

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNJE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nika KRIVEC

**VPLIV HIPOKSIJE NA IZRAŽANJE MEMBRANSKIH
TRANSPORTERJEV IN ADIPOKINOV V ČLOVEŠKIH
PREADIPOCITIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNJE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Nika KRIVEC

**VPLIV HIPOKSIJE NA IZRAŽANJE MEMBRANSKIH
TRANSPORTERJEV IN ADIPOKINOV V ČLOVEŠKIH
PREADIPOCITIH**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**EFFECT OF HYPOXIA ON THE EXPRESSION OF MEMBRANE
TRANSPORTERS AND ADIPOKINES IN HUMAN PREADIPOCYTES**

M.Sc. THESIS
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je nastalo kot zaključek drugostopenjskega bolonjskega študija Struktura in funkcionalna biologija MSc v okviru oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del je bil v celoti izveden v laboratoriju podjetja Celica d.o.o., ki deluje v okviru Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Magistrsko delo je bilo prvič odobreno na seji senata, dne 6. 2. 2013. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Helena Haque Chowdhury, za somentorja akad. prof. dr. Robert Zorec in za recenzenta prof. dr. Marko Kreft. Veljavnost teme je bila podaljšana, njen naslov pa spremenjen s sklepom senata, dne 20. 5. 2015.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Helena HAQUE CHOWDHURY

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Somentor: akad. prof. dr. Robert ZOREC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Recenzent: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 22. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nika KRIVEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 6:616:577(043.2)=163.6
KG	humanı preadipociti/hipoksija/debelost/adipokini/presnova/vnetje
AV	KRIVEC, Nika, dipl. biol. (UN)
SA	HAQUE CHOWDHURY, Helena (mentorica)/ ZOREC, Robert (somentor)/ KREFT Marko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	VPLIV HIPOKSIJE NA IZRAŽANJE MEMBRANSKIH TRANSPORTERJEV IN ADIPOKINOV V HUMANIH PREADIPOCITIH
TD	Magistrsko delo (Univerzitetni študij 2. stopnja - Strukturalna in funkcionalna biologija)
OP	XI, 46 str., 4 sl., 83 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Hipoksija maščevja kot posledica debelosti vpliva na presnovo celic maščevja; preko sprememb v izločanju signalnih molekul (adipokinov) pa vodi v nastanek lokalnega vnetja. Vpliv hipoksije na preadipocyte je slabo poznan. Preverjali smo vpliv umetno vzpostavljene hipoksije na izražanje glukoznega prenašalca GLUT1, monokarboksilatnega prenašalca MCT4 ter adipokinov TNF- α in IL-6 v humanih preadipocitih. Celice smo 24 h gojili v razmerah normoksijske (18 % O ₂) in v razmerah hipoksije (1 % O ₂), nato pa smo jih imunocitokemično označili za omenjene proteine. Z uporabo konfokalnega mikroskopa smo neposredno prikazali izražanje proteinov na ravni posamezne celice. Raven GLUT1 se je v hipoksiji povišala za faktor 2,1, MCT4 za 3, IL-6 za 1,8, raven TNF- α pa znižala za faktor 1,5. Tako smo potrdili hipotezo o spremembah ravni izbranih proteinov pod vplivom hipoksije. Za GLUT1, MCT4 in IL-6 smo potrdili tudi pričakovanja o zvišanju ravni proteinov v odziv na hipoksijo, ovrgli pa smo pričakovanja o zvišanju ravni TNF- α . Rezultati kažejo na spremenjeno presnovo glukoze in na možen zmanjšan odziv preadipocitov na hipoksijo v primerjavi z adipociti. Rezultat označevanja celic za TNF- α je lahko posledica <i>in vitro</i> razmer, eksperimentalnih pogojev ali pa dejstva, da smo z imunocitokemijo zaznali le znotrajcelični delež proteina.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Du2
DC	UDK 6:616:577(043.2)=163.6
CX	human preadipocytes/hypoxia/adipokines/metabolism/inflammation
AU	KRIVEC, Nika
AA	HAQUE CHOWDHURY, Helena (supervisor)/ ZOREC, Robert (co-supervisor)/ KREFT, Marko (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Structural and Functional Biology
PY	2015
TI	EFFECT OF HYPOXIA ON THE EXPRESSION OF MEMBRANE TRANSPORTERS AND ADIPOKINES IN HUMAN PREADIPOCYTES
DT	M.Sc. Thesis (Master Study Programmes – Structural and Functional Biology)
NO	XI, 46 p., 4 fig., 83 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Adipose tissue hypoxia is a consequence of obesity that affects both metabolism and adipokine secretion of fat tissue cells, the latter resulting in local inflammation. We tested the effect of <i>in vitro</i> hypoxia on the expression of glucose transporter GLUT1, monocarboxilate transporter MCT4 and adipokines TNF- α and IL-6 in human preadipocytes. Cells were maintained under normoxic (18 % O ₂) and hypoxic (1 % O ₂) conditions for 24 h, followed by immunocytochemical labelling. Using confocal microscopy, we were able to visualize the expression of proteins on the cellular level. There was a 2.1-fold increase in GLUT1 level, 3-fold in MCT4 level, 1.8-fold in IL-6 level and a 1.5-fold decrease in TNF- α level. Our results confirm that levels of chosen proteins change in hypoxic conditions and that levels of GLUT1, MCT and IL-6 increase. The hypothesis that TNF- α level increases was rejected. Results show that glucose metabolism is modified in hypoxia. The response of preadipocytes compared with adipocytes may be smaller in scale. The unexpected values for TNF- α may be a consequence of <i>in vitro</i> or experimental conditions. They could also reflect the fact that by using immunocytochemistry we were only able to detect the intracellular portion of the protein.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	VIII
SLOVARČEK.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MAŠCOBNO TKIVO	3
2.1.1 Maščobno tkivo pri različnih živalskih skupinah.....	3
2.1.2 Belo maščobno tkivo.....	3
2.2 DEBELOST IN HIPOKSIJA MAŠCOBNEGA TKIVA	5
2.2.1 Debelost pri človeku	5
2.2.2 Hipoksija kot posledica debelosti	5
2.2.3 Dokazi za hipoksijo maščevja kot posledico debelosti pri miših in ljudeh.....	5
2.3 PRESNOVA GLUKOZE PRI DEBELOSTI/ HIPOKSIJI	7
2.3.1 Splošno.....	7
2.3.2 Glukozni prenašalec 1 – GLUT1	7
2.3.3 Pomen laktata in monokarboksilatnega prenašalca 4 – MCT4	8
2.4 SEKRECIJSKA FUNKCIJA MAŠCOBNEGA TKIVA JE SPREMENJENA PRI DEBELOSTI	9
2.4.1 Adipokini	9
2.4.2 Izražanje adipokinov pri normalni hranjenosti in pri debelosti.....	10
2.4.3 Tumor nekrotizirajoči dejavnik α – TNF- α	11
2.4.4 Interlevkin 6 - IL-6	13
2.5 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 VZDRŽEVANJE, MNOŽITEV IN PRESADITEV HUMANIH PREADIPOCITOVS	16

3.1.1	Priprava in shranjevanje hranilnega medija za vzdrževanje humanih preadipocitov.....	16
3.1.2	Nasaditev in množitev celic	16
3.1.3	Presaditev celic.....	17
3.2	PRIPRAVA KROVNIKOV ZA NASADITEV HUMANIH PREADIPOCITOVS	17
3.3	INKUBACIJA HUMANIH PREADIPOCITOVS V HIPOKSIČNI KOMORI	17
3.4	IMUCITOKEMIČNO OZNAČEVANJE PROTEINOV	18
3.4.1	Postopek.....	18
3.4.2	Uporabljena protitelesa in redčitve.....	18
3.5	KONFOKALNI MIKROSKOP IN ANALIZA	19
3.5.1	Mikroskopiranje	19
3.5.2	Analiza	19
3.5.3	Statistična obdelava	20
4	REZULTATI.....	21
4.1	IMUNOCITOKEMIČNO OZNAČEVANJE.....	21
5	RAZPRAVA.....	31
6	SKLEPI.....	35
7	POVZETEK	36
8	VIRI	38

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Sl. 1: Izražanje GLUT1 v normoksiji in v hipoksiji.	23
Sl. 2: Izražanje MCT4 v normoksiji in v hipoksiji.	25
Sl. 3: Izražanje TNF- α v normoksiji in v hipoksiji.	27
Sl. 4: Izražanje IL-6 v normoksiji in v hipoksiji.	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3T3-L1,	celični liniji mišjih adipoznih celic
3T3-F442A	
BSA	angl. »bovine serum albumin«/ slov. goveji serumski albumin
C/EBP	angl. »CCAAT/enhancer-binding protein beta«
DMEM	angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«/ slov. Dulbeccov modificirani Eaglov medij
DMSO	dimetil sulfoksid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	angl. »Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay«/ slov. encimsko-imunski test
FBS	angl. »fetal bovine serum«/ fetalni goveji serum
GLP-1	angl. »glucagon-like peptide 1«/ slov. glukagonu podoben peptid 1
GLUT	angl. »glucose transporter«/ slov. glukozni prenosač
GS	angl. »goat serum«/ slov. kozji serum
HIF-1- α	angl. »hypoxia-inducible factor 1- α «
HPA	humani preadipociti
IL	interlevkin
IRS-1	inzulinski receptorski substrat 1
JAK-STAT	angl. »Janus kinase - signal transducer and activator of transcription«/ signalna pot JAK-STAT
MAPK	angl. »mitogen-activated protein kinase«/ slov. z mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MCT	angl. »monocarboxilate transporter«/ slov. monokarboksilatni prenosač
mRNA	angl. »messenger RNA«/ slov. informacijska RNA
NF- κ B	angl. »nuclear factor- κ B«/ slov. jedrni faktor- κ B
<i>ob/ob</i>	oznaka za gensko spremenjene miši, ki ne izražajo gena za hormon leptin in zato tekom življenja postanejo prekomerno debele
P	verjetnost, da rezultati niso statistično različni
PAI-1	angl. »plasminogen activator inhibitor-1«

PBS	angl. »phosphate-buffered saline«/ slov. fosfatni pufer
PLL	poli-L-lizin
pO ₂	parcialni tlak kisika
PPAR γ	angl. »peroxisome proliferator-activated receptor γ «/ jedrni receptor PPAR γ
qPCR	angl. »quantitative Polimerase Chain Reaction«/ slov. kvantitativna verižna reakcija s polimerazo)
RBP	angl. »retinol-binding protein«/ slov. retinol-vezavni protein
SGBS	Simpson-Golabi-Behmelov sindrom
TGF- β	angl. »transforming growth factor β «/ slov. transformirajoči rastni faktor β
TNF- α	angl. »tumor necrosis factor- α «/ slov. tumor-nekrotizirajoči faktor alfa
TNF-R1/ 2	membranska receptorja za TNF- α
VEGF	angl. »vascular endothelial growth factor«/ vaskularni endotelijski rastni faktor

SLOVARČEK

Adipocit	Maščobna celica, glavna celica v maščobnem tkivu, ki vrši glavne funkcije maščobnega tkiva, povezane s shranjevanjem in mobilizacijo energije v obliki maščob.
Adipokin	Molekula, ki jo izraža maščobno tkivo in preko katere komunicira z drugimi organi, kot so možgani, skeletne mišice in jetra; med adipokine spadajo hormoni, klasični citokini, vnetni dejavniki in drugi dejavniki homeostaze organizma.
Aerobna presnova	Presnova celice, ki poteka ob prisotnosti kisika.
Anaerobna presnova	Presnova celice, ki poteka ob odsotnosti kisika.
Belo maščobno tkivo	Eno izmed najobsežnejših sesalskih tkiv. Njegova glavna vloga je skladiščenje velikih količin energetskih zalog v obliki maščob, opravlja pa tudi funkcijo endokrinega sekretornega organa.
Debelost	Nenormalno ali prekomerno nalaganje maščob, ki predstavlja zdravstveno tveganje. Med prekomerno debele uvrščamo osebe z indeksom telesne mase (ITM; razmerje med maso in kvadratom telesne višine), večjim od 30.
Fibroblast	Celica, ki proizvaja zunajcelični matriks in kolagen.
Glikoliza	Začetni proces pri razgradnji glukoze v celicah, ki vodi v nastanek piruvata in je del tako aerobne (od kisika odvisne) kot anaerobne presnove glukoze v celicah.
Hiperplazija adipocitov	Rekrutacije novih maščobnih celic – diferenciacija novih preadipocitov v adipocyte.
Hipertrofija adipocitov	Povečanje volumna obstoječih adipocitov.
Hipoksija maščobnega tkiva	Zmanjšana oz. nenormalna preskrbljenost maščobnega tkiva s kisikom, ki nastane kot posledica debelosti in lahko vodi v zdravstvene zaplete, povezane z debelostjo.
Imunocitokemija	Metoda fluorescentnega označevanja celic s pomočjo specifičnih protiteles za tarčne proteine.

Inzulinska rezistenza	Zmanjšana občutljivost tkiv na stimulacijo z inzulinom.
Konfokalna mikroskopija	Tip fluorescentne svetlobne mikroskopije, ki s pomočjo dodatne odprtine (angl. »pinhole«) v goriščni ravnini izloči neizosten del svetlobe in na ta način omogoča visoko ločljivost mikroskopiranja.
Laktat	Produkt anaerobne glikolitske presnove v celicah, ki nastane iz piruvata.
Makrofag	Tip bele krvničke, ki zajame in prebavi različne delce (ostanke celic, tujke, mikrobe, rakave celice itd.), ki na svoji površini ne izražajo proteinov, specifičnih za zdrave celice.
Membranski prenašalec	Membranski protein, ki sodeluje pri prenosu ionov ter manjših in večjih molekul preko biološke membrane.
Membranski receptor	Membranski protein, ki skrbi za komunikacijo med celico in njeno okolico.
Pimonidazol hidroklorid	2-nitroimidazol; eksogeni označevalec znotrajcelične hipoksije, ki se v hipoksičnih celicah reduktivno aktivira in veže na tiolne skupine. Zaznavamo ga imunohistokemično.
Preadipocit	Prekurzorska celica, po morfologiji podobna fibroblastu, iz katere se razvije (diferencira) odrasel adipocit. Ta diferenciacija igra ključno vlogo pri nastanku debelosti.
Presnovni sindrom	Skupek okvar energijske presnove, ki prispevajo k razvoju kardiovaskularnih in sladkorne bolezni.
Protivnetni dejavnik	Molekula, ki zmanjšuje imunski odziv organizma.
Triglicerid	Ester glicerola in treh maščobnih kislin.
Vnetni dejavnik	Molekula, ki spodbuja imunski odziv organizma.

1 UVOD

Belo maščevje je sesalsko tkivo, katerega glavna vloga je skladiščenje velikih količin energetskih zalog v obliki trigliceridov, predstavlja pa tudi pomemben endokrini sekrecijski organ (Symonds, 2012). V zadnjem desetletju je k razumevanju njegovega delovanja prispevalo spoznanje, da se pri debelosti parcialni tlak kisika v maščobnem tkivu zmanjša (Ye in sod., 2007; Hosogai in sod., 2007; Pasarica in sod., 2008; Sun in sod., 2013). Hipoksično stanje po eni strani povzroči spremembe v sami presnovi celic, po drugi strani pa vodi v spremenjeno izražanje citokinov in drugih molekul, ki so del endokrine funkcije maščobnega tkiva. Slednje je povezano z nastankom kroničnega vnetja v maščobnem tkivu in sčasoma lahko vodi v razvoj bolezenskih stanj, kot sta sladkorna bolezen tipa 2 in presnovni sindrom (skupek okvar energijske presnove, ki prispevajo k razvoju kardiovaskularnih in sladkorne bolezni). Adipociti kot najbolj značilne celice maščobnega tkiva večinoma igrajo osrednjo vlogo v raziskavah debelosti, čeprav nekatere študije kažejo, da so tudi njihovi prekurzorji - preadipociti sposobni precejšnjega vnetnega odziva. Študija Chung in sod. (2006) poroča o večjem vnetnem odzivu nemaščobne frakcije (sestavljene v glavnem iz preadipocitov) v primerjavi z maščobno frakcijo tkiva po stimulaciji z lipopolisaharidom (endotoksin v celičnih membranah Gram-negativnih bakterij, ki povzroči močan vnetni odziv). V omenjeni študiji navajajo tudi, da vnetni citokini in kemokini iz preadipocitov pripomorejo k razvoju inzulinske odpornosti v humanih adipocitih. Raziskava Mack in sod. (2009) pa kaže na večji odziv humanih preadipocitov v kulturi v primerjavi z adipociti po stimulaciji s hipoksijo in vnetnim dejavnikom TNF α .

Posledice prekomerne telesne mase in zmanjšane oksigenacije maščobnega tkiva pri preadipocitih so do danes slabo raziskane in odprtih je še veliko vprašanj. V magistrskem delu smo preverjali, kako se spremeni izražanje izbranih proteinov v humanih preadipocitih v kulturi v razmerah umetno vzpostavljene hipoksije. Pri raziskavah smo uporabili hipoksično komoro ter metode imunocitokemičnega označevanja in konfokalne mikroskopije. Spremljali smo adipokina tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α ; angl. »tumor necrosis factor- α «) in interleukin 6 (IL-6), ki sta pomembna dejavnika vnetnega stanja pri debelosti, poleg tega pa tudi sodelujeta pri nastanku in razvoju inzulinske rezistence (zmanjšane občutljivosti na stimulacijo z inzulinom) različnih tkiv (Hotamisligil

in Spiegelman, 1994; Kern in sod., 2001). Spremembe v ravni mRNA in v sekreciji IL-6 v hranilni medij pod vplivom hipoksije so pri primarnih humanih preadipocitih v kulturi s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR, angl. »quantitative Polymerase Chain Reaction«) in encimsko-imunskega testa (ELISA; angl. »Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay«) predhodno že preverjali (Wang in sod., 2008b; Mack in sod., 2009), medtem ko so spremembe v sekreciji in izražanju TNF- α pri preadipocitih pod vplivom hipoksije slabše raziskane.

Pod vplivom hipoksije pa se spremeni tudi celična presnova. Da bi dobili boljšo sliko o dogajanju v humanih preadipocitih v razmerah hipoksije, smo s pomočjo imunocitokemičnega označevanja celic preverili izražanje dveh membranskih prenašalcev, ki sodelujeta v presnovi glukoze v maščobnem tkivu: glukoznega prenašalca 1 (GLUT1, angl. »glucose transporter 1«) in monokarboksilatnega prenašalca 4 (MCT4, angl. »monocarboxilate transporter 4«). Za GLUT1 in MCT4 obstajajo podatki o spremembah v izražanju gena v humanih preadipocitih pod vplivom hipoksije na podlagi PCR (Wang in sod., 2008b; Pérez de Heredia in Wood, 2010).

2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBNO TKIVO

2.1.1 Maščobno tkivo pri različnih živalskih skupinah

Sposobnost shranjevanja virov energije je skupna značilnost vseh organizmov. Že pri nevretenčarjih lahko najdemo specializirana tkiva, podobna jetrom, ki sodelujejo pri regulaciji presnovnih procesov in shranjevanju energijskih zalog. Dobro preučeno je na primer t.i. maščobno telesce pri žuželkah, ki predstavlja analog vretenčarskim jetrom in maščobnemu tkivu. Njegove celice shranjujejo energijske zaloge v obliki glikogena in gliceridov, ki se razgradijo v odziv na presnovne potrebe drugih tkiv. Maščobno telesce sodeluje tudi pri regulaciji izgradnje in razvoja krvnih žil in izloča različne molekule, ki sodelujejo pri imunskega odziva in strjevanju krvi. Maščobne celice vretenčarjev shranjujejo hrnilne snovi v obliki trigliceridov. Pri ribah, dvoživkah in plazilcih se maščobno tkivo nahaja pretežno v trebušnem predelu, pri čemer je njegova količina majhna, saj pri njih jetra igrajo glavno vlogo pri shranjevanju maščob.

Kompleksnost maščobnega tkiva pa je največja pri sesalcih. Delimo ga na rjavo in belo maščobno tkivo. Prvo igra vlogo pri termogenezi in ohranjanju telesne temperature in ga na splošno najdemo v podkožju zgornjega dela telesa, intraperitonealno v okolini ledvic in nadledvičnih žlez ter intratorakalno v okolini srca, pljuč in požiralnika. Belo maščobno tkivo pa predstavlja shrambo energije v obliki maščob in se nahaja po celotnem telesu (Azeez in sod., 2014; Birsoy in sod., 2013; Symonds, 2012).

2.1.2 Belo maščobno tkivo

2.1.2.1 Delitev, vloga in celična sestava

Belo maščobno tkivo je obsežen organ, ki se v telesih sesalcev nalaga na dveh različnih lokacijah - v predelu trebuha med organi (visceralno maščevje) in v podkožju (subkutano maščevje). Glavna funkcija maščevja je shranjevanje in mobilizacija energijskih zalog v obliki trigliceridov, opravlja pa tudi funkcijo endokrinega organa. Maščobno tkivo kot endokrini organ preko izločanja citokinov in drugih molekul pomembno vpliva na energijsko ravnotesje celotnega organizma. Vrste molekul in stopnje njihovega izločanja

iz maščobnega tkiva, pa tudi razvoj z debelostjo povezanih bolezni, so odvisne tako od lokacije kot tudi od količine maščobnega tkiva (Symonds, 2012).

Celična sestava maščobnega tkiva je heterogena. Maščobne celice – adipociti so vršilke nalog, povezanih s shranjevanjem energijskih zalog v obliki lipidov. Adipociti opravljam naloge, povezane z vgrajevanjem (lipogenezo) in sproščanjem (lipolizo) maščob, regulacijo občutljivosti na inzulin in endokrino funkcijo. Velika maščobna kapljica zavzema večino prostornine adipocita, jedro in citoplazmo pa najdemo stisnjena na periferiji celice.

Poleg adipocitov najdemo v maščevju tudi pester nabor drugih tipov celic: preadipocite, fibroblaste, endotelne in imunske celice, pa tudi multipotentne zarodne celice, ki se lahko diferencirajo v različne celične tipe. Odstotna sestava maščevja se na različnih lokacijah v telesu razlikuje, odvisna pa je tudi od njegove količine in drugih dejavnikov. Hauner (2005) navaja, da adipociti pri človeku v splošnem zavzemajo med 50 in 70 % volumna tkiva, pri čemer je sestava odvisna od dejavnikov, kot sta npr. anatomska lokacija in telesna masa.

2.1.2.2 Preadipociti

Preadipociti sestavljajo 20 do 40 % volumna maščobnega tkiva (Hauner, 2005). Predstavljajo vir novih adipocitov. Po morfologiji so podobni fibroblastom (celicam, ki proizvajajo izvencelični matriks in kolagen), izvirajo pa iz mezenhimatskih matičnih celic mezodermalnega izvora. Ker se adipociti *in vivo* niso sposobni deliti, sta regeneracija in povečanje števila adipocitov odvisna od zaloge preadipocitov, ki jih organizem hrani celo življenje. Iz obstoječe populacije prekurzorskih celic se ves čas diferencirajo novi adipociti; pri odraslem človeku se v osmih letih zamenja približno 50 % adipocitov z novimi.

Diferenciacija preadipocitov v adipocite igra ključno vlogo pri razvoju debelosti. Ta lahko nastane na 2 načina - bodisi s hipertrofijo, pri kateri gre za povečanje obstoječih adipocitov ali pa s hiperplazijo, pri kateri pride do rekrutacije novih maščobnih celic. Preadipociti pa skupaj z adipociti pripomorejo tudi k endokrini funkciji maščevja, ki je v debelosti spremenjena. (Symonds, 2012).

2.2 DEBELOST IN HIPOKSIJA MAŠČOBNEGA TKIVA

2.2.1 Debelost pri človeku

Debelost pri človeku je definirana kot nenormalno ali prekomerno nalaganje maščob, ki predstavlja zdravstveno tveganje. Med debele uvrščamo ljudi z indeksom telesne mase (ITM; razmerje med maso in kvadratom telesne višine), večjim od 30 (Svetovna zdravstvena organizacija (WHO), 2000). Ob tem belo maščobno tkivo pri debelih ljudeh predstavlja 40 ali več % telesne mase v primerjavi s 15-20 % pri normalno hranjenih (Trayhurn, 2013).

Tradicionalno gledano je debelost neravnovesje med vnosom in porabo energije. K njej lahko poleg prekomerne količine zaužite hrane in pomanjkanja telesne aktivnosti prispevajo tudi genetske predispozicije. Debelost sama po sebi ne predstavlja problema. Problem predstavlajo bolezni, ki lahko nastanejo kot njena posledica. To so med drugim inzulinska rezistenca (zmanjšana občutljivost tkiv na stimulacijo z inzulinom), sladkorna bolezen, srčno-žilne bolezni in rak (Symonds, 2012).

2.2.2 Hipoksija kot posledica debelosti

Študije kažejo, da je pomembna posledica debelosti pri sesalcih hipoksija oz. znižan parcialni tlak kisika (pO_2) v maščobnem tkivu. Ta predpostavka je utemeljena z naslednjimi argumenti: minutni volumen in prekravavitev maščobnega tkiva se ne povečata sorazmerno s povečanjem deleža maščobnega tkiva med debelostjo; prekravavitev maščobnega tkiva se po zaužitju obroka pri debelih osebah v nasprotju z normalno prehranjenimi ne poveča; adipociti, ki v debelosti hipertrofirajo, lahko po velikosti presežejo povprečno razdaljo difuzije, ki znaša 100 μm (Trayhurn in sod., 2008).

2.2.3 Dokazi za hipoksijo maščevja kot posledico debelosti pri miših in ljudeh

Različne študije so z uporabo senzorjev za kisik in barvanja z eksogenim označevalcem za hipoksijo, pimonidazol hidrokloridom (2-nitroimidazol, ki se reduktivno aktivira v hipoksičnih celicah in se veže na tiolne skupine v proteinih, peptidih in aminokislinah; preko vezave sprecičnega protitelesa ga lahko nato imunohistokemično zaznamo), pokazale zmanjšan pO_2 v maščevju gensko spremenjenih miši brez gena za hormon leptin

(*ob/ob*), ki tekom življenja postanejo prekomerno debele. Ye in sod. (2007) so s pomočjo senzorja izmerili 70 % nižji pO_2 v epididimalnih (obmodkovih) in retroperitonealnih (hrbtna stran abdomna v okolini ledvic) maščobnih zalogah gensko debelih miši v primerjavi z mišmi divjega tipa. Pri tem merjenje parcialnega tlaka kisika v venozni krvi ni pokazalo sistemski hipoksije. Ista študija poroča o povišani koncentraciji označevalca za hipoksijo HIF-1- α (angl. »hypoxia-inducible factor 1- α «) v maščobnem tkivu gensko debelih miši, ki pa je niso zaznali v mišičnem tkivu, kar dodatno podpira možnost tkivno specifične hipoksije. Z določitvijo ravni označevalcev na prehransko debelih miših divjega tipa so dobili primerljive rezultate. Tudi barvanje tkiv prekomerno debelih miši s pimonidazol hidrokloridom je dalo podobne rezultate (Ye in sod., 2007; Hosogai in sod., 2007). Nedavna študija (Sun in sod., 2013) na zmerno prehransko debelih miših pa je še enkrat potrdila znižanje pO_2 v maščobnem tkivu. Omenjene ugotovitve podpirajo predpostavko, da je hipoksija maščevja posledica debelosti.

Podatki za človeško maščobno tkivo so manj obsežni. Pasarica in sod. (2008) so pokazali, da je gostota kapilar v maščobnem tkivu debelih ljudi manjša kot pri normalno prehranjenih. Ista študija je z uporabo elektrod pokazala tudi, da je pO_2 v abdominalnem subkutanem maščobnem tkivu pri debelih ljudeh nižji kot pri normalno prehranjenih in da je povezava med debelostjo in pO_2 obratno sorazmerna.

Obstajajo pa tudi študije, ki nasprotujejo do sedaj omenjenim dokazom. Goosens in sod. (2011) opisujejo, da je pO_2 v maščevju pri ljudeh v debelosti pravzaprav višji, vendar hipertrofirane celice slabše izkoriščajo kisik. Hodson in sod. (2013) pa v *in vivo* študiji, ki je merila vnos in porabo kisika ter količino produktov od kisika odvisnih presnovnih procesov v subkutanem abdominalnem maščobnem tkivu, povsem zavračajo hipotezo, da pri debelih ljudeh pride do hipoksije maščevja. Zadovoljive razlage za neujemanje v rezultatih ni, možno pa je, da so posledica razlik v uporabljenih raziskovalnih metodah (Trayhurn, 2014).

2.3 PRESNOVA GLUKOZE PRI DEBELOSTI/ HIPOKSIJI

2.3.1 Splošno

Pomembna značilnost debelosti so spremembe v presnovi glukoze, ki so posledica zmanjšanega pO₂. Presnova glukoze, ki je v običajnih razmerah aerobna (vezana na O₂) preide na anaerobno, pri kateri O₂ ne sodeluje. To v humanih adipocitih vodi v povišanje ravni izražanja genov, povezanih z glikolizo (prva stopnja v razgradnji glukoze, ki ni odvisna od prisotnosti O₂) (Wang in sod., 2008a, Mazzatti in sod., 2012). Prehod z aerobne na anaerobno presnovo je splošno značilen odziv celice na nizek pO₂, ki je zlasti očiten pri tumorjih (Höpfl in sod., 2004; Matsumoto in sod., 2008). Skladno s porastom glikolize se potreba celice po glukozi poveča, saj ima anaerobna presnova mnogo manjši energetski izkoristek kot aerobna. Povišane ravni ključnih encimov glikolize so s proteomsko analizo pokazali tudi v encimskih lizatih celic mišje celične linije 3T3-L1, izpostavljenih hipoksiji (Choi in sod., 2009). Wood in sod. (2007) pa so v funkcionalni študiji z uporabo 2-deoksi-D-glukoze pokazali, da se raven privzema glukoze v humanih adipocitih v hipoksiji poveča, je pa blokirana v prisotnosti citohalazina B (glivni presnovek, ki se veže na glukozne prenašalce in s tem blokira membranski glukozni transport), kar kaže na dejstvo, da privzem poteka preko membranskih prenašalcev.

2.3.2 Glukozni prenašalec 1 – GLUT1

Potreba po glukozi se v hipoksiji v skladu s prehodom na anaeroben tip presnove poveča, po čemer lahko sklepamo na povečan heksozni transport v celicah. GLUT1 je protein, ki je zadolžen za konstitutivni transport glukoze v mnogih celicah v telesu. Je visoko občutljiv na hipoksijo (Semenza, 2003); spremembo v izražanju gena za GLUT1 v hipoksiji so pokazali v mnogih različnih tipih celic, med drugim v podganjih jetrnih celicah in fibroblastih, v ovarijskih celicah kitajskih hrčkov in v človeških rakavih celicah (Wang in sod., 2007). GLUT1 ni edini glukozni transporter v preadipocitih, vendar pa je ključen pri odgovoru na hipoksijo. Povišano raven mRNA za GLUT1 so po izpostavitvi razmeram hipoksije zabeležili tako v humanih preadipocitih (Wang in sod., 2008b), kot tudi v maščobnem tkivu genetsko (*ob/ob*) in prehransko debelih miši (Rausch in sod., 2008; Ye in sod., 2007) ter v humanih in mišjih 3T3-L1 adipocitih (Lolmède in sod., 2003; Hosogai in

sod., 2007; Wang in sod., 2007; Wood in sod., 2007; Ye in sod., 2007). Wood in sod. (2007) so pri humanih adipocitih pokazali tudi bistveno zvišano raven proteina.

2.3.3 Pomen laktata in monokarboksilatnega prenašalca 4 – MCT4

Laktat je produkt anaerobne glikolize v celicah, ki se vedno bolj uveljavlja kot pomemben presnovni signal v telesu (Rooney in Trayhurn, 2011). Njegove funkcije vključujejo stimulacijo vnetja v makrofagih (Samuvel in sod., 2009), vlogo v inzulinski rezistenci v mišicah (Choi in sod., 2002) in inhibicijo lipolizne aktivnosti (pospešitev vgrajevanja maščob v adipocitih) (Liu in sod., 2009; Kashan in sod., 2010). Povečano izločanje laktata bi zato lahko vodilo v presnovne spremembe na ravni celotnega organizma. Pospešeno izločanje kot posledica prehoda celic na anaerobno presnovo je opisano pri tumorjih (Gatenby in Gillies, 2004), pa tudi pri belem maščobnem tkivu (Di Girolamo in sod., 1992; Hosogai in sod., 2007; Ye in sod., 2007). Pri debelih podganah in ljudeh naj bi se kar 50 do 70 % glukoze presnovilo do laktata (Di Girolamo in sod., 1992). Povišano raven laktata so zabeležili tako v mišjih 3T3-F442A kot v človeških maščobnih celicah (Lolmède in sod., 2003; Pérez de Heredia in Wood, 2010), pa tudi v maščobnem tkivu debelih miši (Hosogai in sod., 2007).

Celica mora presežek laktata izločiti, s čimer prepreči zakisanje citosola, ki lahko vodi v poškodbe. Izločanje laktata poteka preko različnih monokarboksilatnih prenašalcev (MCT), od katerih se v človeških adipocitih in preadipocitih izražajo MCT1, MCT2 in MCT4 (Pérez de Heredia in Wood, 2010). MCT1 in MCT4 sta najbolj razširjena monokarboksilatna prenašalca, ki ju najdemo tudi v drugih tkivih. MCT4 je še posebej značilen za celice z visoko glikolitično aktivnostjo (Halestrap in Meredith, 2004). Občutljivost izražanja gena za MCT4 in občutljivost proteina MCT4 na hipoksijo je bila večkrat prikazana v različnih tipih celic in tkiv, kot so človeške celice raka mehurja (Ord in sod., 2005), podganje mišice (Py in sod., 2005), človeške HeLa celice in ovarijске celice kitajskih hrčkov (Ullah in sod., 2006). Tudi v humanih preadipocitih in adipocitih 24 ali 48-urna izpostavitev hipoksičnim razmeram vodi v povišanje izražanja genov in prenašalcev (Pérez de Heredia in Wood, 2010). Rezultati te študije prikazujejo povišano raven mRNA za MCT1 in MCT4 ter povišano raven proteina MCT1 v humanih adipocitih, diferenciranih iz preadipocitov, ki so jih izolirali iz maščobnega tkiva oseb s Simpson-

Golabi-Behmel-ovim sindromom (SGBS). Pri humanih SGBS preadipocitih pa je prišlo do povečanega izražanja gena za MCT4, medtem ko je izražanje MCT1 ostalo nespremenjeno.

2.4 SEKRECIJSKA FUNKCIJA MAŠČOBNEGA TKIVA JE SPREMENJENA PRI DEBELOSTI

2.4.1 Adipokini

Maščobno tkivo preko izločanja različnih tipov molekul komunicira z drugimi organi, kot so možgani, skeletne mišice in jetra. Številne funkcije teh molekul oz. adipokinov vključujejo ohranjanje energijskega ravnotežja, vpliv na občutljivost na inzulin in presnovo glukoze, vpliv na vnetni odziv organizma, odpornost, presnovo lipidov in krvni tlak, poleg naštetega pa sodelujejo tudi pri hemostazi in angiogenezi. Prve adipokine so opisali v 80-ih letih prejšnjega stoletja (npr. adipsin; Cook in sod., 1987), do preskoka v pogledu na maščobno tkivo pa je prišlo leta 1994 z odkritjem hormona leptina (Zhang in sod., 1994). Do zdaj je bilo opisanih že več kot 100 različnih adipokinov (Trayhurn, 2013).

Adipokini niso nujno molekule, specifične za maščobno tkivo, in pogosto druga tkiva v večji meri doprinesejo k izločanju določenega sekrecijskega faktorja. Predstavniki adipokinov imajo zelo raznoliko strukturo in funkcijo. Skupina vključuje klasične citokine (npr. TNF- α , IL-6, IL-8), rastne faktorje (npr. TGF- β , angl. »transforming growth factor- β «), proteine alternativnega komplementnega sistema (npr. adipsin), proteine, vključene v strjevanje krvi (npr. PAI-1, angl. »plasminogen activator inhibitor-1«), regulacijo krvnega tlaka (npr. angiotenzinogen), presnovo lipidov (npr. RBP, angl. »retinol-binding protein«/ slov. retinol-vezavni protein), homeostazo glukoze (npr. adiponektin), angiogenezo (npr. VEGF, angl. »vascular endothelial growth factor«/ slov. vaskularni endotelijski rastni faktor), proteine, ki sodelujejo v akutnem in stresnem odzivu (npr. haptoglobin, metalotioneini) (Trayhurn in Wood, 2004). Izmed vseh molekul, ki jih maščobno tkivo izloča, so vloge in vplivi na metabolizem organizma najbolje preučeni pri leptinu, adiponektinu, RBP4, rezistinu, TNF- α in IL-6. Hormona leptin in adiponektin sta najvidnejša predstavnika adipokinov in sta edina, ki ju izločajo izključno adipociti, medtem ko ostale izločajo tudi drugi tipi celic, ki jih najdemo v maščevju (Symonds, 2012).

Funkcije prvega so povezane s kontrolo sitosti, angiogenezo in izločanjem inzulina, funkcije drugega pa z izboljšanjem občutljivosti za inzulin, protivnetnim odzivom in angiogenezo (Trayhurn, 2013).

Raziskave so pokazale, da so razlike v sekreciji maščobnega tkiva odvisne od regije v telesu, kjer je maščobno tkivo. Visceralno maščevje ima tako večjo zmogljivost izločanja kot subkutano maščevje (Symonds, 2012).

2.4.2 Izražanje adipokinov pri normalni hranjenosti in pri debelosti

Za zdravje organizma je ključnega pomena, da ohranja optimalno količino maščobnega tkiva. Velika odstopanja od optimalnih zalog maščevja, na primer stanja kot so premalo maščobe, preveč maščobe (debelost) ali nepravilno razporejena maščoba (lipodistrofija), lahko vodijo v neravnovesje v sekrecijski funkciji maščobnega tkiva in posledično v različna bolezenska stanja (Wood in sod., 2009).

Maščobno tkivo pri normalno hranjenih posameznikih izloča pretežno protivnetne adipokine (Makki in sod., 2009), ki zmanjšujejo imunski odziv organizma in ga varujejo pred komplikacijami, ki so posledica debelosti. Eden takih je na primer adiponektin, ki ima pomemben protivnetni vpliv na različne tipe celic – makrofage, endotelne celice, fibroblaste in celo srčno-mišične celice. V makrofagih, fibroblastih in srčno-mišičnih celicah zmanjšuje izločanje vnetnega dejavnika TNF- α , povzroči prehod makrofagov iz vnetnega v protivnetni fenotip, sodeluje pri odstanitvi apoptočnih celic, v endotelnih celicah pa povzroči zmanjšano izločanje vnetnega IL-6 (Ohashi in sod., 2014). Pozitivno vpliva tudi na produkcijo drugih protivnetnih dejavnikov (IL-1 receptorskega antagonista in IL-10) v monocitih, makrofagih in dendritičnih celicah (Wolf in sod., 2004). Protivnetno vlogo ima tudi na primer protein adipolin, za katerega so pokazali pozitiven vpliv na občutljivost na inzulin pri prehransko debelih miših. V isti študiji so pokazali tudi negativen vpliv tega proteina na kopiranje makrofagov in izločanje vnetnih dejavnikov, tudi TNF- α , v maščobnem tkivu (Enomoto T., 2011). Vnetje žilnega endotelija pa preko različnih mehanizmov zmanjšuje tudi protein omentin-1, ki ima pozitiven vpliv tudi na privzem glukoze v adipocitih (Ohashi, 2014).

Po drugi strani se v maščobnem tkivu debelih posameznikov poveča izločanje vnetnih adipokinov, kot so TNF- α , IL-6, leptin, visfatin, rezistin, angiotenzin II in PAI-1 (Makki in sod., 2009). To vnetno stanje, pogojeno s hipoksijo kot posledico debelosti, naj bi imelo na splošno dva učinka: povečanje krvnega pretoka skozi maščobno tkivo in pa rast novih krvnih žil (angiogenezo), kar je podobno kot pri tumorjih (Trayhurn in Wood, 2004). Paradoksalno pa povečana koncentracija označevalcev vnetja vodi v spremembo funkcije žilnega endotelija, kar še poslabša pretok skozi tkivo (Ye in sod., 2007). Presnovni in imunski odziv sta si evolucijsko zelo blizu, tako da si lahko predstavljamo, da se signalne poti in regulatorne molekule lahko v veliki meri prekrivajo. To je s stališča ohranjanja energije ugodno, problem pa nastane, ker se tak sistem slabo odziva na konstanten (pre)visok vnos nutrientov (Hotamisligil, 2006).

Posledica sprememb v maščobnem tkivu pri debelosti pa je tudi vdor makrofagov v tkivo sorazmerno s količino maščobnega tkiva pri ljudeh in miših (Weisberg in sod., 2003). Imunsko barvanje tkiv kaže na kolokalizacijo makrofagov s hipoksičnimi predeli v maščobnem tkivu (Rausch in sod., 2008). Makrofagi prav tako pomembno pripomorejo k produkciji citokinov in drugih vnetnih dejavnikov (Ye in sod., 2007). Boulimie in sod. (2005) pa so celo predlagali, da je ta rekrutacija ključna za nastop presnovnih motenj, povezanih z debelostjo.

Kljub temu, da gre za podobne poti in mediatorje, se vnetni odziv kot posledica debelosti po trajanju in intenziteti pomembno razlikuje od infektivnega. Infektivno vnetje vključuje kratkotrajne odgovore z visoko amplitudo, medtem ko se presnovno vnetje - podobno kot druga kronična vnetna stanja - ohranja na nizki ravni leta ali desetletja (Odenggaard in Chawla, 2013).

2.4.3 Tumor nekrotizirajoči dejavnik α – TNF- α

2.4.3.1 Splošno

TNF- α je pomemben vnetni endokrini dejavnik (citokin), ki po eni strani sodeluje pri apoptozi nekaterih tumorskih celic, po drugi strani pa uravnava vnetni odziv in imunske funkcije organizma. Je homotrimerni protein, ki ga sestavlja 157 aminokislinskih podenot, in ga izločajo predvsem aktivirani makrofagi (Chen in Goeddel, 2002). Nepravilna

produkcia TNF- α oz. stalna aktivacija njegovega signaliziranja pri človeku lahko vodita v širok spekter bolezni, vključno s slatkorno boleznijo, sepsom, cerebralno malarijo, rakom, osteoporozo, zavrnitvijo presaditve, multiplo sklerozo, revmatoidnim artritisom in vnetnimi boleznimi črevesja (Chen in Goeddel, 2002). Signaliziranje TNF- α poteka preko dveh različnih membranskih receptorjev, TNF-R1 in TNF-R2. TNF-R1 je udeležen pri večini bioloških aktivnosti citokina. Vezava TNF- α na TNF-R1 vodi v serijo znotrajceličnih dogodkov, ki v končni fazi vodijo v aktivacijo dveh večjih transkripcijskih faktorjev, jedrnega faktorja kB (NF- κ B) in c-Jun. Omenjena faktorja imata vpliv na izražanje genov, povezanih s procesi, kot so rast, razvoj in smrt celice, onkogeneza ter imunski, vnetni in stresni odgovor (Chen in Goeddel, 2002). TNF- α posredno vpliva tudi na izražanje drugih vnetnih citokinov, kot sta IL-6 in IL-1 β (Makki in sod., 2013). Vezava TNF- α na TNF-R2 pa vodi v aktivacijo in proliferacijo timocitov (Grell in sod., 1998), ima pa tudi vlogo v regeneraciji in proliferaciji oligodendrocytov (Arnett in sod., 2001) ter vpliv na aktivnost limfocitov T (Chen in sod., 2007).

V maščobnem tkivu le majhen delež TNF- α proizvedejo maščobne celice, večji delež pa nastane v nemaščobnih celicah (Fain in sod., 2004). Podkožno maščevje pri debelosti izloča več TNF- α kot visceralno maščevje, pri normalno prehranjenih osebah pa naj bi bila situacija obratna (Fain in sod., 2004).

2.4.3.2 Spremenjeno izražanje TNF- α v debelosti

TNF- α je bil prvi adipokin, ki so mu pripisali vlogo pri nastanku in razvoju inzulinske rezistence. V maščobnem tkivu naj bi TNF- α preko avtokrinskih in parakrinskih mehanizmov inhibiral signaliziranje inzulina tako, da povzroči inhibitorno serinsko fosforilacijo inzulinskega receptorskega substrata 1 (IRS-1) (Hotamisligil in Spiegelman, 1994). Pri gensko debelih *ob/ob* miših z mutacijo v genu za TNF- α ali njegova receptorja so pokazali, da jih to ščiti pred razvojem inzulinske rezistence (Uysal in sod., 1997). Kasnejši poskus akutnega zdravljenja debelih pacientov s slatkorno boleznijo tipa 2 s pomočjo blokiranja TNF- α sicer ni vodil v zmanjšanje inzulinske rezistence, čeprav se je znižala raven drugih vnetnih označevalcev (Dominguez in sod., 2005). Hivert in sod. (2008) poročajo, da je raven TNF- α v pozitivnem sorazmerju z drugimi označevalci inzulinske rezistence, v nedavni študiji pa so Stanley in sod. (2011) tudi uspeli pokazati, da blokiranje TNF- α

Ijudem s presnovnim sindromom uredi raven glukoze v krvi in zviša raven adiponektina. Ta doganjaja potrjujejo vlogo TNF- α pri z debelostjo povezani inzulinski rezistenci pri ljudeh. TNF- α pa preko znižanja ravni jedrnega receptorja PPAR γ (angl. »peroxisome proliferator-activated receptor γ «) in transkripcijskega faktorja C/EBP (angl. »CCAAT/enhancer-binding protein beta«) tudi inhibira diferenciacijo maščobnih celic, kar vodi v rekrutacijo nedeterminiranih celic in širjenje maščobnega tkiva (Xu in sod., 1999), zmanjšuje pa tudi raven adiponektina (Hector in sod., 2007).

2.4.4 Interlevkin 6 - IL-6

2.4.4.1 Splošno

IL-6 je pomemben citokin, ki sodeluje pri uravnavanju vnetja, hematopoeze, imunskega odziva in mehanizmov gostiteljeve obrambe (Makki in sod., 2013). Podobno kot TNF- α tudi IL-6 direktno vpliva na presnovo lipidov - stimulira lipolizo, zvišuje koncentracijo prostih maščobnih kislin v krvi in pospešuje oksidacijo maščob na ravni organizma (Van Hall in sod., 2003), negativno pa vpliva na raven izražanja in izločanja adiponektina in drugih označevalcev diferenciacije v človeških adipocitih (Rotter Sopasakis in sod., 2004). Proizvajajo ga različni tipi celic v telesu, vključno s fibroblasti, endotelnimi celicami, monociti, makrofagi, miociti in adipociti (Fève in Bastard, 2009). Signaliziranje IL-6 poteka preko receptorskoga kompleksa, pri čemer vezava IL-6 na IL-6-R α podenoto kompleksa povzroči aktivacijo signalnega transduktorskoga proteina glikoproteina 130 (gp130). Signalna kaskada, ki sledi, vključuje aktivacijo vnetnih poti JAK-STAT (angl. »Janus kinase-signal transducer and activator of transcription« in MAPK (angl. »mitogen-activated protein kinase«/ slov. z mitogenom aktivirana proteinska kinaza) (Heinrich in sod., 2003).

Med mirovanjem in v odsotnosti akutnega vnetja maščobno tkivo proizvede približno 15-30 % IL-6 v telesu (Mohamed-Ali in sod., 1997), vendar ga le majhen delež izločajo same maščobne celice (Fain in sod., 2004), visceralno maščevje pa ga izloča več kot podkožno maščevje (Fried in sod., 1998; Fain in sod., 2004).

2.4.4.2 Spremenjeno izražanje IL-6 pri debelosti

Izražanje IL-6 v belem maščobnem tkivu in v krvni plazmi je, podobno kot pri TNF- α , v pozitivnem sorazmerju s povišanjem telesne mase in ravni prostih maščobnih kislin v krvi ter povečanjem obsega pasu (Vozarova in sod., 2001), njegova raven pa z izgubo mase ponovno pada (Bastard in sod., 2000).

Izsledki študij obnašanja IL-6 pri debelosti so si nasprotuječi. Čeprav nekatere študije kažejo, da je povišana raven IL-6 povezan s količino maščobe v organizmu, ne pa nujno tudi z inzulinsko aktivnostjo in odgovorom telesa na inzulin (Vozarova in sod., 2001; Hansen in sod., 2010), pa je ena študija pokazala višjo raven IL-6 pri bolnikih z inzulinsko rezistenco kot posledico debelosti (Kern in sod., 2001). Druge *in vitro* in *in vivo* študije potrjujejo, da izpostavljenost IL-6 vodi v okvare inzulinskega signaliziranja v jetrnih celicah, tako da prepreči avtofosforilacijo in tirozinsko fosforilacijo IRS-1 in IRS-2 (Senn in sod., 2002; Klover in sod., 2003). Stouthard in sod. (1996) so po drugi strani pokazali, da v mišjih 3T3-L1 adipocitih akutna izpostavljenost IL-6 glukozni transport stimulira, medtem ko kronična izpostavljenost vodi v inzulinsko rezistenco, ki je posledica znižanja transkripcije genov za proteine, kot so IRS-1, od inzulina odvisni transporter glukoze GLUT4 in PPAR γ , znižanja ravni fosforilacije inzulinskega receptorja in negativnega vpliva na inzulinsko pogojena glukozni transport in lipogenezo (Lagathu in sod., 2003; Rotter in sod., 2003). Takšna dvojna vloga IL-6 se kaže tudi pri mišicah. IL-6 med fizično aktivnostjo skrbi za povečan privzem glukoze v mišjih skeletnih mišicah (Nieto-Vazquez in sod., 2008), po drugi strani pa ima protivnetni učinek (Starkie in sod., 2003). Tudi v mišicah pa lahko kronično povišanje ravni IL-6 vodi v razvoj inzulinske rezistence (Nieto-Vazquez, 2008; Fève in Bastard, 2009). Glede na vse opisane izsledke je zelo zanimivo, da IL-6 pravzaprav pozitivno vpliva na izločanje inzulina preko spodbujanja izločanja GLP-1 (glukagonu podoben peptid-1, angl. »glucagon-like peptide-1«) v celicah trebušne slinavke (Ellingsgaard in sod., 2011).

Pri adipocitih, izpostavljenih 24-urni hipoksiji, so Wang in sod. (2008b) s pomočjo PCR in testa ELISA uspeli pokazati *in vitro* zvišanje ravni mRNA in proteina IL-6, niso pa zabeležili razlik pri preadipocitih. Sklepali so, da se odziv na hipoksijo razvije šele v odraslih maščobnih celicah, za katere so tudi pokazali povišanje ravni IL-6 po izpostavitvi

hipoksiji. Mack in sod. (2009) so po drugi strani pokazali zvišanje ravni proteina IL-6, pri čemer je bilo zvišanje večje pri preadipocitih kot pri adipocitih. Tudi Fain in sod. (2008) so pokazali, da pri debelosti največ IL-6 izloča sveže izolirana nemaščobna frakcija maščobnega tkiva. Pokazali so tudi, da preadipociti v kulturi izločajo več IL-6 kot *in vitro* diferencirani adipociti.

2.5 NAMEN DELA

Cilj raziskave je bil s pomočjo imunocitokemičnega označevanja in konfokalne mikroskopije v humanih preadipocitih v kulturi ovrednotiti in razširiti znanje o izražanju GLUT1, MCT4, IL-6 in TNF- α v razmerah hipoksije in normoksije. Spremembe v izražanju teh molekul pri debelosti/ hipoksiji potencialno vplivajo na razvoj bolezenskih stanj. Dosedanje *in vitro* raziskave na tem področju so bile opravljene predvsem na kolonijah diferenciranih sesalskih (humanih in mišjih) adipocitov in so temeljile na drugačnih metodah (PCR, ELISA). Postavili smo hipotezo, da bo izražanje izbranih proteinov v preadipocitih, gojenih v razmerah hipoksije drugačno kot v celicah, gojenih v standardnih razmerah normoksije, kar se bo odražalo v spremembri relativne površine celice, označene s fluorescenčnimi protitelesi. Glede na literaturo smo pričakovali povišane ravni GLUT1, MCT4, TNF- α in IL-6.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZDRŽEVANJE, MNOŽITEV IN PRESADITEV HUMANIH PREADIPOCITOV

3.1.1 Priprava in shranjevanje hraničnega medija za vzdrževanje humanih preadipocitov

Za vzdrževanje in množitev primarne kulture humanih preadipocitov (Zen-Bio, ZDA) smo uporabili hranični medij za humane preadipocyte. V sterilni časi smo zmešali Dulbeccov spremenjeni eaglov medij, DMEM (angl. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«) (Sigma-Aldrich, ZDA), 10 % fetalnega govejega seruma, FBS (angl. »Fetal Bovine Serum«) (Sigma-Aldrich, ZDA), 1 % mešanice antibiotikov penicilina in streptomicina (Sigma-Aldrich, ZDA) ter 1 % L-glutamina (Sigma-Aldrich, ZDA). Medij smo sterilno prefiltrirali skozi membranski filter s premerom por 0.2 µm v sterilne posode. Medij smo shranili na 4 °C.

Za zamrzovanje humanih preadipocitov smo uporabili hranični medij za humane preadipocyte z dodatkom 5 % dimetil sulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich, ZDA). Priprava medijev je potekala v aseptičnem okolju.

3.1.2 Nasaditev in množitev celic

Zamrznjeno celično suspenzijo smo odtajali, prenesli v centrifugirko in dodali hranični medij. Celice smo centrifugirali 5 min pri 1300 obratih ($270 \times g$) (centrifuga Centric 322A, Tehnica, Slovenija). Po končanem centrifugiranju smo supernatant zavrgli, celice v peletu pa smo resuspendirali v svežem, ogretem hraničnem mediju. Celično suspenzijo smo prenesli v sterilne posode za gojenje in dodali primerno količino hraničnega medija. Celice smo hranili v inkubatorju na 37 °C, 95 % zračni vlagi in 5 % CO₂. Hranični medij smo na 2 do 3 dni zamenjali s svežim hraničnim medijem. Množitev celic smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom. Ko so celice pokrile 70 % dna gojilne posode, smo jih odlepili od podlage s pomočjo tripsina, sprali in razsadili v nove gojilne posode ali na krovnike za izvajanje poskusov. Celice smo po potrebi tudi ponovno centrifugirali in resuspendirali v mediju za zamrzovanje. Celice smo dolgotrajno shranjevali v kriovialah na -80 °C. Delo je potekalo v aseptičnem okolju.

3.1.3 Presaditev celic

Pred presaditvijo smo odpipetirali medij in posodo za gojenje sprali z DMEM. V vsako gojilno posodo smo dodali 5 ml mešanice tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, ZDA) in inkubirali 5 min na 37 °C. Pod mikroskopom smo preverili, če so se celice dobro odlepile, nato pa smo celično suspenzijo odpipetirali v 10 ml centrifugirko. Da bi ustavili delovanje tripsina, smo v centrifugirko dodali 5 ml hranilnega medija za preadipocite, ki vsebuje serum. Celice smo centrifugirali 5 min na 1300 obratih (270 × g). Supernatant smo zavrgli, pelet s celicami pa smo resuspendirali v hranilnem mediju. Nato smo celice nasadili v nove sterilne gojilne posode ali na krovnike za nadaljne poskuse. Za nasaditev na krovnike smo celice po centrifugiranju resuspendirali v majhni količini medija. Želeno količino suspenzije smo prenesli na suhe, vnaprej pripravljene krovnike v petrijevkah in inkubirali na 37 °C najprej 30-60 min, da so se celice pritrstile na podlago, nato pa v petrijevke dodali po 1-2 ml medija. Delo je potekalo v aseptičnem okolju.

3.2 PRIPRAVA KROVNIKOV ZA NASADITEV HUMANIH PREADIPOCITOV

Krovnike premera 22 mm smo pomočili v 70-odstotni etanol (Kefo d.o.o., Ljubljana) in trikrat sprali z redestilirano vodo (pH = 5.0-7.0, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Lekarna, Slovenija). Nato smo jih potopili v vnaprej pripravljeno 10-odstotno raztopino poli-L-lizina (PLL) (Sigma-Aldrich, ZDA) in inkubirali 20 min na sobni temperaturi. Sledilo je še dvakratno spiranje z redestilirano vodo. Krovnike smo posušili na zraku v laminariju, jih položili v sterilne petrijevke, petrijevke zatesnili s parafilmom in hranili na 4 °C. Delo je potekalo v aseptičnem okolju.

3.3 INKUBACIJA HUMANIH PREADIPOCITOV V HIPOOKSIČNI KOMORI

Celice smo inkubirali v razmerah hipoksije z uporabo inkubacijske komore (Billups-Rothenberg, Inc., Del Mar, Kalifornija, ZDA). Komoro smo 4 min prepričevali z mešanicami plinov: 1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂ (Messer, Slovenija) in čez 2 h postopek prepričevanja ponovili. To smo storili zato, da smo se znebili še tistega dela O₂, ki je bil raztopljen v mediju. Celice v komori smo inkubirali 24 h na 37 °C in 95 % zračni vlagi. Kontrolne celice smo inkubirali 24 h, in sicer neposredno v inkubatorju, na 37 °C, 95 % zračni vlagi in 5 % CO₂. Opisane razmere se široko uporabljajo za raziskave hipoksije v celičnih

kulturah (Wood in sod., 2007, Wang in sod., 2008a, 2008b; Mack in sod., 2009). 1-odstotni pO₂ je blizu tistemu, ki so ga izmerili v maščobnem tkivu debelih *ob/ob* miši (Ye in sod., 2007).

3.4 IMUCITOKEMIČNO OZNAČEVANJE PROTEINOV

3.4.1 Postopek

Celice, pritrjene na krovna stekla smo najprej na hitro sprali s fosfatnim pufrom (PBS, angl. »phosphate-buffered saline«) (Sigma-Aldrich, ZDA). Sledila je 10-minutna fiksacija v 4-odstotnem paraformaldehidu (Sigma-Aldrich, ZDA), nato pa ponovno spiranje s PBS (4 × 3 min). Za blokado nespecifičnih vezav protiteles smo celice inkubirali s kozjim serumom (GS, angl. »Goat Serum«) (Sigma-Aldrich, ZDA) 1 h na 37 °C. Nato smo celice sprali s PBS (1 × 3 min). Primarna protitelesa smo redčili v PBS s 3% govejega serumskega albumina (BSA, angl. »bovine serum albumin«) (Sigma-Aldrich, ZDA). Na krovnike smo nanesli po 200 µl raztopine protiteles in inkubirali 2 h na 37 °C ali čez noč na 4 °C. Po spiranju s PBS (4 × 3 min) smo nanesli sekundarno protitelo, redčeno v PBS z BSA, inkubirali 45 min na 37 °C, nato pa spirali s PBS (4 × 3 min). Krovnike s celicami smo polagali na objektna stekelca s kapljico *SlowFade®* antifade reagenta (Life Technologies, ZDA). Zatesnili smo s prozornim lakom in shranili v temi na 4 °C. Za kontrolo vezave sekundarnih protiteles smo poskus naredili samo s sekundarnimi protitelesi. Uporabljene koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles smo predhodno eksperimentalno optimizirali.

3.4.2 Uporabljena protitelesa in redčitve

- prim.: anti-GLUT1 Rabbit Polyclonal, ab652 (Abcam, V.B.) – **1:500**; sek.: Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), A11008 (Invitrogen, ZDA) – **1:600**
- prim.: anti-TNF-α Rabbit Polyclonal, ab9739 (Abcam, V.B.) – **1:100**; sek.: Alexa Fluor® 488, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), A11008 (Invitrogen, ZDA) – **1:1000**
- prim.: anti-IL-6 Chicken Polyclonal, ab117341 (Abcam, V.B.) – **1:200**; sek.: Alexa Fluor® 488, Goat anti-Chicken IgG H&L, ab150169 (Abcam, V.B.) – **1:500**

- prim.: anti-MCT4 Rabbit Polyclonal, SC-50329 (Santa Cruz, ZDA) – **1:500**; sek.: Alexa Fluor® 488, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), A11008 (Invitrogen, ZDA) – **1:600**

3.5 KONFOKALNI MIKROSKOP IN ANALIZA

3.5.1 Mikroskopiranje

Po poskusih je sledilo mikroskopiranje celic s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom (Zeiss LSM510, Zeiss, Nemčija). Posamezne celice, označene s fluorescenčnimi protitelesi, smo opazovali z oljnim imerzijskim objektivom pri 63-kratni povečavi. (Zeiss, Nemčija). Izbirali smo celice, ki se niso dotikale drugih celic na krovniku. Celice smo izbirali naključno, posneli pa smo nasvetlejšo ravnino. Za zajemanje slik smo uporabili argonski laser z ekscitacijsko valovno dolžino 488 nm, zajeto sliko pa smo filtrirali z emisijskimi filtri valovne dolžine med 505 in 530 nm. Za vsak protein posebej smo nastavili točkovno zaslonko (angl. »pinhole«) in ojačitev zajetega fluorescenčnega signala (angl. »gain«). Celice smo poslikali s pomočjo programa LSM510 (Zeiss, Nemčija). Pred zajemanjem slik smo nastavili ustrezno povprečenje intenzitete pikslov, s čimer smo zmanjšali šum. Zajemanje slik je potekalo pri sobni temperaturi.

Pred analizo posnetkov smo določili prazno vrednost intenzitete fluorescence tako, da je bila približno enaka povprečni vrednosti intenzitete ozadja. Prazno vrednost intenzitete fluorescence smo nastavili na 20 % maksimalne intenzitete fluorescence. Tako smo pri analizi upoštevali le fluorescenčno označena področja celic z nadprazno vrednostjo intenzitet.

3.5.2 Analiza

Na mikroskopski sliki smo s pomočjo programskega orodja označili rob optične rezine celice. Nato smo nastavili prag intenzitete fluorescence in odčitali površino optične rezine celice, ki je svetila z nadprazno jakostjo. Iz podatkov smo izračunali relativno površino celice, ki je svetila z nadprazno jakostjo. V analizo smo vključili vsaj 40 označenih celic v normoksičnih in v hipoksičnih razmerah, vsak poskus pa smo ponovili najmanj 2-krat, da smo zagotovili konsistentnost rezultatov. Na razlike v izražanju označenih proteinov v

razmerah normoksijske in hipoksijske smo sklepali na podlagi spremembe v povprečni relativni površini celic, ki je nadprapročno svetila.

3.5.3 Statistična obdelava

Za statistično obdelavo smo s pomočjo programa SigmaPlot v.11.0 izračunali aritmetično sredino, standardno deviacijo (SD) in standardno napako ($SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$), naredili analizo variance in Mann-Whitney-jev U test za vzorce z nenormalno porazdelitvijo. Rezultate smo prikazali na slikah, na katere smo vključili mikroskopske slike celic in histograme, ki smo jih uredili s pomočjo programa Adobe PhotoShop CC 2014. Vzorce smo označili kot značilno različne takrat, ko je bil $p < 0,05$ (p - verjetnost, da vzorca nista statistično značilno različna).

4 REZULTATI

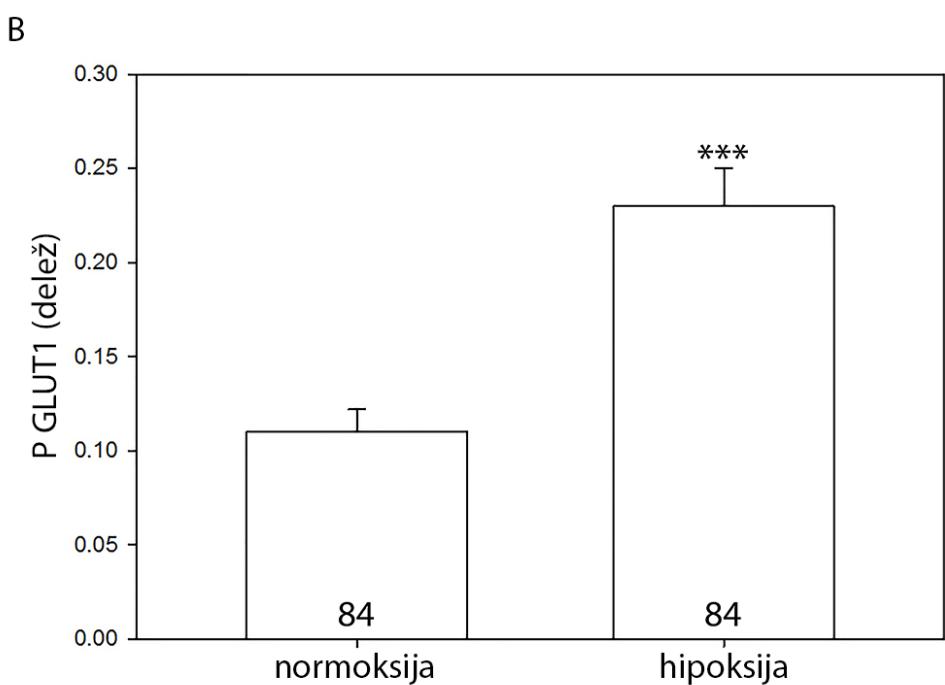
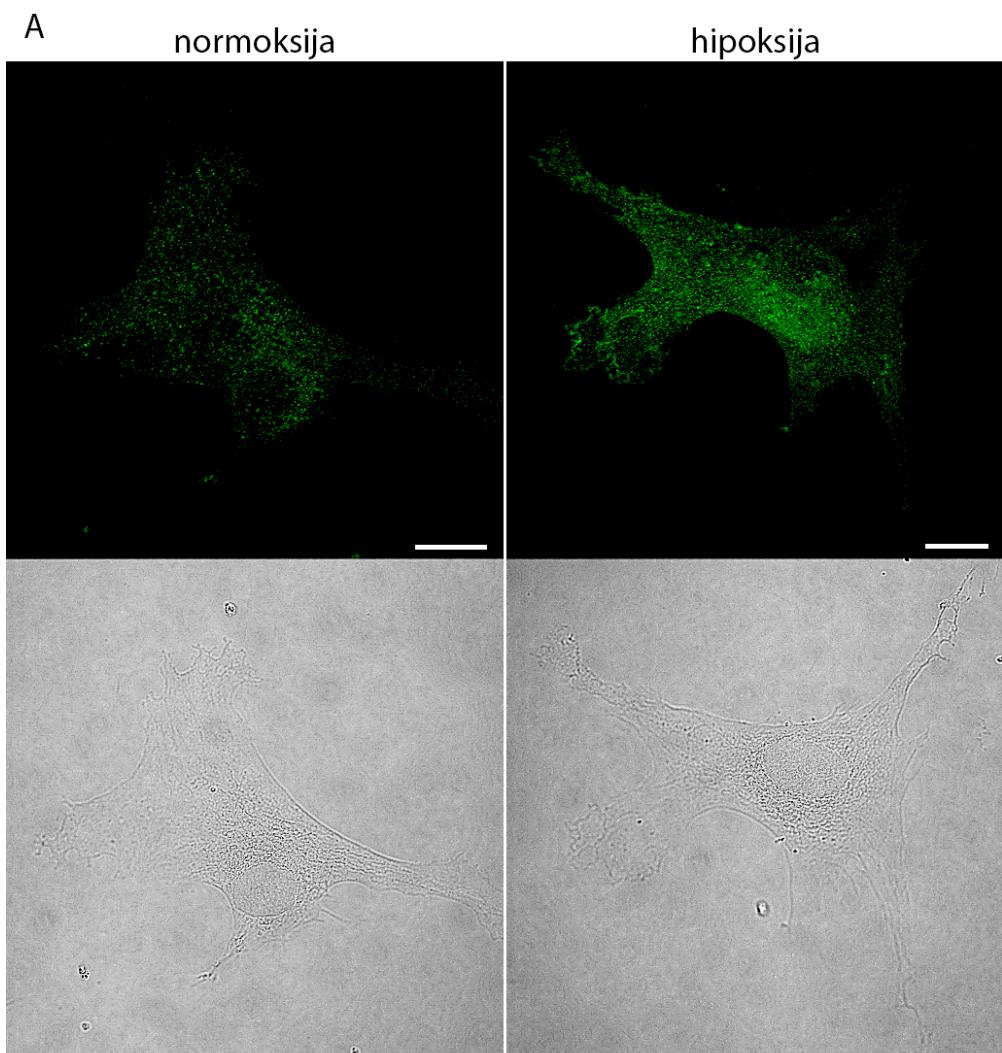
4.1 IMUNOCITOKEMIČNO OZNAČEVANJE

Humane preadipocite smo gojili 24 h v razmerah hipoksije (1 % O₂) in v kontrolnih razmerah normoksije (18 % O₂). Da bi primerjali izražanje proteinov GLUT1, MCT4, TNF- α in IL-6 v humanih preadipocitih v razmerah normoksije in hipoksije, smo proteine v celicah najprej fluorescentno označili z imunocitokemijo. Celice smo nato pregledali pod konfokalnim mikroskopom. Izračunali smo relativni del površine optične rezine celice, fluorescentno označene s protitelesi, glede na celotno površino optične rezine celice. Pri tem smo upoštevali samo s pomočjo programa določene nadpražne vrednosti intenzitete fluorescence.

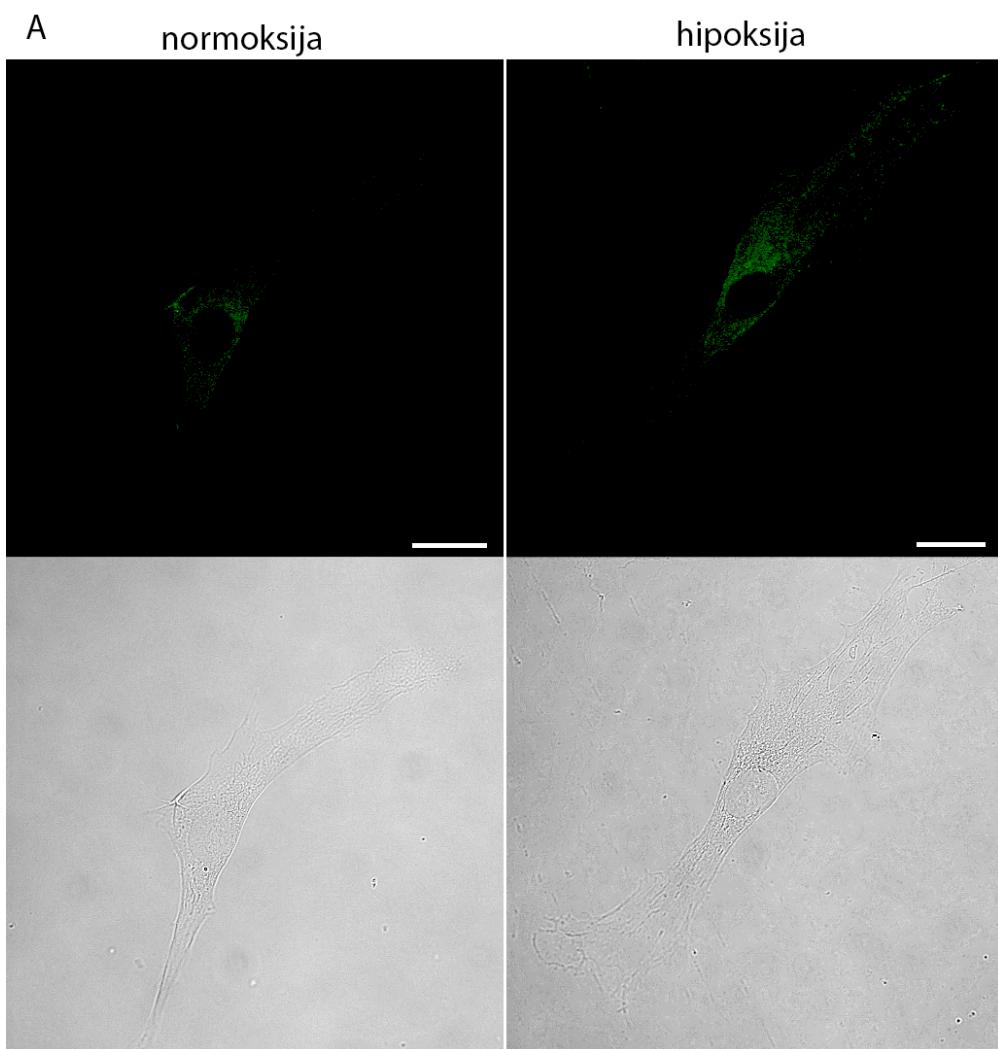
Na slikah 1-4 so prikazani posnetki posameznih fluorescenčno označenih optičnih rezin celic, zajetih s konfokalnim mikroskopom, v normoksiji in v hipoksiji. Podpražni del intenzitet oz. ozadje (manj kot 20 % maksimalne vrednosti intenzitet) je na slikah odstranjen s pomočjo računalniškega programa. Fluorescentna obarvanost celice je tako razvidna samo na mestih, kjer je intenziteta fluorescence višja od pražne vrednosti. Celice so označene s protitelesi proti GLUT1, MCT4, TNF- α in IL-6. Pod vsakim fluorescenčnim mikrografom je slika iste celice, posneta pod presevnim svetlobnim mikroskopom. Na histogramih je prikazana primerjava med specifično označenimi relativnimi površinami optičnih rezin celic, inkubiranih v razmerah hipoksije, v primerjavi s celicami, inkubiranimi v normoksiji.

Izražanje obeh membranskih proteinov je bilo v razmerah hipoksije povišano. Raven GLUT1 se je v razmerah hipoksije v primerjavi z normoksijo v povprečju povišal za faktor 2,1, razlika je bila statistično značilna ($n = 84$, Mann-Whitney: $P < 0,001$; Slika 1). Povprečna relativna označena površina celice, je narasla z 0,109 (+/- 0,012) v normoksiji na 0,229 (+/-0,019) v hipoksiji. Tudi izražanje transporterja MCT4 (Slika 2) se je v hipoksiji v povprečju povišalo, in sicer za faktor 3, razlika je bila statistično značilna ($n = 80$, Mann-Whitney: $P < 0,001$). Označena relativna površina celice se je povečala z 0,032 (+/- 0,003) na 0,096 (+/-0,007). Vsebnost TNF- α v celici se je v hipoksičnih razmerah zmanjšala (Slika 3), in sicer za faktor 1,5 glede na normoksične razmere. Povprečna označena relativna površina celice je bila v normoksiji 0,053 (+/- 0,004), v hipoksiji pa

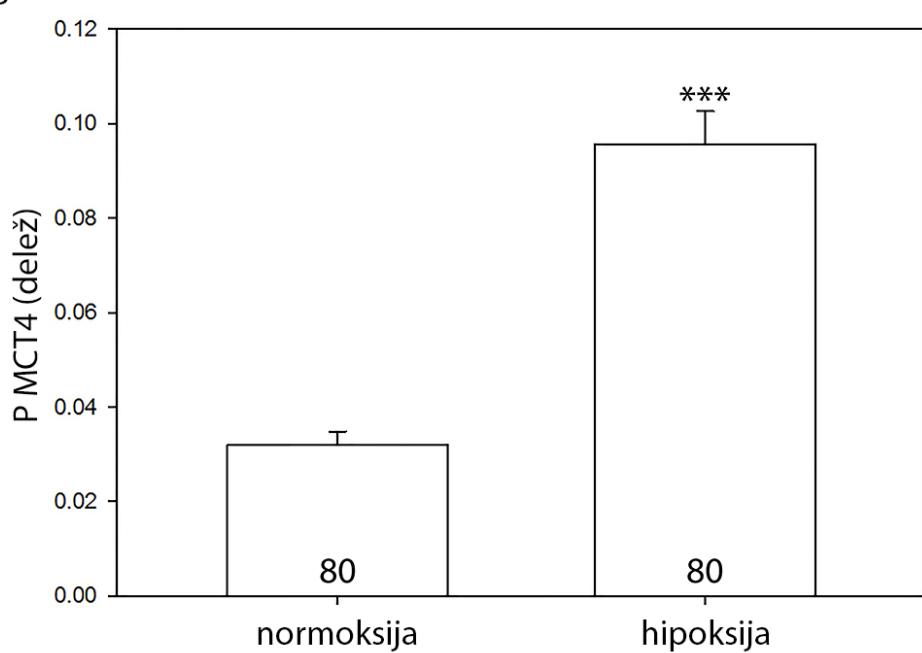
0,036 (+/- 0,003), razlika je bila statistično značilna ($n = 120$, Mann-Whitney: $P < 0,001$). IL-6 (Slika 4) se je v hipoksiji povišal za faktor 1,8. Relativna označena površina celice je narasla z 0,054 (+/- 0,004) v normoksiji na 0,099 (+/- 0,008) v hipoksiji, razlika je bila statistično značilna ($n = 80$, T test: $P < 0,001$).



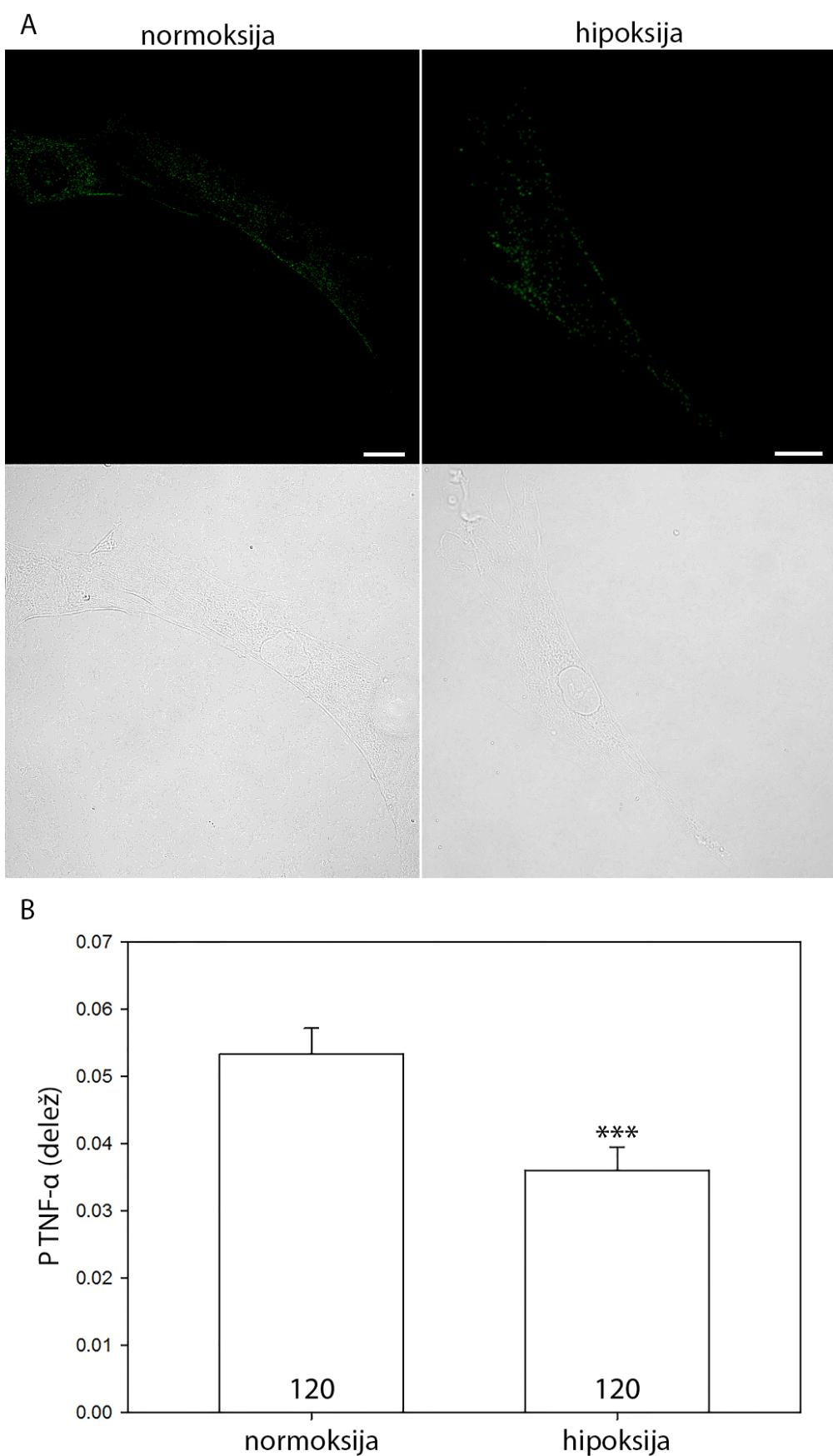
Slika 1: Izražanje GLUT1 v normoksijski in v hipoksijski.(A) Zgornji sliki predstavljata fluorescenčno označen GLUT1 na optični rezini celice, izpostavljene normoksiiji (levo) in hipoksiiji (desno), spodnji sliki pa isti celici pod svetlobnim mikroskopom. Slike so posnete pri 63-kratni povečavi, merili na slikah fluorescence predstavljata $20 \mu\text{m}$. Fluorescentna obarvanost celice je razvidna samo na mestih, kjer je intenziteta fluorescence višja od prazne vrednosti. (B) Histogram povprečja deležev s protitelesom proti GLUT1 označenih površin optičnih rezin celic, gojenih 24 h v razmerah normoksiije in hipoksiije (P GLUT). Rezultati so prikazani kot povprečno izražanje proteina + standardna napaka. Številke v stolpcih prikazujejo število analiziranih celic. Zvezdice označujejo statistično značilno razliko med eksperimentalnima skupinama (** P < 0,001).



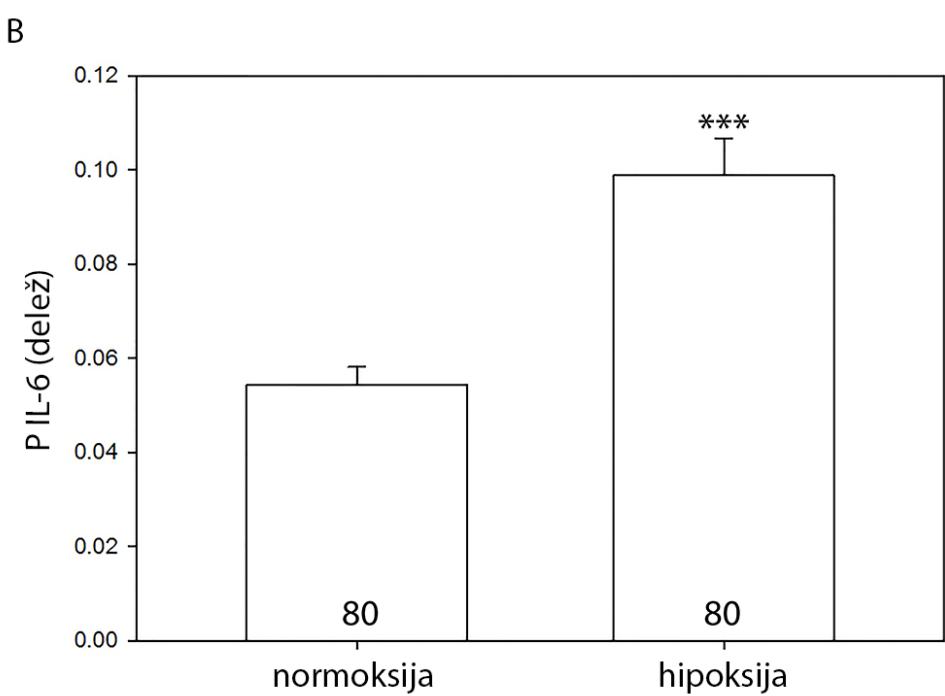
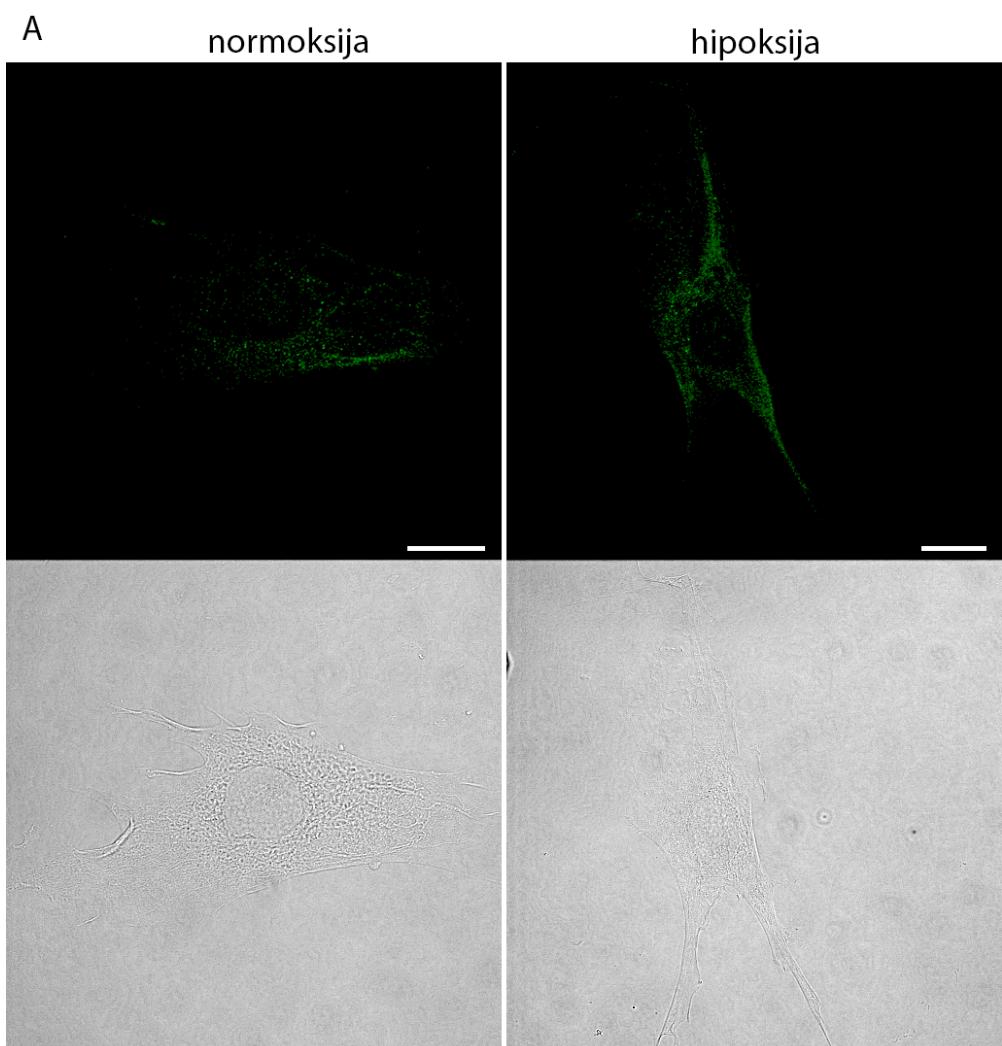
B



Slika 2: Izražanje MCT4 v normoksijski in v hipoksijski.(A) Zgornji sliki predstavljata fluorescenčno označen MCT4 na optični rezini celice, izpostavljene normoksiiji (levo) in hipoksiiji (desno), spodnji sliki pa isti celici pod svetlobnim mikroskopom. Slike so posnete pri 63-kratni povečavi, merili na slikah fluorescence pa predstavljata $20 \mu\text{m}$. Fluorescentna obarvanost celice je razvidna samo na mestih, kjer je intenziteta fluorescence višja od prazne vrednosti. (B) Histogram povprečja deležev s protitelesom proti MCT4 označenih površin optičnih rezin celic, gojenih 24 h v razmerah normoksije in hipoksije (P MCT4). Rezultati so prikazani kot povprečno izražanje proteina + standardna napaka. Številke v stolpcih prikazujejo število analiziranih celic. Zvezdice označujejo statistično značilno razliko med eksperimentalnima skupinama ($*** P < 0,001$).



Slika 3: Izražanje TNF- α v normoksiji in v hipoksiji.(A) Zgornji sliki predstavljata fluorescenčno označen TNF- α na optični rezini celice, izpostavljene normoksiji (levo) in hipoksiji (desno), spodnji sliki pa isti celici pod svetlobnim mikroskopom. Slike so posnete pri 63-kratni povečavi, merili na slikah fluorescence pa predstavljata 20 μm . Fluorescentna obarvanost celice je razvidna samo na mestih, kjer je intenziteta fluorescence višja od pražne vrednosti. (B) Histogram povprečja deležev s protitelesom proti TNF- α označenih površin optičnih rezin celic, gojenih 24 h v razmerah normoksije in hipoksije (P TNF- α). Rezultati so prikazani kot povprečno izražanje proteina + standardna napaka. Številke v stolpcih prikazujejo število analiziranih celic. Zvezdice označujejo statistično značilno razliko med eksperimentalnima skupinama (** P < 0,001).



Slika 4: Izražanje IL-6 v normoksijski in v hipoksijski. (A) Zgornji sliki predstavljata fluorescenčno označen IL-6 na optični rezini celice, izpostavljeni normoksijski (levo) in hipoksijski (desno), spodnji sliki pa isti celici pod presevnim svetlobnim mikroskopom. Slike so posnete pri 63-kratni povečavi, merili na slikah fluorescence pa predstavljata $20 \mu\text{m}$. Fluorescentna obarvanost celice je razvidna samo na mestih, kjer je intenziteta fluorescence višja od pražne vrednosti. (B) Histogram povprečja deležev s protitelesom proti IL-6 označenih površin optičnih rezin celic, gojenih 24 h v razmerah normoksijske in hipoksijske (P IL-6). Rezultati so prikazani kot povprečno izražanje proteina + standardna napaka. Številke v stolpcih prikazujejo število analiziranih celic. Zvezdice označujejo statistično značilno razliko med eksperimentalnima skupinama (** $P < 0,001$).

5 RAZPRAVA

V magistrskem delu smo želeli poglobiti znanje o vlogi preadipocitov pri debelosti in s tem povezanih vnetnih procesih ter spremembah v presnovi. Zanimalo nas je, kako se v humanih preadipocitih po izpostavitvi razmeram hipoksije, ki je značilna za debelost, spremeni izražanje nekaterih proteinov. Izbrani proteini so vključeni v procese vnetnih reakcij ali pa spremenjene presnove maščevja. Dosedanje raziskave *in vitro* na tem področju se osredotočajo predvsem na maščobne celice kot osrednje celice maščobnega tkiva. Po drugi strani pa so že poročali, da pri odgovoru na hipoksijo igrajo zelo pomembno vlogo nemaščobne celice v maščevju, predvsem preadipociti (Chung in sod., 2006; Mack in sod, 2009), ki naj bi izločale več kot 90 % adipokinov (Fain in sod., 2004).

Hipoksijo smo simulirali s pomočjo inkubacijske komore, v katero smo uvedli mešanico plinov z 1 % O₂ in v kateri smo celice inkubirali 24 h. Celice smo nato imunocitokemično označili s protitelesi za membranska proteina GLUT1 in MCT4 ter za vnetna označevalca TNF- α in IL-6. V kontrolnih poskusih smo celice gojili v razmerah normoksijske (18 % O₂). Celice smo pregledali pod mikroskopom in analizirali delež fluorescentno označenih površin. Rezultate, ki smo jih dobili v hipoksičnih razmerah, smo primerjali z rezultati iz normoksijske.

V tej študiji je bila imunocitokemija prvič uporabljena za potrebe raziskav izražanja proteinov v kontekstu hipoksije maščobnega tkiva in njenih posledic. Ta metoda je omogočila neposreden prikaz izražanja izbranih proteinov na ravni posamezne celice.

GLUT1 je membranski protein, ki skrbi za konstitutivni privzem glukoze v mnogih celicah. Znano je, da se v hipoksiji njegovo izražanje v celicah poveča, kar je posledica prehoda na anaerobno glikolitsko presnovo in v skladu s tem večje potrebe po glukozi. (Semenza, 2003; Lolmède in sod., 2003; Hosogai in sod., 2007; Rausch in sod., 2008; Wang in sod., 2007; Wang in sod., 2008b; Wood in sod., 2007; Ye in sod., 2007)

Pri označevanju humanih preadipocitov s protitelesi proti GLUT1 smo dobili pričakovano večje izražanje proteina v celicah, inkubiranih v razmerah hipoksije. V hipoksiji smo zaznali v povprečju približno 2-krat večji signal proteina kot v normoksijski, kar je razvidno na Sliki 1. Čeprav je sprememba šla v pričakovano smer, primerjava z literaturo pokaže, da

so razlike manjše od 6,5-kratnega povišanja ravni mRNA za GLUT1 v preadipocitih po 24-urni izpostavitvi hipoksiji, ki so jo pokazali Wang in sod. (2008b). Lahko bi sklepali, da gre za neuskajeno izražanje gena in proteina GLUT1 v humanih preadipocitih, vendar pa so Wang in sod. (2008b) za izvajanje poskusov uporabili konfluentne preadipocite in drugačno metodologijo, ustrezna primerjava izražanja gena in proteina v preadipocitih pa bi bila mogoča le, če bi bila izvedena v enakih razmerah. V primerjavi s humanimi adipociti, kjer so pokazali, da se je po 24-urni izpostavljenosti hipoksiji raven mRNA za GLUT1 povečala kar za faktor 9, čemur je sledilo tudi izražanje proteina v podobni meri (za faktor 10) glede na normoksijo (Wood in sod., 2007) bi lahko sklepali, da je odziv preadipocitov na hipoksijo manjši kot odziv adipocitov, kar je v skladu z ugotovitvami Wang in sod (2008b), vendar pa gre zopet za razlike v metodah pri naši raziskavi in pri raziskavi Wood in sod. (2007).

Laktat se transportira preko celične membrane s pomočjo različnih transporterjev, med drugim tudi MCT4, ki je prisoten tudi v humanih preadipocitih (Pérez de Heredia in Wood, 2010). Pričakovali smo, da se bo raven MCT4, v skladu z večjo porabo glukoze in večjo produkcijo laktata v razmerah hipoksije, povišal.

Analiza rezultatov pokaže, da je prišlo v razmerah hipoksije v povprečju do 3-kratnega povišanja ravni prenašalca MCT4, kar je razvidno na Sliki 2. Naš rezultat je v skladu s študijo Pérez de Heredia in Wood (2010), v kateri so po 24-urni hipoksiji dobili 2,4-kratno povišanje ravni mRNA za gen MCT4 v človeških SGBS preadipocitih. V omenjeni študiji niso zaznali razlik v izražanju MCT1 in MCT2 po izpostavitvi hipoksiji, po čemer lahko sklepamo, da je laktatni transporter MCT4 v preadipocitih najbolj odziven na hipoksijo. Ker nismo označevali celic za MCT1 in MCT2, ne moremo dokončno oceniti vloge posameznih monokarboksilatnih prenašalcev pri izločanju laktata.

Podobne razlike smo dobili tudi pri označevanju za GLUT1. Rezultata skupaj kažeta na to, da so presnovni procesi pri preadipocitih v hipoksiji oz. debelosti spremenjeni, pri čemer verjetno pride do pospešenega izločanja laktata.

Izražanje TNF- α v belem maščobnem tkivu so prvotno odkrili pri glodalcih, pri čemer so opazili njegovo povečano izražanje pri debelih osebkih (Hotamisligil in sod., 1994).

Maščobno tkivo debelih oseb izloča več TNF- α kot tkivo normalno prehranjenih oseb, Wang in sod. (2007) pa so pokazali nespremenjeno raven gena za TNF- α po 24-urnem tretiranju humanih adipocitov s hipoksičnim mimetikom CoCl₂ in v hipoksičnih razmerah (1 % O₂).

Glede na poročanja o povečanem izražanju TNF- α v debelosti smo pričakovali, da bo raven TNF- α v hipoksiji narasla, vendar je bil približno za faktor 1,5 nižji kot v celicah, inkubiranih v razmerah normoksijske (Slika 3). Naši nepričakovani rezultati so morda lahko posledica razmer *in vitro*, o čemer so že poročali Fain in sod. (2008), lahko pa so tudi posledica katerega izmed korakov v tretiranju celic pred in med poskusi. Poudariti je potrebno tudi, da je TNF- α sekrecijski protein, mi pa smo zaznali le tisto frakcijo, ki je ostala v notranjosti celice. Druge študije za kvantifikacijo adipokinov, izločenih v celični medij, uporabljajo test ELISA (Wang in sod., 2007, Wang in sod., 2008b; Mack in sod., 2009). Zanimiva je študija Mack in sod. (2009), pri kateri so v preadipocitih celične linije SGBS izražanje TNF- α zaznali šele po stimulaciji s samim TNF- α , katerega glavni vir so po navajanju Weisberg (2003) v maščobnem tkivu makrofagi, proteina pa sploh niso uspeli zaznati. Ker je bil signal za TNF- α tudi v naši študiji šibek, bi to lahko pomenilo, da preadipociti niso pomemben vir TNF- α v maščobnem tkivu.

Študije so pokazale, da je raven IL-6 v človeškem organizmu v sorazmerju s povišanjem telesne teže, povečanim obsegom pasu in ravnjo prostih maščobnih kislin v krvi (Vozarova in sod., 2001).

V naši raziskavi se je raven IL-6 povišala za faktor 1,8 (Slika 4). Povišana raven proteina v preadipocitih v naši raziskavi ter nespremenjena sekrecija proteina v raziskavi Wang in sod. (2008b) lahko kažeta na to, da sekrecijski odziv potrebuje več časa, da se odzove na hipoksijo kot mehanizem na ravni sinteze proteinov. Ker so v omenjeni študiji uporabili konfluentne celice in drugačen način zaznavanja proteinov, pa so razlike v rezultatih lahko tudi posledica različne metodologije. Nedavna študija (Mack in sod., 2009) kaže, da preadipociti pomembno pripomorejo k skupnemu izločanju adipokinov. Po izpostavitvi hipoksiji se izločanje IL-6 poveča za faktor 3,5, kar je v skladu z našimi rezultati. Vsaka zabeležena sprememba bi lahko v debelosti delovala na lokalni, parakrini ravni, npr. na že

omenjeno zmanjšano izločanje protivnetnega adiponektina in označevalcev diferenciacije v človeških adipocitih (Rotter Sopasakis in sod., 2004).

6 SKLEPI

Cilj magistrske naloge je bil preveriti spremembe v izražanju nekaterih membranskih proteinov in adipokinov v človeških preadipocitih v razmerah hipoksije, ki je povezana z debelostjo. Pri raziskavah smo uporabili imunocitokemično metodo označevanja proteinov in konfokalno mikroskopijo.

Prišli smo do naslednjih sklepov:

- Potrdili smo hipotezo, da se bo izražanje izbranih proteinov v hipoksiji spremenilo.
- V razmerah hipoksije se je raven označenega proteina GLUT1 povečala za faktor 2,1, MCT4 za faktor 3 in IL-6 za faktor 1,8. Ti rezutati so potrdili naša pričakovanja, da bo hipoksija povzročila povišanje ravni GLUT1, MCT4 in IL-6.
- V razmerah hipoksije se je raven označenega proteina TNF- α zmanjšala za faktor 1,5. Ta rezultat je v nasprotju s pričakovanjem, da bo hipoksija povzročila povišanje ravni TNF- α .
- Rezultata za GLUT1 in MCT4 kažeta na to, da imajo preadipociti v hipoksiji/ debelosti spremenjeno presnovo.
- Na podlagi rezultatov za MTC4 in literature sklepamo, da se izločanje laktata iz preadipocitov pri hipoksiji/ debelosti verjetno poveča.
- Zabeležen doprinos preadipocitov k izločanju IL-6 bi lahko deloval na lokalni ravni in doprinesel k lokalnemu vnetju.

7 POVZETEK

Sesalsko maščobno tkivo je obsežen organ, katerega glavna funkcija je skladiščenje energije v obliki maščob in njihova mobilizacija v odziv na potrebe organizma. Preko izločanja sekrecijskih molekul – adipokinov izvaja tudi endokrino funkcijo. Glavne celice maščobnega tkiva so adipociti, sestavlajo pa ga tudi drugi tipi celic, kot so preadipociti, imunske in endotelne celice. Odstopanja od optimalne količine maščevja lahko vodijo v spremembe v njegovem delovanju. V debelosti so te spremembe povezane z znižanjem parcialnega tlaka O_2 v maščobnem tkivu, ki je posledica povečanja adipocitov in nezadostne prekrvavitve tkiva. Vplivi hipoksije na celice vključujejo porast anaerobne presnove, kar vodi v povečan privzem glukoze in porast laktata, ki ga celica izloča preko monokarboksilatnih prenašalcev. Spremembe v izločanju adipokinov pa vodijo v nastanek lokalnega vnetja, ki je lahko podlaga za vrsto presnovnih bolezni. Preadipociti predstavljajo 20-40 % maščobnega tkiva. Študije kažejo, da hipoksija vpliva tudi na njihovo presnovo in izločanje adipokinov, sposobni pa so tudi precejnjega vnetnega odziva. Kljub temu so posledice hipoksije na preadipocite slabo poznane, saj se večina študij na tem področju osredotoča na adipocite kot glavne celice maščobnega tkiva. V magistrski nalogi smo želeli preveriti vpliv umetno vzpostavljenih hipoksije na izražanje glukoznega prenašalca 1 (GLUT1) in monokarboksilatnega prenašalca 4 (MCT4), ki sodelujeva v presnovi glukoze v celicah, ter adipokinov TNF- α in IL-6 v humanih preadipocitih. Pričakovali smo, da se bodo ravni izbranih proteinov v odziv na hipoksijo povisale. Da bi preverili naše hipoteze, smo celice 24 h gojili v razmerah normoksije (18 % O_2) in v razmerah hipoksije (1 % O_2) in jih nato imunocitokemično označili za izbrane proteine. Fluorescentno označene celice smo opazovali in poslikali s pomočjo konfokalnega mikroskopa. Podatke iz hipoksičnih in normoksičnih razmer smo nato statistično obdelali, predstavili na grafih in jih primerjali med sabo. V tej študiji smo za potrebe raziskav na tem področju imunocitokemijo uporabili prvič. Omogočila nam je neposreden prikaz izražanja proteinov na ravni celice. Dobili smo naslednje rezultate: raven GLUT1 se je povisala za faktor 2,1, raven MCT4 za faktor 3, raven IL-6 za faktor 1,8, raven TNF- α pa se je znižala, in sicer za faktor 1,7. Na podlagi teh izsledkov smo uspeli potrditi hipotezo, da se ravni izbranih proteinov v razmerah hipoksije spremenijo. Za GLUT1, MCT4 in IL-6 smo potrdili tudi hipotezo o zvišanju ravni proteinov v odziv na

hipoksijo, ovrgli pa smo hipotezo, da hipoksija povzroči zvišanje ravni TNF- α . Na podlagi rezultatov za GLUT1 in MCT4 lahko sklepamo, da je presnova glukoze v preadipocitih v debelosti/ hipoksiji spremenjena in da pride do povečanega izločanja laktata. Rezultati za GLUT1 v primerjavi z literaturo bi lahko kazali na zmanjšan odziv preadipocitov na hipoksijo v primerjavi z adipociti. Nepričakovani rezultat označevanja celic za TNF- α je lahko posledica *in vitro* razmer, razmer pred ali med poskusi ali pa dejstva, da gre za sekrecijski protein, z našo metodo pa smo zaznali le znotrajcelični delež. Pri IL-6 smo po drugi strani pokazali porast njegove ravni po izpostavitvi hipoksiji, kar je v skladu z literaturo.

8 VIRI

- Arnett H.A., Mason J., Marino M., Suzuki K., Matsushima G.K., Ting J.P.Y. 2001. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience*, 4, 11: 1116-1122
- Azeez O.I., Meintjes R., Chamunorwa J.P. 2014. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids in Health and Disease*, 13: 71
- Bastard J.-P., Jardel C., Bruckert E., Blondy P., Capeau J., Laville M., Vidal H., Hainque B. 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85, 9: 3338-3342
- Bouloumié A., Curat C.A., Sengenès C., Lolmède K., Miranville A., Busse R. 2005. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 8: 347–354
- Birsoy K., Festuccia W.T., Laplante M. 2013. A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126, 7: 1541-1552
- Chen G., Goeddel D.V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 5573: 1634–1635
- Choi C.S., Kim Y.B., Lee F.N., Zabolotny J.M., Kahn B.B., Youn J.H. 2002. Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 283: 233–240
- Choi S., Cho K., Kim J., Yea K., Park G., Lee J., Ryu S.H., Kim J., Kim Y.H. 2009. Comparative proteome analysis using amine-reactive isobaric tagging reagents coupled with 2D LC/MS/MS in 3T3-L1 adipocytes following hypoxia or normoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383: 135–140
- Chung S., LaPoint K., Martinez K., Kennedy A., Boysen Sandberg M., McIntosh M.K. 2006. Preadipocytes mediate LPS-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*, 147, 11: 5340-5351

- Cook K.S., Min H.Y., Johnson D., Chaplinsky R.J., Flier J.S., Hunt C.R., Spiegelman B.M. 1987. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*, 237, 4813: 402-405
- Dahlman I., Elsen M., Tennagels N., Korn M., Brockmann B., Sell H., Eckel J., Arner P. 2012. Functional annotation of the human fat cell secretome. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118: 84–91
- Di Girolamo M., Newby F.D., Lovejoy J. 1992. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *The FASEB Journal*, 6: 2405–2412
- Dominguez H., Storgaard H., Rask-Madsen C., Steffen Hermann T., Ihlemani N., Baunbjerg Nielsen D., Spohr C., Kober L., Vaag A., Torp-Pedersen C. 2005. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor- α blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *Journal of Vascular Research*, 42, 6: 517–525
- Ellingsgaard H., Hauselmann I., Schuler B., Habib A.M., Baggio L.L., Meier D.T., Eppler E., Bouzakri K., Wueest S., Muller Y.D., Kruse Hansen A.M., Reinecke M., Konrad D., Gassmann M., Reimann F., Halban P.A., Gromada J., Drucker D.J., Gribble F.M., Ehses J.A., Donath M.Y. 2011. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nature Medicine*, 17, 11: 1481–1489
- Enomoto T., Ohashi K., Shibata R., Higuchi A., Maruyama S., Izumiya Y., Walsh K., Murohara T., Ouchi, N. (2011). Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 40: 34552-34558
- Fain J.N., Madan A.K., Hiler M.L., Cheema P., Bahouth S.W. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 145, 5: 2273–2282
- Fain J.N., Buehrer B., Bahouth S.W., Tichansky D.S., Madan A.K. 2008. Comparison of messenger RNA distribution for 60 proteins in fat cells vs the nonfat cells of human omental adipose tissue. *Metabolism*, 57, 7: 1005-1015

- Fèvre B., Bastard J.-P. 2009. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 5: 305-311
- Fried S.K., Bunkin D.A., Greenberg A.S. 1998. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 3: 847-850
- Gatenby R.A., Gillies R.J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4: 891-899
- Goossens G.H., Bizzarri A., Venteclef N., Essers Y., Cleutjens J.P., Konings E., Jocken J.W., Cajlakovic M., Ribitsch V., Clément K., Blaak E.E. 2011. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization and inflammation. *Circulation*, 124: 67-76
- Halestrap A.P., Meredith, D. 2004. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv*, 447, 5: 619-628
- Hansen D. Dendale P., Beelen M., Jonkers R.A., Mullens A., Corluy, L., Meeusen R., van Loon L.J. 2010. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *European Journal of Applied Physiology*, 109, 3: 397–404
- Hauner H. 2005. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 163–169
- Hector J. 2007. TNF- α alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Hormone and Metabolic Research*, 39, 4: 250–255
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Neven G., Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374: 1–20
- Hivert M.F., Sullivan L.M., Fox C.S., Nathan D.M., D'Agostino R.B. Sr., Wilson P.W., Meigs J.B. 2008. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93, 8: 3165–3172

- Hodson L., Humphreys S.M., Karpe F., Frayn K.N. 2013. Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. *Diabetes*, 62, 5: 1417-1425
- Höpfel G., Ogunshola O., Gassmann M. 2004. HIFs and tumors: causes and consequences. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286: 608–623
- Hosogai N., Fukuhara A., Oshima K., Miyata Y., Tanaka S., Segawa K., Furukawa S., Tochino Y., Komuro R., Matsuda M., Shimomura I. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56, 4: 901-911
- Hotamisligil G.S. in Spiegelman B.M. (1994) Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity diabetes link. *Diabetes*, 43: 1271–1278
- Hotamisligil G.S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444: 860-867
- Kashan A., Tunaru S., Tang C., Müller M., Gille A., Sassmann A., Hanson J., Offermanns S. 2010. An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metabolism*, 11, 4 : 311-319
- Kern P.A., Ranganathan S., Li C., Wood L., Ranganathan G. 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280, 5: 745-751
- Klover P.J., Zimmers T.A., Koniaris L.G., Mooney R.A. 2003. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, 52: 2784–2789
- Lacasa D., Taleb S., Keophiphath M., Miranville A., Clement K. 2007. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*, 148, 2: 868-877
- Lagathu C., Bastard J.P., Auclair M., Maachi M., Capeau J., Caron M. 2003. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311: 372–379
- Liu C., Wu J., Zhu J., Kuei C., Yu J., Shelton J., Sutton S.W., Li X., Yun S.J., Mirzadegan T., Mazur C., Kamme F., Lovenberg T.W. 2009. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 2811–2822

- Lolmède K., Durand de Saint Front V., Galitzky J., Lafontan M., Bouloumiè A. 2003. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *International Journal of Obesity*, 27: 1187–1195
- Mack I., BelAiba R.S., Djordjević T., Görlach A., Hauner H., Bader B.L. 2009. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNF α exposure. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297: 735-748
- Makki K., Froguel P., Wolowczuk I. 2013. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013
- Matsumoto S., Hyodo F., Subramanian S., Devasahayam N., Munasinghe J., Hyodo E., Gadisetti C., Cook J.A., Mitchell J.B., Krishna M.C. 2008. Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118: 1965–1973
- Mazzatti D., Lim F.L., O'Hara A., Wood I.S., Trayhurn P. 2012. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118, 3: 112-120
- Mohamed-Ali V., Goodrick S., Rawesh A., Katz D.R., Miles J.M., Yudkin J.S., Klein S., Coppack S.W. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 12: 4196-4200
- Nieto-Vazquez I., Fernández-Veledo S., de Alvaro C., Lorenzo M. (2008) Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*, 57: 3211–3221
- Odegaard J.I., Chawla A. 2013. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*, 339, 6116: 172-177
- Ohashi K., Shibata R., Murohara T., Ouchi, N. 2014. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends in endocrinology and metabolism*, 25, 7: 348-355
- Ord J.J., Streeter E.H., Roberts I.S.D., Cranston D., Harris A.L. 2005. Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 93, 3: 346-354

- Pasarica M., Sereda O.R., Redman L.M., Albarado D.C., Hymel D.T., Roan L.E., Rood J.C., Burk D.H., Smith S.R. 2009. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity - evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*, 58, 3: 718-725
- Pérez de Heredia F., Wood I.S. 2010. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, MCT4) expression in human adipocytes. *Pflügers Archiv*, 459: 509–518
- Py G., Eydoux N., Lambert K., Chapot R., Koulmann N., Sanchez, H., Bahi L., Peinnequin A., Mercier J., Bigard A.X. 2005. Role of hypoxia-induced anorexia and right ventricular hypertrophy on lactate transport and MCT expression in rat muscle. *Metabolism*, 54, 5: 634-644
- Rausch M.E., Weisberg S., Vardhana P., Tortoriello D.V. 2008. Obesity in C57BL/6J mice is characterised by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International Journal of Obesity*, 32: 451–463
- Rooney K., Trayhurn P. 2011. Lactate and the GPR81 receptor in metabolic regulation: implications for adipose tissue function and fatty acid utilisation by muscle during exercise. *British Journal of Nutrition*, 106: 1310–1316
- Rotter V., Nagaev I., Smith U. 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 45777–45784
- Rotter Sopasakis V., Larsson B.M., Johansson A., Holmäng A., Smith U. 2004. Short-term infusion of interleukin-6 does not induce insulin resistance in vivo or impair insulin signalling in rats. *Diabetologia*, 47: 1879–1887
- Samuel D.J., Sundararaj K.P., Nareika A., Lopes-Virella M.F., Huang Y. 2009. Lactate boosts TLR4 signaling and NF- κ B pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *Journal of Immunology*, 182: 2476–2484
- Semenza G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3: 721–732
- Senn J.J., Klover P.J., Nowak I.A., Zimmers T.A., Koniaris L.G., Furlanetto R.W., Mooney R.A. 2002. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential

- mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 13740–13746
- Stanley T.L., Zanni M.V., Johnsen S., Rasheed S., Makimura H., Lee H., Khor V.K., Ahima R.S., Grinspoon S.K. 2011. TNF- α antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96, 1: 146–150
- Starkie R., Ostrowski S.R., Jauffred S., Febbraio M., Pedersen B.K. 2003. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17, 8: 884-886
- Stouthard J.M.L., Oude Elferink R.P.J., Sauerwein H.P. 1996. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220: 241–245
- Sun K., Halberg N., Khan M., Magalang U.J., Scherer P.E. 2013. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 α ameliorates adipose tissue dysfunction. *Molecular and Cellular Biology*, 33: 904–917
- Symonds M.E. 2012. Adipose tissue biology. 1. izdaja. New York, Springer-Verlag: 413 str.
- Trayhurn P., Wood I.S. 2004. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 92: 347–355
- Trayhurn P., Wang B., Wood I.S. 2008. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*, 100, 02: 227-235
- Trayhurn P., Drevon C.A., Eckel J. 2011. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle: adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 117: 47–56
- Trayhurn P. 2013. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological Reviews*, 93, 1: 1-21
- Trayhurn P. 2014. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annual Review of Nutrition*, 34: 207-236

- Ullah M.S., Davies A.J., Halestrap A.P. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 14: 9030-9037
- Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W., Hotamisligil G.S. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389, 6651: 610–614
- Van Hall G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock N., Møller K., Saltin B., Febbraio M.A., Pedersen B.K. 2003. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 7: 3005-3010
- Vozarova B., Weyer C., Hanson K., Tataranni P.A., Bogardus C., Pratley R.E. 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity Research*, 9, 7: 414–417
- Wang B., Wood I.S., Trayhurn P. 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflügers Archiv*, 455, 3: 479–492
- Wang B., Wood I.S., Trayhurn P. 2008a. PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 1: 88–93
- Wang B., Wood I.S., Trayhurn P. 2008b. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *Journal of Endocrinology*, 198: 127–134
- Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 12: 1796–1808
- WHO technical reports series no. 894 - Obesity: preventing and managing the global epidemic. 2000. World Health Organization: 253 str.
- Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H. 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323: 630–635
- Wood S., Wang B., Lorente-Cebrián S., Trayhurn P. 2007. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake

- in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 2: 468-473
- Wood S.I., de Heredia F.P., Wang B., Trayhurn P. 2009. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 68: 370–377
- Xu H., Sethi J.K., Hotamisligil G.S. 1999. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 37: 26287–26295
- Ye J., Gao Z., Yin J., He Q. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293: 1118–1128
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature*, 372: 425–432

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila svoji mentorici prof. dr. Heleni Chowdhury za pomoč, iznajdljivost, potrpežljivost in koristne komentarje, ki so pri izdelavi naloge odigrali zelo pomembno vlogo.

Hvala tudi somentorju akad. prof. Robertu Zorcu in recenzentu prof. dr. Marku Kreftu za pregled dela, popravke in predloge.

Posebna zahvala gre Marku, Vitu in Maji za prijateljsko pomoč in podporo ter vedno odlično vzdušje v laboratoriju z najlepšim razgledom.

Nenazadnje pa se zahvaljujem tudi moji družini, Gašperju in vsem ostalim, ki vas imam najrajši in mi vztrajno stojite ob strani.