

Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz

**OCENA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO  
U PACJENTÓW OTYŁYCH PRZED I PO  
UMIARKOWANEJ RESTRYKCJI KALORYCZNEJ**

**Rozprawa doktorska  
mgr inż. Joanna Łuczak**

Promotor: dr hab. n med. Katarzyna Korybalska, prof. UM

Poznań, 2017

*Składam gorące podziękowania pracownikom Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu: prof. dr hab. n med. Marianowi Grzymiśłowskiemu, dr n med. Ewelinie Sworze-Cwynar oraz dr n med. Alinie Kanikowskiej. Dzięki tej współpracy mogłam zebrać materiał kliniczny do badań.*

*Składam gorące podziękowania Pani dr hab. med. Katarzynie Korybalskiej za pomoc oraz nieocenione wsparcie w trakcie realizowania pracy.*

*Słowa podziękowania kieruję również do Pana prof. dr hab. Janusza Witowskiego za cenne uwagi podczas analizowania wyników.*

*Kierownikowi Katedry i Zakładu Patofizjologii - Panu prof. dr hab. Andrzejowi Bręborowiczowi dziękuję za umożliwienie zrealizowania pracy doktorskiej.*

Praca finansowana przez grant naukowy z NCN nr N N404 151340

Część wyników zostały wykorzystana w publikacjach:

- Katarzyna Korybalska, Ewelina Swora-Cwynar, Joanna Łuczak, Alina Kanikowska, Natasza Czepulis, Rafał Rutkowski, Andrzej Bręborowicz, Marian Grzymisławski, Janusz Witowski. *Association of endothelial proliferation with the magnitude of weight loss during calorie restriction. Angiogenesis 2016, 19:407–419*
- Katarzyna Korybalska, Joanna Łuczak, Ewelina Swora-Cwynar, Alina Kanikowska, Natasza Czepulis, Dominika Kanikowska, Hanna Skalisz, Andrzej Bręborowicz, Marian Grzymisławski, Janusz Witowski: *Weight loss-dependent and - independent effects of moderate calorie restriction on proinflammatory cytokines and mediators of endothelial cell function in obesity* zgłoszona do *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* nr manuskryptu: ID apnm-2017-0239.

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	7
Spis rycin.....	10
Spis tabel.....	11
1. Wstęp.....	12
1.1. Otyłość .....	12
1.2. Tkanka tłuszczowa .....	15
Leptyna.....	20
Adiponektyna.....	20
IL-6 .....	21
TNF- $\alpha$ .....	21
Rezystyna.....	22
Omentyna.....	22
1.3. Restrykcja kaloryczna.....	22
1.4. Wpływ restrykcji kalorycznej na profil ekspresji genów.....	25
1.5. Śródbłonek naczyniowy.....	26
Wpływ śródbłonka na napięcie ściany naczyniowej.....	27
Wpływ śródbłonka na proces hemostazy .....	29
Wpływ śródbłonka na proces angiogenezy.....	30
Aktywacja zapalna śródbłonka .....	31
1.6. Dysfunkcja komórek śródbłonka w otyłości .....	33
1.7. Otyłość - różnice wynikające z płci .....	36
2. Cel pracy.....	38
3. Materiał i Metoda .....	39
3.1. Grupa badana .....	39
3.2. Protokół badania .....	41

ETAP 1. Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu .....	41
Pobieranie krwi do badań .....	42
Badania biochemiczne krwi – szpitalne laboratorium .....	42
ETAP 2. Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.....	43
3.3. Badania biochemiczne – Katedra Patofizjologii.....	43
3.3.1. Zasada testu immunoenzymatycznego ELISA.....	43
3.3.2. Zasada testu kolorymetrycznego .....	44
Aktywność katalazy .....	44
Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej .....	44
Całkowity status antyoksydacyjny .....	45
Tlenek azotu.....	45
3.4. Badania w warunkach hodowli komórkowej <i>in vitro</i> .....	47
3.4.1. Hodowla komórek śródbłonka naczyniowego .....	47
3.4.2. Wybór stężenia ludzkiej surowicy do dalszych badań eksperymentalnych .....	47
3.4.3. Ocena zmian ekspresji genów komórek śródbłonka naczyniowego .....	47
Analiza mikromacierzy.....	47
Metoda RT PCR .....	48
3.4.4. Ocena proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego .....	49
3.4.5. Ocena generacji wolnych rodników tlenowych (ROS) przez komórki śródbłonka naczyniowego.....	49
3.4.6. Uwagi do eksperymentów w warunkach hodowli komórkowej.....	50
3.5. Analiza statystyczna wyników .....	50
4. Wyniki .....	52
4.1. Analiza grupy pacjentów.....	52
4.2. Ocena parametrów antropometrycznych.....	52
4.3. Ocena składu ciała .....	54

4.4.	Ocena parametrów sercowo-naczyniowych .....	55
4.5.	Ocena parametrów gospodarki lipidowej.....	55
4.6.	Ocena parametrów gospodarki węglowodanowej .....	56
4.7.	Ocena parametrów metabolicznych tkanki tłuszczowej.....	57
4.8.	Ocena stresu oksydacyjnego .....	58
4.9.	Ocena profilu ekspresji genów w komórkach śródbłonka po okresie łagodnej restrykcji kalorycznej .....	59
4.10.	Ocena zmian funkcji komórek śródbłonka naczyniowego .....	60
4.11.	Ocena korelacji pomiędzy badanymi parametrami.....	64
5.	Dyskusja .....	66
5.1.	Skuteczność umiarkowanej restrykcji kalorycznej.....	66
5.2.	Wpływ restrykcji kalorycznej na profili ekspresji genów komórek śródbłonka. 70	
5.3.	Wpływ restrykcji na ocenę funkcji śródbłonka .....	74
5.4.	Podsumowanie .....	80
6.	Wnioski .....	82
7.	Streszczenie w języku polskim.....	83
8.	Streszczenie w języku angielskim.....	85
9.	Literatura.....	87

## Wykaz stosowanych skrótów

- 6-ketoPGF $1\alpha$  – (ang. *6-Keto Prostaglandin F $1\alpha$* ) - 6-keto-prostaglandyna F $1\alpha$
- ACE – (ang. *angiotensin-converting enzyme*) - enzym konwertujący angiotensynę
- ADMA – (ang. *asymmetric dimethylarginine*) - asymetryczna dimetylarginina
- ADP-aza – (ang. *adenosine-5`-diphosphatse*) - adenozy-no-5` difosfataza
- ANG-1 – (ang. *angiopoetin-1*) - angiopoetyna-1
- ANG-2 – (ang. *angiopoetin-2*) - angiopoetyna-2
- AT – (ang. *antithrombin*) - antytrombina
- BAT – (ang. *brown adipose tissue*) - brunatna tkanka tłuszczowa
- bFGF - (ang. *basic fibroblast growth factor*) - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
- BMI – (ang. *body mass index*) - wskaźnik masy ciała
- CRP – (ang. *C-reactive protein*) - białko C-reaktywne
- EDHF – (ang. *endothelium-derived hyperpolaryzing factor*) - hiperpolaryzujący czynnik pochodzenia śródbłonkowego
- ELISA – (ang. *enzyme-linked immunoabsorbent assay*) - test immunenzymatyczny
- eNOS – (ang. *endothelial nitric oxide synthase*) - śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
- ET-1 – (ang. *endothelin-1*) - endotelina-1
- FDP – (ang. *fibrin/fibrinogen degradation products*) - produkty degradacji fibrynogenu/fibryny
- FMD - (ang. *flow mediatel dilatation*) – rozkurcz naczyń powodowany przepływem krwi
- FGF – (ang. *fibroblast growth factor*) - czynniki wzrostu fibroblastów
- FGFR – (ang. *fibroblast growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów
- GAG – (ang. *glucose oxidase glucose antioxidase complex*) - kompleks oksydaza glukozy-antyoksydaza glukozy
- GM-CSF – (ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- GSH – (ang. *glutathione*) - glutation
- HDL – (ang. *high density lipoprotein*) - lipoproteiny wysokiej gęstości
- HIF-1 – (ang. *hypoxia-inducible factor*) - czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją
- HUVEC – (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) - komórki śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej

ICAM-1 – (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1

ICAM-2 – (ang. *intercellular adhesion molecule-2*) - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-2

IGF1 – (ang. *insulin-like growth factor 1*) - insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IL – (ang. *interleukin*) - interleukina

HS IL – (ang. *high sensitivity*) - test wysokiej czułości detekcji interleukiny

INF- $\gamma$  – (ang. *interferone gamma*) - interferon gamma

LDL – (ang. *low-density lipoprotein*) - lipoproteina niskiej gęstości

MCP-1 – (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) - czynnik chemotaktyczny dla monocytów-1

MMP – (ang. *matrix metalloproteinases*) - metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

NADPH – (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) – zredukowana forma fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

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

NOS – (ang. *nitric oxide synthase*) - syntaza tlenku azotu

ONOO – (ang. *peroxynitrite*) – nadtlenoazotyn

PAF – (ang. *platelet-activating factor*) - czynnik aktywujący płytki krwi

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

PAI-2 – (ang. *plasminogen activator inhibitor-2*) - inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu-2

PDGF – (ang. *platelet derived growth factor*) - płytkowy czynnik wzrostu

PDGFR – (ang. *platelet-derived growth factor receptor*) - receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego

PECAM – (ang. *platelet-endothelial cell adhesion molecule*) - płytkowo-śródbłonkowa cząstka adhezyjna

PGE<sub>2</sub> – (ang. *prostaglandin E2*) – prostaglandyny

PGI<sub>2</sub> – (ang. *prostacyclin*) - prostacyklina

PSGL-1 – (ang. *P-selectin glycoprotein ligand 1*) – ligand glikoproteinowy selektyny P

ROS – (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

SOD – (ang. *superoxide dismutases*) – dysmutaza ponadtlenkowa



TAS – (ang. *total antioxidant status*) – całkowity status antyoksydacyjny

TF – (ang. *tissue factor*) - czynnik tkankowy; tromboplastyna tkankowa

TFPI – (ang. *tissue factor pathway inhibitor*) – inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę

TGF- $\beta$  – (ang. *transforming growth factor beta*) - transformujący czynnik wzrostu beta

Tie-2 – (ang. *angiopoietin receptor-2*) – receptor angiopoetyny-2

TIMP – (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) - tkankowe inhibitory metaloproteinaz

TM – (ang. *thrombomodulin*) - trombomodulina

TNF- $\alpha$  – (ang. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) - czynnik martwicy guza- $\alpha$

TSP-1 – (ang. *thrombospondin 1*) – trombospondyna 1

t-PA – (ang. *tissue plasminogen activator*) - tkankowy aktywator plazminogenu

TXA<sub>2</sub> – (ang. *thromboxane A<sub>2</sub>*) - tromboksan A<sub>2</sub>

u-PA – (ang. *urokinase-plasminogen activator*) - urokinazowy aktywator plazminogenu

VCAM-1 – (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*) - naczyniowa cząsteczka adhezyjna

VEGF – (ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłónka

VSMC – (ang. *vascular smooth muscle cell*) – komórki mięśni gładkich naczyń

vWF – (ang. *von Willebrand factor*) - czynnik von Willebranda

WAT – (ang. *white adipose tissue*) - biała tkanka tłuszczowa

## Spis rycin

Ryc. 1 Wpływ otyłości na funkcjonowanie różnych narządów. ....	18
Ryc. 2 Wpływ adiponektyny na regulację metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie .....	21
Ryc. 3 Przykłady różnych rodzajów komórek śródbłonka .....	26
Ryc. 4 Regulacja napięcia ściany naczynia krwionośnego .....	28
Ryc. 5 Wpływ śródbłonka na proces krzepnięcia i fibrynolizy. ....	30
Ryc. 6 Przebieg procesu angiogenezy komórek śródbłonka .....	31
Ryc. 7 Oddziaływanie komórek śródbłonka naczyniowego z leukocytami krwi obwodowej.....	33
Ryc. 8 Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego .....	34
Ryc. 9 Zależność pomiędzy otyłością, a funkcją śródbłonka. ....	36
Ryc. 10 Procentowa zmiana parametrów antropometrycznych po łagodnej RK.....	53
Ryc. 11 Procentowa zmiana tkanki tłuszczowej i tkanki mięśniowej po łagodnej RK. 54	
Ryc. 12 Procentowa zmiana stężenia adipokin po RK. ....	58
Ryc. 13 Procentowa zmiana stężenia biomarkerów funkcji śródbłonka po RK.....	62
Ryc. 14 Procentowa zmiana proliferacji komórek śródbłonka pod wpływem medium z dodatkiem surowicy pacjentów leczonych RK. ....	62
Ryc. 15 Wybrane korelacje pomiędzy procentową zmianą stężenia adipokin oraz parametrów funkcji śródbłonka naczyniowego, a procentową zmianą tkanki tłuszczowej (n=41).....	65

## Spis tabel

Tab.1 Klasyfikacja otyłości.....	14
Tab.2 Charakterystyka wybranych adipokin .....	18
Tab.3 Funkcje komórek śródbłonna naczyniowego .....	27
Tab.4 Molekuły adhezyjne zlokalizowane na powierzchni komórek śródbłonna oraz odpowiadające im komórki docelowe krwi obwodowej .....	32
Tab.5 Dysfunkcja komórek śródbłonna naczyniowego .....	35
Tab.6 Charakterystyka otyłych pacjentek przed przystąpieniem do badań .....	40
Tab.7 Charakterystyka dwóch grup otyłych pacjentek w zależności od uzyskanej straty masy ciała po RK przed przystąpieniem do badania .....	40
Tab.8 Proporcje składników odżywczych w stosowanej diecie.....	42
Tab.9 Czulość metod ELISA oraz procent zmienność uzyskiwanych wyników pomiędzy oznaczeniami (%CV).....	45
Tab.10 Procentowy udział pacjentów z otyłością II i III stopnia po łagodnej RK.....	52
Tab.11 Ocena parametrów antropometrycznych po łagodnej RK .....	53
Tab.12 Ocena składu ciała po łagodnej RK.....	54
Tab.13 Ocena parametrów sercowo-naczyniowych po łagodnej RK.....	55
Tab.14 Ocena gospodarki lipidowej po łagodnej RK .....	56
Tab.15 Ocena gospodarki węglowodanowej po łagodnej RK.....	57
Tab.16 Ocena wybranych parametrów metabolicznych po łagodnej RK.....	58
Tab.17 Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po łagodnej RK .....	59
Tab.18 Przykładowe wartości ekspresji wybranych genów cyklu komórkowego w komórkach śródbłonna przed i po łagodnej RK.....	60
Tab.19 Ocena zmian funkcji komórek śródbłonna naczyniowego po łagodnej RK...	61
Tab.20 Porównanie pomiędzy stratą masy ciała po RK, a zmianą proliferacji śródbłonna u wszystkich analizowanych pacjentek	63
Tab.21 Ocena korelacji pomiędzy procentową zmianą stężenia adipokin oraz parametrów funkcji śródbłonna naczyniowego, a procentową zmianą masy ciała i tkanki tłuszczowej (n=41).....	64

## 1. Wstęp

### 1.1. Otyłość

Otyłość nazywana jest epidemią XXI wieku i staje się narastającym problemem zdrowotnym na całym świecie (Tsigos i wsp., 2009; Kłosiewicz-Latoszek, 2010; Przybylska i wsp., 2012). Na wzrost populacji ludzi otyłych wpływają czynniki genetyczne, środowiskowe, psychologiczne i socjoekonomiczne (Farooqi i wsp., 2006; Kyrou i wsp., 2006; Branca i wsp., 2007). Za podstawową przyczynę tego stanu rzeczy uznaje się jednak zmniejszenie aktywności fizycznej, przy jednoczesnym zwiększeniu kaloryczności posiłków. Otyłość dotyczy zarówno kobiety jak i mężczyzn w różnym wieku, niezależnie od rasy (James, 2008). W przypadku kobiet o otyłości świadczy ponad 25% zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do masy całego ciała, u mężczyzn ponad 15% (Mazur-Roszak i wsp., 2010). Wzrost masy ciała, zwiększa zagrożenie zgonem oraz prowadzi do rozwoju wielu chorób, jak: schorzenia układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca, choroby układu kostno-stawowego, zaburzeń gastroenterologicznych, nowotwory, bezdech senny oraz problemy rozrodcze, urologiczne i nefrologiczne (Niedźwiedzka-Rystwej i wsp., 2009; Kłosiewicz-Latoszek, 2010; Mazur-Roszak i wsp., 2010). Główne powikłania otyłości dotyczą jednak chorób sercowo-naczyniowych (nadciśnienie tętnicze, udar mózgu, niewydolność serca, choroba niedokrwienna serca) (Kłosiewicz-Latoszek, 2010). Według badań, spadek masy ciała znacząco redukuje ryzyko wystąpienia chorób towarzyszących otyłości. Przy redukcji masy ciała o 10 % stwierdzono kilkunastu procentowy spadek stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, 30-50% obniżenie stężenia glukozy we krwi, 30% spadek stężenia trójglicerydów oraz ciśnienia krwi o 10-20 mmHg (Jung, 1997). W doniesieniach naukowych zwraca się również uwagę na znaczenie witaminy D<sub>3</sub> w procesie rozwoju otyłości. Aktywna postać witaminy D<sub>3</sub> zmienia ekspresję około 200 genów, a jej niedobór wpływa negatywnie na metabolizm glukozy, poprzez zaburzenie działania insuliny. Witamina D<sub>3</sub>, jako witamina rozpuszczalna w tłuszczach, jest magazynowana w tkance tłuszczowej, co powoduje jej niedobór w surowicy i ogranicza dostępność biologiczną (szczegółowo omówione w Cannell i wsp., 2008; McGill i wsp., 2008; Lagunova i wsp., 2009).

Według raportu GUS waga ciała Polaków wzrasta, a problemy z jej utrzymaniem ma ponad 54% populacji, gdzie 64% stanowią mężczyźni, a 46% kobiety. Największy

odsetek osób ze zwiększoną masą ciała występuje w grupie osób powyżej czterdziestego roku życia, a wynika to ze spowolnienia procesów metabolicznych, zmniejszenia aktywności fizycznej oraz ze złych nawyków żywieniowych. Obecnie problem nadwagi i otyłości w populacji miejskiej i wiejskiej oscyluje na podobnym poziomie i jest konsekwencją przejęcia złych nawyków żywieniowych przez ludność terenów wiejskich. W porównaniu z mieszkańcami Unii Europejskiej (analiza 18 krajów), Polska zajmuje 7 miejsce, w rankingu osób dorosłych, z nieprawidłową masą ciała. Największy odsetek osób z nadwagą i otyłością występuje na Malcie, w Republice Czeskiej, Słowenii, Grecji, na Łotwie oraz na Węgrzech. Najlepsza sytuacja występuje natomiast w Austrii, Belgii oraz we Francji gdzie odsetek ludzi z nadwagą i otyłością jest poniżej 50% (Raport GUS, 2009).

Otyłość można dwójako sklasyfikować: w zależności od przyczyn jej powstania oraz stosując podział zależny od wielkości parametrów antropometrycznych. Według pierwszej klasyfikacji wyróżniamy otyłość prostą (pierwotną), która jest wywołana nadmiernym przyjmowaniem pożywienia oraz niską aktywnością fizyczną. Drugim typem jest otyłość wtórna, która wynika z zaburzeń endokrynologicznych, chorób genetycznych, zwyrodnieniowych, wad rozwojowych, urazów ośrodkowego układu nerwowego oraz jest konsekwencją stosowania niektórych leków (Przybylska i wsp., 2012). Według kryterium wielkości parametrów antropometrycznych, wyróżniamy otyłość w zależności od gromadzenia się tkanki tłuszczowej: typ brzuszny (trzewny) i pośladkowo-udowy. Pierwszy typ otyłości, występujący głównie u mężczyzn, zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych, zespołu metabolicznego oraz niektórych nowotworów. Typ otyłości pośladkowo-udowej, dotyczy głównie kobiet i niesie za sobą mniejsze ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych. W celu zdiagnozowania otyłości stosuje się liczne metody, które mają na celu umiejscowienie masy tkanki tłuszczowej. W praktyce klinicznej, w celu umiejscowienia tkanki tłuszczowej w narządach, stosuje się metody obrazowe takie jak tomografia komputerowa oraz magnetyczny rezonans jądrowy. Metoda bioimpedancji elektrycznej (BIA) ocenia tłuszczową i beztłuszczową masę ciała. Kolejną metodą wykorzystywaną w diagnostyce otyłości jest absorpcjometria promieniowania X (Bolanowski i wsp., 2005; Jakubowska-Pietkiewicz i wsp. 2009). Badania epidemiologiczne opierają się głównie na pomiarach masy ciała, proporcji obwodu pasa do obwodu bioder oraz obwodu samej talii. Na podstawie tych

pomiarów określa się podstawowe wskaźniki antropometryczne takie jak: BMI - wskaźnik masy ciała (ang. *Body Mass Index*), WHR - proporcja obwodu pasa do obwodu bioder (ang. *Waist to Hip Ratio*) oraz WC – obwód talii (ang. *Waist Circumference*), których interpretacja zależna jest od płci, wieku oraz rasy. Ocenia się również inne, mniej popularne wskaźniki antropometryczne, takie jak: grubości fałdu skórniego, wskaźnik Cola (ang. *LMS – Least Mean Square*), WHtR (ang. *Waist to Height Ratio*) oraz BAI (ang. *Body Adiposity Index*), który w sposób bardziej dokładny niż BMI określa procent tkanki tłuszczowej w organizmie (Komiya i wsp., 2008; Przybylska i wsp., 2012). Należy zwrócić uwagę, że wskaźnik BMI niesie za sobą pewne ograniczenia, ponieważ nie uwzględnia rozmieszczenia tkanki tłuszczowej oraz nie rozgranicza masy tkanki mięśniowej od tłuszczowej. Bardziej precyzyjny okazuje się współczynnik WHtR, który określa stosunek obwodu pasa do wysokości ciała. Wskaźnik ten okazuje się szczególnie istotny w określaniu tkanki tłuszczowej typu brzusznej, jednocześnie precyzyjniej określa ryzyko zespołu metabolicznego oraz chorób układu krążenia (Przybylska i wsp. 2012). W celu sklasyfikowania i diagnozowania otyłości najczęściej stosuje się wskaźnik BMI (Tab. 1).

Tab. 1 Klasyfikacja otyłości.

Klasyfikacja	Wskaźnik BMI kg/m <sup>2</sup>
Waga prawidłowa	18,5 – 24,9
Nadwaga	25,0 – 29,9
Otyłość I stopnia	30,0 – 34,9
Otyłość II stopnia	35,0 – 39,9
Otyłość III stopnia	>40

Otyłość leczy się w zależności od stopnia jej zaawansowania. Przy nadwadze wystarczy zmiana stylu życia, czyli zwiększenie aktywności fizycznej oraz zmianę nawyków żywieniowych. W przypadku otyłości, oprócz zmiany stylu życia, stosuje się leczenie farmakologiczne. Leczenie chirurgiczne rozpatruje się u pacjentów z II i III stopniem otyłości, która obarczona jest dużym ryzykiem rozwoju wielu chorób oraz śmiertelnością (Kłósiewicz-Latoszek, 2010).

## 1.2. Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa jest narządem, w którym magazynowany jest tłuszcz zapasowy (triacylglicerole). Rozproszona jest po całym ciele i odgrywa istotną funkcję endokrynną wpływając na okoliczne narządy. Rozróżniamy kilka ważnych miejsc lokalizacji tkanki tłuszczowej: (i) brzuszna trzewna, (ii) brzuszna podskórna oraz (iii) pośladkowo-udowa (Rosen i wsp. 2014). U kobiet tkanka tłuszczowa gromadzi się głównie w dolnych partiach ciała (biodra i pośladki), natomiast u mężczyzn lokalizuje się w okolicach karku, ramion i brzucha. Tkanka tłuszczowa w głównej mierze jest zbudowana z adipocytów, które gromadzą trójglicerydy - główny zapas energii dla organizmu. Pierwsze komórki tkanki tłuszczowej pojawiają się już w 14 tygodniu życia płodowego. Po narodzeniu tkanka tłuszczowa stanowi około 13% masy ciała i zwiększa swoją objętość do 28% w pierwszym roku życia. Rozrost tkanki w tym okresie związany jest ze wzrostem objętości adipocytów. Następny znaczący wzrost tkanki tłuszczowej następuje w okresie dojrzewania. W tym okresie dochodzi do znaczącego przyrostu liczby adipocytów (Skowrońska i wsp., 2005), co może sprzyjać otyłości w wieku dorosłym (Rosen i wsp. 2014). Poza adipocytami, w tkance tłuszczowej występują również: komórki macierzyste (SVF, ang. *stromal vascular fraction*), preadipocyty, fibroblasty, makrofagi oraz komórki śródbłonna (Siemieńska, 2007).

Wyróżniamy dwa rodzaje tkanki tłuszczowej: białą (WAT, ang. *white adipose tissue*) i brunatną (BAT, ang. *brown adipose tissue*). Tkanka tłuszczowa biała w głównej mierze zbudowana jest z dużych, kulistych adipocytów o średnicy 100-200  $\mu\text{m}$ , wypełnionych w 95% trójglicerydami. Komórka tkanki wypełniona jest dużą kroplą tłuszczu, a cienka warstwa cytoplazmy zawiera niewielką liczbę mitochondriów. W tkance tłuszczowej brunatnej adipocyty są znacznie bardziej rozproszone, a ich rozmiary są znacznie mniejsze. W obrębie komórek tłuszczowych, w cytoplazmie, występują liczne, duże mitochondria, w których na wewnętrznej błonie mitochondriów występuje białko UCP-1 (ang. *uncouple protein*), odpowiedzialne za wytwarzane ciepła w procesie termogenezy. Lipidy stanowią jedynie 30-50% objętości komórki i występują w postaci małych kropelek. W tkance tłuszczowej brunatnej, w momencie zwiększonego poboru węglowodanów i tłuszczu, zwiększa się termogeneza posiłkowa, regulowana przez leptynę oraz mechanizmy ośrodkowe (jądro brzuszno-przyśrodkowe w podwzgórzu ang. *ventromedial nucleus*

VMN). Pojawiająca się po posiłku glukoza, insulina oraz produkowana w tkance tłuszczowej leptyna stymulują receptory VMN, prowadząc do pobudzenia układu współczulnego oraz termogenezy. Główną funkcją tkanki tłuszczowej białej jest magazynowanie energii w postaci związków lipidowych, natomiast tkanka tłuszczowa brunatna odpowiada za wytwarzanie energii. U osób dorosłych tkanka tłuszczowa brunatna zlokalizowana jest w okolicy okołonerkowej, wzdłuż naczyń szyjnych i w okolicy serca. Tkanka tłuszczowa biała utrzymuje stężenie glukozy na stałym poziomie, metabolizuje steroidy płciowe oraz wydziela białka o istotnej funkcji endokrynnej. Substancje przez nią produkowane są nazywane adipokinami. Wpływają na metabolizm glukozy i lipidów, biorą udział w odpowiedzi immunologicznej, regulują łaknienie, ciśnienie tętnicze, proces hemostazy, angiogenezy oraz płodność. Nadmiar adipokin we krwi w momencie gromadzenia coraz większej ilości tkanki tłuszczowej prowadzi do uogólnionej reakcji zapalnej oraz rozwoju insulinooporności, co stanowi początek wielu komplikacji zdrowotnych u osób otyłych (Skowrońska i wsp., 2005; Malinowski i wsp., 2008; Ashima i wsp., 2006; Meier i wsp., 2004).

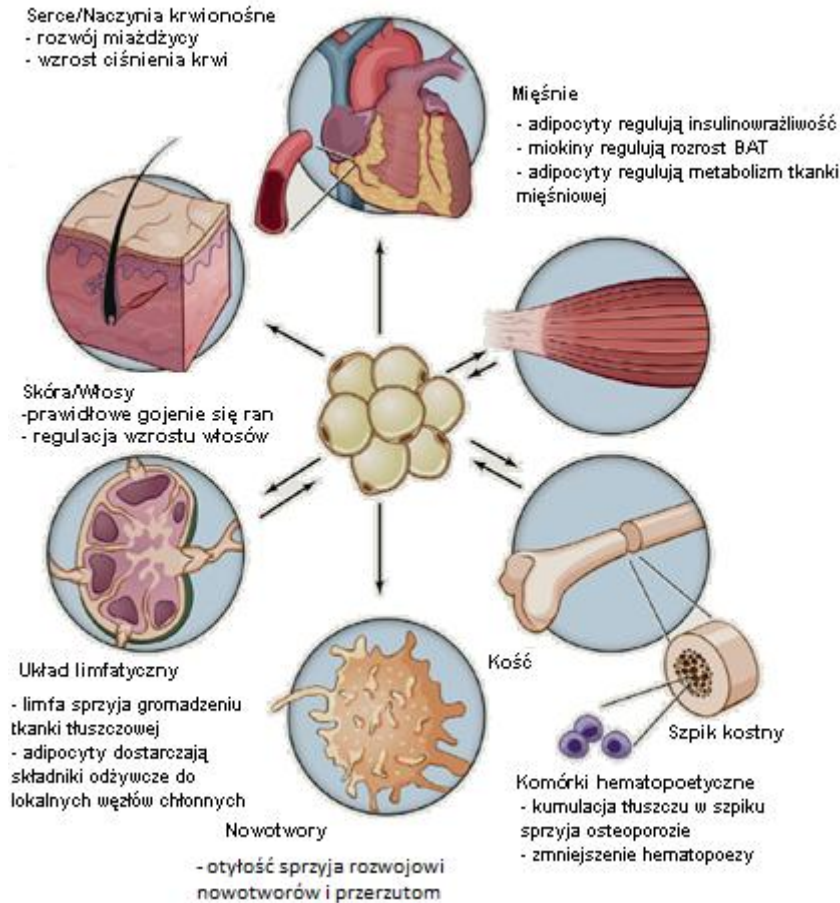
Pomiędzy tkanką tłuszczową trzewną, a podskórną jamy brzusznej można dostrzec istotne różnice. Adipocyty tkanki tłuszczowej trzewnej są niewielkich rozmiarów, a tkanki tłuszczowej podskórnej są dużej wielkości. Szczególnie negatywny wpływ na nasz organizm ma tkanka tłuszczowa trzewna. Przyczynia się do rozwoju zespołu metabolicznego, który charakteryzuje się insulinoopornością, nadciśnieniem tętniczym, dyslipidemią, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Jest to tkanka bardzo aktywna metabolicznie. W związku z insulinoopornością dochodzi w niej do rozpadu trójglicerydów i uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu oraz adipokin bezpośrednio do krążenia wrotnego, co skutkuje stłuszczeniem wątroby, lipotoksycznością oraz jeszcze bardziej pogłębia insulinooporność. Podskórna tkanka tłuszczowa gromadzi 65-70% lipidów i stanowi organ anaboliczny, który po posiłku, pod wpływem insuliny, wychwytuje z krwiobiegu trójglicerydy i magazynuje je w adipocytach. W fizjologicznej podskórnej tkance tłuszczowej adipocyty osiągają duże rozmiary, produkując jednocześnie czynniki pobudzające adipogenezę. Prawdopodobnie funkcjonująca tkanka tłuszczowa podskórna jest insulinooporna i stanowi bufor gromadzący nadmiar energii w postaci trójglicerydów. Porównując tkankę tłuszczową



trzewną i podskórną to ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz chorób układu krążenia jest większe w przypadku rozrostu tkanki tłuszczowej trzewnej. W przypadku niewrażliwości adipocytów tkanki podskórnej na insulinę obniża się proliferacja komórek tkanki tłuszczowej z jednoczesnym zahamowaniem apoptozy, przez co tkanka przestaje pełnić funkcję magazynu trójglicerydów, a tłuszcz zostaje rozmieszczony ektopowo w innych tkankach. Dlatego też wrażliwość tkanki tłuszczowej podskórnej na insulinę chroni przed miejscowym odkładaniem się tłuszczu.

Warto zwrócić również uwagę na tkankę tłuszczową okołonaczyniową, która wpływa na napięcie naczyń krwionośnych (Malinowski 2008). W 2002 roku opisano działanie czynnika rozkurczowego pochodzenia przydankowo-tłuszczowego ADRF (ang. *adventitium-adipocyte derived relaxing factor*), produkowanego przez okołonaczyniową tkankę tłuszczową (Lohn i wsp., 2002). Rozkurczowe działanie ADRF wygasa wraz z wystąpieniem wysokiego zewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu. (Dubrowska i wsp., 2004).

Adipocyty produkują około 50 różnych związków takich jak: enzymy, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu oraz hormony. Wpływają one w sposób pośredni lub bezpośredni na działanie wielu organów (mózg, wątroba, mięśnie szkieletowe), (Jasińska i wsp., 2010). Schemat oddziaływania adipocytów na organizm przedstawia Ryc. 1 poniżej, w Tab. 2 przedstawiona jest charakterystyka działania najistotniejszych adipokin.



Ryc. 1 Wpływ otyłości na funkcjonowanie różnych narządów. (Rosen i wsp., 2014, modyfikacja własna). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

Tab. 2 Charakterystyka wybranych adipokyn (Fruhbeck, 1999; Lembo i wsp., 2000; Yudkin i wsp., 2000; Peelman i wsp., 2004; Schafer i wsp., 2004; de Souza Batista i wsp., 2007; Siemieńska, 2007; Malinowski i wsp., 2008).

Adipokina	Funkcje
<b>Leptyna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- hormon anoreksygenny (↓ apetyt)</li> <li>- wydatkowanie energii</li> <li>- funkcje neuroendokrynne</li> <li>- działanie prozakrzepowe</li> <li>- regulacja ciśnienia krwi</li> <li>- odpowiedź immunologiczna</li> <li>- wpływ na płodność</li> <li>- zmiana ekspresji genów szlaków lipogenezy (↓) i lipolizy (↑)</li> </ul>
<b>Adiponektyna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- regulacja gospodarki węglowodanowej i lipidowej</li> </ul>

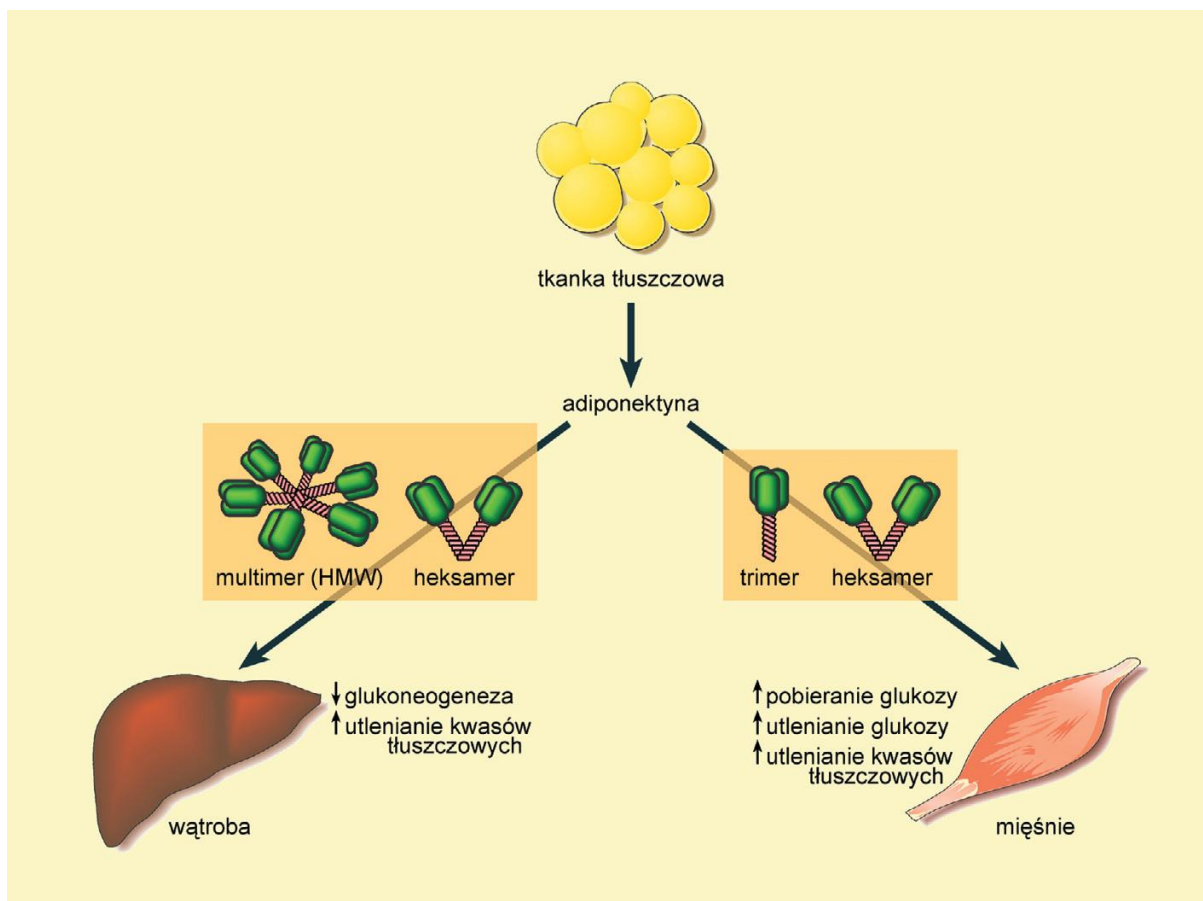
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- działanie przeciwmiażdżycowe</li> <li>- rozkurcz naczyń</li> <li>- działanie przeciwzapalne (<math>\downarrow</math> TNF-<math>\alpha</math>)</li> <li>- marker dojrzałych adipocytów</li> <li>- odpowiedź immunologiczna</li> <li>- wpływ na płodność</li> </ul>
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktywność lipolityczna (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- produkcja białek ostrej fazy (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- regulacja termogenezy</li> <li>- aterogeneza</li> <li>- różnicowanie preadipocytów (<math>\downarrow</math>)</li> <li>- wątrobowa glukoneogeneza (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- synteza CRP (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- przekazywanie sygnałów przez insulinę (<math>\downarrow</math>)</li> <li>- lipoliza (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- wydzielanie adiponektyny (<math>\downarrow</math>)</li> <li>- insulinooporność (<math>\uparrow</math>)</li> </ul>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lipoliza (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- adipogeneza (<math>\downarrow</math>)</li> <li>- różnicowanie preadipocytów (<math>\downarrow</math>)</li> <li>- ekspresja molekuł adhezyjnych na powierzchni śródbłónka (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- nadciśnienie tętnicze</li> <li>- sekrecję adiponektyny (<math>\downarrow</math>)</li> </ul>
<b>Rezystyna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- metabolizm glukozy i lipidów</li> <li>- odpowiedź immunologiczna</li> <li>- TNF-<math>\alpha</math>, IL-1, IL-6, IL-12 (<math>\uparrow</math>)</li> <li>- marker dojrzałości adipocytów</li> </ul>
<b>Omentyna</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- produkowana głównie w tkance tłuszczowej trzewnej</li> <li>- zwiększa insulinooporność</li> <li>- nagromadzenie tłuszczu trzewnego zmniejsza ekspresję genu omentyny</li> <li>- moduluje funkcje śródbłónka (<math>\uparrow</math> eNOS)</li> </ul>

## Leptyna

Leptyna została odkryta w 1994 roku i jest jednym z najistotniejszych białek produkowanych przez adipocyty (Zhang i wsp., 1994; Gogga i wsp., 2011). Produkowana jest głównie przez dojrzałe adipocyty, a jej stężenie jest proporcjonalne do masy białej tkanki tłuszczowej (Gogga i wsp., 2011). Biosynteza leptyny jest uzależniona od wpływu wielu czynników spośród których najważniejsze to insulina (Pratley i wsp., 2000; Lee i wsp., 2007) glukoza oraz glukokortykosteroidy (Sliker i wsp., 1996; Mueller i wsp. 1998; Lee i wsp., 2007). Insulina wywiera jednak najistotniejszy wpływ na jej biosyntezę, regulując tym samym lipogenezę (Bornstein i wsp. 2000; Lee i wsp., 2007). Mniejsza podaż kalorii, a tym samym niskie stężenie glukozy i insuliny we krwi, powoduje spadek ekspresji genów i aktywności enzymów lipogennych (Raghow i wsp., 2008; Kochan, 2009).

## Adiponektyna

Adiponektyna występuje w postaci dwóch form: pełnej (fAD) oraz globularnej (gAD). Obróbka potranslacyjna prowadzi do powstania trzech izoform adiponektyny: trimeru (LMW – ang. *low molecular weight complexes*), heksamery (MMW – ang. *medium molecular weight complexes*) oraz multimeru (HMW – ang. *high molecular weight complexes*) (Wang, 2008). Zwiększa wrażliwość komórek na insulinę poprzez regulację stężenia glukozy i lipidów we krwi. Jest to złożony proces, który prowadzi do: (i) niezależnego od insuliny transportu glukozy do komórek, (ii) zmniejszenia wątrobowej glukoneogenezy, (iii) przyspieszenia spalania wolnych kwasów tłuszczowych, (iv) zmniejszenia kumulacji lipidów w wątrobie i mięśniach oraz (v) zwiększenia stężenia frakcji HDL w surowicy krwi (Berg i wsp., 2001; Olczyk-Wrochna i wsp., 2008). Adiponektyna działa również przeciwmiażdżycowo poprzez: (i) wpływ na komórki śródbłonna, pobudzając je do produkcji tlenu azotu oraz zmniejszając na ich powierzchni ekspresję cząsteczek adhezyjnych, (ii) hamowanie proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich naczyń oraz (iii) hamowanie tworzenia komórek piankowatych (Olczyk-Wrochna i wsp., 2008). Ryc. 2 przedstawia w sposób schematyczny wpływ adiponektyny na regulację metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie.



Ryc. 2 Wpływ adiponektyny na regulację metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie (Karbowska i wsp., 2004).

## IL-6

Interleukina-6 jest glikoproteiną o grywającą znaczącą rolę w regulacji mechanizmów obronnych organizmu, wytwarzaną głównie przez monocyty oraz makrofagi podczas stanu zapalnego. Ponadto jej produkcja zachodzi również w fibroblastach, chondrocytach, śródbłonku, adipocytach, limfocytach T i B, keratynocytach oraz komórkach owodni (Gadina i wsp., 2001; Łukaszewicz i wsp., 2007). Do czynników stymulujących jej produkcję zaliczamy: IL-1, interferon, TNF- $\alpha$ , lipopolisacharydy bakteryjne oraz wirusy DNA i RNA (Gadina i wsp., 2001; Gołąb i wsp., 2002; Łukaszewicz i wsp., 2007).

## TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$ , czynnik martwicy nowotworów, występuje w dwóch formach: alfa (kacheksyna, związana głównie z procesem zapalnym) i beta (limfotoksyna, produkowana głównie przez limfocyty Th) (Oster i wsp., 1987). Produkują go

monocyty i makrofagi głównie podczas aktywacji zapalnej (Baszczuk i wsp. 2014). W znacznie mniejszych ilościach produkowany jest przez adipocyty, keratynocyty, fibroblasty, mastocyty, neutrofile i niektóre limfocyty. Jest to aktywny biologicznie polipeptyd, który odpowiada m.in. za uwalnianie leukotrienów, prostaglandyny, tlenu azotu, czynników aktywujących płytki oraz reaktywnych formy tlenu (Wcisło i wsp., 2002).

### **Rezystyna**

Głównym miejscem biosyntezy rezystyny są monocyty i makrofagi (Karbowska i wsp., 2009). Adipocyty w niewielkim stopniu odpowiadają za produkcję rezystyny, a jej obecność stwierdzono również w szpiku kostnym, łożysku, komórkach wysp trzustkowych oraz płucach. Jest jednym z czynników odpowiedzialnych za insulinooporność, stąd też pochodzi jej nazwa (Karbowska i wsp., 2009).

### **Omentyna**

Omentyna-1 jest produkowana głównie w tkance tłuszczowej trzewnej, a jej produkcja w tkance tłuszczowej podskórnej jest znacznie mniejsza. Omentyna poprzez stymulację insulinozależnego wychwyty glukozy w adipocytach zwiększa insulino-wrażliwość (Szopa i wsp., 2007). Pomimo tego, że jest produkowana w tkance tłuszczowej, u osób otyłych stwierdza się obniżenie stężenie omentyny we krwi. Przyczyną tego faktu jest zmniejszenie ekspresji omentyny w tkance tłuszczowej (de Suoza i wsp., 2007). Badania Urbanova i wsp. oraz Saremi i wsp. pokazują, że w szczególności ćwiczenia fizyczne, jak również dieta zmieniają stężenie omentyny (Urbanova i wsp., 2014; Saremi i wsp., 2010). Omentyna wywiera korzystny wpływ na śródbłonek. Zmniejsza ekspresję cząstek adhezyjnych w śródbłonku, ponieważ blokuje szlak sygnałowy czynników transkrypcyjnych ERK/NF- $\kappa$ B (Zhong i wsp., 2012), jak również wpływa na relaksację naczyń krwionośnych poprzez stymulację uwalniania NO ze śródbłonka i zmniejszenie wrażliwości na noradrenalinę (Yamawaki i wsp., 2010).

### **1.3. Restrykcja kaloryczna**

Otyłość jest stanem patologicznym, który należy leczyć, bez względu, czy towarzyszą jej współistniejące choroby. Bezwzględnie należy wprowadzić leczenie

u pacjentów otyłych, u których stwierdzono zespół metaboliczny, lecz również pojawiającą się: (i) hiperinsulinmia, (ii) oporność na insulinę, (iii) upośledzona tolerancja glukozy, (iv) dyslipidemia, (v) nadciśnienie tętnicze oraz samoistnie występujące choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca, dna moczanowa, choroby nerek i wątroby. W przeważającej liczbie przypadków leczenie otyłości wiąże się ze zmianą nawyków żywieniowych, zmniejszeniem kaloryczności posiłków, zwiększeniem aktywności fizycznej, wsparciem farmakologicznym, a w przypadku otyłości olbrzymiej  $BMI > 40 \text{ kg/m}^2$ , z leczeniem chirurgicznym. W przypadku leczenia otyłości bardzo istotnym czynnikiem jest długoterminowe utrzymanie efektów reżimu dietetycznego, jednakże pacjentom jest bardzo trudno to osiągnąć. Przeważnie otyły pacjent chce w bardzo krótkim czasie stracić jak najwięcej zbędnych kilogramów, a następnie powrócić do starych nawyków. Jednakże tzw. „diety cud”, które przeważnie polegają na drastycznym obniżeniu kaloryczności posiłków prowadzą do szybkiego spadku masy ciała, który jednak nie wiąże się z ubytkiem tkanki tłuszczowej, a spadkiem masy mięśniowej oraz utratą wody. Według obecnego stanu wiedzy, za skuteczny efekt odchudzania, uważa się ubytek masy ciała o 5-10% w ciągu miesiąca, który prowadzi do korzystnych zmian metabolicznych oraz redukcji tkanki tłuszczowej. Prawidłowo skomponowana dieta powinna dostarczyć organizmowi wszystkie niezbędne składniki odżywcze, powinna również uwzględnić regularność oraz prawidłową częstość przyjmowania posiłków (4-5 posiłków dziennie). Przyjmuje się, że dla osób z  $BMI 27-35 \text{ kg/m}^2$  należy ograniczyć podaż kalorii o 500 kcal na dobę, a dla osób z  $BMI > 35 \text{ kg/m}^2$  o 1000 kcal, co prowadzi do utraty wagi o 0,5-1,0 kg na tydzień (Ostrowska, 2010). Przy ustalaniu diety należy uwzględnić również spoczynkową przemianę materii oraz określić stopień aktywności fizycznej pacjenta. Przy tworzeniu diety należy pamiętać, że najwięcej kalorii dostarczają tłuszcze, dlatego należy ograniczyć ich spożycie do 25-30% całkowitego zapotrzebowania kalorycznego. Należy jednak pamiętać, że tłuszcze są niezbędnym składnikiem diety, ponieważ są źródłem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Dieta powinna być bogata w warzywa, ponieważ dostarczają one błonnik, oraz niezbędne minerały i mikroelementy. Powinno się również ograniczyć spożycie słodkich owoców oraz soków ze względu na ich wysoką kaloryczność. Bezwzględnie należy z jadłospisu wyeliminować słodczyce oraz alkohol.

Otyłość to główny czynnik odpowiedzialny za nieprawidłową pracę układu krążenia. Tkanka tłuszczowa zlokalizowana ekotopowo (naczynia krwionośne, nasierdzie, przedsionki itp.) poprzez sekrecję adipokin i indukcję stanu zapalnego zwiększa ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych (Lopez-Jimenez i wsp., 2011; Meijer i wsp., 2011; Nguyen i wsp., 2012). Otyłość negatywnie wpływa również na prawidłowe funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego, który jest ważnym elementem układu krążenia. Wyścielający naczynia nabłonek pełni szereg funkcji regulatorowych, które zostają zaburzone przez nadmierny przyrost tkanki tłuszczowej.

Naukowcy z Uniwersytetu w Helsinkach przeprowadzili doświadczenie na myszach, które miało na celu podkreślenie związku pomiędzy otyłością, a nieprawidłowym funkcjonowaniem śródbłonka naczyniowego. (Ketonen i wsp., 2010). Samce myszy podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa była karmiona paszą o ograniczonej zawartości tłuszczu (17%), a druga grupa paszą o zwiększonej zawartości tłuszczu (do 60%) przez 100 dni. Po tym okresie stwierdzono, że w grupie myszy ze zwiększoną podażą tłuszczu, pojawiła się otyłość i zmiany w aorcie wynikające z nieprawidłowej funkcji śródbłonka naczyniowego. W tym momencie myszom ograniczono kaloryczność posiłków o 30%. Po kolejnych 50 dniach na restrykcji kalorycznej zaobserwowano korzystne zmiany w funkcjonowaniu aortalnych komórek śródbłonek, świadczące o odwróceniu niekorzystnego trendu wywołanego nadmiarem tłuszczu w diecie (Ketonen i wsp., 2010).

Naukowcy z Uniwersytetu w Hiroszynie badali wpływ niskokalorycznej diety na rozkurcz naczyń u pacjentów z nadciśnieniem. Oceniali rozkurcz naczyń pod wpływem uwalnianego ze śródbłonka tlenu azotu (FMD ang. *flow mediated dilatation*). Podczas 2 tygodni trwania restrykcji otyli pacjenci z nadciśnieniem otrzymywali posiłek o standardowej kaloryczności 2400 kcal/dzień. W kolejnym tygodniu zredukowano kaloryczność posiłków do 800 kcal/dzień, lecz nie zalecono wysiłku fizycznego, aby ocenić wpływ samej restrykcji na poprawę funkcjonowania naczyń. Po tygodniu samej diety zaobserwowano poprawę FMD, co sugeruje, że zmniejszenie kaloryczności posiłków wpływa korzystnie na śródbłonek naczyniowy, który poprzez zwiększenie produkcji tlenu azotu rozszerza naczynia krwionośne (Sasaki i wsp., 2002).



#### **1.4. Wpływ restrykcji kalorycznej na profil ekspresji genów**

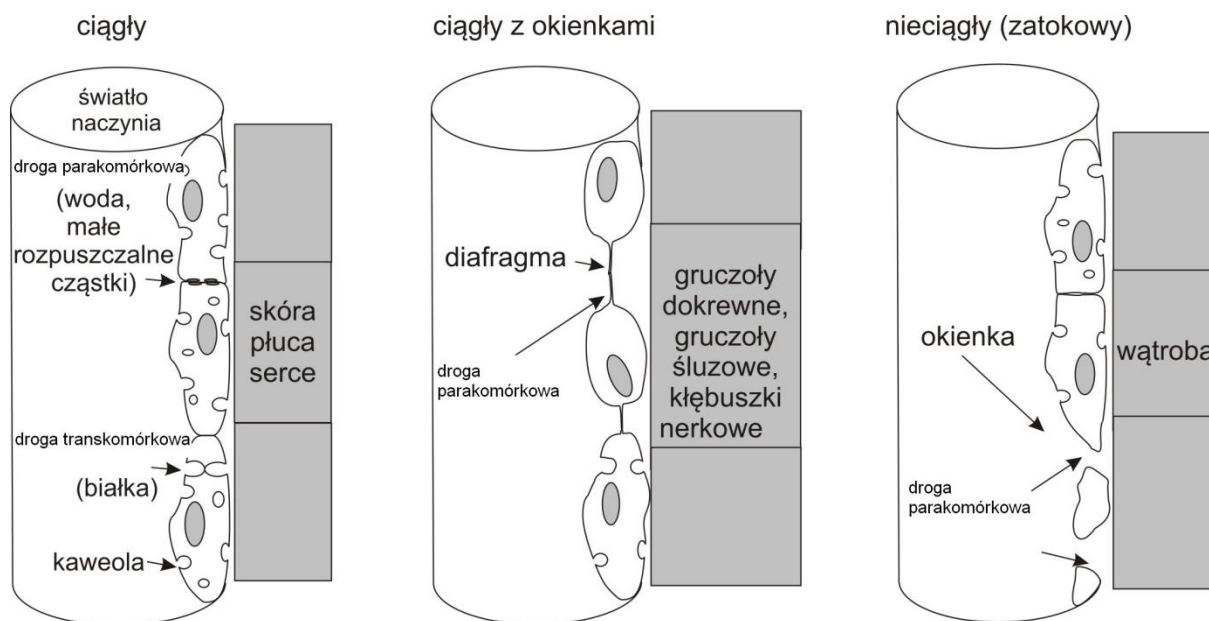
Czynniki genetyczne mogą zwiększać zapadalność na różne choroby. Rozwój określonych schorzeń u osób z predyspozycją rozwija się jednak często pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak między innymi sposób odżywiania. W 1975 roku pojawiła się nowa gałąź nauki, zwana nutrigenetyką, która bada zależności pomiędzy zmianą ekspresji genów, a różnymi czynnikami odżywczymi (Brennan R.O., 1975). Przebadano między innymi wpływ różnorodnych diet na profil ekspresji genów w monocytach i limfocytach (Crujeiras i wsp., 2008), komórkach wątroby (Hietaniemi i wsp. 2009), czy komórkach tkanki tłuszczowej (Capel i wsp., 2009). Dotychczasowe badania nie dają konkretnej odpowiedzi, czy zaobserwowane zmiany w ekspresji poszczególnych genów były spowodowane redukcją masy ciała, czy wynikały z ujemnego bilansu energetycznego. Istnieją przypuszczenia, że zmiany ekspresji genów w adipocytach są uwarunkowane samą restrykcją kaloryczną, a nie stopniem utraty masy tkanki tłuszczowej (Viguerie i wsp., 2005). Występuje bardzo dużo zmiennych, które wpływają na ekspresję konkretnej grupy genów. Na pewno decydujący jest czas trwania restrykcji kalorycznej, rodzaj stosowanej diety, wpływ aktywności fizycznej, grupa badanych otyłych pacjentów, którzy zwykle nie są osobami zdrowymi. Dane z publikacji z nutrigenetyki dostarczają podobnych sugestii, co do grupy genów, które ulegają modyfikacji. Zaobserwowano zmiany dotyczące genów zaangażowanych w cykl komórkowy (Crujeiras i wsp., 2008; Hietaniemi i wsp., 2009), metabolizm białek, lipidów i węglowodanów (Crujeiras i wsp., 2008; Hietaniemi i wsp. 2009; Capel i wsp., 2009) oraz genów istotnych dla reakcji zapalnej (Crujeiras i wsp., 2008; Capel i wsp., 2009).

W 2006 roku Yoshikazu i wsp. opublikował, pracę, w której przedstawiono wpływ restrykcji kalorycznej na ekspresję ponad 11 000 genów białej tkanki tłuszczowej u młodych myszy (Yoshikazu i wsp., 2006). Zwierzętom ograniczono kaloryczność posiłków w różnym czasie przed uśmierceniem. Najistotniejsze zmiany zaobserwowano u zwierząt, które pozostawały na restrykcji najdłużej, bo aż 9 miesięcy. Zaobserwowano zmiany w genach odpowiedzialnych za angiogenezę, budowę cytoszkieletu oraz odpowiedź zapalną. Krótki okres trwania restrykcji (18 h, 23 dni) nie spowodował istotnych zmian ekspresji genów. Świadczy to, że dopiero długotrwała restrykcja kaloryczna zmniejsza ekspresję genów prozapalnych,

przebudowy cytoszkieletu oraz reguluje rozrost sieci naczyń krwionośnych w obrębie tkanki tłuszczowej (Yoshikazu i wsp., 2006).

### 1.5. Śródbłonek naczyniowy

Śródbłonek naczyniowy (łac. *endothelium*) jest jednowarstwowym, wyspecjalizowanym nabłonkiem, który powstaje w życiu płodowym z mezodermi na skutek różnicowania się hemangioblastów w kierunku angioblastów. Wyściela wewnętrzną powierzchnię naczyń krwionośnych, limfatycznych oraz jam i zastawek serca. Składa się z jednej warstwy wyspecjalizowanych komórek, o wymiarach 10 x 30 x 0,2  $\mu\text{m}$  i kształcie romboidalnym (Sawicki i wsp., 2012). Komórki śródbłonka wykazują specyfikę gatunkową, narządową, zróżnicowanie antygenowe, jak również odmienną ekspresję cząstek adhezyjnych (Sachais, 2001; Chłopicki, 2003). W zależności od umiejscowienia wyróżniamy trzy rodzaje śródbłonka: (i) ciągły, (ii) ciągły z okienkami oraz (iii) nieciągły (zatokowy). Rodzaje śródbłonka przedstawia Ryc. 3.



Ryc. 3 Przykłady różnych rodzajów komórek śródbłonka (Trojan i wsp., 2014).

Przez wielu *endothelium* określane jest mianem narządu, ze względu na swoje występowanie w całej sieci naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz obecność w jamach serca. U dorosłej osoby śródbłonek pokrywa powierzchnię od 1-7  $\text{m}^2$ , a całkowita jego masa to ok. 1 kg (Anggard i wsp., 1990). Śródbłonek nie tylko

rozdziela składniki komórkowe krwi od tkanki łącznej i mięśniowej naczyń, ale również spełnia szereg funkcji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania układu krążenia. Funkcje śródbłonna naczyniowego w sposób schematyczny przedstawia Tab. 3.

Tab. 3 Funkcje komórek śródbłonna naczyniowego (Cines i wsp., 1998; Widlansky i wsp., 2003; Brevetti i wsp., 2008; Sprague i wsp., 2009).

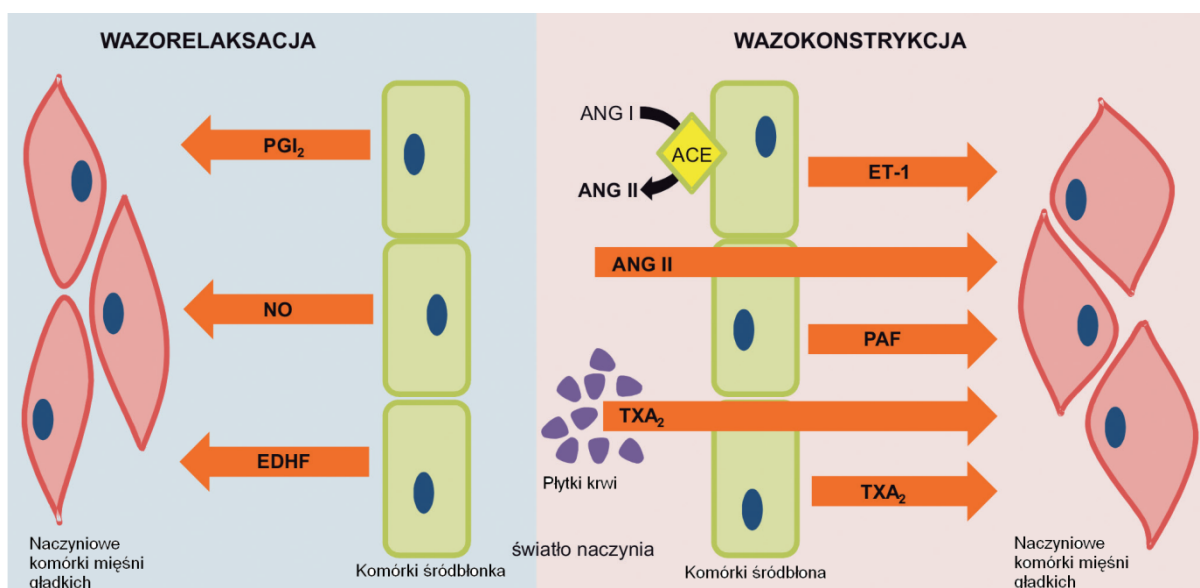
<b>FUNKCJA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stanowi barierę pomiędzy krwią a tkankami</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje napięcie ściany naczynia               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki rozszerzające naczynia: NO, EDHF (CNP)</li> <li>○ czynniki kurczące naczynia: ET-1, PGE<sub>2</sub>, Ang II (przez ACE), TXA<sub>2</sub>, rodniki tlenowe</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje proces krzepnięcia               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki pobudzające: vWF, tromboplastyna tkankowa (TF), rodniki tlenowe</li> <li>○ czynniki hamujące: trombospondulina (TM), siarczan heparanu, siarczan dermatanu, TFPI</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje proces fibrylizacji               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki pobudzające: t-PA, uPA</li> <li>○ czynniki hamujące: PAI-1, PAI-2</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje agregację płytek               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki pobudzające: TXA<sub>2</sub></li> <li>○ czynniki hamujące: NO, PGI<sub>2</sub>, ADP-aza</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje diapedezę leukocytów: Il-1, Il-6, Il-8, MCP-1, GM-CSF, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM, selektyna E, selektyna P</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wpływa na przebudowę naczynia krwionośnego (ang. <i>remodeling</i>)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki pobudzające: PDGF, ET-1, Ang II (poprzez ACE),</li> <li>○ czynniki hamujące: NO, TGF-beta</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguluje angiogenezę               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ czynniki pobudzające: VEGF, bFGF, PDGF, MMPs, vWF, PAI-1, Ang-1, Il-1, Il-8, PGE<sub>2</sub>, NO, GM-CSF, TGF-beta, IGF-1</li> <li>○ czynniki hamujące: trombospondyna -1, TIMPs, Ang-2</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wydziela białka macierzy pozakomórkowej: vWF, kolagen IV, fibronektyna, laminina, elastyna, trombospondyna</li> </ul>

Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

### **Wpływ śródbłonna na napięcie ściany naczyniowej**

Najistotniejszym czynnikiem pochodzenia śródbłonkowego, rozszerzającym naczynia krwionośne, jest tlenek azotu (NO ang. *nitric oxide*). Stężenie tlenu azotu

wzrasta pod wpływem sił hemodynamicznych przepływu krwi oraz bradykininy i trombiny (Mombouli i wsp., 1992; Gryglewski i wsp., 2002). Enzymem odpowiedzialnym za jego produkcję jest endotelialna syntaza tlenku azotu (eNOS, NOS-3 ang. *endothelial nitric oxide synthase*). Podstawową funkcją tlenku azotu jest relaksacja naczyń, ale również hamowanie agregacji płytek krwi, działanie przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne (Kubes i wsp., 1991; Sarkar i wsp., 1996; Janssens i wsp., 1998). Jednym z istotniejszych czynników produkowanych przez komórki śródbłonka jest prostacyklina ( $PGI_2$ ), która odpowiada za relaksację mięśniówki gładkiej naczyń oraz ma właściwości antyagregacyjne. Prostacyklina hamuje również wazokonstrykcyjne i proagregacyjne działanie tromboksanu  $A_2$  ( $TXA_2$ ), produkowanego przez trombocyty. Istotną rolę we wzroście stężenia NO i  $PGI_2$  odgrywa bradykinina, która jest szybko rozkładana przez enzym konwertazę angiotensyny. Enzym ten ogranicza dostępność czynników wazodylatacyjnych, jak również konwertuje nieaktywną angiotensynę I w angiotensynę II, która wykazuje działanie wazokonstrykcyjne. Szczególną rolę w relaksacji naczyń odgrywa również hiperpolaryzujący czynnik pochodzenia śródbłonkowego, którego działanie polega na stymulowaniu aktywności kanałów potasowych, przy czym spadek poziomu potasu prowadzi do stanu hiperpolaryzacji wewnątrzkomórkowej. Ryc. 4 przedstawia w sposób schematyczny regulację napięcia ściany naczynia krwionośnego.

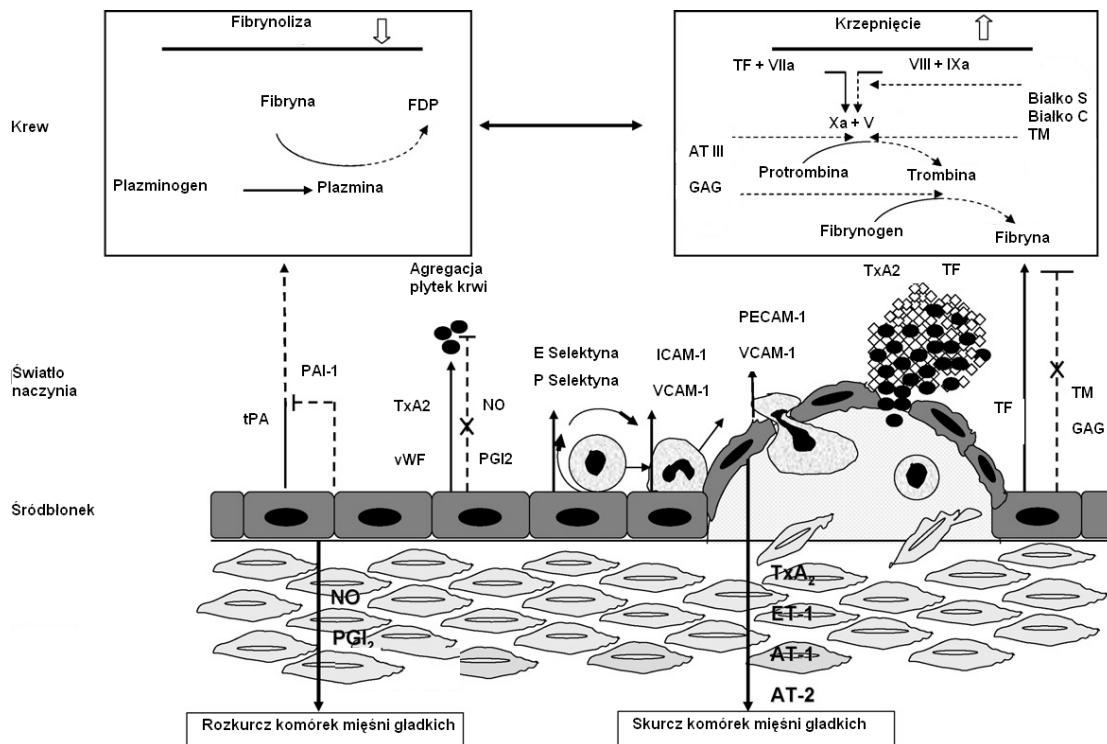


Ryc. 4 Regulacja napięcia ściany naczynia krwionośnego (Tomczyk i wsp., 2013).

Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

## Wpływ śródbłonka na proces hemostazy

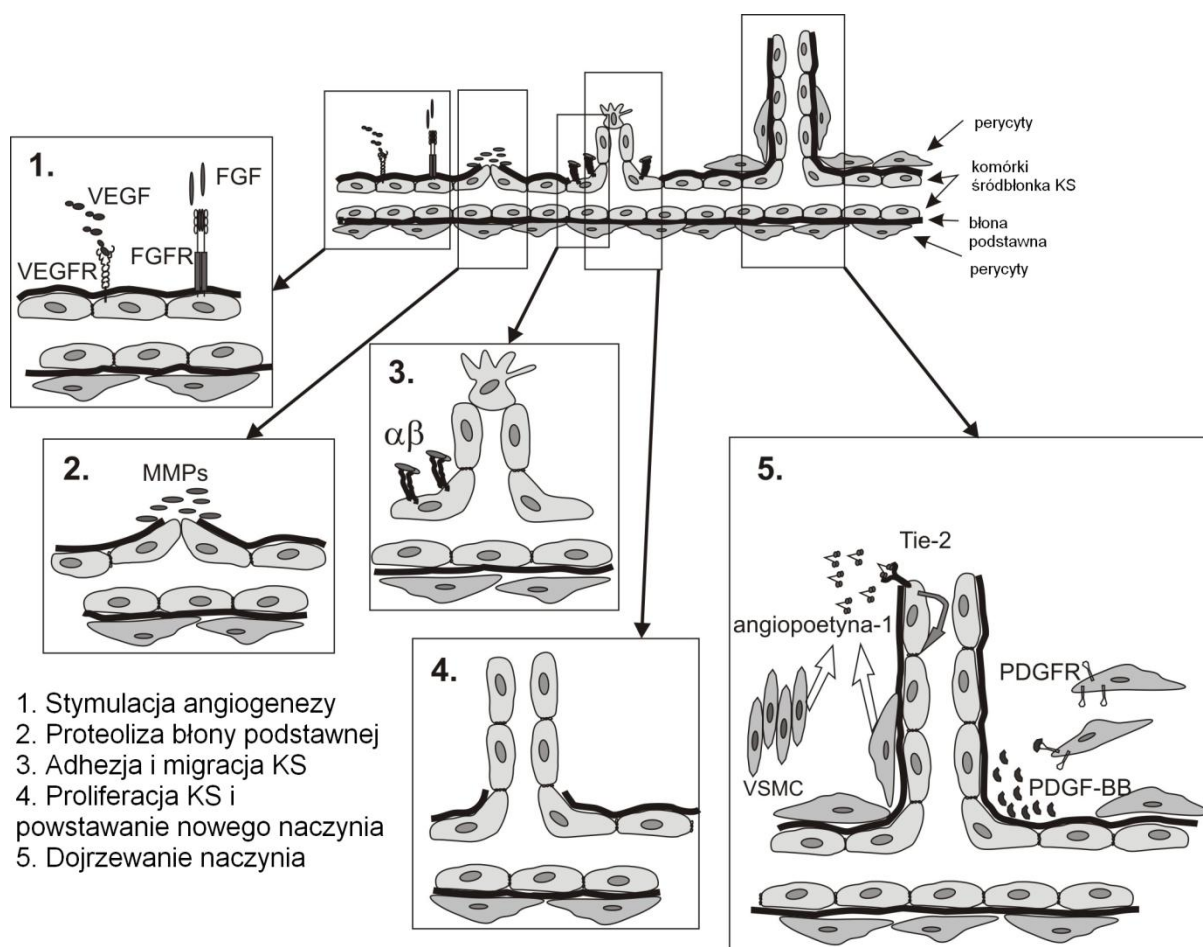
Śródbłonek odgrywa niezwykle istotną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesem krzepnięcia i fibrynolizy. Ma to zapewnić płynność krwi wewnątrz naczynia poprzez zahamowanie miejscowych procesów wykrzepiania i agregacji płytek. Komórki śródbłonka tworzą szczelną granicę pomiędzy osocзовymi czynnikami krzepnięcia i płytkami, a głębszymi warstwami ściany naczynia, które je aktywują (Cines i wsp., 1998). Śródbłonek produkuje zarówno czynniki stymulujące, jak i hamujące proces krzepnięcia. Czynnikiem tkankowym (ang. *tissue factor*, TF), zwany również tromboplastyną tkankową, którego ekspresja wzrasta w momencie stanu zapalnego lub w kontakcie z drobnoustrojami, prowadzi do wygenerowania trombiny. Oprócz tego, że trombina decyduje o powstaniu włókniaka, jest również czynnikiem mitogennym dla wielu komórek np. fibroblastów, śródbłonka oraz miocytów. Jest najsilniejszym fizjologicznym agonistą płytek krwi oraz czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów. Śródbłonek jest głównym źródłem czynnika von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*, vWF), decydującego o procesie adhezji i agregacji płytek krwi, a przez to tworzenia skrzepu. Do czynników hamujących proces krzepnięcia należy białko, które zmniejsza generację trombiny - trombomodulina (ang. *trombomodulin*, TM). Wiążąc się z trombiną hamuje proces konwersji fibrynogenu do fibryny. Na powierzchni śródbłonka znajdują się również liczne aktywatory plazminogenu (t-PA, uPA), które zapewniają prawidłowy proces fibrynolizy, co stanowi przeciwwagę dla procesu krzepnięcia zapewniając prawidłowy przepływ krwi przez naczynie. Ich synteza wzrasta szczególnie w momencie miejscowego nagromadzenia włókniaka. Czynniki hamujące proces fibrynolizy są inhibitory aktywatora plazminogenu 1 i 2 (PAI 1 i 2, ang. *plasminogen activator inhibitor*). PAI produkowany jest w znacznych ilościach przez komórki śródbłonka i magazynowany w macierzy pozakomórkowej, w celu zabezpieczenia go przed dezaktywacją (Lewin i wsp., 1987; Higazi i wsp., 1996). Wpływ śródbłonka na proces hemostazy przedstawia Ryc. 5.



Ryc. 5 Wpływ śródbłonna na proces krzepnięcia i fibrylizacji (Brevetti i wsp., 2008; modyfikacja własna). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

### Wpływ śródbłonna na proces angiogenezy

Angiogeneza jest to proces powstawania nowych naczyń krwionośnych z już istniejących naczyń. Procesy tworzenia naczyń zachodzą zarówno w procesach fizjologicznych (cykl menstruacyjny, ciąża), jak i patologicznych (stany zapalne, nowotwory) (Folkman, 1997). Czynnikiem, który najsilniej pobudza proces angiogenezy jest hipoksja. W jej efekcie w komórkach śródbłonna wzrasta synteza czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  (ang. *hypoxia-inducible factor  $\alpha$* ). Jednym z najistotniejszych czynników angiogennych, którego synteza wzrasta w odpowiedzi na HIF-1 $\alpha$ , jest naczyniowy czynnik wzrostu komórek śródbłonna VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). VEGF został odkryty w 1989 roku przez Ferrara i Henzela (Ferrara i wsp. 1989). Pobudza on śródbłonek do migracji, proliferacji, hamuje apoptozę, stymuluje produkcję NO, przez co zwiększa przepuszczalność naczyń (Senger i wsp., 1993; Ferrara i wsp., 1997 A; Ferrara i wsp., 1997 B; Neufeld i wsp., 1999; Koczy-Baron i wsp., 2014). Uczestniczy zarówno w fizjologicznej, jak i patologicznej angiogenezie (Dvorak i wsp., 1995). Proces angiogenezy w sposób schematyczny przedstawia Ryc. 6.



Ryc. 6 Przebieg procesu angiogenezy komórek śródbłónka (KS) (Trojan i wsp., 2014). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

### Aktywacja zapalna śródbłónka

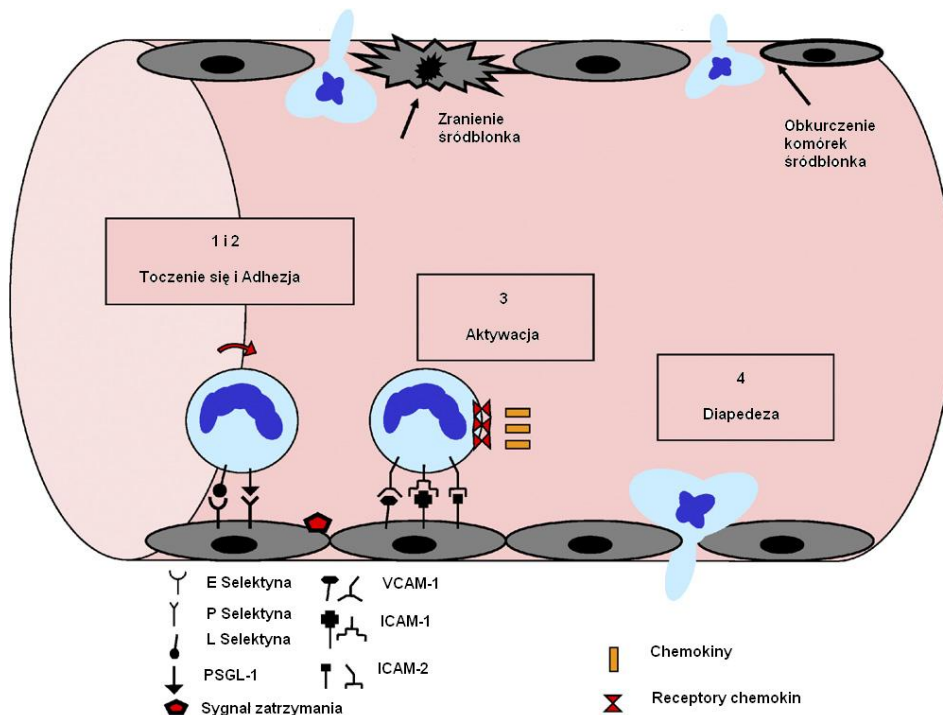
Śródbłonek decyduje o rozpoczęciu reakcji zapalnej. Poprzez produkcję cytokin oraz ekspozycję odpowiednich molekulek adhezyjnych na swojej powierzchni, inicjuje diapedezę. Początkiem tej reakcji jest pojawienie się mediatorów stanu zapalnego (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1, IL-4). Pojawienie się cząstek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłónka, rozpoczyna proces wiązania się odpowiednich ligandów obecnych na powierzchni leukocytów z odpowiednimi cząsteczkami na powierzchni śródbłónka. Początkowo połączenia te są nietrwałe, ponieważ pierwszy etap „toczenia się” leukocytów po powierzchni śródbłónka zachodzi za pośrednictwem glikoprotein błony komórkowej. Oddziałują ze sobą selektyna L obecna w leukocytach (ang. *selectin L*) oraz śródbłónkowa selektyna E i P. Nietrwałość tego połączenia wynika z faktu złuszczenia się selektyn z powierzchni

komórek śródbłonka. Pod wpływem kontaktu z leukocytami zwiększa się ekspresja VCAM (ang. *vascular cell adhesion molecule*) oraz ICAM (ang. *intercellular adhesion molecule*) w śródbłonku, które prowadzą do trwałej diapedezy w miejscu stanu zapalnego (Cines i wsp., 1998). Stan zapalny zwiększa ekspresję szeregu cząstek adhezyjnych w błonie komórkowej śródbłonka, które determinują przepuszczalność dla ściśle określonych leukocytów np. monocytów, limfocytów czy neutrofile z krwi obwodowej do tkanki objętej stanem zapalnym (Tab. 4). Oddziaływanie śródbłonka z leukocytami przedstawia Ryc. 7.

Tab. 4 Molekuły adhezyjne zlokalizowane na powierzchni komórek śródbłonka oraz odpowiadające im komórki docelowe krwi obwodowej.

<b>Molekuły adhezyjne zlokalizowane na powierzchni śródbłonka</b>	<b>Komórki docelowe</b>
ICAM-1	limfocyty, monocyty, neutrofile
VCAM-1	limfocyty, monocyty
PECAM-1	limfocyty, trombocyty, neutrofile, monocyty
Selektyna E	monocyty, neutrofile, trombocyty
Selektyna P	monocyty, neutrofile, trombocyty





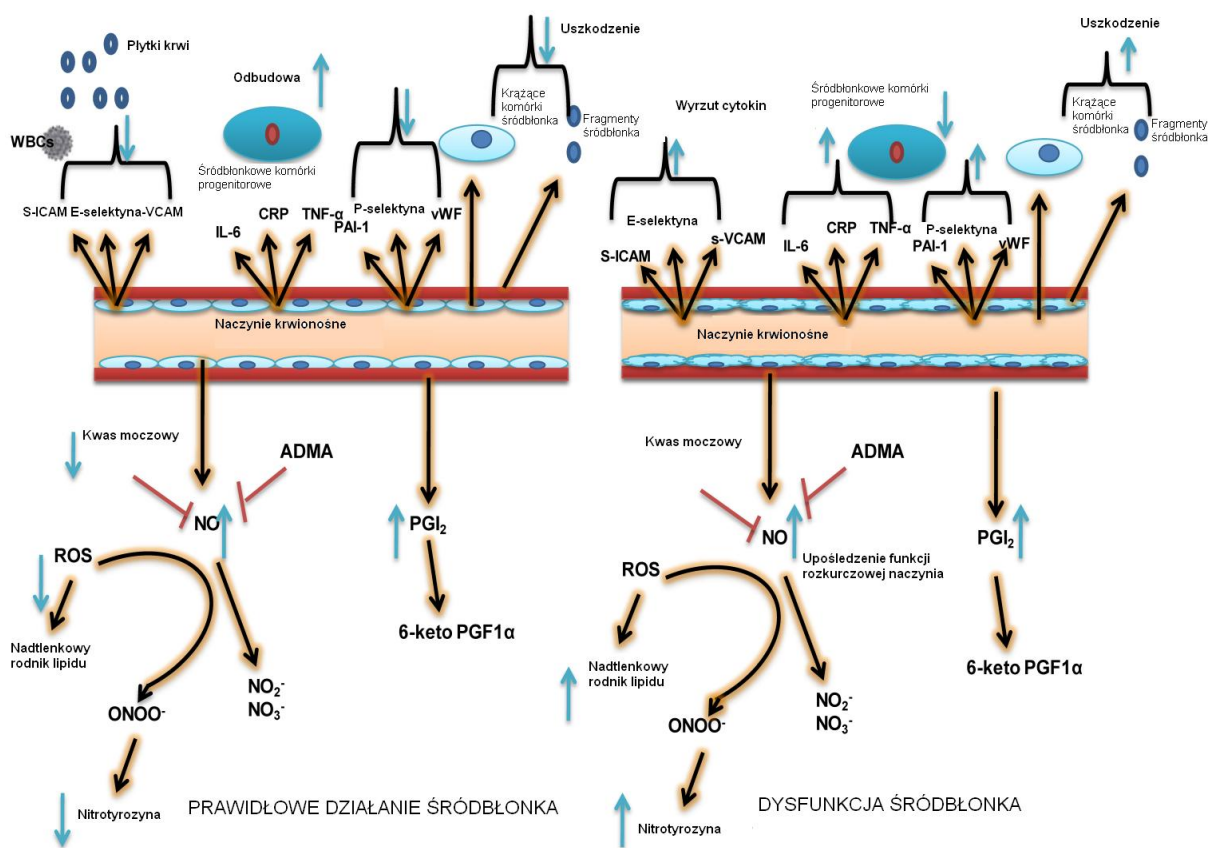
Ryc. 7 Oddziaływanie komórek śródbłonka naczyniowego z leukocytami krwi obwodowej (Khazaei i wsp., 2008; modyfikacja własna). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

### 1.6. Dysfunkcja komórek śródbłonka w otyłości

Otyłość jest odpowiedzialna za dysfunkcję śródbłonka naczyniowego (Simionescu, 2007) (Ryc. 9). Stan ten charakteryzuje się między innymi zmniejszoną produkcją tlenku azotu w odpowiedzi na acetylocholinę oraz większym uwalnianiem czynnika von Willebranda (Hamilton i wsp., 2007). Konsekwencją dysfunkcji śródbłonka jest jego aktywacja zapalna prowadząca do wzrostu produkcji cytokin prozapalnych i chemotaktycznych oraz ekspresji molekuł adhezyjnych prowadząc do adhezji leukocytów i płytek oraz tworzeniem się blaszki miażdżycowej (Chłopicki, 2005; Obońska i wsp., 2011). Otyłości często towarzyszy hiperlipidemia, hiperglikemia, co dodatkowo pogarsza funkcjonowanie śródbłonka (Tomczyk i wsp., 2013). W otyłości bezpośredni kontakt z podwyższonym stężeniem cholesterolu, zmienia fenotyp śródbłonka na tzw. fenotyp wydzielniczy. Charakteryzuje się on zmianami w cytoszkielecie, powiększeniem aparatu Golgiego oraz siateczki śródplazmatycznej (Simionescu, 2007). Następstwem tych zmian jest rozrost błony podstawnej oraz akumulacja lipoprotein pod warstwą komórek śródbłonka. Ponieważ otyłości towarzyszy często hiperglikemia indukująca stres oksydacyjny (Fadini G.P

i wsp., 2005; Segal M.S i wsp., 2006), lipoproteiny ulegają niekorzystnym modyfikacją jak glikacja, czy utlenienie (oxyLDL) (Sitia i wsp., 2010; Tomczyk i wsp., 2013).

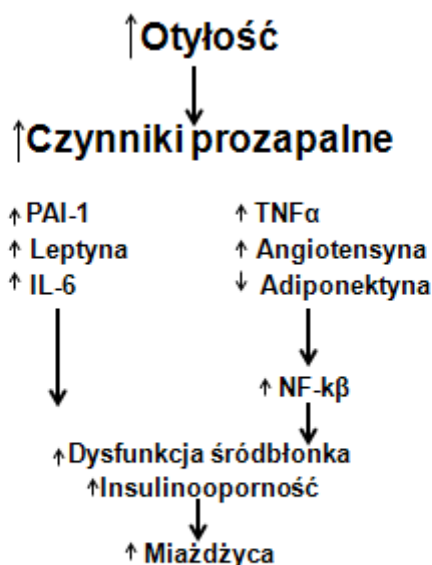
To właśnie oxyLDL są najistotniejszym czynnikiem zmieniającym fenotyp komórek śródbłonna, prowadzącym do ich dysfunkcji (Chłopicki, 2005; Keaney i wsp., 1996). Nieprawidłowa glikemia zmniejsza również produkcję eNOS oraz VEGF upośledzając relaksację naczyń krwionośnych i proces angiogenezy (Loomans i wsp., 2009). Charakterystyczne objawy dysfunkcji śródbłonna przedstawia Ryc. 8 oraz Tab. 5.



Ryc. 8 Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego (Rajendran i wsp., 2013; modyfikacja własna). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

Tab. 5 Dysfunkcja komórek śródbłonna naczyniowego (Widlansky i wsp., 2003; Brevetti i wsp., 2008).

<b>DYSFUNKCJA KOMÓREK SRÓDBŁONKA</b>	
<b>PARAMETR</b>	<b>SKUTEK</b>
↓NO	skurcz naczyń krwionośnych
↑ ET-1	skurcz naczyń krwionośnych
↑ Ang II	skurcz naczyń krwionośnych
↑ PGH <sub>2</sub>	skurcz naczyń krwionośnych
↓PGI <sub>2</sub>	skurcz naczyń krwionośnych
↓EDHF	skurcz naczyń krwionośnych
↓t-PA	upośledzenie fibrynolizy
↑ PAI-1	upośledzenie fibrynolizy
↑ TF	działanie prozakrzepowe
↑ vWF	działanie prozakrzepowe
↓TM	działanie prozakrzepowe
↓TFPI	działanie prozakrzepowe
↑ ICAM-1	działanie prozapalne
↑ VCAM-1	działanie prozapalne
↑ II-6	działanie prozapalne
↑ II-8	działanie prozapalne
↑ MCP-1	działanie prozapalne
↑ O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	działanie prozapalne i naczyniokurczące
↑ONOO <sup>-</sup>	działanie prozapalne i naczyniokurczące



Ryc. 9 Zależność pomiędzy otyłością, a funkcją śródbłonna (Lyon J. i wsp., 2003; modyfikacja własna). Skróty zostały wyjaśnione w wykazie skrótów str. 7-9.

### 1.7. Otyłość - różnice wynikające z płci

Różnice w budowie i funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej uwidaczniają się już w dzieciństwie. Zarówno rozmiar, jak ilość i rozmieszczenie tkanki tłuszczowej są zdeterminowane poprzez hormony płciowe. U kobiet przed menopauzą tkanka tłuszczowa podskórna zlokalizowana jest głównie w okolicy udowo-pośladkowej (sylwetka typu gruszka, otyłość ginoidalna). W przypadku mężczyzn tkanka tłuszczowa rozrasta się głównie w okolicy jamy brzusznej (sylwetka typu jabłko, otyłość androidalna) (Przybylska i wsp., 2012). Rozwój otyłości trzewnej, który jest charakterystyczny dla mężczyzn, wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego. U kobiet po menopauzie wzrasta ilość tkanki tłuszczowej trzewnej, nawet o 50%, co niweluje dymorfizm płciowy w tym zakresie (Toth i wsp., 2000). U mężczyzn wyliczane indeksy określające otyłość (np. WHR, BMI, obwód talii) okazują się zdecydowanie wyższe niż w przypadku kobiet (Shimokata i wsp., 1989). Gromadzenie się tkanki tłuszczowej w górnej i centralnej części ciała wzrasta wraz z wiekiem (Shimokata i wsp., 1989). Wpływ na ilość i lokalizację tkanki tłuszczowej mają hormony płciowe, co widać szczególnie u kobiet po menopauzie, gdzie dochodzi do gromadzenia się tkanki tłuszczowej w regionie

jamy brzusznej. Dostrzegalne są również różnice w funkcji wydzielniczej tkanki tłuszczowej. Stężenia adipokin różnią się pomiędzy płciami. Dotyczy to szczególnie leptyny oraz adiponektyny (Esteghamati i wsp., 2013; Hellstrom i wsp., 2000). Stężenie leptyny koreluje z masą tkanki tłuszczowej i wzrasta w sposób ciągły ze zwiększeniem wagi ciała u kobiet i mężczyzn. Kobiety charakteryzują się trzy razy większym stężeniem leptyny w porównaniu z mężczyznami, ze względu na większy procentowy udział tkanki tłuszczowej w porównaniu z mężczyznami i większą ilość wydzielanej leptyny na jednostkę masy tkanki tłuszczowej. Stężenie leptyny jest odwrotnie proporcjonalne do wieku i spada o około 50% u osób powyżej 60 roku życia (Ostlund i wsp., 1996; Hellstrom i wsp., 2000). Stężenie adiponektyny u osób otyłych spada w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała (Fantuzzi, 2008). Jej stężenie podlega wpływom androgenów. Jest to szczególnie zauważalne podczas dojrzewania płciowego. Dojrzewający chłopcy mają niższe stężenie adiponektyny w porównaniu z dziewczętami. Podobny efekt obserwuje się u dorosłych mężczyzn. Natomiast podobny efekt utrzymujący się u kobiet i mężczyzn w podeszłym wieku nie jest już tak łatwo wytłumaczyć zmianą stężenia hormonów. (Bottner i wsp., 2004). Obecnie naukowcy do oceny tych dwóch bardzo istotnych adipokin wykorzystują proporcję pomiędzy wydzielaniem leptyny i adiponektyny – LAR (ang. *leptin to adiponectin ratio*) (Finucane i wsp., 2009). Omentyna to kolejna adipokina, której stężenie jest zależne od płci. Niższe stężenie omentyny stwierdza się u mężczyzn w porównaniu z kobietami (Olszanecka-Glinianowicz i wsp., 2009).

## 2. Cel pracy

Nadmierny rozrost tkanki tłuszczowej prowadzi do rozwoju licznych powikłań zdrowotnych. Tkanka tłuszczowa jest aktywna metabolicznie i produkuje szereg prozapalnych adipokin. Prowadzi to do pogorszenia funkcji śródbłonka naczyniowego odpowiedzialnego za homeostazę naczyniową. Uważa się, że zaburzenie czynności komórek śródbłonka, u osób otyłych można zmniejszyć stosując ograniczenia dietetyczne. Nie jest jednak jasne, czy korzyść ta wymaga jednoczesnej utraty masy ciała, czy jest to tylko efekt związany ze zmniejszonym spożyciem kalorii. Analizując ten problem należy zwrócić uwagę na dobór grupy badawczej. Charakterystyka otyłych kobiet i otyłych mężczyzn jest inna. W dużym uproszczeniu wynika to z (i) innej dystrybucji tkanki tłuszczowej determinowanej hormonami płciowymi, (ii) większej ilości tkanki tłuszczowej trzewnej u mężczyzn, oraz (iii) różnicą w wydzielaniu niektórych adipokin. W związku z tym w prezentowanej pracy do grupy badanej zrekrutowano tylko otyłe kobiety. Z jednej strony ułatwiło to interpretację uzyskanych wyników, a z drugiej było podyktowane tym, iż kobiety chętniej poddają się leczeniu dietetycznemu niż mężczyźni.

Celem pracy była ocena funkcji śródbłonka naczyniowego u otyłych kobiet po umiarkowanej restrykcji kalorycznej trwającej 8 tygodni.

Cel pracy został osiągnięty poprzez analizę czterech problemów badawczych.

- Ocenę efektywności umiarkowanej restrykcji kalorycznej mierzoną zmianą parametrów sercowo-naczyniowych, składu masy ciała, profilu wydzielania adipokin, stresu oksydacyjnego, gospodarki lipidowej i węglowodanowej.
- Ocenę profilu ekspresji genów komórek śródbłonka naczyniowego po ekspozycji na medium z dodatkiem surowicy pacjentów otyłych, u których stwierdzono największy spadek masy ciała po RK, w warunkach hodowli *in vitro*.
- Ocenę biomarkerów funkcji komórek śródbłonka naczyniowego w surowicy otyłych pacjentek w dwóch grupach, w zależności od uzyskanej straty masy ciała.
- Ocenę wzajemnych korelacji pomiędzy uzyskanymi parametrami z wykorzystaniem metod statystycznych.

### 3. Materiał i Metoda

Protokół badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (uchwała nr 217/11 oraz aneks 279/14). Każdy z pacjentów podpisał zgodę na udział w badaniu oraz został szczegółowo poinformowany o jego przebiegu.

#### 3.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiły osoby leczone z powodu otyłości w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Kryterium wykluczenia stanowiły: udział w innym badaniu klinicznym, cukrzyca, leczenie chirurgiczne otyłości, zaburzenia odżywiania, ciąża, hormonalna antykoncepcja, menopauza, uzależnienie alkoholowe, niewydolność serca i ostry zespół wieńcowy w ostatnich 6 miesiącach, choroba nowotworowa oraz zmiana wagi ciała  $\pm$  2 kg w ciągu ostatnich 3 miesięcy. Do badań przystąpiły 64 otyłe kobiety, z czego okres restrykcyj utrzymało tylko 41. Z badań odpadło 36% osób (ang. *drop-out rate*). U 41 pacjentek, które utrzymały reżim dietetyczny najczęściej występującą jednostką chorobową, towarzyszącą otyłości, była nietolerancja glukozy (leczenie metforminą) oraz choroby tarczycy (leczenie: Euthyrox) (Tab. 6, Tab. 7). W grupie badanej były również osoby z leczonym nadciśnieniem. Stosowały one inhibitory receptora angiotensyny II, blokery kanału wapniowego, beta-blokery, leki moczopędne, inhibitory konwertazy angiotensyny.

Zwykle pacjentom z II i III stopniem otyłości towarzyszą dodatkowe zaburzenia. Zdecydowaliśmy się na włączenie do badań osób, które były prawidłowo leczone (nietolerancja glukozy, nadciśnienie, choroby tarczycy) i nie przerywały leczenia przez cały czas trwania RK.

Tab. 6 Charakterystyka otyłych pacjentek przed przystąpieniem do badań.

Parametr	n = 41
Wiek, lata	34±10
Masa ciała, kg	116±20
BMI, kg/m <sup>2</sup>	38,2±6,5
BMI>35, n (%)	7 (17)
BMI>40, n (%)	17 (41)
WHR	1,6±0,2
Obwód talii, cm	111±14
Osoby palące papierosy, n (%)	12 (29)
Nietolerancja glukozy (Metformina), n (%)	17 (41)
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	5 (12)
Choroby tarczycy, n (%)	13 (31)
Choroby wątroby, n (%)	9 (22)
Choroby ginekologiczne, n (%)	6 (15)
Astma oskrzelowa, n (%)	3 (7)

Do dalszych badań otyłe pacjentki podzielono ze względu na uzyskaną stratę masy ciała. Kryterium podziału stanowiła wartość mediany: -5,8 kg. Grupa pierwsza, to osoby, których utrata masy ciała po RK była niższa od wartości bezwzględnej mediany (średnia: -1,9±2,5 kg; n=20), grupa druga to osoby, których utrata masy ciała była wyższa od wartości bezwzględnej mediany (średnia: -8,3±1,9 kg; n=21). Tab. 7 przedstawia ich dokładną charakterystykę.

Tab. 7 Charakterystyka dwóch grup otyłych pacjentek w zależności od uzyskanej straty masy ciała po RK przed przystąpieniem do badania.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)	Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)	p
Wiek, lata	34.5±9.5	34.2±10.8	0,9876
Liczba pacjentów, n	20	21	
Strata masy ciała, kg	-1.9±2.5	-8.3±1.9	<0.0001
Waga, kg	102,4±14,9	110,1±24,5	0,3419
BMI, kg/m <sup>2</sup>	37,2±5,5	39,1±7,4*	0,7034
BMI> 35, n (%)	2 (10)	5 (23)	0,2401
BMI>40, n (%)	8 (40)	9 (43)	0.9005



Osoby palące papierosy, n (%)	4 (20)	8 (38)	0.2031
Nietolerancja glukozy (metformina), n (%)	7 (35)	10 (48)	0.4123
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	0 (0)	5 (24)	0,0199
Choroby tarczycy, n (%)	8 (40)	5 (24)	0.2655
Choroby wątroby, n (%)	6 (30)	3 (14)	0,2243
Choroby ginekologiczne, n (%)	3 (15)	3 (14)	0,9484
Astma oskrzelowa, n (%)	0 (0)	3 (14)	0.0791

### 3.2. Protokół badania

#### ETAP 1. Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Osoby zakwalifikowane do badania poddane zostały 8 tygodniowemu leczeniu dietetycznemu polegającemu na przygotowaniu specjalnego jadłospisu dobranego w sposób indywidualny w stosunku do podstawowej przemiany materii (PPM) według równania Harrisa-Benedicta (Harris i wsp., 1919) i skorygowanego o wielkość wysiłku fizycznego wg WHO, z przewidywanym deficytem energetycznym 300-500 kcal/dzień. Zakres PPM otyłych był od 1454 do 2454 kcal/dzień. Pacjentki charakteryzowały się niską aktywnością fizyczną. Każda osoba uczestnicząca w badaniu otrzymała szczegółowy plan dietetyczny i była w stałym kontakcie z dietetykiem dwa razy w tygodniu. Dietetyk ustalił dietę w oparciu o indywidualne preferencje z zabezpieczeniem odpowiednich proporcji składników odżywczych: 25% tłuszcze, 20-25% białko i 50-55% węglowodany. Dokładny skład stosowanej diety przedstawia Tab. 8.

Podczas pobytu w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pacjentom wykonano: pomiar składu ciała metodą bioimpedancji (ang. BIA *Bioelectrical Impedance Analysis*) (Tanita/Akern, Japonia). Badanie składu ciała polegało na określeniu procentowego i wagowego udziału tkanki mięśniowej i tłuszczowej. Zasada pomiaru oparta jest na różnicy w przewodzeniu prądu elektrycznego w przedziale wodnym i tłuszczowym. Ponadto pacjentom zmierzono (i) obwód talii (w połowie pomiędzy ostatnim żebrem, a grzebieniem kości biodrowej), (ii) ciśnienie krwi (Citizen CH-453, Japonia), (iii) wyliczono proporcję pomiędzy talią a biodrami - WHR (ang. *Waist to Hip Ratio*), (iv)

oceniono wskaźnik BMI ( waga(kg)/wzrost(m)<sup>2</sup>), (v) wykonano doustny test obciążenia glukozą (OGTT ang. *oral glucose tolerance test*), (vi) pobrano krew przed i po 8 tygodniowej restrykcji dietetycznej oraz (vii) wykonano całą gamę badań biochemicznych w szpitalnym laboratorium (Szpital Kliniczny nr 2 im. H. Święcickiego ul. Przybyszewskiego 49, Poznań).

Tab. 8 Proporcje składników odżywczych w stosowanej diecie.

Skład diety	% dostarczonej energii
Węglowodany	50 – 55
• złożone	45 – 50
• sacharoza	< 10
Białko	20 – 25
Tłuszcze	25
• nasycone kwasy tłuszczowe	7
• jednonienasycone kwasy tłuszczowe	10
• wielonienasycone kwasy tłuszczowe	8
Cholesterol (mg/dzień)	< 300

### **Pobieranie krwi do badań**

Krew została pobrana od pacjentów przed i po ośmiotygodniowej restrykcji kalorycznej za pomocą systemu Monovette TM firmy Sarstedt. W celu uzyskania surowicy krew odwirowano 10 minut 2000 obr./min (RCF 580). Następnie surowice rozporcjowano do sterylnych kriofiolek i zamrożono w -80°C do czasu wykonania dalszych badań.

### **Badania biochemiczne krwi – szpitalne laboratorium**

Używając metod kolorymetrycznych oraz enzymatycznych w surowicy krwi oceniono stężenie glukozy, cholesterolu, trójglicerydów, frakcji LDL oraz HDL, wykorzystując analizator biochemiczny Cobas 501.

## **ETAP 2. Katedra i Zakład Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

W Katedrze i Zakładzie Patofizjologii, zastosowano model eksperymentalny łączący badania kliniczne z badaniami hodowli komórkowej *in vitro*. W tym celu przeprowadzono wieloetapową ocenę funkcji śródbłonna naczyniowego. Badania obejmowały:

- ocenę profilu ekspresji genów komórek śródbłonna naczyniowego, po ekspozycji na surowice pacjentów pobraną przed i po RK. Do badań wybrano pięciu pacjentów, którzy uzyskali największą stratę masy ciała po zastosowanej interwencji
- ocenę stężeń markerów funkcji śródbłonna, adipokin oraz parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy pobranej przed i po restrykcji kalorycznej.
- ocenę proliferacji oraz generacji wolnych rodników przez komórki śródbłonna po ekspozycji na medium z dodatkiem surowicy otyłych pacjentów, pobraną przed i po restrykcji kalorycznej, w warunkach hodowli komórkowej *in vitro*.

### **3.3 Badania biochemiczne – Katedra Patofizjologii**

Znaczną większość analizowanych parametrów oceniano przy pomocy testów immunoenzymatycznych ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) wykorzystując zestawy DuoSet firmy R&D (USA). Zestawy DuoSet wykorzystano do oceny następujących parametrów: leptyna, adiponektyna, VEGF, sICAM-1, sE-selektyna, vWF, TM, PAI-1, ADMA. W badaniach wykorzystano również testy ELISA firmy R&D wysokiej czułości (TNF- $\alpha$ , Il-6).

Testy kolorymetryczne wykorzystano do pomiaru stężenia NO (test R&D, USA), katalazy, SOD, TAS (zestawy firmy Cayman USA).

Czułość metod oraz procent zmienności uzyskiwanych wyników pomiędzy oznaczeniami, %CV (ang. *Coefficient of Variation*) przedstawia Tab. 9

#### **3.3.1. Zasada testu immunoenzymatycznego ELISA**

Procedura testu immunoenzymatycznego polegała na opłaszczeniu przeciwciałem monoklonalnym płytki 96 dołkowej (Nunc, Dania) przez okres 24 h w temperaturze pokojowej. Po upływie doby płytkę trzykrotnie płukano buforem płuczającym (PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20, Sigma, USA). W celu uniemożliwienia nieselektywnego wiązania się ocenianych białek, podczas kolejnych etapów testu,

płytkę blokowano 10% buforem Roti-Block (Carl-Roth, Niemcy) przez 2 h w temperaturze pokojowej. Ponownie płukano trzykrotnie. Do tak przygotowanej płytki podawano próbki badane oraz krzywą wzorcową i ponownie inkubowana 24 h w temperaturze 4° C. Po wypłukaniu płytki, podawano drugi rodzaj przeciwciała, wiążącego się z opłaszczonym na powierzchni płytki kompleksem przeciwciała monoklonalnego z badanym antygenem (inkubacja 2 h w temperaturze pokojowej). Ponownie, po uprzednim wypłukaniu płytki, podawano roztwór enzymu znakowanego peroksydazą chrzanową. Po 20 minutach i kolejnym płukaniu dozowano roztwór nadtlenu wodoru (Pharmingen, USA), substratu dla związanego z powierzchnią płytki enzymu. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, do czasu rozwinięcia się koloru. Reakcję hamowano roztworem 2N kwasu siarkowego. Pomiaru intensywności zabarwienia dokonywano przy użyciu czytnika płytek VersaMax (Molecular Device, USA), przy dwóch długościach fali: 450 nm i 540 nm. Odczyt wyników uzyskiwano z krzywej wzorcowej.

### **3.3.2. Zasada testu kolorymetrycznego**

Zasadą testu kolorymetrycznego jest wytworzenie barwnego produktu reakcji, którego intensywność barwy jest miarą oznaczanego związku. W teście wykorzystuje się krzywe wzorcowe, z których odczytuje się wynik.

#### **Aktywność katalazy**

Metoda oceny aktywności katalazy (Cayman, USA) opiera się na reakcji enzymu z metanolem w obecności nadtlenu wodoru. Produktem reakcji jest formaldehyd, który reaguje z chromogenem 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolem, dając fioletowo zabarwiony produkt reakcji. Pomiaru intensywności zabarwienia dokonywano wykorzystując czytnik płytek VersaMax (Molecular Device, USA), przy długości fali 540 nm. Odczyt wyników uzyskiwano z krzywej wzorcowej.

#### **Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)**

Metodą oceny aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (Cayman, USA) jest reakcja prowadząca do wytworzenia jonorodnika ponadtlenkowego (reakcja ksantyny z oksydazą ksantynową), substratu dla SOD. Jonorodnik ponadtlenkowy, który nie

został usunięty przez SOD reaguje z solami tetrazolu tworząc barwny formazon. Pomiaru intensywności zabarwienia dokonywano wykorzystując czytnik płytek VersaMax (Molecular Device, USA), przy długościach fali 440-460 nm. Odczyt wyników uzyskiwano z krzywej wzorcowej.

### **Całkowity status antyoksydacyjny (TAS ang. *Total Antioxidant Status*)**

W celu oznaczenia całkowitego statusu antyoksydacyjnego wykorzystano zestaw (Cayman, USA), który mierzy całkowitą ilość przeciwutleniaczy zawartą w surowicy (GSH, wit. C, wit. E, bilirubina, troxol, kwas moczowy). Zasada testu opiera się na hamowaniu utleniania 2,2-azino-di[3-etylobenzotiazolinosulfonianu] przez mioglobinę w obecności testowanej surowicy. Jako wzorzec antyoksydantów wykorzystano troloks. Pomiaru intensywności powstałego produktu dokonywano przy użyciu czytnika płytek VersaMax (Molecular Device, USA), przy długościach fali 750 nm. Odczyt wyników uzyskiwano z krzywej wzorcowej.

### **Tlenek azotu**

W celu oznaczenia tlenku azotu (R&D, USA), surowicę wstępnie oczyszczono z białek wykorzystując filtry 0,22 µm (R&D, USA), a następnie rozcieńczono w stosunku 1:1 buforem reakcyjnym. Ocena stężenia całkowitego tlenku azotu (azotyny w próbce surowicy) polega na wykorzystaniu reakcji Griessa. Obecne w próbce azotany zostają zredukowane do azotynów przy użyciu reduktazy. Całkowita ilość azotanów/azotynów reaguje z barwnikiem azowym (kwasu sulfanilowy i roztwór α-naftyloaminy w kwasie octowym) dając czerwony barwnik azowy. Intensywność zabarwienia odczytuje się użyciu czytnika płytek VersaMax (Molecular Device, USA), przy długościach fali 450nm. Odczyt wyników uzyskiwano z krzywej wzorcowej.

Tab. 9 Czulość metod ELISA oraz procent zmienność uzyskiwanych wyników pomiędzy oznaczeniami (%CV).

<b>Parametr</b>	<b>% CV</b>	<b>Czulość</b>
<b>leptyna</b>	7	24,82 pg/ml
<b>adiponektyna</b>	14,1	24,4 pg/ml
<b>rezystyna</b>	9,5	13,86 pg/ml
<b>II-6 HS</b>	7,8	0,04 pg/ml

<b>TNF-alfa HS</b>	8,3	0,11pg/ml
<b>katalaza</b>	9,9	ponizej 2nM/min/ml
<b>SOD</b>	3,7	ponizej 0,025 U/ml
<b>TAS</b>	3,4	ponizej 0,045 mM
<b>VEGF</b>	13,7	12,18 pg/ml
<b>sICAM-1</b>	11,1	17,51 pg/ml
<b>sE-selektyna</b>	10,9	39,05 pg/ml
<b>vWF</b>	5,7	0,10 ng/ml
<b>trombomodulina</b>	9,1	28,53 pg/ml
<b>PAI-1</b>	9,4	0,14 ng/ml
<b>całkowity NO</b>	4,6	0,25 $\mu$ M
<b>ADMA</b>	7,6	0,04 $\mu$ M

### **3.4 Badania w warunkach hodowli komórkowej *in vitro***

#### **3.4.1 Hodowla komórek śródbłonka naczyniowego**

Badania prowadzone były z wykorzystaniem komórek śródbłonka HUVEC linii EA.hy926 (Edgell CJ, 1983). Komórki hodowano w medium M199 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, L-glutaminy (2 mmol/l), penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) oraz hydrokortyzonu (0,4 µg/ml) w warunkach 37° C w atmosferze 21% tlenu i 5% CO<sub>2</sub> oraz stałej wilgotności. Wymiana medium oraz pasaż komórek wykonywane były, co 2-3 dni. Wszystkie odczynniki do hodowli komórkowej pochodzą z firmy Sigma Aldrich (USA). Jednorazowe plastikowe pojemniki do hodowli komórkowej (butelki, płytki, pipety itp.) pochodzą z firmy Greiner (Austria).

#### **3.4.2 Wybór stężenia ludzkiej surowicy do dalszych badań eksperymentalnych**

Stężenie ludzkiej surowicy, wykorzystywanej w eksperymentach *in vitro* zostało wyznaczone we wcześniejszym wstępnym eksperymencie. W badaniu tym oceniano żywotność komórek śródbłonka pod wpływem medium z dodatkiem szerokiego zakresu stężeń surowicy ludzkiej od 5 do 50%. Do dalszych badań wybrano stężenie 20%, ponieważ nie zmieniało żywotności komórek śródbłonka.

#### **3.4.3 Ocena zmian ekspresji genów komórek śródbłonka naczyniowego**

Spośród grupy 41 pacjentek wybrano 5, u których stwierdzono największy spadek masy ciała po zastosowanej interwencji (od 7,9 do 10,2 kg średnia: 8,4 kg ± 2,7 kg). Surowica tych osób została wykorzystana do oceny profilu ekspresji genów w komórkach śródbłonka przed i po RK.

#### **Analiza mikromacierzy**

Komórki śródbłonka w warunkach *in vitro* eksponowano 48 h na medium z dodatkiem 20% ludzkiej surowicy pobranej przed i po RK. Po tym czasie pobrano RNA komórkowe (RNAzol Sigma-Aldrich, USA), oczyszczono za pomocą zestawu

RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). Próbki RNA (10 µg) zabezpieczono do badań oceny profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy (zestaw firmy Affymetrix HuGeneST1.0.). Hybrydyzacja do mikromacierzy została przeprowadzona w ośrodku BioChip Labor przy Instytucie Biologii Komórki Kliniki Uniwersyteckiej w Essen. Do badań wykorzystana została platforma HG133plus2, zawierająca 54676 sond dla około 38500 zidentyfikowanych genów.

### **Metoda RT PCR**

Po uzyskaniu wyników analizy ekspresji genów, te geny, których ekspresja zmieniła się w największym stopniu były analizowane ilościowo przy użyciu techniki RT PCR (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*) W komórkach śródbłonna po 48 h ekspozycji na medium z dodatkiem 20% surowicy pacjentek pobranej przed i po RK zostało pobrane RNA komórkowe przy użyciu odczynnika RNAzol (Sigma-Aldrich, USA). Do izolacji RNA z próbek wykorzystano zestaw GeneMatrix Universal RNA Purification Kit (Eurx, Poland). Przy użyciu odwrotnej transkryptazy dART Reverse Transcriptase (Eurx, Poland) informacja zawarta w RNA została przepisana na komplementarne DNA (cDNA). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło RNA oraz odczynnik MasterMix (Eurx, Poland) składający się z: przypadkowych starterów, nukleotydów, buforu, DTT (dithiothreitol) oraz odwrotnej transkryptazy. Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano w cyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany). Reakcja przebiegała w następujących warunkach: 25°C przez 10 minut, 50°C przez 60 minut (synteza cDNA), 85°C przez 5 minut (inaktywacja enzymu).

cDNA jest materiałem wyjściowym do oceny genów, których ekspresja uległa zmianie w wyniku restrikcji (wyniki uzyskane z analizy mikromacierzy). Pierwszym etapem tej części analizy jest zaprojektowanie odpowiednich starterów i sond. Analiza ekspresji genów wymaga wyboru odpowiedniego wewnętrznego genu referencyjnego (ang. *housekeeping gene*), który charakteryzuje się względną stałą ekspresją w różnych warunkach (aktywny, GAPDH). Optymalnym warunkiem amplifikacji jest użycie odpowiednich barwników fluorescencyjnych znakujących sondy (SYBR Green). W przeciwieństwie do reakcji PCR, która uwidaczniała tylko końcowy produkt amplifikacji, reakcja RT PCR, w czasie rzeczywistym umożliwia obserwację narastania kolejnych kopii amplifikonu. W mieszaninie reakcyjnej reakcji



RT PCR znajdują się: cDNA, nukleotydy, sonda znakowana barwnikiem fluorescencyjnym, polimeraza, bufor warunkujący odpowiednie pH i stężenie jonów magnezu oraz startery wybrane dla odpowiednich genów. Reakcja przebiegała w termocyklerze LightCycler Nano (Roche, Switzerland).

#### **3.4.4. Ocena proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego**

Oceny proliferacji komórek śródbłonna dokonano przy użyciu testu MTT, którego zasada oparta jest na konwersji soli tetrazolowej (MTT, bromku [3(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylo-4-tetrazolu]) do nierozpuszczalnego formazonu w obecności dehydrogenaz mitochondrialnych (Mosmann, 1983). Test przeprowadzony został w 96-dołkowej płytce hodowlanej. Komórki śródbłonna posiano rzadko (4000 komórek/studzienkę), aby zapewnić im swobodną proliferację w mało zlewnej warstwie komórkowej. Po przywarciu do dna studzienki komórki eksponowano na medium bez dodatku surowicy, celem wytlumienia ich aktywności. Następnie do studzienek podano medium hodowlane z dodatkiem 20% surowicy pacjentów otyłych pobranej przed i po RK i inkubowano przez okres 24 h w temperaturze 37° C, w atmosferze 21% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> oraz stałej wilgotności. Po 24 h inkubacji odessano medium testowe i podano medium z odczynnikiem MTT (5 mg/ml). Inkubowano przez 4 godziny w 37° C (stała wilgotność, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), a następnie wykonano lizę komórek. Płytkę przechowywano w miejscu bez dostępu światła. Następnego dnia dokonano pomiaru absorbancji przy użyciu czytnika mikroplatek VersaMax (Molecular Devices, USA) przy długości fali 535 nm. Wyniki przedstawiono, jako procent kontroli, którą stanowiło standardowe medium hodowlane z suplementami bez surowicy (SFM ang. *serum free medium*).

#### **3.4.5 Ocena generacji wolnych rodników tlenowych (ROS) przez komórki śródbłonna naczyniowego**

Oznaczenie generacji ROS przez komórki śródbłonna wykonano metodą fluorescencyjną. Komórki posiano do czarnej płytki z transparentnym dnem (20 000 komórek/studzienkę) i eksponowano na medium z dodatkiem 20% surowicy pacjentów, przez 24 h. Po ekspozycji usunięto medium, przepłukano komórki roztworem PBS celem usunięcia resztek medium i surowicy. Następnie do studzienek podano roztwór 10 μM H<sub>2</sub>DCFDA (dwuoctan 2',7'-

dichlorodihydrofluoresceiny) w PBS i inkubowano 30 min w temp 37° (stała wilgotność 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Miarą generacji ROS w komórkach jest stopień fluorescencji barwnika H<sub>2</sub>DCFDA, który pod wpływem wygenerowanych w komórce wolnych rodników ulega utlenieniu do fluorescencyjnego produktu. Pomiaru fluorescencji dokonano wykorzystując fluorymetr Wallac Victor 2 (Finlandia) przy długości fali wzbudzenia 485 nm oraz emisji 535 nm. Wyniki przedstawiono, jako RFC (ang. *Relative Fluorescent Unite*).

### **3.4.6 Uwagi do eksperymentów w warunkach hodowli komórkowej**

Wykorzystywane przez nas komórki śródbłónka naczyniowego HUVEC linii EA.hy926 są komórkami nieśmiertelnionymi stworzonymi poprzez fuzję komórek śródbłónka pochodzących z żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *human umbilical vein endothelial cell*) oraz komórek nowotworowych raka płuc linii A549 (Edgell i wsp., 1983). Komórki tej linii otrzymaliśmy dzięki uprzejmości dr Cory-Jean Edgell z University of North Carolina w Chapel Hill w USA. Komórki śródbłónka naczyniowego HUVEC linii EA.hy926 są powszechnie stosowane w badaniach hodowli komórkowej *in vitro* (Elluru i wsp., 2009; Schwalm i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2014). Praca Boerma i wsp. oceniła profil ekspresji genów w komórkach HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) i HUVEC linii EA.hy926, pokazując bardzo dużą zbieżność w ekspresji różnorodnych genów. Zasugerowała jednak większą o ok. 30% aktywność genów cyklu komórkowego w przypadku linii EA.hy926 (Boerma i wsp., 2006). Aby to sprawdzić wykonaliśmy ocenę proliferacji tych dwóch linii komórkowych, wykorzystując dwie powszechnie stosowane metody, z użyciem znakowanej trytem tymidyny oraz test MTT. Otrzymaliśmy bardzo podobny stopień zmian proliferacji w odpowiedzi na testowane czynniki w obydwu rodzajach komórek śródbłónka (Korybalska i wsp., 2016).

### **3.5. Analiza statystyczna wyników**

Uzyskane wyniki były analizowane statystycznie przy użyciu programu GraphPad Prism v 6. Wyniki analizowano dla zmiennych powiązanych i niepowiązanych (t-test) testami parametrycznymi i nieparametrycznymi, w zależności od tego czy spełniały kryterium rozkładu normalnego. Do oceny rozkładu normalnego wykorzystywano następujące testy statystyczne: D'Agostino&Pearson, Shapiro-Wilk oraz Kolmogorov-

Smirnov. Korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami oceniano wykorzystując test Pearson'a lub Spearman'a w zależności od rozkładu danych. Do oceny częstości występowania określonej niemierzalnej cechy w grupach badanych wykorzystano test chi kwadrat ( $\chi^2$ ). Uzyskanie wartości  $p < 0,05$  w teście statystycznym, kwalifikowało wynik jako istotny statystycznie.

## 4. Wyniki

### 4.1. Analiza grupy pacjentów

W badaniach wzięło udział 41 otyłych kobiet, które przez okres 8 tygodni stosowały RK, mającą na celu ograniczenie kaloryczności ich posiłków o 300-500 kcal/dzień. Czterdzieści jeden procent z nich charakteryzowało występowanie otyłości zagrażającej życiu (BMI > 40). (Tab. 6). Najczęściej występującym zaburzeniem była nietolerancja glukozy, którą stwierdzono w przypadku 41% pacjentek (Tab. 6). Drugim, co do częstości występowania zaburzeniem były choroby tarczycy, które stwierdzono u 31% pacjentek (Tab. 6). Blisko jedna trzecia z nich paliła papierosy (29%) (Tab. 6).

Dzieląc badane pacjentki ze względu na uzyskaną stratę masy ciała po RK, stwierdziliśmy, że przystępując do badań nie różniły się one między sobą, za wyjątkiem tego, że grupa osób, która w większym stopniu straciła na wadze miała wyższy odsetek pacjentek z leczonym nadciśnieniem (24% vs. 0%) (Tab. 7).

### 4.2. Ocena parametrów antropometrycznych

Dwie grupy pacjentek nie różniły się między sobą liczbą osób z II i III stopniem otyłości (Tab. 7). W grupie pacjentek, która w efekcie diety straciła więcej masy ciała, zaobserwowano spadek osób z wartością BMI zagrażającą życiu (43% przed RK vs. 20% po RK), a u pań, dla których RK okazała się mniej skuteczna o połowę zmniejszył się odsetek osób z II stopniem otyłości (10% przed RK vs. 5% po RK) (Tab. 10).

Tab. 10 Procentowy udział pacjentów z otyłością II i III stopnia po łagodnej RK.

	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg	
	Przed	Po	Przed	Po
<b>II stopień otyłości BMI&gt;35</b>	10%	5%	23%	40%
<b>III stopień otyłości BMI&gt;40</b>	40%	35%	43%	20%

W obydwu grupach RK spowodowała poprawę większości parametrów antropometrycznych (waga, BMI, obwód talii) (Tab. 11). Istotnie statystycznie

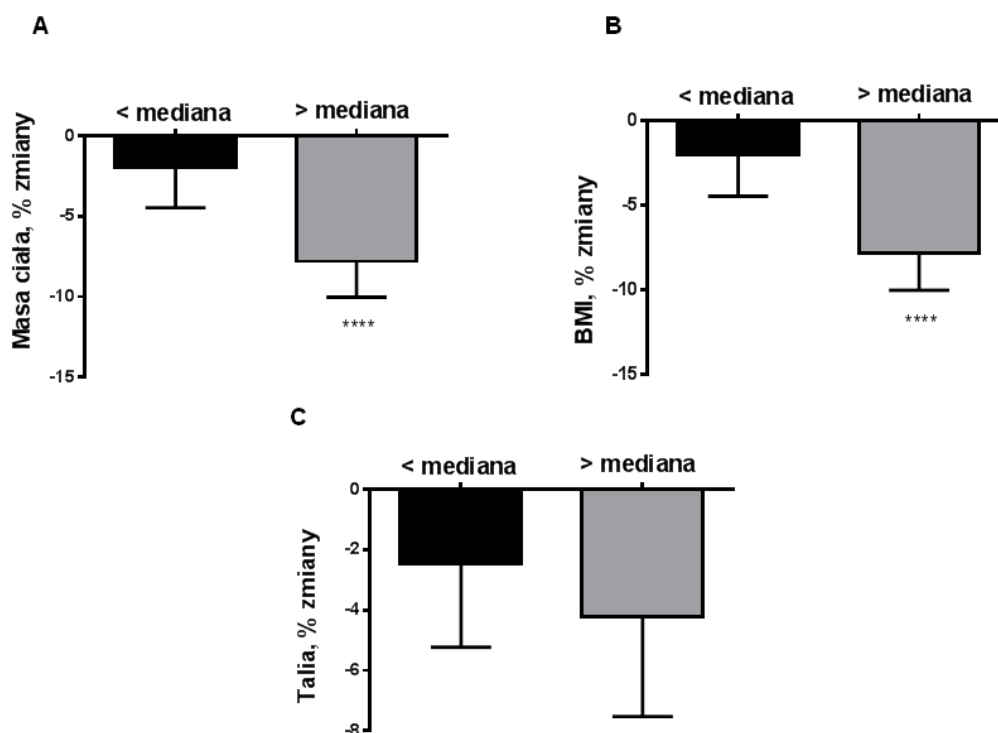
procentowe zmiany zaobserwowano tylko w przypadku oceny wartości BMI i masy ciała, u osób, które w wyniku diety straciły więcej na wadze (Ryc. 10).

Tab. 11 Ocena parametrów antropometrycznych po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
Masa ciała, kg	102,4±14,9	100,5±15,7**	110,1±24,5	101,8±24,2****	0,8014
BMI, kg/m <sup>2</sup>	37,2±5,5	36,5±5,7**	39,1±7,4†	36,1±7,4****	0,8483
WHR	1,63±0,15	1,63±0,15	1,59±0,29	1,59±0,29	0,5475
Talia, cm	107±11	104±11**	114±16	110±17****	0,2590

\* Przed vs. Po \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$ , ††††  $p < 0.0001$



Ryc. 10 Procentowa zmiana parametrów antropometrycznych po łagodnej RK.

### 4.3. Ocena składu ciała

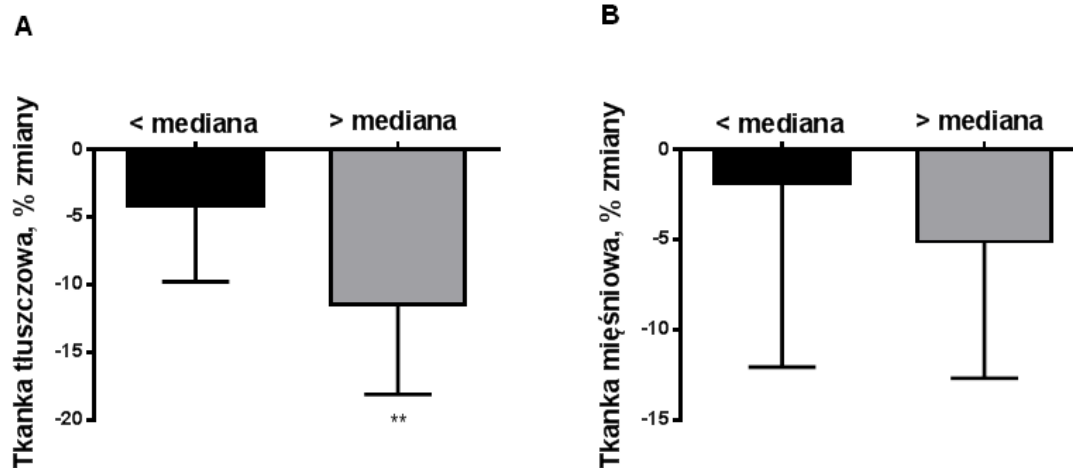
Interwencja dietetyczna spowodowała zmiany składu ciała otyłych pacjentek. Zmniejszyła się zawartość tkanki tłuszczowej, ale również tkanki mięśniowej (Tab. 12). Większą procentową zmianę ilości tkanki tłuszczowej zaobserwowano w grupie, dla której RK okazała się bardziej skuteczna (-11,4% vs. -4,2%) (Ryc. 11).

Tab. 12 Ocena składu ciała po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8 kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8 kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
Tkanka tłuszczowa, kg (%)	46,7±11,2 (44,8±4,4)	44,4±12,2* (43,9±5,2*)	51,2±17,1 (45,2±5,5)	44,0±16,7**** (43,1±6,2)***	0,9318
Tkanka mięśniowa, kg (%)	34,9±3,9 (34,1±3,9)	33,5±5,4 (34,2±5,1)	36,9±7,7 (34,1±3,3)	33,8±7,7** (34,8±4,1)	0,8716

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$



Ryc.11 Procentowa zmiana tkanki tłuszczowej i tkanki mięśniowej po łagodnej RK.

#### 4.4. Ocena parametrów sercowo-naczyniowych

Badane pacjentki różniły się między sobą wielkością ciśnienia przed przystąpieniem do badań (Tab. 13). Tylko w grupie kobiet, u których stwierdzono większą stratę masy ciała po RK, stwierdzono spadek wartości ciśnienia skurczowego. Wynika to z pewnością z tego, że w grupie tej aż 24% stanowiły osoby z leczonym nadciśnieniem (Tab. 7). Pacjentki tej grupy charakteryzowały się również wyższym ciśnieniem rozkurczowym po RK (Tab. 13).

Tab. 13 Ocena parametrów sercowo-naczyniowych po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
Ciśnienie skurczowe, mmHg	122,3±6,9	118,3±8,6	†129,0±11,5	120,0±10,0**	0,5740
% zmiany	-3,0±8,2		-6,4±10,2		0,2460
Ciśnienie rozkurczowe, mmHg	77,1±6,9	76,1,1±6,5	80,7±8,6	81,0±6,4	0,0198
% zmiany	-1,0±7,8		1,5±13,3		0,4808
Puls, uderzenie/min	73±10	73±9	73±12	70±11	0,2067
% zmiany	1,9±15,7		-4,8±16,0		0,1888

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$

#### 4.5. Ocena parametrów gospodarki lipidowej

Istotny statystycznie spadek stężenia cholesterolu oraz trójglicerydów po RK zaobserwowano jedynie w grupie pań, które w większym stopniu zredukowały masę swojego ciała (Tab. 14). Stężenie cholesterolu HDL w tej grupie było niższe niż u osób z mniejszą stratą masy ciała. (Tab. 14).

Tab.14 Ocena gospodarki lipidowej po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
<b>Cholesterol, mg/dl</b>	202,4±30,2	195,8±42,8	194,9±46,1	175,0±40,4**	0,1231
<b>% zmiany</b>	-3,3±13,8		-9,7±12,9		0,1296
<b>HDL, mg/dl</b>	58,1±12,3	60,4±12,1	52,4±15,4	49,1±10,3	0,0030
<b>% zmiany</b>	4,9±13,2		-3,5±22,1		0,1517
<b>LDL, mg/dl</b>	119,1±27,8	114,3±36,0	113,2±39,9	108,5±39,5	0,6333
<b>% zmiany</b>	-4,9±15,7		-2,1±18,3		0,6045
<b>TG, mg/ml</b>	123,6±55,4	122,6±67,3	145,9±82,5	103,8±29,8*	0,2605
<b>% zmiany</b>	1,4±33,1		-17,3±32,2		0,0705

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$

#### 4.6. Ocena parametrów gospodarki węglowodanowej

Leczenie dietetyczne zmniejszyło insulinooporność, mierzoną wskaźnikiem HOMA-IR, w grupie kobiet z większą redukcją masy ciała. W tej samej grupie zaobserwowano spadek stężenia insuliny po 2 h trwania doustnego testu obciążenia glukozą, nie zaobserwowano zmian stężenia glukozy. U pacjentek, które straciły miesiąc ilości masy ciała po RK, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian parametrów gospodarki węglowodanowej (Tab.15).



Tab. 15 Ocena gospodarki węglowodanowej po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
<b>Glukoza, mg/dl</b>	0h: 93,4±7,4 2h: 122,4±29,4	0h: 91,61±7,85 2h: 110,2±20,6	0h: 92,7±8,4 2h: 114,6±29,2	0h: 92,1±7,8 2h: 103,3±17,9	0h: 0,1957 2h: 0,2683
<b>% zmiany 0h</b>	-1,7±7,5		6,0±21,2		0,1553
<b>% zmiany 2h</b>	-5,5±20,3		-4,2±36,0		0,8931
<b>Insulina, mU/l</b>	0h: 12,9±6,9 2h: 89,6±57,3	0h: 12,89±5,9 2h: 67,1±39,6	0h: 16,5±10,6 2h: 70,0±50,3	0h: 14,6±11,9 2h: 44,6±30,6**	0h: 0,2947 2h: 0,0306
<b>% zmiany 0h</b>	0,4±37,9		-6,8±43,3		0,5204
<b>% zmiany 2h</b>	-1,4±72,6		-10,9±84,3		0,7195
<b>HOMA-IR</b>	3,0±1,4	3,0±1,5	3,5±2,5†	2,8±1,5*	0,9877
<b>% zmiany</b>	3,1±45,2		-5,9±46,2		0,6128

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$

#### 4.7. Ocena parametrów metabolicznych tkanki tłuszczowej

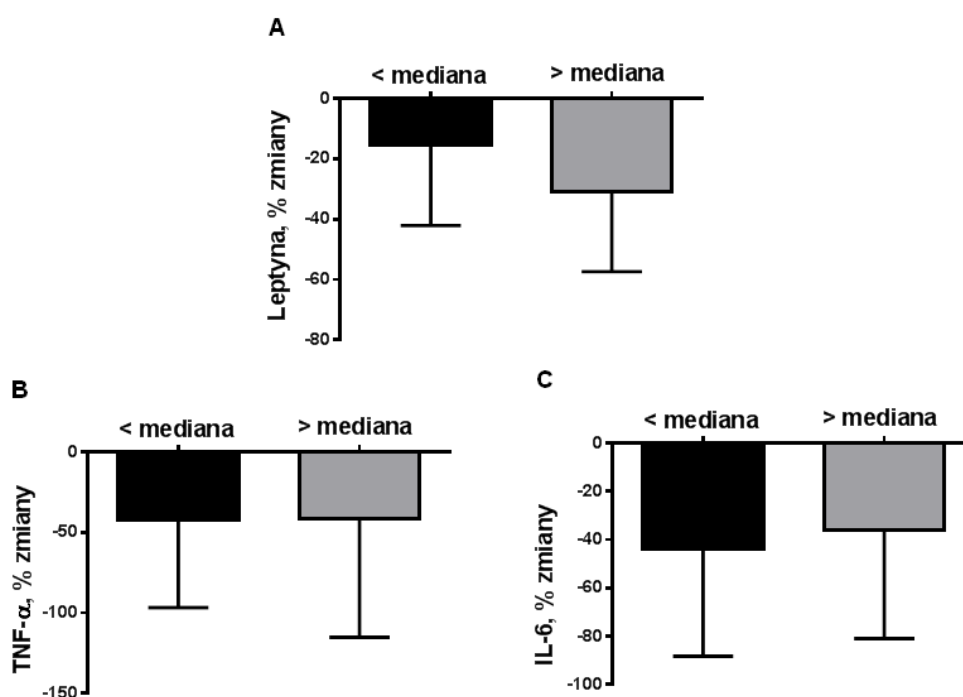
Zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej (Tab. 12, Ryc. 11) spowodowane zastosowaną RK, przyczyniło się również do zmniejszenia stężenia adipokin (leptyna, Il-6, TNF-alfa). W obydwu analizowanych grupach, niezależnie od ilości straty masy ciała, zaobserwowano porównywalny spadek stężenia cytokin prozapalnych: Il-6 oraz TNF-alfa. Chociaż spadek stężenia leptyny był większy w grupie, która straciła więcej na wadze, to procentowa jej zmiana po RK (-15,6% vs. -30,0%), nie była istotna statystycznie ( $p = 0,0689$ ) (Ryc. 12). Łagodna RK nie podwyższyła stężenia adiponektyny w żadnej z grup (Tab. 16).

Tab. 16 Ocena wybranych parametrów metabolicznych po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
Leptyna, ng/ml	64,9±27,6	51,6±19,0**	67,3±27,0	48,3±29,4****	0,6752
Adiponektyna, µg/ml	2,2±0,9	2,2±0,9	2,4±1,2	2,3±0,8	0,8122
IL-6 HS, pg/ml	2,0±1,0	1,1±1,2**	2,1±2,0	1,1±0,8**	0,9342
TNF- alfa HS, pg/ml	16,7±7,8	9,0±9,1**	17,1±8,8	7,8±10,0**	0,5657

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$



Ryc. 12 Procentowa zmiana stężenia adipokin po RK.

#### 4.8. Ocena stresu oksydacyjnego

Jedynym parametrem, którego zmianę zaobserwowano po łagodnej restrykcji kalorycznej było zwiększenie aktywności katalazy. Zmiana ta została zaobserwowana tylko u pacjentek, które uzyskały większą stratę masy ciała po RK (Tab. 17). Pomimo tego, że po RK zaobserwowano procentowy spadek generacji

wolnych rodników oraz procentowy wzrost aktywności katalazy, SOD a także wzrost TAS, to zmiany te nie zostały potwierdzone statystycznie (Tab. 17)

Tab.17 Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po łagodnej RK.

Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (↓M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (↑M)		Istotność ↓M vs. ↑M po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
Katalaza, nM/min/ml	50,5±36,5	64,4±56,2	69,2±93,5	80,3±58,3*	0,3797
% zmiany	51,9±93,0		87,8±159,4		0,3873
SOD, U/ml	11,6±2,5	12,4±3,4	13,0±3,6	13,4±4,0	0,4070
% zmiany	11,4±38,0		10,4±43,0		0,9343
TAS, mM	2,2±0,7	2,5±0,8	2,5±0,7	2,4±0,6	0,6767
% zmiany	18,8±42,2		17,2±34,5		0,8976
ROS, RFU	3698±601	3556±604	3972±1304	4037±1249	0,1143
% zmiany	-3,0±17,3		-5,6±29,5		0,2643

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

† Przed ↓M vs. Przed ↑M: †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$

#### 4.9. Ocena profilu ekspresji genów w komórkach śródbłonka po okresie łagodnej restrykcyj kalorycznej

Żaden badany gen nie wykazał istotnej statystycznie różnicy w ekspresji pomiędzy pacjentami, po umiarkowanej RK. W związku z tym do przeanalizowania uzyskanych wyników zastosowano dodatkową metodę badawczą, którą jest analiza GSEA (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*). Ocenia ona zmiany profilu genów w całych szlakach komórkowych (Subramanian i wsp., 2005). Wyniki uzyskane w ten sposób pozwoliły stwierdzić, że grupą genów, której ekspresja zmienia się w największym stopniu, po łagodnej RK, są geny cyklu komórkowego. W Tab. 18 przedstawiono przykładowe wartości ekspresji cyklin D, E, B. Ponieważ żaden gen nie wykazał istotnej statystycznie różnicy po RK, nie wykonano analizy ilościowej z wykorzystaniem techniki RT PCR. Oceniono natomiast proliferację komórek śródbłonka po ekspozycji na medium z dodatkiem 20% surowicy pacjentek pobranej przed i po RK. Wyniki omówiono w rozdziale 4.10 (Tab. 19).

Tab. 18 Przykładowe wartości ekspresji wybranych genów cyklu komórkowego w komórkach śródbłonna przed i po łagodnej RK.

Parametr	Grupa	Odczyty intensywności fluorescencji					Średnia	SD
Cyclin D1	Przed RK	7,01	6,98	6,97	6,90	6,89	6,95	0,05
	Po RK	7,12	6,99	6,89	6,84	6,91	6,95	0,11
Cyclin A1	Przed RK	5,62	5,63	5,60	5,58	5,30	5,54	0,14
	Po RK	5,59	5,54	5,60	5,49	5,20	5,48	0,16
p21	Przed RK	10,33	10,31	10,24	10,41	10,30	10,32	0,06
	Po RK	10,40	10,45	10,38	10,39	10,28	10,38	0,06
Cyclin E1	Przed RK	8,43	8,50	8,36	8,36	8,47	8,42	0,06
	Po RK	8,45	8,56	8,35	8,53	8,43	8,46	0,09

#### 4.10. Ocena zmian funkcji komórek śródbłonna naczyniowego

Interwencja dietetyczna w największym stopniu zmieniła funkcję śródbłonna odpowiedzialną za napięcie ściany naczynia krwionośnego ( $\uparrow$ NO,  $\downarrow$ ADMA) oraz funkcję modulującą reakcję zapalną ( $\downarrow$ sICAM-1,  $\downarrow$ sE-selektyna) (Tab. 19, Ryc. 13). Największą istotną statystycznie zmianę po RK zaobserwowano w przypadku syntezy tlenu azotu. Zmiana ta była szczególnie widoczna u pacjentek, które straciły większą ilość masy ciała (+13% vs. 163%) (Ryc. 13). Również zmniejszenie aktywacji zapalnej śródbłonna po RK było zdecydowanie bardziej widoczne w tej grupie pacjentek ( $\downarrow$ sICAM-1,  $\downarrow$ sE-selektyna) (Tab. 19, Ryc. 13). Zaobserwowany wzrost proliferacji śródbłonna po RK, potwierdził wcześniej uzyskane wyniki z analizy GSEA (rozdział 4.9). Wzrost proliferacji komórek zaobserwowano tylko u pacjentek, u których restrykcja przyniosła największy efekt (Tab. 19, Ryc. 14). W tabeli 20 przedstawiono porównanie pomiędzy uzyskaną stratą masy ciała, a uzyskaną zmianą proliferacji śródbłonna dla każdej badanej otyłej pacjentki. Zdecydowanie mniej parametrów funkcji śródbłonna zmieniło się u pacjentek, które w mniejszym

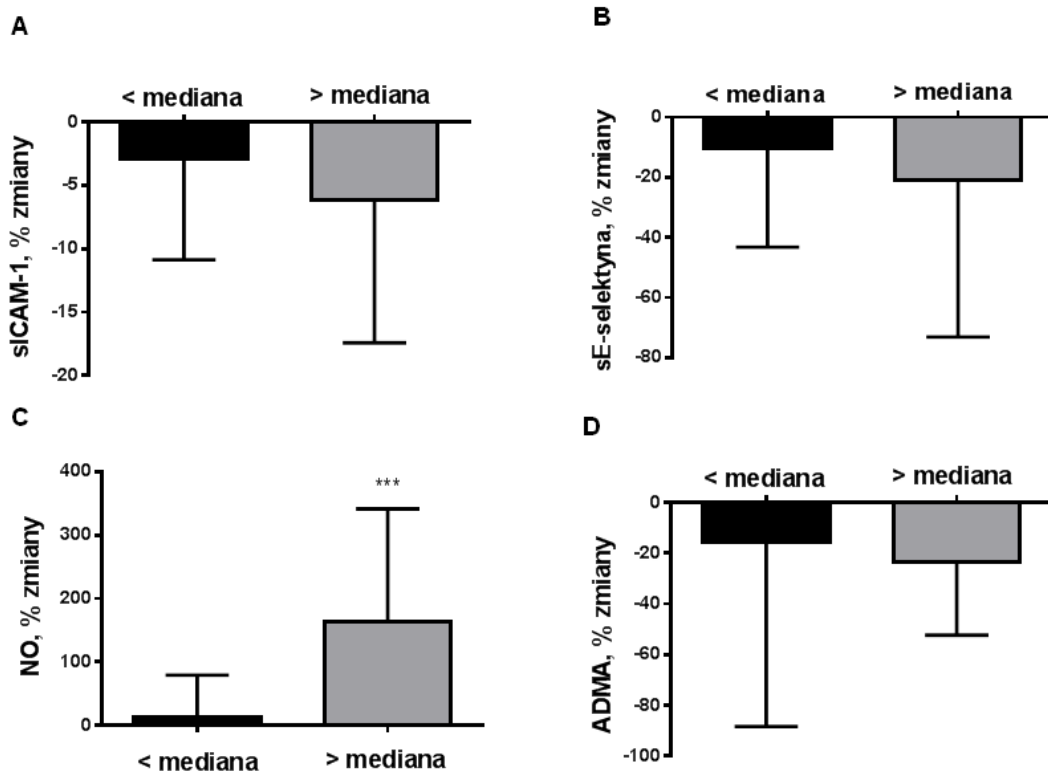
stopniu straciły na wadze ( $\downarrow$ selektyna E,  $\downarrow$ ADMA) (Tab.19, Ryc.13). W żadnej z grup RK nie spowodowała zmian parametrów istotnych dla procesu hemostazy (TM, PAI-1, vWF) i angiogenezy (VEGF) (Tab. 19).

Tab. 19 Ocena zmian funkcji komórek śródbłonka naczyniowego po łagodnej RK.

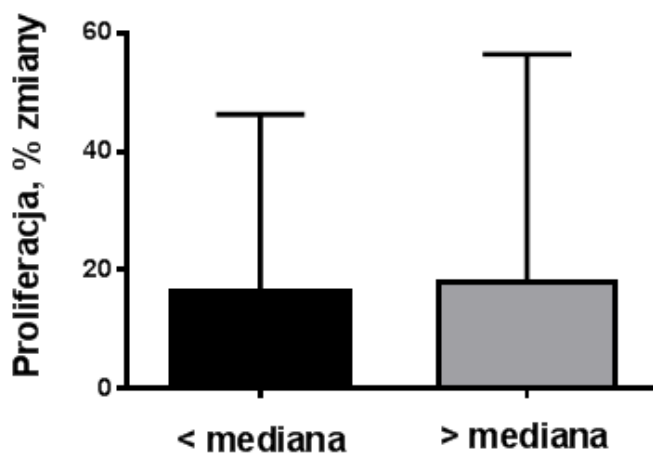
Parametr	Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9 $\pm$ 2,5 kg (< M)		Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3 $\pm$ 1,9kg (>M)		Istotność po RK
	Przed	Po	Przed	Po	
VEGF, pg/ml	109,8 $\pm$ 106,9	117,0 $\pm$ 120,3	124,3 $\pm$ 104,0	112,8 $\pm$ 91,6	0,8903
sICAM-1, ng/ml	119,7 $\pm$ 15,3	116,1 $\pm$ 16,3	111,1 $\pm$ 28,5	102,4 $\pm$ 24,4**	0,0308
sE-selektyna, ng/ml	17,7 $\pm$ 7,3	14,7 $\pm$ 6,6*	17,8 $\pm$ 11,1	12,3 $\pm$ 6,9**	0,2462
vWF, ng/ml	875,8 $\pm$ 281,8	866,4 $\pm$ 217,1	790,3 $\pm$ 267,8	792,6,9 $\pm$ 286,2	0,3597
TM, ng/ml	3,8 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 1,2	0,8215
PAI-1, ng/ml	10,5 $\pm$ 5,0	10,8 $\pm$ 4,3	11,0 $\pm$ 3,7	11,8 $\pm$ 3,8	0,4338
NO, $\mu$ M/l	6,2 $\pm$ 4,1	5,5 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 1,9	10,5 $\pm$ 5,5****	0,0004
ADAM, $\mu$ M/	0,79 $\pm$ 0,47	0,54 $\pm$ 0,33**	0,71 $\pm$ 0,45	0,50 $\pm$ 0,18*	0,6631
Proliferacja, % kontroli	163,1 $\pm$ 115,4	171,6 $\pm$ 83,6	181,5 $\pm$ 81,9	222,4 $\pm$ 118,7*	0,1230

\* Przed vs. Po \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

† Przed  $\downarrow$ M vs. Przed  $\uparrow$ M: † $p < 0,05$ , †† $p < 0,01$ , ††† $p < 0,001$ , ††††  $p < 0,0001$



Ryc. 13 Procentowa zmiana stężenia biomarkerów funkcji śródbłonna po RK.



Ryc. 14 Procentowa zmiana proliferacji komórek śródbłonna pod wpływem medium z dodatkiem surowicy pacjentów leczonych RK.

Tab. 20 Porównanie pomiędzy stratą masy ciała po RK, a zmianą proliferacji śródbłonna u wszystkich analizowanych pacjentek.

Strata masy ciała poniżej mediany: -5,8kg średnia: -1,9±2,5 kg (< M)			Strata masy ciała powyżej mediany: -5,8kg średnia: -8,3± 1,9kg (>M)		
Pacjent	Strata masy ciała, kg	Zmiana proliferacji	Pacjent	Strata masy ciała, kg	Zmiana proliferacji
1	4,3	2,1	1	-5,8	16,0
2	1,4	3,8	2	-5,9	0,8
3	1,3	35,4	3	-6,0	-21,2
4	0,8	36,6	4	-6,0	-5,9
5	0,1	25,8	5	-6,6	1,2
6	-0,5	97,2	6	-6,6	5,5
7	-1,3	-10,4	7	-7,4	47,2
8	-1,7	17,0	8	-7,6	8,3
9	-1,7	-9,2	9	-7,8	86,6
10	-2,4	-1,4	10	-8,0	-12,9
11	-2,5	-7,0	11	-8,1	36,6
12	-3,0	74,3	12	-8,2	-20,1
13	-3,1	14,9	13	-8,3	-5,9
14	-3,6	33,5	14	-9,0	8,4
15	-4,0	33,4	15	-9,1	55,6
16	-4,2	-9,7	16	-9,3	-0,8
17	-4,5	11,3	17	-9,3	-10,7
18	-4,5	13,2	18	-9,7	135,3
19	-4,5	-25,2	19	-10,9	0,9
20	-5,2	-8,0	20	-11,8	48,3
			21	-12,9	2,3

#### 4.11. Ocena korelacji pomiędzy badanymi parametrami

W Tab. 21 i Ryc 15 przedstawiono uzyskane korelacje pomiędzy procentową zmianą stężenia adipokin oraz parametrów funkcji śródbłonna naczyniowego, a procentową zmianą masy ciała i tkanki tłuszczowej. Potwierdzono dobrze znaną współzależność pomiędzy masą ciała i masą tkanki tłuszczowej oraz leptyną. Uzyskane dodatnie korelacje pokazują, że im większa strata masy ciała tym większy spadek stężenia leptyny (Tab. 21). Analizując współzależność pomiędzy zmianami wartości parametrów antropometrycznych, a zmianami stężeń śródbłonkowych biomarkerów uwidaczniają się dwie korelacje (Tab. 21, Ryc. 15). Najsilniejszą ujemną korelację uzyskano pomiędzy procentową zmianą masy ciała i tkanki tłuszczowej, a procentowym wzrostem stężenia tlenu azotu (Tab. 21, Ryc. 15 C). Aktywacja zapalna śródbłonna zmniejsza się w miarę normalizacji masy ciała (Tab. 19, Ryc. 13). Jednak współzależność wykazano tylko pomiędzy spadkiem ilości masy ciała (nie tłuszczu), a zmianą stężenia sE-selektyny (Tab. 21, Ryc. 15 B).

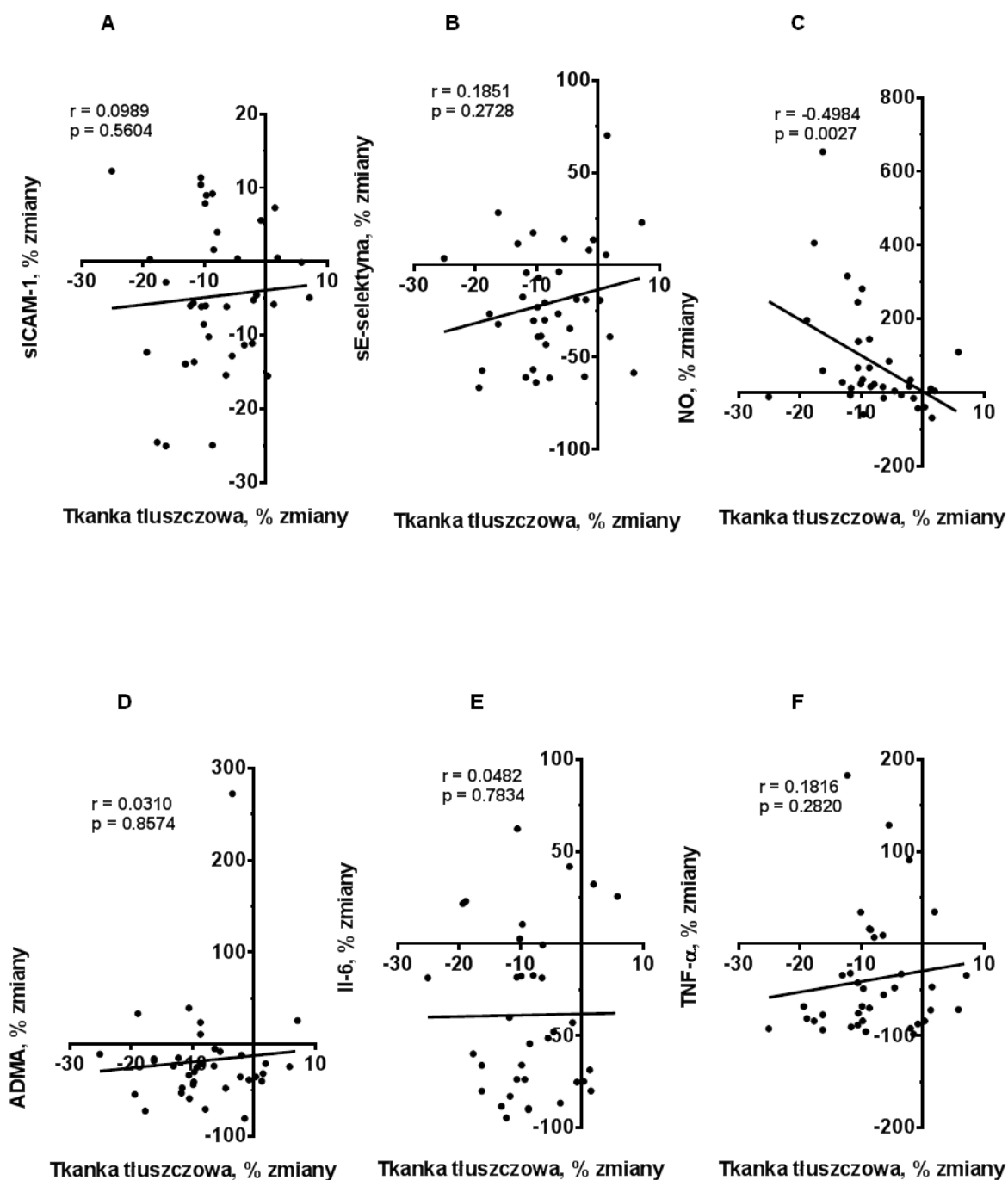
Tab. 21 Ocena korelacji pomiędzy procentową zmianą stężenia, adipokin oraz parametrów funkcji śródbłonna naczyniowego, a procentową zmianą masy ciała i tkanki tłuszczowej (n=41).

Parametr	Tkanka tłuszczowa, % zmiany po RK (r)	Masa ciała, % zmiany po RK (r)
Leptyna, % zmiany	0.5798***	0.5431**
Adiponektyna, % zmiany	-0.0241	-0.0418
Il-6, % zmiany	0.0482	-0.2103
TNF- $\alpha$ , % zmiany	0.1816	0.1606
VEGF, % zmiany	0.1898	0.2774
sICAM-1, % zmiany	0.0988	0.1850
sE-selektyna, % zmiany	0.1850	0.3726*
vWF, % zmiany	0.1153	0.0213
TM, % zmiany	0.0807	-0.2030
PAI-1, % zmiany	-0.2669	-0.1133
NO, % zmiany	-0.4983**	-0.5623***
ADMA, % zmiany	0.0310	0.0500

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

*r* – współczynnik regresji





Ryc. 15 Wybrane korelacje pomiędzy procentową zmianą stężenia adipokin oraz parametrów funkcji śródbłonna naczyniowego, a procentową zmianą tkanki tłuszczowej (n=41).

## 5. Dyskusja

Otyłość jest jednym z największych globalnych problemów zdrowotnych na świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia w latach 1980-2008 liczba osób ze zdiagnozowaną otyłością wzrosła dwukrotnie (Jarosz i wsp., 2011), a w roku 2014 odnotowano na świecie 600 milionów osób otyłych (WHO, 2015). Bardzo ważnym aspektem walki z tym problemem jest zmiana sposobu odżywiania. Niewątpliwie najtrudniejszym aspektem walki z otyłością jest utrzymanie reżimu dietetycznego. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się umiarkowana restrykcja dietetyczna, której codzienne stosowanie w sposób łagodny, acz skuteczny doprowadzić może do normalizacji masy ciała. Zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej wpływa pozytywnie na funkcjonowanie całego organizmu. Poprawie ulegają parametry gospodarki lipidowej, węglowodanowej, zmniejsza się insulinooporność tkanek, poprawia się funkcjonowanie komórek śródbłonna naczyniowego, co bezpośrednio usprawnia układ sercowo-naczyniowy (Jung, 1997).

### 5.1 Skuteczność umiarkowanej restrykcji kalorycznej

Pożądanym efektem restrykcji kalorycznej jest korekcja nieprawidłowych wartości parametrów antropometrycznych oraz wysokich stężeń adipokin (Porreca i wsp., 2004; Raitakari i wsp., 2004; Vazquez i wsp., 2005). Niestety nie zawsze udaje się skorygować niepożądane wysokie wartości wskaźnika BMI, co z pewnością zależy od długości trwania RK i jej suplementów (Hankey i wsp., 2002; Ziccardi i wsp., 2002; Hamdy i wsp., 2003; Lefevre i wsp., 2009; Lefevre i wsp., 2009). Również naszym pacjentkom nie udało się skorygować wysokich wartości BMI do wartości zalecanych, przez okres 8 tygodni. W obu przebadanych grupach, pozostały osoby z nieprawidłową wartością BMI, przekraczającą wartość 35. Jednak pomimo tego, że okres leczenia dietetycznego nie był długi i bardzo intensywny, u większości analizowanych pacjentów zaobserwowano obniżenie masy ciała, wartości BMI, obwodu talii, ilości tkanki tłuszczowej oraz stężenia adipokin: Il-6, TNF- $\alpha$  oraz leptyny. Niestety 8 tygodniowy okres stosowania diety okazał się za krótki na skorygowanie stężenia adiponektyny. Podobne rezultaty przedstawiają publikacje, w których zastosowano RK o podobnym czasie trwania i intensywności (Porreca i wsp., 2004; Raitakari i wsp., 2004). Wydaje się, że wzrost stężenia adiponektyny wymaga RK o długim okresie trwania. Rolland i wsp. zastosowali trzymiesięczną,

niskokaloryczną dietę w grupie 120 pacjentów. W tym czasie pacjenci stracili mniej niż 5% masy ciała, a stężenie adiponektyny nie uległo zmianie. W związku z tym losowo wybrano pacjentów, którym podawano dietę niskokaloryczną oraz dietę wysokobiałkową/niskowęglowodanową przez dziewięć miesięcy. Po zakończonym badaniu zaobserwowano wzrost stężenia adiponektyny, zwłaszcza w grupie, która stosowała dietę niskokaloryczną (Rolland i wsp., 2011).

Dobór pacjentów w celu oceny efektywności restrykcji u osób otyłych jest zróżnicowany i dotyczy zarówno pacjentów, których wskaźnik BMI jest mniejszy niż 35 (Hankey i wsp., 2002; Ziccardi i wsp., 2002; Brook i wsp., 2004; Lefevre i wsp., 2009; Egert i wsp., 2014), ale również dotyczy osób z ciężką otyłością (BMI > 35) (Hamdy i wsp., 2003; Raitakari i wsp., 2004; Thomson i wsp., 2012). Nasze badania obejmowały pacjentki z ciężką otyłością (średnie BMI: 38,2 kg/m<sup>2</sup>), co z pewnością sprawiło, że najczęściej występującym dodatkowym zaburzeniem była diagnozowana nietolerancja glukozy (41%), pojawiająca się szczególnie często, u osób z wysokim wskaźnikiem BMI (Hamdy i wsp., 2003; Haffner i wsp., 2005; Tinahones i wsp., 2012). Pacjentki te dodatkowo oprócz diety stosowały metforminę, która jest jednym z najczęściej stosowanych leków obniżających stężenie glukozy we krwi, nie ingerującym w sekrecję insuliny (Lau i wsp., 2015). Pojawiająca się oprócz hiperglikemii insulinooporność sprawia, że pacjenci trudniej tracą zbędne kilogramy, poprzez utrudnione wykorzystywanie glukozy przez tkankę mięśniową, tłuszczową oraz wątrobę, ponadto insulinooporność utrudnia lipolizę prowadząc do rozrostu tkanki tłuszczowej. Prowadzi to do bardziej siedzącego trybu życia i przybierania na wadze. Proces ten dodatkowo stymulują czynniki pobudzające apetyt (greлина, kortyzol, insulina, neuropeptyd Y i wiele innych) (Lau i wsp., 2015). Metformina kontroluje glikemię, głównie poprzez kilka istotnych mechanizmów, jak zmniejszenie oporności tkanek na insulinę, głównie mięśni oraz hamowanie wątrobowej syntezy glukozy. Obniża również syntezę kwasów tłuszczowych, hamuje lipogenezę, zmniejsza gromadzenie tłuszczu w mięśniach, co jest skutkiem wzrostu wrażliwości tej tkanki na insulinę (Viollet i wsp., 2012). Jej wielokierunkowe działanie daleko wykracza poza kontrolę profilu glikemii, a wielokierunkowe działanie u osób otyłych na hepatocyty, miocyty, śródbłonek naczyniowy oraz adipocyty prowadzi do zmniejszenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (Lamanna i wsp., 2011; Lau i wsp., 2015). W badaniach Caballero stosowanie metforminy przez 16 tygodni

zmniejszyło stężenie markerów dysfunkcji śródbłonka u otyłych pacjentów z nieprawidłowym profilem glikemii, w porównaniu do grupy placebo (Caballero i wsp., 2004). Salpeter i wsp. porównali działanie metforminy z 31 badań klinicznych osób z cukrzycą i stwierdzili, że redukuje ona BMI średnio o 5,3%, a masę ciała od 1 do 2% w porównaniu do osób, które jej nie stosowały (Salpeter i wsp., 2008). Wynika to między innymi z jej działania zmniejszającego apetyt, wpływu na dobowy rytm pracy układu pokarmowego oraz metabolizm tłuszczowy (Malin i wsp., 2014). Jednak, jak pokazał Haffner i wsp., zmiana stylu życia w większym stopniu modyfikuje parametry antropometryczne, niż stosowanie samej metforminy w długofalowym okresie 6 i 12 miesięcy u pacjentów otyłych z nietolerancją glukozy (Haffner i wsp., 2005).

Niezmiernie istotnym aspektem zastosowanej restrykcji, było zredukowanie odsetka osób z BMI zagrażającym życiu z 43% do 20%, w grupie pacjentek, które straciły więcej na wadze. Należy wspomnieć, że obydwie grupy charakteryzowały się podobnym udziałem procentowy osób z II i III stopniem otyłości. Grupa pacjentek, dla których RK okazała się bardziej skuteczna, dodatkowo zwiększyły wrażliwość tkanek na insulinę (zmniejszenie wskaźnika HOMA-IR), zredukowały stężenie cholesterolu, trójglicerydów oraz ilość tkanki mięśniowej. Badania Brook'a i wsp. pokazują podobny wpływ, nieco dłuższej umiarkowanej restrykcji kalorycznej, na otyłych pacjentach z zespołem metabolicznym. Zaobserwowano u nich poprawę parametrów antropometrycznych, lipidowych, zwiększenie wrażliwości na insulinę oraz zmniejszenie stężenia leptyny. Konsekwencją otyłości jest spadek masy mięśniowej, zaobserwowany również u naszych pacjentek. Utracie masy ciała u osób otyłych na skutek diety niskokalorycznej towarzyszy spadek beztłuszczowej masy ciała. Spadek ten może stanowić, aż 25% całkowitej utraty masy ciała. Obecnie podczas leczenia otyłości dąży się do utrzymania beztłuszczowej masy ciała w możliwie niezmienionej ilości np. zalecając aktywność fizyczną. Stosowanie diety, bez wprowadzenia aktywności fizycznej, skutkuje utratą masy mięśniowej, ponieważ dieta, w szczególności niskokaloryczna, stanowi dla organizmu stan niedożywienia spowodowany niedoborem energetycznym oraz zmniejszoną podażą podstawowych składników odżywczych (Biernat i wsp., 2011). Utrata masy mięśniowej u osób otyłych zwana otyłością sarkopeniczną to problem złożony, na który składają się następujące zaburzenia towarzyszące otyłości: (i) subkliniczny stan zapalny, (ii) stres

oksydacyjny, (iii) zmiana stężeń czynników mitogennych jak np. insulina, IGF-1, testosteron i hormon wzrostu, (iii) zbyt małe dostarczanie wapnia zjonizowanego do komórki w związku z uszkodzeniem kanałów wapniowych przez wolne rodniki, (iv) niedobory witaminy D, (v) stosowanie statyn (inhibitory reduktazy HMG-CoA) przy leczeniu dyslipidemii, (vi) stosowanie niskokalorycznej diety bez aktywności fizycznej (więcej informacji w Stenholm S. i wsp., 2008). Stosowanie metforminy u osób otyłych może zapobiegać sarkopenii. Metformina redukuje odkładanie się tłuszczu w mięśniach i zwiększa wykorzystanie glukozy, a tym samym uwrażliwia komórki mięśniowe na insulinę zapewniając im dowóz substratów energetycznych i lepsze funkcjonowanie (Violetti i wsp., 2012).

Pacjentki, które straciły większą ilość masy ciała charakteryzowały się również spadkiem wartości ciśnienia skurczowego krwi, co z pewnością wynikało z faktu łącznego działania RK i leków korygujących ciśnienie krwi. Tylko w tej grupie znajdowały się osoby z leczonym nadciśnieniem (24%).

Otyłość predysponuje do występowania insulinooporności (Kolterman i wsp., 1980), jednakże nie u wszystkich pacjentów otyłych stwierdza się to zaburzenie (Ferrannini i wsp., 1997). Początkowo wskaźnikiem, który wykazywał powiązanie pomiędzy otyłością, hiperglikemią, a insulinoopornością był wskaźnik WHR, którym można było klasyfikować otyłość typu żeńskiego i męskiego (Kissebah i wsp., 1982). Obecnie do oceny insulinooporności wykorzystuje się wskaźnik HOMA-IR (Wallace i wsp., 2004). To uwalnianie z tkanki tłuszczowej adipokiny oraz wolne kwasy tłuszczowe upośledzają wykorzystanie glukozy i przyczyniają się do insulinooporności (Boden, 1997). Adipokiny prozapalne: TNF- $\alpha$ , Il-6, MCP-1 jak również rezystyna i waspina odpowiadają za insulinooporność. Przeciwwagę dla nich stanowią leptyna, adiponektyna i wisfatyna (Faraj i wsp., 2004). Zredukowanie tkanki tłuszczowej w istotny sposób redukuje produkcję prozapalnych adipokin i poprawia wrażliwość na insulinę (Porreca i wsp., 2004; Raitakari i wsp., 2004; Vazquez i wsp., 2005). W naszym przypadku zaskakującym faktem było to, że pomimo istotnych różnic w utraconej masie ciała i tkanki tłuszczowej, obydwie grupy, charakteryzował podobny spadek stężenia prozapalnych adipokin Il-6 i TNF- $\alpha$ , a zmiana stężenia leptyny pomimo dużej różnicy między grupami nie została potwierdzona statystycznie.

Warto również wspomnieć o fakcie, że restrykcja kaloryczna opóźnia proces starzenia i chroni nas przed rozwojem chorób nowotworowych. Wiele badań potwierdziło pozytywny efekt restrykcji kalorycznej na wydłużenie czasu życia oraz poprawę jego jakości (Austad i wsp., 1989; Colman i wsp., 2009). Jedną z teorii starzenia, zakłada przyspieszone starzenie w związku ze zwiększoną produkcją wolnych rodników i postępującą akumulacją oksydacyjnych uszkodzeń (Książek i wsp., 2008; Fontana i wsp., 2007; Hursting i wsp., 2013; Ruetenik i wsp., 2015). Poprzez zmniejszenie kaloryczności posiłków zmniejsza się (i) stan zapalny, (ii) stres oksydacyjny, (iii) dostępności czynników mitogennych jak np. insulina czy IGF-1. Prowadzi to do zmian w mikrośrodowisku komórkowym chroniąc przed inwazją komórek nowotworowych (Fontana i wsp., 2007; Książek i wsp., 2008; Hursting i wsp., 2013). W ostatnich latach pojawiają się prace sugerujące, że jednym z mechanizmów działania przeciwstarzeniowego i przeciwnowotworowego restrykcji kalorycznej jest modyfikacja proces angiogenezy (Csiszar i wsp., 2009; Ungvari i wsp., 2009).

Krótkotrwała łagodna restrykcja kaloryczna okazała się skuteczna dla otyłych pacjentek. Zmniejszyła wartości parametrów antropometrycznych oraz stężenia adipokin. U otyłych pacjentek, które w wyniku RK utraciły większą masę ciała zaobserwowano również wzrost wrażliwości na insulinę, spadek stężenia cholesterolu, trójglicerydów, ciśnienia skurczowego krwi, ale również niekorzystny spadek masy mięśniowej.

## **5.2 Wpływ restrykcji kalorycznej na profili ekspresji genów komórek śródbłonna.**

W naszych badaniach chcieliśmy zidentyfikować geny, których ekspresja może ulec zmianie po zastosowaniu łagodnej restrykcji kalorycznej. W tym celu eksponowaliśmy śródbłonek na medium z dodatkiem surowicy pięciu pacjentek, które w wyniku restrykcji w największym stopniu zredukowały masę swojego ciała. Stosując ocenę profilu ekspresji genów, z wykorzystaniem metody mikromacierzy, nie udało się nam zidentyfikować zmian pojedynczych genów. Zastosowanie techniki *gene set enrichment analysis* pozwoliło na ocenę genów w całych szlakach metabolicznych. Grupą genów, której ekspresja zmieniła się w największym stopniu po RK były geny istotne dla cyklu komórkowego. W tym celu jednym z badań

oceniającym funkcję śródbłonna po łagodnej RK była proliferacja komórkowa. Aby zweryfikować czy jest to cecha tylko charakterystyczna dla śródbłonna, wykonano eksperyment sprawdzający jak inne linie komórkowe reagują na medium z dodatkiem surowicy pacjentek pobranej przed i po RK. Przebadano dwie linie komórek nowotworowych raka jajnika (SCOV-3, OVCAR-3), komórki mięśni szkieletowych, komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego, pierwotne komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) oraz komórki śródbłonna HUVEC linii EAhy926. Wzrost proliferacji zaobserwowano tylko w przypadku komórek śródbłonna naczyniowego, zarówno linii pierwotnej (HUVEC) jak i stransformowanej (EAhy926) (Korybalska i wsp., 2016). Wynik ten jest szczególnie istotny, ponieważ wcześniejsze doniesienia sugerowały, że komórki EA.hy926 mogą nie być optymalnym modelem do badania proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego (Boerma i wsp., 2006). Zaobserwowany wzrost proliferacji komórek śródbłonna, indukowany surowicą, odzwierciedlał pewne fenotypowe cechy pacjenta, szczególnie procentową utratę masy ciała. Nasze wcześniejsze badania obejmowały większą grupę osób otyłych, składającą się zarówno z kobiet (większą) jak i mężczyzn (mniejszą). Zaobserwowany efekt powiązania proliferacji z utratą masy ciała pojawił się tylko u mężczyzn, a w zdecydowanie mniejszym stopniu był obserwowany u kobiet. Większa redukcja masy ciała u mężczyzn sprawiała, że ich surowica raczej zmniejszała niż zwiększała wzrost komórek śródbłonna. Efekt ten nie zależał od typowych czynników angiogennych takich jak VEGF, MCP-1, TSP-1, MMP-9, Ang-2, ale korelował ze zmianami Ang-1, bFGF, leptyny i adiponektyny (Korybalska i wsp., 2016). Wydawało się, że istotnym czynnikiem procesu angiogenezy, od którego może zależeć proliferacja jest VEGF, którego stężenie u osób otyłych wzrasta (Doupis i wsp., 2011). Jednak łagodna RK nie zmienia jego stężenia. Podobny efekt w surowicy i tkance tłuszczowej obserwował Cullberg i wsp. (Cullberg i wsp., 2013). Ellsworth i wsp. zaobserwował istotne zmiany ekspresji genów, również tych zaangażowanych w proliferację, u osób, które przez rok stosowały modyfikację dietetyczną. Zmiany były widoczne tylko u pacjentów, którzy zmniejszyli masę swojego ciała o więcej niż 10%, a nie były zauważalne u osób, które w minimalnym stopniu straciły na wadze (Ellsworth i wsp., 2015).

Różnorodną odpowiedź proliferacji śródbłonna na zmiany masy ciała w wyniku restrykcji u kobiet i mężczyzn można tłumaczyć wpływem hormonów płciowych.

Znany jest stymulujący wpływ estrogenów na proliferację, migrację oraz formowanie załączków naczyń (Morales i wsp., 1995). Podobne doniesienia są na temat działania androgenów (Cai i wsp., 2011). Ostatnie doniesienia Jing-Jing Cai i wsp. podsumowują korzystny, jak i niekorzystny wpływ estrogenów i androgenów na układ krążenia (Cai i wsp., 2016). Od lat wiadomo, że leptyna i adiponektyna wywierają przeciwstawne efekty na proliferację śródbłonna (Vansaun i wsp., 2013; Adya i wsp., 2015). Leptyna promuje angiogenezę, natomiast adiponektyna ją hamuje (Vansaun i wsp., 2013; Adya i wsp., 2015). Istotne są również różnice w wydzielaniu tych adipokin u kobiet i mężczyzn, szczególnie obserwowane prawie trzykrotnie wyższe stężenia leptyny u kobiet (Ostlund i wsp., 1996; Hellstrom i wsp., 2000) i niższe stężenia adiponektyny u mężczyzn (Bottner i wsp., 2004.) Niezwykle cenne uwagi dotyczące zależności pomiędzy proliferacją śródbłonna, a restrykcją kaloryczną zawiera praca Reinharda i wsp. Wysuwa on hipotezę mówiącą o zależności pomiędzy energochłonną proliferacją śródbłonna, a stratą masy ciała uzyskaną podczas stosowanej diety. Osoby z tzw. "oszczędnym" fenotypem mogłyby przeznaczyć więcej energii na proliferację komórek śródbłonna, tracąc mniej masy ciała, podczas gdy osoby o tzw. fenotypie "rozrzutnym" przeznaczają na ten sam cel mniej energii, ale uzyskują większą stratę masy ciała. Autorzy stwierdzili, że osoby, które straciły na wadze więcej wykazywały spadek proliferacji komórek (Reinhardt i wsp., 2015), co zostało potwierdzone również w naszych badaniach, ale tylko w grupie mężczyzn (Korybalska i wsp., 2016).

Wykorzystanie komórek śródbłonna *in vitro* do oceny warunków *in vivo* jest praktykowane w pracach eksperymentalnych. Badania pokazały, że zmiany funkcji komórek śródbłonna obserwowane *in vitro* pod wpływem badanych surowic, mają istotną wartość prognostyczną np. u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i raka okrężnicy (Palatka i wsp., 2006; Gonzalez i wsp., 2007). Wcześniejsze nasze badania z wykorzystaniem komórek HUVEC linii EA.hy926 wykazały, że proliferacja komórek pod wpływem surowic pobranych od chorych z zawałem serca jest istotnie większa, niż pod wpływem surowicy osób zdrowych (Pyda, 2007). Ponad to zaobserwowaliśmy, że wzrost proliferacji śródbłonna pod wpływem surowicy osób z zawałem serca jest proporcjonalny do długości wszczepionego stentu podczas zabiegu angioplastyki wieńcowej, czyli odzwierciedla wielkość uszkodzenia naczynia (Pyda i wsp., 2012).



Model do badania restrykcji kalorycznej w warunkach *in vitro* prezentują między innymi Rafaela de Cabo (de Cabo i wsp., 2003) oraz Annę Csiszar (Csiszar i wsp., 2009; Csiszar i wsp., 2013). Ekspozycja śródbłonka na medium z dodatkiem surowic zwierząt po restrykcji kalorycznej imituje wiele istotnych procesów zachodzących w naczyniu krwionośnym obserwowanych podczas diety w warunkach *in vivo* (Csiszar i wsp., 2009; Csiszar i wsp., 2013). Stres oksydacyjny, nadmiar czynników o działaniu prozapalnym, lokalne niedotlenienie tkanki tłuszczowej to czynniki prowadzące do pogorszenia funkcji naczyń krwionośnych w otyłości. Ograniczenia dietetyczne poprawiają funkcję naczyń krwionośnych poprzez zmniejszenie czynników ryzyka zmian miażdżycowych (Hamdy i wsp., 2003). Badania Hanzu i wsp. przedstawiają doświadczenia ekspozycji śródbłonka w warunkach *in vitro* na medium uzyskane z hodowli tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej osób otyłych i z prawidłową masą ciała. Badania pokazały, że cytokiny wydzielane przez adipocyty działają niekorzystnie na śródbłonek zwiększając ekspresję molekuł adhezyjnych, czynnika von Willebranda oraz zmieniają jego morfologię. Proliferacja śródbłonka wzrastała tylko w przypadku ekspozycji na medium kondycjonowane adipocytów osób otyłych w porównaniu do komórek, które ekspozowane były na medium z hodowli adipocytów pobranych od osób z prawidłową masą ciała. Jak podkreślają autorzy pracy, niekorzystny wpływ na śródbłonek wynika z aktywacji szlaków sygnałowych czynnika transkrypcyjnego NFκB (Hanzu i wsp., 2011).

Mechanizm, w jakim restrykcja kaloryczna chroni funkcje naczyń krwionośnych pozostaje stale niewyjaśniony. Z pewnością usprawnia wiele funkcji śródbłonka istotnych dla angiogenezy, takich jak zapobieganie starzeniu i apoptozie, ale również usprawnia proliferację i formowanie załączków naczyń (Csiszar i wsp., 2012; Csiszar i wsp., 2013). Wydaje się jednak, że to właśnie zmniejszenie stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, po zastosowaniu diety prowadzi w głównej mierze do usprawnienia funkcji śródbłonka (Csiszar i wsp., 2009). Csiszar i wsp. po eksperymentach z zastosowaniem ograniczeń dietetycznych u zwierząt (szczury, mały człokształtne) uważa, że zmiany pojawiające się w śródbłonku będą na tyle silne, że efekt ich działania będzie również widoczny po zaprzestaniu restrykcji (Csiszar i wsp., 2012). Zmniejszenie kaloryczności diety wiąże się ze zmianą stężenia wielu czynników neuroendokrynych, które docierając z prądem krwi do komórek

śródbłonna naczyń włosowatych zapoczątkowują różnorodne procesy cytoprotekcyjne (de Cabo i wsp., 2003; Ungvari i wsp., 2008). Czas RK zastosowany przez Csiszar i wsp. na małpach człekokształtnych *Macaca Mulatta* to okres 10 lat, bardzo trudny do osiągnięcia w przypadku badań klinicznych. Zwierzętom zmniejszono kaloryczność diety o 30% w stosunku do zwierząt karmionych *ad libitum*, stanowiących grupę kontrolną. Stwierdzono, że surowice małp pozostających na restrykcji stymulują proliferację komórek śródbłonna naczyniowego oraz zwiększają zdolność formowania załączków naczyń (Csiszar i wsp., 2012). Chociaż nasz okres restrykcji był krótki, stwierdziliśmy podobny efekt wzrostu proliferacji tylko w grupie kobiet, która w większym stopniu zredukowała masę swojego ciała. W sekcji wyniki w Tab. 20 przedstawiono zależność pomiędzy proliferacją śródbłonna, a spadkiem masy ciała po RK dla wszystkich 41 badanych pacjentek.

Mechanizmy leżące u podstaw zmian w proliferacji komórek śródbłonna w odpowiedzi na restrykcję kaloryczną są prawdopodobnie wielopłaszczyznowe. Zależą od wielu czynników jak hormony, adipokiny, mediatory stanu zapalnego, czynniki angiogenne i angiostatyczne. Liczne doniesienia wskazują, że otyłość wpływa bezpośrednio na zmiany zachodzące w procesie angiogenezy (Renehan i wsp., 2015; Vandekeere i wsp., 2015). Badając ten proces u otyłych, należy również zwrócić uwagę na powszechne stosowanie u nich metforminy, z powodu pojawiającej się nietolerancji glukozy i cukrzycy. Z jednej strony jest to lek usprawniającym funkcję śródbłonna w otyłości (Caballero i wsp., 2004), a z drugiej strony znane jest jej działanie antyangiogenne (Tan i wsp., 2009; Dallaglio i wsp., 2014). Ekspozując śródbłonek w hodowli *in vitro* na medium z dodatkiem surowic otyłych kobiet leczonych restrykcją kaloryczną jesteśmy w stanie zaobserwować zmiany proliferacji komórek w zależności od straty masy ciała. Analizując te dane nie stwierdza się pomiędzy nimi ścisłej proporcjonalnej zależności. Generalnie spadek wagi, u większości analizowanych otyłych kobiet powoduje wzrost proliferacji komórek. Efekt jest bardziej nasilony w grupie kobiet, które w większym stopniu zredukowały masę swojego ciała po RK.

### **5.3 Wpływ restrykcji na ocenę funkcji śródbłonna**

Obecnie zwraca się uwagę na tzw. zdrowe osoby otyłe, u których nie stwierdza się zaburzeń metabolicznych. Ich liczbę szacuje się w szerokich granicach od 10 do

51% wśród ludzi otyłych (Rey-López i wsp., 2014). Sprawą kontrowersyjną pozostaje pytanie, czy te zdrowe metabolicznie osoby pozostają również zdrowe w sensie ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (Kip i wsp., 2004; Ogorodnikova i wsp., 2012). Zaburzenie funkcji małych naczyń włosowatych jest nieodłącznym elementem otyłości zapowiadającym zdarzenia sercowo-naczyniowe. Luisa Brant i wsp. wykazali, że taka dysfunkcja pojawia się zarówno u otyłych metabolicznie zdrowych, jak i metabolicznie nieprawidłowych. Uszkodzenie funkcji naczyń włosowatych jest jednak mniej nasilone u otyłych metabolicznie zdrowych (Brant i wsp., 2017). Niezmiernie istotnym elementem sprawności naczyń są komórki śródbłonka naczyniowego, których dysfunkcja w otyłości jest powszechnie udowodniona (Widlansky i wsp., 2003; Brevetti i wsp., 2008). Charakteryzuje się to zmniejszeniem produkcji tlenu azotu, skurczem naczyń, aktywacją zapalną, zakrzepicą, co sprawia, że otyli pacjenci stają się bardziej podatni na rozwój chorób sercowo-naczyniowych (Alexopoulos i wsp., 2014; Cao i wsp., 2014). Dlatego tak istotnym elementem usprawnienia ich funkcji wydaje się reżim dietetyczny długotrwały i umiarkowany, który w jak największym stopniu imituje codzienne zdrowe odżywianie.

Adiponektyna, leptyna, Il-6 i TNF- $\alpha$  są najlepiej scharakteryzowanymi adipokinami, które odgrywają istotną rolę w oporności na insulinę i wpływają na czynność śródbłonka (Ritchie i wsp., 2004). Ośmiotygodniowa restrykcja częściowo usprawniła funkcje komórek śródbłonka zarówno u osób, które straciły małą jak i dużą ilość masy ciała. Podobne efekty uzyskał Egert i wsp., ale zależał on bardziej od długości stosowania reżimu dietetycznego, niż od zastosowanych suplementów (Egert i wsp., 2014). Zauważono również, że wydłużenie RK nie zawsze prowadzi do realizacji celu jakim jest poprawa funkcji śródbłonka naczyniowego (Ziccardi i wsp., 2002; Thomson i wsp., 2012). Najczęściej stężenie TNF- $\alpha$  spada w wyniku RK, co sprzyja poprawie funkcjonowania śródbłonka, ocenianej spadkiem stężenia sICAM-1, sVCAM-1 oraz sE-selektyny (Ziccardi i wsp., 2002). Jakkolwiek zaobserwowany przez nas, podobny spadek stężenia prozapalnych adipokin (Il-6 i TNF- $\alpha$ ) w obydwu analizowanych grupach nie odzwierciedlał do końca poprawy funkcji śródbłonka, która była zdecydowanie lepsza u pań, które straciły więcej na wadze, w porównaniu do grupy, w której efektywność diety była mniejsza, pomimo podobnej redukcji prozapalnych adipokin.

Reżim dietetyczny nie zmienił w sposób istotny parametrów procesu hemostazy produkowanych przez śródbłonek, co potwierdzają też inni autorzy (Hankey i wsp., 2002; Hamdy i wsp., 2003). Niemniej jednak PAI-1, spośród innych parametrów procesu hemostazy, wydaje się najbardziej podatnym na modyfikacje po RK (Hamdy i wsp., 2003, Thomson i wsp., 2012, Torres i wsp., 2013).

Międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1 (ICAM-1) odgrywa istotną rolę w przebiegu procesu zapalnego oraz rozwoju miażdżycy tętnic (Cines i wsp., 1998; Alexopoulos i wsp., 2014). Jest też najczęściej oceniana spośród markerów aktywacji zapalnej śródbłonka. Jej stężenie, jak pokazują dane literaturowe, ulega dość łatwo modyfikacji pod wpływem reżimu dietetycznego (Ziccardi i wsp., 2002; Hamdy i wsp., 2003; Thomson i wsp., 2012; Torres i wsp., 2013; Egert i wsp., 2014). Zmiany stężenia innych cząsteczek adhezyjnych, takich jak E-selektyna oraz VCAM-1, są mniej przewidywalne i prawdopodobnie bardziej zależą od rodzaju i czasu trwania RK (Hamdy i wsp., 2003; Thomson i wsp., 2012; Torres i wsp., 2013; Egert i wsp., 2014). Badacze próbują znaleźć powiązanie pomiędzy markerami funkcji śródbłonka, a markerami intensywności otyłości. Do tej pory stwierdzono korelacje pomiędzy stężeniami molekuł adhezyjnych, a stężeniem leptyny (Porreca i wsp., 2004; Park i wsp., 2007), BMI i WHR (Ziccardi i wsp., 2002), HDL (Davis i wsp., 2011) oraz stężeniem receptora typu 2 dla TNF oraz IL-6 (Davis i wsp., 2011). Leptyna i adiponektyna wywierają przeciwstawny wpływ na ekspresję ICAM-1 (Porreca i wsp., 2004; Park i wsp., 2007) i są zaangażowane w dysfunkcję śródbłonka w otyłości (Avogaro i wsp., 2005). Wielkość zmian prozapalnych markerów dysfunkcji śródbłonka jest spowodowana wielkością redukcji stężenia leptyny (Porreca i wsp., 2004; Park i wsp., 2007). Wysokie stężenie leptyny u osób otyłych (Ostlund i wsp., 1996; Porreca i wsp., 2004), obniża się w momencie zmniejszania masy ciała (Torres i wsp., 2013; Korybalska i wsp., 2016). W naszym projekcie osoby, które straciły więcej na wadze charakteryzował duży spadek ilości tkanki tłuszczowej i leptyny, co było prawdopodobną przyczyną redukcji prozapalnych sE-selektyny i sICAM-1 oraz prowadziło do bardzo wysokiego wzrostu produkcji tlenu azotu. Wydaje nam się, że ten efekt jest odpowiedzialny w większym stopniu za poprawę funkcji śródbłonka niż, porównywalny w obydwu grupach, spadek stężenia prozapalnych adipokin – IL-6 oraz TNF- $\alpha$ . Częściowa poprawa funkcji śródbłonka pojawia się niezależnie od ilości straconej masy ciała, w związku ze spadkiem masy tkanki tłuszczowej,

zmniejszeniem stanu zapalnego i prawdopodobnie poprawą nawyków żywieniowych. Mediatorami, których stężenie ulega redukcji są sE-selektyna i ADMA. U osób otyłych dieta wysokotłuszczowa i bogata w sól prowadzi do wzrostu stężenia ADMA (Fard i wsp., 2000; Fujiwara N., 2000). Niesie to ze sobą ryzyko, chorób sercowo-naczyniowych, hamuje produkcję NO poprzez konkurowanie z L-argininą, substratem eNOS (Vallance i wsp., 2004). Ponadto ADMA działa niekorzystnie na proliferację komórkową, generuje produkcję ROS, zwiększa przepuszczalność śródbłonna, i ekspresję ICAM-1. Stosowanie antyoksydantów jest skuteczną metodą redukującą niekorzystne działanie ADMA (Chen i wsp., 2011). Restrykcja kaloryczna, ograniczająca produkty wysokotłuszczowe, obniża stężenia ADMA w otyłości (Fard i wsp., 2000; Fujiwara N., 2000). Jednakże nie do końca jest wyjaśnione, czy na zmiany stężenia ADMA wpływ ma wprowadzona restrykcja kaloryczna, czy istotny jest ubytek masy tkanki tłuszczowej. Wyniki badań wydają się wskazywać, że na obniżenie stężenia ADMA u osób otyłych leczonych restrykcją wpływa w większym stopniu rodzaj stosowanej diety (Egert i wsp., 2014, (Krzyzanowaka i wsp., 2004), niż wpływ zastosowanych łącznie z nią ćwiczeń fizycznych (Thomson i wsp., 2012).

Przyjmowanie nadmiaru pożywienia prowadzi do hiperglikemii, hiperinsulinemii, stresu oksydacyjnego i wzrostu stężenia TNF- $\alpha$  i ADMA. Wymienione czynniki są odpowiedzialne za spadek aktywności eNOS, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za produkcję NO w śródbłonku (Ding i wsp., 2000; Avogaro i wsp., 2005; Sansbury i wsp., 2014). Insulina wzmacnia rozkurcz naczyń uzależniony od śródbłonkowej produkcji tlenu azotu. W sytuacji nadmiaru tkanki tłuszczowej, hiperinsulinemia jest przyczyną stresu oksydacyjnego i upośledza wazodylatacyjną funkcję śródbłonna. Steinberg i wsp. udokumentowali, że oporności na insulinę zmniejsza rozkurcz naczyń uzależniony od śródbłonna, ale nie zmienia odpowiedzi naczyń na inne czynniki wazodylatacyjne (Steinberg i wsp., 1996). Leptyna to również jeden z czynników o działaniu rozszerzającym naczyń, ze zróżnicowanym mechanizmem działania (Fruhbeck i wsp., 1999; Lembo i wsp., 2000; Vecchione i wsp., 2002). Zaobserwowano związek pomiędzy stężeniem leptyny, a wartością FMD (ang. *flow mediated dillatation*) (Brook i wsp., 2004). Przypuszcza się, że leptyna wpływa na rozkurcz naczyń poprzez stymulację śródbłonna do produkcji NO (Fruhbeck i wsp., 1999; Lembo i wsp., 2000), ale ta reakcja może ulegać zmianie (Vecchione i wsp., 2002). Obserwuje się również brak odpowiedzi śródbłonna naczyniowego na leptynę

(Brook i wsp., 2004). Inne doniesienia sugerują, że w rozszerzającym naczynia efekcie leptyny pośredniczy hiperpolaryzujący czynnik pochodzenia śródbłonkowego - EDHF (Lembo i wsp., 2000). Nasze badania nie pokazują bezpośredniej korelacji pomiędzy leptyną i tlenkiem azotu, ale wykazaliśmy silną zależność pomiędzy wzrostem stężenia NO i spadkiem ilości tkanki tłuszczowej, która jest głównym źródłem leptyny. Ponadto wykazaliśmy, że znaczna poprawa produkcji tlenku azotu, wymaga znacznego zmniejszenia masy ciała. Joris i wsp. w meta-analizie wykazali, że spadek wagi ciała pociąga za sobą mały, ale istotny wzrost wartości FMD, który jest uważany za istotny kliniczny parametr dobrego funkcjonowania śródbłonka uzależniony od produkcji tlenku azotu. Oszacowano, że na każde 10 kg spadku masy ciała wartość FMD wzrasta o ok. 1%. Analiza przeprowadzona przez Joris'a i wsp. pokazała również bardzo dużą niejednorodność odpowiedzi FMD na spadek masy ciała. Autorzy uważają, że jest to spowodowane różną utratą masy ciała, rodzajem stosowanej diety, występowaniem współistniejących chorób i stosowaną terapią jak również stosowaniem ćwiczeń fizycznych (Joris i wsp., 2014).

Wielkością stężenia NO we krwi osób otyłych jest reakcja adaptacyjna na wysokie stężenie leptyny (Konukoglu i wsp., 2006). Zmienia ona dostępność NO, poprzez wpływ na jego uwalnianie, ale również wynika z generowanego przez leptynę stresu oksydacyjnego, który obniża jego dostępność (Beltowski i wsp., 2004; Konukoglu i wsp., 2006). Badania pokazują, że leptyna jest przyczyną stresu oksydacyjnego u otyłych kobiet (Konukoglu i wsp., 2006) i generuje powstawanie ROS w komórkach śródbłonka naczyniowego *in vitro* (Yamagishi i wsp., 2003). Ponadto stres oksydacyjny, u osób otyłych, nie wynika tylko z obecności wysokich stężeń leptyny, to również wynik współistniejącego stanu zapalnego (NF- $\kappa$ B - ekspresja genów zapalnych), hiperglikemii, hiperinsulinemii, wysokiego stężenia ADMA i obecności rozprężonej syntazy eNOS, enzymu charakterystycznego dla dysfunkcyjnego śródbłonka (Avogaro i wsp., 2005; Chen i wsp., 2011; Sansbury i wsp., 2014). Jonorodnik ponadtlenkowy oraz nadtlenek wodoru zmniejszają biodostępność NO, prowadząc do wytworzenia jonu nadazotynowego (ONOO<sup>-</sup>) (Beltowski i wsp., 2004; Konukoglu i wsp., 2006). Dodatkowo podwyższone stężenie rozprężonej syntazy eNOS stwierdza się u otyłych kobiet (Engeli i wsp., 2004). Jest to między innymi spowodowane tym, że ROS są czynnikami stymulującymi jej produkcję (Ding i wsp., 2000). ROS to również czynniki regulujące ekspresję kilku klas prozapalnych genów,

włączając w to geny kodujące molekuly adhezyjne, czynniki chemotaktyczne, antyoksydanty oraz czynniki wazoaktywne (Cooper i wsp., 2002). Aby wytłumaczyć tak spektakularny wzrost tlenku azotu po RK oceniliśmy u pacjentów całkowity status antyoksydacyjny (TAS), aktywność katalazy, SOD oraz generację wolnych rodników przez śródbłonek eksponowany na medium z dodatkiem surowicy pacjentek. Nie zaobserwowaliśmy istotnej statystycznie różnicy w badanych parametrach w obydwu grupach, za wyjątkiem wzrostu aktywności katalazy w grupie, która w większym stopniu zmniejszyła masę ciała. Rzeczywiście badania wskazują, że wzrost produkcji NO jest efektem zmniejszenia stresu oksydacyjnego (Roberts i wsp., 2006). Nasze badania jednak tego nie potwierdzają. Przypuszczamy, że dłuższa niż 8 tygodni interwencja spowodowałaby bardziej zauważalny efekt redukcji stresu oksydacyjnego. Okresowe zmniejszenie przyjmowania kalorii działa korzystnie poprzez przynajmniej dwa istotne mechanizmy: (i) zmniejsza uszkodzenia powodowane wolnymi rodnikami oraz (ii) wzmacnia komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne. To w konsekwencji wydłuża czas życia, zwiększa odporność na choroby związane z wiekiem oraz ogólnie poprawia zdrowie ludzi z nadwagą (więcej informacji w Mattson i wsp., 2005). Korzystny wpływ restrykcji kalorycznej redukuje stres oksydacyjny w zależności od modyfikacji dietetycznej, czasu jej trwania i towarzyszącej aktywności fizycznej. Wycherley i wsp. przeprowadził badania w trakcie, których grupa otyłych pacjentów została poddana 12 tygodniowej, łagodnej RK. Wykazał on zmniejszenie stresu oksydacyjnego, mierzonego stężeniem malonylodialdehydu, ale niepotwierdzonego zmianą wartości TAS, zarówno w grupie, która stosowała jedynie dietę, jak i dietę połączoną z aktywnością fizyczną. Niestety nie zaobserwowano poprawy wartości FMD (Wycherley i wsp., 2008). Przypuszczamy, że stężenie NO u osób otyłych to rezultat odpowiedzi na stres oksydacyjny, spowodowany współistniejącym w otyłości stanem zapalnym, hiperglikemię, hiperinsulinemię, hiperleptynemię oraz podwyższonym stężenie ADMA. Tak bardzo duży wzrost NO u kobiet, które w większym stopniu zredukowały masę swojego ciała jest głównie wynikiem zmniejszenia tkanki tłuszczowej i zmniejszenia stanu zapalnego, stężenia leptyny, insuliny oraz ADMA. Ta współzależność pomiędzy NO, a tkanką tłuszczową została przez nas potwierdzona metodami statystycznymi i nie dotyczyła innego parametru funkcji śródbłonna.

Poprawa funkcji śródbłonka pojawia się zarówno u osób, które w znaczący sposób zmniejszyły masę swojego ciała, jak i u tych, które zmniejszyły ją w sposób niewielki. Znacząca poprawa stężenia tlenu azotu, kluczowego mediatora funkcji śródbłonka naczyniowego, jest jednak możliwa tylko u osób ze znaczną redukcją masy ciała (>5,8 kg; >5%). Nasze obserwacje mogą przyczynić się do lepszego doboru metod interwencji dietetycznych usprawniających czynność śródbłonka u osób otyłych.

#### **5.4. Podsumowanie**

Przedstawione wyniki pokazują, że nawet krótkotrwała umiarkowana restrykcja kaloryczna doprowadza do zmniejszenia wartości parametrów antropometrycznych, spadku stężenia prozapalnych adipokin, obniżenia insulinooporności, poprawy gospodarki lipidowej oraz poprawy ciśnienie skurczowe krwi. Usprawnia również niektóre aspekty dysfunkcji śródbłonka naczyniowego u otyłych. Poprawa funkcji śródbłonka pojawia się zarówno u pacjentek, u których efektem RK była strata małej jak i dużej ilości masy ciała. Efekt ten był bardziej widoczny u kobiet, które w większym stopniu zredukowały masę swojego ciała. Niezależnie od wielkości straty masy ciała dwa parametry: sE-selektyna oraz asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) zmniejszają się w podobny sposób. Strata większej ilości masy ciała zmniejsza aktywację zapalną śródbłonka (spadek stężenia: sICAM-1 oraz E-selektyny), prowadzi do spektakularnego wzrostu produkcji tlenu azotu (NO) i spadku stężenia ADMA. Ciekawą obserwacją było również to, że wielkość zmian sE-selektyny, sICAM-1, ADMA i NO nie odzwierciedlała zmian stężenia prozapalnych adipokin takich jak TNF- $\alpha$  i Il-6, których spadek wartości był podobny niezależnie, jak dużą ilość masy ciała straciły badane pacjentki. Zaobserwowane procentowe zmiany sE-selektyny i NO korelowały z procentową zmianą masy ciała po restrykcji. Tylko wielkość zmian tlenu azotu, a nie innych markerów funkcji śródbłonka, korelowała dodatnio ze zmianami wielkości spadku tkanki tłuszczowej. Niestety tak krótki okres leczenia dietetycznego nie spowodował istotnych zmian ekspresji genów komórek śródbłonka u otyłych pacjentek. Jediną zaobserwowaną zmianą była poprawa aktywności genów zaangażowanych w cykl komórkowy. Ekspozycja śródbłonka na medium z dodatkiem surowicy pacjentek pobranej przed i po skutkowało wzrostem proliferacji tylko w grupie kobiet, które straciły większą ilość masy ciała.



Poprawa funkcji śródbłonka pojawia się zarówno u osób, które w wyniku RK w mniejszym lub większym stopniu zmniejszyły masę swojego ciała. Proces ten jest wypadkową zmniejszenia tkanki tłuszczowej, stanu zapalnego i zmiany nawyków żywieniowych. Tlenek azotu jest jedynym parametrem funkcji śródbłonka, którego wzrost stężenia koreluje ze zmianami wielkości spadku tkanki tłuszczowej po RK. Jednak znaczna poprawa produkcji tlenu azotu, kluczowego markera sprawności śródbłonka, wymaga znacznego zmniejszenia masy ciała.

## 6. Wnioski

1. Łagodna restrykcja kaloryczna, proporcjonalnie do ubytku masy ciała, redukuje wartości parametrów antropometrycznych, stężenia adipokin, normalizuje gospodarkę lipidową, ciśnienia krwi oraz zwiększa wrażliwość na insulinę.
2. Łagodna restrykcja kaloryczna nie zmienia profilu ekspresji pojedynczych genów komórek śródbłonna naczyniowego, ale u otyłych pacjentek, które w większym stopniu straciły na wadze, poprawia funkcjonowanie szlaku genów zaangażowanych w cykl komórkowy.
3. Usprawnienie niektórych funkcji śródbłonna u otyłych kobiet po restrykcji kalorycznej, obserwuje się niezależnie od ilości zredukowanej masy ciała.
4. Utrata większej ilości masy ciała zmniejsza aktywację zapalną śródbłonna naczyniowego i prowadzi do spektakularnego wzrostu stężenia tlenu azotu.
5. Tlenek azotu jest jedynym parametrem funkcji śródbłonna, którego procentowy wzrost stężenia koreluje dodatnio z procentowym spadkiem tkanki tłuszczowej.

## 7. Streszczenie w języku polskim

**Wstęp** Nadmierny rozrost tkanki tłuszczowej prowadzi do wielu powikłań zdrowotnych. Tkanka tłuszczowa jest aktywna metabolicznie i produkuje szereg prozapalnych adipokin. Ich obecność w krążeniu systemowym prowadzi do pogorszenia funkcji śródbłonna naczyniowego odpowiedzialnego za homeostazę naczyniową. Uważa się, że zaburzenie czynności komórek śródbłonna, u osób otyłych można zmniejszyć stosując ograniczenia dietetyczne. Nie jest jednak jasne, czy korzyść ta wymaga jednoczesnej utraty masy ciała, czy jest to tylko efekt związany ze zmniejszonym spożyciem kalorii.

**Cel badania** Celem przedstawionej pracy była ocena funkcji śródbłonna naczyniowego, u otyłych kobiet po umiarkowanej restrykcji kalorycznej (RK) w odniesieniu do uzyskanych zmian masy ciała.

**Metodyka** Do badań zrekrutowano 41 otyłych kobiet (wiek:  $34 \pm 10$  lat, BMI:  $38,2 \pm 6,5$  kg/m<sup>2</sup>, BMI > 40 - 41%), celem oceny funkcji komórek śródbłonna po 8 tygodniowej łagodnej RK (deficyt energetyczny 300-500 kcal/dzień). W pobranej przed i po RK surowicy, oceniono czynniki warunkujące efektywność zastosowanego leczenia dietetycznego (adipokiny, stres oksydacyjny, gospodarkę węglowodanową i lipidową), oraz mediatory funkcji śródbłonna naczyniowego. U pięciu pacjentek, które w wyniku RK utraciły najwięcej masy ciała, oceniono zmianę profilu ekspresji genów, metodą mikromacierzy, eksponując śródbłonek na medium z dodatkiem surowicy otyłych pacjentek w warunkach hodowli *in vitro*. Wykonano również pomiar składu masy ciała metodą bioimpedancji. Grupę badaną podzielono na dwie podgrupy w zależności od efektywności RK, mierzonej ilości straconej masy ciała. Kryterium podziału stanowiła wielkość mediany: -5,8 kg. Analizowano grupę z mniejszą stratą masy ciała (wartość poniżej mediany; średnia:  $-1,9 \pm 2,5$  kg) oraz grupę z większą stratą masy ciała (wartość powyżej mediany; średnia:  $-8,3 \pm 1,9$  kg).

**Wyniki** Umiarkowana restrykcja kaloryczna okazała się skuteczna dla wszystkich analizowanych pacjentek obniżając wartości parametrów antropometrycznych (masa ciała, BMI, obwód pasa, ilość tkanki tłuszczowej) oraz stężenia adipokin (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptyna). Pacjentki z grupy, która straciła więcej masy ciała w wyniku RK, dodatkowo zmniejszyły odsetek osób z BMI zagrażającym życiu z 43% do 20%, zwiększyły wrażliwość na insulinę, zredukowały stężenie cholesterolu, trójglicerydów oraz ilość tkanki mięśniowej. Pacjentki tej grupy charakteryzowały się również zmniejszeniem

wartości ciśnienia skurczowego po RK, co z pewnością wynikało z faktu łącznego działania diety i leków korygujących ciśnienie krwi. Tylko w tej grupie znajdowały się osoby z leczonym nadciśnieniem (24%). Pomimo istotnych różnic w utraczonej masie ciała, obydwie grupy, charakteryzował podobny spadek stężenia prozapalnych adipokin II-6 i TNF- $\alpha$ .

Niestety tak krótki okres leczenia dietetycznego nie spowodował istotnych zmian ekspresji genów komórek śródbłonna u otyłych pacjentek. Jedyną zaobserwowaną zmianą była poprawa aktywności całego szlaku genów zaangażowanych w cykl komórkowy. Ekspozycja śródbłonna na medium z dodatkiem surowicy pacjentek pobranej przed i po RK skutkowała wzrostem proliferacji komórek, tylko w grupie kobiet, które straciły większą ilość masy ciała.

Zaobserwowane usprawnienie funkcji śródbłonna jest widoczne zarówno u osób z małą jak i dużą stratą masy ciała po zastosowanej diecie. Niezależnie od wielkości straty masy ciała dwa parametry sE-selektyna oraz asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) zmieniają się w podobny sposób. Strata większej ilości masy ciała prowadzi do zmniejszenia aktywacji zapalnej śródbłonna ( $\downarrow$ sICAM-1,  $\downarrow$ sE-selektyna) i spektakularnego wzrostu produkcji tlenu azotu (NO). Ciekawą obserwacją było również to, że wielkość zmian sE-selektyny, sICAM-1, ADMA i NO nie odzwierciedlała zmian stężenia prozapalnych adipokin takich jak TNF- $\alpha$  i II-6, których spadek wartości był podobny niezależnie od dużej ilości masy ciała straciły badane pacjentki. Obserwowane zmiany sE-selektyny i NO, korelowały ze zmianami masy ciała po zastosowanej diecie. Tylko wielkość zmian tlenu azotu, a nie innych markerów funkcji śródbłonna, wykazała korelację ze spadkiem ilości tkanki tłuszczowej po RK.

**Wnioski** Umiarkowana restrykcja kaloryczna usprawnienia niektóre aspekty dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u osób otyłych. Poprawa funkcji śródbłonna pojawia się zarówno u osób, które w wyniku RK straciły dużo, jak i mało na wadze. Proces ten jest wypadkową zmniejszenia tkanki tłuszczowej, stanu zapalnego i zmiany nawyków żywieniowych. Tlenek azotu jest jedynym parametrem funkcji śródbłonna, którego wzrost stężenia koreluje ze zmianami wielkości spadku tkanki tłuszczowej po RK. Jednak znaczna poprawa produkcji tlenu azotu, kluczowego markera sprawności śródbłonna, wymaga znacznego zmniejszenia masy ciała.

## 8. Streszczenie w języku angielskim

**Background** Obesity is a serious health problem leading to obesity related disorders. Adipose tissue is metabolically active. It produces a number of pro-inflammatory mediators, known as adipokines. The presence of pro-inflammatory adipokines in systemic circulation leads to deterioration in vascular endothelial cell function, cells which are responsible for vascular homeostasis. It is believed that endothelial cell dysfunction in obesity can be reduced by caloric restriction (CR). It is, however, unclear whether this benefit requires a concomitant weight loss or is it simply related to the reduced calorie intake *per se*.

**Aim of thy study** In this study we analyzed the changes in endothelial cell function parameters in relation to the changes in body weight.

**Methods** We recruited 41 obese women (age:  $34 \pm 10$  years, BMI:  $38.2 \pm 6.5$  kg/m<sup>2</sup>, BMI > 40 - 41%) to evaluate the function of endothelial cells after 8 weeks of mild CR (300 energy deficit -500 kcal/day). In serum obtained before and after CR we detected a number of factors determining the effectiveness of the dietary treatment (adipokines, oxidative stress, carbohydrate and lipid profile), and mediators of endothelial cell function. In five patients, who lost the largest amount of body mass after CR, we evaluated the gene profile expression by microarray, exposing the endothelial cells to the medium supplemented with patient serum *in vitro*. Using bioimpedance method, we have also evaluated patients' body composition. Our group was divided into two groups depending on the amount of body mass loss after CR. As a criterion for the division we use the median value: -5.8 kg. We analyzed obese women with low body weight loss after CR (below the median value, mean:  $-1.9 \pm 2.5$  kg), and women with high body weight loss after CR (above the median value, mean:  $-8.3 \pm 1.9$  kg).

**Results** Moderate CR was effective for all analyzed patients reducing the value of anthropometric parameters (body weight, BMI, waist circumference, body fat) and adipokines level (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptin). Women who lost more body weight after CR also reduced the rate of patients with life-threatening BMI from 43% to 20%, increased insulin sensitivity, reduced cholesterol, triglycerides, and the amount of muscle tissue. They were also characterized by a decrease in systolic blood pressure after intervention. This effect might to be explaining by combined effects of diet and antihypertensive drugs. Women who suffered from hypertension were only the part of

the group who lost more body weight after CR (24%). Surprisingly, despite of significant difference in body weight lost after CR, the two groups, were characterized by a similar decrease in the concentration of pro-inflammatory adipokines, Il-6 and TNF- $\alpha$ .

Unfortunately, such a short period of dietary treatment did not change the endothelial gene expression profile. We have only observed an improvement of genes involved in the cell cycle. Exposure of endothelial cells to medium supplemented with serum taken before and after RK resulted in an increase in cell proliferation only in women who had lost more body mass after the treatment.

The observed improvement of endothelial cell function was noticeable in both tested groups. Regardless of the amount of body weight loss after CR, the two parameters – sE-selektin and asymmetric dimethylarginine (ADMA) were similarly reduced. More body weight loss reduced proinflammatory activation of endothelial cells ( $\downarrow$ sICAM-1,  $\downarrow$  sE-selectin), and resulted in the spectacular increase in nitric oxide production. An interesting observation was that the magnitude of changes in sE-selectin, sICAM-1, ADMA and NO did not parallel the changes in pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and Il-6. The observed changes in sE-selectin, and NO level were significantly correlated with changes in body mass. Only the magnitude of changes in NO serum, but not in other parameters of endothelial cell function, corresponded to the magnitude of body fat reduction.

**Conclusions** Moderate calorie restriction can still improve several parameters of endothelial cell function irrespective of whether it is accompanied by great changes in body mass. This process is a result of the reduction of adipose tissue, inflammation, and the changes in eating habits. Only the magnitude of changes in serum nitric oxide, but not in other parameters of endothelial cell function, corresponded to the magnitude of body fat reduction. However, a significant improvement in nitric oxide, a key mediator of endothelial well-being, requires a substantial reduction in body weight.

## 9. Literatura

Adya R., Tan B.K., Randeve H.S. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. *J Diabetes Res*; 2015; 1-12.

Alexopoulos N., Katritsis D., Raggi P. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 233:104-112.

Anggard E.E. The endothelium--the body's largest endocrine gland? *J Endocrinol* 1990; 127: 371-375.

Ashima R.S., Yong Qi., Singhal N.S. i wsp. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* 2006; 55: 145-154.

Austad SN. Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela*. *Exp Gerontol* 1989; 24: 83-92.

Avogaro A., De Kreutzenberg S.V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 9-26.

Banerji M.A., Lebowitz J., Chaiken R.L. i wsp. Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol* 1997; 273: 425-432.

Baszczuk A., Kopczyński Z., Thielemann A. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze z hiperhomocysteinemią. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 91-100.

Belowski J., Wojcicka G., Marciniak A., Jamroz A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci* 2004; 74:2987-3000.

Berg A.H., Combs T.P., Du X., i wsp. The adipocytokine created protein Acrp 30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947-953.

Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A. Jr, i wsp. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243: 1160-1165.

Biernat J., Wyka J. Stan odżywienia w aspekcie stanu zdrowia. *Nowiny Lekarskie* 2011; 80: 209–212.

Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 1: 3–10.

Bottner A., Kratzsch J., Muller G. i wsp. Gender Differences of Adiponectin Levels Develop during the Progression of Puberty and Are Related to Serum Androgen Levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89: 4053-4061.

Branca F., Nikogosian H., Lobstein T., I wsp. The challenge of obesity in the WHO European region and the strategies for response: Summary. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe. 2007.

Brant L.C.C., Wang N., Ojeda F.M. i wsp. Relations of Metabolically Healthy and Unhealthy Obesity to Digital Vascular Function in Three Community-Based Cohorts: A Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6: 1-9.

Brennan R.O. *Nutrigenetics: New Concepts for Relieving Hyperglycemia*. New York, Signet, 1975.

Brevetti G., Schiano V., Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis* 2008; 197: 1-11.

Brook R.D., Bard R.L, Glazewski L. i wsp. Effect of short-term weight loss on the metabolic syndrome and conduit vascular endothelial function in overweight adults. *Am J Cardiol* 2004; 93:1012-1016.



Boerma M., Burton G.R., Wang J. i wsp. Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17:173-18.

Bolanowski M., Zadrozna-Śliwka B. i wsp. Badanie składu ciała – metody i możliwości zastosowania w zaburzeniach hormonalnych. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2005; 1: 920-925.

Bornstein S.R., Abu-Asab M., Glasow A., Páth G. i wsp. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 2000; 49: 532–538.

Bottner A., Kratzsch J., Muller G., i wsp. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4053-4061.

Brevetti G., Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: A key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis* 2008; 197: 1–11.

Caballero A.E., Delgado A., Aguilar-Salinas C.A. i wsp. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3943-3948.

Cai J.J., Hong Y., Weng C. i wsp. Androgen stimulates endothelial cell proliferation via an androgen receptor/VEGF/cyclin A-mediated mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300: 1210–1221.

Cai J.J., Wen J., Jiang W-H. i wsp. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. *J Geriatr Cardiol.* 2016; 13: 183–196.

Cannell J.J., Hollis B.W. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern. Med. Rev* 2008; 13: 6–20.

Cao H. Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. *J Endocrinol* 2014; 220: 47–59.

Capel F., Klimčáková E., Viguerie N. i wsp. Macrophages and Adipocytes in Human Obesity. *Diabetes* 2009; 58: 1558-1567.

Chen Y.H., Xu X., Sheng M.J. i wsp. Effects of asymmetric dimethylarginine on bovine retinal capillary endothelial cell proliferation, reactive oxygen species production, permeability, intercellular adhesion molecule-1, and occludin expression. *Mol Vis* 2011; 17: 332-340.

Chłopicki S. Śródbłonek w farmakoterapii atherothrombosis. *Kardiol Pol* 2003; 59: 69.

Chłopicki S. Zapalenie śródbłonka w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 77–88.

Cines D., Pollak E.S., Buck C.A. i wsp. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *The Journal of The American Society of Hematology* 1998; 91: 3527-3561.

Colman R.J., Anderson R.M., Johnson S.C. i wsp. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-204.

Cooper D., Stokes K.Y., Taylor A., Granger D.N. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2002; 2:165-180.

Crujeiras A.B., Parra D., Milagro F.I. i wsp. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS*. 2008; 12: 251-61.

Csiszar A., Labinsky N., Jimenez R. i wsp. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 518-527.

Csiszar A., Sosnowska D., Tucsek Z. i wsp. Circulating factors induced by caloric restriction in the nonhuman primate *Macaca mulatta* activate angiogenic processes in endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 235-249.

Cullberg K.B., Christiansen T., Paulsen S.K. i wsp. Effect of weight loss and exercise on angiogenic factors in the circulation and in adipose tissue in obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21:454-460.

Davis N.J., Crandall J.P., Gajavelli S. I wsp. Differential effects of low-carbohydrate and low-fat diets on inflammation and endothelial function in diabetes. *J Diabetes Complications* 2011; 25:371-376.

de Cabo R., Furer-Galban S., Anson R.M. i wsp. An in vitro model of caloric restriction. *Exp Gerontol* 2003; 38:631-639.

de Souza Batista C.M., Yang R.Z., Lee M.J. i wsp. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 2007; 56: 1655–1661.

Ding Y., Vaziri N.D., Coulson R., i wsp. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: 11-17.

Doupis J., Rahangdale S., Gnardellis C. i wsp. Effects of diabetes and obesity on vascular reactivity, inflammatory cytokines, and growth factors. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 729-735.

Dubrovskaja G., Verlohren S., Luft F.C. i wsp. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 1107-1113.

Dvorak H.F., Detmar M., Claffey K.P., Nagy J.A. i wsp. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol* 1995; 107: 233-235.

Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:3734-3737.

Egert S., Baxheinrich A., Lee-Barkey Y.H. i wsp. Effects of an energy-restricted diet rich in plant-derived alpha-linolenic acid on systemic inflammation and endothelial function in overweight-to-obese patients with metabolic syndrome traits. *Br J Nutr* 2014; 112:1315-1322.

Ellsworth D.L., Mamula K.A., Blackburn H.L. i wsp. Importance of substantial weight loss for altering gene expression during cardiovascular lifestyle modification. *Obesity (Silver Spring)* 2015; 23:1312-1319.

Elluru S.R., van Huyen J-P. D., Delignat S. Antiangiogenic Properties of *Viscum Album* Extracts Are Associated with Endothelial Cytotoxicity. *Anticancer Research* 2009; 29: 2945-2950.

Engeli S., Janke J., Gorzelniak K. i wsp. Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res* 2004; 45:1640-1648.

Esteghamati A., Mousavizadeh M., Noshad S. i wsp. Gender-dependent effects of metformin on vaspin and adiponectin in type 2 diabetes patients: a randomized clinical trial. *Horm Metab Res* 2013; 45: 319-325.

Fadini G.P., Miorin M., Facco M., i wsp. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1449-1457.

Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 326-330.

Faraj M., Lu H.L., Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol* 2004; 1: 170–190.

Fard A., Tuck C.H., Donis J.A. i wsp. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 2039-2044.

Farooqi S., O’Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr. Rev* 2006; 27: 710–718.

Ferrannini E., Natali A., Bell P. i wsp. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest* 1997; 2: 1166–73.

Ferrara N., Henzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989; 161: 851-858.

Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev* 1997; 18: 4-25 (A).

Ferrara N., Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 1997; 79: 209-232 (B).

Finucane F. M., Luan J., Wareham N. J. i wsp. Correlation of the leptin: adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* 2009; 52: 2345–2349.

Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition. *EXS* 1997; 79:1-8.

Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Four Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell* 2008; 7: 681-687.

Frontczak-Baniewicz M., Walski M. Mózgowe naczynia kapilarne. Ultrastrukturalne wykładniki procesu angiogenezy. *Post Biol Kom* 2004; 31: 563–573.

Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 1999; 48: 903-908.

Fujioka K., Apovian C.M., Hill J.O. The evolution of obesity therapies: new application of obesity therapies: new application for existing drugs. *Medscape CME Diabetes & Endocrinology* <http://cme.medscape.com/wievaricle/722366>.

Fujiwara N., Osanai T., Kamada T. i wsp. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 2000; 101: 856-861.

Gadina M., Hilton D., Johnson J.A., i wsp. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 363-373.

Gogga P., Karbowska J., Meissner W., Kochan Z. Rola leptyny w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65: 255-262.

Golan E., Tal B., Dror Y. i wsp. Reduction in resting metabolic rate and ratio of plasma leptin to urinary nitric oxide: influence on obesity-related hypertension. *Isr Med Assoc J* 2002; 4:426-430.

Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., i wsp. Cytokiny. *Immunologia*. Warszawa, WydNauk PWN 2002; 15: 198-205.

Gonzalez F.J., Quesada A.R., Sevilla I. i wsp. Prognostic value of serum angiogenic activity in colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med* 2007; 11:120-128.

Goodpaster B.H., Thaete F.L., Simoneau J.A. i wsp. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 1997; 10: 1579–1585.

Gryglewski R.J., Uracz W., Chłopicki S., Marcinkiewicz E. Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr Pathol Mol Med* 2002; 21: 279-290.

Haffner S., Temprosa M., Crandall J., i wsp. Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2005;54: 1566-1572.

Hamdy O., Ledbury S., Mullooly C., i wsp. Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 2003; 26: 2119-2125.

Hamilton S.J., Chew G.T., Watts G.F. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes And Vascular Disease Research* 2007; 4: 89-102.

Hankey C.R., Lean M.E., Lowe G.D. i wsp. Effects of moderate weight loss on anginal symptoms and indices of coagulation and fibrinolysis in overweight patients with angina pectoris. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 1039-1045.

Hanzu F.A., Palomo M., Kalko S.G. i wsp. Translational evidence of endothelial damage in obese individuals: inflammatory and prothrombotic responses. *J Thromb Haemost* 2011; 9:1236-1245.

Hellstrom L., Wahrenberg H., Hruska K., i wsp. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J Intern Med* 2000; 247:457-462.

Hietaniemi M., Jokela M., Rantala M. i wsp. The effect of a short-term hypocaloric diet on liver gene expression and metabolic risk factors in obese women. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2009; 19, 177-183.

Higami Y., Barger J.L, Page G.P wsp. Energy Restriction Lowers the Expression of Genes Linked to Inflammation, the Cytoskeleton, the Extracellular Matrix, and Angiogenesis in Mouse Adipose Tissue. *J. Nutr* 2006; 136: 343–352.

Higazi A.A., Mazar A., Wang J. i wsp. Single-chain urokinase-type plasminogen activator bound to its receptor is relatively resistant to plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1996; 1;87:3545-3549.

Hopkins T.A., Ouchi N., Shibata R., I wsp. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 11-18.

Hursting S.D., Dunlap S.M., Ford N.A. i wsp. Calorie restriction and cancer prevention: a mechanistic perspective. *Cancer Metab* 2013; 7: 10-17.

Jakubowska-Pietkiewicz E., Prochowska A., Fendler W., Szadkowska A. Comparison of body fat measurement methods in children. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2009; 15: 246-250.

James W.P.T. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 2008; 263: 336-352.

Janssens S., Flaherty D, Nong Z. i wsp. Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Transfer Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation After Balloon Injury in Rats. *Circulation* 1998; 97: 1274-1281.

Jasińska A., Pietruczuk M. Adipocytokiny – białka o wielokierunkowym działaniu. *Journal of Laboratory Diagnostics* 2010; 46: 331-338.



Joris PJ, Zeegers MP, Mensink RP Weight loss improves fasting flow-mediated vasodilation in adults: A meta-analysis of intervention studies. *Atherosclerosis* 2014; 239: 21-30.

Jung R.T. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997; 53: 307–21.

Karbowska A., Boratyńska M, Klinger M. Rezystyna – czynnik patogenetyczny czy biomarker zaburzeń metabolicznych i zapalenia? *Postepy Hig Med Dosw* 2009; 63: 485-491.

Karbowska J., Warczak E., Kochan Z. Polimorfizm genu i zaburzenia funkcjonalne adiponektyny jako jedna z przyczyn rozwoju oporności na insulinę. *Postepy Hig Med Dosw* 2004; 58: 449-457.

Kawecka-Jaszcz K., Tendera M., Czarnecka D. i wsp. *Cukrzyca i serce*. Warszawa, Via Medica 2004; 1-19.

Kelley D.E., Thaete F.L., Troost F. i wsp. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 5: 941–948.

Keaney J.F., Guo Y., Cunningham D. i wsp. Vascular incorporation of alpha-tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J Clin Invest* 1996; 98: 386–394.

Ketonen J., Pilvi T., Mervaala E. Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. *Heart Vessels* 2010; 25:254–262.

Khazaei M., Moien-afshari F., Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology* 2008; 15: 49–67.

Kip K.E., Marroquin O.C., Kelley D.E. i wsp. Clinical Importance of Obesity Versus the Metabolic Syndrome in Cardiovascular Risk in Women A Report From the

Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study. *Circulation* 2004; 109:706-713.

Kissebah A.H., Vydellingum N., Murray R. i wsp. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 2: 254–60.

Kłosiewicz-Latoszek L. Otyłość jako problem społeczny, zdrowotny i leczniczy. *Probl Hig Epidemiol* 2010; 3: 339-343.

Kochan Z. Regulacja wydzielniczej i metabolicznej funkcji tkanki tłuszczowej podczas wielokrotnego głodzenia i karmienia. Rozprawa habilitacyjna. *Ann. Acad. Med. Gedan* 2009; 39: 1–108.

Kolterman O.G., Insel J., Saekow M. i wsp.. Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *J Clin Invest* 1980; 6: 1272–84.

Konukoglu D., Serin O., Turhan M.S. Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. *Arch Med Res* 2006; 37: 602-606.

Krzyżanowska K., Mittermayer F., Kopp H-P i wsp. Weight Loss Reduces Circulating Asymmetrical Dimethylarginine Concentrations in Morbidly Obese Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89: 6277– 6281.

Książek K, Witowski J. Zaburzenia działania insuliny a starzenie człowieka. *Postępy Hig Med Dosw* 2008; 62: 263-271.

Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1991; 88: 4651-4655.

Kuczmarski RJ, Flegal KM. Criteria for definition of overweight in transition. *Am J Clin Nutri* 2000; 72: 1074-1081.

Koczy-Baron E., Kasperska-Zajac A. Rola naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w procesach zapalnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 57-65.

Komiya H., Masubuchi Y., et al. The validity of body mass index criteria in obese school-aged children. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214: 27-37.

Korybalska K., Swora-Cwynar E., Łuczak J., Kanikowska A., Czepulis N., Rutkowski R., Bręborowicz A., Grzymisławski M., Witowski J. Association of endothelial proliferation with the magnitude of weight loss during calorie restriction. *Angiogenesis* 2016; 19: 407–419.

Kyrou I., Chrousos G.P., Tsigos C. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann. NY Acad. Sci* 2006; 1083: 77–110.

Lagunova Z., Porojnicu A.C., Lindberg F., Hexeberg S., Moan J. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res* 2009; 29: 3713-3720.

Lamanna C., Monami M., Marchionni N., Mannucci E. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 221-228.

Lau D.C., Teoh H. Impact of current and emerging glucose-lowering drugs on body weight in type 2 diabetes. *Can J Diabetes* 2015; 39: 148-154.

Lee M.J., Wang Y., Ricci M.R., Sullivan S. i wsp. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 2007; 292: 858–864.

Lefevre M., Redman L.M., Heilbronn L.K., i wsp. Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals. *Atherosclerosis* 2009; 203:206-213.

Lembo G., Vecchione C., Fratta L. i wsp. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 2000; 49: 293-297.

Lohn M., Dubrovská G., Lauterbach B. i wsp. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 2002; 16: 1057–1063.

Loomans C.J., Van Haperen R., Van Zonneveld A.J. Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol Med* 2009; 15: 152-159.

Lopez-Jimenez F., Cortes-Bergoderi M. Obesity and the Heart. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 140-149.

Rey-López J. P., de Rezende L. F., Pastor-Valero M. Tess B.H. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systematic review and critical evaluation of the definitions used. *Obesity Reviews* 2014; 15: 781–790.

Lyon J., Law R.E., Hsueh W.A. Adiposity, Inflammation and Atherogenesis. *Endocrinology* 2003; 144: 2196-2200.

Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M. Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL-6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117: 247-251.

Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; 21: 323-329.

Malinowski M., Deja M.A., Gołba K.S., Janusiewicz P. i wsp. Wpływ okolonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcję naczyń. *Kardiologia Polska* 2008; 10: 317-325.

Mattson M.P., Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 2005; 16:129-137.

Mazur-Roszak M., Litwiniuk M., Grodecka-Gazdecka S. Otyłość a rak piersi. *Współczesna Onkologia* 2010; 4: 270-275.

Meier U., Gressner A.M. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-1525.

Meijer R.I., Serne E.H., Smulders Y.M. Perivascular Adipose Tissue and Its Role in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 211-217.

McGill A.T., Stewart J.M., Lithander F.E., Strik C.M., Poppitt S.D. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutr J* 2008; 7 4.

Molica F., Morel S., Kwak .BR. I wsp. Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2015; 113: 553-566.

Moller D.E., Kaufman K.D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 2005; 56: 45–62.

Mombouli J.V., Illiano S., Nagao T. i wsp. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992; 71: 137-144.

Morales D.E., McGowan K.A., Grant D.S. i wsp. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 1995; 91: 755-763.

Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

Mraz M., Lacinova Z., Drapalova J. i wsp. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:E606-13. doi: 10.1210/jc.2010-1858.

Mueller W.M., Gregoire F.M., Stanhope K.L., Mobbs C.V. i wsp. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 551–558.

Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z. VEGF jako czynnik angiogeny, neurotrofi czny i neuroprotekcynj. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 573-583.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.

Nguyen T., Lau D. The obesity epidemic and its impact on hypertension. *Can J Cardiol* 2012; 28: 326-333.

Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W. Tkanka tłuszczowa a układ odpornościowy. *Alergia Astma Immunologia* 2009; 2: 101-105.

Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J., Kubica J. Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonna — krótkie spojrzenie na złożony problem. *Folia Cardiologica Excerpta* 2011; 6: 109–116.

Ogorodnikova A.D., Kim M., McGinn A.P. i wsp. Incident Cardiovascular Disease Events in Metabolically Benign Obese Individuals. *Obesity* 2012; 20: 651–659.

Olczyk-Wrochna K., Wisłowska M. Adiponektyna w reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Reumatologia* 2008; 46, 4: 245–247.

Olszanecka-Glinianowicz M., Kocełak P., Orlik B. Nowe adipokiny – korzystne czy niekorzystne w aspekcie patogenezy insulinooporności? *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2009; 5: 236–244.

Oster W., Lindemann A., Horn S. i wsp. Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha but not TNF-beta Induces Secretion of Colony Stimulating Factor for Macrophages (CSF-1) by Human Monocytes. *Blood* 1987; 70: 1700-1703.

Ostlund R.E. Jr, Yang J.W., Klein S., Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 3909-3913.

Ostrowska L. Leczenie dietetyczne otyłości — wskazówki dla lekarzy praktyków. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2010. 1: 22–30.

Pagano C., Pilon C., Olivieri M. i wsp. Reduced plasma visfatin/pre-B cellcolony-enhancing factor in obesity is not regulated to insulin resistance in humans. *J of Clin Endocrinology and Metabolism* 2006; 91: 3165-3170.

Palatka K., Serfozo Z., Vereb Z. i wsp. Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1730-1738.

Paprocka M., Duś D. Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonków naczyniowych. *Post Biol Kom* 2000; 27: 247-260.

Park E., Shin M.J., Chung N. The associations between serum leptin, adiponectin and intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic patients. *Nutr Res Pract* 2007; 1:65-69.

Pearson J.D. Endothelial progenitor cells - an evolving story. *Microvasc Res* 2010; 79: 162-168.

Peelman F., Waelput W., Iserentant H. i wsp. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune disease. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 283-301.

Peeters A., Barendregt J.J., Willekens F. i wsp. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* 2003; 138: 24-32.

Porreca E., Di F.C., Fusco L. i wsp. Soluble thrombomodulin and vascular adhesion molecule-1 are associated to leptin plasma levels in obese women. *Atherosclerosis* 2004; 172:175-180.

Pouliot M.C., Despres J.P., Nadeau A. i wsp. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 1992; 7: 826–34.

Pratley R.E., Ren K., Milner M.R., Sell S.M. Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans. *Mol. Genet. Metab* 2000; 70: 19–26.

Przybylska D., Kurowska M., Przybylski P. Otyłość i nadwaga w populacji rozwojowej. *Hygeia Public Health* 2012; 47: 28-34.

Pyda M. Ocena wpływu wybranych czynników reakcji zapalnej na rokowania u chorych z zawałem serca leczonych pierwotną angioplastyką wieńcową. Rozprawa habilitacyjna, Ośrodek Wydawnictw Naukowych Poznań 2007.

Pyda M., Korybalska K., Grajek S. i wsp. Endothelial cell growth response to stimulation with serum from patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2012; 159: 235-237.

Raghow R., Yellaturu C., Deng X., Park E.A., Elam M.B. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab* 2008; 19: 65–73.



Raitakari M., Ilvonen T., Ahotupa M. i wsp. Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:124-128.

Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J. i wsp. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci* 2013; 9: 1057-1069.

Raport GUS "Stan zdrowia ludności w 2009"

Rasouli N., Kern F.A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 64-73.

Reilly M.P., Lehrke M., Wolfe M.L. Resistin is inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005; 22: 932-939.

Renehan A.G., Zwahlen M., Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 484-498.

Ritchie S.A., Ewart M.A., Perry C.G. i wsp. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 519-532.

Roberts C.K., Won D., Pruthi S. i wsp. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 249-259.

Rohde E., Malischnik C., Thaler D., i wsp. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 2006; 24: 357-367.

Rolland C., Hession M., Broom I. Effect of weight loss on adipokine levels in obese patients. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2011; 4: 315–323.

Ronti T., Lupattelli G., Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 355-365.

Rosen E.D, Spiegelman B.M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 2014; 156: 20–44.

Rosenbaum M., Nicolson M., Hirsch J., Heymsfield S.B. i wsp. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1996; 81: 3424–3427.

Ruetenik A., Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1847: 1434-1447.

Sachais B.S. Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3: 412-416.

Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med* 2008; 121: 149-157.

Saremi A., Asghari M., Ghorbani A. Effects of aerobic training on serum omentin-1 and cardiometabolic risk factors in overweight and obese men. *J Sports Sci* 2010; 28: 993-998.

Sarkar R., Meinberg E.G., Stanley J.C. i wsp. Nitric Oxide Reversibly Inhibits the Migration of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 1996; 78: 225-230.

Sasaki S., Higashi Y., Nakagawa K. i wsp. A Low-Calorie Diet Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Obese Patients With Essential Hypertension. *AJH* 2002; 15: 302–309.

Sawicki W., Malejczyk J. *Histologia*. PZWL 2012.

Schafer K., Halle M., Goeschen C. i wsp. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 112-117.

Schwalm S., Pfeilschifter J., Huwiler A. Sphingosine kinase 1 is critically involved in nitric oxide-mediated human endothelial cell migration and tube formation. *British Journal of Pharmacology* 2010; 160: 1641–1651.

Segal M.S., Shah R., Afzal A., i wsp. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 102-109.

Senger D.R., Van de Water L., Brown L.F., Nagy J.A. i wsp. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-324.

Siemieńska L. Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych. *Endokrynologia Polska* 2007; vol. 58; 4: 330-342.

Shimokata H., Tobin J.D., Muller D.C. i wsp. Studies in the Distribution of Body Fat: I. Effects of Age, Sex, and Obesity. *Journal of Gerontology* 1989; 44: 66-73.

Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 266-274.

Sitia S., Tomasoni L., Atzeni F., Ambrosio G. i wsp. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun* 2010; Rev 9: 830-834.

Skowrońska B., Fichna M., Fichna P. Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2005; 3: 21-29.

Slieker L.J., Sloop K.W., Surface P.L., Kriauciunas A. i wsp. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem* 1996; 271: 5301–5304.

Souza Batista C.M., Yang R-Z., Lee M-J i wsp. Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. *DIABETES* 2007; 56: 1655- 1661.

Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 2009; 78: 539–552.

Stachowiak G., Stetkiewicz T., Połać I., Sobczuk A. i wsp. Rola E-selektyny w procesach zapalnych i aterogennych – wpływ terapii hormonalnej okresu menopauzy. *Przegląd Menopauzalny* 2006; 3: 153–158.

Stachowicz M., Janas-Kozik M., Olszanecka-Glinianowicz M., Chudek J. Rola leptyny w zaburzeniach odżywiania się – współczesne poglądy. *Psychiatr. Pol* 2013; 47: 897–907.

Steinberg H.O., Chaker H., Leaming R. i wsp. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 97: 2601-2610.

Stępień E., Targosz-Korecka M. Mikrocząstki w regulacji funkcji śródbłonna. *Postępy biochemii* 2013; 59: 395-404.

Stenholm S, Harris TB, Rantanen T i wsp. Sarcopenic obesity - definition, etiology and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 693–700.

Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. i wsp. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* 2005; 102: 15545–15550.

Sansbury B.E., Hill B.G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 383-399.

Szopa M., Skupień J. Omentyna — nowa adipokina w kontekście założeń nowej definicji zespołu metabolicznego. *Diabetologia Praktyczna* 2007; 8: 35–39.

Thomson R.L., Brinkworth G.D., Noakes M., i wsp. The effect of diet and exercise on markers of endothelial function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2012; 27: 2169-2176.

Tinahones F.J., Coin-Araguez L., Mayas M.D., i wsp. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol* 2012; 12: 4.

Tsigos C., Hainer V., Basdevant A., Finer N. I wsp. Postępowanie w otyłości dorosłych: europejskie wytyczne dla praktyki klinicznej. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2009; Tom 5, nr 3.

Todd M.K., Yaspelkis B.B. 3rd, Turcotte L.P. Short-term leptin treatment increases fatty acids uptake and oxidation in muscle of high fat-fed rats. *Metabolism* 2005; 54: 1218–1224.

Tomczyk M., Nowak W., Jaźwa A. Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Postępy Biochemii* 2013; 59: 357-364.

Torres M.R., Sanjuliani A.F. Effects of weight loss from a high-calcium energy-reduced diet on biomarkers of inflammatory stress, fibrinolysis, and endothelial function in obese subjects. *Nutrition* 2013; 29:143-151.

Toth M.J., Tchernof A., Sites C.K., Poehlman E.T. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 904: 502–506.

Trojan P., Janik M., Przybyło M. Śródbłonek — niedoceniany organ. budowa i rola w procesach fizjologicznych. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych* 2014; 63: 555-568.

Ungvari Z, Parrado-Fernandez C, Csiszar A, de Cabo R. Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circ Res* 2008; 102: 519-528.

Urbanová M. , Dostálová I. , Trachta P. i wsp. Serum Concentrations and Subcutaneous Adipose Tissue mRNA Expression of Omentin in Morbid Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: the Effect of Very-Low-Calorie Diet, Physical Activity and Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Physiol. Res.* 2014; 63: 207-218.

Wallace T.M., Levy J.C., Matthews D.R. Use and Abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004, 27, 1487

Walski M., Frontczak-Baniewicz M. Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłonka naczyń krwionośnych. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007; 117 (Supl.).

Wcisło G., Korniluk J., Szarlej-Wcisło K., Pawlak W.Z., i wsp. Leczenie chorób nowotworowych czynnikiem martwicy nowotworów – alfa (TNF-alfa). *Współczesna Onkologia* 2002; 4: 222–227.

World Health Organization Global database on body mass index (BMI). Dane dostępne na stronie Geneva, World Health Organization, 2006 (<http://www.who.int/bmi>, accessed 17 April 2008).

World Health Organization Dane dostępne na stronie [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/) November 15, 2015.

Widlansky M.E., Gokce N., Keaney J.F., Vita J.A. The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 42: 1149-60.

Wycherley T.P., Brinkworth G.D., Noakes M. i wsp. Effect of caloric restriction with and without exercise training on oxidative stress and endothelial function in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 1062-1073.

Vallance P., Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-1030.

Vandekeere S., Dewerchin M., Carmeliet P. Angiogenesis revisited: an overlooked role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Microcirculation* 2015; 22: 509-517.

Vansaun M.N. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1926-1932.

Vazquez L.A., Pazos F., Berrazueta J.R., i wsp. Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 316-322.

Vecchione C., Maffei A., Colella S. I wsp. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 2002; 51: 168-173.

Viguerie N., Poitou C., R. Canello R. Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction. *Biochimie* 2005; 87: 117–123.

Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J i wsp. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci(Lond)* 2012; 122: 253-270.

Yamagishi S., Amano S., Inagaki Y. i wsp. Pigment epithelium-derived factor inhibits leptin-induced angiogenesis by suppressing vascular endothelial growth factor gene expression through anti-oxidative properties. *Microvasc Res* 2003; 65: 186-190.

Yamawaki H., Tsubaki N., Mukohda M i wsp. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 393: 668–672.

Yudkin J.S., Kumari M., Humphries S.E., i wsp. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148: 209-214.

Zhang G-H., Qin R., Zhang S-H., Zhu H. Effects of vascular endothelial growth factor B on proliferation and migration in EA.Hy926 cells. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 779–785.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M. i wsp.. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425–432.

Zhong X., Li X., Liu F. i wsp. Omentin inhibits TNF-  $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 425: 401-406.

Ziccardi P., Nappo F., Giugliano G., i wsp. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002; 105: 804-809.

Zubkiewicz-Kucharska A., Chrzanowska J., Nocoń-Bohusz J., Noczyńska A. Badania zaburzeń czynności śródbłonna i procesów zapalnych u otyłych nastolatków z zespołem metabolicznym. *Endokrynologia Pediatria* 2012; 11: 38.