodzonych szczurów (S), natomiast wzrosła (około trzykrotnie) w WAT szczurów poddanych głodzeniu i następującemu po nim karmieniu (SR) i około sześciokrotnie w WAT szczurów poddanych wielokrotnie powtórzonym cyklom głodzenia i karmienia (MSR) (ryc. 38). SREBP-1 jest regulowane nie tylko na etapie transkrypcji, lecz również poprzez hydrolityczne cięcie, w czasie którego powstaje aktywna transkrypcyjnie jądrowa forma tego czynnika transkrypcyjnego. Dlatego też zmiany ilości formy jądrowej SREBP-1 w WAT szczurów potwierdzono metodą Western-blot (ryc. 39). Poziom białka SREBP-1 (formy jądrowej) w WAT szczurów z grupy MSR był ponad piętnastokrotnie wyższy niż w kontroli ($P < 0,001$).



Ryc. 38. Ilość mRNA SREBP-1 w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

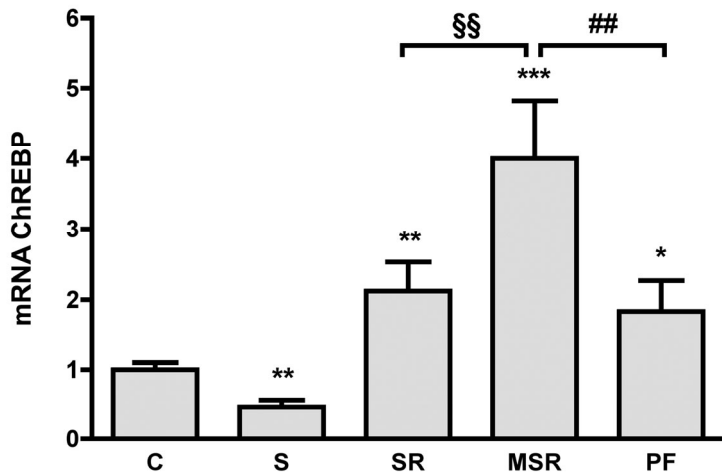
Fig. 38. *SREBP-1* mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6



Ryc. 39. Poziom białka SREBP-1 w WAT szczurów wyznaczony metodą Western-blot. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 39. SREBP-1 protein levels in WAT of rats determined by Western-blot. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

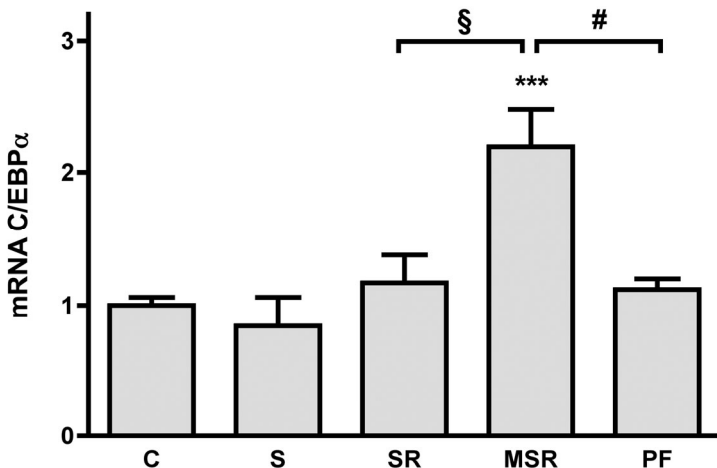
W wyniku głodzenia doszło również do spadku ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny ChREBP w WAT badanych szczurów (S); natomiast podwyższoną ekspresję tego genu zaobserwowano w tkance tłuszczowej szczurów SR, MSR i PF (ryc. 40). Największy, czterokrotny w stosunku do kontroli, wzrost ekspresji genu kodującego ChREBP wykazano w WAT szczurów z grupy MSR. W grupie SR zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost ekspresji tego genu. W odróżnieniu od SREBP-1, wzrost ilości mRNA ChREBP zaobserwowano również w tkance tłuszczowej szczurów poddanych restrykcji kalorycznej (PF) – około dwukrotnie wyższa w stosunku do kontroli ekspresja genu kodującego czynnik ChREBP w WAT szczurów z grupy PF odpowiada podwyższonemu stężeniu insuliny u tych szczurów (ryc. 8).



Ryc. 40. Ilość mRNA ChREBP w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 40. ChREBP mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

Ilość mRNA czynnika transkrypcyjnego C/EBP α , istotnego w różnicowaniu adipocytów, nie zmieniała się istotnie w tkance tłuszczowej badanych szczurów, z wyjątkiem grupy MSR, gdzie była ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu do kontroli (ryc. 41).



Ryc. 41. Ilość mRNA C/EBP α w WAT szczurów. Oznaczenia przedstawiono zgodnie z opisem pod ryciną 4 oraz z opisem zawartym w rozdziale 3.6

Fig. 41. C/EBP α mRNA levels in WAT of rats. Data are presented as described in the legend for Fig. 4 and in the section 3.6

5. DYSKUSJA

5.1. Zmiany masy ciała i masy tkanki tłuszczowej u szczurów głodzonych i karmionych

Głównym celem stosowania diety redukcyjnej, polegającej na zmniejszeniu ilości spożywanego pokarmu, jest zwykle obniżenie masy ciała. W czasie obniżonej podaży pokarmu w tkance tłuszczowej zachodzi zwiększona lipoliza i uwalnianie kwasów tłuszczowych, co prowadzi do spadku masy tej tkanki. U szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych doszło do zahamowania wzrostu masy ciała i masy tkanki tłuszczowej. Jest to niewątpliwie wywołane mniejszym spożyciem pokarmu, gdyż szczury z grupy MSR spożywają o 20% mniej paszy niż szczury z grupy kontrolnej. W grupie szczurów PF (spożywających taką samą ilość paszy, jak szczury z grupy MSR) zaobserwowano podobne zmiany masy ciała, jak w grupie MSR. U tych dwóch grup szczurów zaobserwowano natomiast różnicę w masie tkanki tłuszczowej pobranej z okolic najądrzy – u szczurów z grupy MSR masa tej tkanki była znacząco mniejsza (ryc. 5). Takie równoległe badania z zastosowaniem diety redukcyjnej o takiej samej ilości pokarmu wykazały, że zmiany masy ciała i masy WAT obserwowane u szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych nie wynikały jedynie ze spadku ilości spożywanego pokarmu, ale były efektem jego cyklicznej podaży. Główną przyczyną spadku masy tkanki tłuszczowej u szczurów z grupy MSR było, jak wynika z przeprowadzonych badań, obniżenie wielkości adipocytów. Adipocyty izolowane z WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu były znacznie mniejsze niż u innych grup szczurów (ryc. 13-14), nawet dieta redukcyjna (PF) nie doprowadziła do takiego obniżenia wielkości adipocytów. Zaobserwowany spadek wielkości adipocytów był wynikiem zwiększonej lipolizy w tkance tłuszczowej. Biorąc pod uwagę, że od wielkości adipocytów zależy biosynteza i wydzielanie leptyny, spadek wielkości adipocytów mógł być jedną z przyczyn obniżenia stężenia tej adipokiny we krwi badanych szczurów. Spadek stężenia leptyny we krwi mógł z kolei doprowadzić do wzrostu apetytu i zwiększonego pobierania pokarmu, a w konsekwencji do szybszego przybierania na wadze szczurów MSR, obserwowanego po rozpoczęciu ich żywienia *ad libitum* [84, 92]. Opisane tu zależności wynikające z cyklicznej podaży pokarmu mogą być odzwierciedleniem efektu jo-jo, obserwowanego gdy między okresami stosowania krótkotrwałych diet dochodzi do przejadania się i wzrostu masy ciała.

5.2. Zmiany stężenia glukozy, triacylogliceroli, insuliny, leptyny, adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi szczurów

U szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych podobnie, jak u szczurów z grupy PF stężenie glukozy w surowicy krwi nie zmieniło się w stosunku do kontroli (ryc. 6). Brak zmian stężenia glukozy w surowicy krwi zaobserwowano już u szczurów poddanych diecie redukcyjnej zawierającej 85% ilości paszy spożytej przez szczury kontrolne [94]. Wielokrotne głodzenie i karmienie zmieniło natomiast stężenie triacylogliceroli w surowicy krwi, które było obniżone u szczurów z grup MSR, S i SR (ryc. 7). Spadek stężenia triacylogliceroli po głodzeniu spowodowany jest najprawdopodobniej zahamowaniem lipogenezy wątrobowej, gdyż w wątrobie szczurów głodzonych

przez 72 godz. aktywność FAS spadła o 30% ($P < 0,05$) (nie przedstawiono). W surowicy krwi szczurów z grupy PF odnotowano istotnie wyższe stężenie triacylogliceroli niż u szczurów z grupy MSR, co może świadczyć o tym, że cykliczna podaż pokarmu bardziej obniża stężenie triacylogliceroli niż dieta redukcyjna o tej samej kaloryczności. Z kolei stężenie insuliny w surowicy krwi było istotnie wyższe u szczurów poddanych wielokrotnie powtarzanym cyklom głodzenia i karmienia, zarówno w porównaniu z grupą kontrolną, jak i w porównaniu z grupami SR i PF (ryc. 8). Ten wielokrotny wzrost stężenia insuliny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR był wywołany cyklami głodzenia i karmienia, gdyż u szczurów z grupy PF spożywających taką samą ilość paszy, jak te z grupy MSR stężenie insuliny było pięciokrotnie niższe. Wzrost stężenia insuliny, obserwowany u szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu sugeruje, że bierze ona udział w indukcji genów uczestniczących w metabolizmie węglowodanów i lipidów w tkance tłuszczowej tych zwierząt.

Wielokrotne głodzenie i karmienie (MSR) lub długotrwałe zmniejszenie ilości spożywanego pokarmu (PF) obniżyło stężenie leptyny w surowicy krwi badanych szczurów. U szczurów głodzonych (S) oraz głodzonych, a następnie karmionych (SR) również zaobserwowano towarzyszący obniżeniu masy WAT spadek stężenia leptyny w surowicy krwi (ryc. 9). Podobny spadek stężenia leptyny w surowicy zaobserwowano u szczurów poddanych diecie redukcyjnej [94]. W wielu badaniach wykazano, że stężenie leptyny we krwi jest związane z obniżaniem masy ciała. W większości ze stosowanych metod obniżania masy ciała otyłych pacjentów, stężenie leptyny we krwi spadało niezależnie od rodzaju diety redukcyjnej [82]. Stężenie leptyny we krwi może być związane z masą tkanki tłuszczowej oraz z wielkością adipocytów. W doświadczeniach opisywanych w niniejszej rozprawie stężenie to było dodatnio skorelowane z masą tkanki tłuszczowej z okolic najądrzy i z wielkością adipocytów izolowanych z WAT szczurów. Adipocyty izolowane z WAT szczurów z grupy S, SR i MSR wydzielaly mniej leptyny niż adipocyty pochodzące z WAT szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 17). Podobne zależności otrzymano także w badaniach opisujących inne modele doświadczalne u myszy i szczurów [10, 209]. Wydaje się, że masa tkanki tłuszczowej i wielkość adipocytów, to główne czynniki wpływające na długotrwałe zmiany stężenia leptyny we krwi. Niezależnie od wielkości adipocytów biosynteza i wydzielanie leptyny są również regulowane przez insulinę [96]. W modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia stężenie insuliny było wyższe u szczurów z grupy MSR niż w kontroli, przy niższym stężeniu leptyny w surowicy krwi. Wskazuje to, że w badanym modelu doświadczalnym insulina w niewielkim stopniu wpływa na wydzielanie leptyny.

Stężenie adiponektyny w surowicy krwi szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu (grupa MSR) było wyższe, przy niższej niż w grupie kontrolnej masie ciała tych zwierząt (ryc. 10). Zatem, w przeciwieństwie do leptyny, stężenie adiponektyny w surowicy krwi w tym modelu doświadczalnym było odwrotnie proporcjonalne do masy tkanki tłuszczowej. Już we wcześniejszych badaniach wykazano, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy stężeniem adiponektyny we krwi, a masą tkanki tłuszczowej i wskaźnikiem masy ciała (BMI) u ludzi [54]. Podobną zależność zaobserwowano również u szczurów, u których wzrostowi masy tkanki tłuszczowej i masy ciała po dwutygodniowym karmieniu dietą wysoko-tłuszczową towarzyszył spadek stężenia adiponektyny w surowicy krwi, pomimo braku zmian poziomu mRNA adiponektyny w WAT [145]. Zaskakujący jest brak wpływu diety redukcyjnej (grupa PF) na stężenie tego hormonu we krwi badanych szczurów, ponieważ u myszy zaobserwowano dodatni wpływ różnych diet redukcyjnych na stężenie adiponektyny we krwi. W badaniach

Combs i wsp. [28] trzymiesięczna dieta redukcyjna o 60% kaloryczności zwiększała około dwukrotnie stężenie adiponektyny w surowicy krwi myszy, niezależnie od ich wieku. Również w badaniach Varady i wsp. [189] u samic myszy, które otrzymywały dietę równoważną 75% kalorii dziennego zapotrzebowania zaobserwowano podwyższone stężenie adiponektyny w osoczu. Podobnie było podwyższone stężenie adiponektyny w osoczu myszy otrzymujących co drugi dzień 25%, 15% lub 0% dziennego zapotrzebowania. W tym modelu doświadczalnym co drugi dzień myszy otrzymywały paszę *ad libitum*, natomiast w pozostałe dni podaż pokarmu była ograniczona do 25%, 15% lub 0% dziennego zapotrzebowania energetycznego. Różnice pomiędzy wynikami prezentowanymi w niniejszej rozprawie, a tymi przedstawionymi przez Combs i wsp. oraz Varady i wsp., mogą wynikać z tego, że w opisanych tu badaniach zastosowano inny gatunek gryzonia, a ponadto szczury z grupy PF były poddane mniej drastycznej restrikcji kalorycznej – otrzymywały około 80% ilości paszy, którą spożywały szczury kontrolne. Wyżej przedstawione dane z badań na myszach nie znajdują również potwierdzenia w wynikach opisujących stężenie adiponektyny we krwi odchudzanych pacjentów. W większości publikacji opisujących różne protokoły stosowania diet redukcyjnych nie odnotowano zmian stężenia tej adipokiny we krwi pacjentów [82]. Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie wskazują, że stężenie adiponektyny we krwi jest związane z masą tkanki tłuszczowej, jednak masa tkanki tłuszczowej nie jest głównym czynnikiem wpływającym na biosyntezę adiponektyny w tej tkance.

Spośród trzech adipokin badanych w opisywanym tu modelu doświadczalnym stężenie rezystyny w surowicy krwi ulega najbardziej zróżnicowanym zmianom pod wpływem diety. U szczurów poddanych 8 cyklom głodzenia i karmienia dochodzi do 50% wzrostu stężenia rezystyny we krwi, inaczej niż we wszystkich innych grupach szczurów. Dieta redukcyjna trwająca 48 dni (grupa PF) wywołuje efekt przeciwny – istotny spadek stężenia tego hormonu (ryc. 11). Opisane zmiany stężenia rezystyny w surowicy krwi szczurów nie są skorelowane ze zmianami masy WAT. Podobny jak w grupie PF wpływ diety redukcyjnej opisano niedawno u starszych, 8-miesięcznych szczurów rasy Wistar, u których 3-miesięczna dieta zaspokajająca 80% zapotrzebowania energetycznego badanych zwierząt doprowadziła do spadku o połowę stężenia rezystyny we krwi [40]. Istotnie wyższe stężenie rezystyny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR w porównaniu do kontroli i grupy PF świadczy o tym, że zmiany stężenia tej adipokiny w krwi wywołane przez wielokrotne głodzenie i karmienie są związane nie tylko z ilością spożytego przez szczury pokarmu, lecz również z cykliczną jego podażą.

U szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu stężenia wszystkich trzech badanych adipokin są różne od tych zaobserwowanych w grupie kontrolnej. Stężenie leptyny spada, natomiast stężenie adiponektyny i rezystyny rośnie w stosunku do grupy kontrolnej. Znamienna jest różnica w stężeniu adiponektyny i rezystyny w porównaniu z grupą PF. Przy takiej samej podaży energii zaobserwowano brak wpływu (adiponektyna) lub spadek (rezystyna) stężenia adipokin w grupie PF w porównaniu z kontrolą, przy jednoczesnym wzroście stężenia tych adipokin w surowicy krwi szczurów z grupy MSR. Zarówno w przypadku adiponektyny, jak i rezystyny różnica pomiędzy stężeniem adipokiny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR a PF jest istotna statystycznie (ryc. 10-11). Świadczy to o tym, że nie ilość spożytej paszy, lecz cykle głodzenia i następującego po nim karmienia *ad libitum* decydują o swoistym profilu zmian stężenia adipokin w surowicy krwi badanych zwierząt. Zaobserwowane zmiany w stężeniu adipokin w surowicy krwi są niewątpliwie związane ze zmianami szybkości syntezy i wydzielania tych białek do krążenia.

5.3. Zmiany ekspresji genów kodujących leptynę i receptor leptyny w tkance tłuszczowej

Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie doprowadziło do obniżenia ekspresji genu kodującego leptynę w tkance tłuszczowej badanych zwierząt (ryc. 15). U szczurów z grupy PF, poddanych diecie redukcyjnej, zaobserwowano podobne zmiany – trend spadkowy ilości mRNA leptyny w tkance tłuszczowej. W opublikowanej niedawno pracy Zhu i wsp. [211] również wykazano, że stężenie mRNA leptyny w tkance tłuszczowej szczurów poddanych diecie redukcyjnej jest niższe niż w grupie kontrolnej. 3-dniowe głodzenie także doprowadziło do obniżenia ekspresji genu *Lep* w tkance tłuszczowej – w WAT szczurów poddanych głodzeniu (S) zaobserwowano spadek ilości mRNA leptyny. Podobne wyniki uzyskał Zhang i wsp. [210] – u szczurów głodzonych ekspresja genu kodującego leptynę spadła, natomiast po karmieniu nieznacznie wzrosła, nie osiągając jednak poziomu kontroli. Z badań Bertile i Raclot [11] wynika, że u szczura ekspresja genu kodującego leptynę znacząco spada w WAT z okolic najądrzy już po pierwszym dniu głodzenia i ten spadek ekspresji pogłębia się jeszcze do 5 dnia głodzenia. Wszystkie powyższe dane wskazują, że ograniczona podaż pokarmu obniża ekspresję genu kodującego leptynę.

Stężenie mRNA leptyny oraz biosynteza leptyny w tkance tłuszczowej zależą od wielkości adipocytów i w komórkach o większej średnicy są wyższe (ryc. 16). U szczurów z grupy MSR, u których zaobserwowano najmniejszą średnicę adipocytów oraz najniższą masę WAT (ryc. 5, 12-14), odnotowano jednocześnie mniejszą ilość mRNA leptyny w tkance tłuszczowej, niższe stężenie leptyny w surowicy krwi oraz obniżone wydzielanie leptyny przez izolowane adipocyty w porównaniu do szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 9, 15, 17). Pomimo opisanych wyżej zależności, biosynteza i wydzielanie leptyny u szczurów z grupy MSR okazały się wyższe niż u szczurów głodzonych (S), których adipocyty były większe. Wskazuje to, że ekspresja genu *Lep* w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu mogła być jednocześnie indukowana przez insulinę, której stężenie było podwyższone we krwi tych szczurów.

Podobną zależność między wielkością adipocytów a ilością mRNA leptyny i biosyntezą tego białka u myszy opisał Zhang i wsp. [209], a u ludzi Lee i wsp. [96]. Molekularny mechanizm regulacji ekspresji genu kodującego leptynę w zależności od wielkości adipocytów nie został jeszcze poznany. W pracy Le Lay i wsp. [99] zaproponowano, że być może wewnątrzkomórkowe stężenie cholesterolu w adipocytach pełni rolę regulacyjną i jest wskaźnikiem wielkości komórki. Ten mechanizm regulacji ekspresji genów mógłby tłumaczyć niższy poziom ekspresji genu *Lep* w małych komórkach, jednak ci sami autorzy nie zaobserwowali zmian ekspresji genu kodującego leptynę w adipocytach, którym sztucznie obniżano stężenie cholesterolu. Te badania niestety nie były wykonane na dojrzałych, izolowanych adipocytach, lecz na komórkach linii 3T3-L1, o których wiadomo, że wydzielają bardzo małe ilości leptyny [112].

W tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu wzrosła ekspresja genu kodującego receptor jądrowy PPAR γ . Farmakologiczna aktywacja tego receptora w wielu modelach doświadczalnych prowadziła do represji genu kodującego leptynę [31], jednak w modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia PPAR γ odgrywał raczej niewielką rolę w regulacji ekspresji genu *Lep*, ponieważ nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem mRNA leptyny a stężeniem mRNA tego receptora w WAT badanych szczurów. Nie można jednak wykluczyć represji genu kodującego

leptynę w WAT szczurów z grupy MSR pod wpływem aktywacji PPAR γ przez naturalne ligandy tego receptora, które mogły powstać w tkance tłuszczowej w czasie wielokrotnego głodzenia i karmienia.

Ekspresja genu kodującego leptynę w tkance tłuszczowej jest również regulowana przez receptor LXR. Stulnig i wsp. [176] zaobserwowali, że podawanie agonisty LXR wywołało dwukrotny spadek ekspresji genu kodującego leptynę w WAT myszy. W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie wykazano, że ekspresja genu kodującego LXR α w tkance tłuszczowej badanych szczurów zależy od zmian diety – u szczurów poddanych 8 cyklom głodzenia i karmienia ilość mRNA LXR α wzrosła niemal trzykrotnie, natomiast u szczurów głodzonych przez 3 dni o około 50% (ryc. 35). Wzrost ilości LXR α mógł być jedną z przyczyn represji genu *Lep* w WAT szczurów z grup MSR i S, jednak nie odnotowano korelacji pomiędzy ilością mRNA leptyny a mRNA LXR α ($r = -0,1361$ $P > 0,05$). Wskazuje to, że receptor LXR α nie odgrywał istotnej roli w regulacji ekspresji genu kodującego leptynę w WAT szczurów z grupy MSR.

Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało ponad dwukrotny wzrost ilości mRNA kodującego receptor leptyny w WAT szczurów (ryc. 18). W tkance tłuszczowej badanych zwierząt ilość mRNA receptora leptyny jest skorelowana z ilością mRNA receptorów PPAR. Sugeruje to, że właśnie te receptory uczestniczą w indukcji genu kodującego *LepR* w WAT szczurów podczas wielokrotnego głodzenia i karmienia. Wzrost ilości receptora leptyny na powierzchni adipocytów w WAT szczurów z grupy MSR może zwiększać auto- lub parakrynnie działanie leptyny w tkance tłuszczowej wielokrotnie głodzonych i karmionych szczurów. Podobnych zmian nie odnotowano w WAT szczurów z grup S i SR, ani w WAT szczurów z grupy PF. Świadczy to o tym, że w badanym modelu doświadczalnym w tkance tłuszczowej dochodzi do wzrostu wrażliwości na leptynę i być może również na insulinę. Zaobserwowano już wcześniej, że szlak sygnałowy leptyny wpływa na substraty receptora insulinowego i 3-kinazę fosfatydyloinozitolową [126]. Z kolei Fruhbeck i wsp. [41] zauważyli, że leptyna działając na adipocyty wzmaga lipolizę. Zatem wzrost szybkości lipolizy zaobserwowany w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnie cyklom głodzenia i karmienia (ryc. 30) może być wynikiem zwiększonej wrażliwości ich adipocytów na leptynę.

5.4. Zmiany ekspresji genów kodujących adiponektynę i obie izoforny receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej

U szczurów głodzonych przez 3 dni (S) ekspresja genu kodującego adiponektynę spadła, natomiast po kolejnych trzech dniach karmienia (SR) zaobserwowano tendencję wzrostową ekspresji tego genu w porównaniu z grupą kontrolną. Podobny do opisanego wyżej dla grup S i SR wpływ głodzenia i karmienia na ekspresję genu kodującego adiponektynę zaobserwował wcześniej Zhang i wsp. [210]. W pracy tej autorzy wykazali, że u szczurów głodzonych ekspresja genu kodującego adiponektynę spadła, natomiast po karmieniu wzrosła, osiągając poziom obserwowany u szczurów kontrolnych. W badaniach Bertile i Raclot [11] poziom mRNA adiponektyny w WAT z najdłuzszych badanych szczurów wykazywał tendencję spadkową podczas głodzenia trwającego 1 i 3 dni, natomiast w piątym dniu głodówki osiągnął poziom stanowiący około 25% wartości kontrolnych.

Długotrwałe obniżenie ilości paszy spożytej przez zwierzęta nie wywołało istotnych zmian ekspresji genu kodującego adiponektynę w WAT szczurów z grupy PF. W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie zaobserwowano trend wzrostowy ekspresji genu kodującego adiponektynę w tkance tłuszczowej (ryc. 19) i stężenia adiponektyny w surowicy krwi (ryc. 10) szczurów z grupy PF oraz trend wzrostowy wydzielania adiponektyny do środowiska inkubacyjnego przez adipocyty izolowane z WAT szczurów z grupy PF (ryc. 21). W badaniach przeprowadzonych przez Zhu i wsp. [211] zaobserwowano 50% wzrost ilości mRNA adiponektyny w tkance tłuszczowej szczurów poddanych przez 2 miesiące diecie redukcyjnej, podczas której podaż pokarmu ograniczono do 60% paszy spożytej przez szczury z grupy kontrolnej. Podobne wyniki uzyskał wcześniej Wang i wsp. [198], wykazując około 50% wzrost ilości mRNA adiponektyny w WAT z okolic najądrzy u myszy spożywających 70% paszy jedzonej przez grupę kontrolną. Mniejsze zmiany ekspresji genu kodującego adiponektynę w WAT szczurów z grupy PF w porównaniu do tych opisanych przez autorów dwóch wyżej przedstawionych prac wynikają najprawdopodobniej z zastosowania mniej drastycznej diety redukcyjnej – szczury z grupy PF otrzymywały 80% ilości paszy, którą spożywały szczury z grupy kontrolnej.

Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało około 50% wzrost stężenia adiponektyny w surowicy krwi oraz około 50% wzrost ekspresji genu kodującego adiponektynę w WAT szczurów (ryc. 19). Również w preparatach adipocytów pochodzących z WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano większe wydzielanie adiponektyny do środowiska inkubacyjnego niż w preparatach adipocytów izolowanych z tkanki tłuszczowej szczurów kontrolnych (ryc. 21). Ilość mRNA adiponektyny w WAT szczurów z grupy MSR jest istotnie wyższa od tej odnotowanej w WAT szczurów z grup PF i SR. Powszechnie uważa się, że biosynteza adiponektyny w tkance tłuszczowej jest regulowana przez receptory PPAR [28, 111, 185, 206]. W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie wykazano, że ilość mRNA adiponektyny w WAT wszystkich badanych grup szczurów jest dodatnio skorelowana ze zmianami ilości mRNA receptora PPAR γ ($r=0,8193$ $P<0,001$), którego ekspresja również była regulowana przez zmiany diety. Wskazuje to, że receptor PPAR γ mógł być jednym z czynników indukujących ekspresję genu kodującego adiponektynę w tkance tłuszczowej szczurów.

Wzrost ilości mRNA adiponektyny w WAT szczurów z grupy MSR może być również wywołany wzrostem aktywności SREBP-1. Wiadomo, że SREBP-1 wiąże się z regionem promotorowym genu kodującego adiponektynę u myszy indukując jego ekspresję [159]. Taka regulacja może także dotyczyć szczura. W badanych szczurach ilość mRNA jest jednak słabo skorelowana z ilością mRNA SREBP-1 ($r=0,4837$ $P<0,001$). Należy jednak nadmienić, że sam czynnik transkrypcyjny SREBP-1 może być indukowany przez receptory LXR i RXR [29, 67]. Geny kodujące wszystkie te receptory ulegają wzmożonej ekspresji w WAT szczurów z grupy MSR.

Ekspresja genów kodujących obie izoformy receptora adiponektyny pozostała bez zmian w WAT szczurów głodzonych, głodzonych i następnie karmionych oraz w WAT szczurów PF w porównaniu z kontrolą (ryc. 22-23). Jednak wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało znaczny, ponad trzykrotny, wzrost ekspresji genów kodujących obie izoformy receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej szczurów. Indukcja ekspresji genów kodujących AdipoR1 i AdipoR2 w WAT szczurów z grupy MSR może być wywołana wzrostem stężenia insuliny, a także aktywacją lub wzrostem ekspresji jednego z czynników transkrypcyjnych uczestniczących w przekazywaniu sygnału insuliny. Regulacja ekspresji genów kodujących izoformy receptora adiponektyny w tkance tłuszcz-

czowej nie została jeszcze dokładnie zbadana. Najprawdopodobniej w regulacji transkrypcji tych genów uczestniczy insulina i glukagon, ponieważ odnotowano zmiany poziomu mRNA AdipoR1 i AdipoR2 pod wpływem głodzenia. W badaniach Bluher i wsp. [13] zarówno poziom mRNA AdipoR1, jak i AdipoR2 w WAT z najądrzy myszy głodzonych był wyższy niż u myszy kontrolnych. W podskórnej tkance tłuszczowej odwrotnie – ekspresja genu kodującego AdipoR1 była niższa u myszy głodzonych, natomiast ekspresja genu kodującego AdipoR2 nie zmieniała się. W badaniach Beylot i wsp. [12] ekspresja obu genów kodujących receptor adiponektyny nie zmieniała się w WAT szczurów rasy Wistar głodzonych przez 48 godz., w porównaniu z osobnikami karmionymi. Jednak to samo traktowanie otyłych szczurów rasy Zucker wywołało spadek ekspresji genu kodującego AdipoR1 w WAT. Co ciekawe, głodzenie chudych szczurów rasy Zucker wywołało spadek ekspresji genu kodującego AdipoR2, lecz nie AdipoR1. Prace Bluhera i wsp. [13] oraz Beylot i wsp. [12] to, jak dotąd, jedyne dwie publikacje opisujące wpływ głodzenia na ekspresję genów kodujących receptory adiponektyny w tkance tłuszczowej. Obydwie grupy wykonały jednak badania z użyciem różnych modeli zwierzęcych. Grupa niemiecka wykonała doświadczenia na chudych myszach C57Bl/6 pobierając do analiz tkankę tłuszczową podskórną i z okolic najądrzy [13], podczas gdy grupa francuska badała zmiany ekspresji genów w tkance tłuszczowej z okolic nerek u chudych szczurów rasy Wistar i u chudych oraz otyłych szczurów rasy Zucker [12]. Poza innym genetycznym podłożem zastosowanych zwierząt samo pobranie różnych rodzajów tkanki tłuszczowej mogło wywołać różnice w otrzymanych wynikach. W badaniach opisywanych w tej rozprawie głodzenie szczurów przez 3 doby oraz pojedynczy cykl głodzenia i karmienia nie zmieniały ekspresji genów kodujących receptor adiponektyny w WAT zwierząt, co może świadczyć o tym, że insulina i glukagon nie pełnią ważnej roli w regulacji ekspresji tych genów.

Ekspresja obu genów kodujących receptor adiponektyny w tkance tłuszczowej może być również regulowana przez receptor PPAR γ , ponieważ wywołanie wzrostu ekspresji genu i aktywności transkrypcyjnej tego receptora spowodowało wzrost ekspresji genu kodującego AdipoR1 [73]. Ponadto aktywacja receptorów PPAR przez podanie agonistów zwiększa w niektórych modelach doświadczalnych ekspresję jednego lub obu genów receptora adiponektyny; na przykład w tkance tłuszczowej myszy, które otrzymywały w paszy fenofibrat, związek aktywujący PPAR α , wzrosła ekspresja genu kodującego AdipoR2 przy braku zmian ekspresji genu kodującego AdipoR1 [52]. Zaobserwowano również wzrost ekspresji genu kodującego AdipoR2 w ludzkich makrofagach pod wpływem aktywatorów PPAR α , PPAR γ i LXR [21]. Podobne wyniki uzyskał Tsuchida i wsp. [186] – w WAT otyłych i cukrzycowych myszy KKy, u których ekspresja genów kodujących receptor adiponektyny była niższa niż u myszy chudych, podanie związku WY-14643, aktywatora receptora PPAR α zwiększało stężenie mRNA zarówno receptora AdipoR1, jak i AdipoR2. Wzrost ekspresji genów kodujących obie izoforny receptora adiponektyny w WAT szczurów z grupy MSR może być wywołany wzrostem ilości i aktywności transkrypcyjnej receptorów PPAR. W WAT tych szczurów zaobserwowano podwyższoną ekspresję genów PPAR α i PPAR γ ; ponadto ilość mRNA receptora adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w WAT wszystkich badanych grup szczurów jest dodatnio skorelowana z poziomem mRNA receptorów PPAR α i PPAR γ . Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki świadczą o tym, że receptory PPAR uczestniczą w indukcji genów kodujących obie izoforny receptora adiponektyny w tkance tłuszczowej szczurów podczas wielokrotnego głodzenia i karmienia.

Opisany wyżej wzrost ekspresji genów kodujących AdipoR1 i AdipoR2 w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu może zwiększać wrażliwość adipocytów na adiponektynę, która działając auto- lub parakrynnie może nie tylko wpływać na przemiany węglowodanów i lipidów w tkance tłuszczowej, lecz również zwiększać wrażliwość adipocytów na insulinę.

5.5. Zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej

Ekspresja genu kodującego rezystynę spadła o około 50% w WAT szczurów głodzonych przez 3 dni, a następnie wzrosła po trzech kolejnych dniach spożywania pokarmu (ryc. 24); towarzyszyły temu odpowiednie zmiany stężenia rezystyny w surowicy krwi (ryc. 11). W grupie PF również zaobserwowano spadek stężenia rezystyny w surowicy krwi oraz trend spadkowy ilości mRNA rezystyny w WAT. Restrykcja kaloryczna jest więc związana ze spadkiem stężenia rezystyny w krążeniu i ze spadkiem ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej. Podobne wyniki uzyskano w modelu diety redukcyjnej opisanym przez Varady i wsp. [188], w którym myszy co drugi dzień otrzymywały paszę *ad libitum*, a w pozostałe dni – w ilości odpowiadającej 15% paszy spożytej przez zwierzęta kontrolne. Wpływ restrykcji kalorycznej na ekspresję genu *Retn* również może zależeć od wieku – w badaniach Fernandez i wsp. [40] 3-miesięczna dieta redukcyjna (pokrywająca 80% normalnego zapotrzebowania na pokarm) znacznie obniżyła ilość mRNA rezystyny w WAT z okolic najądrzy szczurów 8-miesięcznych (spadek o 70%); z kolei u 24-miesięcznych osobników nie wywołała istotnych zmian ilości mRNA rezystyny. W tych badaniach zaobserwowano również, że podstawowa ekspresja genu kodującego rezystynę w WAT szczurów spada z wiekiem – najwyższa była u 3-miesięcznych zwierząt, ale już u 8-miesięcznych spadła o 40%, a u 24-miesięcznych aż o 83%.

Wielokrotnie powtarzane cykle głodzenia i karmienia wywołały efekt odwrotny niż restrykcja kaloryczna – zaobserwowano około dwukrotny wzrost ekspresji genu *Retn* w tkance tłuszczowej badanych szczurów (ryc. 24). Niewątpliwie kluczową rolę w takiej regulacji odgrywa insulina, której poziom wzrasta we krwi zwierząt w wyniku karmienia. W modelu głodzenia i karmienia wykazano wcześniej, że głodzenie prowadzi do spadku poziomu mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej myszy; natomiast w trakcie następującego po głodzeniu karmienia, zarówno dietą standardową, jak i wysokowęglowodanową, ekspresja genu *Retn* w tkance tłuszczowej badanych zwierząt wzrasta [11, 80, 157, 173]. Profil zmian poziomu mRNA rezystyny w opisanych modelach doświadczalnych jest bardzo podobny do obserwowanego w przypadku mRNA FAS w tkance tłuszczowej zwierząt [80, 157]. Sugeruje to, że ekspresja genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej podlega podobnej regulacji, jak ekspresja genu kodującego FAS – jest indukowana w stanie resorpcyjnym oraz przez insulinę. Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na zmiany stanu odżywienia organizmu są SREBP-1 i ChREBP [14, 162]. Gen kodujący FAS, podobnie jak geny kodujące inne enzymy lipogenne, jest jednym z genów docelowych tych czynników transkrypcyjnych, zarówno w tkance tłuszczowej, jak i w wątrobie [14, 162]. W modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia ilość mRNA rezystyny w WAT szczurów jest dodatnio skorelowana z ilością mRNA czynników

transkrypcyjnych SREBP-1 i ChREBP, co sugeruje, że te czynniki uczestniczą w dietetycznej regulacji ekspresji genu *Retn* w tkance tłuszczowej.

Ekspresja genu kodującego rezystynę w WAT może być również regulowana przez receptory PPAR. Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych PPAR α wskazują, że ten receptor jest niezbędny do utrzymania podstawowej ekspresji genu kodującego rezystynę w tkance tłuszczowej [42]. Może to być związane z bezpośrednim oddziaływaniem receptora PPAR α z elementem odpowiedzi PPPE w regionie promotorowym genu *Retn* lub z syntezą innych, zależnych od PPAR α białek, biorących udział w regulacji ekspresji tego genu w tkance tłuszczowej. Potwierdzeniem tej tezy mogą być wyniki badań, w których wykazano, że wzrostowi ekspresji genu i aktywności transkrypcyjnej receptora PPAR α w tkance tłuszczowej szczurów towarzyszył wzrost ekspresji genu kodującego rezystynę [89]. Ponadto podawanie myszom przez dwa tygodnie fenofibratu podnosiło ekspresję genu *Retn* w WAT [52].

Udział receptora PPAR γ w regulacji ekspresji genu kodującego rezystynę nie jest jednoznaczny. W niektórych doświadczeniach podawanie rosiglitazonu, aktywatora receptora PPAR γ , doprowadziło do obniżenia ekspresji genu kodującego rezystynę, zarówno w adipocytach 3T3-L1 [53, 173], jak i w tkance tłuszczowej cukrzycowych myszy [123, 173]. Są również badania, z których wynika, że ekspresja genu kodującego rezystynę może być indukowana przez aktywatory receptorów PPAR [52, 200]. W badaniach Way i wsp. [200] ekspresja genu kodującego rezystynę była obniżona w tkance tłuszczowej cukrzycowych lub otyłych myszy *ob/ob*, *db/db*, *tub/tub* i *KKy* w porównaniu do odpowiednich myszy kontrolnych. Podanie aktywatorów receptora PPAR γ myszom *ob/ob* spowodowało wzrost poziomu mRNA rezystyny w WAT 2- do 8-krotnie, w zależności od użytego związku. Podobnie, podawanie rosiglitazonu cukrzycowym szczurom ZDF podnosiło około dwukrotnie poziom mRNA rezystyny w WAT [200].

W przeprowadzonych ostatnio badaniach zaobserwowano, że aktywacja receptora PPAR δ prowadzi do zahamowania wzrostu ekspresji genu kodującego rezystynę w dojrzewających adipocytach linii 3T3-L1; jednak dootrzewnowe podawanie agonisty receptora PPAR δ przez dwa tygodnie doprowadziło tylko do nieznacznego spadku ilości mRNA rezystyny w WAT szczurów rasy Wistar karmionych dietą wysokotłuszczową [22]. Interpretacja tych wyników jest utrudniona, ponieważ sama zmiana diety ze standardowej paszy laboratoryjnej na wysokotłuszczową wywołuje zmiany ekspresji genu kodującego rezystynę w WAT. U szczurów rasy Wistar jedzących paszę wysokotłuszczową odnotowano spadek ekspresji tego genu w WAT [145], natomiast u myszy C57Bl/6J wzrost stężenia rezystyny w surowicy krwi [173].

W badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy odnotowano słabą dodatnią korelację pomiędzy ilością mRNA rezystyny w WAT szczurów ze wszystkich grup i ilością mRNA PPAR α ($r=0,3229$ $P<0,05$), PPAR γ ($r=0,3409$ $P<0,05$) i PPAR δ ($r=0,3144$ $P<0,05$). Sugeruje to, że w badanym modelu doświadczalnym receptory PPAR nie odgrywają wiodącej roli w indukcji genu kodującego rezystynę w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu. Patel i wsp. [133] wykazali, że w regionie promotorowym ludzkiego genu kodującego rezystynę znajduje się pięć miejsc, z którymi mogą wiązać się receptory PPAR. Z jednym z nich prawdopodobnie wiąże się receptor PPAR γ , lecz funkcje pozostałych potencjalnych elementów PPPE nie zostały poznane. Warto zwrócić uwagę, że autorzy nie wykonali analiz wiązania receptorów PPAR α i PPAR δ z regionem promotorowym genu kodującego rezystynę. Infor-

macje dostarczone przez Patel i wsp. są sprzeczne z danymi prezentowanymi przez Hartman i wsp. [53], którzy nie odnaleźli sekwencji PPRE w promotorze genu *Retn* myszy. Najprawdopodobniej wpływ receptorów PPAR na ekspresję genu kodującego rezystynę jest pośredni i w badanym modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia indukcja tego genu w tkance tłuszczowej szczurów zachodzi głównie pod wpływem czynników transkrypcyjnych SREBP-1 i ChREBP, natomiast receptory PPAR mogą w tej regulacji pełnić rolę uzupełniającą.

5.6. Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie prowadzi do zmian ekspresji genów kodujących białka, w tym enzymy, związane z przemianami węglowodanów i lipidów

Spadek poziomu triacylogliceroli we krwi szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu oraz niewielki wzrost ekspresji genu kodującego LPL w WAT oznaczają zmniejszony napływ kwasów tłuszczowych do adipocytów, co z kolei oznacza mniej substratów do syntezy triacylogliceroli i lipidów w adipocytach. Brak możliwości pobrania kwasów tłuszczowych z krążenia może wywołać spadek szybkości syntezy triacylogliceroli i spadek masy tkanki tłuszczowej. Jednak u myszy, u których tkanka tłuszczowa została pozbawiona możliwości pobierania kwasów tłuszczowych z powodu braku lipazy lipoproteinowej, nie zaobserwowano spadku masy tej tkanki [201]. Jeżeli przyjmiemy, że utrzymanie odpowiedniej masy tkanki tłuszczowej jest niezbędne dla przeżycia organizmu, to należy założyć, że w trakcie ewolucji musiały wykształcić się mechanizmy kompensacyjne pozwalające na zachowanie zasobów tkanki tłuszczowej w sytuacji niedoboru kwasów tłuszczowych pochodzących z pożywienia. W oparciu o uzyskane wyniki wydaje się, że takim mechanizmem jest zwiększenie lipogenezy *de novo* w komórkach tkanki tłuszczowej związane ze skoordynowanym wzrostem ekspresji genów kodujących enzymy, które biorą udział w tym procesie.

Wiadomo, że głodzenie i następujące po nim karmienie zwierząt dietą wysokowęglowodanową wywołuje wzrost aktywności enzymów lipogennych w wątrobie i tkance tłuszczowej [63, 182]. Większość enzymów lipogennych jest regulowana przez zmiany diety na etapie transkrypcji kodujących je genów [162] – zarówno zmiany aktywności, jak i ilości białka tych enzymów odpowiadają zmianom stężenia ich mRNA. W WAT wielokrotnie głodzonych i karmionych szczurów dochodzi do znacznego, nie obserwowanego w innych grupach szczurów wzrostu ilości mRNA enzymów lipogennych. Podobne zmiany ilości mRNA FAS i MEC zaobserwowano w WAT szczurów poddanych miesięcznej diecie redukcyjnej [94, 171]. Dieta redukcyjna wywołuje jednak znacznie mniejsze zmiany ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne w tkance tłuszczowej, niż wielokrotne głodzenie i karmienie – u szczurów poddanych miesięcznej diecie redukcyjnej wzrost ilości mRNA FAS i MEC w WAT był kilkakrotny, podczas gdy u szczurów poddanych ośmiu cyklom głodzenia i karmienia wzrost ilości mRNA głównych enzymów lipogennych (FAS i GPAT) był przeszło dwudziestokrotny (ryc. 27-28, tabela 3), a pomocniczego enzymu lipogennego – MEC – ponad trzydziestokrotny (nie przedstawiono). Skoordynowany wzrost ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu sugeruje udział wspólnych czynników transkrypcyjnych, zdolnych indukować ekspresję wszystkich tych genów. Podobnie skoordynowaną indukcję genów kodujących enzymy związane

z syntezą lipidów obserwuje się podczas różnicowania adipocytów w hodowli. Uważa się, że w procesie adipogenezy kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi, które synchronizują ekspresję wielu genów są PPAR γ i SREBP-1 [18, 37, 79, 181]. Jednak, w odróżnieniu od dosyć dobrze poznanych procesów regulacyjnych związanych z adipogenezą, regulacja syntezy lipidów i udział w tym procesie określonych czynników transkrypcyjnych w dojrzałych adipocytach jest nadal przedmiotem badań. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że receptory PPAR reagują na zmiany diety – w wyniku naprzemiennego głodzenia i karmienia znacznie wzrasta ekspresja kodujących je genów w tkance tłuszczowej (ryc. 31-34). Sugeruje to, że receptory PPAR, poza rolą czujników metabolicznych, aktywowanych przez wewnątrzkomórkowe ligandy, mogą również działać jako czynniki transkrypcyjne przekazujące sygnał insuliny i pod wpływem insuliny regulować aktywność lipogenną tkanki tłuszczowej. To działanie może obejmować stymulację transkrypcji genów kodujących enzymy i inne białka związane z lipogenezą. Funkcja, jaką pełni PPAR γ w dojrzałych adipocytach jest słabo poznana, wydaje się jednak, że ten jądrowy receptor odgrywa ważną rolę w regulacji syntezy lipidów. Zwiększenie masy tkanki tłuszczowej wymaga obecności PPAR γ – u heterozygotycznych myszy *Pparg*^{+/-} karmionych dietą wysokotłuszczową nie obserwuje się wzrostu objętości adipocytów [95]. Z kolei u otyłych myszy *ob/ob* podanie antagonisty PPAR γ spowodowało spadek wielkości adipocytów [146]. Większość genów regulowanych przez PPAR γ w tkance tłuszczowej koduje białka bezpośrednio związane ze szlakiem syntezy lipidów. Do genów regulowanych przez PPAR γ w tkance tłuszczowej należą między innymi geny kodujące karboksylazę acetylo-CoA, syntazę kwasów tłuszczowych, ATP-liazę cytrynianową, enzym jabłczanowy, desaturazę stearoilo-CoA, acylotransferazę glicerolo 3-fosforanową oraz lipazę lipoproteinową [155, 199]; wzrost ekspresji których zaobserwowano u szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu. Jednak wzmoczona ekspresja receptorów PPAR wywołana przez proliferatory peroksysomów nie wystarcza do indukcji genów enzymów lipogennych w WAT [69]. PPAR γ wymaga zatem współdziałania innych czynników transkrypcyjnych, aby ingerować w metabolizm dojrzałych adipocytów. Ekspresja genu kodującego receptor PPAR γ , podobnie jak ekspresja genów enzymów lipogennych, wzrasta po cyklach głodzenia i karmienia, jednak skala zmian ilości tego czynnika transkrypcyjnego jest znacznie mniejsza od zaobserwowanych zmian poziomu mRNA enzymów lipogennych (ryc. 27-28, 31, tabela 3). Sugeruje to, że receptor PPAR γ reaguje na zmiany diety, lecz odpowiedź ta, w postaci wzrostu ilości cząsteczek receptora lub wzrostu jego aktywności transkrypcyjnej, jest zbyt słaba, aby uznać PPAR γ za główny czynnik kontrolujący ekspresję genów enzymów lipogennych w tkance tłuszczowej badanych zwierząt. Wydaje się, że PPAR γ działa jako adipogenny czynnik transkrypcyjny w czasie różnicowania adipocytów, natomiast jego wpływ na indukcję enzymów związanych z lipogenezą w dojrzałych adipocytach wymaga współdziałania innych czynników transkrypcyjnych, np. SREBP-1. W WAT szczurów z grupy MSR ilość mRNA SREBP-1 jest około sześciokrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Obserwowany wzrost ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego jest skorelowany ze zmianami ekspresji genów enzymów lipogennych. Ilości mRNA FAS i GPAT w WAT wszystkich badanych grup są dodatnio skorelowane ze zmianami ilości mRNA SREBP-1 (dla FAS $r=0,7792$ $P<0,001$; dla GPAT $r=0,6865$ $P<0,001$). Przeprowadzone badania wskazują, że kontrola procesu zmian metabolicznych mających na celu utrzymanie masy tkanki tłuszczowej zachodzi z udziałem SREBP-1 i w opisanym modelu doświadczalnym wielokrotnego głodzenia i karmienia

ten czynnik transkrypcyjny może brać udział w indukcji genów odpowiedzialnych za lipogenezę.

Wzrost lipogenezy i indukcja enzymów lipogennych w WAT szczurów z grupy MSR mogą być związane ze zwiększoną ekspresją receptora LXR α w ich tkance tłuszczowej (ryc. 35). Od kilku lat opisuje się prolipogenne działanie receptora LXR. W mysich adipocytach 3T3-L1 zaobserwowano nagromadzenie kropli lipidowych pod wpływem agonistów LXR [65]. Z badań przeprowadzonych z wykorzystaniem adipocytów izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka wynika, że aktywacja LXR za pomocą syntetycznego liganda prowadzi do zwiększonej lipogenezy *de novo* i nagromadzenia triacylogliceroli w tych komórkach [29]. Pod wpływem aktywacji LXR α dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne: FAS, ACC1 i SCD1 oraz czynnik transkrypcyjny SREBP-1c i receptor PPAR γ w izolowanych adipocytach i w tkance tłuszczowej myszy [29, 65, 158].

W WAT szczurów z grupy MSR odnotowano obniżoną w stosunku do kontroli ilość mRNA kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (tabela 3). Niższa ekspresja i, co za tym idzie, obniżona ilość kinazy PDK4 oznacza, że aktywność dehydrogenazy pirogronianowej jest wyższa w WAT tych szczurów, co może prowadzić do większego przepływu metabolitów w kierunku cyklu kwasu cytrynowego. W efekcie może powstawać więcej cząsteczek acetylo-CoA, które po przeniesieniu do cytosolu będą stanowiły substrat do lipogenezy.

Zwiększenie intensywności lipogenezy w tkance tłuszczowej wymaga również dostarczenia glicerolo-3-fosforanu. Kluczowym enzymem dostarczającym ten substrat do syntezy triacylogliceroli jest dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (G3PD1), która umożliwia wykorzystanie metabolitów pośrednich glikolizy do syntezy glicerolo-3-fosforanu. Ilość mRNA kodującego G3PD1 w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR była dziesięciokrotnie wyższa niż u szczurów kontrolnych (tabela 3), co wskazuje na istotną rolę glikolizy w dostarczaniu glicerolo-3-fosforanu do syntezy lipidów w WAT szczurów poddanych wielokrotnym cyklom głodzenia i karmienia. Innym źródłem tego metabolitu może być gliceroloneogeneza zachodząca z udziałem PEPCK lub fosforylacja glicerolu katalizowana przez GyK. U szczurów z grupy MSR zaobserwowano trzykrotny spadek ilości mRNA kodującego PEPCK w stosunku do grupy kontrolnej, co może wskazywać, że enzym ten nie uczestniczy w zwiększaniu puli glicerolo-3-fosforanu w tkance tłuszczowej szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych. Jednocześnie w WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano około pięciokrotny wzrost ilości mRNA kodującego GyK. Guan i wsp. [48] zaobserwowali, że gen kodujący GyK ulega zwiększonej ekspresji w adipocytach pod wpływem aktywatorów PPAR γ . Podobnie, w badaniach wykonanych przez Kang i wsp. [68] wykazano wywołany podawaniem rosiglitazonu wzrost ekspresji genu kodującego GyK w WAT cukrzycowych szczurów. Ponadto w badaniach wykonanych z wykorzystaniem ludzkich adipocytów wykazano, że gen kodujący GyK może być indukowany przez receptor PPAR α i koaktywator PGC1 α [114]. W badaniach opisywanych w niniejszej rozprawie ilość mRNA GyK w WAT wszystkich badanych szczurów była dodatnio skorelowana z ilością mRNA receptorów PPAR γ ($r=0,6813$ $P<0,001$) oraz PPAR α ($r=0,7889$ $P<0,001$). Oznacza to, że indukcja ekspresji genu kodującego GyK, do której doszło w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu, mogła zajść pod wpływem receptorów PPAR. Wielokrotny wzrost ekspresji genu kodującego GyK sugeruje, że u szczurów z grupy MSR mogła zachodzić wzmożona synteza triacylogliceroli, w której wykorzystywane były glicerol i kwasy tłuszczowe pochodzące z lipolizy.

Lipoliza, proces uwalniania kwasów tłuszczowych ze zgromadzonych w adipocytach triacylogliceroli, jest głównym źródłem krążących we krwi kwasów tłuszczowych. W procesie hydrolizy zmagazynowanych w tkance tłuszczowej lipidów uczestniczą głównie dwie lipazy: ATGL i HSL, z których ATGL odpowiada za hydrolizę triacylogliceroli, natomiast HSL hydrolizuje przede wszystkim diacyloglicerole [168, 196, 212]. ATGL jest regulowana głównie na poziomie transkrypcji genu, którego ekspresja w tkance tłuszczowej zależy od stanu odżywienia organizmu. U szczurów głodzonych (grupa S) zaobserwowano słaby trend wzrostowy, natomiast w grupie szczurów głodzonych, a następnie karmionych (grupa SR) – spadek ilości mRNA ATGL o około 40%. Podobne wyniki uzyskał wcześniej Villena i wsp. [191], odnotowując wzrost ilości mRNA ATGL w tkance tłuszczowej myszy podczas głodzenia i spadek ilości tego mRNA podczas następującego po głodzeniu karmienia. W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie 48-dniowa dieta redukcyjna nie zmieniła ekspresji genu kodującego ATGL w tkance tłuszczowej szczurów z grupy PF. Natomiast w WAT szczurów z grupy MSR, wielokrotnie poddanych głodzeniu i karmieniu, doszło do odmiennych niż w grupie SR i PF zmian – zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost ilości mRNA ATGL w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 29). Ten wzrost ekspresji genu kodującego ATGL wystąpił wyłącznie w grupie MSR, zatem mógł być wywołany działaniem jednego z receptorów jądrowych lub czynników transkrypcyjnych, indukowanych w WAT badanych szczurów pod wpływem wielokrotnego głodzenia i karmienia. Niedawno wykazano, że w regulacji ekspresji genu kodującego ATGL w tkance tłuszczowej może brać udział receptor PPAR γ . W WAT chudych i otyłych (*ob/ob*) myszy, w podskórnej tkance tłuszczowej cukrzycowych szczurów oraz w adipocytach 3T3-L1 ATGL była indukowana pod wpływem rosiglitazonu, aktywatora receptora PPAR γ [76, 78]. Wzrost ekspresji genu kodującego ATGL w WAT szczurów z grupy MSR (ryc. 29) odpowiada wzrostowi ekspresji genów kodujących receptory PPAR (ryc. 31-34). Ponadto ilość mRNA ATGL w tkance tłuszczowej badanych szczurów jest skorelowana z ilością mRNA receptorów PPAR (współczynnik korelacji dla PPAR α $r=0,8440$ $P<0,001$; dla PPAR γ $r=0,6929$ $P<0,001$; dla PPAR δ $r=0,8711$ $P<0,001$). To sugeruje, że receptory PPAR biorą udział w regulacji ekspresji genu kodującego ATGL w WAT wielokrotnie głodzonych i karmionych szczurów. Zmiany ekspresji genu kodującego HSL w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu były podobne do opisanych wcześniej zmian ekspresji ATGL – zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost ilości mRNA HSL (tabela 3). Zmiany te są skorelowane ze zmianami ilości mRNA receptorów PPAR w WAT tych szczurów (współczynnik korelacji dla PPAR α $r=0,8934$ $P<0,001$; dla PPAR γ $r=0,7128$ $P<0,001$; dla PPAR δ $r=0,9608$ $P<0,001$). Wzrost ekspresji genu kodującego HSL wykazał ostatnio Kang i wsp. [68] w WAT cukrzycowych szczurów otrzymujących rosiglitazon. Oznacza to, że w tkance tłuszczowej szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych receptory PPAR mogą uczestniczyć w indukcji genów kodujących obie lipazy, ATGL i HSL. Wielokrotnie powtarzane cykle głodzenia i karmienia doprowadziły także do wzrostu ekspresji genu kodującego perylipiny w tkance tłuszczowej szczurów (tabela 3). Wzrost ekspresji tego genu w WAT może być również wywołany wzrostem aktywności receptorów PPAR [78]. Jednak w opisywanym tu modelu doświadczalnym korelacja między ilością mRNA perylipin a ilością mRNA receptorów PPAR w tkance tłuszczowej szczurów jest słaba (współczynnik korelacji dla PPAR α $r=0,4961$ $P<0,01$; dla PPAR γ $r=0,04375$ $P>0,05$; dla PPAR δ $r=0,4681$ $P<0,01$). Przedstawione wyniki mogą świadczyć o tym, że w modelu doświadczalnym wielokrotnego głodzenia i karmienia PPAR γ nie jest dominującym regulatorem biosyntezy peryli-

pin. Brak korelacji pomiędzy ilością mRNA perylipin a ilością mRNA PPAR γ może wynikać z tego, że do pomiarów pobrano tkankę tłuszczową z okolic nądrzy. W tej tkance, w przeciwieństwie do podskórnej, nie wykazano istotnych zmian biosyntezy perylipin pod wpływem rosiglitazonu u cukrzycowych szczurów [78]. W WAT szczurów z grupy MSR indukcja genu kodującego perylipiny może być jednak wywołana wzrostem aktywności transkrypcyjnej receptorów PPAR α lub PPAR δ , których wpływ na ekspresję tego genu nie został jeszcze poznany.

Wzrostowi ekspresji genów kodujących ATGL, HSL i perylipiny w WAT szczurów z grupy MSR towarzyszyła zwiększona lipoliza, mierzona ilością uwalniania glicerolu przez izolowane adipocyty (ryc. 29-30, tabela 3). Nie zaobserwowano zmian ekspresji genów kodujących wymienione lipazy w tkance tłuszczowej szczurów z grupy PF, ani zmian szybkości lipolizy w adipocytach izolowanych z WAT tych szczurów. Z przeprowadzonych badań oraz z badań opublikowanych ostatnio przez innych autorów wynika, że lipoliza w tkance tłuszczowej może być regulowana przez receptory PPAR [76, 212]. Jednoczesne zachodzenie procesów lipolizy i lipogenezy oraz wzrost syntezy glicerolo-3-fosforanu może prowadzić do restryfikacji powstałych w czasie lipolizy wolnych kwasów tłuszczowych. Możliwość jednoczesnego zachodzenia syntezy i hydrolizy triacylogliceroli w tkance tłuszczowej została wykazana wcześniej przez Raclot i Oudart [139] w izolowanych adipocytach szczura. Z badań prezentowanych w niniejszej rozprawie wynika, że ten swoisty „cykl daremny”, polegający na jednoczesnej biosyntezie i hydrolizie triacylogliceroli w tkance tłuszczowej, można wywołać *in vivo* cykliczną podażą pokarmu; natomiast nie dochodzi do wywołania takiego cyklu pod wpływem diety redukcyjnej.

5.7. Zmiany ekspresji genów kodujących receptory PPAR i ich koaktywator PGC1 α w tkance tłuszczowej

W WAT szczurów głodzonych przez 3 dni (S) zaobserwowano tendencję spadkową ilości mRNA PPAR γ , natomiast w tkance tłuszczowej szczurów z grupy SR – tendencję wzrostową w stosunku do kontroli (ryc. 31). Te wyniki są zgodne z otrzymanymi przez Escher i wsp. [36], którzy odnotowali spadek ekspresji PPAR γ (głównie PPAR γ 2) w WAT szczurów po 12-godzinnym głodzeniu.

Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie indukuje ekspresję genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej badanych zwierząt – w WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano niemal dwukrotny wzrost ilości mRNA PPAR γ w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 31). Podobne zmiany ekspresji genu kodującego PPAR γ otrzymano zarówno w pomiarach przeprowadzonych z wykorzystaniem starterów specyficznych wobec formy PPAR γ 2 transkryptu (charakterystycznej dla tkanki tłuszczowej), jak i w pomiarach ze starterami rozpoznającymi wszystkie formy transkryptu PPAR γ (nie przedstawiono). Otrzymane wyniki sugerują, że w WAT szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych indukcja genu kodującego PPAR γ następuje poprzez stymulację transkrypcji regulowanej przez wszystkie promotory genu *Pparg*. Wzrost ilości receptora PPAR γ w tkance tłuszczowej szczurów poddanych naprzemiennemu głodzeniu i karmieniu został również wykazany metodą Western-blot (ryc. 32). Ostatnio Zhu i wsp. [211] zaobserwowali, że do indukcji genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej dochodzi pod wpływem diety redukcyjnej – w WAT szczurów poddanych przez 2 mie-

siące diecie redukcyjnej wykazali o 50% wyższe stężenie mRNA i o około 25% wyższe stężenie białka PPAR γ niż w WAT szczurów z grupy kontrolnej. Wyniki te są podobne do uzyskanych w badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie w grupie MSR, jednak cykliczna podaż pokarmu wywołała większe zmiany ekspresji genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej badanych szczurów niż opisana przez Zhu i wsp. dieta redukcyjna. W przeciwieństwie do wyników opublikowanych przez Zhu i wsp. [211], w opisywanych tu badaniach nie odnotowano wzrostu ekspresji genu kodującego PPAR γ w WAT szczurów z grupy PF, poddanych diecie redukcyjnej przez 48 dni (ryc. 31). Może to wynikać z zastosowania różnych diet redukcyjnych – w badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie szczury z grupy PF otrzymywały około 80% ilości paszy, którą spożywały szczury z grupy kontrolnej; podczas gdy w badaniach Zhu i wsp. zwierzęta z grupy badanej otrzymywały 60% ilości paszy spożywanej przez zwierzęta kontrolne.

Pomimo indukcji ekspresji genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR nie zaobserwowano istotnych zmian ekspresji genu kodującego aFABP – białka powszechnie uznawanego za wskaźnik aktywności transkrypcyjnej receptora PPAR γ podczas różnicowania adipocytów [181]. Brak zmian ilości mRNA aFABP wskazuje, że wzrost ekspresji genu kodującego PPAR γ w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu nie jest związany ze zwiększonym różnicowaniem adipocytów. Innym genem, który został przyjęty za wskaźnik działania receptora PPAR γ w adipocytach jest gen kodujący adiponektynę; którego ekspresja zachodzi wyłącznie w dojrzałych adipocytach. W WAT szczurów z grupy MSR doszło do wzrostu ekspresji genu kodującego adiponektynę o 50%. Z badań Gustafson i wsp. [49] wynika, że ekspresja genów kodujących aFABP i adiponektynę jest w różny sposób regulowana przez PPAR γ w adipocytach. Ponadto Chui i wsp. [24] zauważyli, że w dojrzałych adipocytach 3T3-L1 gen kodujący aFABP jest indukowany niezależnie od stanu aktywacji receptora PPAR γ . Heterodimer PPAR γ -RXR łącznie z koaktywatorami jest stale związany z regionem promotorowym genu kodującego aFABP i dodanie rosiglitazonu, aktywatora PPAR γ , nie zwiększało ekspresji genu kodującego aFABP w dojrzałych adipocytach 3T3-L1 [24]. Wzrost ekspresji genu kodującego adiponektynę w WAT szczurów z grupy MSR i brak zmian ekspresji genu kodującego aFABP wskazuje, że w wyniku cyklicznego głodzenia i karmienia w tkance tłuszczowej tych szczurów doszło nie tylko do wzrostu ilości mRNA PPAR γ , ale również do zwiększenia aktywności transkrypcyjnej tego receptora, nie związanej z różnicowaniem adipocytów lecz z indukcją ekspresji genów docelowych PPAR γ w dojrzałych adipocytach.

Zmiany wywołane wielokrotnym głodzeniem i karmieniem zaobserwowano także w przypadku receptora PPAR α . Ekspresja genu kodującego ten receptor wzrosła ponad dwukrotnie w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu w porównaniu z kontrolą (ryc. 33). Indukcja PPAR α wystąpiła wyłącznie w grupie MSR – po jednym cyklu głodzenia-karmienia (grupa SR) oraz u szczurów poddanych diecie redukcyjnej (grupa PF) nie doszło do istotnych zmian ilości receptora PPAR α w stosunku do kontroli. Receptor PPAR α dominuje w wątrobie, natomiast w tkance tłuszczowej jego poziom jest zwykle niski [155]. Regulacja ekspresji PPAR α w tkance tłuszczowej i udział tego receptora w regulacji metabolizmu adipocyta jest w związku z tym słabo poznany. Niewielki wzrost ekspresji PPAR α w WAT szczura po głodzeniu zaobserwował Escher i wsp. [36], jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Głodzenie wywoływało wzrost ekspresji genu kodującego PPAR α głównie w wątrobie [36]. W WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano zwiększoną lipolizę,

w związku z tym przyczyną wzrostu ilości mRNA PPAR α obserwowanego w tkance tłuszczowej szczurów po wielokrotnym głodzeniu i karmieniu może być wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia kwasów tłuszczowych, naturalnych ligandów tego receptora, które mogłyby poprzez aktywację receptora PPAR α prowadzić do jego autoindukcji. Inną przyczyną wzrostu ekspresji genu kodującego PPAR α może być wzrost ekspresji genu kodującego PPAR γ i związana z tym indukcja genu kodującego adiponektynę. Wykazano, że PPAR α jest elementem jednej ze ścieżek sygnałowych adiponektyny, a jego ekspresja jest regulowana przez ten hormon [205]. Adiponektyna dzięki obecności receptora na powierzchni komórki działając auto- lub parakrynnie mogłaby wywoływać wzrost ekspresji genu kodującego PPAR α w adipocytach. Skutkiem zwiększonej biosyntezy PPAR α może być wzrost utleniania kwasów tłuszczowych w adipocytach, prowadzący do obserwowanego zmniejszenia objętości tych komórek.

Podobnie do wcześniej opisanych genów receptorów PPAR, również ekspresja genu kodującego PPAR δ wzrosła w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu, i była wyższa o około 50% od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 34). W pracy Escher i wsp. [36] zaobserwowano wpływ głodzenia na ekspresję genu kodującego PPAR δ jedynie w wątrobie i nerce. Kilku- lub kilkunastogodzinne głodzenie nie zmieniało poziomu mRNA PPAR δ w WAT. Warto zauważyć, że w badaniach Escher i wsp. [36] ekspresja genu kodującego PPAR δ w wątrobie ulegała obniżeniu, natomiast ekspresja genu PPAR α była wyższa u szczurów głodzonych w porównaniu do kontroli. Zarówno PPAR α , jak i PPAR δ uczestniczą w wątrobie i w mięśniach szkieletowych w regulacji utleniania kwasów tłuszczowych poprzez indukcję takich enzymów, jak palmitoilotransferaza karnitynowa I, czy enzymy β -oksydacji kwasów tłuszczowych [77, 155]. W WAT szczurów z grupy MSR odnotowano niemal dwukrotny wzrost ilości mRNA LCPT1 (tabela 3). Ilość mRNA LCPT1 w WAT wszystkich badanych szczurów jest dodatnio skorelowana z ilością mRNA PPAR α ($r=0,6742$ $P<0,001$) i PPAR δ ($r=0,7758$ $P<0,001$). Może to świadczyć o tym, że w WAT szczurów z grupy MSR receptory PPAR α i PPAR δ mogą uczestniczyć w indukcji genów kodujących enzymy uczestniczące w utlenianiu kwasów tłuszczowych.

PGC1 α , koaktywator receptora PPAR γ , należy do rodziny białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania czynników transkrypcyjnych PPAR [148, 149]. PGC1 α wiąże się z heterodimerem PPAR-RXR i najprawdopodobniej stanowi platformę, do której mogą przyłączać się kolejne białka np. koaktywatory z aktywnością acetylotransferazy histonowej, takie jak CBP/p300 lub SRC [138, 148]. PGC1 α należy do białek niezwykle ważnych z punktu widzenia regulacji przemian lipidów w tkance tłuszczowej – w badaniach Vohl i wsp. [192] przeprowadzonych niedawno na populacji francuskiej zaobserwowano, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu w genie kodującym PGC1 α , prowadzący do zmiany jednego aminokwasu (Gly482Ser), może być związany z występowaniem otyłości. Ekspresja genu kodującego PGC1 α wzrosła w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu i była pięciokrotnie wyższa od wartości mierzonych u szczurów z grupy kontrolnej (ryc. 37). Indukcja PGC1 α w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR oznacza zwiększoną aktywność transkrypcyjną receptorów PPAR. W przypadku receptora PPAR γ mogło to wywołać wzrost ekspresji genu kodującego adiponektynę oraz indukcję genów związanych z przemianami lipidów, natomiast w przypadku receptora PPAR α i PPAR δ – zwiększone utlenianie kwasów tłuszczowych w adipocytach.

5.8. Zmiany ekspresji genów kodujących receptory LXR α i RXR α w tkance tłuszczowej

Wielokrotne głodzenie i karmienie doprowadziło do ponad dwukrotnego wzrostu ekspresji genu kodującego LXR α w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR w porównaniu z kontrolą (ryc. 35). Gen kodujący LXR α był również indukowany przez głodzenie – ilość mRNA LXR α w WAT szczurów z grupy S była o około 50% wyższa, niż w kontroli (ryc. 35). Indukcja LXR α w WAT szczurów z grupy MSR może zachodzić pod wpływem receptora PPAR γ , którego ekspresja znacznie wzrosła u szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych (ryc. 31). Juvet i wsp. [65] wykazali, że aktywacja PPAR γ za pomocą syntetycznych ligandów, darglitazonu lub rosiglitazonu, indukuje ekspresję genu kodującego LXR α bezpośrednio poprzez PPRE w promotorze tego genu. Indukcja LXR α pod wpływem aktywacji PPAR γ zachodziła zarówno w mysich adipocytach 3T3-L1, ludzkich adipocytach izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej oraz w tkance tłuszczowej otyłych szczurów rasy Zucker [65]. Ponadto ekspresja LXR α może być indukowana przez insulinę. W badaniach Tobin i wsp. [179] wykazano, że insulina uczestniczy w indukcji tego genu w hepatocytach. Podobna regulacja ekspresji genu kodującego LXR α może zachodzić w WAT szczurów z grupy MSR, u których obserwuje się znacznie podwyższony poziom insuliny we krwi (ryc. 8).

Do zwiększonej ekspresji genu kodującego LXR α w tkance tłuszczowej szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu mogą przyczyniać się kwasy tłuszczowe uwalnianie w wyniku wzmoczonej lipolizy. Tobin i wsp. [178] wykazali, że ekspresja genu kodującego LXR α , w odróżnieniu od LXR β , była indukowana przez kwasy tłuszczowe w hepatocytach szczura. Kwasy tłuszczowe są naturalnymi ligandami receptorów PPAR, więc w takiej regulacji może brać udział zarówno receptor PPAR γ , jak i pozostałe izoformy – PPAR α i PPAR δ . Aktywacja PPAR α pod wpływem bezafibratu w badaniach Juvet i wsp. [65] doprowadziła do ponad dwukrotnego wzrostu ilości mRNA LXR α w adipocytach 3T3-L1.

Gen kodujący LXR α podlega również autoindukcji, wzmagając własną transkrypcję. Promotor genu kodującego LXR α człowieka zawiera trzy sekwencje odpowiedzi na LXR (LXRE), które mogą być aktywowane przez LXR α i LXR β [103]. Zarówno naturalne, jak i syntetyczne ligandy LXR zwiększają ekspresję genu kodującego LXR α w makrofagach, mysich i ludzkich adipocytach oraz hepatocytach człowieka [65, 202]. Wzrost ekspresji LXR α może również prowadzić do indukcji genu kodującego PPAR γ , bezpośrednio poprzez sekwencję LXRE w promotorze tego genu [158]. Możliwe, że w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu powstaje dodatnie sprzężenie zwrotne pomiędzy LXR α i PPAR γ , które zwiększają nawzajem ekspresję swoich genów, aktywując procesy metaboliczne w tkance tłuszczowej badanych zwierząt. Udział zwiększonej ekspresji LXR α w regulacji funkcji metabolicznej tkanki tłuszczowej został omówiony w rozdziale 5.6.

Z kolei ekspresja genu kodującego RXR α w WAT szczurów z grupy MSR była niemal dwukrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej (ryc. 36). Paradoksalnie, pomimo tego, że receptor RXR tworzy heterodimery z większością innych receptorów jądrowych, czynniki wpływające na jego ekspresję są słabo poznane. RXR α jest regulowany przez zmiany diety – Kamei i wsp. [67] wykazali niedawno, że głodzenie obniża, natomiast następujące po nim karmienie zwiększa ekspresję genu kodującego RXR α w wątrobie szczurów. Receptor RXR α tworzy heterodimery z LXR α i bierze udział

w indukcji ekspresji genu kodującego SREBP-1 w testach *in vitro* [67]. U myszy z delecją obu alleli genu kodującego RXR α w tkance tłuszczowej zaobserwowano zahamowane różnicowanie preadipocytów, oporność na otyłość wywołaną dietą oraz zaburzone przemiany lipidów [62]. Opisane zmiany przypominają te wynikające z braku PPAR γ lub LXR α , z którymi RXR α tworzy heterodimery. Wyjaśnienie potencjalnej roli RXR α w regulacji wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej wymaga opracowania nowego modelu doświadczalnego.

5.9. Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny SREBP-1 w tkance tłuszczowej

Z badań opisywanych w niniejszej rozprawie wynika, że ekspresja genu kodującego SREBP-1 w tkance tłuszczowej jest regulowana przez czynniki dietetyczne, przy czym dużą rolę odgrywa sposób podaży pokarmu. W zastosowanym modelu doświadczalnym cykliczna podaż pokarmu, w odróżnieniu od diety redukcyjnej, doprowadziła do indukcji genu kodującego SREBP-1 w tkance tłuszczowej – wielokrotne powtarzanie głodzenia i karmienia doprowadziło do około sześciokrotnego wzrostu ilości mRNA SREBP-1 w WAT badanych szczurów, natomiast w grupie poddanej diecie redukcyjnej ilość tego mRNA nie różniła się od kontroli (ryc. 38). Wzrost ekspresji tego genu w tkance tłuszczowej został również potwierdzony metodą Western-blot, za pomocą której wykazano wzrost ilości aktywnej formy czynnika SREBP-1 po ośmiu cyklach głodzenia i karmienia (ryc. 39). Przeciwciała użyte w badaniach rozpoznają obie formy SREBP-1, jednak wiadomo, że SREBP-1c jest izoformą dominującą w tkance tłuszczowej [163]. Ponadto SREBP-1a nie jest regulowany przez zmiany diety, takie jak głodzenie i karmienie [57]. Przyjęto zatem, że sygnał uzyskany metodą Western-blot odzwierciedla zmiany ilości białka SREBP-1c. Przyczyną zwiększonej biosyntezy SREBP-1 w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR może być podwyższone stężenie insuliny we krwi tych zwierząt. Wykazano, że w adipocytach i hepatocytach pod wpływem insuliny wzrasta ekspresja genu kodującego SREBP-1 i powstaje więcej jądrowej, aktywnej formy SREBP-1c, zatem ten czynnik transkrypcyjny może być ważnym składnikiem szlaku sygnałowego insuliny [5, 100]. We krwi szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych, pomimo obserwowanego u tych zwierząt zahamowania wzrostu masy ciała i spadku masy tkanki tłuszczowej, stężenie insuliny było 2-krotnie wyższe niż u szczurów poddanych jednorazowemu głodzeniu i karmieniu i ponad 4-krotnie wyższe niż u szczurów z grupy kontrolnej i grupy PF (ryc. 8). Gen kodujący czynnik transkrypcyjny SREBP-1c w tkance tłuszczowej jest również genem docelowym receptora LXR [29, 65, 144, 158]. W opisanym modelu doświadczalnym profil zmian ilości mRNA SREBP-1 w WAT badanych szczurów był bardzo podobny do profilu zmian ilości mRNA LXR α – znaczny wzrost ekspresji genu kodującego LXR α , niemal trzykrotny, odnotowano wyłącznie w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR (ryc. 35). Ponadto zmiany ekspresji genu kodującego SREBP-1 w WAT wszystkich badanych grup szczurów były dodatnio skorelowane ze zmianami ilości mRNA receptora LXR α ($r=0,4659$ $P<0,01$). Oznacza to, że w wywołanej wielokrotnym głodzeniem i karmieniem indukcji ekspresji genu kodującego SREBP-1 w tkance tłuszczowej mógł brać udział receptor jądrowy LXR α .

Ostatnio opublikowane dane wskazują, że nadekspresja SREBP-1c odgrywa istotną rolę w wywołanej przez głodzenie i karmienie indukcji enzymów związanych

z przemianami lipidów [45]. Proponowany udział LXR α w regulacji ekspresji SREBP-1 wskazuje, że indukcja enzymów lipogennych w tkance tłuszczowej szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych może być wywołana wzrostem aktywności transkrypcyjnej LXR α , który wzmacnia transkrypcję genów kodujących te enzymy nie tylko bezpośrednio, lecz również pośrednio poprzez zmiany ilości białka SREBP-1c. Zmiany ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 w WAT szczurów z grupy MSR odpowiadały zmianom ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne (ryc. 27-28). Wydaje się, że podczas wielokrotnego głodzenia i karmienia SREBP-1 może pełnić rolę czynnika koordynującego ekspresję genów kodujących białka, które biorą udział w wewnątrzkomórkowych przemianach węglowodanów i lipidów, szczególnie zaś genów kodujących enzymy szlaku lipogenezy w tkance tłuszczowej. W badaniach przeprowadzonych na myszach z uszkodzonym genem SREBP-1 (nie powstawało ani białko SREBP-1a, ani SREBP-1c) zaobserwowano, że poziom mRNA enzymów lipogennych był obniżony w wątrobie, lecz pozostał bez zmian w tkance tłuszczowej [161]. Interpretacja tych wyników jest jednak trudna ponieważ zauważono jednoczesny wzrost ekspresji genu kodującego SREBP-2. W kolejnych doświadczeniach ta sama grupa badaczy uzyskała wyniki świadczące o tym, że u myszy pozbawionych SREBP-1 odpowiedź wątroby i tkanki tłuszczowej na głodzenie i karmienie jest upośledzona [104]. Z analizy mysiego genu kodującego SREBP-1 wynika, że istnieje dodatnie sprzężenie zwrotne – SREBP może sam siebie indukować łącząc się z jednym z elementów SRE we własnym regionie promotorowym [1]. Taka dodatnia pętla regulacyjna może odpowiadać za wielokrotne wzmocnienie sygnału insuliny u zwierząt w czasie przejścia od głodzenia do karmienia [1]. Zjawiskiem autoindukcji czynników SREBP można wyjaśnić fakt, że u myszy transgenicznych, pozbawionych aktywnej formy SREBP-1, doszło do wzmocnienia ekspresji genu kodującego ten czynnik transkrypcyjny [162]. Prawdopodobnie przy spadku ilości dojrzałej formy SREBP-1 jej wzmocniona biosynteza może zachodzić pod wpływem SREBP-2. Wydaje się, że w wątrobie, i być może w tkance tłuszczowej, funkcjonują nie poznane jeszcze mechanizmy regulacyjne, wyrównujące ilość tego czynnika transkrypcyjnego.

5.10. Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny ChREBP w tkance tłuszczowej

Wiadomo, że ekspresja genów kodujących enzymy lipogenne w tkance tłuszczowej zależy od stanu odżywienia organizmu i poziomu insuliny we krwi [44, 63]. Precyzyjna odpowiedź na sygnały przekazywane przez hormony w czasie zmiany diety wymaga wielu czynników regulacyjnych, z których najczęściej wymienia się SREBP-1. Jednak Stoeckman i Towle [174] wykazali, że w hepatocytach samo zwiększenie ilości aktywnej formy SREBP-1c nie wystarczyło do osiągnięcia takiego poziomu ekspresji enzymów lipogennych FAS i ACC, jaki był obserwowany pod wpływem wysokich stężeń insuliny i glukozy. W regulacji ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne pod wpływem insuliny i glukozy uczestniczą inne czynniki, z których najważniejszym jest prawdopodobnie białko ChREBP. Ten odkryty przez zespół prof. Uyeda czynnik transkrypcyjny w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy i insuliny wiąże się z elementem odpowiedzi na węglowodany w regionach promotorowych genów kodujących enzymy lipogenne, indukując ich ekspresję [187]. W WAT badanych szczurów ilość mRNA tego

czynnika transkrypcyjnego spadła po głodzeniu i wzrosła po następującym po nim karmieniu (ryc. 40). W tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR zaobserwowano czterokrotny, natomiast u szczurów z grupy PF około dwukrotny wzrost ekspresji genu kodującego ChREBP. Interesujące jest, że w zastosowanym modelu doświadczalnym zaobserwowano różny profil zmian ilości mRNA czynników transkrypcyjnych ChREBP i SREBP-1 w tkance tłuszczowej badanych szczurów. Ekspresja ChREBP wzrosła zarówno w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu, jak i w WAT szczurów poddanych diecie redukcyjnej; podczas gdy wzrost ekspresji SREBP-1 zaobserwowano wyłącznie po cyklicznej podaży pokarmu – ekspresja SREBP-1 w WAT szczurów z grupy PF nie różniła się od kontroli. Wskazuje to na odmienną regulację ekspresji genów kodujących wymienione czynniki transkrypcyjne pod wpływem diety. Uważa się, że w regulacji ekspresji genu kodującego SREBP-1 w tkankach lipogennych oprócz insuliny bierze udział receptor LXR, natomiast ekspresja genu kodującego ChREBP i aktywacja tego białka mogą zachodzić pod wpływem zwiększonego stężenia insuliny i glukozy [29, 30, 44, 65]. Zmiany ilości mRNA tego czynnika transkrypcyjnego w WAT badanych szczurów odpowiadają zmianom stężenia insuliny w surowicy krwi badanych szczurów (ryc. 8), co może sugerować, że to insulina, a nie glukoza, uczestniczy w regulacji ekspresji genu kodującego ChREBP. Dużą rolę w regulacji aktywności transkrypcyjnej czynnika ChREBP, poza zmianami ekspresji kodującego go genu, odgrywają modyfikacje posttranslacyjne tego białka [30, 44, 61]. Pod wpływem zwiększonego metabolizmu glukozy w komórce dochodzi do wzrostu stężenia ksylozo-5-fosforanu i aktywacji fosfatazy białkowej PP2A, która defosforyluje ChREBP [30, 61], co z kolei powoduje przemieszczenie się tego czynnika do jądra komórkowego i indukcję transkrypcji jego genów docelowych. Inaktywacja ChREBP następuje poprzez katalizowaną przez PKA lub AMPK fosforylację, która prowadzi do przeniesienia białka ChREBP do cytosolu [30, 61].

Z badań przeprowadzonych przez Uyeda i wsp. [187] wynika, że ChREBP może brać udział w regulacji ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne w tkance tłuszczowej. W opisywanym w niniejszej rozprawie modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia spośród genów związanych z przemianami lipidów podobny do ChREBP profil zmian ilości mRNA, to znaczy wzrost w WAT szczurów z grup MSR i PF, wykazano dla FAS (ryc. 27) i innych enzymów lipogennych (nie przedstawiono). Ilość mRNA FAS w WAT wszystkich badanych grup szczurów była dodatnio skorelowana z ilością mRNA ChREBP ($r=0,7106$ $P<0,001$). Podobną korelację odnotowano dla transportera glukozy GLUT4 ($r=0,6261$ $P<0,001$) odpowiadającego za transport glukozy do adipocyta.

Powyższe dane sugerują, że czynnik transkrypcyjny ChREBP w WAT wielokrotnie głodzonych i karmionych szczurów jest regulowany niezależnie od czynnika SREBP-1 i uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących enzymy lipogenne w WAT badanych szczurów synergistycznie do czynnika SREBP-1.

5.11. Zmiany ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny C/EBP α w tkance tłuszczowej

Ilość mRNA C/EBP α , czynnika transkrypcyjnego związanego z procesem adipogenezy, była około dwukrotnie wyższa w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głod-

dzeniu i karmieniu (grupa MSR) w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 41). Indukcja genu kodującego C/EBP α wystąpiła tylko w tej grupie szczurów, jest więc charakterystyczna dla wielokrotnego głodzenia i karmienia. Wskazywałoby to na możliwość zwiększonej adipogenezy w tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR. Jednak w WAT tych szczurów nie wykryto mRNA Pref-1 (nie przedstawiono) – białka uznawanego za wskaźnik obecności preadipocytów, ponieważ jego ekspresja zachodzi w preadipocytach i spada podczas dojrzewania adipocytów. Brak mRNA Pref-1 wskazuje, że pod wpływem wielokrotnego głodzenia i karmienia nie dochodzi do zwiększonej adipogenezy w tkance tłuszczowej szczurów. C/EBP α jest uważany za czynnik transkrypcyjny indukujący ekspresję genu kodującego leptynę [56], jednak w WAT szczurów z grupy MSR ilość mRNA leptyny jest niższa niż w kontroli, podczas gdy ilość mRNA C/EBP α jest wyższa. U tych szczurów najprawdopodobniej dochodzi do represji genu kodującego leptynę pod wpływem PPAR γ . Hollenberg i wsp. [56] zasugerowali, że PPAR γ związany z ligandem antagonizuje działanie C/EBP α , który w obecności aktywnego PPAR γ nie wiąże się z regionem promotorowym genu *Lep*. Przyczyną spadku ekspresji genu kodującego leptynę w WAT szczurów z grupy MSR może być oddziaływanie receptora PPAR γ z czynnikiem transkrypcyjnym C/EBP α lub ich konkurencja o wspólne kofaktory. Mechanizm represji genu *Lep* w tkance tłuszczowej przez PPAR γ nie został jak dotąd, mimo wielu badań, wyjaśniony.

W grupie szczurów poddanych diecie redukcyjnej (PF) ilość mRNA C/EBP α w tkance tłuszczowej nie uległa zmianie. Wpływ diety redukcyjnej na zmiany ilości czynnika transkrypcyjnego C/EBP α w tkance tłuszczowej szczura był niedawno badany przez Zhu i wsp. [211]. W WAT 25-miesięcznych szczurów poddanych diecie redukcyjnej trwającej 2 miesiące zaobserwowano wyższe stężenie C/EBP α niż w WAT szczurów z grupy kontrolnej, jednak u szczurów w wieku 2 miesięcy dieta redukcyjna nie zmieniała stężenia C/EBP α w tkance tłuszczowej. Wskazuje to, że wywołane przez dietę redukcyjną zmiany ekspresji C/EBP α w tkance tłuszczowej są związane z wiekiem i mogły nie wystąpić u szczurów w wieku około 5 miesięcy, opisywanych w niniejszej rozprawie.

Wzrost ilości mRNA C/EBP α w WAT szczurów z grupy MSR jest słabo skorelowany ze zmianami ilości mRNA adipokin i enzymów lipogennych, co może sugerować niewielką rolę tego czynnika w regulacji biosyntezy adipokin i kontroli lipogenezy w tkance tłuszczowej szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych (nie przedstawiono). Wyniki badań będące przedmiotem niniejszej rozprawy wskazują, że w dojrzałych adipocytach czynnik C/EBP α najprawdopodobniej nie odgrywa istotnej roli ani w regulacji ekspresji genów kodujących adipokiny, ani w ekspresji genów kodujących enzymy związane z przemianami lipidów.

5.12. Wielokrotnie powtarzane głodzenie i karmienie uruchamia mechanizmy regulacyjne właściwe tylko dla tkanki tłuszczowej

Głodzenie i następujące po nim karmienie to znany model doświadczalny prowadzący do stymulacji enzymów związanych z lipogenezą w głównych tkankach lipogennych: w wątrobie i w tkance tłuszczowej [44, 63]. Jednak, jak wykazaliśmy wcześniej, wielokrotne powtarzanie cykli głodzenia i karmienia uruchamia inne mechanizmy regulacyjne, właściwe tylko dla tkanki tłuszczowej, bowiem w wątrobie kolejne cykle głó-

dzenia i karmienia nie wywołują dodatkowych zmian szybkości lipogenezy, ani aktywności enzymów lipogennych [85]. W tkance tłuszczowej natomiast dochodzi do wielokrotnego wzrostu szybkości lipogenezy i aktywności enzymów lipogennych. Z danych przedstawionych w niniejszej rozprawie wynika, że wielokrotne głodzenie i karmienie uruchamia dodatkowe lub prowadzi do zwielokrotnienia istniejących mechanizmów regulacyjnych w tkance tłuszczowej i w związku z tym pozwala na poznanie specyficznych dla tej tkanki szlaków sygnałowych, regulujących jej aktywność wydzielniczą i metaboliczną. W tym modelu doświadczalnym dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących główne receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne uczestniczące w regulacji funkcji tkanki tłuszczowej. Nasiloną lipogeneza i lipoliza zachodząca w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu może także zmieniać stężenia metabolitów – naturalnych aktywatorów receptorów jądrowych. McIntyre i wsp. [115] wykazali niedawno, że kwas lizofosfatydowy (LPA) jest biologicznym ligandem PPAR γ , działającym bezpośrednio na ten receptor jądrowy. LPA wiąże się jako naturalny ligand z PPAR γ , wywołując wzrost transkrypcji genów zawierających element odpowiedzi na PPAR, PPRE. Z badań McIntyre i wsp. wynika również, że LPA jest specyficznym agonistą PPAR γ i nie aktywuje pozostałych receptorów PPAR (α i δ). Przy wzroście ekspresji GPAT i wzroście syntezy glicerolo-3-fosforanu oraz przy nasilonej lipogenezie i lipolizie w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu może powstawać więcej kwasu lizofosfatydowego. W WAT szczurów z grupy MSR odnotowano także kilkunastokrotny wzrost ekspresji genu kodującego SCD1 (nie przedstawiono) – kluczowy enzym syntetyzujący nienasycone kwasy tłuszczowe [34]. Przy zwiększonej aktywności SCD1 w WAT szczurów może dochodzić do wzrostu szybkości desaturacji kwasów tłuszczowych. Z badań McIntyre i wsp. [115] wynika, że najlepszym aktywatorem PPAR γ jest kwas lizofosfatydowy zawierający w swoim składzie kwas olejowy, który z kolei jest produktem reakcji katalizowanej przez SCD1. Ponadto nienasycone kwasy tłuszczowe są naturalnymi ligandami PPAR α i δ [181]. Zatem w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu może dochodzić nie tylko do zmian ekspresji genów kodujących receptory PPAR, lecz również do aktywacji tych receptorów pod wpływem ich naturalnych aktywatorów.

Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołuje spadek stężenia leptyny oraz wzrost stężenia adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi. Podobnym zmianom jak stężenie adipokin w surowicy ulegają również: ekspresja genów kodujących te adipokiny w WAT szczurów oraz tempo wydzielania tych białek przez izolowane adipocyty. Zmiany charakterystyczne dla opisanego modelu doświadczalnego, polegającego na ośmiokrotnym powtórzeniu cyklu głodzenia i karmienia zwierząt, różnią się od tych zaobserwowanych u zwierząt kontrolnych, szczurów poddanych jednokrotnemu głodzeniu i karmieniu oraz w grupie szczurów, które otrzymywały codziennie porcję paszy odpowiadającej ilości paszy spożywanej średnio przez szczury wielokrotnie głodzone i karmione. Spadek stężenia leptyny w surowicy krwi szczurów, spadek ilości mRNA leptyny w WAT oraz spadek tempa wydzielania leptyny przez izolowane adipocyty są związane ze spadkiem wielkości adipocytów i ze spadkiem masy WAT. Wzrost stężenia adiponektyny w surowicy krwi szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych, wzrost ilości mRNA adiponektyny w WAT oraz wzrost tempa wydzielania tego białka przez izolowane dojrzałe adipocyty są prawdopodobnie związane ze wzrostem ilości i aktywności transkrypcyjnej receptorów jądrowych, głównie PPAR γ . Wzrost stężenia rezystyny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR, wzrost ilości mRNA rezystyny w WAT oraz wzrost tempa wydzielania tego białka przez izolowane dojrzałe adipocyty może być

wywołany wzrostem aktywności białek uczestniczących w szlaku sygnałowym insuliny, z których najważniejszą rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne SREBP-1 i ChREBP. W WAT szczurów z grupy MSR wykazano wyższą ekspresję genu receptora leptyny oraz obu izoform receptora adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w porównaniu do kontroli. Może to oznaczać, że adipocyty szczurów z grupy MSR są bardziej wrażliwe na adiponektynę i leptynę, które mogą wykazywać działanie auto- lub parakryne wywołując wzrost tempa lipolizy, wzrost tempa utleniania kwasów tłuszczowych oraz wzrost wrażliwości adipocytów na insulinę.

6. WNIOSKI

Wielokrotnie powtarzane cykle głodzenia i karmienia wywołują znaczne zmiany w funkcji wydzielniczej i metabolicznej tkanki tłuszczowej szczura:

1. obniżają biosyntezę i wydzielanie leptyny oraz zwiększają biosyntezę i wydzielanie adiponektyny i rezystyny,
2. zwiększają metabolizm węglowodanów i przemiany lipidów (lipogenezę i lipolizę),
3. podnoszą poziom receptorów jądrowych PPAR, LXR i RXR oraz ich koaktywatora PGC1 α , a także czynników transkrypcyjnych SREBP-1, ChREBP i C/EBP α , regulujących funkcję wydzielniczą i metaboliczną tkanki tłuszczowej.

7. PIŚMIENICTWO

1. Amemiya-Kudo M., Shimano H., Yoshikawa T., Yahagi N, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N.: Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 40, 31078-31085.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 3, 403-410.
3. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257, 1, 79-83.
4. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H.: Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997, 46, 8, 1319-1327.
5. 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, 2, 389-393.
6. Banerjee RR, Lazar MA.: Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28, 25970-25973.
7. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA.: Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004, 303, 5661, 1195-1198.
8. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM.: PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 1999, 4, 4, 585-595.
9. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B.: Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 9, 3338-3342.
10. Beck B, Richy S.: Differential long-term dietary regulation of adipokines, ghrelin, or corticosterone: impact on adiposity. *J. Endocrinol.* 2008, 196, 1, 171-179.
11. Bertile F, Raclot T.: Differences in mRNA expression of adipocyte-derived factors in response to fasting, refeeding and leptin. *Biochim. Biophys. Acta* 2004b, 1683, 1-3, 101-109.
12. Beylot M, Pinteur C, Peroni O.: Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats. *Metabolism* 2006, 55, 3, 396-401.
13. Bluher M, Fasshauer M, Kralisch S, Schon MR, Krohn K, Paschke R.: Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, 3, 1127-1132.

14. Boizard M, Le Liepvre X, Lemarchand P, Fougelle F, Ferre P, Dugail I. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 44, 29164-29171.
15. Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA.: Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 2000, 49, 4, 532-538.
16. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W.: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 1996, 137, 1, 354-366.
17. Brun LD, Gagne C, Julien P, Tremblay A, Moorjani S, Bouchard C, Lupien PJ.: Familial lipoprotein lipase-activity deficiency: study of total body fatness and subcutaneous fat tissue distribution. *Metabolism* 1989, 38, 10, 1005-1009.
18. Brun RP, Kim JB, Hu E, Spiegelman BM.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997, 8, 4, 212-218.
19. Camp HS, Ren D, Leff T.: Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* 2002, 8, 9, 442-447.
20. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV.: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996, 348, 9021, 159-161.
21. Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B.: Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPAR α , PPAR γ , and LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 314, 1, 151-158.
22. Choi KC, Lee SY, Yoo HJ, Ryu OH, Lee KW, Kim SM, Baik SH, Choi KM.: Effect of PPAR- δ agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 357, 1, 62-67.
23. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 1, 156-159.
24. Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA.: PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 8, 2244-2256.
25. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR.: Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in haematopoiesis and reproduction. *Nat. Med.* 1996, 2, 5, 585-589.
26. Cinti S.: *The Adipose Organ.* w: Fantuzzi G, Mazzone T. (red.): *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease.* Totowa, Humana Press, 2007, 3-20.
27. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L.: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 12, 1875-1881.
28. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE.: Sexual differentiation,

- pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003, 52, 2, 268-276.
29. Darimont C, Avanti O, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Mansourian R, Giusti V, Mace K.: Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie* 2006, 88, 309-318.
 30. Dentin R, Girard J, Postic C.: Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005, 87, 1, 81-86.
 31. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J.: Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 4, 1004-1009.
 32. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R.: Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am. J. Physiol.* 1998, 274, 5 Pt 2, R1460-R1467.
 33. Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M.: Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 282, 1, E46-E51.
 34. Dobrzyń A, Ntambi JM.: The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2005, 73, 1, 35-41.
 35. Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J.: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 2000, 43, 9, 1165-1169.
 36. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B.: Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001, 142, 10, 4195-4202.
 37. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J.: Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998, 10, 2, 165-173.
 38. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R.: Adiponectin gene expression is inhibited by β -adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2001, 507, 2, 142-146.
 39. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R.: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 290, 3, 1084-1089.
 40. Fernandez CM, Molto E, Gallardo N, del Arco A, Martinez C, Andres A, Ros M, Carrascosa JM, Arribas C.: The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. *Metabolism* 2009, 58, 2, 204-211.
 41. Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA.: In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 240, 3, 590-594.
 42. Fukui Y, Motojima K.: Expression of resistin in the adipose tissue is modulated by various factors including peroxisome proliferator-activated receptor α . *Diabetes Obes. Metab.* 2002, 4, 5, 342-345.

43. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML.: Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 3, 271-278.
44. 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.
45. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H, Lefai E.: Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* 2005, 46, 4, 697-705.
46. Graveleau C, Zaha VG, Mohajer A, Banerjee RR, Dudley-Rucker N, Stepan CM, Rajala MW, Scherer PE, Ahima RS, Lazar MA, Abel ED.: Mouse and human resistins impair glucose transport in primary mouse cardiomyocytes, and oligomerization is required for this biological action. *J. Biol. Chem.* 2005 280, 36, 31679-31685.
47. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS.: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 1998, 78, 3, 783-809.
48. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar M.: A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat. Med.* 2002, 8, 10, 1122-1128.
49. Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U.: Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR γ 2, but not C/EBP α – evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 308, 4, 933-939.
50. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM.: Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 16, 8878-8883.
51. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM.: Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 288, 5, 1102-1107.
52. Haluzik MM, Lacinova Z, Dolinkova M, Haluzikova D, Housa D, Horinek A, Vernerova Z, Kumstyrova T, Haluzik M.: Improvement of insulin sensitivity after peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist treatment is accompanied by paradoxical increase of circulating resistin levels. *Endocrinology* 2006, 147, 9, 4517-4524.
53. Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA.: Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 22, 19754-19756.
54. Hauner H.: Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005, 64, 2, 163-169.
55. 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, 15712-15717.
56. Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB.: Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated

- receptor-gamma on the leptin promoter. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 8, 5283-5290.
57. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H.: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 11, 5987-5992.
 58. Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K, Jenkinson A, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Megy K, Meidl P, Overduin B, Parker A, Pritchard B, Rios D, Schuster M, Slater G, Smedley D, Spooner W, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wilder S, Zadissa A, Birney E, Cunningham F, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Herrero J, Kasprzyk A, Proctor G, Smith J, Searle S, Flicek P.: Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, Database issue, D690-D697.
 59. Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese RA, Diakun J, Hirsch J.: Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J. Clin. Invest.* 1996, 97, 9, 2081-2091.
 60. Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, Sugimoto N, Liang YQ, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y.: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247, 2, 353-356.
 61. Iizuka K, Horikawa Y.: ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocrine J.* 2008, 55, 4, 617-624.
 62. Imai T, Jiang M, Chambon P, Metzger D.: Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 224-228.
 63. Iritani N, Fukuda H, Tada K.: Nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression in rat epididymal adipose tissue. *J. Biochem.* 1996, 120, 2, 242-248.
 64. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM.: Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes. Res.* 2002, 10, 1, 1-5.
 65. Juvet LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KA, Hollung K, Haugen F, Jacinto S, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI.: On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 2003, 17, 2, 172-182.
 66. Kallen CB, Lazar MA.: Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 12, 5793-5796.
 67. Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O, Ogawa Y.: Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: Role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor. *Endocrinol.* 2008, 149, 5, 2293-2305.
 68. Kang JG, Park CY, Ihm SH, Yoo HJ, Park H, Rhee EJ, Won JC, Lee WY, Oh KW, Park SW, Kim SW.: Mechanisms of adipose tissue redistribution with rosiglitazone treatment in various adipose depots. *Metabolism* 2010, w druku.

69. Karbowska J, Kochan Z, Żelewski L, Świerczyński J.: Tissue-specific effect of clofibrate on rat lipogenic enzyme gene expression. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 370, 3, 329-336.
70. Karbowska J, Kochan Z, Świerczyński J.: Increase of lipogenic enzyme mRNA levels in rat white adipose tissue after multiple cycles of starvation-refeeding. *Metabolism* 2001, 50, 6, 734-738.
71. Karbowska J, Brzeziński M, Kochan Z.: Rola adiponektyny – białka wydzielanego przez tkankę tłuszczową w zapobieganiu miażdżycy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2003, 57, 5, 579-591.
72. Karbowska J, Warczak E, Kochan Z.: Polimorfizm genu i zaburzenia funkcjonalne adiponektyny jako jedna z przyczyn rozwoju oporności na insulinę. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2004, 58, 449-457.
73. Karbowska J, Kochan Z.: Effect of DHEA on endocrine functions of adipose tissue, the involvement of PPAR γ . *Biochem. Pharmacol.* 2005, 70, 2, 249-257.
74. Karbowska J, Kochan Z.: Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 57, Suppl 6, 103-113.
75. Kawaji N, Yoshida A, Motoyashiki T, Morita T, Ueki H.: Anti-leptin receptor antibody mimics the stimulation of lipolysis induced by leptin in isolated mouse fat pads. *J. Lipid Res.* 2001, 42, 10, 1671-1677.
76. Kershaw EE, Schupp M, Guan HP, Gardner NP, Lazar MA, Flier JS.: PPAR γ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, 2007, E1736-E1745.
77. 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, 1489-1498.
78. Kim HJ, Jung TW, Kang ES, Kim DJ, Ahn CW, Lee KW, Lee HC, Cha BS.: Depot-specific regulation of perilipin by rosiglitazone in a diabetic animal model. *Metabolism* 2007, 56, 676-685.
79. Kim JB, Spiegelman BM.: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 1996, 10, 9, 1096-1107.
80. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS.: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 14, 11252-11256.
81. Kim YJ, Park T.: Genes are differentially expressed in the epididymal fat of rats rendered obese by a high-fat diet. *Nutr. Res.* 2008, 28, 6, 414-422.
82. Klimcakova E, Kovacikova M, Stich V, Langin D.: Adipokines and dietary interventions in human obesity. *Obes. Rev.* 2010, w druku.
83. Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.: Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ. Res.* 2004, 94, 4, e27-e31.
84. Kochan Z.: Increased lipogenic potential of rat adipose tissue after repeated dieting – the role of SREBP-1 transcription factor. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003, 8, 4, 49-53.
85. Kochan Z, Karbowska J, Świerczyński J.: Unusual increase of lipogenesis in rat white adipose tissue after multiple cycles of starvation-refeeding. *Metabolism* 1997, 46, 1, 10-17.

86. Kochan Z, Karbowska J, Świerczyński J.: Effect of clofibrate on malic enzyme and leptin mRNAs level in rat brown and white adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 1999, 31, 10, 538-542.
87. Kochan Z, Goyke E, Karbowska J, Słomińska E, Świerczyński J.: The decrease of rat postprandial plasma triacylglycerol concentration after multiple cycles of starvation-refeeding. *Horm. Metab. Res.* 2001, 33, 1, 26-29.
88. Kochan Z, Karbowska J.: Rezystyna – nowy hormon wydzielany przez tkankę tłuszczową (rola tkanki tłuszczowej w rozwoju oporności na insulinę). *Przegl. Lek.* 2003, 60, 1, 40-42.
89. Kochan Z, Karbowska J.: Dehydroepiandrosterone up-regulates resistin gene expression in white adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004, 218, 1-2, 57-64.
90. Kochan Z, Karbowska J.: Wydzielnicza funkcja tkanki tłuszczowej. *Postępy Biochem.* 2004, 50, 3, 256-271.
91. Kochan Z, Karbowska J, Meissner W.: Leptin is synthesized in the liver and adipose tissue of the dunlin (*Calidris alpina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006, 148, 3, 336-339.
92. Kochan Z, Karbowska J, Świerczyński J.: The effects of weight cycling on serum leptin levels and lipogenic enzyme activities in adipose tissue. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 57, Suppl 6, 115-127.
93. Kolak M, Yki-Jarvinen H, Kannisto K, Tiikkainen M, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM.: Effects of chronic rosiglitazone therapy on gene expression in human adipose tissue in vivo in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, 92, 2, 720-724.
94. Korczyńska J, Stelmańska E, Świerczyński J.: Differential effect of long-term food restriction on fatty acid synthase and leptin gene expression in rat white adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 2003, 35, 10, 593-597.
95. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T.: PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 1999, 4, 4, 597-609.
96. Lee MJ, Wang Y, Ricci MR, Sullivan S, Russell CD, Fried SK.: Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 292, 3, E858-E864.
97. Lefterova MI, Lazar MA.: New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009, 20, 3, 107-114.
98. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA.: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 22, 12953-12956.
99. Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefrere I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferre P, Dugail I.: Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 20, 16904-16910.

100. Le Lay S, Lefrere I, Trautwein C, Dugail I, Krief S.: Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein as an SREBP-1c target. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 38, 35625-35634.
101. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C.: Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 5, 2365-2368.
102. Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M.: Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J. Lipid Res.* 2003, 44, 11, 2127-2134.
103. Li Y, Bolten C, Bhat BG, Woodring-Dietz J, Li S, Prayaga SK, Xia C, Lala DS.: Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 3, 506-514.
104. Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS.: Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 11, 9520-9528.
105. Lihn AS, Ostergard T, Nyholm B, Pedersen SB, Richelsen B, Schmitz O.: Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003, 284, 2, E443-E448.
106. Lim CT, Kola B, Korbonits M.: AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 2010, w druku.
107. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI.: Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998, 394, 6696, 897-901.
108. Lostao MP, Urdaneta E, Martinez-Anso E, Barber A, Martinez JA.: Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett.* 1998, 423, 3, 302-306.
109. Loviscach M, Rehman N, Carter L, Mudaliar S, Mohadeen P, Ciaraldi TP, Veerkamp JH, Henry RR.: Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* 2000, 43, 3, 304-311.
110. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K.: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 221, 2, 286-289.
111. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y.: PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001, 50, 9, 2094-2099.
112. Mandrup S, Loftus TM, MacDougald OA, Kuhajda FP, Lane MD.: Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 9, 4300-4305.
113. Marin P, Hogh-Kristiansen I, Jansson S, Krotkiewski M, Holm G, Bjorntorp P.: Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am. J. Physiol.* 1992, 263, 3 Pt 1, E473-E480.

114. Mazzucotelli A, Viguerie N, Tiraby C, Annicotte JS, Mairal A, Klimcakova E, Lepin E, Delmar P, Dejean S, Tavernier G, Lefort C, Hidalgo J, Pineau T, Fajas L, Clement K, Langin D.: The transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 α and the nuclear receptor PPAR α control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR γ activation in human white adipocytes. *Diabetes* 2007, 56, 10, 2467-2475.
115. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD.: Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 1, 131-136.
116. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S.: Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002, 359, 9300, 46-47.
117. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S.: Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87, 5, 2407-2410.
118. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, Terauchi Y, Kamon J, Kaburagi Y, Matsui J, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kadowaki T.: Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 7, 2521-2532.
119. Minehira K, Bettschart V, Vidal H, Vega N, Di Vetta V, Rey V, Schneiter P, Tappy L.: Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans. *Obes. Res.* 2003, 11, 9, 1096-1103.
120. Mizuno TM, Bergen H, Funabashi T, Kleopoulos SP, Zhong YG, Bauman WA, Mobbs CV.: Obese gene expression: reduction by fasting and stimulation by insulin and glucose in lean mice, and persistent elevation in acquired (diet-induced) and genetic (yellow agouti) obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 8, 3434-3438.
121. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW.: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 12, 4196-4200.
122. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C.: Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998, 12, 20, 3168-3181.
123. Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA, Clapham JC.: Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 286, 4, 735-741.
124. Morash BA, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M.: Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS Lett.* 2002, 526, 1-3, 26-30.
125. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ.: Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 1998, 139, 2, 551-558.
126. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW.: Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001, 413, 6858, 794-795.

127. Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C.: Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett.* 2003, 548, 1-3, 21-27.
128. Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M.: Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism* 2005, 54, 8, 995-1001.
129. Oberkofler H, Fukushima N, Esterbauer H, Krempler F, Patsch W.: Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1575, 1-3, 75-81.
130. Ort T, Arjona AA, MacDougall JR, Nelson PJ, Rothenberg ME, Wu F, Eisen A, Halvorsen YD.: Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *Endocrinology* 2005, 146, 5, 2200-2209.
131. Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N.: Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 2, 787-792.
132. Pai JT, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL.: Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 40, 26138-26148.
133. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L.: Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004, 304, 5674, 1154-1158.
134. Peake PW, Hughes JT, Shen Y, Charlesworth JA.: Glycosylation of human adiponectin affects its conformation and stability. *J. Mol. Endocrinol.* 2007, 39, 1, 45-52.
135. Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, Kang X, Kim Y, White N, Dean NM.: Identification of novel PPAR γ target genes in primary human adipocytes. *Gene* 2006, 369, 90-99.
136. 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, 10, 1345-1350.
137. Pratley RE, Ren K, Milner MR, Sell SM.: Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans. *Mol. Genet. Metab.* 2000, 70, 1, 19-26.
138. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM.: Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 1999, 286, 5443, 1368-1371.
139. Raclot T, Oudart H.: Net release of individual fatty acids from white adipose tissue during lipolysis in vitro: evidence for selective fatty acid re-uptake. *Biochem. J.* 2000, 348, Pt 1, 129-136.
140. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L.: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 2, 225-230.

141. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS.: Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004, 53, 7, 1671-1679.
142. Rangwala SM, Lazar MA.: Transcriptional control of adipogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 20, 535-559.
143. Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA.: Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 2004, 53, 8, 1937-1941.
144. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ.: Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev.* 2000, 14, 22, 2819-2830.
145. Ribot J, Rodriguez AM, Rodriguez E, Palou A.: Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity* 2008, 16, 4, 723-730.
146. Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E, Wahli W.: A new selective peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 11, 2628-2644.
147. Rodbell M.: Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1964, 239, 375-380.
148. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P.: Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 2005, 434, 7029, 113-118.
149. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM.: Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000, 14, 11, 1293-1307.
150. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM.: C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 2002, 16, 1, 22-26.
151. Russell CD, Petersen RN, Rao SP, Ricci MR, Prasad A, Zhang Y, Brolin RE, Fried SK.: Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *Am. J. Physiol.* 1998, 275, 3, E507-E515.
152. Sahu A.: Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology* 1998, 139, 11, 4739-4742.
153. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J.: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995, 377, 6549, 527-529.
154. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S.: Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes* 2001, 50, 10, 2199-2202.
155. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J.: The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1302, 2, 93-109.

156. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG.: Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000, 404, 6778, 661-671.
157. Seo JB, Noh MJ, Yoo EJ, Park SY, Park J, Lee IK, Park SD, Kim JB.: Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein- α . *Mol. Endocrinol.* 2003, 17, 8, 1522-1533.
158. Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JA, Park SD, Kim JB.: Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24, 8, 3430-3444.
159. Seo JB, Moon HM, Noh MJ, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Kim WS, Park J, Youn BS, Kim JW, Park SD, Kim JB.: Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 21, 22108-22117.
160. Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF.: Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 2, 674-679.
161. Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD.: Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 8, 2115-2124.
162. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N.: Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 50, 35832-35839.
163. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS.: Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 5, 838-845.
164. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL.: Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999, 401, 6748, 73-76.
165. Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T.: Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 2002, 51, 6, 1737-1744.
166. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR.: Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998, 281, 5383, 1683-1686.
167. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW.: Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 10, 5301-5304.

168. Soni KG, Lehner R, Metalnikov P, O'Donnell P, Semache M, Gao W, Ashman K, Pshezhetsky AV, Mitchell GA.: Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 39, 40683-40689.
169. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E.: The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab. Anim.* 2008, 42, 4, 413-432.
170. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A.: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 1998, 393, 6687, 790-793.
171. Stelmańska E, Korczyńska J, Świerczyński J.: Tissue-specific effect of refeeding after short- and long-term caloric restriction on malic enzyme gene expression in rat tissues. *Acta Biochim. Pol.* 2004, 51, 3, 805-814.
172. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, MacKellar W, Rosteck PR Jr, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang XY, Heiman M.: The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995, 377, 6549, 530-532.
173. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001, 409, 6818, 307-312.
174. Stoeckman AK, Towle HC.: The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 30, 27029-27035.
175. Stroubini T, Perelas A, Liapi C, Perrea D, Dontas I, Tzavara Ch, Galanopoulou P.: Serum adiponectin and resistin in rats under three isocaloric diets: The effect of sibutramine. *Cytokine* 2009, 46, 2, 171-175.
176. Stulnig TM, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K, Schuster GU, Gustafsson JA.: Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol. Pharmacol.* 2002, 62, 6, 1299-1305.
177. Świerczyński J, Goyke E, Wach L, Pankiewicz A, Kochan Z, Adamonis W, Śledziński Z, Aleksandrowicz Z.: Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. *Metabolism* 2000, 49, 5, 594-599.
178. 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-alpha. *Mol. Endocrinol.* 2000, 14, 5, 741-752.
179. 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, 12, 10691-10697.
180. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994, 79, 7, 1147-1156.
181. Tontonoz P, Spiegelman BM.: Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* 2008, 77, 1, 289-312.
182. Towle HC, Kaytor EN, Shih HM.: Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* 1997, 17, 405-433.
183. Trzeciak W.: Jądrowe receptory sieroce. W: Nowak JZ, Zawilska JB. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wyd. 3, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004, 588-603.

184. Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF.: Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 50, 50810-50817.
185. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T.: Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 29, 30817-30822.
186. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T.: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR α , PPAR γ , and their combination. *Diabetes* 2005, 54, 12, 3358-3370.
187. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T.: Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 63, 12, 2075-2080.
188. Varady KA, Hudak CS, Hellerstein MK.: Modified alternate-day fasting and cardioprotection: relation to adipose tissue dynamics and dietary fat intake. *Metabolism* 2009, 58, 6, 803-811.
189. Varady KA, Allister CA, Roohk DJ, Hellerstein MK.: Improvements in body fat distribution and circulating adiponectin by alternate-day fasting versus calorie restriction. *J. Nutr. Biochem.* 2010, w druku.
190. Villena JA, Kim KH, Sul HS.: Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm. Metab. Res.* 2002, 34, 11-12, 664-670.
191. 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, 45, 47066-47075.
192. Vohl MC, Houde A, Lebel S, Hould FS, Marceau P.: Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 Gly482Ser variant on features of the metabolic syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 2005, 86, 1-2, 300-306.
193. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T.: Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 41, 40352-40363.
194. Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H.: Leptin receptor action in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 2, 16216-16223.
195. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L.: A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998, 393, 6686, 684-688.
196. Wang S, Soni KG, Semache M, Casavant S, Fortier M, Pan L, Mitchell GA.: Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 2008, 95, 1, 117-126.

197. Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF, Pan L, Oligny L, Mitchell GA.: The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.* 2001, 9, 2 119-128.
198. Wang Z, Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bartke A.: Adipocytokines and lipid levels in Ames dwarf and calorie-restricted mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2006, 61, 4, 323-331.
199. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA.: Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor γ activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001, 142, 3, 1269-1277.
200. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS.: Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28, 25651-25653.
201. Weinstock PH, Levak-Frank S, Hudgins LC, Radner H, Friedman JM, Zechner R, Breslow JL. (1997) Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 19, 10261-10266.
202. Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, Wilson JG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA.: Liver X receptor (LXR) regulation of the LXR α gene in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 47, 43509-43515.
203. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM.: Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* 1999, 270, 1, 41-49.
204. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002, 8, 11, 1288-1295.
205. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T.: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003, 423, 6941, 762-769.
206. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM.: The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002, 51, 10, 2968-2974.
207. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M, Fujii S.: Resistin is expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, 88, 3, 1394-1397.

-
208. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372, 6505, 425-432.
 209. Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL.: Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002, 282, 1, R226-R234.
 210. Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, Tumer N, Scarpace PJ.: Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1584, 2-3, 115-122.
 211. Zhu M, Lee GD, Ding L, Hu J, Qiu G, de Cabo R, Bernier M, Ingram DK, Zou S.: Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp. Gerontol.* 2007, 42, 8, 733-744.
 212. Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R.: Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1791, 3, 494-500.

8. STRESZCZENIE

Tkanka tłuszczowa jest nie tylko miejscem gromadzenia i przechowywania zasobów energetycznych w postaci triacylogliceroli, ale również narządem wydzielniczym, syntetyzującym i uwalniającym do krwi wiele aktywnych biologicznie białek i peptydów, określanymi wspólnym mianem „adipokiny”. Leptyna, jeden z najlepiej poznanych hormonów wydzielanych przez adipocyty, reguluje równowagę energetyczną organizmu; adiponektyna, syntetyzowana w dużych ilościach przez komórki tkanki tłuszczowej, ma wpływ na metabolizm glukozy i lipidów w różnych tkankach; z kolei rezystyna może brać udział w regulacji wrażliwości komórek na insulinę.

W dotychczasowych badaniach, przeprowadzonych na opracowanym przez nas zwierzęcym modelu doświadczalnym cyklicznego, naprzemiennego głodzenia i karmienia dochodziło do wielokrotnego wzrostu aktywności i ilości mRNA enzymów lipogennych w tkance tłuszczowej badanych szczurów oraz do wzrostu szybkości syntezy lipidów, który był specyficzny dla tej tkanki, ponieważ w wątrobie nie zaobserwowaliśmy tak dużych zmian. Ponieważ mechanizmy regulacji wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej w trakcie głodzenia i następującego po nim karmienia nie zostały wyjaśnione, w ramach niniejszej rozprawy postanowiono zbadać w tym samym modelu doświadczalnym jakie zmiany zachodzą w tkance tłuszczowej przy cyklicznej podaży pokarmu i czy zmiany te są inne niż przy ograniczonej podaży pokarmu (dieta redukcyjna). Badaniom poddano następujące grupy szczurów: S (głodzone przez 72 godz.), SR (głodzone przez 72 godz. a następnie karmione przez 72 godz.), MSR (szczury poddane ośmiu cyklom naprzemiennego głodzenia i karmienia), PF (szczury otrzymujące codziennie, przez 48 dni, porcję paszy odpowiadającą średniej masie paszy spożytej przez szczury z grupy MSR) oraz C (grupa kontrolna). Liczba ośmiu cykli głodzenia i karmienia została wybrana, ponieważ zaobserwowaliśmy wcześniej, że po ośmiu takich cyklach aktywności enzymów lipogennych w WAT szczurów były najwyższe i po kolejnych cyklach aktywności te już nie rosły. Regulacja wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej odbywa się głównie na etapie transkrypcji genów, w związku z tym skupiono się na badaniach regulacji ekspresji genów w tkance tłuszczowej badanych szczurów.

Do analiz pobierano tkankę tłuszczową z okolic najądrzy (WAT) i krew, z której otrzymano surowicę. W surowicy krwi szczurów zmierzono stężenie adipokin (leptyny, adiponektyny i rezystyny) oraz stężenie insuliny, triacylogliceroli i glukozy. Pobrane preparaty tkanki tłuszczowej wykorzystano do badania ekspresji genów metodą real-time RT-PCR i Western-blot, do oznaczania aktywności enzymów i do izolacji adipocytów. Dodatkowo w wyizolowanych dojrzałych adipocytach przeprowadzono pomiary średnicy komórek, ekspresji genów kodujących wymienione wcześniej adipokiny, ilości adipokin wydzielonych do środowiska inkubacyjnego oraz szybkości lipolizy mierzonej ilością uwalnianego glicerolu. W ramach niniejszej rozprawy zbadano wpływ wielokrotnego głodzenia i karmienia na ekspresję genów kodujących leptynę, adiponektynę i rezystynę w tkance tłuszczowej, zbadano także zmiany ekspresji genów kodujących główne receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne oraz enzymy i inne białka związane z przemianami węglowodanów i lipidów w tej tkance. Łącznie zbadano zmiany ekspresji 36 genów.

Wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało spadek masy ciała szczurów, obniżenie masy tkanki tłuszczowej z okolic najądrzy i spadek wielkości adipocytów. Towarzy-

szył temu spadek stężenia leptyny oraz wzrost stężenia adiponektyny i rezystyny w surowicy krwi badanych szczurów. Podobnym zmianom jak stężenie adipokin w surowicy uległa również ekspresja genów kodujących te adipokiny w tkance tłuszczowej oraz szybkość wydzielania tych białek przez izolowane adipocyty. Opisane zmiany były charakterystyczne dla modelu wielokrotnego głodzenia i karmienia (grupa szczurów MSR) i różniły się od tych zaobserwowanych u zwierząt kontrolnych (C), poddanych jednokrotnemu głodzeniu i karmieniu (SR), czy diecie redukcyjnej (PF).

Otrzymane wyniki sugerują, że przyczyną spadku stężenia leptyny w surowicy krwi szczurów i ilości mRNA leptyny w WAT oraz spadku tempa wydzielania leptyny przez izolowane adipocyty był spadek wielkości adipocytów i obniżenie masy WAT, ponieważ zmiany ekspresji genu *Lep* oraz stężenia leptyny w surowicy były dodatnio skorelowane z masą WAT i wielkością adipocytów. Z kolei wzrost stężenia adiponektyny w surowicy krwi szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych był związany ze wzrostem biosyntezy tej adipokiny w tkance tłuszczowej oraz ze zwiększoną szybkością jej wydzielania przez adipocyty. Indukcja ekspresji genu kodującego adiponektynę w WAT szczurów z grupy MSR były wynikiem wzrostu ilości i aktywności transkrypcyjnej receptorów jądrowych, a w szczególności receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR γ), w tkance tłuszczowej badanych zwierząt. Wzrost stężenia rezystyny w surowicy krwi szczurów z grupy MSR, wzrost ilości mRNA rezystyny w ich tkance tłuszczowej oraz wzrost tempa wydzielania tego białka przez izolowane dojrzałe adipocyty były najprawdopodobniej skutkiem zwiększonej w wyniku wielokrotnego głodzenia i karmienia aktywności białek uczestniczących w szlaku sygnałowym insuliny w WAT, wśród których najważniejszą rolę odgrywają czynnik transkrypcyjny wiążący się z elementem odpowiedzi na sterole (SREBP-1) i czynnik transkrypcyjny wiążący się z elementem odpowiedzi na węglowodany (ChREBP).

W WAT szczurów z grupy MSR wykazano wyższą ekspresję genu receptora leptyny oraz obu izoform receptora adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w porównaniu do kontroli i szczurów z grup SR i PF. Oznacza to, że adipocyty szczurów z grupy MSR były bardziej wrażliwe na adiponektynę i leptynę, które mogły wykazywać działanie auto- lub parakryne wywołując wzrost szybkości lipolizy i utleniania kwasów tłuszczowych oraz wzrost wrażliwości adipocytów na insulinę. Pomiarów zmian ekspresji genu receptora rezystyny nie wykonano, ponieważ nie został on jeszcze poznany.

W WAT szczurów poddanych wielokrotnie powtarzanym cykлом głodzenia i karmienia zaobserwowano indukcję genu kodującego transporter glukozy GLUT4, wzrost ekspresji genu kodującego heksokinazę 2 oraz spadek ilości mRNA PDK4 (kinazy dehydrogenazy pirogronianowej). Skutkiem opisanych zmian ekspresji genów mogło być nasilenie przemian od glukozy do acetylo-CoA, substratu do syntezy kwasów tłuszczowych. Ponadto wielokrotne głodzenie i karmienie wywołało w WAT badanych szczurów wzrost ekspresji genów kodujących enzymy i białka związane z lipogenezą, wzrost ekspresji genów związanych z lipolizą oraz wzrost szybkości lipolizy mierzonej ilością glicerolu uwalnianego przez izolowane adipocyty. W tkance tłuszczowej szczurów z grupy MSR odnotowano również wyższą od kontroli ekspresję genów kodujących enzymy syntezy glicerolo-3-fosforanu, substratu do syntezy triacylogliceroli. Otrzymane wyniki wskazują, że w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu zachodziła wzmożona synteza glicerolo-3-fosforanu, zarówno z glukozy, jak i z wolnego glicerolu – produktu lipolizy. Zwiększonej ekspresji genów związanych z tymi trzema procesami tzn. lipogenezą, lipolizą i przemianami glicerolu nie zaobserwowano w WAT szczurów z grup S, SR i PF. Wskazuje to, że cykliczna podaż pokarmu wywołała

w tkance tłuszczowej badanych szczurów swoistą odpowiedź metaboliczną – jednoczesną syntezę i hydrolizę triacylogliceroli. Ponadto w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu wzrosła ekspresja genu kodującego palmitoilotransferazę karnitynową 1 (LCPT1), co mogło doprowadzić do zwiększonego utleniania kwasów tłuszczowych w WAT szczurów z grupy MSR.

W wyniku wielokrotnego głodzenia i karmienia w tkance tłuszczowej badanych szczurów doszło do znacznych zmian ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne i receptory jądrowe, kluczowe w regulacji metabolizmu tej tkanki. W WAT szczurów z grupy MSR zaobserwowano, niewystępujący w innych grupach, wzrost ekspresji genów kodujących receptory jądrowe PPAR (α , γ i δ), LXR α , RXR α i ich koaktywator PGC1 α . Wzrost syntezy dominującego w tkance tłuszczowej receptora PPAR γ w WAT szczurów z grupy MSR potwierdzono również metodą Western-blot. Charakterystyczny dla grupy MSR wzrost ekspresji genów kodujących wymienione wyżej receptory jądrowe w WAT był skorelowany ze zmianami ekspresji genów kodujących adiponektynę, obie izoformy jej receptora oraz ze zmianami ekspresji genu kodującego receptor leptyny. Sugeruje to udział tych receptorów jądrowych w wywołanej wielokrotnym głodzeniem i karmieniem zwiększonej transkrypcji genów adiponektyny i jej receptorów oraz receptora leptyny w tkance tłuszczowej. Ponadto u szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu wykazano wzrost ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne SREBP-1, ChREBP i C/EBP α w tkance tłuszczowej. Wzrost syntezy aktywnej (jądrowej) formy czynnika SREBP-1 u szczurów z grupy MSR potwierdzono metodą Western-blot. Czynniki transkrypcyjne SREBP-1 i ChREBP mogą indukować ekspresję genów pod wpływem wzrastającego stężenia insuliny i/lub węglowodanów. W modelu doświadczalnym wielokrotnego głodzenia i karmienia zwiększona biosynteza i aktywacja czynnika SREBP-1 oraz wzrost ilości ChREBP mogły doprowadzić do indukcji genu kodującego rezystynę i genów związanych z lipogenezą.

U szczurów poddanych wielokrotnie powtarzanym cykлом głodzenia i karmienia doszło do dużych zmian biosyntezy i wydzielania badanych adipokin przez tkankę tłuszczową oraz do znacznego wzrostu aktywności metabolicznej tej tkanki, w tym do uaktywnienia prowadzącego do spadku masy tkanki tłuszczowej swoistego „cyklu daremnego” jednoczesnej biosyntezy i hydrolizy triacylogliceroli. Nietypowy wzrost aktywności metabolicznej tkanki tłuszczowej mógł doprowadzić do pojawienia się w tej tkance wysokiego stężenia naturalnych lipidowych ligandów receptorów PPAR. Zatem w WAT szczurów poddanych wielokrotnemu głodzeniu i karmieniu może dochodzić nie tylko do zmian ekspresji genów kodujących receptory PPAR, lecz również do aktywacji tych receptorów pod wpływem ich naturalnych aktywatorów.

W tkance tłuszczowej szczurów wielokrotnie głodzonych i karmionych dochodzi zatem do charakterystycznych, nie występujących w innych badanych grupach zwierząt, zmian ekspresji wielu genów związanych z wydzielniczą i metaboliczną funkcją tej tkanki. Z tego powodu opisany tu model doświadczalny może być szczególnie przydatny w badaniach nad swoistymi dla tkanki tłuszczowej molekularnymi mechanizmami regulacyjnymi, uruchamianymi pod wpływem czynników dietetycznych.

9. SUMMARY

Adipose tissue was once considered an inert depot for the storage of lipids used as a source of energy during food deprivation or long-term muscle work, when they are mobilised and released as free fatty acids for oxidation in other organs. Nowadays, it is widely acknowledged that adipose tissue, in addition to its well known function to store and mobilize triacylglycerols, is a secretory organ which synthesises and secretes many peptides, known as „adipokines”. Adipose tissue is considered to be the major source of circulating leptin, a cytokine-like hormone involved in appetite control and metabolic responses to nutrients. Another adipokine, adiponectin, has been proposed to play an important role in the regulation of glucose and lipid metabolism; and resistin was postulated to be a link between obesity and insulin resistance implicated in the modulation of insulin sensitivity.

Mechanisms underlying nutritional control of secretory and metabolic function of adipose tissue are not fully clarified; thus recognizing the dual functions of adipose tissue as an endocrine organ and fuel storage depot, the aim of the study was to determine whether multiple cycles of starvation-refeeding would affect adipokine biosynthesis together with carbohydrate and lipid metabolism in rat adipose tissue. To elucidate this, male Wistar rats were assigned to five experimental groups: C, S, SR, MSR and PF. Rats from the S group were deprived of food for 3 days. SR rats were subjected to 3-day food deprivation and subsequently re-fed for 3 days. Rats from MSR group were subjected to eight food deprivation and refeeding cycles, each cycle consisting of 3 days of food deprivation followed by 3 days of refeeding. Rats from PF group were pair-fed to the MSR rats – PF rats were given everyday, for 48 days, weighed amount of food which was equal to the average amount of food consumed by the MSR rats for the period of the previous 6-day cycle of food deprivation and refeeding. In the control group (C), rats were given ad libitum access to food. At the end of the experiment epididymal white adipose tissue (WAT) and blood were taken for analysis.

Leptin, adiponectin and resistin concentrations were measured in rat sera, along with serum insulin, triacylglycerol and glucose levels. WAT specimens were used for gene expression studies measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot methods, for enzyme assays and for preparation of mature adipocytes. The expression levels of adipokines (leptin, adiponectin and resistin), nuclear receptors (peroxisome proliferator activated receptor – PPAR, liver X receptor – LXR and retinoid X receptor – RXR) and their coactivator PGC1 α , transcription factors (sterol response element binding protein – SREBP-1, carbohydrate response element binding protein – ChREBP and CCAAT enhancer binding protein – C/EBP α), and genes encoding enzymes and other proteins involved in carbohydrate and lipid metabolism in adipose tissue were analyzed in epididymal WAT of rats. Overall, the expression levels of 36 genes have been determined by real-time RT-PCR in WAT of rats subjected to multiple cycles of starvation-refeeding.

Multiple cycles of starvation-refeeding resulted in a reduction in body weight of MSR rats compared with control rats, a decrease in epididymal WAT mass and adipocyte diameter; accompanied by a decrease in serum leptin levels and increase in serum adiponectin and resistin levels. Similar changes were observed in leptin, adiponectin and resistin mRNA expression in WAT, where multiple cycles of starvation-refeeding down-regulated *Lep* gene and induced adiponectin and resistin gene expression. Moreover,

adipokine secretion from isolated adipocytes was correlated with their mRNA expression levels.

Lowered serum leptin levels in MSR rats, downregulation of leptin mRNA expression in their WAT and decreased leptin secretion from their adipocytes in culture result probably from the reduced size of epididymal adipose tissue. Moreover, visceral adipocytes are much smaller in MSR rats than in control rats. Synthesis and secretion of leptin from adipose cells is regulated by the amount of energy stored in adipose tissue. Serum leptin levels are regulated by adiposity and are reduced by weight reduction. In contrast, serum adiponectin and resistin levels in the MSR group were significantly elevated in comparison to control rats. The increase in serum adiponectin levels observed after multiple cycles of starvation-refeeding is a consequence of augmented adiponectin mRNA expression in WAT of MSR rats and increased adiponectin secretion by their adipocytes. The induction of gene encoding adiponectin most likely was caused by increased expression and transcriptional activity of nuclear receptors, mainly PPAR γ , which expression in WAT was upregulated by multiple cycles of starvation-refeeding. Elevated serum resistin in MSR rats was accompanied by an increase in resistin gene expression in their WAT and increased resistin secretion by adipocytes isolated from WAT of MSR rats. The induction of the *Retn* gene in WAT of MSR rats was most probably the result of increased activity of proteins involved in insulin signalling pathway, such as SREBP-1 and ChREBP transcription factors, which mRNA levels were elevated in adipose tissue of rats subjected to multiple cycles of starvation-refeeding.

Leptin receptor and both isoforms of adiponectin receptor (AdipoR1 and AdipoR2) were also upregulated by multiple cycles of starvation-refeeding. It suggests that adipocytes in WAT of MSR rats were more sensitive to adiponectin and leptin than adipocytes of other rats. Both adiponectin and leptin may act in an auto- or paracrine manner stimulating adipose tissue lipolysis, increasing fatty acid β -oxidation in WAT and insulin sensitivity of this tissue. Since resistin receptor has not been identified so far, it has not been studied in MSR rats.

Multiple cycles of starvation-refeeding affect glucose homeostasis in adipose tissue. In WAT of MSR rats mRNA levels of the glucose transporter type 4 (GLUT4) and hexokinase 2 were elevated, indicating increased insulin-stimulated glucose uptake and phosphorylation in adipocytes of MSR rats. Moreover, gene encoding PDK4 was downregulated in WAT of these rats, suggesting that pyruvate emerging from glycolysis is more efficiently metabolized to acetyl-CoA in adipose tissue of MSR rats as compared to rats from other groups.

Lipid metabolism in adipose tissue was strongly affected by multiple cycles of starvation-refeeding. The expression levels of genes encoding enzymes and other proteins involved in lipogenesis were robustly increased in WAT of MSR rats. Interestingly, the genes encoding enzymes and other proteins involved in lipolysis were also induced in adipose tissue of these rats and lipolysis was increased in adipocytes isolated from their WAT. Furthermore, in adipose tissue of MSR rats the mRNA expression of enzymes involved in glycerol-3-phosphate synthesis was elevated. It seems that multiple cycles of starvation-refeeding induced in adipose tissue the process of reutilization of glycerol emerging from lipolysis, thus resulting in a „futile cycle” of lipogenesis and lipolysis leading to a decrease in adipose tissue mass observed in MSR rats. Moreover, in WAT of rats subjected to multiple cycles of starvation-refeeding the expression levels of carnitine palmitoyltransferase 1 (LCPT1) were elevated. LCPT1 is involved in fatty acid oxidation in mitochondria, thus its upregulation seen in adipose tissue of MSR rats may

have led to an increased β -oxidation of fatty acids in this tissue and a decrease in WAT mass.

In adipose tissue of rats subjected to multiple cycles of starvation-refeeding a considerable increase in expression of genes encoding nuclear receptors PPAR, LXR, RXR and their coactivator PGC1 α has been observed. Moreover, upregulation of these genes correlated well with the expression levels of adiponectin, both isoforms of adiponectin receptor and leptin receptor in WAT of MSR rats. Since it has not been observed in other groups of rats, it suggests the role of these nuclear receptors in the multiple cycles of starvation and refeeding-dependent induction of genes encoding adiponectin, AdipoR1, AdipoR2 and leptin receptor. Furthermore, the expression levels of SREBP-1, ChREBP, and C/EBP α were increased in adipose tissue of MSR rats. Elevated levels of active nuclear form of SREBP-1 were confirmed in WAT of MSR rats by Western-blot. Both SREBP-1 and ChREBP regulate gene expression in metabolic tissues in response to insulin and carbohydrates. It seems probable that genes encoding resistin and lipogenic enzymes were induced in WAT of MSR rats as a result of increased expression levels and activity of SREBP-1 and ChREBP.

Changes in expression levels of several genes involved in endocrine and metabolic functions of adipose tissue observed in WAT of rats subjected to multiple starvation-refeeding cycles were specific to this dietary regimen and did not occur in other groups of rats. For that reason the experimental model described here may be of particular interest in studies of long-term nutritional regulation of both adipokine biosynthesis and carbohydrate and lipid homeostasis in adipose tissue.