

**Praca doktorska zrealizowana w Katedrze Fizjologii i Biochemii
Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz na Wydziale
Gastroenterologii i Hepatologii na Uniwersytecie Medycznym Charité
w Berlinie**

**Udział oreksyny A w regulacji metabolizmu
adipocytów oraz ekspresji i sekrecji adiponektyny**

Marek Skrzypski

**Promotor: prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak
Ko-promotor: prof. dr hab. Mathias Z. Strowski**

Poznań 2013

Badania zostały częściowo sfinansowane w ramach grantu nr STR558 przyznanego przez DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft).

Rezultaty badań otrzymane w wyniku realizacji rozprawy doktorskiej oraz zawarty we wstępie aktualny stan wiedzy na temat oreksyn opublikowano w:

Skrzypski M., Kaczmarek P., Le T.T., Wojciechowicz T., Pruszyńska-Oszmałek E., Szczepankiewicz D., Sassek M., Arafat A., Wiedenmann B., Nowak K.W., Strowski M.Z., 2012, Effects of Orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Febs Letters* 23: 4157-4164.

Skrzypski M., Le T.T., Kaczmarek P., Pruszyńska-Oszmałek E., Pietrzak P., Szczepankiewicz D., Kołodziejcki P.A., Sassek M., Arafatm A., Wiedenmann B., Nowak K.W., Strowski M.Z., 2011, Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia* 54: 1841-1852.

Skrzypski M., Strowski M.Z., Nowak K.W., 2010, Oreksyny w regulacji homeostazy energetycznej. *Kosmos* 59: 305-313.

Panu Profesorowi dr hab. Krzysztofowi W. Nowakowi oraz Panu Profesorowi dr hab. Mathiasowi Z. Strowskiemu dziękuję za pomoc podczas realizacji pracy dokorskiej oraz motywacje i inspiracje do prowadzenia badań.

Pracownikom Katedry Fizjologii i Biochemii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu dziękuję za pomoc podczas realizacji części eksperymentalnej.

Spis treści

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Wykaz skrótów..... | 6 |
| 2 | Wstęp..... | 8 |
| 2.1 | Wprowadzenie..... | 8 |
| 2.2 | Charakterystyka i funkcje tkanki tłuszczowej..... | 9 |
| 2.3 | Rola tkanki tłuszczowej w patogenezie otyłości oraz cukrzycy typu 2..... | 12 |
| 2.4 | Modele eksperymentalne wykorzystywane w badaniach nad adipocytami | 16 |
| 2.5 | Charakterystyka oreksyn i ich receptorów..... | 17 |
| 2.6 | Receptory oreksyn | 19 |
| 2.7 | Rola oreksyn w regulacji behawioru pokarmowego | 21 |
| 2.8 | System oreksynowy w regulacji snu - powiązania z homeostazą energetyczną..... | 22 |
| 2.9 | Rola oreksyn w regulacji insulino-wrażliwości..... | 24 |
| 2.10 | Wpływ oreksyn na homeostazę glukozy..... | 25 |
| 2.11 | Oreksyny w regulacji funkcji tkanek obwodowych..... | 26 |
| 3 | Hipoteza badawcza i cele pracy | 28 |
| 4 | Materiały i metody..... | 29 |
| 4.1 | Bufory | 29 |
| 4.2 | Zwierzęta..... | 29 |
| 4.3 | Kultury komórkowe..... | 30 |
| 4.4 | Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 | 30 |
| 4.5 | Izolacja adipocytów | 30 |
| 4.6 | Stymulacja oreksyną A oraz innymi badanymi czynnikami | 31 |
| 4.7 | Transport glukozy | 31 |
| 4.7.1 | <i>Adipocyty 3T3-L1</i> | <i>31</i> |
| 4.7.2 | <i>Izolowane adipocyty.....</i> | <i>32</i> |
| 4.8 | Pomiar ATP..... | 32 |
| 4.9 | Lipogeneza (synteza kwasów tłuszczowych) | 33 |
| 4.10 | Wpływ oreksyny A na akumulację triacylogliceroli | 33 |
| 4.10.1 | <i>Barwienie roztworem czerwieni olejowej</i> | <i>33</i> |
| 4.10.2 | <i>Oznaczenie zawartości triacylogliceroli</i> | <i>34</i> |
| 4.11 | Oznaczenie lipolizy..... | 35 |
| 4.12 | Oznaczenie PIP3 | 36 |
| 4.13 | Pomiar cAMP | 37 |
| 4.14 | Analiza western blot..... | 37 |
| 4.14.1 | <i>Izolacja białka całkowitego oraz frakcji błonowej</i> | <i>37</i> |
| 4.14.2 | <i>Pomiar koncentracji białka.....</i> | <i>38</i> |
| 4.14.3 | <i>Rozdział elektroforetyczny oraz transfer na membranę.....</i> | <i>39</i> |
| 4.15 | Immunofluorescencja białka GLUT4 | 41 |
| 4.16 | Analiza ekspresji genów | 41 |
| 4.16.1 | <i>Izolacja RNA</i> | <i>41</i> |
| 4.16.2 | <i>Reakcja odwrotnej transkrypcji.....</i> | <i>42</i> |
| 4.16.3 | <i>Startery reakcji PCR.....</i> | <i>43</i> |
| 4.16.4 | <i>Analiza ekspresji w oparciu o SYBR green</i> | <i>44</i> |
| 4.16.5 | <i>Analiza ekspresji OXR1 i OXR2 z zastosowaniem sond.....</i> | <i>45</i> |
| 4.17 | Wyciszenie ekspresji PPAR γ przez siRNA..... | 46 |
| 4.18 | Sekrecja adiponektyny | 47 |
| 4.19 | Eksperyment <i>in vivo</i> z wykorzystaniem pomp osmotycznych | 47 |
| 4.20 | Analiza statystyczna | 48 |
| 5 | Wyniki..... | 49 |
| 5.1 | Różnicowanie fibroblastów 3T3-L1 w adipocyty..... | 49 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2 | Ekspresja OXR1 i OXR2 w adipocytach..... | 50 |
| 5.3 | Oreksyna A stymuluje transport glukozy do adipocytów..... | 52 |
| 5.4 | Oreksyna A stymuluje translokację GLUT4 do błony komórkowej | 55 |
| 5.5 | Oreksyna A aktywuje szlak PI3-kinazy/PKB..... | 57 |
| 5.6 | Oreksyna A zwiększa syntezę ATP | 66 |
| 5.7 | Oreksyna A stymuluje syntezę triacylogliceroli i kwasów tłuszczowych | 66 |
| 5.8 | Wpływ 4. tygodniowego podawania oreksyny A na masę ciała u szczurów | 74 |
| 5.9 | Oreksyna A zwiększa poziom adiponektyny we krwi u szczurów..... | 75 |
| 5.10 | Oreksyna A stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2 | 76 |
| 5.11 | Oreksyna A stymuluje magazynowanie triacylogliceroli aktywując PPAR γ | 78 |
| 5.12 | Oreksyna A stymuluje sekrecję i ekspresję adiponektyny. Powiązania z czynnikiem transkrypcyjnym PPAR γ | 80 |
| 6 | Dyskusja | 84 |
| 6.1 | Receptory oreksyn w adipocytach..... | 84 |
| 6.2 | Oreksyna A w transporcie glukozy – potencjalny mechanizm w adipocytach | 86 |
| 6.3 | Wpływ oreksyny A na metabolizm glukozy i lipidów | 91 |
| 6.4 | Efekty oreksyny A w modelu <i>in vivo</i> | 94 |
| 6.5 | Potencjalny mechanizm stymulacji adiponektyny i syntezy triacylogliceroli przez OXA – rola PPAR γ | 96 |
| 7 | Wnioski | 99 |
| 8 | Streszczenie..... | 100 |
| 8.1 | Cel..... | 100 |
| 8.2 | Metody..... | 100 |
| 8.3 | Wyniki | 101 |
| 8.4 | Konkluzja..... | 101 |
| 9 | Summary | 102 |
| 10 | Spis literatury | 103 |

1 Wykaz skrótów

ACTH: hormon adrenokortykotropowy (ang. adrenocorticotropic hormone)

AGEs: produkty końcowe zawansowanej glikacji (ang. advanced glycation end-products)

ATGL: lipaza triacyloglicerolowa (ang. adipose triglyceride lipase)

ATP: adenozyntrifosforon (ang. adenosine-5'-triphosphate)

BADGE: eter diglicydylowy bisfenolu A (ang. bisphenol A diglycidyl ether)

BCL-2: białko chłoniaka białaczki B-komorkowej (ang. B-cell lymphoma 2)

BMI: indeks masy ciała (ang. body mass index)

BSA: surowicza albumina wołowa (ang. bovine serum albumin)

cAMP: cykliczny adenozynomonofosforan (ang. cyclic adenosine monophosphate)

ERK: kinaza regulowana przez sygnały pozakomórkowe (ang. extracellular signal-regulated kinase)

FCS: płodowa surowica bydlęca (ang. fetal calf serum)

GAPDH: dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

GLUT: transporter glukozy (ang. glucose transporter)

GPCR: receptory sprzężone z białkami G (ang. G protein-coupled receptors)

HFD: dieta wysokotłuszczowa (ang. high fat diet)

HIF-1 α : czynnik 1 alfa indukowany przez hipoksję (ang. hypoxia-inducible factor 1 α)

HPRT: fosforybozylo transferaza hypoksantynowa (ang. hypoxanthine phosphoribosyl transferase)

HRP: peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)

HSL: lipaza wrażliwa na hormony (ang. hormone-sensitive lipase)

IL6: interleukina 6 (ang. interleukin 6)

IL10: interleukina 10 (ang. interleukin 10)

KRBH: bufor Krebsa-Ringera uzupełniony w HEPES (ang. Krebs-Ringer HEPES buffer)

LDH: dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)

MAP: kinazy aktywowane mitogenami (ang. mitogen activated kinases)

MSCs: mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells)

NADH: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. nicotinamide adenine dinucleotide)

NF- κ B: transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NPY: neuropeptyd Y (ang. neuropeptide Y)

nTZD: agonista receptora PPAR γ nienależący do grupy tiazolidinedionów (ang. non-thiazolidinedione peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist).

OXA: oreksyna A (ang. orexin A)

OXB: oreksyna B (ang. orexin B)

OXR1: pierwszy typ receptora oreksyn (ang. orexin-1 receptor)

OXR2: drugi typ receptora oreksyn (ang. orexin-2 receptor)

PDK1: kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide-dependent kinase 1)

PI3-K: kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)

PIP3: 3,4,5-trifosforan inozytolu (ang. phosphatidylinositol (3,4,5-triphosphate))

PKB: kinaza białkowa B (ang. protein kinase B, AKT)

PKC: kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)

PLIN: perilipina (ang. perilipin)

POMC: propiomelanokortyna (ang. proopiomelanocortin)

PPAR γ : receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

REM: sen paradoksalny (ang. rapid eye movement)

siRNA: małe interferencyjne RNA (ang. small interfering RNA)

TCA: kwas trichlorooctowy (ang. trichloroacetic acid)

TLR4: receptor toll-like 4 (ang. toll-like receptor 4)

TNF α : czynnik nekrozy nowotworów alfa (ang. tumor necrosis factor-alpha)

UCP1: białko rozprzegające 1 (ang. uncoupling protein 1)

UCP2: białko rozprzegające 2 (ang. uncoupling protein 2)

WKT: wolne kwasy tłuszczowe

2 Wstęp

2.1 Wprowadzenie

Tkanka tłuszczowa jest narządem o plejotropowym działaniu. Magazynuje nadmiar dostarczanej w składnikach pokarmowych energii oraz wydzielając hormony i metabolity reguluje funkcje wielu innych narządów. Zaburzenia w jej funkcjonowaniu prowadzą do licznych chorób oraz nieprawidłowości w homeostazie organizmu. Do najpoważniejszych zalicza się cukrzycę typu 2, choroby układu krążenia oraz niektóre typy nowotworów. Bezpośrednią przyczyną dysfunkcji tkanki tłuszczowej i wynikających z niej chorób jest przede wszystkim otyłość. Podłoże do powstawania otyłości stanowią predyspozycje genetyczne. Ponadto bardzo ważną rolę odgrywają czynniki środowiskowe. Nadmiar przyjmowanych kalorii oraz brak aktywności fizycznej sprzyjają występowaniu otyłości szczególnie w zachodnich społeczeństwach Europy czy USA, ale również w tych, które są na etapie intensywnego rozwoju cywilizacyjnego, na przykład na terenie Chin. Ponieważ choroby spowodowane otyłością nie tylko zagrażają zdrowiu i życiu, ale generują również wysokie straty ekonomiczne, aktualnie poszukuje się nowych celów, które mogłyby być skuteczne w przeciwdziałaniu otyłości oraz poprawie metabolizmu i funkcji endokrynych tkanki tłuszczowej. Poszukiwania te obejmują między innymi hormony peptydowe oraz ich receptory.

Rezultaty ostatnich badań ujawniły, że neurohormon oreksyna A oraz jej receptory regulują funkcje zróżnicowanych i niezróżnicowanych adipocytów. Działając na mysie preadipocyty oreksyna A stymuluje proliferację komórek oraz reguluje aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm tlenowy. W przypadku ludzkich komórek tłuszczowych oreksyna A zwiększa ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2, a także hamuje lipolizę. Należy odnotować, że zarówno aktywacja PPAR γ 2 oraz wyhamowanie lipolizy to bardzo istotne cele w terapii cukrzycy typu 2. Poza opisanymi efektami nie są dostępne żadne dane na temat dalszej charakterystyki roli oreksyny A w żółtej tkance tłuszczowej. W niniejszej pracy wykorzystując izolowane adipocyty szczura, linię komórkową adipocytów 3T3-L1 oraz model *in vivo* postanowiono podjąć próbę określenia wpływu oreksyny A na metabolizm węglowodanowo-lipodowy oraz funkcje endokryne adipocytów.

2.2 Charakterystyka i funkcje tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa jest typem tkanki łącznej zbudowanej przede wszystkim z komórek określanych jako adipocyty. Do tej pory scharakteryzowano dwa typy tkanki tłuszczowej: żółtą i brunatną. Główną rolą żółtej tkanki tłuszczowej jest magazynowanie energii, natomiast brunatna tkanka tłuszczowa odpowiada przede wszystkim za generowanie ciepła (1). Brunatna tkanka tłuszczowa występuje w znacznych ilościach u noworodków i zanika stopniowo w rozwoju osobniczym. Brunatne adipocyty obserwowane są jednak w ciągu całego życia (1, 2). Adipocyty żółtej tkanki tłuszczowej zawierają jedną dużą kroplę tłuszczu (triacylogliceroli), podczas gdy w adipocytach brunatnych obserwowana jest znaczna ilość małych kropeł tłuszczu (3). Ponadto w porównaniu do żółtych adipocytów, brunatne adipocyty charakteryzują się większą liczbą mitochondriów oraz wysoką ekspresją białka UCP1. Białko UCP1 (dawniej określane jako termogenina) w komórkach jest zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrium, gdzie wykorzystując siłę protonomotoryczną odpowiada za generowanie energii cieplnej (4).

Adipocyty powstają na drodze różnicowania preadipocytów. Preadipocyty pochodzą z mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), które w rozwoju zarodkowym rozwijają się z mezodermy. Różnicowanie preadipocytów w dojrzałe adipocyty jest procesem złożonym. Wiadomo, że w różnicowaniu dochodzi do aktywacji ekspresji wielu genów, jednak kluczową rolę przypisuje się czynnikom transkrypcyjnym PPAR γ i C/EBP (5). W warunkach eksperymentalnych *in vitro*, proces ten może być indukowany przez inkubację preadipocytów w obecności stymulatorów syntezy cAMP (np. IBMX), analogów glikokortykoidów lub aktywatorów szlaku PI3-K/PKB takich jak insulina czy IGF-1 (6-8). *In vivo* proces ten jest regulowany kompleksowo. Kluczową rolę przypisuje się hormonom, jednak istotną funkcję odgrywają również metabolity (9). Dlatego też pełna natura procesu różnicowania nie jest w pełni poznana. Do dzisiaj nie ma przekonujących danych na temat mechanizmów odpowiedzialnych za różnicowanie brunatnych i żółtych adipocytów (1).

Tkanka tłuszczowa nie jest narządem homogennym. W jej skład oprócz adipocytów wchodzi również inne komórki takie jak makrofagi, fibroblasty, preadipocyty i komórki endotelialne (10). Ponadto jest ona narządem bardzo plastycznym, którego skład komórkowy i morfologia zależą od aktualnego stanu fizjologicznego organizmu. Co więcej, różnice dotyczą nie tylko budowy, ale i funkcji. W zależności od lokalizacji

tkanki tłuszczowej adipocyty wchodzące w jej skład charakteryzuje odmienny profil sekrecyjny, ekspresyjny i insulinowrażliwość (11).

Podstawową rolą tkanki tłuszczowej jest magazynowanie zawartej w substancjach odżywczych energii, której podaż przekracza aktualne zapotrzebowanie organizmu. Energia akumulowana jest w postaci wysoce zredukowanych kwasów tłuszczowych połączonych wiązaniem estrowym z glicerolem (triacyloglicerol). W sytuacji zapotrzebowania energetycznego dzięki aktywności enzymów lipolitycznych, triacyloglicerole podlegają lipolizie do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu, które stanowią źródło energii dla tkanek obwodowych (12, 13). Pogląd na magazynującą rolę tkanki tłuszczowej jako najistotniejszą utrzymywał się przez wiele lat. Jednak ostatnie dwie dekady badań udokumentowały, że tkanka tłuszczowa jest narządem o plejotropowym działaniu. W 1994 roku grupa Friedman'a zidentyfikowała pierwszy hormon wydzielany przez adipocyty leptynę (14). Dzisiaj lista hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową jest długa. Adipocyty wydzielają i syntetyzują hormony peptydowe, katecholaminy oraz hormony sterydowe (15, 16). Hormony syntetyzowane i wydzielane przez adipocyty działając para- i endokrynnie sprawiają, że tkanka tłuszczowa partycypuje w homeostazie energetycznej całego organizmu. Wybrane hormony oraz ich krótką charakterystykę podano w tabeli 1.

Mając na uwadze tak kompleksową rolę tkanki tłuszczowej nie jest zaskakujące, że wszelkie nieprawidłowości w jej funkcjonowaniu powodują istotne zmiany w homeostazie organizmu. Czynnikiem, który w szczególności wpływa na funkcje metaboliczne i endokrynnie adipocytów jest otyłość.

Tabela 1. Wybrane hormony tkanki tłuszczowej oraz ich krótka charakterystyka.

Opracowano na podstawie (17-21).

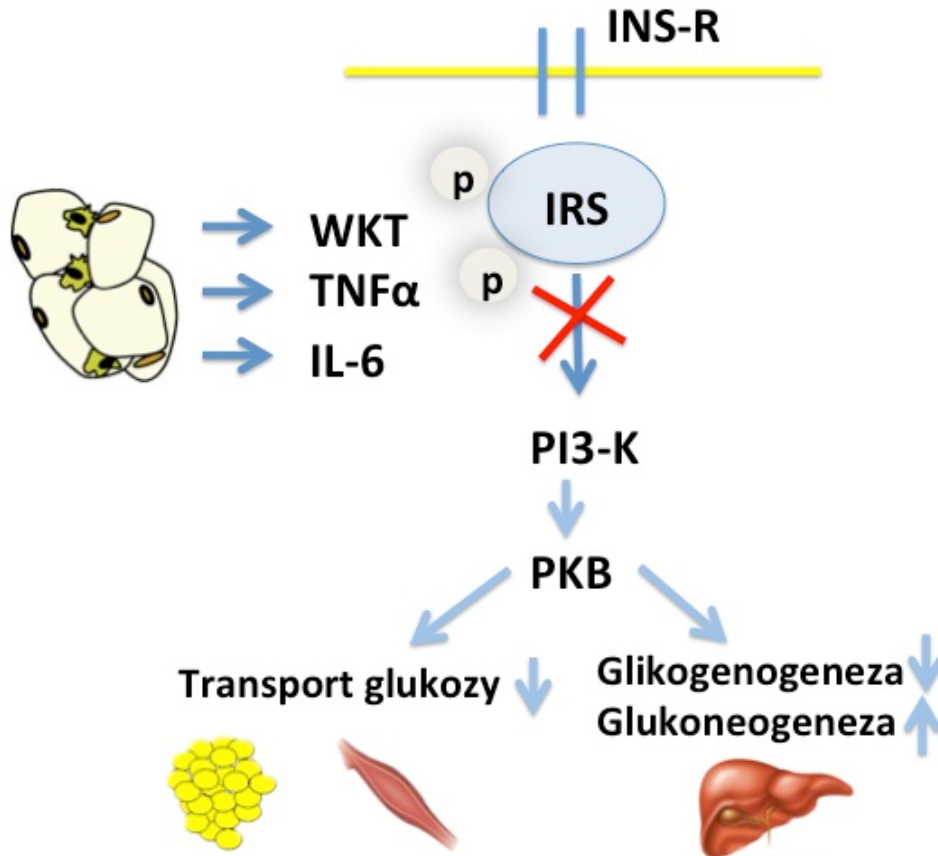
| Hormon | Wpływ na pobieranie pokarmu | Wpływ na homeostazę glukozy |
|---------------|------------------------------------|--|
| Leptyna | Hamuje | Zwiększa insulinowrażliwość w mięśniach i wątrobie, w komórkach β obniża ekspresję insuliny. |
| Adiponektyna | Brak | Zwiększa insulinowrażliwość w mięśniach i wątrobie, stymuluje sekrecję i ekspresję insuliny, działa ochronnie na komórki β . |
| Rezystyna | Hamuje | Zmniejsza insulinowrażliwość w wątrobie i mięśniach, hamuje sekrecję insuliny. |
| Wisfatyna | Stymuluje | Zwiększa insulinowrażliwość w tkankach obwodowych, działa ochronnie na komórki β , stymuluje sekrecję insuliny. |
| Omentyna | Brak | Zwiększa insulinowrażliwość w mięśniach. |
| Chemeryna | Brak | Zwiększa insulinowrażliwość w tkance tłuszczowej. |
| TNF α | Hamuje | Obniża insulinowrażliwość w tkance tłuszczowej, wątrobie i mięśniach. |
| IL-6 | Hamuje | Obniża insulinowrażliwość w tkance tłuszczowej, wątrobie i mięśniach. |

2.3 Rola tkanki tłuszczowej w patogenezie otyłości oraz cukrzycy typu 2

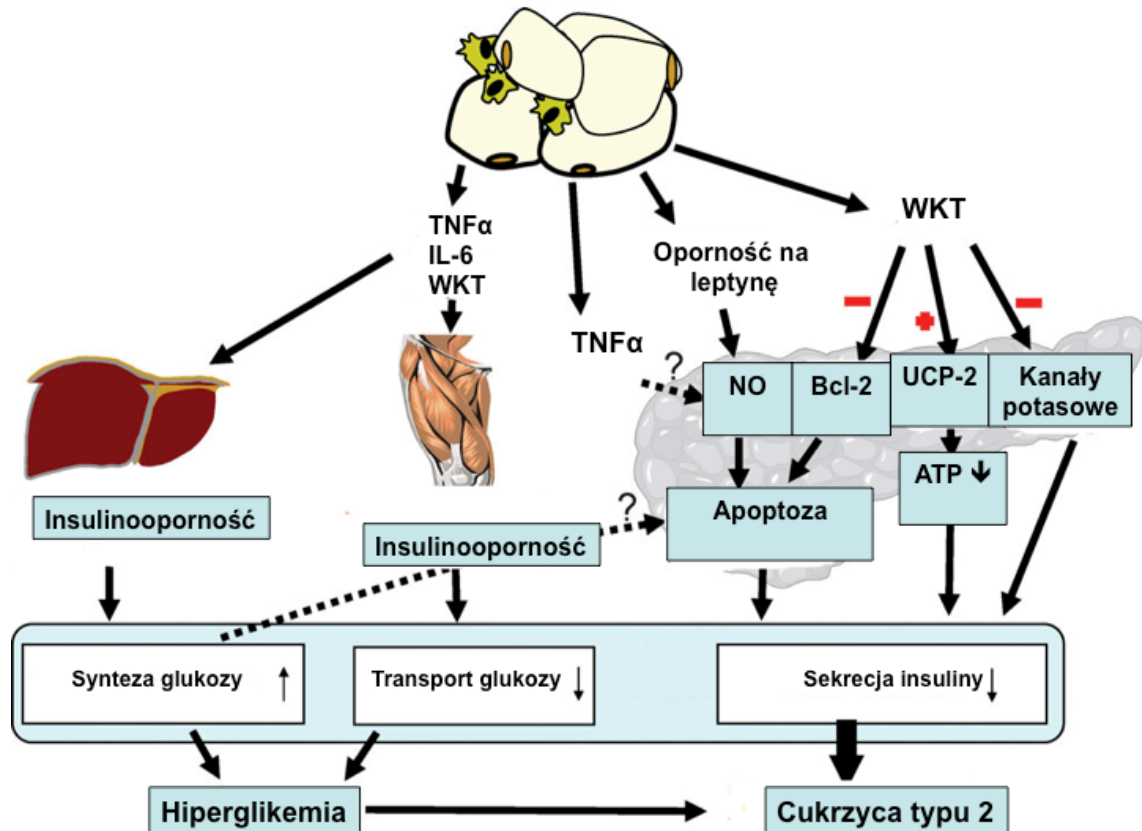
Otyłość charakteryzuje się jako zwiększone nagromadzenie tkanki tłuszczowej, której ilość znacznie przekracza fizjologiczne i adaptacyjne potrzeby organizmu (22). Użytecznym markerem określającym poziom otyłości jest wskaźnik masy ciała (BMI). Oblicza się go dzieląc masę ciała wyrażoną w kilogramach przez kwadrat wysokości wyrażony w metrach. W przypadku ludzi dorosłych, za otyłe uważa się osoby posiadające wartość BMI powyżej 25 (23). Liczne dane literaturowe wskazują, że otyłość prowadzi do wielu zaburzeń metabolicznych przejawiających się w postaci schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz zwiększoną zapadalnością na niektóre typy nowotworów (24, 25). Jednym z najczęstszych schorzeń wynikających z otyłości jest cukrzyca typu 2. Pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 charakteryzuje obniżona insulinowrażliwość tkanek obwodowych (insulinooporność). Stan ten dotyczy szczególnie mięśni oraz tkanki tłuszczowej, gdzie dochodzi do znacznego upośledzenia funkcji insuliny w zakresie stymulacji transportu glukozy do komórek. W wątrobie insulinooporność powoduje wzrost glukoneogeny i wyhamowanie syntezy glikogenu (26). Ponadto we wszystkich fazach choroby obserwuje się nieprawidłowości w sekrecji glukagonu i insuliny. W późniejszym etapie cukrzycy typu 2 w wyspach trzustkowych dochodzi do bardzo wyraźnego obniżenia stymulowanej przez glukozę sekrecji insuliny i spadku liczby komórek β , co przypomina sytuację obserwowaną podczas cukrzycy typu 1 (27, 28). Podobnie do chorych na cukrzycę typu 1, cukrzyca typu 2 cierpią przede wszystkim z powodu licznych komplikacji związanych głównie z niefizjologicznie wysokim stężeniem glukozy we krwi. Pochodne jej metabolizmu czy zawansowane końcowe produkty glikacji (AGEs) prowadzą do retinopatii, nefropatii czy uszkodzeń w obrębie układu sercowo-naczyniowego (29-31). Aktualnie jednym z najintensywniej eksplorowanych tematów w naukach medycznych i biologicznych jest poznanie pełnego mechanizmu odpowiedzialnego za rozwój cukrzycy typu 2 u ludzi otyłych. Wiadomo, że tkankę tłuszczową ludzi oraz zwierząt otyłych charakteryzuje nie tylko większa ilość adipocytów (hiperplazja), ale również ich przerost (hipertrofia) (32). Poza morfologią, zmiany dotyczą również kompozycji, metabolizmu oraz funkcji endokrynnych komórek tłuszczowych. Jedną z najlepiej poznanych cech towarzyszących tkance tłuszczowej podczas otyłości jest obecność makrofagów (głównie typu M1 i M2) (33). Zarówno makrofagi jak i adipocyty wydzielają wówczas cytokiny prozapalne takie jak TNF α czy interleukiny 6 i 10. Cytokiny te działając bezpośrednio na adipocyty upośledzają przekazanie receptora insuliny przyczyniając

się do insulinooporności i pośrednio do hiperglikemii (34). Charakterystyczne dla otyłości jest również zaburzenie metabolizmu lipidowego. Adipocyty wydzielają duże ilości nasyconych kwasów tłuszczowych, które poza bezpośrednim działaniem na transdukcję sygnału insuliny wiążą się do receptora TLR4 na błonie komórkowej makrofagów i adipocytów, co prowadzi do aktywacji szlaku NF- κ B powodując zwiększoną sekrecję TNF α (35, 36). Zwiększone wydzielanie kwasów tłuszczowych i cytokin prozapalnych powoduje powstawanie insulinooporności w tkance tłuszczowej, ale również w innych tkankach takich jak wątroba czy mięśnie (37). Ponadto to właśnie wolne nasycone kwasy tłuszczowe i cytokiny prozapalne postrzega się jako czynniki proapoptotyczne przyczyniające się do spadku liczby komórek β w wyspach trzustkowych u pacjentów z cukrzycą typu 2 (38). Jeden z podstawowych i najistotniejszych mechanizmów powstawania insulinooporności powodowanej przez WKT i cytokiny przedstawiono na rycinie 1.

Wyniki ostatnich badań ujawniły, że oprócz opisanych powyżej mechanizmów istotną rolę w rozwoju insulinooporności w komórkach tłuszczowych podczas otyłości może odgrywać zaburzona cyrkulacja krwi. Nieprawidłowość ta wynika głównie z hiperplazji i hipertrofii adipocytów. Ograniczona cyrkulacja krwi skutkuje obniżeniem dostępności tlenu i związaną z tym aktywacją czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Ponadto hipertrofia adipocytów skutkuje nie tylko zmianami w unaczynieniu tkanki tłuszczowej, ale ogranicza również dyfuzję tlenu bezpośrednio do adipocytów, co dodatkowo sprzyja powstawaniu hipoksji i aktywacji czynnika HIF-1. Zwiększona aktywność tego czynnika transkrypcyjnego prowadzi do spadku ekspresji uwrażliwiających adipocyty na działanie insuliny hormonu adiponektyny i czynnika transkrypcyjnego PPAR γ oraz powoduje wzrost ekspresji markerów stresu komórkowego wpływając hamująco na transdukcję sygnału receptora insuliny (39, 40). Kompleksowy udział tkanki tłuszczowej w powstawaniu cukrzycy typu 2 przedstawiono na rycinie 2.



Ryc 1. Proponowany mechanizm odpowiedzialny za powstawanie insulinooporności obserwowanej podczas otyłości. Wydzielane przez adipocyty i makrofagi $\text{TNF}\alpha$, interleukina 6 (IL-6) oraz wolne kwasy tłuszczowe powodują fosforylację serynową substratów receptora insuliny (IRS1 i IRS2), co prowadzi do obniżenia stymulowanej przez insulinę fosforylacji (głównie treoninowej) tych białek. W wyniku tego dochodzi do zaburzeń w dalszym przekazywaniu sygnału receptora insuliny (INS-R). Powoduje to obniżenie aktywności kinazy białkowej B, która odgrywa kluczową rolę w transporcie glukozy szczególnie w mięśniach i tkance tłuszczowej. Ponadto zaburzenia w obrębie IRS2 przekładają się również na wątrobę, gdzie utrzymanie insulinooporności konieczne jest w hamowaniu glukoneogenezy oraz stymulacji glikogenogenezy. W efektach WKT pośredniczy najprawdopodobniej kinaza białkowa C (PKC), w przypadku $\text{TNF}\alpha$ i IL-6 w upośledzaniu sygnału receptora insuliny biorą głównie udział kinazy z grupy MAP. Opracowano na podstawie (17, 41, 42)



Ryc. 2. Zaburzenia funkcji adipocytów prowadzą do cukrzycy typu 2.

Charakterystyczne dla otyłości podwyższone poziomy $TNF\alpha$, IL-6 oraz WKT powodują insulinooporność w tkankach peryferyjnych, zwiększają syntezę glukozy w wątrobie oraz hamują jej transport do tkanki tłuszczowej i mięśniowej co prowadzi do hiperglikemii. Podwyższony poziom WKT prowadzi do obniżenia sekrecji insuliny. WKT regulują aktywność kanałów potasowych oraz stymulują ekspresję białka UCP2, które obniża ilość ATP i tym samym upośledza sekrecję insuliny. Dodatkowo WKT obniżając ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 aktywują apoptozę w komórkach β . Istotną rolę odgrywa również oporność na leptynę. Leptyna, która obniża syntezę tlenu azotu (NO) działa ochronnie na komórki β . Opracowano za (17).

Mając na uwadze istotną rolę tkanki tłuszczowej w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2, adipocyty oraz tkanka tłuszczowa stanowią istotne cele w zapobieganiu oraz leczeniu wymienionych nieprawidłowości. Aktualnie za najistotniejsze cele uważa się nie tylko ograniczenie ilości tkanki tłuszczowej (głównie otrzewnowej), ale również wyhamowanie stanów zapalnych występujących w jej obrębie oraz zwiększenie insulinooporności adipocytów (43). W celu zwiększenia odpowiedzi komórek tłuszczowych na insulinę stosuje się terapię opartą głównie na podawaniu agonistów czynnika transkrypcyjnego PPAR γ . Dokładny mechanizm działania agonistów PPAR γ jest ciągle analizowany. Wiadomo, że PPAR γ uwikłany jest w regulację bardzo wielu genów, włączając geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm lipidów i węglowodanów. Aktywacja PPAR γ zwiększa ilość adipocytów cechujących się wysoką insulinoopornością oraz chroni komórki β przed lipotoksycznością (44).

Ponadto w celu poprawy funkcjonowania tkanki tłuszczowej pożądane jest wyhamowanie sekrecji kwasów tłuszczowych, a także zwiększenie ekspresji i sekrecji hormonów partycypujących w regulacji insulinooporności (głównie adiponektyny) (45).

2.4 Modele eksperymentalne wykorzystywane w badaniach nad adipocytami

Odkryciom sugerującym istotną rolę tkanki tłuszczowej w patogenezie wielu chorób metabolicznych towarzyszył rozwój modeli wykorzystywanych w badaniach nad adipocytami. Jedną z najbardziej użytecznych i stosowanych metod jest izolacja adipocytów. Mimo tego, że źródła tej metody sięgają kilkadziesiąt lat wstecz jest ona nadal powszechnie wykorzystywana. Przemawia za tym fakt, że materiał badawczy pochodzi bezpośrednio od zwierząt, możliwa jest izolacja z wielu miejsc w organizmie oraz od różnych osobników, w tym otyłych czy też poddanych działaniu konkretnego czynnika eksperymentalnego. Dodatkowo zarówno od zwierząt jak i ludzi możliwa jest izolacja preadipocytów oraz ich różnicowanie w adipocyty (46, 47). Mimo tak wielu zalet wynikających z izolacji adipocytów, szczególnie w przypadku eksperymentów dotyczących mechanizmów transdukcji sygnału hormonalnego, przydatne narzędzie stanowią linie komórkowe. Linie te dzieli się na dwie grupy. Do jednej należą linie preadipocytów, które są w stanie różnicować tylko w adipocyty, do drugiej komórki multipotentne, które mogą różnicować w adipocyty, ale również w inne typy komórek, jak np. komórki mięśniowe. Najczęściej stosowanymi komórkami w badaniach nad adipocytami są dwie linie preadipocytów określane jako 3T3-L1 oraz 3T3-F422A.

Komórki te wywodzą się z linii komórek Swiss 3T3-L1, która została wyprowadzona z 17-19 dniowych embrionów myszy Swiss. Są one w stanie różnicować z wykazujących cechy fibroblastów preadipocytów w morfologicznie i funkcjonalnie zróżnicowane adipocyty. Podczas różnicowania obserwowane są wzrastająca akumulacja tłuszczu, zmiany morfologii oraz ekspresji genów, włączając geny charakterystyczne dla tkanki tłuszczowej takie jak FABP4 czy PPAR γ . Największą zaletą komórek 3T3-L1 jest łatwość ich różnicowania. W tym celu wykorzystuje się stymulację hormonalną (48, 49). Zestawienie najczęściej stosowanych linii komórkowych podano w tabeli 2.

Tabela 2. Linie komórkowe adipocytów, zmodyfikowano za (48).

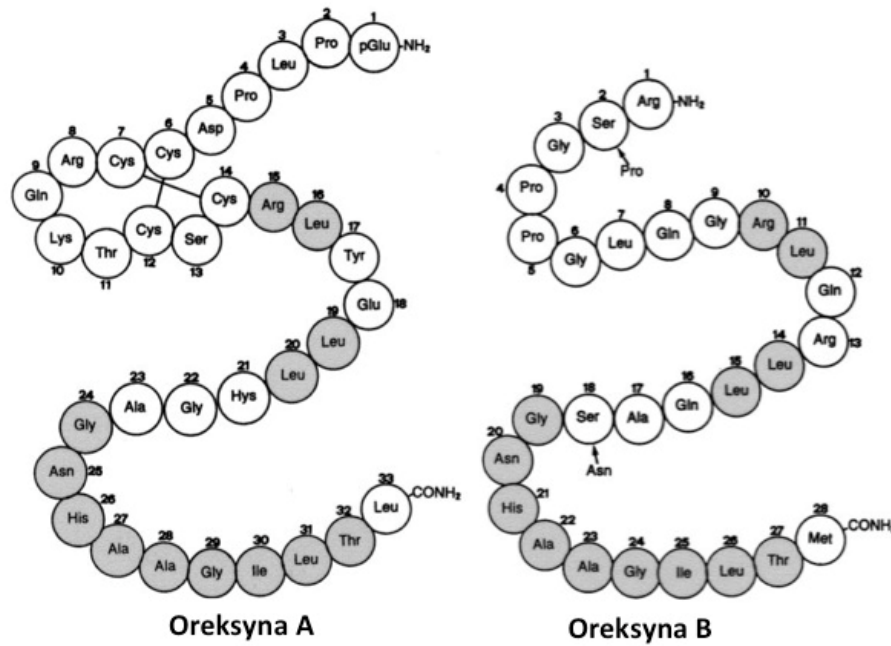
| Linia | Typ | Źródło | Charakterystyka |
|------------|--------------|---|---|
| 3T3-L1 | Preadipocyty | 18-19 dniowe embriony myszy Swiss | Najpowszechniej stosowany model pre- i adipocytów. |
| 3T3-F442A | Preadipocyty | 17-19 dniowe embriony myszy Swiss | Podobne do 3T3-L1, intensywniej różnicują. |
| Ob17 | Preadipocyty | Tłuszcz okołajądrowy myszy <i>ob/ob</i> | Niska synteza kwasów tłuszczowych. |
| C3H10T1/2 | Komórki pnia | 14-17 dniowe embriony myszy C3H | Użyteczne jako model różnicowania komórek stem w adipocyty. |
| Komórki ES | Komórki pnia | 3,5 dniowe mysie blastocysty | Jak powyżej. |

2.5 Charakterystyka oreksyn i ich receptorów

Oreksyny zidentyfikowano w roku 1998 roku. Odkrycia niemal równolegle dokonały dwa zespoły badawcze. Zespół De Lacea'y analizując bibliotekę cDNA podwzgórza szczura zidentyfikował mRNA kodujące białko prekursorowe, z którego syntetyzowane są dwa neuropeptydy. Ponieważ peptydy zidentyfikowano w podwzgórzu (ang. *hypothalamus*) oraz odnotowano ich strukturalne podobieństwo do hormonów z rodziny inkretyn (ang. *incretin*) nazwano je hipokretynami 1 i 2 (50). Sakurai i wsp. odkryli te same neurohormony w wyniku poszukiwań naturalnych ligandów dla receptorów sierocych związanych z białkami G (GPCR). Ponieważ zauważono, że peptydy te

stymulują apetyt (gr. orexis = apetyt) nazwano je oreksynami (51). Obie nazwy są poprawne i zamiennie używane.

Oreksyny A i B są syntetyzowane w wyniku proteolitycznej obróbki tego samego 130 aminokwasowego białka prekursorowego – preprooreksyny. U człowieka oreksyna A i B zbudowane są odpowiednio z 33 i 28 aminokwasów, obydwie peptydy cechuje 46% podobieństwa sekwencji aminokwasowej. W cząsteczce oreksyny A na skutek potranslacyjnej obróbki w rejonie końca-N łańcucha polipeptydowego powstaje cykliczny pyroglutamyl. Oba peptydy ulegają amidacji na końcu C. Kolejną cechą charakterystyczną oreksyny A jest obecność dwóch mostków disiarczkowych, które znajdują się w łańcuchu polipeptydowym pomiędzy resztami Cys6-Cys12 oraz Cys7-Cys14 (50, 51). Oreksyna A jest peptydem bardziej lipofilnym, co pozwala na pokonywanie bariery krew – mózg oraz sprawia, że we krwi jest ona wolniej degradowana niż cząsteczka OXB (52). Opisane powyżej właściwości sprawiają, że oreksyna A jest peptydem który wywiera silniejsze działanie biologiczne w porównaniu do mniej stabilnej cząsteczki oreksyny B. Ekspresja genu preprooreksyny w ośrodkowym układzie nerwowym obserwowana jest w niewielkiej liczbie neuronów w bocznym i tylnym podwzgórzu. Neurony te tworzą bardzo rozległy system docierający do kory mózgowej, hipokampa, wzgórza, pnia mózgu czy rdzenia kręgowego (53).



Ryc. 3. Sekwencja aminokwasowa ludzkiej oreksyny A i B. Na końcu-N cząsteczki OXA znajduje się cykliczny pyroglutamyl, a pomiędzy resztami cysteinami 6 i 2 oraz 7 i 14 zlokalizowane są dwa mostki disiarczkowe. Cząsteczka OXA wykazuje taką samą sekwencję u człowieka, myszy, szczura, owcy i świni podczas gdy OXB różni się dwiema resztami aminokwasowymi, które na rycinie zaznaczono strzałkami. Kolorem szarym zaznaczono reszty aminokwasowe, które są identyczne dla OXA i OXB. Opracowano za (54).

2.6 Receptory oreksyn

Oreksyny A i B działają na komórki docelowe na drodze aktywacji dwóch typów receptorów: OXR1 oraz OXR2. Znane są one również jako receptory hipokretyn: HCRTR1 i HCRTR2 (51). Receptory oreksyn należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G. OXR1 i OXR2 zbudowane są z siedmiu domen transbłonowych. OXR1 jest selektywnie sprzężony z białkami z podklasy $G_{q/11}$, natomiast OXR2 może wykorzystywać białka $G_{q/11}$, G_s oraz $G_{i/o}$ (51, 55). Analizując podobieństwo w budowie aminokwasowej pomiędzy OXR1 i OXR2 zauważono, że u człowieka wynosi ono 64%. Zupełnie jak w przypadku ligandów, tak i w przypadku receptorów sekwencja aminokwasowa jest u ssaków wysoce konserwatywna. Dla OXR1 podobieństwo pomiędzy szczurem a człowiekiem to 94%, a dla OXR2 wynosi 95% (51, 56).

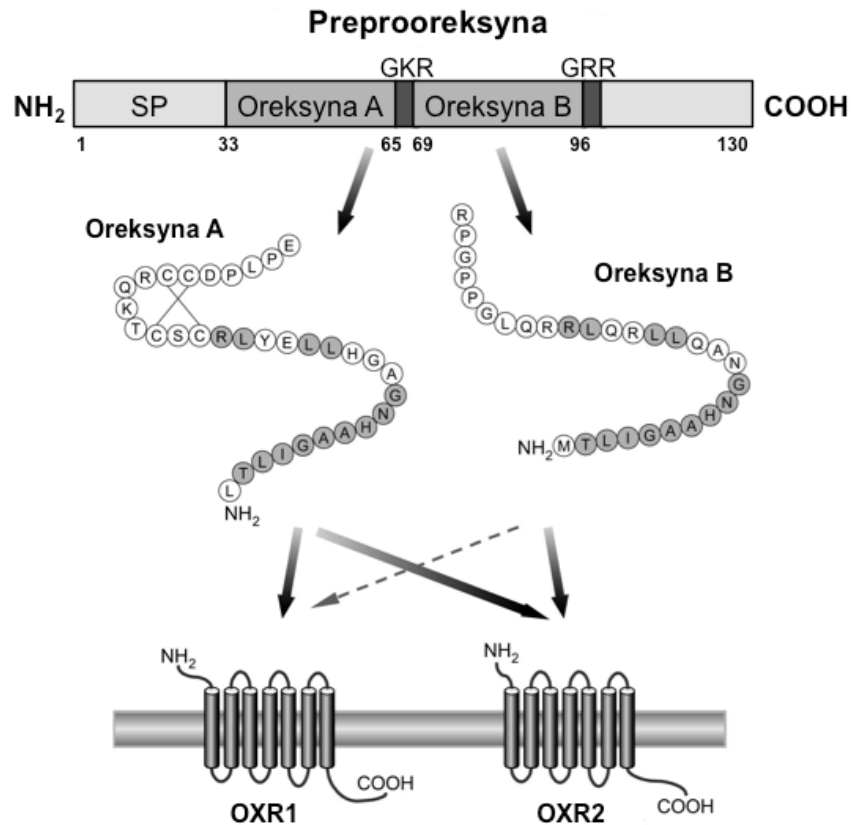
Oreksyna A wykazuje takie samo powinowactwo do obydwu typów receptora, z drugiej strony oreksyna B wykazuje około dziesięć razy wyższe powinowactwo do OXR2 (51). Wynika stąd, że OXR1 jest receptorem selektywnie wiążącym oreksynę A, podczas gdy OXR2 jest receptorem nieselektywnym, który z takim samym powinowactwem wiąże obydwie oreksyny.

Mechanizm transdukcji sygnału receptorów oreksyn zależy między innymi od zmian wewnątrzkomórkowej dystrybucji jonów wapnia (Ca^{2+}). Odnotowano, że w neuronach oraz w komórkach wykazujących stabilną ekspresję OXR1, oreksyny A i B zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} (57, 58). Zmiany stężenia jonów wapnia zależne są głównie od jego uwalniania z magazynów wewnątrzkomórkowych w którym pośredniczy fosfolipaza C (58).

Kolejnym wtórnym przekaźnikiem pośredniczącym w egzekucji sygnału hormonalnego przez receptory oreksyn jest cykliczny AMP (59). Wpływ na aktywność cyklicznej adenylowej może mieć charakter stymulujący lub hamujący i jest regulowany przez co najmniej trzy mechanizmy: rekrutację białka $G_{i/o}$ (hamowanie syntezy cAMP), G_s (stymulacja cAMP) lub PKC (stymuluje cAMP przez PLC i G_q) (60).

Ponadto receptory oreksyn pobudzają kaskadę kinaz aktywowanych miogenami (41). W wielu typach komórek stymulacja oreksyną A i B związana jest z fosforylacją należących do tej grupy kinaz ERK1/2 oraz p38 (55, 61, 62).

W ośrodkowym układzie nerwowym ekspresja OXR1 zachodzi przede wszystkim w bocznym podwzgórzu, jądrze brzuszno-przyśrodkowym, jądrze miejsca sinawego, hipokampie, przysadce i szyszynce. Miejsca, w których odnotowano ekspresję OXR2 to głównie jądra: przykomorowe, brzuszno-przyśrodkowe, grzbietowo-przyśrodkowe, łukowate oraz kora i pień mózgu (63).



Ryc. 4. System oreksynowy. OXA i OXB powstają w wyniku proteolitycznej obróbki preprooreksyny. Do proteolitycznych cięć dochodzi w miejscach GKR i GRR gdzie konwertaza preprohormonu rozpoznaje specyficzne reszty aminokwasowe. OXR1 wiąże OXA oraz w niewielkim stopniu OXB. OXR2 jest receptorem niespecyficznym i z takim samym powinowactwem wiąże OXA i OXB. Zmodyfikowano za (64).

2.7 Rola oreksyn w regulacji behawioru pokarmowego

Tak jak zaznaczono przy okazji omawiania genetyki nazwy oreksyn, peptydy te stymulują pobieranie pokarmu. Ekspresja preprooreksyny zachodzi w stosunkowo małej populacji neuronów w obszarze bocznego i tylnego podwzgórza, neurony te ulegają projekcji do innych ośrodków kluczowych dla behawioru pokarmowego (50). U szczura i myszy dokomorowe podanie oreksyny A i w mniejszym stopniu oreksyny B w fazie jasnej, kiedy zwierzęta są nieaktywne w zależności od dawki zwiększa ilość pobieranego pokarmu (51, 65). Stymulujący pobieranie pokarmu efekt oreksyn utrzymuje się tylko przez kilka pierwszych godzin, a przedłużenie okresu podawania tych peptydów do 24 godzin nie ma żadnego wpływu na behawior pokarmowy i masę

ciała. Wpływ oreksyn na pobieranie pokarmu jest również zależny od wieku zwierząt. U szczurów starych (25 miesięcy) oreksyna nie wpływa na ilość pobieranego pokarmu. Brak wpływu wynika najprawdopodobniej z malejącej z wiekiem ekspresji receptorów oreksyn w podwzgórzu (53, 66). Aktywność neuronów syntetyzujących oreksynę jest precyzyjnie regulowana przez status energetyczny organizmu, głównie przez glukozę. Wzrost ekspresji preprooreksyny jest obserwowany na skutek głodzenia (48 h), jednak chroniczne ograniczenie pożywienia nie wpływa znacząco na ekspresję oreksyny u szczurów (67). Aktywność neuronów wykazujących ekspresję oreksyn jest również stymulowana przez aminokwasy (68).

Neurony w których zachodzi ekspresja oreksyn oraz ich receptorów wykazują interakcję z neuronami, w których ekspresji ulegają grelina, NPY, AgRP czy POMC. Co więcej, obserwuje się również koekspresję receptorów oreksyn, leptyny czy NPY. Dla tego nie zaskakuje to, że w stymulowanym przez oreksyny łaknieniu mogą pośredniczyć inne peptydy oreksygenne jak grelina czy NPY (69, 70).

Ponadto zwiększenie pobierania pokarmu przez oreksyny może wynikać pośrednio z tego, że peptydy te stymulują aktywność motoryczną i wydłużają okres czuwania (71). Stymulacja pobierania pokarmu przez oreksyny wynika głównie z aktywacji pierwszego typu receptora. Odnotowano, że jego farmakologiczna inhibicja powoduje spadek apetytu spowodowanego podaniem oreksyny A, ale również podstawowego pobierania pokarmu (72).

Mimo tego, że zdecydowana część publikacji ukazuje oreksyny jako peptydy, które stymulują pobieranie pokarmu, należy też wspomnieć o danych, które ujawniły, że OXR2 może pośredniczyć w hamowaniu pobierania pokarmu. Podanie agonisty, który selektywnie aktywuje OXR2 nie wpływa na behavior pokarmowy u zwierząt utrzymywanych na diecie normalnej, podczas gdy ogranicza pobieranie pokarmu u zwierząt utrzymywanych na diecie wysokochołuszczowej (73). Dlatego do pełnej charakterystyki receptorów oreksyn w regulacji pobierania pokarmu niezbędne są dalsze badania.

2.8 System oreksynowy w regulacji snu - powiazania z homeostazą energetyczną

Ekspresja receptorów oreksyn nie jest ograniczona jedynie do regionów mózgu zaangażowanych w regulację behavioru pokarmowego, ale ma miejsce również w obszarach odpowiedzialnych za regulację aktywności motorycznej oraz cyklu sen – czuwanie (74). Wiadomo, że aktywność neuronów, w których zachodzi ekspresja

oreksyn wzrasta w czasie czuwania i aktywności zwierząt, z drugiej strony jest obniżona podczas wypoczynku czy snu (75). Dokomorowe podanie oreksyn wiąże się ze zwiększaniem aktywności ruchowej, stymuluje aktywność układu sercowo-naczyniowego, zwiększa temperaturę ciała oraz zużycie tlenu (76-79). Ponadto związane jest to również z ograniczeniem fazy REM snu (80). U psów występowanie mutacji w obrębie genu kodującego OXR2 powiązane jest z występowaniem narkolepsji (81). Podobnie genetyczny nokaut preprooreksyny u szczura również skutkuje narkolepsją (63). Choroba neurologiczna jaką jest narkolepsja zarówno u ludzi jak i zwierząt manifestuje się przede wszystkim napadowymi stanami senności, katalepsją oraz porażeniem przysennym. Co ciekawe, szczególnie z badań nad ludźmi wiadomo, że występowanie narkolepsji bardzo często związane jest również ze zwiększonym indeksem masy ciała (BMI), ograniczonym wydatkowaniem energii oraz podatnością w kierunku rozwoju cukrzycy typu 2 (82). Aktualnie wydaje się, że kluczowym elementem łączącym narkolepsję z otyłością i zwiększoną zapadalnością na cukrzycę typu 2 mogą być nieprawidłowości w obrębie oreksyn oraz ich receptorów. Przypuszczenia te potwierdza fakt ukazujący, że narkoleptycy wykazują niższy poziom oreksyny A w płynie mózgowo-rdzeniowym (83). Obniżony poziom oreksyny A charakteryzuje również zdrowych, ale otyłych ludzi (84). Związek pomiędzy niskim poziomem oreksyny A a predyspozycjami w kierunku powstawania otyłości oraz cukrzycy typu 2 ujawnił, że oreksyna A może odgrywać bardzo istotną rolę w regulacji homeostazy energetycznej. Potwierdzają to rezultaty badań uzyskanych przy użyciu genetycznie modyfikowanych myszy niezdolnych do ekspresji genu preprooreksyny. Myszy te cierpią z powodu narkolepsji, ale również są mniej aktywne ruchowo i charakteryzuje je umiarkowana otyłość (85).

Wydaje się, że jedna z możliwych przyczyn związku pomiędzy niskim poziomem oreksyny A oraz zaburzeniami w obrębie jej receptorów a otyłością wynika z tego, że system oreksynowy promuje wydatkowanie energii, przez co działa ochronnie na wzrost masy ciała. Mechanizm, który odpowiada za regulację bilansu energetycznego przez OXA jest aktualnie intensywnie badany. Z jednej strony istotną rolę może odgrywać stymulujący wpływ oreksyn na współczulny układ nerwowy oraz zwiększenie aktywności motorycznej (86). Jednak wzrost wydatkowania energii przez oreksyny ma miejsce także u szczurów podczas anestezji, dlatego efekty oreksyn rozciągają się również poza zwiększanie aktywności motorycznej (87). Najnowsze wyniki ujawniły, że kolejnym celem oreksyn w regulacji metabolizmu i homeostazy

energetycznej jest brunatna tkanka tłuszczowa. U myszy nokaut preprooreksyny przejawia się otyłością oraz zmniejszoną zawartością brunatnej tkanki tłuszczowej. Potwierdzono, że oreksyna jest niezbędna do różnicowania brunatnych preadipocytów oraz reguluje funkcje dojrzałych brunatnych adipocytów (88). Związek pomiędzy otyłością a niedoborem brunatnej tkanki tłuszczowej wynika najprawdopodobniej ze zdolności brunatnych adipocytów do generowania energii cieplnej. W sytuacji niedoboru brunatnej tkanki tłuszczowej dochodzi do zachwiania bilansu energetycznego. Nadmiar energii, która nie może być przekształcona w energię ciepłą akumulowany jest w postaci triacylogliceroli w żółtej tkance tłuszczowej prowadząc do wzrostu masy ciała (88). Rola oreksyn w funkcjach brunatnej tkanki tłuszczowej jest zagadnieniem wymagającym dalszej weryfikacji.

Znaczna część wyników dowodzi, że regulując homeostazę energetyczną oreksyny oraz ich receptory są zaangażowane bezpośrednio w regulację insulinowrażliwości oraz metabolizm i homeostazę glukozy.

2.9 Rola oreksyn w regulacji insulinowrażliwości

Myszy z nokautem genu preprooreksyny wraz z wiekiem wykazują nietolerancję glukozy, insulinooporność i podwyższoną masę ciała (89). Poszukując źródła tych nieprawidłowości zaobserwowano, że oreksyna reguluje insulinowrażliwość w podwzgórze. Egzekucja sygnału receptora insuliny oraz jej funkcjonalne konsekwencje następują głównie w wyniku aktywacji szlaków kinazy 3-fosfatydyloinozytolu/kinaza białkowa B (PI3-K/PKB) (90). Utrzymanie prawidłowej insulinowrażliwości jest ważne nie tylko w tkankach obwodowych, ale również w podwzgórze. Prawidłowa wrażliwość na insulinę w podwzgórze konieczna jest do hamowania wątrobowej glukoneogenezy. Obniżenie insulinowrażliwości w podwzgórze przekłada się na umiarkowaną insulinooporność w całym organizmie oraz związane jest z występowaniem otyłości (91). Myszy z nokautem preprooreksyny wykazują w podwzgórze podwyższony poziom serynowej fosforylacji kinazy białkowej B (PKB) oraz spadek stymulowanej przez insulinę fosforylacji treoninowej (89). Podwyższona fosforylacja serynowa PKB odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w ujemnym sprzężeniu zwrotnym, które prowadzi do wyhamowania aktywności receptora insuliny uniemożliwiając fosforylację w obrębie treoniny powodując insulinooporność (89, 92). Warto również odnotować, że receptory oreksyn mogą być zaangażowane w regulację poziomu glukozy przez aktywację kinazy

białkowej C (PKC), która wpływa na obniżanie syntezy glukozy w wątrobie i tym samym przeciwdziała hiperglikemii (92).

Molekularna interakcja pomiędzy receptorami oreksyn a receptorem insuliny na poziomie podwzgórza nie jest jeszcze scharakteryzowana. Doszukując się jednak związku pomiędzy systemem oreksynowym i obniżoną insulinowrażliwością, wydaje się, że może on wynikać z postępującego z wiekiem spadku ekspresji OXR1 i OXR2 w podwzgórzu. Według dostępnej literatury główną rolę w regulacji insulinowrażliwości oraz przeciwdziałaniu otyłości odgrywa OXR2. Mechanizm działania OXR2 w tym zakresie pozostaje w znacznej mierze niepoznany, przypuszcza się jednak, że jego aktywacja może uwrażliwiać komórki na leptynę (73). Ponadto istotne mogą być również wpływy oreksyn na homeostazę glukozy.

2.10 Wpływ oreksyn na homeostazę glukozy

Poziom glukozy we krwi jest precyzyjnie regulowany przez wiele czynników. Jednak najistotniejszą rolę odgrywają insulina i glukagon, które są wydzielane odpowiednio z komórek α i β wysp trzustkowych w odpowiedzi na zmiany w stężeniu glukozy we krwi (93, 94).

Dane na temat roli oreksyn oraz ich receptorów w regulacji funkcji wydzielniczych wysp trzustkowych pochodzą głównie z badań prowadzonych nad gryzoniami. U szczura w endokrynej części trzustki obecność OXR1 i OXR2 odnotowano na poziomie mRNA (95), natomiast jedynie w przypadku OXR1 ekspresję potwierdzono na poziomie białka (96). Dlatego też wydaje się, że to właśnie pierwszy typ receptora oreksyn reguluje funkcje endokryne wysp trzustkowych. OXR1 wykazuje kolokalizację z insuliną i glukagonem (97, 98). W komórkach endokrynych wysp trzustkowych dochodzi również do ekspresji i wydzielania oreksyny A. OXA wydzielana jest w odpowiedzi na niskie stężenie glukozy (2,8 mM), natomiast wysokie stężenie glukozy (16,7 mM) hamuje wydzielanie oreksyny A z wysp trzustkowych (97). Otrzymane rezultaty badań wskazały również na glukagon jako czynnik, który hamuje sekrecję OXA z wysp trzustkowych¹. Rola oreksyn w regulacji sekrecji insuliny jest niejasna. Dowiedziono, że u szczura podskórna iniekcja oreksyny A i w mniejszym stopniu oreksyny B powoduje wzrost stężenia insuliny we krwi (99, 100). Stymulujący wpływ OXA i OXB na sekrecję insuliny potwierdzono również w układzie *in situ* z użyciem metody perfuzji trzustek oraz *in vitro* podczas inkubacji izolowanych wysp

¹ Nieopublikowane wyniki zespołów prof. M.Z. Strowskiego i prof. K.W. Nowaka

(95). Jednak odmienne rezultaty dowiodły, że OXA nie ma wpływu na sekrecję insuliny (101) lub hamuje jej wydzielanie z komórek β wysp trzustkowych (97). Wyniki dotyczące roli OXA w regulacji glukagonu są bardziej, ale nie do końca jednorodne. Wykazano, że OXA hamuje sekrecję glukagonu z izolowanych wysp i linii komórek α (96). Trzeba jednak odnotować, że są również dostępne dane, które dowodzą, że OXA stymuluje sekrecję glukagonu z wysp trzustkowych (97). Określenie roli oreksyn oraz OXR1 w endokrynnej funkcji trzustki, szczególnie w komórkach β jest zagadnieniem otwartym i wymaga dalszych badań.

2.11 Oreksyny w regulacji funkcji tkanek obwodowych

Oreksyn nie należy postrzegać jedynie jako klasycznych neurohormonów. Oreksyna A w stężeniu od 10^{-12} do 10^{-11} mol/l obecna jest również we krwi obwodowej, co dowodzi endokrynnej drogi działania tego peptydu. Jednak stopień w jakim OXA wywiera wpływ na tkanki obwodowe pozostaje w znacznej mierze niejasny. Z jednej strony wykazano, że OXA już w stężeniach pikomolarnych aktywuje zarówno OXR1 i OXR2, co przekłada się na zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. Z drugiej strony odmienne badania dowodzą, że minimalne stężenie ligandu aktywujące OXR1 wynosi około 10^{-8} mol/l. Najważniejsze źródło OXA we krwi obwodowej nie zostało zidentyfikowane. Wiadomo jednak, że oreksyna jest syntetyzowana w komórkach endokrynych przewodu pokarmowego, układu rozrodczego i trzustki, może być również uwalniana z zakończeń nerwowych (92). Warto wspomnieć, że OXA zdolna jest do pokonywania bariery krew-mózg (52). Tak jak już zaznaczono OXR1 i OXR2 ulegają ekspresji w wyspach trzustkowych, jednak tkanek peryferyjnych, w których zachodzi ekspresja receptorów oreksyn jest więcej. OXR1 i OXR2 zidentyfikowano między innymi w nadnerczach, układzie rozrodczym, układzie pokarmowym oraz żółtej i brunatnej tkance tłuszczowej (88, 102). Duża część danych odnośnie roli oreksyn na obwodzie pochodzi z badań nad nadnerczami. Oreksyny są zaangażowane w regulację uwalniania hormonów kory nadnerczy na dwóch poziomach: działając na osi podwzgórze-przysadka oraz bezpośrednio na obwodzie w korze nadnerczy (103, 104). U szczura dokomorowe podanie oreksyny A i B powoduje wzrost stężenia ACTH oraz kortykosterydów we krwi (105). Podobne efekty zaobserwowano w układzie *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich komórek kory nadnerczy, gdzie na drodze aktywacji OXR1, oreksyna A stymuluje sekrecję kortyzolu (106). Dostępne

dane sugerują, że oreksyna A stymuluje sekrecję adrenaliny i noradrenaliny z rdzenia nadnerczy (107).

W układzie pokarmowym ekspresję preprooreksyny oraz OXR1 i OXR2 wykryto w zakończeniach nerwowych unerwiających mięśniówkę i śluzówkę jelita, ale także w komórkach endokrynych żołądka i jelita (108). W układzie pokarmowym system oreksynowy zaangażowany jest głównie w regulację motoryki żołądka i jelit oraz w transport glukozy z jelita cienkiego (109).

Ponadto w tkankach obwodowych receptory oreksyn mogą odgrywać pewną rolę w regulacji proliferacji i apoptozie komórek. Z jednej strony silnie proapoptotyczne efekty OXA opisano w komórkach nowotworowych (110), z drugiej strony działając na preadipocyty 3T3-L1 oreksyna A stymuluje ich proliferację (111). Mając na uwadze problem cukrzycy, interesujące jest poznanie roli OXR1 w proliferacji komórek β wysp trzustkowych. Wiadomo, że u szczurów z cukrzycą typu 1 i 2 ekspresja OXR1 w komórkach endokrynych trzustki znacząco wzrasta oraz wykazuje koekspresję z aktywną kaspazą 3 (98). Podłoże i znaczenie tego zjawiska są jednak nieznanne, nie wiadomo zatem czy w komórkach β aktywacja OXR1 ma działanie ochronne czy też związana jest z indukcją apoptozy.

Receptory oreksyn wykryto również w ludzkiej tkance tłuszczowej. Do tej pory wiadomo, że działając na ludzkie adipocyty OXA zwiększa ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2 oraz hamuje lipolizę (112). Czynnikiem transkrypcyjnym PPAR γ 2 odgrywa bardzo istotną rolę w różnicowaniu preadipocytów i metabolizmie dojrzałych adipocytów, a jego aktywacja to istotny cel w terapii cukrzycy typu 2 (113). Dlatego też mając na uwadze te i pozostałe rezultaty dotyczące wpływu oreksyny A na homeostazę energetyczną i metabolizm, detaliczne określenie roli OXA w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej jest istotnym i rozsądnym zadaniem.

3 Hipoteza badawcza i cele pracy

Formując hipotezę badawczą założono, że oreksyna A wpływa na metabolizm lipidowo-węglowodanowy oraz funkcje endokryne tkanki tłuszczowej. Przesłanką do postawienia takiej hipotezy były opublikowane wcześniej wyniki wykazujące, że OXA jest zaangażowana w regulację masy ciała oraz homeostazy energetycznej organizmu. Zaburzenia w systemie oreksynowym związane są z występowaniem narkolepsji, której bardzo często towarzyszy otyłość oraz predyspozycje w kierunku rozwoju cukrzycy typu 2. Ponadto ludzi otyłych charakteryzuje obniżony poziom oreksyny A. Z drugiej strony nadekspresja oreksyny związana jest z poprawą insulinowrażliwości oraz przeciwdziała wzrostowi masy ciała u myszy na diecie wysokotłuszczowej. Ponieważ zarówno regulacja masy ciała jak i insulinowrażliwość w bardzo dużym stopniu związane są z regulacją ilości oraz endokrynych i metabolicznych funkcji tkanki tłuszczowej, w pracy postanowiono scharakteryzować w jaki sposób OXA wpływa na adipocyty. Wybór tematyki badawczej związany był również z tym, że część danych dowodzi bezpośrednich wpływów oreksyny A na tkankę tłuszczową. W adipocytach izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej OXA hamuje lipolizę oraz stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ , którego aktywacja związana jest ze zwiększeniem insulinowrażliwości.

W pracy postawiono następujące cele:

- i. analiza ekspresji receptorów oreksyn w adipocytach 3T3-L1 oraz izolowanych adipocytach szczura
- ii. określenie wpływu oreksyny A na dokomórkowy transport glukozy oraz jej konwersji do kwasów tłuszczowych
- iii. określenie wpływu oreksyny A na akumulację triacylogliceroli i lipolizę
- iv. określenie roli oreksyny A w ekspresji i sekrecji adiponektyny
- v. próba poznania mechanizmów odpowiedzialnych za ewentualne wpływy oreksyny A na metaboliczne i endokryne funkcje adipocytów
- vi. poznanie wpływu oreksyny A na masę ciała oraz poziom adiponektyny u szczurów (model *in vivo*)

4 Materiały i metody

4.1 Bufory

| | |
|----------------------------|---|
| KRBH: | NaCl (136 mmol/l), KCl (4,7 mmol/l), CaCl ₂ (1 mmol/l), MgSO ₄ (1,2 mmol/l), KH ₂ PO ₄ (1,2 mmol/l), NaHCO ₃ (2 mmol/l), Hepes (10 mmol/l), pH 7,4 |
| RIPA : | Tris-HCL (50 mmol/l, pH 8,0), NaCl (150 mmol/l), 1.0% NP-40, 0,5% deoksycholesterol sodu, 0.1% SDS, NaF (10 mmol/l), Na ₃ (VO ₄) (1 mmol/l) |
| TBST : | Tris-HCl (15,37 mmol/l), NaCl (137 mmol/l), 0,2% Tween 20, pH 7,6 |
| PBS : | NaCl (137 mmol/l), KCl (2,7 mmol/l), Na ₂ HPO ₄ (10 mmol/l), KH ₂ PO ₄ (2 mmol/l), pH 7,2 |
| SDS-PAGE: | Tris (25 mmol/l), glicyna (192 mmol/l), 0,1% SDS, pH 8,3 |
| Bufor do elektrotransferu: | Tris (12 mmol/l), glicyna (96 mmol/l), 20% metanol, pH 8,3 |
| Bufor stripujący: | glicyna (200 mmol/l), 0,1% SDS, 1% Tween 20, pH 2,2 |
| Bufor Laemmli (4x): | 8% SDS, 20% 2-merkaptoetanol, 40% glicerol, 0.004% błękit bromofenolu, Tris-HCl (0,3 mol/l) |

4.2 Zwierzęta

W eksperymentach określających wpływ OXA na izolowane adipocyty oraz przy przewlekłym doświadczeniu z pompami osmotycznymi wykorzystano samce szczurów szczepu Wistar. Zwierzęta pochodziły z hodowli zwierząt laboratoryjnych w Brwinowie. Po zakupie zwierzęta umieszczono w klatkach i utrzymywano w pomieszczeniu Katedry Fizjologii i Biochemii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Przed wykonaniem eksperymentów szczury poddano okresowi adaptacyjnemu (minimum 2 tygodnie). W tym czasie, szczury miały nieograniczony dostęp do wody oraz paszy bytowej Labofed B (A. Morawski, Kcynia). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Poznaniu.

4.3 Kultury komórkowe

Kultury komórkowe prowadzono w inkubatorze do hodowli komórkowych (Labotect, Labor-Technik-Göttingen, Göttingen, Niemcy) w monitorowanych warunkach środowiskowych (95% O₂, 5% CO₂, 37°C, stała wilgotność). W eksperymentach wykorzystano linię komórkową mysich fibroblastów 3T3-L1 pozyskaną z ATCC (LGC Standards, Wesel, Niemcy). Standardowe medium stosowane podczas hodowli to Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) uzupełnione w 10% płodową surowicę bydlęcą (FCS), penicylinę (100 kU/l) oraz streptomycynę (100 mg/l). Zmiany medium oraz pasażowanie komórek przeprowadzano co 48 - 72 h. Pasaże wykonywano stosując 0,05% roztwór trypsyny w PBS uzupełnionym w 0,02% EDTA. Wszystkie eksperymenty wykonano na komórkach pomiędzy 3 a 12 pasażem.

4.4 Różnicowanie preadipocytów 3T3-L1

Fibroblasty 3T3-L1 posiano i utrzymywano w hodowli stosując standardowe medium wzrostowe (DMEM, 10% FCS) do momentu uzyskania 100% konfluencji. Dwa dni od momentu osiągnięcia pełnej konfluencji fibroblasty indukowano w kierunku różnicowania w adipocyty. Postępowano zgodnie z powszechnie stosowanym protokołem (114). W tym celu medium wzrostowe zostało dodatkowo uzupełnione w 1 mmol/l deksametazon, 0,5 mmol/l IBMX oraz 168 nmol/l insuliny. Po upływie kolejnych 48 godzin medium zastąpiono świeżym medium zawierającym insuliny w stężeniu 168 nmol/l. Po kolejnych 48 godzinach medium zastąpiono medium wzrostowym. Powodzenie procesu różnicowania weryfikowano na podstawie poziomu ekspresji mRNA kodującego FABP4 oraz zmian morfologicznych. We wszystkich przypadkach zaobserwowano więcej niż 80% morfologicznie zróżnicowanych adipocytów. Wszystkie eksperymenty wykonano pomiędzy 6 a 10 dniem od momentu indukcji adipogenezy.

4.5 Izolacja adipocytów

Adipocyty izolowano opierając się o protokół opublikowany przez Robbel'a (115) z kilkoma modyfikacjami. Do izolacji wykorzystano tkankę tłuszczową okołojądrową pobraną od szczurów szczepu Wistar. Pobraną od zdekapitowanych wcześniej 3 szczurów tkankę tłuszczową oczyszczono z naczyń krwionośnych, osuszono, rozdrobniono, po czym poddano ją procesowi trawienia kolagenu. W tym celu pofragmentowaną tkankę tłuszczową umieszczono w buforze KRBH uzupełnionym w

3% BSA, 5 mmol/l glukozę oraz typ II kolagenazy (3 mg/ml). Proces trawienia prowadzono w temperaturze 37°C przez 45 min. Następnie adipocyty przefiltrowano przez sitko nylonowe (średnica oczka 250 µm) oraz trzykrotnie przepłukano w KRBH. Komórki liczone używając komory Bürkera-Tükera.

4.6 Stymulacja oreksyną A oraz innymi badanymi czynnikami

W przypadku adipocytów 3T3-L1 zawsze przed podaniem oreksyny A bądź innych badanych czynników komórki inkubowano przez minimum 4 godziny w standardowym medium pozbawionym FCS. Uwaga ta będzie pominięta w dalszej części pracy. Celem zabiegu było wyeliminowanie wpływu innych czynników hormonalnych zawartych w surowicy. W przypadku gdy komórki inkubowano z odczynnikami, które rozpuszczono w DMSO (LY 294002, BADGE) grupę kontrolną oraz grupy pozbawione tego czynnika inkubowano w medium, które również uzupełniono DMSO. Miało to na celu wyrównanie ewentualnego efektu nośnika jakim było DMSO. Dodatkowo medium przeznaczone do stymulacji oreksyną A (lub innymi czynnikami) uzupełniono w 0,1% pozbawioną kwasów tłuszczowych surowiczą albuminę wołową (BSA). Celem zabiegu było zwiększenie stabilności peptydów oraz ograniczenie ich ewentualnego wiązania do powierzchni naczyń hodowlanych. Jeśli pominięto w metodyce, czasy ekspozycji i stężenia badanych czynników podano w legendzie rycin w rozdziale wyniki.

4.7 Transport glukozy

4.7.1 Adipocyty 3T3-L1

We wszystkich eksperymentach dotyczących roli oreksyny A w transporcie glukozy wykorzystano adipocyty różnicowane na płytkach 24-dołkowych. Zróżnicowane adipocyty przepłukano dwukrotnie w PBS oraz inkubowano w buforze KRBH uzupełnionym w 0,1% BSA. Po 15 minutach KRBH usunięto i dodano 225 µl tego samego buforu zawierającego różne stężenia oreksyny A, po czym inkubowano od 10 do 60 min. Kolejno do każdego dołka dodano 25 µl KRBH zawierającego 0,5 µCi 2-deoksy-³H-glukozy (18,5 µBq) oraz 2-deoksy-glukozę (ostateczne stężenie wynosiło 0,5 mmol/l). Po upływie 5 min (czas ten wybrano jako punkt, w którym transport zachowuje charakter liniowy) transport przerywano przez odessanie buforu oraz trzykrotne płukanie lodowatym PBS. Następnie komórki poddano lizie w 400 µl 0,1% SDS (10 min, delikatnie wytrząsając). Zawartość każdego dołka przeniesiono do 1,5 ml probówki i przez około 10 s intensywnie worteksowano. 350 µl lizatu przeniesiono do

naczynia scyntylicyjnego i zmieszano z 3,5 ml płynu scyntylicyjnego. Poziom transportu glukozy oznaczono mierząc poziom promieniowania β na podstawie liczby cpm (ang. counts per minute). Do odczytu wykorzystano licznik Wallac 1409 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Wartości cpm znormalizowano do zawartości białka (cpm/ μ g białka) oraz przedstawiono jako procent kontroli (grupy, której nie stymulowano oreksyną A).

4.7.2 Izolowane adipocyty

Wyizolowane adipocyty w ilości 10^6 zawieszono i inkubowano w 1 ml buforu KRBH uzupełnionego w oreksynę A (100 nmol/l) lub insulinę (10 nmol/l). Inkubację prowadzono przez 30 min w temperaturze 37°C w łaźni wodnej delikatnie mieszając. Pomiar transportu przeprowadzono w oparciu o wcześniej opublikowaną metodykę z kilkoma modyfikacjami (116). Po zakończonej stymulacji peptydami do każdej próbki dodano 0,5 μ Ci 2-deoksy- 3 H-glukozy (18,5 μ Bq). Po 4 min transport zatrzymano dodając lodowaty bufor KRBH zawierający cytochalazynę B (ostateczne stężenie wynosiło 0,2 mmol/l). Zawartość przeniesiono do świeżych próbek zawierających 200 μ l oleju silikonowego. Probówki następnie wirowano przez 1 min, (6000 x g). Pozwoliło to na odseparowanie adipocytów od medium inkubacyjnego. Następnie komórki znajdujące się w górnej warstwie oleju silikonowego przepipetowano do naczyń scyntylicyjnych zawierających 3 ml płynu scyntylicyjnego. Poziom transportu glukozy oznaczono mierząc poziom promieniowania β . Do odczytu wykorzystano licznik Wallac 1409 (Perkin Elmer).

4.8 Pomiar ATP

Przed stymulacją OXA i wykonaniem pomiaru ATP zróżnicowane na 12-dółkowej płytce adipocyty 3T3-L1 inkubowano przez noc w medium DMEM pozbawionym surowicy oraz uzupełnionym w 5 mmol/l glukozę. Inkubację w obecności OXA prowadzono w tym samym medium przez 15, 30, 60 i 120 min. Zawartość ATP w komórkach mierzono przy użyciu zestawu odczynników ATP Determination Kit (Life Technologies, Darmstadt, Niemcy). Detekcja ATP opiera się o reakcję dostarczonej przez producenta lucyferyny z ATP i cząsteczką O_2 . Reakcja jest katalizowana przez lucyferazę i towarzyszy jej luminescencja, której intensywność odpowiada zawartości ATP. Całość przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta. Do pomiaru luminescencji zastosowano Luminometer MicroLumat Plus LB 96V Berthold

Technologies (Wildbad, Niemcy). Ilość ATP szacowano z krzywej standardowej wyznaczonej w oparciu o wcześniej przygotowane znane stężenia ATP i znormalizowano do zawartości białka.

4.9 Lipogeneza (synteza kwasów tłuszczowych)

Metoda polega na analizie inkorporacji atomów węgla cząsteczek glukozy do wolnych kwasów tłuszczowych. W tym celu wykorzystuje się wyznakowaną izotopem węgla ^{14}C glukozę. Z wyjątkiem kilku modyfikacji postępowano zgodnie z wcześniej opublikowaną metodyką (117). Pozyskane w wyniku izolacji adipocyty w ilości 10^6 inkubowano w objętości 500 μl buforu KRBH. Bufor uzupełniono w 2,5 μCi wyznakowanej izotopem węgla ^{14}C glukozy. Inkubację prowadzono w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 120 min delikatnie mieszając. Następnie w celu ekstrakcji frakcji lipidowej do każdej z probówek dodano 2,4 ml lodowatej mieszaniny Dole'a (izopropanol 40 cz. : heptan 10 cz. : 1 N H_2SO_4 1 cz.), próby intensywnie mieszano. Kolejno do każdej probówki napipetowano 1 ml wody i 1,5 ml heptanu i ponownie mieszano. Otrzymaną w ten sposób górną warstwę w objętości około 2 ml pobrano i przeniesiono do naczyń scyntylicyjnych mieszając z 8 ml płynu scyntylicyjnego. Ilość pochodzącego z glukozy izotopu węgla ^{14}C wbudowanego w kwasy tłuszczowe mierzono za pomocą odczytu promieniowania beta. Zastosowano licznik Wallac 1409 (Perkin Elmer).

4.10 Wpływ oreksyny A na akumulację triacylogliceroli

4.10.1 Barwienie roztworem czerwieni olejowej

Metoda polega na zastosowaniu roztworu czerwieni olejowej, która jest wiązana przez triacyloglicerole. Zróżnicowane w 12-dołkowej płytce adipocyty 3T3-L1 przez 24 lub 48 h inkubowano w medium uzupełnionym w oreksynę A (1-100 nmol/l), insulinę (10 nmol/l) lub równocześnie w oba peptydy (100 nmol/l OXA, 10 nmol/l insulina). Po upływie czasu inkubacji usunięto medium, komórki płukano w PBS, po czym poddano je procesowi utrwalenia przez dodanie do każdego dołka 1 ml 10% roztworu paraformaldehydu w PBS. Po upływie 1 h komórki przepłukano w 1 ml 60% izopropanolu, który następnie dokładnie usunięto, a komórki pozostawiono do całkowitego wyschnięcia. Kolejno do każdego dołka dodano 400 μl roztworu czerwieni olejowej (2,1 mg/ml w mieszaninie izopropanol:woda 6:4). Po 30 minutach roztwór barwiący usunięto, a komórki poddano płukaniu w wodzie destylowanej (krok

powtórzono czterokrotnie). Po całkowitym osuszeniu komórek wybrane preparaty sfotografowano (użyto powiększenie 400 x). W tym celu wykorzystano mikroskop Axiophot (Zeiss Oberkochen, Niemcy), przy użyciu kamery Digital AxioCam HRc (Zeiss). Następnie w celu elucji czerwieni olejowej z frakcji lipidowej komórek do każdego z dołków dodano 1,5 ml 100% izopropanolu i inkubowano 10 min. Izopropanol przeniesiono do świeżej 1,5 ml próbówki i dokładnie worteksowano. Następnie z każdej z próbek pobrano 100 µl izopropanolu i napipetowano go do płytki 96-dółkowej. Ocenę ilości związanej czerwieni olejowej mierzono na podstawie intensywności zabarwienia, która koresponduje do ilości wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli. Pomiar wykonano wykorzystując czytnik płytek SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices, Ismaning, Niemcy) przy długości fali 500 nm.

4.10.2 Oznaczenie zawartości triacylogliceroli

Adipocyty 3T3-L1 różnicowano na płytkach 24-dółkowych. Po zakończonym eksperymencie komórki przepłukano w lodowatym PBS. Następnie do każdego z dołków napipetowano 200 µl buforu zawierającego Tris-HCl (50 mmol/l, pH 7,4) oraz EDTA (1 mmol/l). Po dodaniu buforu komórki zdrapano i przeniesiono do 1,5 ml próbówki oraz umieszczono na lodzie. Następnie zawieszono w buforze komórki poddano procesowi homogenizacji przez sonikację. Tak przygotowane preparaty przeznaczono do pomiaru triacylogliceroli. W tym celu wykorzystano zestaw odczynników Colorimetric Triacylglycerol Kit (Cypress Diagnostics, Langdorp, Belgia). Metoda polega na hydrolizie triacylogliceroli do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych przez lipazę. Następnie glicerol podlega fosforylacji do 3-fosfoglicerynianu przez kinazę glicerolu. Związek ten jest następnie metabolizowany do dihydroksyacetonu, czemu towarzyszy powstanie cząsteczki H₂O₂ (enzymem katalizującym jest oksydaza 3-fosfoglicerynianu). H₂O₂ wykrywana jest w reakcji chemicznej, której towarzyszy powstawanie czerwonego zabarwienia, osiągającego maximum absorpcji przy 505 nm. Odczytu dokonano spektrofotometrycznie wykorzystując czytnik płytek SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices). Całość pomiaru wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, modyfikując jednak pewne etapy pod kątem wykorzystania płytki 96-dółkowej. W tym celu 10 µl roztworu poddanych homogenizacji komórek zmieszano z 90 µl mieszaniny reakcyjnej. Ilość triacylogliceroli szacowano na podstawie równania regresji liniowej z krzywej

standardowej. Wykorzystano 4 punkty o znanej koncentracji triacylogliceroli. Otrzymane wartości normalizowano do zawartości białka (oznaczonego w tych samych próbach przy pomocy metody BCA) i przedstawiono jako mg triacylogliceroli na mg białka.

4.11 Oznaczenie lipolizy

Eksperymenty określające wpływ badanych czynników na lipolizę mierzoną jako ilość uwolnionego glicerolu wykonano na adipocytach zróżnicowanych na płytkach 24-dółkowych. Po 24 h stymulacji badanymi czynnikami (100 nmol/l OXA lub 10 nmol/l insuliny), medium komórkowe w ilości 800 μ l pobrano i poddano wirowaniu (10 min, 800 x g). Celem zabiegu było odseparowanie komórek, które mogły znajdować się w medium. 600 μ l otrzymanego supernatantu pobrano i przeniesiono do nowej probówki. Komórki pozostałe na płytce przepłukano lodowatym PBS oraz poddano lizie w 200 μ l 0,1% SDS. Celem lizy komórek było późniejsze określenie zawartości białka i znormalizowanie wobec niego ilości uwolnionego glicerolu do pobranego wcześniej medium komórkowego. Ilość uwolnionego glicerolu mierzono przy pomocy Free Glycerol Reagent (Sigma Aldrich, Deisenhofen Niemcy). Metoda polega na szeregu reakcji enzymatycznych zachodzących przy udziale zawartych w odczynnikach enzymów. W pierwszym kroku wolny glicerol ulega fosforylacji z wytworzeniem cząsteczki 1-fosfoglicerynianu (G-1-P) oraz ADP. Reakcję katalizuje kinaza glicerolu. Następnie G-1-P jest utleniany do fosfodihydroksacetonu. Reakcję katalizuje oksydaza fosfoglicerynianu, reakcji tej towarzyszy powstanie cząsteczki H₂O₂. Ostatecznie z udziałem powstałej H₂O₂ i peroksydazy oraz substratów dostarczonych przez producenta dochodzi do reakcji, w wyniku której powstaje charakterystyczne fioletowe zabarwienie (maksimum absorpcji przy długości fali 540 nm). Intensywność zabarwienia odpowiada ilości zawartego w mieszaninie reakcyjnej glicerolu. Oznaczenie wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, adaptując jednak protokół do płytki 96-dółkowej. W tym celu 20 μ l pobranego medium zmieszano z 80 μ l zawartej w zestawie mieszaniny odczynników i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Odczyt spektrofotometryczny przeprowadzono przy użyciu czytnika SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices). Ilość glicerolu szacowano z wykonanej krzywej standardowej (jako standard użyto 6 różnych koncentracji glicerolu). Wyniki znormalizowano do zawartości białka (μ g glicerolu/ μ g białka).

4.12 Oznaczenie PIP3

Zróznicowane na 6-dołkowych płytkach adipocyty stymulowano przez 5 min medium uzupełnionym w oreksynę A (100 nmol/l) lub insulinę (10 nmol/l). Następnie usunięto medium inkubacyjne, płytki z komórkami umieszczono na lodzie przeznaczając do pomiaru ilości PIP3. W tym celu wykorzystano zestaw odczynników PIP3 Mass ELISA (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA). Lipidy ekstrahowano opierając się o zmodyfikowaną metodykę Gray'a (118). Pierwszym krokiem było pozyskanie frakcji lipidowej zawierającej PIP3. W tym celu do każdego z dołków napipetowano 350 μ l zimnego 0,5 M kwasu trichlorooctowego (TCA), po czym płytkę przez 5 min inkubowano na lodzie. Następnie komórki zdrapano i przeniesiono do świeżej probówki. W obrębie tych samych grup eksperymentalnych komórki pochodzące z trzech dołków pulowano w jednej probówce. Następnie probówki poddano wirowaniu (3000 x g, 5 min, 4°C). Supernatant usunięto, a otrzymany osad rozpuszczono w 3 ml 1 mmol/l EDTA w 5% TCA i poddano kolejnemu wirowaniu (3000 x g, 5 min, 4°C). Po zwirowaniu supernatant usunięto i powtórzono ostatni krok. Następnie otrzymany osad rozpuszczono w 3 ml mieszaniny metanolu z chloroformem (w stosunku 2:1) i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej okazjonalnie bardzo intensywnie mieszając. Następnie probówki wirowano (3000 x g, 5 min), supernatant usunięto. Krok powtórzono. W celu ekstrakcji kwaśnych lipidów powstały po zwirowaniu osad rozpuszczono w 2,25 ml mieszaniny metanol:chloroform:kwas solny (80:40:1), probówki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej okazjonalnie mieszając. Kolejno probówki wirowano (3000 x g, 5 min, 4°C). Powstały supernatant przeniesiono do świeżych probówek, po czym do każdej napipetowano 0,75 ml chloroformu oraz 1,35 ml 0,1 mol/l HCl. Fazy organiczną i wodną rozdzielono wirując (1000 x g, 5 min). Dolną organiczną fazę pobrano i poddano suszeniu stosując wirówkę próżniową. Otrzymaną frakcję lipidową rozpuszczono w 70 μ l dostarczonego przez producenta buforu, sonikowano i przechowywano w temperaturze -20°C.

Koncentracje PIP3 mierzono wykorzystując test immunoenzymatyczny ELISA. W teście tym zawarty w przygotowanym ekstrakcie PIP3 oraz PIP3 znajdujący się w fazie stałej opłaszczonych nim dołków stosowanej do pomiaru 96-dołkowej płytki konkurują o wiązanie ze specyficznym wiążącym je białkiem. Ilość białka związanego przez PIP3 fazy stałej płytki spada wraz ze zwieszającą się koncentracją PIP3 w analizowanym ekstrakcie. Następnie ilość związanego do płytki białka polega detekcji kolometrycznej. W tym celu dodaje się drugorzędowe przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową

oraz substrat reakcji dostarczony przez producenta. Ilość związanego do płytki białka (tym samym intensywność sygnału) odwrotnie koresponduje to stężenia PIP3 w analizowanej próbce. Całą procedurę wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm stosując czytnik płytek SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices).

4.13 Pomiar cAMP

W celu określenia wpływu OXA na poziom syntezy cAMP w adipocytach 3T3-L1, komórki przez 10 min inkubowano z OXA (1-100 nmol/l) lub forskoliną (10 μ mol/l), którą w oparciu o dane literaturowe zastosowano jako kontrolę pozytywną (119). Pomiar wykonano wykorzystując Cyclic AMP EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). Metoda polega na współzawodnictwie wolnego cAMP (pozyskanego z komórek) i cAMP sprzężonym z acetyloholinoesterazą o wiązanie do przeciwciała. Następnie kompleks cAMP-przeciwciało wiązany jest przez kolejne przeciwciało, którym opłaszczony są dołki płytki inkubacyjnej. Ilość cAMP oznaczana jest na podstawie reakcji barwnej z wykorzystaniem substratu do reakcji katalizowanej przez acetylocholinesterazę. Intensywność zabarwienia jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości cAMP w ekstrakcie komórkowym. Wszystkie kroki wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.

4.14 Analiza western blot

4.14.1 Izolacja białka całkowitego oraz frakcji błonowej

Białko całkowite izolowano stosując bufor RIPA. Bufor uzupełniono w inhibitory proteaz i fosfataz: Protease Inhibitor Cocktail oraz Phosphostop (Roche Diagnostics, Penzberg, Niemcy). Po zakończonym eksperymencie, 24-dołkowe płytki z adipocytami umieszczano na lodzie, a komórki płukano w 1 ml lodowatego buforu PBS. Następnie do każdego z dołków dodano 100 μ l lodowatego buforu RIPA, komórki zdrapano oraz przeniesiono do sterylnej 1,5 ml próbówki pozostawiając przez 10 minut na lodzie. Po tym czasie próby wirowano (14 000 x g, 15 min). Supernatanty przeniesiono do świeżych probówek oraz przechowywano w temperaturze -70°C do dalszych analiz (pomiar białka i western blot).

Frakcję błonową wykorzystaną podczas analizy ekspresji receptorów oreksyn oraz translokacji GLUT4 przygotowano stosując ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas Life sciences, Niemcy). W tym celu komórki różnicowano na płytkach

6-dołkowych. Po zakończeniu eksperymentu medium komórkowe usunięto, a do każdego z dołków napipetowano 1,5 ml lodowatego PBS, po czym komórki zdrapano. W obrębie tych samych grup komórki pochodzące z 3 dołków pulowano przenosząc do 15 ml probówki i poddano wirowaniu przez 10 min (800 x g). Kolejno PBS usunięto a pozostały osad komórkowy rozpuszczono w 3 ml dostarczonego przez producenta buforu płuczającego (Cell Wash Solution), wirowanie powtórzono. Następnie bufor usunięto, dodano 1,5 ml tego samego buforu, po czym probówki powtórnie zwirowano. Po wirowaniu bufor usunięto, a osad komórkowy rozpuszczono w 1,5 ml dostarczonego przez producenta buforu lizującego (Cell Permeabilization Buffer). Probówki worteksowano i następnie inkubowano przez 10 min jednocześnie wytrząsając (1400 rpm) w temperaturze 4°C. Po zakończonej inkubacji probówki poddano kolejnemu wirowaniu (16000 x g, 15 min, 4°C). Następnie supernatant zawierający frakcję białek cytoplazmatycznych usunięto, osad rozpuszczono w 1 ml lodowatego buforu przeznaczonego do ekstrakcji białek błonowych (Membrane Protein Extraction Buffer). Probówki przez 30 min inkubowano intensywnie wytrząsając (4°C, 1400 rpm). Po tym czasie próby poddano wirowaniu (1600 x g, 15 min, 4°C). Po zwirowaniu supernatant zawierający białka błonowe przeniesiono do świeżych 1,5 ml probówek i przechowywano w temperaturze -70°C. Producent nie podaje składników wchodzących w skład buforów, dlatego i w tej pracy nie zostały one zawarte.

4.14.2 Pomiar koncentracji białka

Pomiar białka wykonano przy zastosowaniu zmienionej metody biuretowej opartej o wykorzystanie kwasu bis-cynchoninowego (BCA). W tym celu użyto zestawu odczynników BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Na płytkę 96-dołkową napipetowano 5 µl otrzymanego lizatu białkowego oraz dodano 95 µl mieszaniny odczynników A i B (zmieszanych w stosunku 1:50), następnie płytkę inkubowano przez ok 30 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie płytkę doprowadzano do temperatury pokojowej oraz wykorzystując czytnik płytek SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices) poddano odczytowi spektrofotometrycznemu (długość fali 562 nm). Koncentrację białka szacowano w oparciu o równanie regresji liniowej na podstawie wykonanej w tym czasie krzywej standardowej (jako standard użyto 6 różnych koncentracji BSA).

4.14.3 Rozdział elektroforetyczny oraz transfer na membranę

Taką samą ilość białka (5 μg w przypadku frakcji błonowej oraz 25 μg w przypadku zastosowania buforu RIPA) rozdzielano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym. Przed nałożeniem na żel frakcję białkową mieszano z buforem Laemmli oraz denaturowano przez 5 min w temperaturze 95°C. Denaturacji nie prowadzono jedynie w przypadku analizy białka GLUT4 (zalecenie producenta przeciwciała). Rozdział przeprowadzono na nieciąglym żelu poliakrylamidowym (żel górny 5%, dolny 12%) w obecności buforu SDS-PAGE. Elektroforezę prowadzono przez około 70 min stosując prąd elektryczny o napięciu 125 V. Następnie rozdzielone elektroforetyczne białka poddano transferowi na membranę nitrocelulozową. Wykorzystano transfer mokry w aparacie Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe, Niemcy). Transfer prowadzono przez 60 min stosując natężenie prądu wynoszące 80 mA. Następnie membranę płukano przez około 5 min w TBST. Skuteczność transferu sprawdzano stosując barwienie PonceauS. W tym celu membranę inkubowano przez 30 s w 10 ml roztworu 0,1% PonceauS w 5% kwasie octowym. Następnie związany z białkami PonceauS usuwano przez płukanie w buforze TBST (2 x, 5 min). Kolejno wolne od białek miejsca na membranie blokowano w 5% roztworze BSA w TBST. Blokowanie prowadzono przez 60 min w temperaturze pokojowej. Kolejnym krokiem było płukanie membrany w buforze TBST (5 min). Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym w 12 ml TBST uzupełnionym w 1% BSA. Inkubację z przeciwciałem prowadzono od 16 do 24 h w temperaturze 4°C. W celu równomiernego rozmieszczenia przeciwciała inkubacja odbywała się na kołysce. Stężenia, producentów oraz typy zastosowanych przeciwciał pierwszorzędowych podano w tabeli 3. Kolejnym krokiem było płukanie membrany w TBST przez 15 min. Krok wykonano 3 x, każdorazowo zmieniając TBST. Następnie membranę inkubowano przez 60 min w temperaturze pokojowej z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (tabela 4). Po zakończonej inkubacji membranę płukano w TBST (3 x po 15 min). Do wywołania sygnału chemiluminescencyjnego wykorzystano Enhanced Chemiluminescence Kit (GE Healthcare Europe, Freiburg, Niemcy). W celu uniknięcia przeschnięcia membrany przykryto ją folią plastikową, na której następnie umieszczono kliszę światłoczułą (Agfa, Mortsel, Belgia). Ekspozycję kliszy w zależności od intensywności sygnału prowadzono od 5 s do 10 min. Kliszę wywoływano w aparacie Protec Processor Compact 2 (Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Niemcy). Intensywność sygnału badanych białek analizowano przy

pomocy oprogramowania Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Monachium, Niemcy). Intensywność sygnału normalizowano do β -aktyny lub w przypadku białek ufosforylowanych do całkowitego poziomu analizowanego białka. W tym celu membrany stripowano (usuwano związane przeciwciała). Aby usunąć kompleksy przeciwciał membranę inkubowano w 20 ml buforu stripującego (2 x 10 min). Kolejno membranę płukano 2 x po 10 min w PBS oraz 2 x po 5 min w TBST. Następnie powtórzono blokowanie 5% BSA (60 min w temperaturze pokojowej) i kontynuowano od momentu inkubacji z pierwszorzędowym przeciwciałem identycznie jak opisano wyżej.

Tabela 3. Zestawienie stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych.

| Przeciwciało | Źródło* | Producent | Rozcieńczenie |
|---------------------|----------------|---------------------------|----------------------|
| PPAR γ 2 | K | Abcam | 1:1000 |
| Adiponektyna | K | Abcam | 1:1000 |
| GLUT4 | K | Abcam | 1:2500 |
| AKT | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| pAKT (Thr-308) | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| pAKT (Ser-473) | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| pAS160 (Thr642) | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| PDK1 | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| pPDK1 (Ser241) | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| p85 | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| p85 (Tyr458) | K | Cell Signaling Technology | 1:1000 |
| OXR1 | Ko | Santa Cruz Biotechnology | 1:500 |
| OXR2 | Ko | Santa Cruz Biotechnology | 1:500 |
| β -Actin | M | Sigma Aldrich | 1:5000 |

* **K** – królik, **Ko** – koza, **M** - mysz

Tabela 4. Zestawienie stosowanych przeciwciał drugorzędowych.

| Przeciwciało | Źródło* | Firma | Rozcieńczenie |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------|
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked | Ko | Cell Signaling Technology | 1:5000 |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked | Kń | Cell Signaling Technology | 1:5000 |
| Anti-rabbit Cy3 | Ko | Dianova (Hamburg, Germany) | 1:150 |
| Anti-goat IgG, HRP-linked | O | Santa Cruz Biotechnology | 1:5000 |

* **Ko** – koza, **Kń** – koń, **O** - osioł

4.15 Immunofluorescencja białka GLUT4

W celu określenia wpływu OXA na translokację GLUT4 do błony komórkowej w adipocytach 3T3-L1 posłużono się metodą immunofluorescencji. Adipocyty 3T3-L1 poddano różnicowaniu na płytkach 6-dołkowych, w których przed posianiem komórek umieszczono szkiełka nakrywkowe o średnicy 10 mm. Zróżnicowane adipocyty przygotowano i inkubowano identycznie jak przy określaniu wpływu OXA na transport glukozy. Po zakończonej stymulacji komórki na szkiełkach nakrywkowych utwalono inkubując przez 20 min w 4% roztworze paraformaldehydu, po czym płukano przez 10 min w PBS. Następnie tak przygotowane preparaty przez 30 min blokowano w roztworze 2% BSA w PBS. Po kolejnym płukaniu (10 min w PBS) preparaty inkubowano przez noc z pierwszorzędowym przeciwciałem rozcieńczonym 1:1000 w 1% BSA w PBS. Inkubację prowadzono w temperaturze 4°C. Następnie preparaty poddano płukaniu (10 min w PBS) i inkubowano przez 1 h z przeciwciałem drugorzędowym (anti-rabbit cyanine dye 3) rozcieńczonym 1:150 w 1% BSA w PBS. Po zakończonej inkubacji preparaty płukano (10 min w PBS) i umieszczono na szkiełkach podstawowych wykorzystując Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA). Sygnał wizualizowano stosując mikroskop konfokalny FV-500 (Laser scanning confocal microscope, Olympus, Hamburg, Germany). Zastosowano powiększenie 400 x.

4.16 Analiza ekspresji genów

4.16.1 Izolacja RNA

Adipocyty różnicowano na płytkach 6-dołkowych. Po zakończonym eksperymencie RNA izolowano przy pomocy zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Metoda ta opiera się o izolację na kolumnkach zaopatrzonych w specjalne krzemionkowe membrany wiążące RNA. W pierwszym kroku adipocyty przemyto lodowatym PBS. Następnie do każdego z dołków napipetowano 350 µl buforu lizującego (RLT), pozostawiając płytki na lodzie przez około 5 min. Uzyskane lizaty przeniesiono do sterylnych 1,5 ml probówek i dokładnie wymieszano z 350 µl 75% etanolu. Całość przepipetowano do dostarczonej przez producenta kolumnki umieszczonej w 2 ml probówce i wirowano przez 15 s (8000 x g). Następnie związany na membranie RNA poddano procesowi oczyszczenia z ewentualnego zanieczyszczenia genomowym DNA. W tym celu wykorzystano zestaw odczynników Rnase-Free Dnase

Set (Qiagen) zawierający DNAzę oraz bufor RDD. Procesu eliminacji DNA dokonano przez dodanie na membranę 80 μ l roztworu DNAzy I w dostarczonym przez producenta buforze RDD. Trawienie prowadzono przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do kolumnienek napipetowano 350 μ l buforu RLT i poddano je wirowaniu (15 s, 8000 x g). Następnie do kolumnienek dodano 500 μ l buforu RPE i wirowano (15 s, 8000 x g). Krok powtórzono zwiększając czas wirowania do 2 min. W celu zupełnego oczyszczenia membrany z ewentualnej pozostałości buforów kolumnienki dodatkowo wirowano (1 min, 8000 x g). Po zwirowaniu kolumnienki umieszczono w sterylnych 1,5 ml próbkach. W celu elucji całkowitego RNA związanego na membranie do kolumnienek napipetowano 35 μ l wody wolnej od nukleaz oraz kwasów nukleinowych (dostarczonej przez producenta) i poddano wirowaniu (1 min, 8000 x g). Ilość otrzymanego w ten sposób RNA szacowano na podstawie odczytu absorpcji fali o długości 260 nm. Jakość RNA szacowano ze stosunku odczytów przy długościach 260 i 280 nm. Do odczytów wykorzystano czytnik SpectraMax Plus³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices). Przed pomiarem RNA rozcieńczono (20 x) w 100 μ l użytej do elucji wody. Pomiar przeprowadzono w kwarcowej kuwecie.

4.16.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

cDNA generowano przez zastosowanie zestawu odczynników Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma Aldrich). Synteza przeprowadzana jest przez odwrotną transkryptazę wirusa eAMV (Avian Myeloblastosis Virus). Do syntezy cDNA użyto 1 μ g całkowitego RNA. W pierwszym etapie przeprowadzono denaturację RNA, w tym celu w sterylnej 200 μ l próbówce zmieszano składniki podane w tabeli 5.

Tabela 5. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji.

| Reagent | Ilość |
|--------------|------------------------------|
| RNA | 1 μ g |
| dNTP | 1 μ l (200 μ mol/l) |
| Oligo (dT)23 | 1 μ l (0,4 μ mmol/l) |
| Woda | do 10 μ l |

Tak przygotowane próbówki umieszczono w termocyklerze Tgradient (Biometra, Goettingen, Niemcy) w temperaturze 70°C na 10 min. Następnie próbówki umieszczono na lodzie. Po schłodzeniu poddano wirowaniu (1000 x g, 10 s). Kolejną mieszaninę reakcyjną uzupełniono w składniki podane w tabeli 6.

Tabela 6. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji.

| Reagent | Ilość |
|----------------|--------------------|
| Bufor 10 x | 2 μ l |
| eAVM | 1 μ l (1 unit) |
| inhibitor RNaz | 1 μ l (1 unit) |
| woda | do 20 μ l |

Syntezę prowadzono w temperaturze 50°C przez 50 min w termocyklerze. Po zakończeniu reakcji, próbki schłodzono do 4°C, wirowano (1000 x g, 10 s) i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

4.16.3 Startery reakcji PCR

Sekwencje nukleotydowe analizowanych genów pobrano z bazy NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekwencje starterów reakcji PCR projektowano przy użyciu dostępnych narzędzi Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dodatkowo specyficzność starterów weryfikowano z wykorzystaniem strony UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>).

W miarę możliwości startery projektowano w ten sposób aby amplifikowany fragment zlokalizowany był w 2 eksonach. Sekwencje starterów podano w tabeli 7.

Tabela 7. Sekwencje starterów oraz numery sond użyte w reakcji PCR.

| Gen | Orientacja | Sekwencja | Nr sondy* |
|---|--------------|---------------------------------|-----------|
| OXR1, <i>Mus musculus</i> (nm_198959.2) | sensowna | 5' cttcatcgtggctctggaa 3' | 109 |
| | antysensowna | 5' atggaaggggtccccactac 3' | 89 |
| OXR2, <i>Mus musculus</i> (nm_198962.3) | sensowna | 5' tctggtctttgcaatttgctatc 3' | 113 |
| | antysensowna | 5' tgtgtgtgaacatcccaataact 3' | 112 |
| OXR1, <i>Rattus norvegicus</i> (nm_013064.1) | sensowna | 5' tgctggttttgcactctgt 3' | |
| | antysensowna | 5' gcgaaacatcccaaacactc 3' | |
| OXR2, <i>Rattus norvegicus</i> (nm_013074.1) | sensowna | 5' ggcttatctccaaatattccgtaaa 3' | |
| | antysensowna | 5' ctctgaaccacagaagaagttcc 3' | |
| GAPDH, <i>Rattus norvegicus</i> (ENSRNOT00000025351) | sensowna | 5' ctgcaccaccaactgcttag 3' | |
| | antysensowna | 5' tgatggcatggactgtgg 3' | |
| GAPDDH, <i>Mus musculus</i> (ENSMUST00000073605) | sensowna | 5' atggtgaaggtcggtgtga 3' | |
| | antysensowna | 5' aatctccactttgccactgc 3' | |
| PPAR γ 2, <i>Mus musculus</i> (NM_011146) | sensowna | 5' tttatgctgttatgggtga 3' | |
| | antysensowna | 5' ctgattccgaagtgtgtg 3' | |
| PPAR γ 2, <i>Rattus norvegicus</i> (NM_001145366.1) | sensowna | 5' cgaggaggtcaagaaggg 3' | |
| | antysensowna | 5' aacttggtgggccagaat 3' | |
| HAPRT, <i>Rattus norvegicus</i> (NM_012583) | sensowna | 5' cagtcaacgggggacataaaag 3' | |
| | antysensowna | 5' atttggggctgtactgcttga 3' | |
| HAPRT, <i>Mus musculus</i> (NM_013556.2) | sensowna | 5' cgttgggcttacctcact 3' | |
| | antysensowna | 5' ggtcataacctggttcac 3' | |
| FABP4, <i>Mus musculus</i> (NM_024406.2) | sensowna | 5' tggaagacagctcctcctcg 3' | |
| | antysensowna | 5' aatccccatttacgtgatgatc 3' | |
| ATGLI, <i>Mus musculus</i> (NM_001163689.1) | sensowna | 5' gccccggggtggaacaagat 3' | |
| | antysensowna | 5' aaggtggtgggcaggagtaagg 3' | |
| PLIN 1, <i>Mus musculus</i> (NM_001113471.1) | sensowna | 5' tgctggatggagacctc 3' | |
| | antysensowna | 5' accggctccatgctcca 3' | |
| HSL, <i>Mus musculus</i> (NM_010719.5) | sensowna | 5' ggagcactacaacgcaacg 3' | |
| | antysensowna | 5' gacgacagcacctcaatctcag 3' | |

* w przypadku analizy opartej o sondy

4.16.4 Analiza ekspresji w oparciu o SYBR green

Pomiar ekspresji mRNA analizowanych genów wykonano przy pomocy metody PCR w czasie rzeczywistym. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym polega na detekcji sygnału powstającego produktu PCR w czasie fazy wzrostu wykładniczego i odpowiada liczbie cykli, w której stężenie produktu przekracza linię tła generowaną przez składniki reakcji tzw. punkt odcięcia (C_p , ang. crossing point). Wykorzystano system Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) przy użyciu zestawu odczynników LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Pomiar opiera się o właściwość barwnika SYBR Green, który łącząc się z dwuniciowym DNA emituje sygnał o długości fali 530 nm. Intensywność sygnału koresponduje do ilości powstającego produktu reakcji PCR. Wydajność reakcji wyznaczano z krzywych

sporządzonych przez szereg rozcieńczeń znanej ilości cDNA. Analizę ekspresji wykonano w oparciu o program LightCycler 4.05 (Roche Diagnostics). Poziom ekspresji badanego genu normalizowano do wewnętrznego standardu (genu ulegającego względnie stałej ekspresji) jakim była fosforybozylo transferaza hypoksantynowa (HPRT).

Skład mieszaniny reakcyjnej i program reakcji podano w tabeli 8.

Tabela 8. Składniki reakcji PCR z zastosowaniem SYBR green.

| Składnik | Stężenie |
|--|------------|
| LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* | 1 x |
| MgCl ₂ | 2 mmol/l |
| Starter sensowny | 0,5 μmol/l |
| Starter antysensowny | 0,5 μmol/l |
| cDNA (10 x rozcieńczony) | 5 μl |
| Woda | do 20 μl |

* skład zastrzeżony przez producenta

4.16.5 Analiza ekspresji OXR1 i OXR2 z zastosowaniem sond

W przypadku detekcji i analizy ekspresji OXR1 i OXR2 wykorzystano uniwersalne sondy hybrydujące TaqMan (Roche Diagnostics). Sondy te zarówno dla genów OXR1, OXR2 oraz GAPDH zostały dopasowane do zaprojektowanych wcześniej starterów dzięki aplikacji dostępnej na stronie producenta (www.roche.applied-science.com/sis/rtpcr/upl.sdc.ipg). Na końcu 5' sondy znakowane były barwnikiem fluorescencyjnym fluoresceiną (FAM), na końcu 3' wygaszaczem (dark quencher) hamującym generowanie sygnału fluorescencyjnego. W trakcie powstawania produktu PCR dzięki aktywności 5' egzonukleazowej polimerazy sonda jest degenerowana. Pozwala to na oddzielenie barwnika od wygaszacza i generowanie sygnału o długości fali 530 nm. Reakcje przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Diagnostic). Skład mieszaniny reakcyjnej i program reakcji PCR podano w tabeli 9. Wyniki analizowano przy użyciu programu LightCycler 4.05.

Tabela 9. Skład reakcji PCR z wykorzystaniem sond TaqMan.

| Składnik | Stężenie |
|--------------------------------|-----------|
| LightCycler TaqMan Master Mix* | 1 x |
| TaqMan Sonde | 50 pmol/l |
| Starter sensowny | 50 pmol/l |
| Starter antysensowny | 50 pmol/l |
| cDNA (10 x rozcieńczone) | 5 µl |
| Woda | do 10 µl |

* skład zastrzeżony przez producenta

Tabela 10. Program reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

| Krok | | Czas | Temperatura [°C] |
|------|-----------------------------------|--------|------------------|
| 1. | Denaturacja wstępna | 10 min | 95 |
| 2* | Przyłączanie starterów do matrycy | 3 s | 62 |
| | Elongacja | 6 | 72 |
| | Denaturacja | 10 s | 95 |
| 3. | Krzywa topnienia | 5 min | 65-95 |

* powtórzono w 45 cyklach

4.17 Wyciszenie ekspresji PPAR γ przez siRNA

Wiele publikacji wskazuje, że adipocyty są bardzo trudnym materiałem do efektywnej transfekcji siRNA. Do niedawna transfekcja siRNA do adipocytów była ograniczona do elektroporacji (120). W pracy zrezygnowano z tej metody ponieważ wymaga ona trypsynizacji komórek i ich późniejszej kultury w zawieszynie, ponadto obniża ich przeżywalność. Wykorzystano zatem zestaw odczynników DeliverX Plus siRNA Transfection Kit (Panomics, Fremont, Kanada). Metoda polega na skutecznej transfekcji siRNA do komórek przez zastosowanie technologii MPG wykorzystującej peptydy pochodzenia wirusowego, które wchodzi w interakcje z kwasami nukleinowymi i są zdolne do dyfuzji przez błonę komórkową, uwalniając następnie cargo wewnątrz komórki (121). W celu wyciszenia ekspresji PPAR γ , komórki poddano 72 h transfekcji z PPAR γ siRNA (200 nmol/l). Grupę kontrolną inkubowano z kontrolnym siRNA w tym samym stężeniu molowym. Kontrolne siRNA ulega transfekcji do komórek, pozostaje jednak bez wpływu na ekspresję genów. Wykorzystano ON-Target plus

SMART pool siRNA pozyskane z Dharmacon Lafayette, CO, USA) Procedurę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Skuteczność wyciszenia sprawdzono metodą western blot.

4.18 Sekrecja adiponektyny

Eksperymenty badające wpływ oreksyny A na sekrecję adiponektyny przeprowadzono na płytkach 24-dółkowych. W tym celu adipocyty 3T3-L1 inkubowano w obecności oreksyny A (1, 10, 100 nmol/l), nTZD (10 μ mol/l) oraz oreksyny A (10 nmol/l) w kombinacji z nTZD (10 μ mol/l). Inkubację prowadzono przez 24 h w objętości 1 ml medium na dołek. Po zakończonym eksperymencie z każdego z dołków pobrano 800 μ l medium dodając aprotyninę (5 μ g/ml). Następnie próbki wirowano (800 x g, 10 min, 4°C). Po zwirowaniu pobrano 500 μ l i przeniesiono do świeższych probówek, które przechowywano w temperaturze -70°C w celu późniejszego oznaczenia poziomu adiponektyny. Adiponektynę mierzono używając testu radioimmunologicznego (RIA). W metodzie tej znakowany radioaktywnie antygen (w tym przypadku znakowana ¹²³J adiponektyna) konkuruje z nieznakowanym antygenem (adiponektyną zawartą w medium inkubacyjnym) o wiązanie ze specyficznym przeciwciałem. Pomiaru dokonuje się w oparciu o odczyt promieniowania gamma.

W przypadku adiponektyny wykorzystano zestaw odczynników Adiponektin RIA kit (Linco Research, St. Charles, MO, USA). Całość wykonano zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Przed pomiarem medium komórkowe rozcieńczono 25 x. Pomiar promieniowania gamma wykonano stosując licznik Wallac 1470 Whizard (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

4.19 Eksperyment *in vivo* z wykorzystaniem pomp osmotycznych

Szczury szczepu Wistar o masie początkowej 200 ± 30 g utrzymywano na standardowej paszy bytowej Labofed B (A. Morawski, Kcynia, Polska). W celu wywołania otyłości jedna grupa żywiona była paszą wysokotłuszczową (60% energii zawartej w paszy pochodziła z tłuszczu) wykorzystano paszę No. 2127 (Provimi Kliba AG Kliba Nafag, Kaiseraugst, Szwajcaria). Po upływie 5 tygodni u wszystkich zwierząt umieszczono pomy osmotyczne model 2ML4 (Durect, Cupertino, CA, USA). Pompy umieszczono dootrzewnowo. W obrębie każdej grupy połowa zwierząt otrzymała pompy zawierające i uwalniające 0,9% NaCl (grupa kontrolna) lub oreksynę A (0,134 mg na pompę,

uwalnianą 50 pmol/h). Po 4 tygodniach zwierzęta zabito i pobrano materiał doświadczalny.

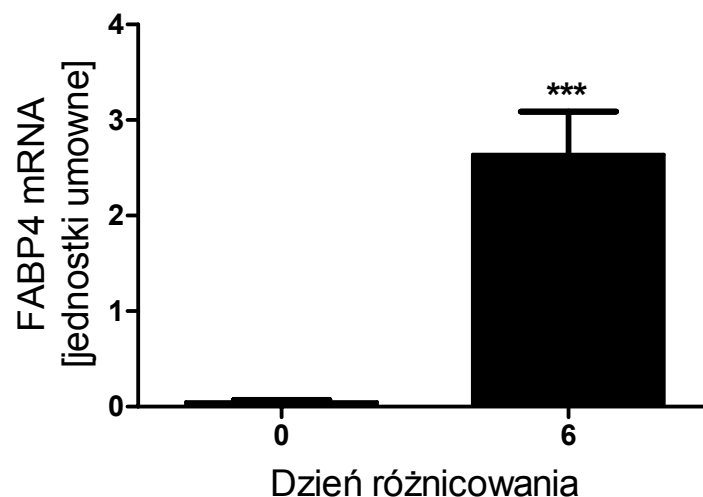
4.20 Analiza statystyczna

Każdy z eksperymentów *in vitro* przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, liczebność w grupach eksperymentalnych wynosiła minimum 4. W doswiadczeniu *in vivo* wykorzystano 6 szczurów. Różnice statystyczne pomiędzy grupami szacowano za pomocą testu t-studenta dla grup niezależnych. Różnice pomiędzy średnimi sprawdzano na poziomie istotności 5% ($p \leq 0,05$), 1% ($p \leq 0,01$), 0,1% ($p \leq 0,001$). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy (SEM). Wykresy oraz obliczenia wykonano przy użyciu pakietu statystycznego GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA , USA).

5 Wyniki

5.1 Różnicowanie fibroblastów 3T3-L1 w adipocyty

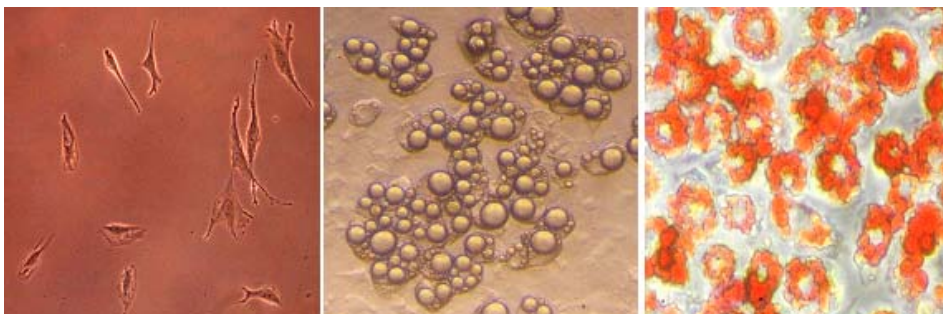
W procesie różnicowania preadipocytów w adipocyty dochodzi do bardzo wyraźnych zmian zarówno w profilu ekspresji genów jak i morfologii komórek. Jednym z najczęściej stosowanych markerów określających powodzenie procesu różnicowania jest poziom ekspresji białka wiążącego kwasy tłuszczowe 4 (FABP4). Z danych literaturowych wiadomo, że w preadipocytach ekspresja FABP4 zachodzi na bardzo niskim poziomie i wzrasta bardzo intensywnie podczas różnicowania w adipocyty (122). Weryfikując różnicowanie fibroblastów w adipocyty zauważono, że komórki różnicowane wg opisanego powyżej protokołu wykazały bardzo intensywny wzrost poziomu ekspresji mRNA kodującego FABP4 (Ryc. 5).



Ryc. 5. Ekspresja mRNA kodującego FABP4 w nieodróżnicowanych i odróżnicowanych (dzień 6) adipocytach 3T3-L1. Wyniki analizy PCR w czasie rzeczywistym przedstawiają poziom ekspresji znormalizowany wobec HPRT. *** $p < 0,001$ vs nieodróżnicowane 3T3-L1.

Drugim istotnym elementem charakterystycznym dla analizy procesu różnicowania jest zmiana morfologii komórek. W czasie różnicowania obserwowana jest zmiana kształtu z charakterystycznej dla fibroblastów morfologii, w komórki o kształcie okrągłym z widocznymi kroplami odkładanego tłuszczu. Zauważono, że odróżnicowane adipocyty

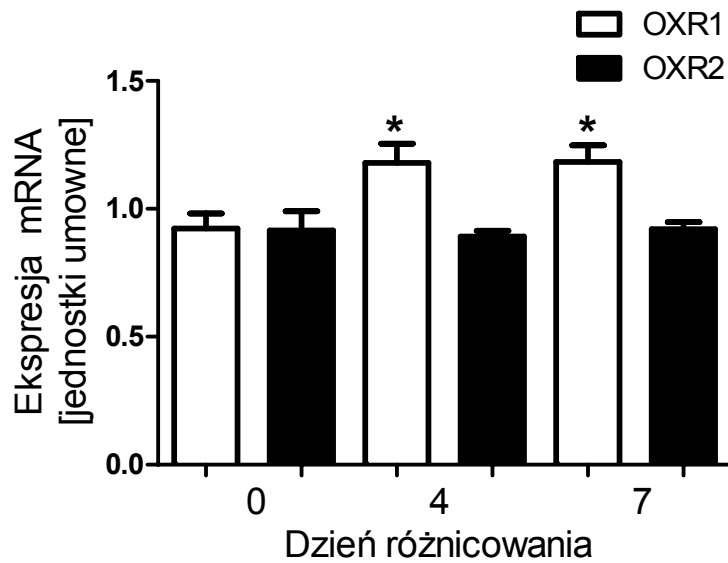
cechowała odmienna względem fibroblastów morfologia. (ryc. 6). Oznacza to, że różnicowanie w adipocyty przebiegało poprawnie.



Ryc. 6. Różnice morfologiczne pomiędzy fibroblastami i zróżnicowanymi adipocytami 3T3-L1. Fotografia po lewej stronie ukazuje fibroblasty (charakterystyczny wydłużony kształt), środkowa adipocyty w pełni zróżnicowane z widoczną zmianą morfologii oraz powstałymi kroplami magazynowanych triacylogliceroli. Zdjęcie po prawej stronie ukazuje adipocyty 3T3-L1 poddane barwieniu czerwiecią olejową, która na czerwono wybarwia triacyloglicerole. Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 400 x.

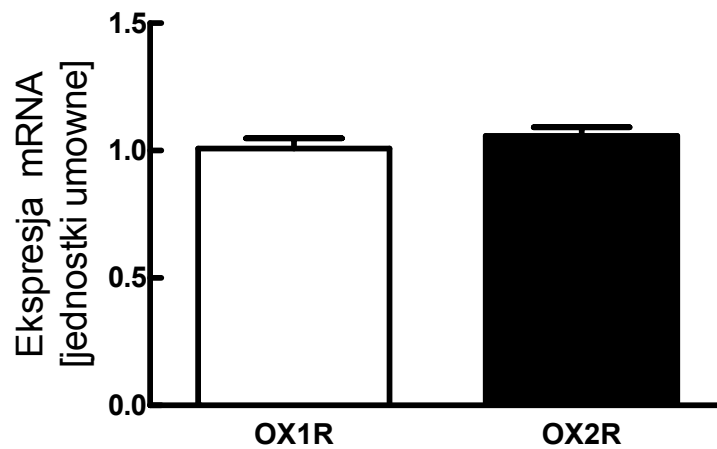
5.2 Ekspresja OXR1 i OXR2 w adipocytach

Przed przeprowadzeniem właściwych eksperymentów określających wpływy OXA na adipocyty przeprowadzono analizę ekspresji obydwu typów receptorów oreksyn. Analiza mRNA z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym ujawniła, że OXR1 i OXR2 ulegają ekspresji zarówno w niezróżnicowanych jak i w pełni zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1. Wykazano, że ekspresja OXR1 znacząco wzrasta podczas procesu różnicowania, osiągając maksymalny poziom w 7 dniu od momentu indukcji adipogenezy (Ryc. 7). W przypadku OXR2 odnotowano stabilny poziom ekspresji bez różnic pomiędzy komórkami zróżnicowanymi a fibroblastami (Ryc. 8).



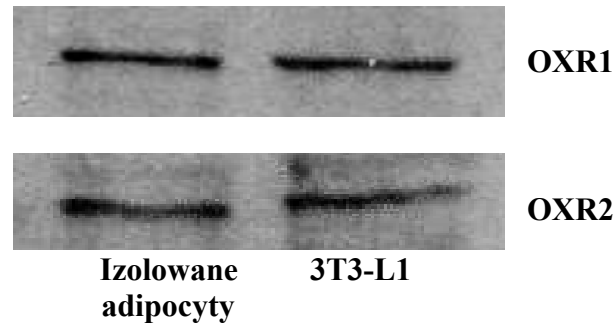
Ryc. 7. Ekspresja mRNA OXR1 i OXR2 w przebiegu różnicowania komórek 3T3-L1. Komórki różnicowano wg standardowego protokołu, ekspresję szacowano w dniu 0 (przed rozpoczęciem różnicowania) w 4 oraz 7 dniu od momentu indukcji różnicowania. Wyniki przedstawiają ekspresję OXR1 i OXR2 znormalizowaną wobec GAPDH. * $p < 0,05$ vs ekspresja w dniu 0 odpowiednio dla OXR1 lub OXR2.

W izolowanych adipocytach szczura zaobserwowano, że ekspresji ulegają obydwa receptory oreksyn. Nie odnotowano różnic w poziomie intensywności ekspresji mRNA (Ryc. 4).



Ryc. 8. Ekspresja OXR1 i OXR2 w izolowanych adipocytach szczura. Ekspresję szacowano metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki przedstawiają ekspresję OXR1 i OXR2 znormalizowaną do GAPDH.

Technika western blot potwierdziła obecność receptorów na poziomie białka. Zarówno w zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1, jak i w izolowanych adipocytach szczura w białku pozyskanym z frakcji błon komórkowych wykazano obecność OXR1 i OXR2 (Ryc. 9).

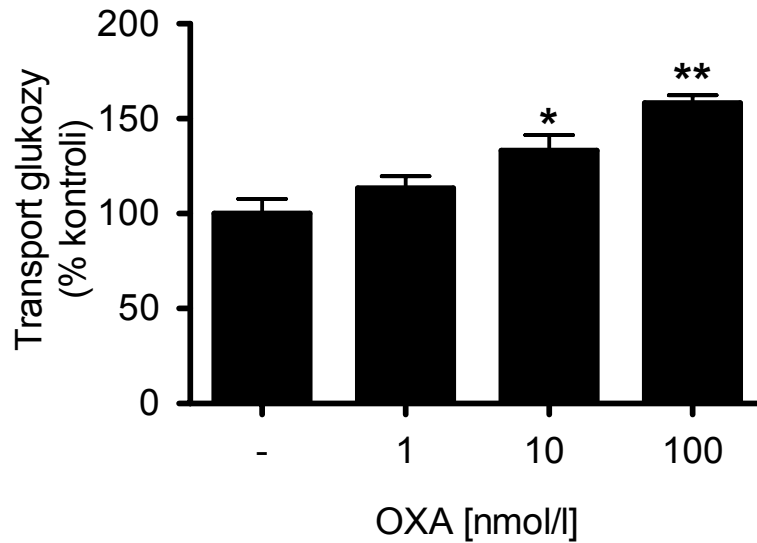


Ryc. 9. Ekspresja OXR1 i OXR2 w zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1 oraz izolowanych adipocytach szczura. Reprezentatywny western blot ukazuje odpowiednio prążki odpowiadające OXR1 (55 kDa) i OXR2 (37 kDa).

5.3 Oreksyna A stymuluje transport glukozy do adipocytów

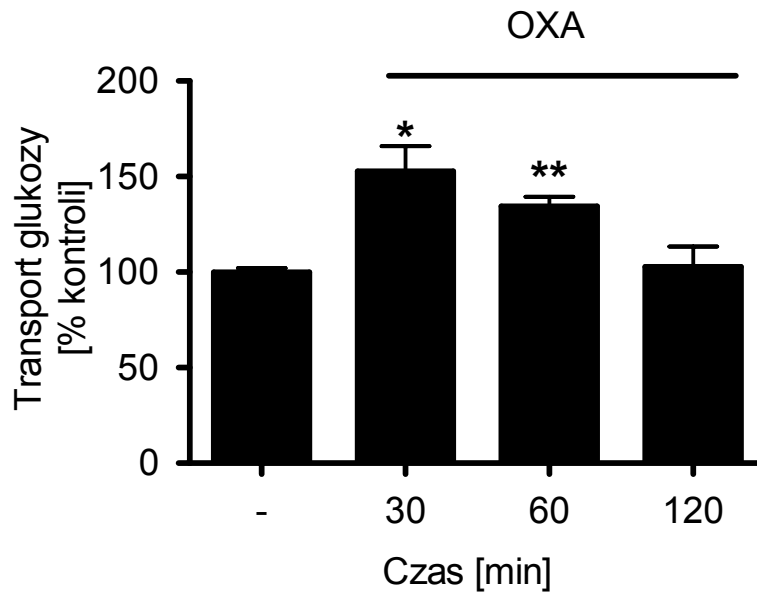
Dane literaturowe wskazują, że OXA obniża poziom glukozy we krwi (109, 123). Dlatego też postanowiono sprawdzić czy efekty te mogą być powiązane ze wzrostem transportu glukozy do adipocytów.

W adipocytach 3T3-L1 oreksyna A w zależności od dawki zwiększyła dokomórkowy transport glukozy. Istotny statystycznie wpływ zaobserwowano przy stężeniu 10 nmol/l, a maksymalny efekt przy stężeniu 100 nmol/l. Odnotowano brak wpływu najniższego z przeanalizowanych stężeń 1 nmol/l (Ryc. 10).



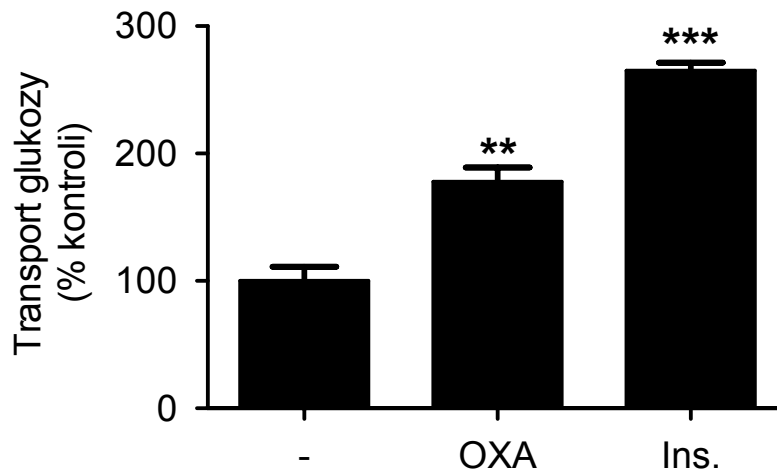
Ryc. 10. Wpływ różnych stężeń oreksyny A na dkomórkowy transport glukozy w adipocytach 3T3-L1. Komórki przez 30 min inkubowano w obecności 1, 10 i 100 nmol/l OXA, następnie wykonano pomiar transportu 2-deoksy-³H-glukozy. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupa nie poddana stymulacji oreksyną A.

Przeanalizowano również wpływ czasu ekspozycji na badany peptyd. Po 30 i 60 min inkubacji 100 nmol/l OXA zwiększyła poziom transportu glukozy. Przedłużenie czasu inkubacji do 120 min nie wpłynęło znacząco na transport glukozy (Ryc. 11).



Ryc. 11. Wpływ czasu stymulacji 100 nmol/l oreksyną A na transport glukozy w adipocytach 3T3-L1. Wyniki znormalizowano do poziomu białka i przedstawiono jako % kontroli (grupy nie poddanej stymulacji oreksyną A). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupa bez oreksyny A.

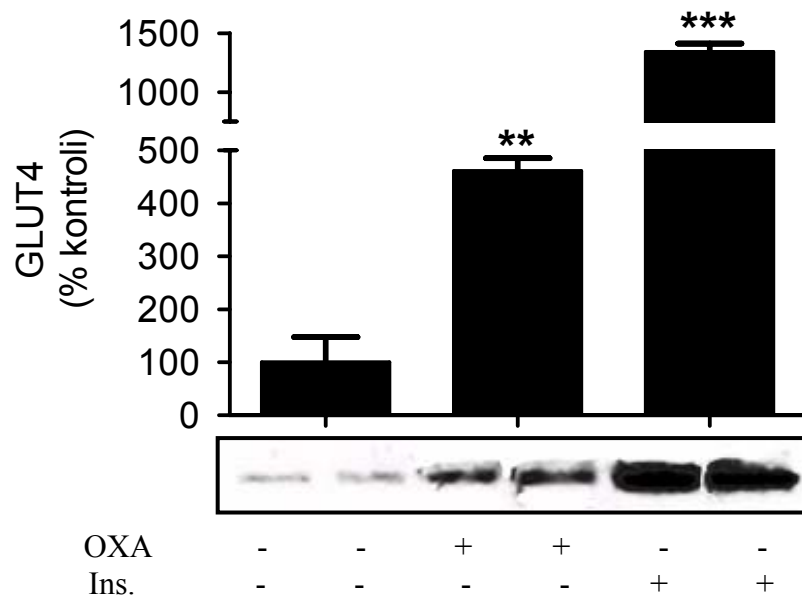
Wpływ OXA na transport glukozy określono również używając izolowanych adipocytów szczura. Odnotowano, że po 30 min 100 nmol/l OXA zwiększyła poziom transportu glukozy, jednak efekt ten był mniejszy niż insuliny w stężeniu 10 nmol/l (Ryc. 12).



Ryc. 12. Wpływ 100 nmol/l oreksyny A i 10 nmol/l insuliny (Ins.) na dokomórkowy transport glukozy w izolowanych adipocytach szczura. Komórki przez 30 min inkubowano w obecności badanych peptydów, po czym określono transport 2-deoksy-³H-glukozy. Wyniki przedstawiono jako % kontroli (grupy nie poddanej stymulacji peptydami). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa bez oreksyny A i insuliny.

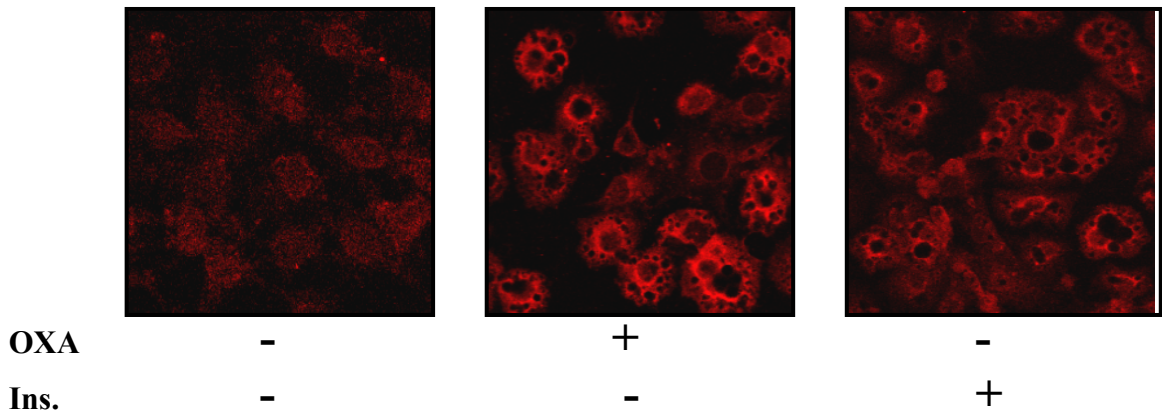
5.4 Oreksyna A stymuluje translokację GLUT4 do błony komórkowej

W tkankach insulinozależnych takich jak mięśnie czy tkanka tłuszczowa, transport glukozy regulowany jest głównie przez translokację czwartego typu transportera glukozy (GLUT4) z cytoplazmy do błony komórkowej (124). Stosując metodę western blot zauważono, że stymulacja adipocytów 100 nmol/l OXA (30 min) zwiększyła poziom białka GLUT4 we frakcji błonowej. Efekt ten był jednak słabszy w porównaniu do insuliny (Ryc. 13).



Ryc. 13. Wpływ 100 nmol/l oreksyny A oraz 10 nmol/l insuliny na translokację GLUT4 z cytoplazmy do błony komórkowej w adipocytach 3T3-L1. Po 30 minutach stymulacji badanymi hormonami z adipocytów pozyskano frakcję błonową i wykonano analizę western blot. Górna rycina przedstawia ilościowe zmiany białka GLUT4 po inkubacji z OXA i insuliną (intensywność sygnału szacowano na podstawie gęstości optycznej prążków). Wyniki przedstawiono jako % zmiany w stosunku do komórek, których nie poddano stymulacji oreksyną A i insuliną. Dolny panel przedstawia reprezentatywny western blot. Obserwowane prążki odpowiadają białku GLUT4 (55 kDa). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa bez oreksyny A i insuliny.

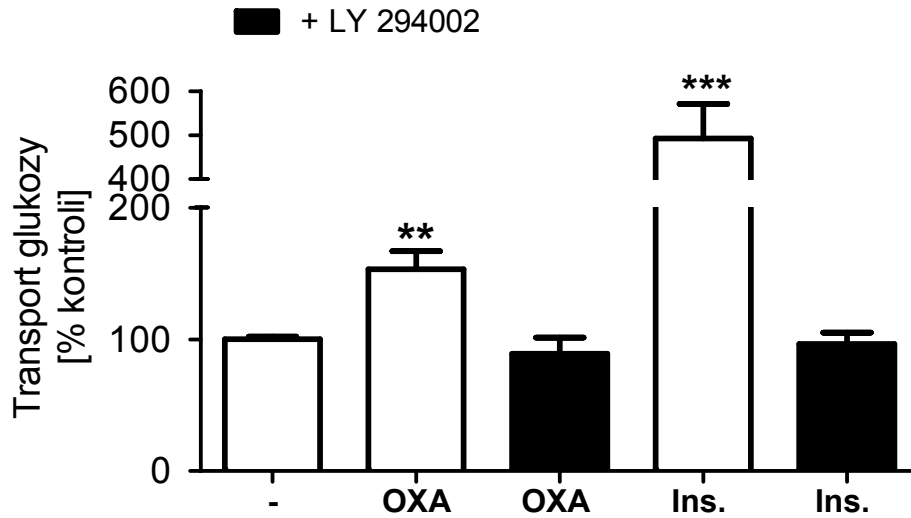
Wyniki te potwierdzono również przez immunofluorescencyjną detekcję GLUT4 w błonie komórkowej. Po stymulacji 100 nmol/l OXA i 10 nmol/l insuliną, w błonie komórkowej odnotowano wyraźny sygnał fluorescencyjny będący wynikiem wiązania specyficznego dla GLUT4 przeciwciała. W grupie kontrolnej sygnał ten jest wyraźnie słabszy (Ryc. 14).



Ryc. 14. Immunofluorescencyjna detekcja GLUT4 w adipocytach 3T3-L1. Adipocyty inkubowano przez 30 min w obecności 100 nmol/l oreksyny A i 10 nmol/l insuliny. Intensywny czerwony sygnał na peryferiach komórek koresponduje do ilości białka GLUT4 w błonie komórkowej. Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 400 x.

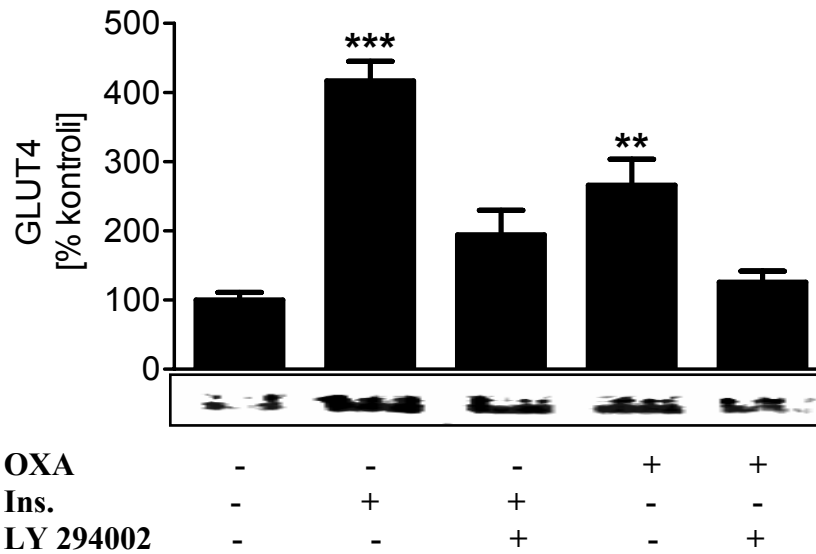
5.5 Oreksyna A aktywuje szlak PI3-kinazy/PKB

Wcześniejsze prace dowiodły, że w adipocytach jednym z kluczowych momentów w regulacji translokacji GLUT4 do błony komórkowej jest aktywacja kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K) (125). Kinaza ta jest również aktywowana przez OXR1 (61). W celu sprawdzenia czy PI3-K pośredniczy w stymulowanym przez OXA dokomórkowym transporcie glukozy, w kolejnym eksperymencie adipocyty 3T3-L1 poddano stymulacji 100 nmol/l oreksyną A lub 10 nmol/l insuliną (kontrola pozytywna) w obecności lub nie 10 μ mol/l LY 294002 (farmakologicznego inhibitora PI3-K). Otrzymane wyniki wykazały, że zahamowanie aktywności PI3-K znosi stymulujący na transport glukozy wpływ oreksyny A oraz insuliny (Ryc. 15).



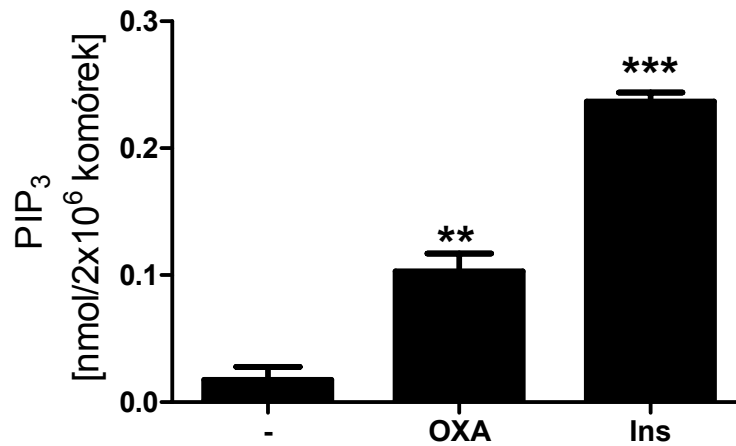
Ryc. 15. Wpływ LY 294002 na stymulowany przez oreksynę A i insulinę transport glukozy. Adipocyty 3T3-L1 przez 30 min stymulowano 100 nmol/l OXA lub 10 nmol/l insuliną w obecności LY 294002 w stężeniu 10 μ mol/l (inhibitor dodano 10 minut przed badanymi peptydami). Po zakończonej inkubacji określono transport 2-deoksy-³H-glukozy. Wyniki przedstawiono jako % zmiany w stosunku do grupy kontrolnej (nie poddanej stymulacji hormonami). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

Co więcej zgodnie z przypuszczeniami, w obecności LY 294002 OXA i insulina nie zwiększyły poziomu translokacji GLUT4 do błony komórkowej (Ryc. 16).



Ryc. 16. Wpływ inhibicji PI3-K na stymulowaną przez oreksynę A i insulinę translokację GLUT4 z cytoplazmy do błony komórkowej. Komórki przez 30 min stymulowano 100 nmol/l OXA i 10 nmol/l insuliną w obecności lub nie 10 μ mol/l LY 294002 (inhibitor dodano 10 minut przed OXA i insuliną). Następnie przy pomocy techniki western blot dokonano detekcji białka GLUT4 w błonie komórkowej. Obserwowane prążki odpowiadają 55 kDa. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

W celu potwierdzenia aktywacji PI3-K przez OXA komórki poddano inkubacji w obecności oreksyny A po czym zmierzono poziom syntezy 1,4,5-trifosforanu inozytolu (PIP3), który jest syntetyzowany w sytuacji gdy dochodzi do aktywacji PI3-K (126). Wykazano, że OXA istotnie zwiększa produkcję PIP3, efekt ten był jednak słabszy w porównaniu z 10 nmol/l insuliną, którą zastosowano jak kontrolę pozytywną (Ryc. 17).

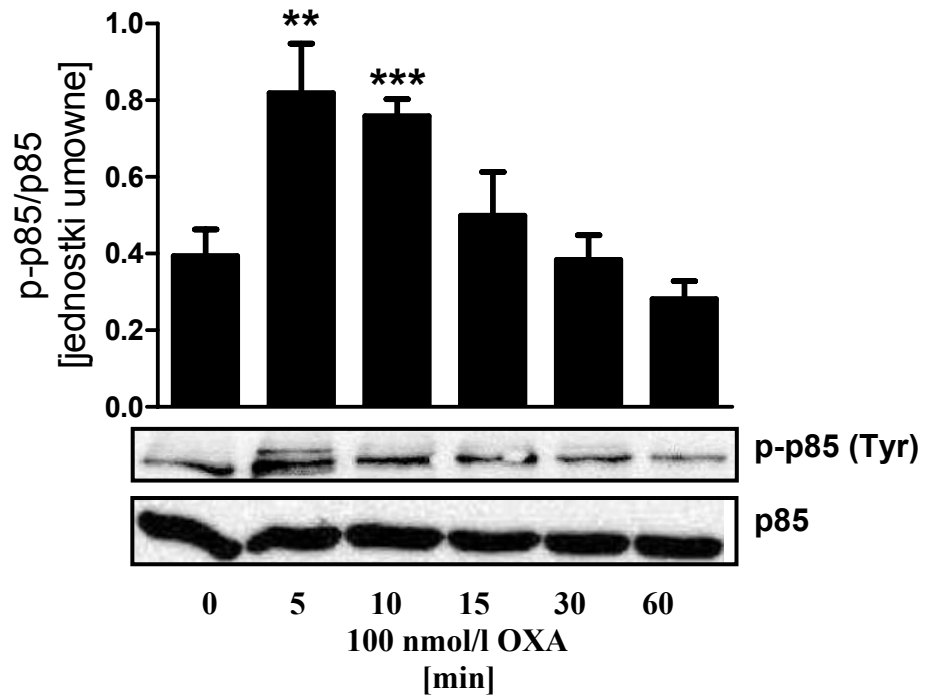


Ryc. 17. Efekty oreksyny A i insuliny na syntezę PIP₃ w adipocytach 3T3-L1.

Adipocyty przez 10 min stymulowano 100 nmol/l OXA lub 10 nmol/l insuliny, następnie zmierzano ilość wewnątrzkomórkowego PIP₃. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

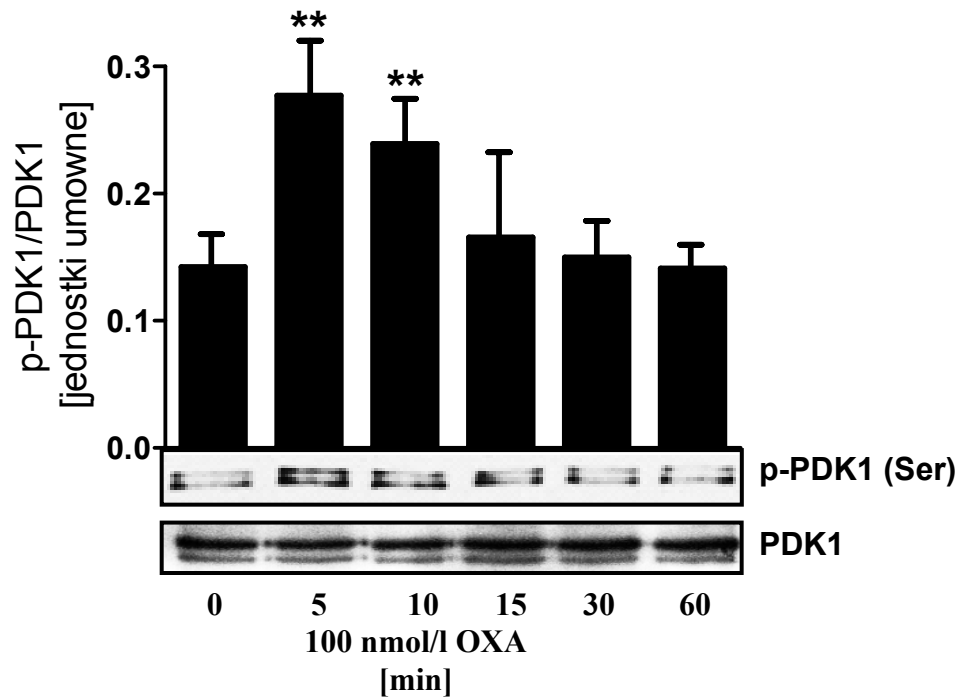
Następnie w celu weryfikacji wyników wskazujących na udział PI3-K w stymulowanym przez OXA transporcie glukozy, przeanalizowano wpływ oreksyny A na fosforylację podjednostki regulatorowej p85 tej kinazy oraz aktywowanych przez PI3-K białek: kinazy 1 zależnej od fosfatydyloinozytolu (PDK1) i kinazy białkowej B (PKB). Ponadto określono również poziom fosforylacji białka AS160 (substrat kinazy białkowej B).

Analiza western blot wykazała, że 100 nmol/l OXA w zależności od czasu stymulacji zwiększyła fosforylację podjednostki p85. Istotny statystycznie efekt zaobserwowano po 5 oraz po 10 min inkubacji (Ryc. 18).



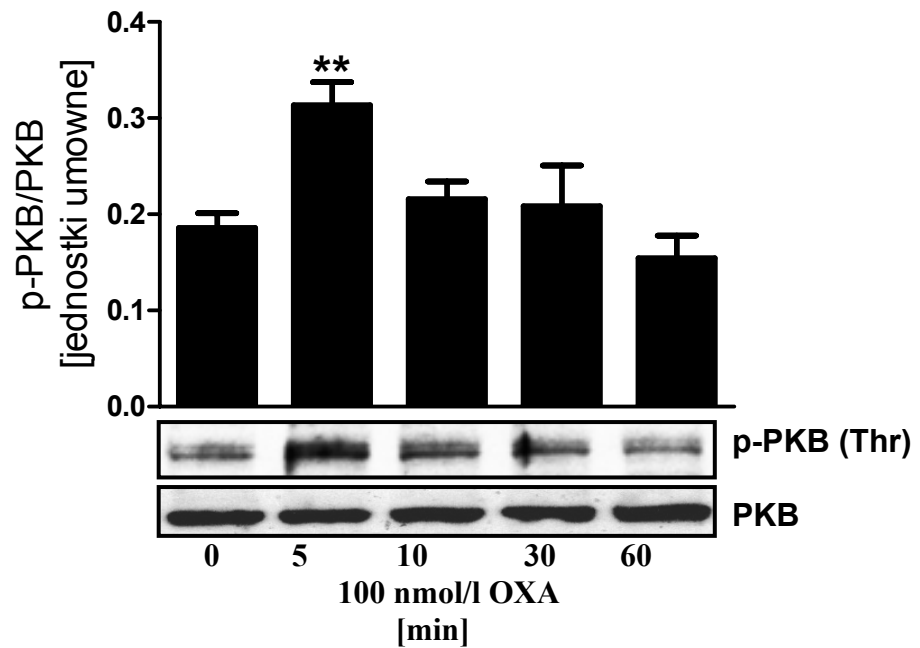
Ryc. 18. Wpływ oreksyny A na fosforylację białka p85 (jednostki regulatorowej PI3-K). Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA (czas ekspozycji zaznaczono w legendzie). Górna rycina przedstawia zmiany ilościowe ufosforylowanej podjednostki p85 oszacowane na podstawie gęstości optycznej prążków, znormalizowane do całkowitej zawartości białka p85. Dolny panel prezentuje reprezentatywny western blot. Widoczne prążki odpowiadają 87 kDa dla białka ufosforolowanego oraz całkowitego. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

Podobne wyniki przyniosła analiza wpływu OXA na fosforylację PDK1. Oreksyna A zwiększyła poziom ufosforylowanego białka PDK1 po 5 i 10 min inkubacji, wydłużenie okresu inkubacji nie miało wpływu na poziom ufosforylowanego białka (Ryc. 19).

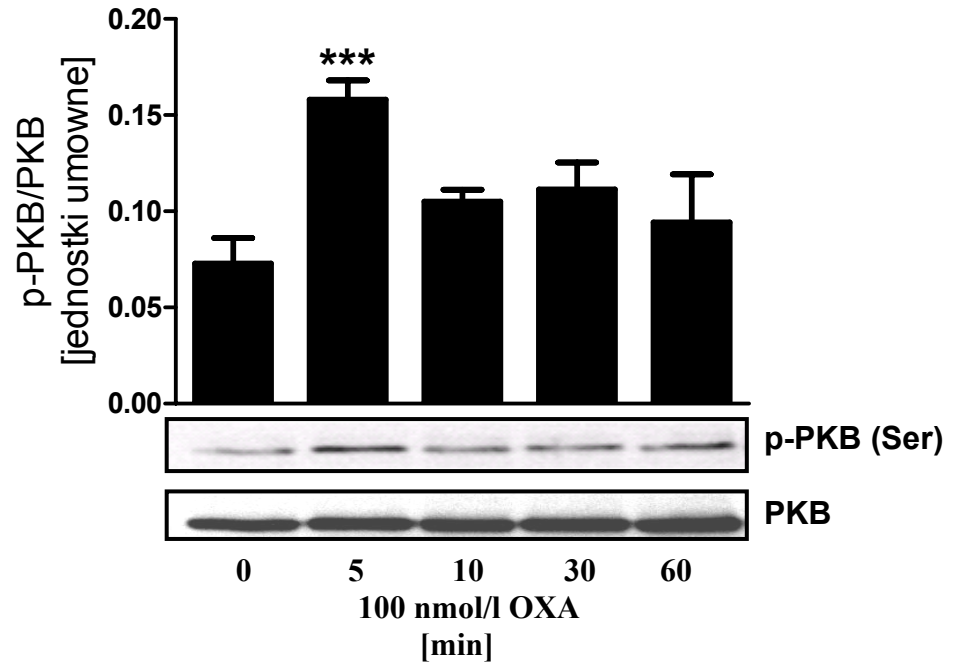


Ryc. 19. Wpływ oreksyny A na fosforylację PDK1. Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA (czas ekspozycji zaznaczono w legendzie). Górna rycina przedstawia zmiany ilościowe ufosforylowanej PDK1 oszacowane na podstawie gęstości optycznej prążków, znormalizowane do całkowitej zawartości PDK1. Dolny panel prezentuje reprezentatywny western blot. Widoczne podwójne prążki odpowiadają 68 (górny) i 58 (dolny) kDa. ** $p < 0,01$ vs grupa kontrolna.

W przypadku kinazy białkowej B po 5 minutach ekspozycji na 100 nmol/l OXA odnotowano zwiększony poziom fosforylacji treoninowej (Ryc. 20) oraz serynowej (Ryc. 21).

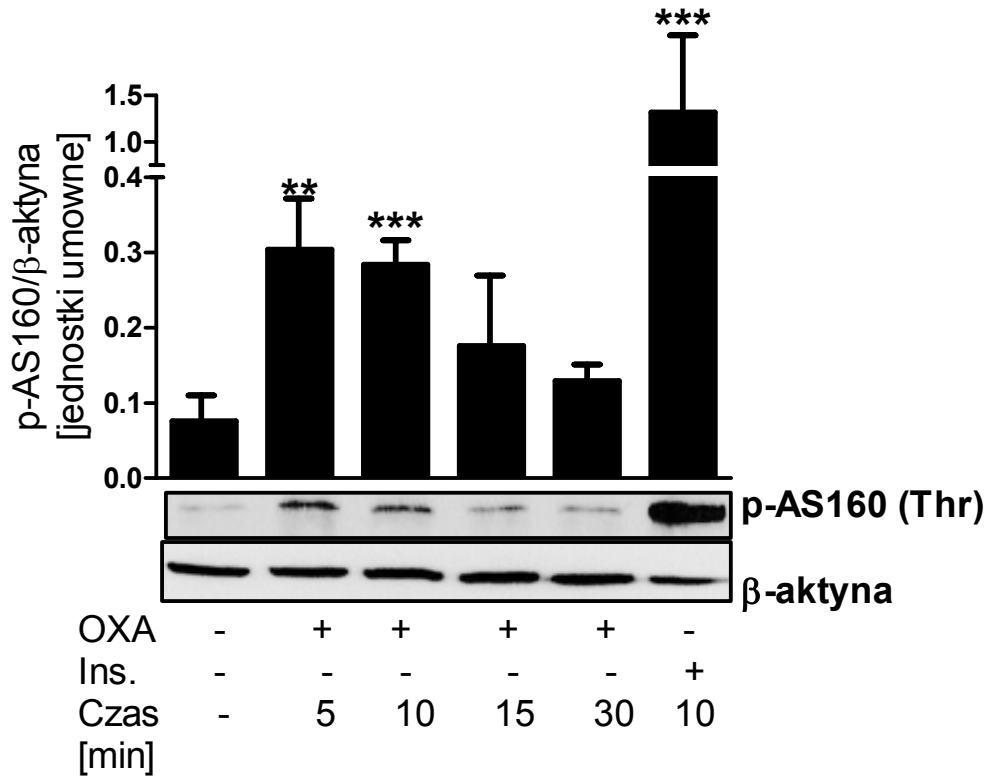


Ryc. 20. Wpływ oreksyny A na treoninową fosforylację kinazy białkowej B (PKB). Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA (czas ekspozycji zaznaczono w legendzie). Górna rycina przedstawia zmiany ilościowe ufosforylowanej PKB oszacowane na podstawie gęstości optycznej prążków znormalizowane do całkowitej zawartości białka PKB. Dolny panel prezentuje reprezentatywny western blot. Widoczne prążki odpowiadają 55 kDa dla białka ufosforylowanego oraz całkowitego. ** $p < 0,01$ vs grupa kontrolna.



Ryc. 21. Wpływ oreksyny A na serynową fosforylację kinazy białkowej B (PKB). Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA (czas ekspozycji zaznaczono w legendzie). Górna rycina przedstawia zmiany ilościowe ufosforylowanej PKB oszacowane na podstawie gęstości optycznej prążków znormalizowane do całkowitej zawartości białka PKB. Dolny panel prezentuje reprezentatywny western blot. Widoczne prążki odpowiadają 55 kDa dla białka ufosforylowanego oraz całkowitego. *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

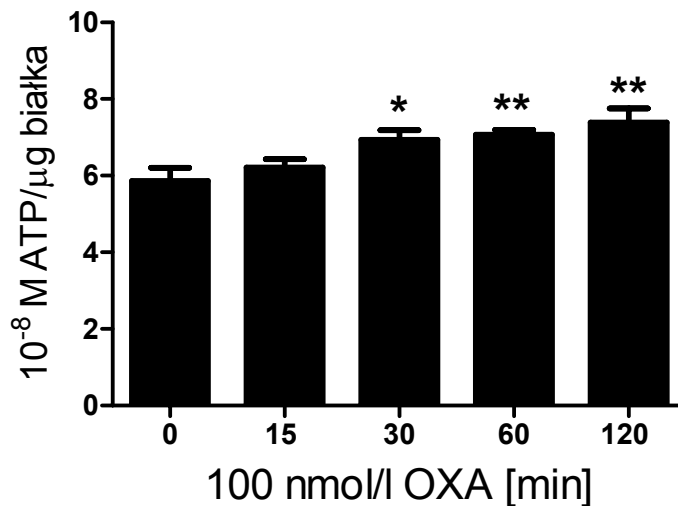
W przypadku AS160 zwiększony poziom fosforylacji zaobserwowano po 5 i 10 min inkubacji z 100 nmol/l OXA. Stymulacja 10 nmol/l insuliną (kontrola pozytywna) spowodowała bardziej wyraźny wzrost poziomu ufosforylowanego białka (Ryc. 22).



Ryc. 22. Wpływ oreksyny A na treoninową fosforylację białka AS160. Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA (czas ekspozycji zaznaczono w legendzie). Górna rycina przedstawia zmiany ilościowe w poziomie fosforylacji AS160 oszacowane na podstawie gęstości optycznej prążków znormalizowane do β-aktyny. Dolny panel prezentuje reprezentatywny western blot. Widoczne prążki odpowiadają 160 kDa dla ufosforylowanego białka AS160 oraz 37 kDa dla β-aktyny. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

5.6 Oreksyna A zwiększa syntezę ATP

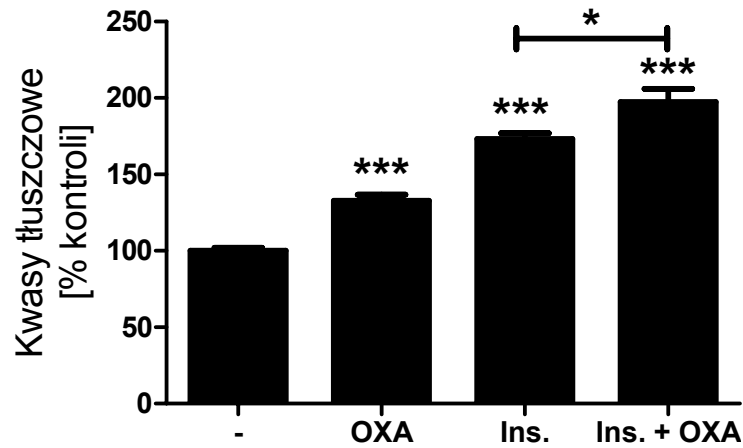
Analizując metaboliczne konsekwencje stymulacji oreksyną A prześledzono jej wpływ na syntezę ATP. Wykazano, że oreksyna A zwiększyła poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Wynik ten zaobserwowano po 30, 60 oraz 120 min inkubacji w obecności 100 nmol/l OXA (Ryc. 23).



Ryc. 23 Wpływ oreksyny A na poziom ATP w adipocytach 3T3-L1. Komórki inkubowano w obecności 100 nmol/l oreksyny A, a po zakończonym czasie inkubacji dokonano pomiaru wewnątrzkomórkowego ATP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupa kontrolna.

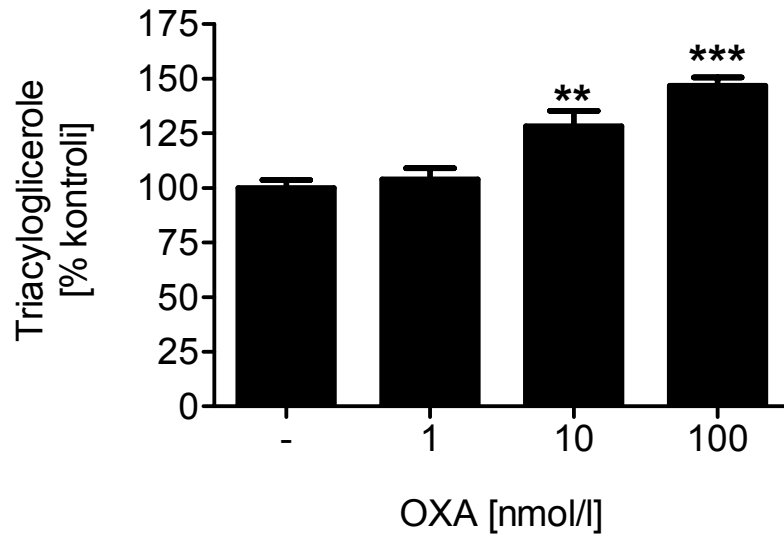
5.7 Oreksyna A stymuluje syntezę triacylogliceroli i kwasów tłuszczowych

W komórkach tkanki tłuszczowej glukoza może podlegać konwersji do kwasów tłuszczowych, które następnie mogą być magazynowane w postaci triacylogliceroli (12). W celu określenia wpływu oreksyny A na syntezę kwasów tłuszczowych posłużono się izolowanymi adipocytami szczura. Rezultaty badań wykazały, że OXA w stężeniu 100 nmol/l istotnie statystycznie zwiększyła poziom przemian glukozy do kwasów tłuszczowych. Ponadto OXA zwiększyła stymulujący wpływ insuliny (Ryc. 24).



Ryc. 24. Wpływ OXA i insuliny na syntezę kwasów tłuszczowych w izolowanych adipocytach szczura. Komórki przez 120 min stymulowano 100 nmol/l OXA, 10 nmol/l insuliny (Ins.) oraz oreksyną A (100 nmol/l) w połączeniu z insuliny (10 nmol/l). Po tym czasie oznaczono poziom kwasów tłuszczowych w adipocytach. Wyniki zaprezentowano jako % zmiany wobec grupy kontrolnej (nie poddanej stymulacji OXA i insuliny). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna (nie poddana działaniu badanych peptydów lub grupa stymulowana insuliny, tak jak zaznaczono na wykresie).

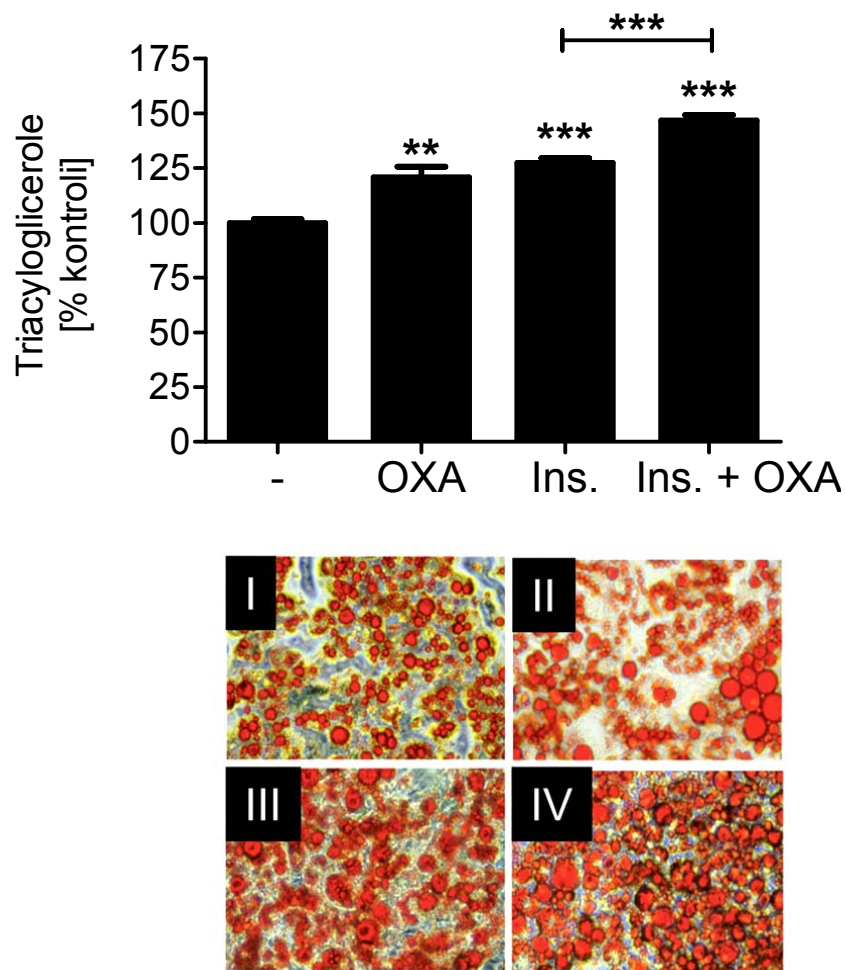
W kolejnym eksperymencie sprawdzono czy zwiększonej syntezie kwasów tłuszczowych towarzyszy również wpływ na akumulację triacylogliceroli. Wykazano, że inkubacja (24 h) adipocytów 3T3-L1 w medium uzupełnionym w 10 i 100 nmol/l OXA spowodowała wyższy poziom wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli w porównaniu do grupy kontrolnej pozbawionej badanego peptydu. Oreksyna A w stężeniu 1 nmol/l nie była w tym zakresie efektywna (Ryc. 25).



Ryc. 25. Wpływ oreksyny A na akumulację triacylogliceroli w adipocytach 3T3-L1.

Zróznicowane adipocyty 3T3-L1 przez 24 h inkubowano z 1, 10 i 100 nmol/l oreksyną A. Następnie ilość wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli oszacowano za pomocą metody barwienia czerwienią olejową. Wyniki przedstawiono jako % zmian wobec grupy kontrolnej (nie poddanej stymulacji oreksyną A). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

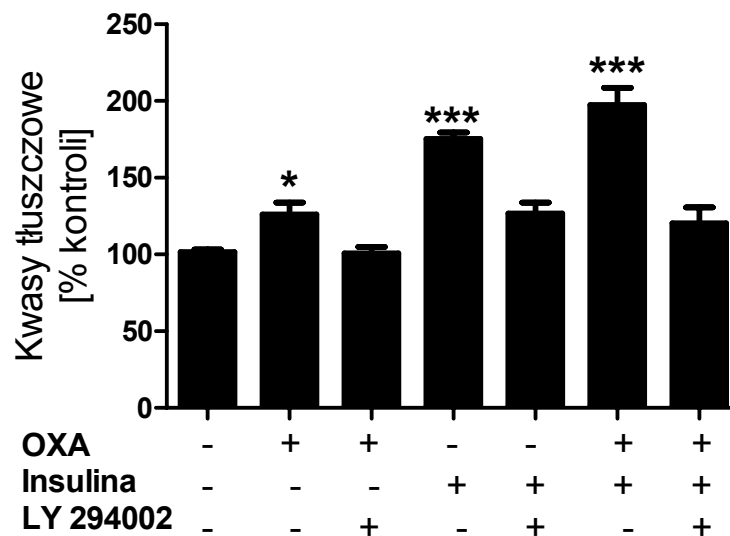
Przedłużając okres inkubacji do 48 h również odnotowano stymulujący wpływ OXA. Ponadto po 48 h inkubacji OXA zwiększyła również wpływ 10 nmol/l insuliny (Ryc. 26).



Ryc. 26. Wpływ OXA i insuliny na akumulację triacylogliceroli w adipocytach 3T3-L1. Zróżnicowane adipocyty 3T3-L1 przez 48 h stymulowano 100 nmol/l oreksyną A, 10 nmol/l insuliny lub obydwoma peptydami (100 nmol/l OXA + 10 nmol/l Ins.) Ilość wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli oszacowano za pomocą barwienia czerwienią olejową. Na dole ryciny znajdują się reprezentatywne fotografie wykonane po wybarwieniu komórek roztworem czerwieni olejowej (I – kontrola, II – OXA, III – insulina, IV – OXA + insulina). Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 400 x. Wyniki przedstawiono jako % zmian wobec grupy kontrolnej (nie poddanej stymulacji badanymi peptydami). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna lub grupa inkubowana z insuliny.

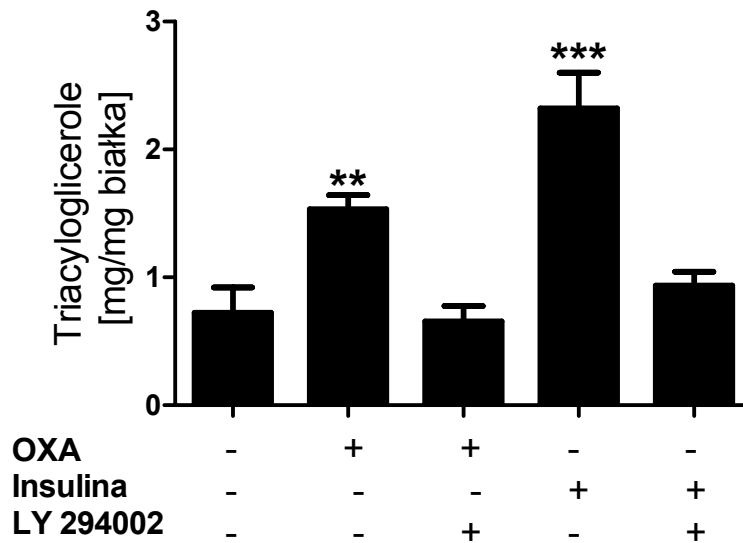
Ponieważ wykazano, że do stymulacji transportu glukozy niezbędna jest aktywacja PI3-K przeanalizowano wpływ wyhamowania tej kinazy na syntezę kwasów tłuszczowych oraz odkładanie triacylogliceroli w obecności OXA i insuliny.

Odnotowano, że w izolowanych adipocytach szczura wyhamowanie aktywności PI3-kinazy zapobiegło zupełnie symulowanej przez OXA oraz insulinę konwersji glukozy do wolnych kwasów tłuszczowych (Ryc. 27).



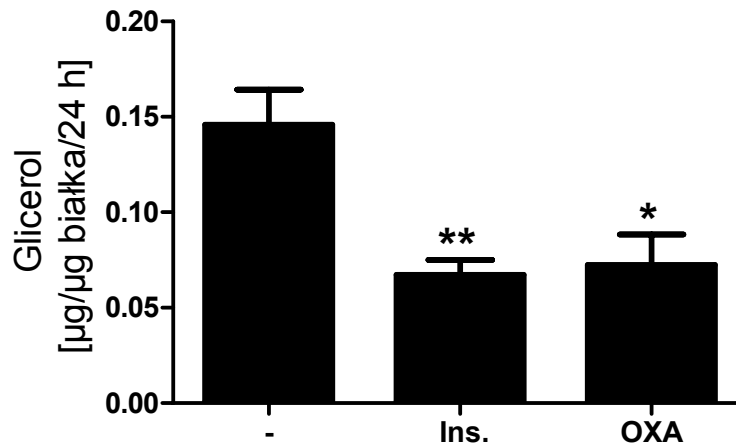
Ryc. 27. Efekt inhibicji PI-3 kinazy na stymulowaną przez OXA i insulinę syntezę kwasów tłuszczowych w izolowanych adipocytach szczura. Komórki przez 90 minut inkubowano w obecności badanych peptydów (100 nmol/l OXA, 10 nmol/l insulina lub OXA + insulina) w obecności 10 μ M LY 294002. Następnie oznaczono poziom konwersji glukozy do kwasów tłuszczowych. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

W adipocytach 3T3-L1 w obecności LY 294002, inkubacja z OXA oraz insuliną również nie zwiększyła poziomu triacylogliceroli (Ryc. 28). Wyniki te pozwalają stwierdzić, że PI-3 kinaza jest wymagana do syntezy kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli zarówno w przypadku oreksyny A jak i insuliny.



Ryc. 28. Wpływ inhibicji PI3-K na akumulację triacylogliceroli w adipocytach 3T3-L1. Zróżnicowane adipocyty 3T3-L1 traktowano 100 nmol/l OXA lub 10 nmol/l insuliny w obecności lub nie 10 μ mol/l LY 294002. Po 24 h zmierzono poziom triacylogliceroli. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

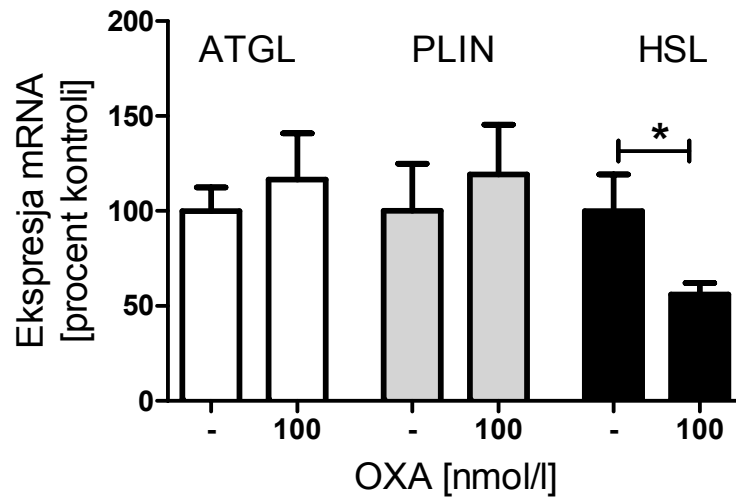
Triacyloglicerole powstają w wyniku estryfikacji glicerolu kwasami tłuszczowymi. Ich poziom jest precyzyjnie regulowany przez lipoogenezę i lipolizę (127). Wiadomo, że działając na ludzkie adipocyty OXA zmniejsza lipolizę (112). W kolejnym eksperymencie sprawdzono czy efekt ten jest również charakterystyczny dla adipocytów 3T3-L1. W przypadku komórek stymulowanych 100 nmol/l OXA zauważono niższy poziom uwolnionego do medium komórkowego glicerolu. Również w przypadku 10 nmol/l insuliny odnotowano znaczny spadek zawartości glicerolu w medium inkubacyjnym w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 29).



Ryc. 29. Wpływ oreksyny A i insuliny na uwalnianie glicerolu z adipocytów 3T3-L1. Zróżnicowane adipocyty poddano inkubacji w obecności 100 nmol/l OXA lub 10 nmol/l insuliny. Po 24 h inkubacji w medium inkubacyjnym oznaczono ilość uwolnionego glicerolu i znormalizowano do zawartości białka. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupa kontrolna (nie poddana działaniu badanych czynników).

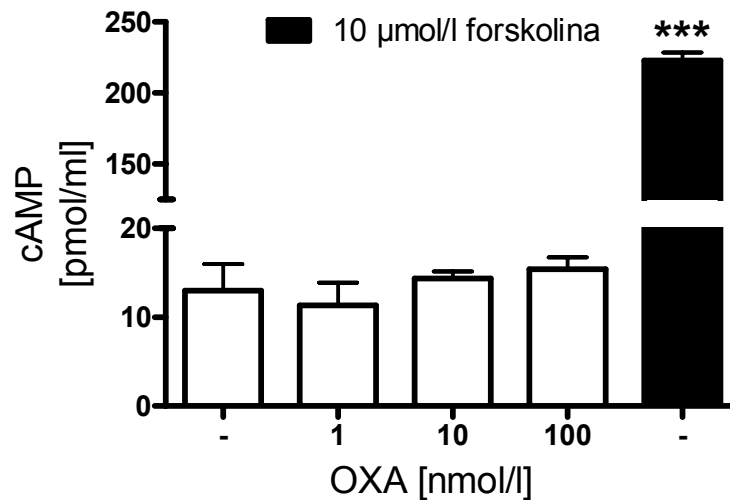
W celu poznania mechanizmów stojących za antylipolitycznymi właściwościami OXA dokonano pomiaru wpływu OXA na ekspresję mRNA kodującego dwie lipazy: lipazę wrażliwą na hormony (HSL) i lipazę triacyloglicerolową (ATGL). Dokonano również pomiaru ekspresji perilipiny (PLIN), która działa ochronnie na proces lipolizy w adipocytach (128).

Dowiedziano, że inkubacja adipocytów 3T3-L1 w obecności oreksyny A (24 h), spowodowała istotny spadek ekspresji HSL, bez zmian w ekspresji ATGL i perylipiny (Ryc. 30).



Ryc. 30. Wpływ oreksyny A na poziom ekspresji mRNA ATGL, PLIN i HSL. Zróżnicowane adipocyty 3T3-L1 przez 24 h inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA. Ekspresję wybranych genów znormalizowano do HPRT jako genu referencyjnego. * $p < 0,05$ vs grupa kontrolna.

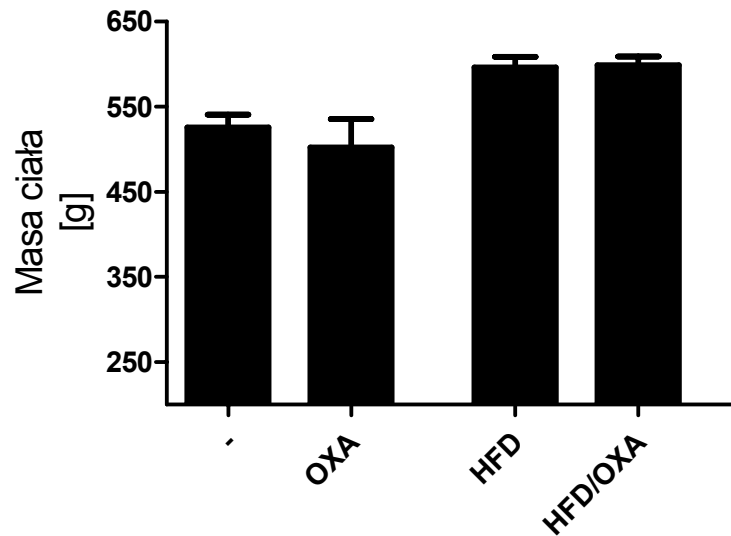
Opublikowane wcześniej rezultaty wskazują, że OXA w pewnych typach komórek obniża poziom cAMP (96). Ponieważ w adipocytach cAMP reguluje aktywność HSL i lipolizę (129, 130), postanowiono prześledzić czy również w adipocytach 3T3-L1 oreksyna A reguluje poziom cAMP. Otrzymane wyniki wykazały, że stymulacja oreksyną A nie wpłynęła istotnie na poziom wewnątrzkomórkowego cAMP. Forskolina, którą użyto jako pozywaną kontrolę, bardzo wyraźnie zwiększyła poziom cAMP w tych komórkach (Ryc. 31).



Ryc. 31. Zależny od dawki wpływ oreksyny A na syntezę cAMP w adipocytach 3T3-L1. Komórki przez 10 min inkubowano w obecności trzech stężeń OXA (1, 10, 100 nmol/l) oraz 10 μmol/l forskoliny. *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

5.8 Wpływ 4. tygodniowego podawania oreksyny A na masę ciała u szczurów

Opisane powyżej wyniki ukazują, że OXA zwiększa poziom syntezy kwasów tłuszczowych oraz akumulacji triacylogliceroli w adipocytach. Ponieważ regulacja masy ciała opiera się głównie na zmianach zawartości triacylogliceroli w adipocytach (131), postanowiono określić wpływ egzogennej oreksyny A na masę ciała u szczurów. Zauważono, że szczury, które przez cały czas eksperymentu utrzymywano na diecie wysokotłuszczowej charakteryzowały się wyższą masą ciała w porównaniu do zwierząt utrzymywanych na standardowej zrównoważonej diecie. Wpływu egzogennej oreksyny A uwalnianej z pomp osmotycznych nie zaobserwowano w żadnej z grup (Ryc. 32).

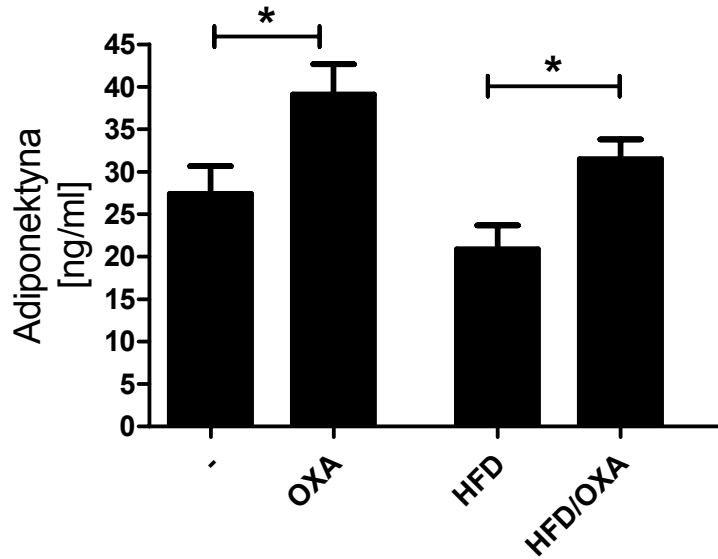


Ryc. 32. Wpływ oreksyny A na masę ciała u szczurów.

Szczury utrzymywane na standardowej paszy bytowej oraz na diecie wysokotłuszczowej (HFD) przez 4 tygodnie przy pomocy pomp osmotycznych otrzymywały OXA (50 pmol/h). Po upływie tego okresu we wszystkich grupach określono masę ciała zwierząt doświadczalnych.

5.9 Oreksyna A zwiększa poziom adiponektyny we krwi u szczurów

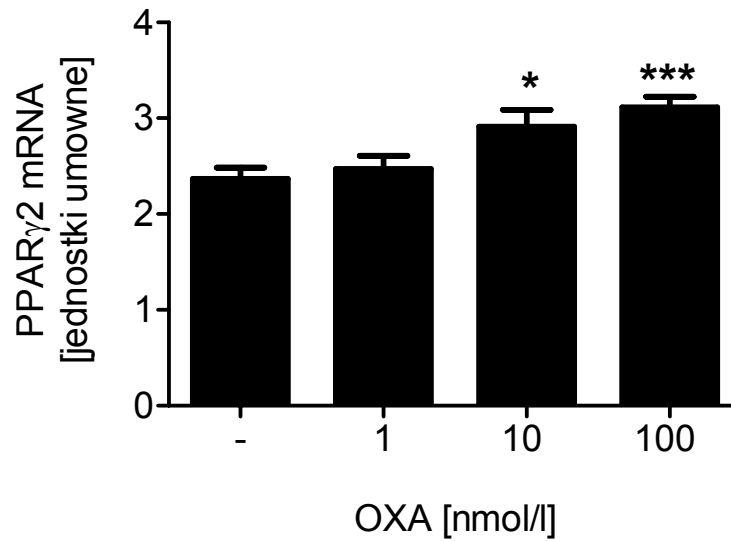
In vivo oreksyna zwiększa insulinowrażliwość (73). Jednym z hormonów tkanki tłuszczowej, który zwiększa wrażliwość tkanek obwodowych na insulinę jest adiponektyna (132, 133). Dlatego następnym zadaniem badania *in vivo* było określenie wpływu oreksyny A na poziom adiponektyny we krwi. Wykazano, że u szczurów o normalnej masie ciała oraz otyłych podawanie OXA spowodowało wyższe stężenie adiponektyny we krwi w porównaniu do szczurów, które otrzymywały 0,9% NaCl (Ryc. 33).



Ryc. 33. Wpływ oreksyny A na poziom adiponektyny we krwi u szczurów. Szczury zdrowe o normalnej masie ciała oraz z indukowaną otyłością (HFD) przez 4 tygodnie otrzymywały uwalnianą z pomp osmotycznych OXA (50 pmol/h). Po 4 tygodniach dokonano pomiaru adiponektyny we krwi. * $p < 0,05$ vs grupa, która otrzymywała 0,9% NaCl.

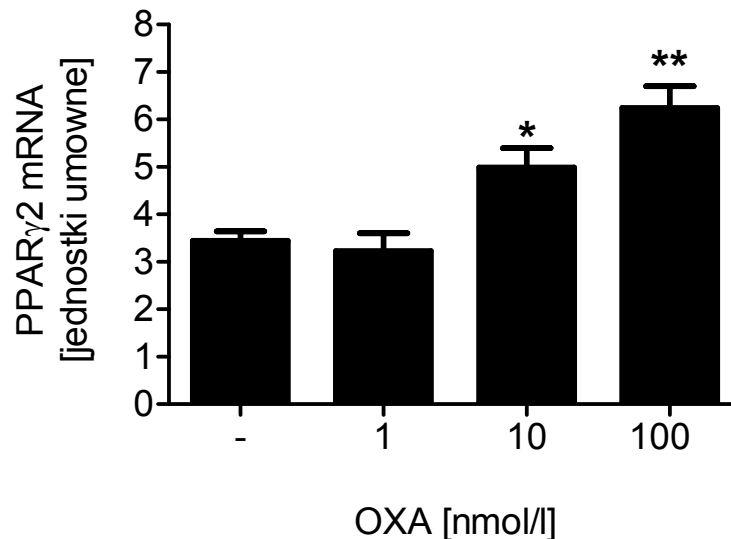
5.10 Oreksyna A stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2

Kolejna część eksperymentów przeprowadzona została z myślą o identyfikacji mechanizmów, które mogą być uwikłane w metaboliczne i endokrynne efekty oreksyny A na poziomie adipocytów. Z danych literaturowych wiadomo, że w adipocytach ludzkiej tkanki tłuszczowej oreksyna A zwiększa ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2, który w komórce tłuszczowej odgrywa jedną z kluczowych ról w regulacji metabolizmu, ekspresji genów oraz funkcji endokrynnych (112). W niniejszej pracy potwierdzono, że OXA ten sam wpływ wywiera na szczurze adipocyty oraz adipocyty 3T3-L1. W izolowanych adipocytach szczura po 8 h inkubacji w obecności 10 i 100 nmol/l OXA zaobserwowano wyższy poziom ekspresji PPAR γ 2 (Ryc. 34).



Ryc. 34. Wpływ oreksyny A na ekspresję mRNA PPAR γ 2 w izolowanych adipocytach szczura. Wyizolowane adipocyty przez 8 h inkubowano w obecności 1, 10 i 100 nmol/l OXA. Wyniki analizy PCR w czasie rzeczywistym przedstawiają poziom ekspresji PPAR γ 2 znormalizowany wobec HPRT. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

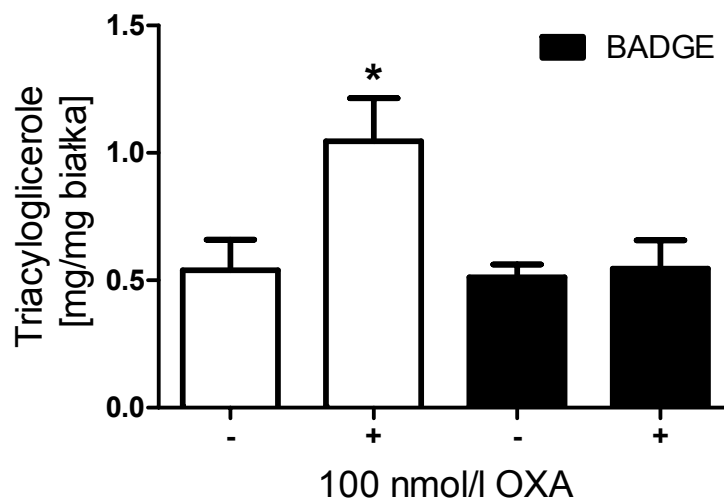
W przypadku adipocytów 3T3-L1 24 h stymulacja oreksyną A w stężeniach 10 i 100 nmol/l spowodowała wyższy poziom transkryptu PPAR γ 2 (Ryc. 35).



Ryc. 35. Wpływ oreksyny A na ekspresję mRNA PPAR γ 2 w zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1. Adipocyty przez 24 h inkubowano w obecności 1, 10 i 100 nmol/l OXA. Wyniki analizy PCR w czasie rzeczywistym przedstawiają poziom ekspresji PPAR γ 2 znormalizowany wobec HPRT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupa kontrolna.

5.11 Oreksyna A stymuluje magazynowanie triacylogliceroli aktywując PPAR γ

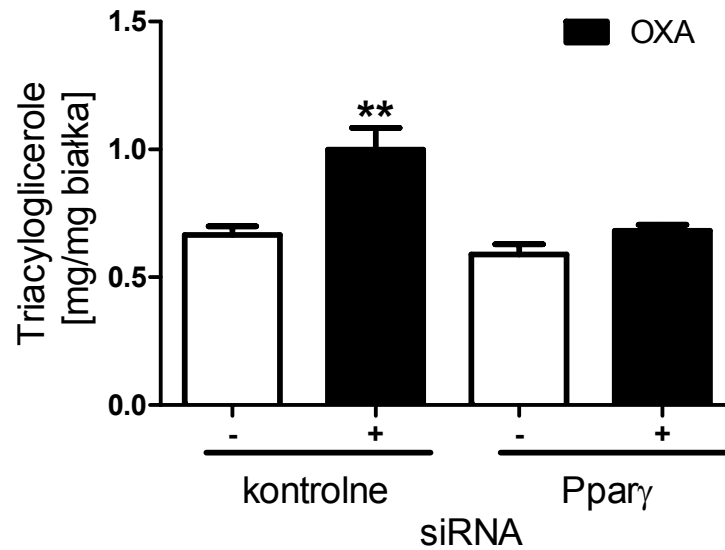
Aktywacja czynnika transkrypcyjnego PPAR γ związana jest z wzrostem ekspresji genów kontrolujących metabolizm i syntezę lipidów (134). Dlatego w kolejnych eksperymentach zbadano wpływ zahamowania aktywności PPAR γ na stymulowaną przez OXA syntezę triacylogliceroli. Wykazano, że w przypadku farmakologicznego wyhamowania aktywności PPAR γ przez użycie inhibitora BADGE oreksyna A nie zwiększyła poziomu triacylogliceroli w komórkach (Ryc. 36).



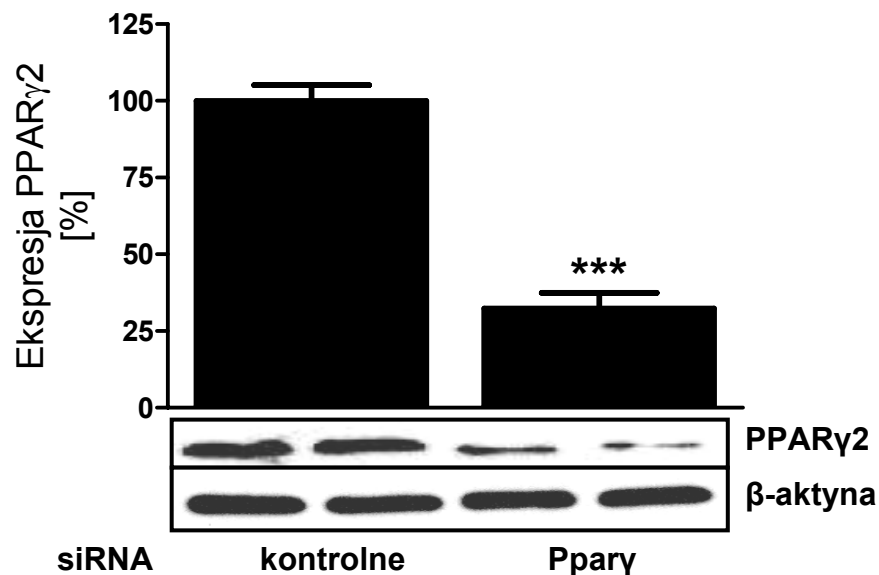
Ryc. 36. Wpływ inhibicji PPAR γ na stymulowane oreksyną A magazynowanie triacylogliceroli. Adipocyty 3T3-L1 przez 24 h stymulowano 100 nmol/l OXA w obecności lub nie 50 μ mol/l BADGE (farmakologiczny inhibitor PPAR γ). Po zakończonej inkubacji dokonano pomiaru triacylogliceroli. Wyniki znormalizowano do zawartości białka. * $p < 0,05$ vs grupa kontrolna.

W sytuacji wyhamowania ekspresji PPAR γ przez zastosowanie techniki siRNA, OXA również nie wpłynęła znacząco na zawartość triacylogliceroli w porównaniu do komórek nie poddanych działaniu oreksyny A (Ryc. 37).

Efektywność wyciszenia PPAR γ mierzona na poziomie białka wyniosła około 75% (Ryc. 38).

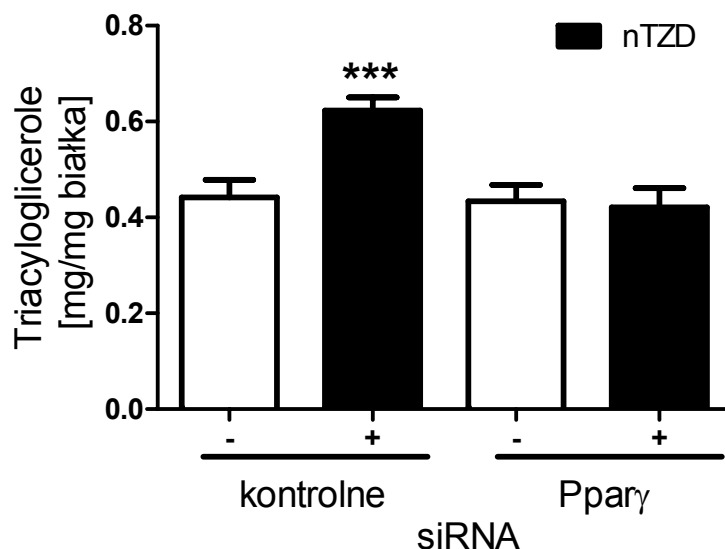


Ryc. 37. Wpływ wyciszenia ekspresji PPAR γ na stymulowane oreksyną A magazynowanie triacylogliceroli. Po wyciszeniu ekspresji PPAR γ adipocyty 3T3-L1 przez 24 h stymulowano 100 nmol/l oreksyną A. Ilość triacylogliceroli znormalizowano do poziomu białka. ** $p < 0,01$.



Ryc. 38. Efektywność wyciszenia ekspresji PPAR γ . Ekspresję białka PPAR γ zmierzono metodą western blot po 72 h transfekcji PPAR γ siRNA (200 nmol/l) lub kontrolnego siRNA (200 nmol/l). Panel dolny prezentuje reprezentatywny western blot, gdzie wielkość białek to odpowiednio 56 i 37 kDa dla PPAR γ 2 i β -aktyny. Wykres prezentuje poziom ekspresji PPAR γ 2 znormalizowany wobec β -aktyny. *** $p < 0,001$ vs adipocyty transfekowane kontrolnym siRNA.

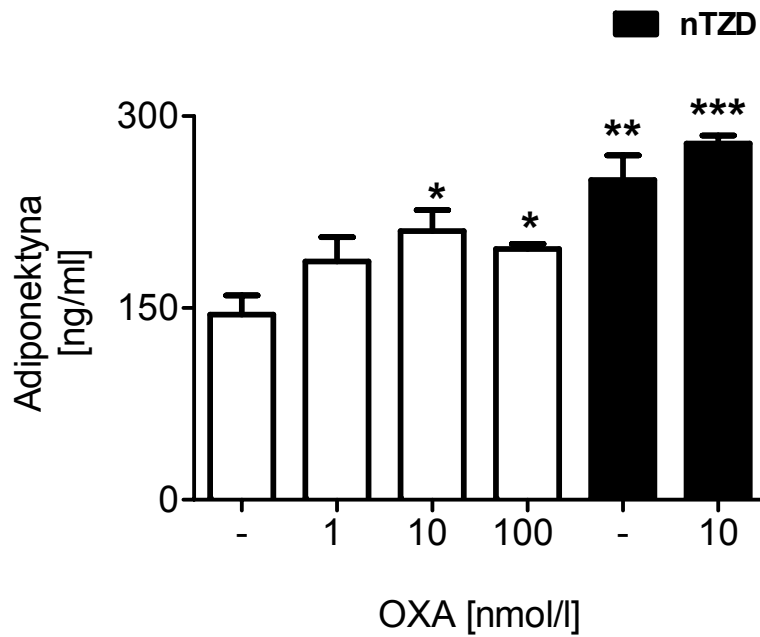
Aby potwierdzić udział PPAR γ w syntezie triacylogliceroli, w kolejnym eksperymencie komórki poddano działaniu nTZD (agonista PPAR γ). Wykazano, że nTZD zwiększył zawartość triacylogliceroli, a efekty te były zniesione przez wyhamowanie ekspresji PPAR γ przez zastosowanie techniki siRNA (Ryc. 39).



Ryc. 39. Wpływ wyciszenia ekspresji PPAR γ na stymulowaną przez nTZD akumulację triacylogliceroli. Po wyciszeniu ekspresji PPAR γ adipocyty 3T3-L1 przez 24 h stymulowano 10 nmol/l nTZD. Ilość triacylogliceroli znormalizowano do poziomu białka. *** $p < 0,001$.

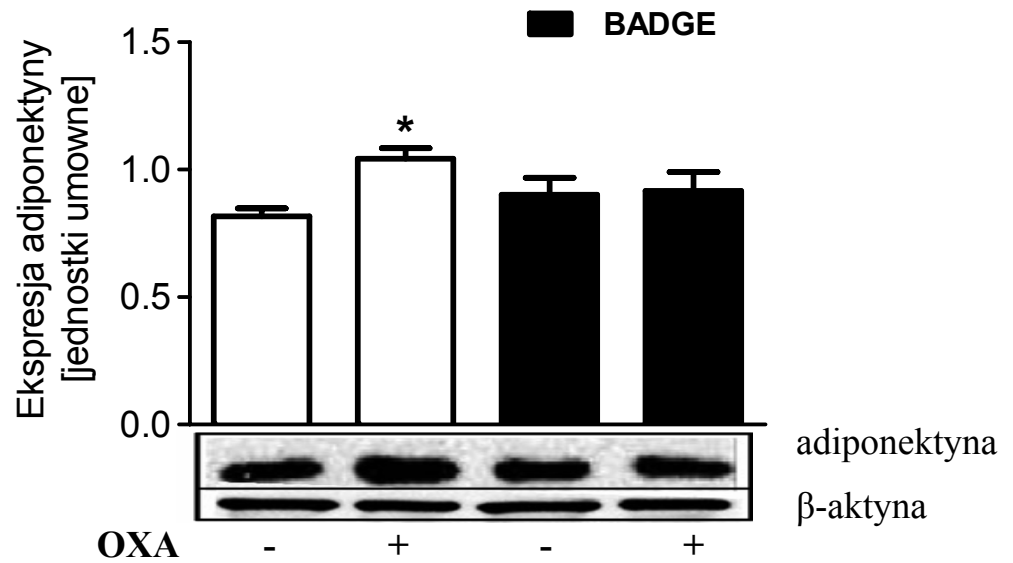
5.12 Oreksyna A stymuluje sekrecję i ekspresję adiponektyny. Powiązania z czynnikiem transkrypcyjnym PPAR γ .

Wcześniejsze prace wskazały, że aktywacja czynnika PPAR γ zwiększa ekspresję i sekrecję adiponektyny w komórkach 3T3-L1 (133). Wyniki te potwierdził eksperyment *in vitro* wykorzystujący adipocyty 3T3-L1. Wykazano, że zastosowany agonista PPAR γ – nTZD (10 μ mol/l) istotnie zwiększył sekrecję adiponektyny. Ponadto udokumentowano, że OXA reguluje sekrecję adiponektyny bezpośrednio z adipocytów. Po 24 h inkubacji w zależności od dawki OXA zwiększyła wydzielanie adiponektyny do medium inkubacyjnego. Maksymalny stymulujący efekt zaobserwowano przy stężeniach 10 i 100 nmol/l. Dawka 1 nmol/l nie miała wpływu na wydzielanie adiponektyny. Najwyższy poziom sekrecji zaobserwowano w momencie, gdy medium komórkowe zawierające nTZD (10 μ mol/l) uzupełniono dodatkowo w 10 nmol/l OXA. (Fig. 40).



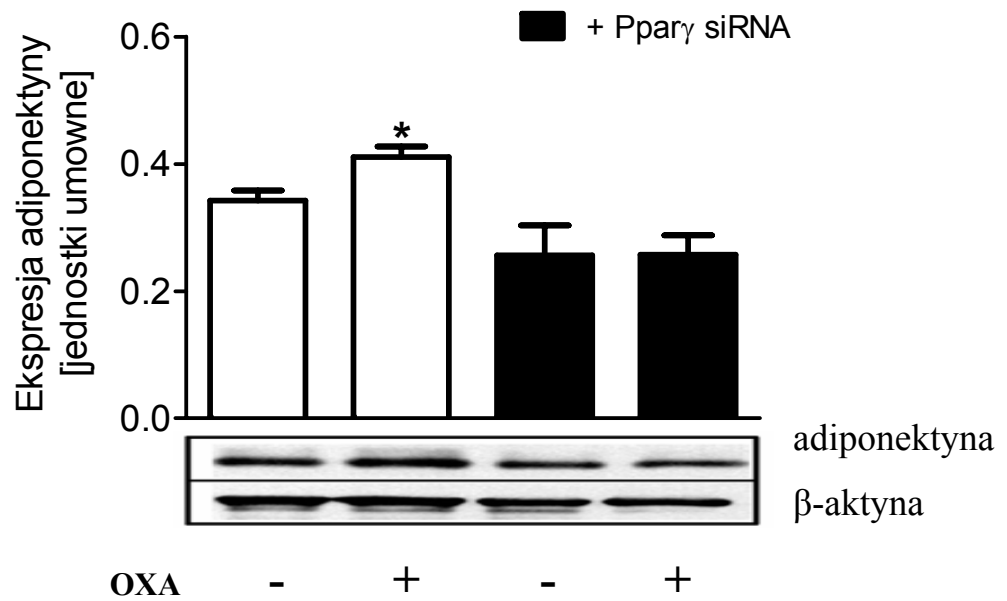
Ryc. 40. Wpływ oreksyny A i nTZD na sekrecję adiponektyny z adipocytów 3T3-L1. Zróżnicowane adipocyty 3T3-L1 inkubowano przez 24 h w obecności OXA (1, 10, 100 nmol/l), 10 μmol/l nTZD lub w kombinacji 10 nmol/l OXA z 10 μmol/l nTZD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupa kontrolna.

Biorąc pod uwagę stymulację ekspresji PPAR γ 2 przez OXA oraz pozytywną rolę tego czynnika transkrypcyjnego w ekspresji adiponektyny, przeanalizowano czy OXA reguluje ekspresję adiponektyny oraz w jaki sposób inhibicja PPAR γ wpłynie na ewentualne efekty OXA w tym zakresie. Wykazano, że OXA zwiększyła poziom ekspresji adiponektyny, co więcej dowiedziono, że efekt ten nie występuje w obecności BADGE (Ryc. 41).



Ryc. 41. Wpływ wyhamowania aktywności PPAR γ na stymulowaną przez oreksynę A ekspresję białka adiponektyny. Komórki przez 24 h inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA w połączeniu z 50 μ mol/l BADGE. Ekspresję adiponektyny (26 kDa) znormalizowano do β -aktyny (37 kDa). * $p < 0,05$ vs kontrola.

Wyciszenie ekspresji PPAR γ przez siRNA również skutecznie wyhamowało stymulujący wpływ OXA (Ryc. 42).



Ryc. 42. Wpływ wyciszenia ekspresji PPAR γ na indukowaną przez oreksynę A ekspresję białka adiponektyny. Po wyciszeniu ekspresji PPAR γ , adipocyty 3T3-L1 przez 24 h inkubowano w obecności 100 nmol/l OXA. Ekspresję mierzono metodą western blot. Ekspresję adiponektyny (26 kDa) znormalizowano do β -aktyny (37 kDa).
* $p < 0,05$ vs kontrolna.

6 Dyskusja

Mimo wiedzy o bardzo szerokim spektrum działania oreksyn, które zostało omówione we wstępie, aktualnie dostępne są jedynie dwie publikacje poświęcone roli oreksyn w żółtej tkance tłuszczowej. Jedna dowodzi promitogennych wpływów oreksyny A w linii komórkowej mysich preadipocytów 3T3-L1, druga wykazuje ekspresję receptorów oreksyn w ludzkich adipocytach oraz demonstruje, że oreksyna A w tych komórkach stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ i hamuje lipolizę. W niniejszej pracy wykorzystując adipocyty 3T3-L1 oraz adipocyty izolowane z tkanki tłuszczowej szczura wykazano, że OXA stymuluje translokację GLUT4 do błony komórkowej oraz zwiększa dkomórkowy transport glukozy. Udokumentowano również, że OXA stymuluje konwersję glukozy do kwasów tłuszczowych i ich akumulację w postaci triacylogliceroli. Zarówno transport glukozy jak i stymulacja lipogenezy związane są z aktywacją szlaku PI3-K/PKB. Dowiedziono również, że oreksyna A zwiększa ekspresję i sekrecję adiponektyny. Ponadto odnotowano, że stymulacja ekspresji czynnika PPAR γ przez OXA jest zjawiskiem charakterystycznym nie tylko dla ludzkich adipocytów, ale dotyczy również adipocytów 3T3-L1 oraz adipocytów pozyskanych z tkanki tłuszczowej szczura. Fenomen ten poszerzono o jego metaboliczne konsekwencje. Zarówno stymulowane przez oreksynę A odkładanie triacylogliceroli jak i ekspresja adiponektyny zależne były od aktywacji PPAR γ . Eksperymenty z wykorzystaniem szczurów potwierdziły, że znaczna część rezultatów otrzymanych *in vitro* znajduje odzwierciedlenie również *in vivo*.

6.1 Receptory oreksyn w adipocytach

Pierwsze przesłanki na temat obecności receptorów oreksyn w tkance tłuszczowej przyniosły rezultaty badań dotyczące roli oreksyn w osi adipoinsularnej u szczura. Autorzy pracy wykazali, że podskórne podanie oreksyny A i w mniejszym stopniu oreksyny B powoduje wzrost poziomu leptyny we krwi (100). Ponieważ tkanka tłuszczowa jest głównym źródłem leptyny w organizmie (14), rezultaty te zasugerowały, że oreksyny mogą stymulować sekrecję leptyny działając bezpośrednio na adipocyty. Pierwsze dowody na takie wpływy oreksyn na tkankę tłuszczową uzyskano jednak w późniejszych badaniach nad preadipocytami 3T3-L1. Wykazano, że obydwie peptydy regulują proliferację oraz aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm tlenowy preadipocytów 3T3-L1 (111). Autorzy pracy nie badali jednak

wpływu oreksyn na zróżnicowane adipocyty 3T3-L1, nie wykonali oni również detekcji receptorów OXR1 i OXR2 w preadipocytach i zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1. Ekspresję receptorów oreksyn w tkance tłuszczowej wykryto po raz pierwszy w ludzkich adipocytach (112). Stosując metody RT-PCR i western blot, autorzy wymienionej publikacji wykryli obydwa receptory, równocześnie wykazując, że OXR1 ulega silniejszej ekspresji w porównaniu do OXR2. W niniejszej pracy, opierając się o wcześniejsze rezultaty badań przystąpiono do próby wykazania ekspresji receptorów oreksyn podczas różnicowania preadipocytów 3T3-L1 oraz w adipocytach izolowanych z okołojądrowej tkanki tłuszczowej szczura. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że transkrypty OXR1 i OXR2 obecne są w fibroblastach (preadipocytach) oraz w zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1. Co więcej odnotowano, że ekspresja OXR1 wzrasta podczas procesu różnicowania. W przypadku OXR2 wykryto względnie stały poziom ekspresji bez różnic pomiędzy komórkami zróżnicowanymi, a niepoddanymi procesowi różnicowania. Wyniki te sugerują, że OXR1 jest prawdopodobnie bardziej istotniejszym typem receptora oreksyn w regulacji funkcji zróżnicowanych adipocytów. Wyższa ekspresja mRNA kodującego OXR1, który jest receptorem selektywnie wiążącym OXA (51) sugeruje ponadto, że to właśnie oreksyna A odgrywa bardziej znaczącą rolę w regulacji funkcji adipocytów. Potwierdzają to wyniki ukazujące, że zarówno w preadipocytach 3T3-L1 jak i ludzkich adipocytach oreksyna A wywiera znacznie wyższe efekty biologiczne w porównaniu do oreksyny B (111, 112).

W przypadku adipocytów pozyskanych z okołojądrowej tkanki tłuszczowej szczura wykryto ekspresję obydwu receptorów oreksyn. Nie zauważono różnic w poziomie ekspresji. Zagadnienie dotyczące ekspresji receptorów oreksyn w tkance tłuszczowej szczura zostało już podjęte we wcześniejszej pracy (135). Co ciekawe, autorzy wspomnianej publikacji stosując technikę PCR w czasie rzeczywistym nie odnotowali znaczących ilości kopii transkryptów OXR1 i OXR2. Różnice te mogą wynikać z czułości reakcji PCR. Przemawia za tym fakt, że ta sama grupa nie wykryła również ekspresji receptorów oreksyn w trzustce, których obecność została jednak później dobrze udokumentowana (95). Ponadto, nie podali również jakiego rodzaju tłuszczu dotyczyła analiza. Zgodnie z danymi literaturowymi tkankę tłuszczową w zależności od lokalizacji w organizmie charakteryzują różnice w profilu sekrecyjnym i ekspresyjnym, włączając ekspresję receptorów hormonów peptydowych (136). Wiarygodność wyników PCR, funkcjonalną rolę receptorów oreksyn oraz istotność dalszych badań

poświęconych oreksynie A w adipocytach szczura i 3T3-L1 dowiodła analiza western blot. Stosując tę metodę, OXR1 i OXR2 wykryto zarówno we frakcji białek błonowych pozyskanych z izolowanych adipocytów szczura jak i z adipocytów 3T3-L1. Wraz z rezultatami jakie dostarczyła analiza PCR, wyniki te były podstawą do dalszych badań nad rolą oreksyny A w komórkach tłuszczowych.

6.2 Oreksyna A w transporcie glukozy – potencjalny mechanizm w adipocytach

Normalizacja i kontrola poziomu glukozy we krwi to najistotniejsze cele w terapii cukrzycy typu 1 i 2. Podwyższony poziom glukozy, jej późniejsze przemiany oraz synteza zaawansowanych produktów glikacji stanowią najpoważniejsze źródła komplikacji towarzyszące cukrzycy (29, 137, 138). Co ciekawe, wiele z nowo poznanych hormonów peptydowych takich jak FGF-21, grelina czy obestatyna zostały scharakteryzowane jako czynniki stymulujące transport glukozy do adipocytów. Dlatego peptydy te oraz ich receptory bierze się pod uwagę jako potencjalne i skuteczne cele w normalizacji poziomu glukozy we krwi u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 (139-141). Badania nad oreksynami wykazały, że hormony te odgrywają istotną rolę w homeostazie glukozy całego organizmu (92). W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że OXA stymuluje transport glukozy do adipocytów pozyskanych z tkanki tłuszczowej szczura oraz zróżnicowanych adipocytów 3T3-L1. Z wcześniej opublikowanych prac wiadomo, że u szczurów podanie OXA obniża poziom glukozy we krwi (109). Identyczny wpływ zaobserwowano również u myszy, co więcej efekt ten dotyczył także zwierząt z cukrzycą wywołaną przez podanie streptozotocyny (123). U myszy podanie oreksyny nie powoduje zmian w stężeniu insuliny we krwi (123). Dlatego sugeruje to, że OXA obniża poziom glukozy we krwi niezależnie od efektów insuliny. Analiza danych literaturowych ukazuje kilka potencjalnych mechanizmów, które mogą być wykorzystywane przez OXA w regulacji transportu glukozy do komórek i jej poziomu we krwi. Dowiedziono, że OXA hamuje absorpcję glukozy z jelita, powodując tym samym spadek jej stężenia we krwi (109). Inne z rezultatów sugerują, że OXA stymuluje transport glukozy do komórek mięśniowych aktywując sympatyczny układ nerwowy (86). Ponadto w linii komórkowej HEK293 ze stabilną ekspresją OXR1 zaobserwowano, że efekt ten może być wynikiem aktywacji podjednostki α czynnika transkrypcyjnego HIF-1, którego ekspresja związana jest z pobudzeniem transportu glukozy do komórek oraz jej glikolitycznych przemian (142). Wyniki ukazujące, że OXA zwiększa transport glukozy do adipocytów sugerują, że

ponad zaproponowane powyżej mechanizmy, również tkanka tłuszczowa może być istotnym elementem w regulacji poziomu glukozy we krwi przez ten hormon. Co prawda należy zaznaczyć, że rezultaty dowodzące, że OXA stymuluje transport glukozy do komórek tłuszczowych nie znajdują potwierdzenia we wcześniej opublikowanych wynikach ukazujących brak wpływu OXA na transport glukozy do adipocytów 3T3-L1 (123). Wyjaśnieniem tych różnic mogą być inne układy doświadczalne. Autorzy wspomnianej pracy inkubowali adipocyty jednocześnie z insuliną i oreksyną A, ponadto stężenie oreksyny A mogło być zbyt niskie (30 nmol/l) by zwiększyć efekty insuliny. Dodatkowo czas ekspozycji komórek na badane peptydy mógł mieć istotne znaczenie dla różnic pomiędzy rezultatami.

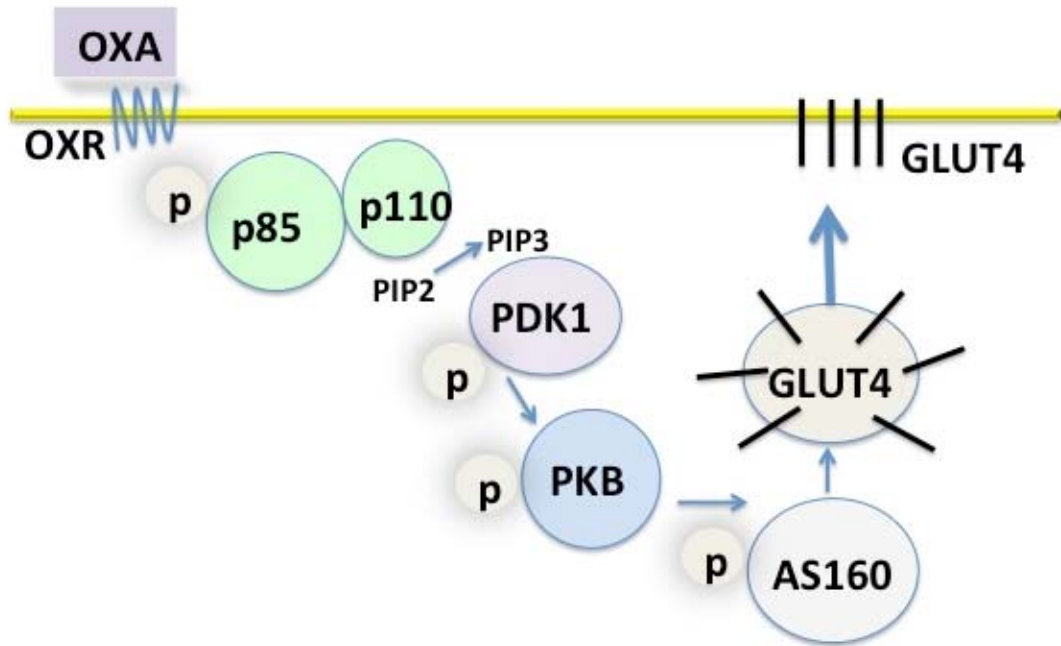
Kolejnym krokiem podjętym w badaniu zagadnienia było poznanie potencjalnego mechanizmu wykorzystywanego przez OXA w regulacji transportu glukozy do adipocytów. Transport glukozy do komórek regulowany jest przez białka określane jako transportery glukozy – GLUT. Do tej pory scharakteryzowano 14 izoform o tkankospecyficznym wyrażeniu, odmiennym mechanizmie działania i różnym powinowactwie do glukozy (143, 144). W przypadku adipocytów zidentyfikowano ekspresję kilku izoform transporterów glukozy: GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT8, GLUT12 (143). Dane literaturowe wskazują, że najistotniejszą rolę odgrywa jego czwarta izoforma (GLUT4). Wiadomo, że w adipocytach obniżona ekspresja GLUT4 związana jest z występowaniem nieprawidłowości w homeostazie glukozy oraz rozwojem cukrzycy typu 2 (145). Z drugiej strony, jego nadekspresja w tkance tłuszczowej powoduje zwiększoną tolerancję na glukozę, podnosi insulinowrażliwość oraz redukuje poziom insuliny i glukozy we krwi u otyłych i diabetycznych myszy (146, 147). GLUT4 jest białkiem zbudowanym z dwunastu domen przezbłonowych, które odpowiada za zgodny z gradientem stężeń transport glukozy do komórki. W mięśniach oraz adipocytach, jego aktywność jest precyzyjnie regulowana przez insulinę. Insulina, która w sytuacji wzrostu stężenia glukozy we krwi jest uwalniana z komórek β wysp trzustkowych stymuluje translokację GLUT4 do błony komórkowej, przez co powoduje wzrost transportu glukozy do komórek i tym samym spadek jej poziomu we krwi (148). W przeprowadzonych eksperymentach stosując dwie odmienne techniki (western blot i immunofluorescencję) wykazano, że oreksyna A zwiększyła translokację GLUT4 z cytoplazmy do błony komórkowej. Efekt ten był jednak słabszy w porównaniu z insuliną. Należy jednak wspomnieć, że insulina jest czynnikiem najsilniej wpływającym na transport glukozy i translokację GLUT4 do błony komórkowej (149). Wyniki te

pozwalają wnioskować, że w adipocytach OXA indukuje transport glukozy aktywując translokację GLUT4 z cytoplazmy do błony komórkowej.

Mechanizm, który odpowiada za translokację białka GLUT4 został i jest ciągle charakteryzowany głównie w badaniach nad przekazywaniem sygnału receptora insuliny. Uważa się, że podstawową rolę w tym procesie odgrywa aktywacja kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K). W przypadku receptora insuliny w aktywacji PI3-K pośredniczy substrat receptora insuliny 1 (IRS1) (149). Co ciekawe, kilka niezależnych zespołów wykazało, że kinaza 3-fosfatydyloinozytolu jest również aktywowana przez OXR1. Wykorzystując linie komórkową CHO ze stabilną ekspresją OXR1 dowiedziono, że do pełnej egzekucji sygnału odreceptorowego niezbędna jest aktywacja PI3-K, a inhibicja tej kinazy skutkuje również częściowym wyhamowaniem efektów biologicznych oreksyny A (61, 150). Bazując na tych doniesieniach, w niniejszej pracy postanowiono prześledzić czy kinaza ta pośredniczy również w stymulowanych przez OXA transporcie glukozy oraz translokacji GLUT4. W tym celu dokonano pomiaru transportu glukozy w obecności LY 294002. Ten farmakologiczny inhibitor specyficznie hamuje aktywność PI3-K (151). Przeprowadzone eksperymenty ujawniły, że inhibicja PI3-K zniosła stymulujące efekty oreksyny A na transport glukozy, co więcej w obecności LY 294002 oreksyna A nie wpłynęła istotnie na poziom translokacji GLUT4 do błony komórkowej. Bardzo podobne, hamujące efekty LY 294002 na translokację GLUT4 oraz transport glukozy zaobserwowano również podczas inkubacji adipocytów 3T3-L1 z insuliną. W przypadku insuliny rezultaty te są w pełni zgodne z wcześniej opublikowanymi wynikami (152). Natomiast w przypadku OXA po raz pierwszy dowiedziono tego, że w komórkach tłuszczowych receptory oreksyn wykorzystują PI3-K.

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, w funkcjonowaniu PI3-K kluczową rolę odgrywają najprawdopodobniej dwie podjednostki określane jako p85 (podjednostka regulatorowa) oraz p110 (katalityczna) (153). Aktywność obydwu podjednostek jest odwracalnie regulowana przez fosforylację reszt aminokwasowych wchodzących w ich skład. Wiadomo, że stymulacja insuliną zwiększa poziom fosforylacji tyrozynowej w podjednostce p85 bez wpływu na jednostkę katalityczną p110 (154). W podjętych w pracy badaniach nad udziałem PI3-K w egzekucji sygnału hormonalnego oreksyny A w adipocytach wykazano, że peptyd ten podobnie do insuliny podnosi poziom fosforylacji tyrozynowej w podjednostce p85. Należy jednak wspomnieć, że rola p85 w dalszej aktywacji PI3-K nie jest do końca wyjaśniona. Z jednej strony udokumentowano, że

fosforylacja w podjednostce p85 nie jest konieczna do aktywacji podjednostki katalitycznej p110. Z drugiej strony wykazano, że fosforylacja p85 związana jest ze zwiększeniem transportu glukozy do adipocytów (155). Dlatego też, wyniki te nie wskazują jednoznacznie czy fosforylacja p85 jest kluczowym momentem w aktywacji PI3-K przez oreksynę A. Bezpośrednich dowodów na to, że OXA aktywuje PI3-K dostarczyły wyniki ukazujące, że w adipocytach 3T3-L1 stymulacja oreksyną A zwiększyła syntezę 1,4,5-trifosforanu inozytolu (PIP3). PIP3 jest wtórnym przekaźnikiem syntetyzowanym i wykorzystywanym przez PI3-K na drodze dalszej egzekucji sygnału hormonalnego (156). Analizując mechanizm odpowiedzialny za regulację translokacji GLUT4 wykazano, że PIP3 jest konieczny do aktywacji dwóch kolejnych kinaz: kinazy białkowej B (PKB) oraz kinazy 1 zależnej od fosfatydyloinozytolu (PDK1). PIP3 jest wymagany podczas rekrutacji PKB do błony komórkowej, gdzie na skutek równocześnie aktywowanej PDK1 (również przez PIP3) PKB podlega fosforylacji. Fosforylacja PKB jest krokiem koniecznym do dalszych etapów rozpoczęcia translokacji cytoplazmatycznej puli GLUT4 do błony komórkowej i zwiększenia transportu glukozy (157-159). Rezultaty przeprowadzonych podczas realizacji tej pracy eksperymentów ujawniły, że w adipocytach 3T3-L1 oreksyna A zwiększyła poziom ufosforylowania kinaz PDK1 oraz PKB. Wyniki dowodzące aktywacji szlaku PI3-K/PKB w adipocytach znajdują potwierdzenie w pracy poświęconej roli OXA w regulacji ekspresji glukagonu. W linii komórek InR-G9 wykazano, że oreksyna A hamuje ekspresję glukagonu, a efekt ten był częściowo wynikiem aktywacji kinaz PKB i PDK1 (96). Ponieważ w opisywanych doświadczeniach wykonano analizę wpływu oreksyny A na poziom fosforylacji białek, a nie wyznaczono ich aktywności, dodatkowo funkcjonalne znaczenie otrzymanych wyników potwierdzono badając wpływ OXA na fosforylację białka AS160. AS160 jest białkiem zidentyfikowanym jako substrat PKB, który w momencie gdy PKB jest aktywna jest przez nią fosforylowane, co jest wymagane do translokacji GLUT4 do błony komórkowej (160). Przeprowadzona część eksperymentalna ujawniła, że OXA zwiększyła poziom ufosforylowanego białka AS160. Pozwala to wnioskować, że efekty OXA sięgają nie tylko zmian w poziomie ufosforylowania białek (p85, PDK1 i PKB) ale związane są również z zwiększeniem ich aktywności, co przekłada się na efekty biologiczne takie jak aktywacja AS160 przez PKB. Proponowany mechanizm, który może odpowiadać za stymulowany przez OXA transport glukozy przedstawiono na rycinie 43.



Ryc. 43. Proponowany mechanizm odpowiadający za regulację transportu glukozy przez oreksynę A w adipocytach. Oreksyna A aktywuje PI3-K co prowadzi do wzrostu syntezy PIP3 i aktywacji PDK1. PDK1 zwiększa poziom ufosforylowania PKB, która następnie aktywuje jej substrat białko AS160. Prowadzi to do translokacji cytoplazmatycznej puli białka GLUT4 do błony komórkowej, którą zaznaczono żółtą linią. OXR: receptor oreksyny.

Należy wspomnieć, że białko AS160 fosforylowane jest również przez aktywatory kinazy białkowej C (161). Z wcześniej opublikowanych danych wynika, że receptory oreksyn mogą wykorzystywać również ten typ kinazy (162, 163), dlatego może to sugerować, że translokacja GLUT4 może być niezależna lub tylko częściowo zależna od aktywacji szlaku PI3-K/PKB. W pracy nie prześledzono wpływu OXA na PKC, należy jednak podkreślić, że w sytuacji specyficznego wyhamowania aktywności PI3-K przez LY 294002 OXA nie wpłynęła istotnie na transport glukozy. Dlatego można stwierdzić, że to właśnie aktywacja szlaku PI-3K/PKB jest kluczowym momentem w stymulacji transportu glukozy przez oreksynę A w komórkach tłuszczowych.

6.3 Wpływ oreksyny A na metabolizm glukozy i lipidów

Poddane powyżej dyskusji wyniki demonstrują, że OXA stymuluje transport glukozy do adipocytów. W adipocytach, podobnie jak w innych komórkach, glukoza jest fosforylowana i w kolejnych etapach szlaku glikolizy jest przekształcana do pirogronianu. Pirogronian w wyniku oksydacyjnej dekarboksylacji podlega przemianie do acetylowanego koenzymu A (Acetylo-CoA). Acetylo-CoA jest utleniany w cyklu kwasów trikarboksylowych prowadząc do powstania równoważników redukujących: NADH (do syntezy ATP) oraz stanowiącego donor potencjału redukującego NADPH (164). W celu prześledzenia wpływu OXA na dalsze przemiany glukozy w adipocytach, w pierwszym kroku określono jej bezpośredni efekt na syntezę ATP. Otrzymane rezultaty ujawniły, że OXA nie tylko zwiększa transport glukozy do komórek tłuszczowych, ale towarzyszy temu również wzrost syntezy ATP. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi, które otrzymano w wyniku eksperymentów poświęconych roli oreksyny A w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za dalszą egzekucję sygnału odreceptorowego (142). Autorzy wspomnianej pracy odnotowali, że w komórkach HEK293 ze stabilną ekspresją OXR1, inkubacja w obecności oreksyny A znacząco zwiększyła poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Ponadto zauważono, że regulując ekspresję enzymów glikolitycznych (stymulacja dehydrogenazy pirgronianowej i hamowanie dehydrogenazy mleczanowej) OXA promuje metabolizm tlenowy komórki. Co ciekawe, w tym przypadku opisane efekty zależne były od aktywowanego przez OXA czynnika HIF-1 α , którego genetyczny nokaut zupełnie hamował stymulowaną przez oreksynę A syntezę ATP. W niniejszej pracy nie prześledzono tego, czy w adipocytach wzrost zawartości ATP może być również spowodowany aktywacją HIF-1 α . Opierając się jednak o omówione w dalszej części dyskusji inne efekty OXA w adipocytach, wydaje się, że nie. Przede wszystkim należy wspomnieć, że aktywacja HIF-1 α jest zjawiskiem niekorzystnym w tkance tłuszczowej. Powoduje ona wzrost sekrecji adipokin prozapalnych (np. rezystyny czy TNF α) oraz upośledza przebieg sygnału receptora insuliny (37, 39). Natomiast tak jak zostanie to omówione w dalszej części pracy oraz zgodnie z danymi literaturowymi (73), OXA nie wpływa hamująco na efekty insuliny, a uwrażliwia komórki na jej działanie. Dodatkowo z doświadczeń *in vivo* wiadomo, że OXA redukuje poziom TNF α we krwi szczurów otyłych oraz z

indukowaną cukrzycą typu 2². Dlatego wydaje się, że w przypadku adipocytów, HIF-1 α nie pośredniczy w regulowanych przez OXA efektach metabolicznych, a zwiększenie syntezy ATP może być wynikiem większej dostępności substratu wynikającego z nasilonego transportu glukozy do komórek.

Tak jak zaznaczono powyżej, powstający w wyniku przemian glukozy acetylo-CoA służy jako substrat do syntezy ATP. Jednak szczególnie w adipocytach, intermediat ten wykorzystywany jest również jako substrat do syntezy kwasów tłuszczowych w procesie lipogenezy (164). Analizując zagadnienie wpływu OXA na syntezę kwasów tłuszczowych posłużono się izolowanymi adipocytami szczura. Wykazano, że oreksyna A istotnie zwiększyła poziom syntezy kwasów tłuszczowych w adipocytach. Ponadto spowodowała ona zwiększenie efektów insuliny. W literaturze brak jest danych poświęconych temu zagadnieniu. Próbując wyjaśnić potencjalny mechanizm tego efektu, w przeprowadzonych w pracy badaniach dowiedziono, że do stymulowanej przez oreksynę A syntezy kwasów tłuszczowych niezbędna jest aktywacja PI3-K. Podobnie, tak jak w przypadku transportu glukozy, farmakologiczna inhibicja PI3-K zupełnie wyhamowała stymulujący wpływ oreksyny A na syntezę kwasów tłuszczowych. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska może być to, że w sytuacji gdy PI3-K jest nieaktywna, oreksyna A nie wpływa również na dokomórkowy transport glukozy i tym samym nie zwiększa ilości wewnątrzkomórkowej glukozy wykorzystywanej do syntezy reszt acetylowych, niezbędnych podczas syntezy kwasów tłuszczowych. Dlatego nie jest zupełnie jasne czy kinaza ta pośredniczy bezpośrednio w regulacji syntezy kwasów tłuszczowych przez oreksynę A, czy też jej aktywność wymagana jest do zwiększenia dostępności substratu jakim jest glukoza. Na pewno pomocne byłoby tu prześledzenie wpływu oreksyny A na aktywność enzymów regulujących syntezę kwasów tłuszczowych.

W adipocytach kwasy tłuszczowe podlegają estryfikacji z glicerolem tworząc triacyloglicerole, które są następnie magazynowane i wykorzystywane jako źródło energii w sytuacji ujemnego bilansu energetycznego (37). W celu określenia roli OXA w akumulacji triacylogliceroli posłużono się adipocytami 3T3-L1. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że inkubacja w obecności OXA spowodowała istotny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli. Ponadto OXA zwiększyła działanie insuliny w tym zakresie. Poziom triacylogliceroli jest precyzyjnie regulowany przez dwa procesy: lipoogenezę i lipolizę (165).

² Niepublikowane wyniki zespołów prof. K.W. Nowaka i prof. M.Z. Strowskiego

Magazynowane w tkance tłuszczowej triacyloglicerole powstają w wyniku estryfikacji glicerolu kwasami tłuszczowymi. Z drugiej strony, na skutek lipolizy zmagazynowane w ten sposób kwasy tłuszczowe mogą być powtórnie dostępne dla innych tkanek i stanowić źródło energii. Część eksperymentalna ujawniła, że działając na adipocyty 3T3-L1, oreksyna A spowodowała znaczny spadek uwolnionego do medium komórkowego glicerolu. Ponieważ obok ilości wolnych kwasów tłuszczowych glicerol jest powszechnie stosowanym markerem lipolizy (117), jego spadek oznacza, że działając na adipocyty OXA nie tylko stymuluje akumulację triacylogliceroli, ale dodatkowo hamuje lipolizę.

Opisane antylipolityczne właściwości OXA w adipocytach 3T3-L1 znajdują potwierdzenie we wcześniej opisanych efektach oreksyny A na proces lipolizy w adipocytach pozyskanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej (112). Co więcej, autorzy cytowanej pracy po części zaproponowali potencjalny mechanizm hamującego efektu oreksyny A. Zauważyli, że OXA zmniejsza ekspresję lipazy wrażliwej na hormony (HSL). HSL jest enzymem, który prowadzi reakcję hydrolizy triacyloglicerolu prowadząc do powstania diacyloglicerolu i wolnej reszty kwasu tłuszczowego. Jego aktywność jest stymulowana przez katecholaminy i hamowana przez insulinę (128). W tej pracy w celu częściowej charakterystyki mechanizmu stojącego za hamowaną przez oreksynę A lipolizę w 3T3-L1 przeanalizowano jej wpływ na ekspresję mRNA dwóch enzymów lipolitycznych: lipazy wrażliwej na hormony (HSL) oraz lipazy triacyloglicerolowej (ATGL) (166). Ponadto określono wpływ OXA na ekspresję perilipiny, która jest białkiem zlokalizowanym na powierzchni odkładanych w adipocytach kropeł tłuszczu, chroniąc je przed działaniem lipaz i ograniczając tym samym poziom lipolizy (167). Otrzymane wyniki wykazały, że oreksyna A wyhamowała jedynie ekspresję HSL. Wiadomo, że aktywność HSL stymulowana jest przez wtórny przekaźnik jakim jest cykliczny AMP (59, 128). Co ciekawe, mimo rozbieżności w zagadnieniu, pewna część danych dowodzi, że OXA hamuje syntezę cAMP w niektórych typach komórek jak np. InR-G9 (96). Zasugerowało to, że hamując syntezę cAMP oreksyna A może regulować nie tylko ekspresję ale i aktywność HSL w adipocytach. W celu weryfikacji tej hipotezy określono wpływ OXA na syntezę cAMP w adipocytach 3T3-L1. Wykazano jednak, że OXA nie wpłynęła istotnie na poziom cAMP. Dlatego wydaje się, że udział cAMP jako modulatora aktywności HSL można wykluczyć z rozważań nad antylipolitycznymi właściwościami oreksyny A w adipocytach 3T3-L1.

Konkludując, prezentowane wyniki pozwalają twierdzić, że *in vitro* oreksyna A stymuluje konwersję glukozy do kwasów tłuszczowych, zwiększa akumulację triacylogliceroli hamując jednocześnie liolizę. Antylipolityczne właściwości OXA przynajmniej po części związane są z redukcją ekspresji lipazy wrażliwej na hormony.

6.4 Efekty oreksyny A w modelu *in vivo*

Następnym podjętym zagadnieniem była próba określenia efektów OXA *in vivo*. Skoncentrowano się na wpływie tego peptydu na masę ciała oraz regulację syntetyzowanego przede wszystkim w tkance tłuszczowej hormonu adiponektyny.

Mając na uwadze problem jakim jest otyłość, stymulacja syntezy triacylogliceroli w adipocytach wydaje się być efektem niepożądanym. Sugeruje to, że zwiększając odkładnie triacylogliceroli oreksyna A powinna przyczyniać się do powstawania hipertroficznycch, insulinoopornych adipocytów oraz wzrostu masy ciała. Dodatkowo przypuszczenia te znajdują poparcie w danych literaturowych ukazujących, że oreksyna A stymuluje proliferację preadipocytów 3T3-L1 (111). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy wiadomo, że obok zwiększenia objętości adipocytów, to właśnie wzrost liczby adipocytów (hiperplazja) jest najistotniejszą przyczyną powstawania otyłości i nieprawidłowości w metabolizmie komórek tłuszczowych (37). W niniejszej pracy, mimo wyraźnej stymulacji syntezy kwasów tłuszczowych i odkładania triacylogliceroli zaobserwowanych *in vitro*, 4. tygodniowe podawanie OXA nie wywarło żadnego wpływu na masę ciała u szczurów zdrowych o normalnej masie ciała oraz otyłych. Rola oreksyny A w regulacji masy ciała jest zagadnieniem intensywnie analizowanym. Wiadomo, że w sytuacji kiedy system oreksynowy nie funkcjonuje prawidłowo jest to bardzo często związane z otyłością (168, 169). Myszy z nokautem preprooreksyny charakteryzuje obniżone pobieranie pokarmu, ale paradoksalnie te same myszy cechuje też zwiększona masa ciała (85, 169). Z drugiej strony, podanie selektywnego agonisty receptora OXR2 oraz nadekspresja preprooreksyny powodują redukcję masy ciała u myszy otyłych (73). Zaobserwowany brak wpływu 4. tygodniowego podawania oreksyny A na masę ciała może wynikać ze zbyt krótkiego okresu eksperymentu oraz innego układu doświadczalnego. Niestety, z powodu braku dostępu do specjalistycznego sprzętu, u szczurów wykorzystanych w przewlekłym doświadczeniu z pompami osmotycznymi nie scharakteryzowano wpływu OXA na ilość, kompozycję komórkową oraz morfologię tkanki tłuszczowej. W tym kontekście szczególnie interesujące są wyniki ukazujące promitogenne wpływy OXA w preadipocytach

3T3-L1. Z jednej strony, jak już zaznaczono, zwiększona ilość adipocytów jest pozytywnie skorelowana z otyłością. Z drugiej strony, szczególnie w tłuszczu podskórnym większa ilość wczesnych, małych adipocytów u ludzi otyłych jest związana z lepszymi parametrami węglowodanowo-lipidowymi we krwi (170). Wpływ OXA na proliferację preadipocytów, ze szczególnym uwzględnieniem tkanki tłuszczowej z różnych miejsc w organizmie wymaga dalszego poznania *in vivo*. Dodatkowo zgłębiając wpływ OXA na tkankę tłuszczową *in vivo*, interesującym zagadnieniem będzie zbadanie wpływu OXA na plastyczność tkanki tłuszczowej. Pojęcie to charakteryzuje zdolność adipocytów do zwiększania funkcji sekrecyjnej adipokin oraz zwiększonej wrażliwości na insulinę (171).

Ponieważ regulacja masy ciała opiera się głównie na zmianach ilości tkanki tłuszczowej (131), przy braku różnic w masie ciała można wnioskować, że *in vivo* OXA nie zwiększyła ilości triacylogliceroli w żółtej tkance tłuszczowej i tym samym nie wpłynęła istotnie na masę ciała. Innym możliwym wyjaśnieniem dlaczego pomimo stymulacji pobierania pokarmu *in vivo* i odkładania triacylogliceroli *in vitro* oreksyna A nie zwiększa masy ciała, a zgodnie z większą częścią danych wykazuje działanie ochronne w tym kierunku, są wyniki dowodzące, że OXA promuje ujemny bilans energetyczny. Zagadnienie to dość szczegółowo omówiono we wstępie, wskazując na powiązania oreksyn i ich receptorów z wydatkowaniem energii i brunatną tkanką tłuszczową. Ponadto częściowym wyjaśnieniem braku wpływu oreksyny A na masę ciała mogą być nieopublikowane badania własne (pominięte w rozdziale wyniki), które wykazały, że mimo prometogennych wpływów na preadipocyty, OXA w żaden sposób nie wpływa na różnicowanie preadipocytów 3T3-L1 w adipocyty. Zgodnie z tym, ostatnio dowiedziono, że myszy z nokautem genu preprooreksyny charakteryzuje obniżone różnicowanie brunatnych preadipocytów bez wpływu na ilość żółtej tkanki tłuszczowej (88). Aalizując dlaczego mimo stymulacji odkładania triacylogliceroli *in vitro* OXA nie wpłynęła na masę ciała, warto również odnotować, że niektóre dane literaturowe dowodzą, że OXA stymuluje sekrecję katecholamin z nadnerczy (172). Katecholaminy zostały opisane jako hormony, które promują lipolizę i obniżają zawartość tłuszczu (173), a więc działając na adipocyty mogą antagonizować efekty OXA. Na pewno pomocnym w odpowiedzi na to pytanie byłby eksperyment na zwierzętach poddanych adrenalectomii.

Wreszcie, w kolejnych eksperymentach przystąpiono również do próby określenia wpływu OXA na ekspresję i sekrecję adiponektyny. Tak jak wspomniano przy okazji

omawiania ekspresji receptorów oreksyn w tkance tłuszczowej, wiadomo, że podanie oreksyny A powoduje zwiększenie poziomu leptyny we krwi u szczurów (100). W niniejszej pracy jednak nie skupiono się na leptynie, a zbadano wpływ OXA na poziom adiponektyny u szczurów zdrowych oraz szczurów z wywołaną otyłością. Wybór adiponektyny był podyktowany tym, że hormon ten obniża poziom glukozy we krwi oraz zwiększa insulinowrażliwość, a zwiększenie stężenia adiponektyny we krwi jest celem w terapii pacjentów cierpiących z powodu cukrzycy typu 2 (174). W literaturze brak jest danych na temat roli oreksyny A w sekrecji adiponektyny. Jak już opisano w rozdziale wyniki, u szczurów we wszystkich grupach doświadczalnych, którym przy pomocy pomp osmotycznych przez 4 tygodnie podawano oreksynę A zaobserwowano wyraźnie wyższy poziom adiponektyny we krwi. Wiadomo, że nadekspresja preprooreksyny związana jest z poprawą parametrów węglowodanowych u myszy z wywołaną otyłością oraz ze zwiększeniem wrażliwości na insulinę (73). Część badań sugeruje, że może być to efekt oddziaływań oreksyny w ośrodkowym układzie nerwowym (89). Z drugiej strony może być on zależny od wzrostu poziomu adiponektyny we krwi, która normalizuje poziom glukozy i hamuje glukoneogenezę w wątrobie (175). Warto również zaznaczyć, że wyniki te są interesujące w kontekście rozważań na temat udziału oreksyny A w terapii cukrzycy typu 2. Adiponektyna wpływa na komórki β wysp trzustki, które chroni przed cytotoksycznym działaniem niefizjologicznie wysokiej glukozy oraz hamuje apoptozę indukowaną przez wolne kwasy tłuszczowe (176, 177). Dlatego normalizacja poziomu adiponektyny przez OXA może się pośrednio przyczyniać do ochrony komórek β w późniejszej fazie cukrzycy typu 2. Wyniki te wymagają jednak dalszej weryfikacji, szczególnie z wykorzystaniem zwierzęcych modeli cukrzycy typu 2.

6.5 Potencjalny mechanizm stymulacji adiponektyny i syntezy triacylogliceroli przez OXA – rola PPAR γ

Ostatnia część pracy dotyczyła rozpoznania mechanizmów, które mogą być odpowiedzialne za udział oreksyny A w akumulacji triacylogliceroli i produkcji adiponektyny. Nie bez powodu skoncentrowano się na potencjalnej roli czynnika transkrypcyjnego PPAR γ .

Wiadomo, że oreksyna A działając na adipocyty pozyskane z ludzkiej podskórnej tkanki tłuszczowej zwiększa ekspresję mRNA kodującego czynnika transkrypcyjny PPAR γ 2 (112). Z danych literaturowych wiadomo, że czynnik transkrypcyjny PPAR γ odgrywa kluczową rolę nie tylko w procesie różnicowania preadipocytów (178), ale również w

metabolizmie dojrzałych komórek tłuszczowych. W adipocytach szczególnie istotną rolę odgrywa jego druga izoforma PPAR γ 2 (179, 180). *In vivo* specyficzni agoniści PPAR γ wykorzystywani są w celu zwiększenia insulinowrażliwości komórek tłuszczowych (133), natomiast *in vitro* zwiększają akumulację triacylogliceroli (181). Wiadomo również, że PPAR γ zaangażowany jest w regulację ekspresji genu adiponektyny w adipocytach (133, 182).

W niniejszej pracy odnotowano, że podobnie jak w przypadku ludzkich adipocytów, oreksyna A działając na adipocyty pozyskane z okołojądrowej tkanki tłuszczowej szczura oraz 3T3-L1 stymuluje ekspresję PPAR γ . Mimo wcześniejszej pracy wykazującej zależny od oreksyny A wzrost poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2 w ludzkich adipocytach, konsekwencje tego zjawiska pozostawały nieznane. Powyżej zaznaczono, że PPAR γ uwikłany jest w regulację akumulacji triacylogliceroli oraz ekspresję i sekrecję adiponektyny. Mając na uwadze fakt zwiększania poziomu wewnątrzkomórkowych triacylogliceroli przez oreksynę A oraz jednoczesną stymulację ekspresji PPAR γ 2, określono czy efekty te są ze sobą powiązane. W tym celu wykorzystano dwie odmienne techniki. Z jednej przeprowadzono eksperyment z farmakologicznym inhibitorem BADGE, który specyficznym hamuje aktywność PPAR γ (183). Z drugiej strony posłużono się techniką siRNA, która pozwoliła na skuteczne wyhamowanie ekspresji PPAR γ . W obydwu przypadkach odnotowano, że inhibicja aktywności jak i znaczne obniżenie ekspresji PPAR γ skutecznie wyhamowały zdolność OXA do zwiększania odkładania triacylogliceroli. Co więcej również w przypadku nTZD w sytuacji obniżenia ekspresji PPAR γ , agonista ten nie wpływał istotnie na zawartość triacylogliceroli a adipocytach 3T3-L1.

Ponadto tak jak opisano to przy okazji omawiania wpływów OXA *in vivo*, u szczurów zdrowych o normalnej masie ciała oraz otyłych przewlekłe 4. tygodniowe podawanie OXA spowodowało wyższe stężenie adiponektyny we krwi. Co ciekawe, podawanie specyficznych aktywatorów PPAR γ powoduje wzrost poziomu adiponektyny we krwi u szczurów i ludzi (133, 182). Doświadczenie *in vitro* potwierdziło stymulujący wpływ agonisty PPAR γ (nTZD) na sekrecję adiponektyny i dowiodło, że OXA bezpośrednio stymuluje ekspresję i sekrecję adiponektyny z adipocytów.

Aby wyjaśnić czy efekty te są również zależne od aktywowanego przez OXA czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2 posłużono się BADGE oraz siRNA. Wyniki potwierdziły, że przypuszczenia dotyczące powiązań OXA i PPAR γ w regulacji ekspresji adiponektyny

są słuszne. Zarówno w sytuacji wyciszenia ekspresji PPAR γ przez siRNA oraz zahamowania jego aktywności przez BADGE, stymulacja oreksyną A nie wpłynęła istotnie na poziom ekspresji białka adiponektyny w adipocytach 3T3-L1. Dowiedziono tym samym, że mechanizm odpowiedzialny za wzrost ekspresji adiponektyny przez OXA jest zależny od PPAR γ . Kluczowym mechanizmem odpowiedzialnym za zwiększanie ekspresji adiponektyny przez PPAR γ jest jego aktywność jako czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genu adiponektyny. Początkowo wykazano, że specyficzni agoniści PPAR γ zwiększają aktywność promotora adiponektyny w adipocytach 3T3-L1 (133). Wyniki te potwierdziły późniejsze rezultaty demonstrujące, że w obrębie promotora adiponektyny zlokalizowana jest sekwencja specyficznie wiążąca PPAR γ , a mutacje w jej obrębie skutecznie blokują zwiększenie ekspresji adiponektyny przez agonistów PPAR γ (184). Konkludując, można stwierdzić, że to właśnie zwiększona ekspresja PPAR γ odpowiada za stymulowaną przez OXA zwiększoną ekspresję i wydzielanie adiponektyny.

Wyniki te dowodzą, że w adipocytach PPAR γ może być ważnym mediatorem pośredniczącym w długotrwałych efektach oreksyny A, w tym w regulacji insulinowrażliwości.

Mechanizm odpowiedzialny za stymulację ekspresji PPAR γ przez OXA pozostaje nieznanym. Dodatkowo jego poznanie jest utrudnione, ponieważ procesy regulujące ekspresję PPAR γ w adipocytach są słabo scharakteryzowane. Jednak pewna grupa danych wskazuje na prawdopodobną rolę OXR1 i szlaku fosfolipaz. Wykazano, że aktywacja OXR1 związana jest z aktywacją szlaku fosfolipaz włączając fosfolipazę A2 (150, 185). Co ciekawe, stymulacja fosfolipazy A2 związana jest z zwiększoną aktywnością PPAR γ , co wpływa na wzrost ekspresji regulowanych przez niego genów (186). Dodatkowo, fosfolipaza A2 została scharakteryzowana jako stymulator ekspresji prostaglandyny 15d-PGJ2, która z jednej strony jest ligandem PPAR γ , ale z drugiej strony może również indukować i zwiększać jego ekspresję (187, 188). Dlatego wydaje się, że wyjaśnienie roli szlaku fosfolipazy A2 w aktywacji i regulacji ekspresji PPAR γ będzie interesującym zadaniem.

7 Wnioski

- i. OXR1 i OXR2 w izolowanych adipocytach szczura i adipocytach 3T3-L1 ulegają ekspresji na poziomie mRNA i białka.
- ii. Oreksyna A stymuluje transport glukozy do adipocytów na drodze aktywacji szlaku PI3-K/PKB oraz translokacji GLUT4 do błony komórkowej.
- iii. Oreksyna A stymuluje konwersję glukozy do kwasów tłuszczowych, zwiększa odkładnie triacylogliceroli oraz hamuje lipolizę.
- iv. Oreksyna A stymuluje ekspresję i sekrecję adiponektyny w adipocytach.
- v. Oreksyna A zwiększa ekspresję PPAR γ , czego efektem jest wzrost ekspresji adiponektyny i akumulacji triacylogliceroli.
- vi. Chroniczne 4. tygodniowe podawanie oreksyny A zwiększa poziom adiponektyny we krwi u szczurów bez wływu na masę ciała.

8 Streszczenie

8.1 Cel

Neurohormon oreksyna A (OXA) reguluje pobieranie pokarmu, wydatkowanie energii oraz cykl sen – czuwanie. Peptyd ten wywiera efekty biologiczne przez aktywację dwóch typów receptorów: OXR1 i OXR2. Zaobserwowano, że ludzi otyłych charakteryzuje niski poziom oreksyny A we krwi, natomiast u myszy nadekspresja oreksyny przeciwdziała otyłości i zwiększa insulinowrażliwość. Potencjalnym celem w regulacji homeostazy energetycznej przez OXA może być tkanka tłuszczowa. Działając na ludzkie adipocyty OXA stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ oraz obniża lipolizę. Inne efekty oreksyny A na poziomie tkanki tłuszczowej pozostają nieznane.

W niniejszej pracy postanowiono prześledzić czy i w jaki sposób OXA reguluje metabolizm węglowodanowo-lipidowy oraz funkcje endokrynne adipocytów.

8.2 Metody

Część *in vitro* przeprowadzono na linii komórkowej adipocytów 3T3-L1 oraz adipocytach izolowanych z okołojądrowej tkanki tłuszczowej szczurów szczepu Wistar. W eksperymentach *in vivo* wykorzystano szczury szczepu Wistar, którym przez 4 tygodnie podawano oreksynę A. Ekspresję receptorów oreksyn szacowano na podstawie metody PCR w czasie rzeczywistym oraz techniki western blot. Wpływ na transport glukozy określano przy pomocy radioaktywnie wyznakowanej glukozy, a mechanizm odpowiedzialny za transport glukozy scharakteryzowano przy pomocy technik western blot oraz immunofluorescencji. Wpływ na syntezę kwasów tłuszczowych określono przy pomocy radioaktywnie wyznakowanej glukozy, syntezę triacylogliceroli szacowano stosując barwienie roztworem czerwieni olejowej oraz przeznaczonym do tego celu testem enzymatycznym. Lipolizę określano na podstawie kolorymetrycznego pomiaru uwolnionego glicerolu stosując test enzymatyczny.

Ekspresję i sekrecję adiponektyny określano używając odpowiednio techniki western blot i metody radioimmunologicznej. Wpływ OXA na ekspresję PPAR γ szacowano stosując PCR w czasie rzeczywistym, natomiast rolę PPAR γ w regulacji ekspresji adiponektyny i akumulacji triacylogliceroli określono stosując farmakologiczny inhibitor aktywności PPAR γ oraz małe interferencyjne RNA, które hamują jego ekspresję.

8.3 Wyniki

Wykazano, że ekspresja mRNA OXR1 i OXR2 zachodzi w izolowanych adipocytach szczura oraz w komórkach linii 3T3-L1. W szczurzych adipocytach nie zauważono różnic w poziomie ekspresji obydwu receptorów. W przypadku adipocytów 3T3-L1 odnotowano, że ekspresja OXR1 wzrasta podczas procesu różnicowania. Analizując ekspresję OXR2 nie wykryto różnic pomiędzy ekspresją w preadipocytach w porównaniu z całkowicie zróżnicowanymi adipocytami. Ponadto odnotowano, że w zróżnicowanych adipocytach 3T3-L1 ekspresja OXR1 zachodzi na wyższym poziomie niż ekspresja OXR2.

Analizując wpływ oreksyny A na adipocyty wykazano, że peptyd ten zwiększa transport glukozy do komórek 3T3-L1 oraz adipocytów izolowanych z tkanki tłuszczowej szczura. Wpływ na transport glukozy zależny jest od stymulacji translokacji czwartej formy transportera glukozy (GLUT4) oraz aktywacji szlaku PI3-K/PKB.

Wykazano również, że działając na adipocyty 3T3-L1 OXA zwiększa natężenie syntezy ATP oraz kwasów tłuszczowych, hamuje lipolizę oraz promuje akumulację triacylogliceroli.

In vitro stymulacja oreksyną związana jest ze wzrostem sekrecji adiponektyny z komórek 3T3-L1. W doświadczeniu *in vivo* wykazano, że 4. tygodniowe podawanie oreksyny A skutkuje wzrostem stężenia adiponektyny we krwi u szczurów zdrowych o normalnej masie ciała jak i u szczurów otyłych.

Ponadto wykazano, że działając na szczurze adipocyty oraz komórki 3T3-L1 OXA stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2. Dowiedziono również, że stymulowane przez oreksynę A akumulacja triacylogliceroli i ekspresja adiponektyny regulowane są przez mechanizm zależny od PPAR γ .

8.4 Konkluzja

Oreksyna A działając na adipocyty (*i*) stymuluje transport glukozy, (*ii*) zwiększa jej konwersję do kwasów tłuszczowych, (*iii*) hamuje lipolizę, (*iv*) promuje odkładanie triacylogliceroli oraz (*v*) stymuluje ekspresję i sekrecję adiponektyny. Anaboliczne wpływy OXA związane są głównie z aktywacją szlaku PI3-K/PKB oraz czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2.

Opisane efekty, ukazują oreksynę A oraz jej receptory jako potencjalne cele w terapii cukrzycy typu 2 i poprawie insulinowrażliwości.

9 Summary

Orexin A (OXA) is a neurohormone which modulates food intake, sleeping behavior and energy expenditure. Orexin receptors (OXR1 and OXR2) are expressed in human adipocytes. They confer the effects of OXA on PPAR γ expression and lipolysis. The role of OXA in regulating lipogenesis is unknown.

In the present study the effects of OXA on lipid and glucose metabolism were evaluated using isolated rat adipocytes, 3T3-L1 adipocytes and Wistar rats, chronically treated with OXA for 4 weeks. Glucose uptake, lipid metabolism and adiponectin secretion were detected biochemically and by molecular analyses.

3T3-L1 adipocytes and rat adipocytes express OXR1 and OXR2. OXA in time- and dose-dependently enhanced glucose uptake by translocating the glucose transporter type 4 (GLUT4) from cytoplasm into the plasma membrane. OXA stimulated fatty acid synthesis and triacylglycerol accumulation. Stimulation of glucose uptake and fatty acids synthesis by OXA was blocked by phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor. Furthermore, OXA stimulated adiponectin production and secretion from 3T3-L1 adipocytes. Higher levels of adiponectin were also detected in normocaloric as well as in high-fat diet-fed rats treated with OXA for 4 weeks.

Furthermore, OXA stimulated PPAR γ expression in 3T3-L1 and isolated primary rat adipocytes. Inhibition of PPAR γ prevented OXA from stimulating triacylglycerol accumulation and adiponectin production.

Overall, the study demonstrates that OXA stimulates glucose uptake, lipid accumulation, and adiponectin production in adipocytes. These effects of OXA are mediated by PI3K and PPAR γ 2. In conclusion, these data allow claiming that OXA may be considered as a potential therapeutic candidate to alleviate metabolic abnormalities occurring in obese and type 2 diabetic patients.

10 Spis literaturey

1. **Cinti S** 2011 Between brown and white: Novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med* 43:104-115
2. **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P** 2009 Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360:1518-1525
3. **Koppen A, Kalkhoven E** 2010 Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS Lett* 584:3250-3259
4. **Richard D, Picard F** 2011 Brown fat biology and thermogenesis. *Front Biosci* 16:1233-1260
5. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809
6. **Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, Døskeland SO, Kristiansen K** 2008 Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* 28:3804-3816
7. **Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS** 1999 Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 274:12632-12641
8. **Gagnon A, Chen CS, Sorisky A** 1999 Activation of protein kinase B and induction of adipogenesis by insulin in 3T3-L1 preadipocytes: contribution of phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate versus phosphoinositide-3,4-bisphosphate. *Diabetes* 48:691-698
9. **Morrison RF, Farmer SR** 2000 Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130:3116S-3121S
10. **Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clement K** 2010 Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59:2817-2825
11. **van de Woestijne AP, Monajemi H, Kalkhoven E, Visseren FL** 2011 Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management. *Obes Rev*
12. **Henry SL, Bensley JG, Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Armitage JA** 2011 White adipocytes: More than just fat depots. *Int J Biochem Cell Biol*
13. **Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR** 2008 White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39:715-728
14. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
15. **Vargovic P, Ukropec J, Laukova M, Cleary S, Manz B, Pacak K, Kvetnansky R** 2011 Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Lett* 585:2279-2284
16. **Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR** 2004 Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent progress in hormone research* 59:359-393
17. **Hajer GR, van Haefen TW, Visseren FL** 2008 Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29:2959-2971

18. **Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K** 2011 Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11:85-97
19. **Ernst MC, Sinal CJ** 2010 Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21:660-667
20. **Brunetti L, Recinella L, Di Nisio C, Chiavaroli A, Leone S, Ferrante C, Orlando G, Vacca M** 2012 Effects of visfatin/PBEF/NAMPT on feeding behaviour and hypothalamic neuromodulators in the rat. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 26:295-302
21. **Brunetti L, Di Nisio C, Recinella L, Chiavaroli A, Leone S, Ferrante C, Orlando G, Vacca M** 2011 Effects of vaspin, chemerin and omentin-1 on feeding behavior and hypothalamic peptide gene expression in the rat. *Peptides* 32:1866-1871
22. 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894:i-xii, 1-253
23. **Wu AH, Eagle KA, Montgomery DG, Kline-Rogers E, Hu YC, Aaronson KD** 2009 Relation of body mass index to mortality after development of heart failure due to acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 103:1736-1740
24. **Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH** 2006 Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:968-976
25. **Suh S, Kim KW** 2011 Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer? *Diabetes Metab J* 35:193-198
26. **Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M** 2003 [Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus]. *Rev Med Interne* 24:730-737
27. **Rutter MK, Nesto RW** 2011 Blood pressure, lipids and glucose in type 2 diabetes: how low should we go? Re-discovering personalized care. *Eur Heart J*
28. **Gunasekaran U, Gannon M** 2011 Type 2 diabetes and the aging pancreatic Beta cell. *Aging (Albany NY)* 3:565-575
29. **Fleming TH, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A** 2010 Reactive Metabolites and AGE/RAGE-Mediated Cellular Dysfunction Affect the Aging Process - A Mini-Review. *Gerontology*
30. **Harcourt BE, Sourris KC, Coughlan MT, Walker KZ, Dougherty SL, Andrikopoulos S, Morley AL, Thallas-Bonke V, Chand V, Penfold SA, de Courten MP, Thomas MC, Kingwell BA, Bierhaus A, Cooper ME, Courten B, Forbes JM** 2011 Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. *Kidney Int* 80:190-198
31. **Vander Jagt DL** 2008 Methylglyoxal, diabetes mellitus and diabetic complications. *Drug Metabol Drug Interact* 23:93-124
32. **Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SW, Perival V** 2009 Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 5:e1000324
33. **Morris DL, Singer K, Lumeng CN** 2011 Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14:341-346
34. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H** 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830
35. **Bradley RL, Fisher FF, Maratos-Flier E** 2008 Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 16:938-944

36. **Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF** 2002 Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51:1319-1336
37. **Goossens GH** 2008 The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* 94:206-218
38. **Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL** 2004 Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145:5087-5096
39. **Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I** 2007 Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56:901-911
40. **Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ** 2002 Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2:331-341
41. **Langlais P, Yi Z, Finlayson J, Luo M, Mapes R, De Filippis E, Meyer C, Plummer E, Tongchinsub P, Mattern M, Mandarino LJ** 2011 Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance. *Diabetologia* 54:2878-2889
42. **Savage DB, Petersen KF, Shulman GI** 2005 Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 45:828-833
43. **Pfeiffer AF** 2007 Adipose tissue and diabetes therapy: do we hit the target? *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 39:734-738
44. **Schulman IG** 2010 Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1307-1315
45. **Westerink J, Visseren FL** 2011 Pharmacological and non-pharmacological interventions to influence adipose tissue function. *Cardiovascular diabetology* 10:13
46. **Van RL, Roncari DA** 1977 Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell and tissue research* 181:197-203
47. **Bjorntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjostrom L, Smith U** 1978 Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *Journal of lipid research* 19:316-324
48. **Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M** 2010 Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *Journal of cellular biochemistry* 110:564-572
49. **Hausman DB, Park HJ, Hausman GJ** 2008 Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue. *Methods Mol Biol* 456:201-219
50. **de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG** 1998 The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:322-327
51. **Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** 1998 Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585

52. **Kastin AJ, Akerstrom V** 1999 Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 289:219-223
53. **Smart D, Jerman J** 2002 The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacol Ther* 94:51-61
54. **Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG** 2006 Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 58:46-57
55. **Tang J, Chen J, Ramanjaneya M, Punn A, Conner AC, Randeve HS** 2008 The signalling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cellular signalling* 20:1651-1661
56. **Karteris E, Chen J, Randeve HS** 2004 Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1957-1962
57. **Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T** 2004 Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci* 19:1524-1534
58. **Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Rushton SL, Murdock PR, Jewitt F, Elshourbagy NA, Ellis CE, Middlemiss DN, Brown F** 1999 Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol* 128:1-3
59. **Camp HS, Tafuri SR** 1997 Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 272:10811-10816
60. **Holmqvist T, Johansson L, Ostman M, Ammoun S, Akerman KE, Kukkonen JP** 2005 OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 280:6570-6579
61. **Ammoun S, Johansson L, Ekholm ME, Holmqvist T, Danis AS, Korhonen L, Sergeeva OA, Haas HL, Akerman KE, Kukkonen JP** 2006 OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol* 20:80-99
62. **Ramanjaneya M, Conner AC, Chen J, Kumar P, Brown JE, Jhoren O, Lehnert H, Stanfield PR, Randeve HS** 2009 Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *The Journal of endocrinology* 202:249-261
63. **Beuckmann CT, Yanagisawa M** 2002 Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J Mol Med* 80:329-342
64. **Jhoren O, Bruggemann N, Dominiak P** 2004 Orexins (hypocretins) and adrenal function. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36:370-375
65. **Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM** 1999 Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821:535-538
66. **Takano S, Kanai S, Hosoya H, Ohta M, Uematsu H, Miyasaka K** 2004 Orexin-A does not stimulate food intake in old rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G1182-1187
67. **Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G** 1999 Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48:2132-2137

68. **Karnani MM, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Jensen LT, de Lecea L, Fugger L, Burdakov D** 2011 Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. *Neuron* 72:616-629
69. **Mazza M, Della Marca G, Paciello N, Mennuni G, Bria P, Mazza S** 2005 [Orexin, sleep and appetite regulation: a review]. *Clin Ter* 156:93-96
70. **Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2003 Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-1512
71. **Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M** 2001 To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annual review of neuroscience* 24:429-458
72. **Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE** 2002 Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36:303-325
73. **Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M** 2009 Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell metabolism* 9:64-76
74. **Hungs M, Mignot E** 2001 Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23:397-408
75. **Berezinska M, Zawilska JB** 2007 [Hypocretins: involvement in the regulation of sleep-wakefulness cycle and pathogenesis of narcolepsy]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:1-12
76. **Szekely M** 2006 Orexins, energy balance, temperature, sleep-wake cycle. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 291:R530-532
77. **Yasuda Y, Takeda A, Fukuda S, Suzuki H, Ishimoto M, Mori Y, Eguchi H, Saitoh R, Fujihara H, Honda K, Higuchi T** 2003 Orexin a elicits arousal electroencephalography without sympathetic cardiovascular activation in isoflurane-anesthetized rats. *Anesthesia and analgesia* 97:1663-1666
78. **Lubkin M, Stricker-Krongrad A** 1998 Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 253:241-245
79. **Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC** 1999 Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain research* 831:248-253
80. **Nunez A, Rodrigo-Angulo ML, Andres ID, Garzon M** 2009 Hypocretin/Orexin neuropeptides: participation in the control of sleep-wakefulness cycle and energy homeostasis. *Curr Neuropharmacol* 7:50-59
81. **Reilly CE** 1999 I. Mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene causes canine narcolepsy. *Journal of neurology* 246:985-986
82. **Longstreth WT, Jr., Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G** 2007 The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* 30:13-26
83. **Nishino S, Kanbayashi T** 2005 Symptomatic narcolepsy, cataplexy and hypersomnia, and their implications in the hypothalamic hypocretin/orexin system. *Sleep Med Rev* 9:269-310
84. **Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW** 2002 Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26:274-276

85. **Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T** 2005 Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett* 380:239-242
86. **Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y** 2009 Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10:466-480
87. **Wang J, Osaka T, Inoue S** 2001 Energy expenditure by intracerebroventricular administration of orexin to anesthetized rats. *Neurosci Lett* 315:49-52
88. **Sellayah D, Bharaj P, Sikder D** 2011 Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell Metab* 14:478-490
89. **Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T** 2008 Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia* 51:657-667
90. **Siddle K** 2011 Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of molecular endocrinology* 47:R1-10
91. **Gerozissis K** 2008 Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* 585:38-49
92. **Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T** 2010 Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)* 198:335-348
93. **Jiang G, Zhang BB** 2003 Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284:E671-678
94. **Kang H, Han K, Jo J, Kim J, Choi MY** 2008 Systems of pancreatic beta-cells and glucose regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:6421-6431
95. **Nowak KW, Strowski MZ, Switonska MM, Kaczmarek P, Singh V, Fabis M, Mackowiak P, Nowak M, Malendowicz LK** 2005 Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int J Mol Med* 15:969-972
96. **Goncz E, Strowski MZ, Grotzinger C, Nowak KW, Kaczmarek P, Sassek M, Mergler S, El-Zayat BF, Theodoropoulou M, Stalla GK, Wiedenmann B, Plockinger U** 2008 Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway. *Endocrinology* 149:1618-1626
97. **Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner AL** 2003 Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52:111-117
98. **Adeghate E, Fernandez-Cabezudo M, Hameed R, El-Hasasna H, El Wasila M, Abbas T, Al-Ramadi B** 2010 Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *PLoS One* 5:e8587
99. **Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M, Malendowicz LK** 2000 Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci* 66:449-454
100. **Switonska MM, Kaczmarek P, Malendowicz LK, Nowak KW** 2002 Orexins and adipoinular axis function in the rat. *Regul Pept* 104:69-73
101. **Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K** 2003 Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas* 27:161-166
102. **Heinonen MV, Purhonen AK, Makela KA, Herzig KH** 2008 Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 192:471-485

103. **Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG** 1999 Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70:185-188
104. **Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L, Nussdorfer GG** 2001 Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med* 7:401-404
105. **Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS** 2001 Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol* 13:421-424
106. **Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG** 2001 Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 86:778-782
107. **Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R** 2006 Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 6:17-42
108. **Kirchgessner AL, Liu M** 1999 Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24:941-951
109. **Ducroc R, Voisin T, El Firar A, Laburthe M** 2007 Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways. *Diabetes* 56:2494-2500
110. **Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, Laboisie C, Laburthe M, Voisin T** 2004 Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 279:45875-45886
111. **Zwirska-Korczała K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pilc K, Suchanek R, Pierzchała K, Namysłowski G, Misiolek M, Sadowski K, Kato I, Kuwahara A, Zabielski R** 2007 Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 1:53-64
112. **Digby JE, Chen J, Tang JY, Lehnert H, Matthews RN, Randeve HS** 2006 Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol* 191:129-136
113. **Whitehead JP** 2011 Diabetes: New conductors for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) orchestra. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1071-1074
114. **Nugent C, Prins JB, Whitehead JP, Savage D, Wentworth JM, Chatterjee VK, O'Rahilly S** 2001 Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR gamma agonists is maintained in cells expressing a PPAR gamma dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR gamma activation. *Mol Endocrinol* 15:1729-1738
115. **Rodbell M** 1964 Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *The Journal of biological chemistry* 239:375-380
116. **Tang S, Le-Tien H, Goldstein BJ, Shin P, Lai R, Fantus IG** 2001 Decreased in situ insulin receptor dephosphorylation in hyperglycemia-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 50:83-90

117. **Szkudelski T, Szkudelska K, Nogowski L** 2009 Effects of adenosine A1 receptor antagonism on lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *Physiol Res* 58:863-871
118. **MacLachlan TB** 1976 Letter: Medical school admissions. *Canadian Medical Association journal* 114:507
119. **Li F, Wang D, Zhou Y, Zhou B, Yang Y, Chen H, Song J** 2008 Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Res* 18:311-323
120. **Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP** 2003 Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7569-7574
121. **Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G** 2003 Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31:2717-2724
122. **Jessen BA, Stevens GJ** 2002 Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* 299:95-100
123. **Tsuneki H, Sugihara Y, Honda R, Wada T, Sasaoka T, Kimura I** 2002 Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 448:245-252
124. **Bryant NJ, Govers R, James DE** 2002 Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology* 3:267-277
125. **Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR** 1996 Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol* 16:2195-2203
126. **Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A** 1997 Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668
127. **Hansen FM, Nielsen JH, Gliemann J** 1974 The influence of body weight and cell size on lipogenesis and lipolysis of isolated rat fat cells. *Eur J Clin Invest* 4:411-418
128. **Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ** 2011 The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene* 477:1-11
129. **Holm C** 2003 Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31:1120-1124
130. **Carmen GY, Victor SM** 2006 Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18:401-408
131. **Jequier E, Tappy L** 1999 Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 79:451-480
132. **Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2002 Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737
133. **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** 2001 PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094-2099
134. **Walczak R, Tontonoz P** 2002 PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43:177-186

135. **Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P** 2001 Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142:3324-3331
136. **Hauner H** 2005 Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 64:163-169
137. **Nolan CJ, Damm P, Prentki M** 2011 Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378:169-181
138. **Rawal LB, Tapp RJ, Williams ED, Chan C, Yasin S, Oldenburg B** 2011 Prevention of Type 2 Diabetes and Its Complications in Developing Countries: A Review. *Int J Behav Med*
139. **Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M** 2007 BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7432-7437
140. **Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR** 2006 Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept* 134:17-22
141. **Gurriaran-Rodriguez U, Al-Massadi O, Roca-Rivada A, Crujeiras AB, Gallego R, Pardo M, Seoane LM, Pazos Y, Casanueva FF, Camina JP** 2010 Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *J Cell Mol Med*
142. **Sikder D, Kodadek T** 2007 The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Genes & development* 21:2995-3005
143. **Wood IS, Trayhurn P** 2003 Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *The British journal of nutrition* 89:3-9
144. **Augustin R** 2010 The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62:315-333
145. **Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB** 2001 Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733
146. **Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB** 1993 Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* 268:22243-22246
147. **Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB** 2005 Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E551-561
148. **Foster LJ, Klip A** 2000 Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C877-890
149. **Chang L, Chiang SH, Saltiel AR** 2004 Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10:65-71
150. **Turunen PM, Ekholm ME, Somerharju P, Kukkonen JP** 2010 Arachidonic acid release mediated by OX1 orexin receptors. *Br J Pharmacol* 159:212-221
151. **Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF** 1994 A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248
152. **Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR** 1994 Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of

- pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14:4902-4911
153. **Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B, Balla T, Weiss WA, Williams RL, Shokat KM** 2006 A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 125:733-747
154. **Kang I, Choi SL, Kim SS, Kim SJ, Ha J, Oh SM** 1998 The regulatory mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin in 3T3 L1 fibroblasts: phosphorylation-independent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Mol Med* 30:263-269
155. **Bertola A, Bonnafous S, Cormont M, Anty R, Tanti JF, Tran A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P** 2007 Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. *J Biol Chem* 282:10325-10332
156. **Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC** 1989 PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57:167-175
157. **Kachko I, Maissel A, Mazor L, Ben-Romano R, Watson RT, Hou JC, Pessin JE, Bashan N, Rudich A** 2009 Postreceptor adipocyte insulin resistance induced by nelfinavir is caused by insensitivity of PKB/Akt to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *Endocrinology* 150:2618-2626
158. **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM** 2006 Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22:159-168
159. **Leney SE, Tavare JM** 2009 The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *The Journal of endocrinology* 203:1-18
160. **Brewer PD, Romenskaia I, Kanow MA, Mastick CC** 2011 Loss of AS160 Akt Substrate Causes Glut4 Protein to Accumulate in Compartments That Are Primed for Fusion in Basal Adipocytes. *J Biol Chem* 286:26287-26297
161. **Thong FS, Bilan PJ, Klip A** 2007 The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 56:414-423
162. **Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M, Yada T** 2001 Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca²⁺ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport* 12:1885-1889
163. **Ozcan M, Ayar A, Serhatlioglu I, Alcin E, Sahin Z, Kelestimur H** 2010 Orexins activates protein kinase C-mediated Ca(2+) signaling in isolated rat primary sensory neurons. *Physiol Res* 59:255-262
164. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L** 2007 *Biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman
165. **Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS** 2007 Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1-4
166. **Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R** 2004 Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386

167. **Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R, Rathod M** 2009 Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 284:34538-34544
168. **Kwok EH, Dun NJ** 2002 Orexin/Hypocretin System: Obesity, Narcolepsy and Beyond. *Drug News Perspect* 15:166-174
169. **Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** 2001 Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354
170. **Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Lofgren P, Ryden M, Thorne A, Wiren M, Palmer M, Thorell A, Toft E, Arner P** 2010 Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 53:2496-2503
171. **Sethi JK, Vidal-Puig AJ** 2007 Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48:1253-1262
172. **Kawada Y, Ueno S, Asayama K, Tsutsui M, Utsunomiya K, Toyohira Y, Morisada N, Tanaka K, Shirahata A, Yanagihara N** 2003 Stimulation of catecholamine synthesis by orexin-A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor 1. *Biochemical pharmacology* 66:141-147
173. **Millet L, Barbe P, Lafontan M, Berlan M, Galitzky J** 1998 Catecholamine effects on lipolysis and blood flow in human abdominal and femoral adipose tissue. *J Appl Physiol* 85:181-188
174. **Ukkola O, Santaniemi M** 2002 Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)* 80:696-702
175. **Miller RA, Chu Q, Le Lay J, Scherer PE, Ahima RS, Kaestner KH, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ** 2011 Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest* 121:2518-2528
176. **Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G, Wheeler MB** 2010 Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. *J Biol Chem* 285:33623-33631
177. **Lin P, Chen L, Li D, Liu J, Yang N, Sun Y, Xu Y, Fu Y, Hou X** 2009 Adiponectin reduces glucotoxicity-induced apoptosis of INS-1 rat insulin-secreting cells on a microfluidic chip. *Tohoku J Exp Med* 217:59-65
178. **Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617
179. **Giusti V, Verdumo C, Suter M, Gaillard RC, Burckhardt P, Pralong F** 2003 Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes* 52:1673-1676
180. **Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li E, Song Q, Chen YE** 2004 Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10703-10708
181. **Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausning K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR, Jr.** 2000 A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks

- adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 14:1425-1433
182. **Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamiss A** 2007 Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens* 20:206-210
183. **Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM** 2000 A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:1873-1877
184. **Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I** 2003 Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655-1663
185. **Johansson L, Ekholm ME, Kukkonen JP** 2008 Multiple phospholipase activation by OX(1) orexin/hypocretin receptors. *Cell Mol Life Sci* 65:1948-1956
186. **Pawliczak R, Han C, Huang XL, Demetris AJ, Shelhamer JH, Wu T** 2002 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. *J Biol Chem* 277:33153-33163
187. **Landrier JF, Gouranton E, El Yazidi C, Malezet C, Balaguer P, Borel P, Amiot MJ** 2009 Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. *Endocrinology* 150:5318-5325
188. **Kim EH, Surh YJ** 2006 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol* 72:1516-1528