

Adrian Sówka

**Desaturaza stearoilo-CoA 1 jako regulator metabolizmu i funkcji
wydzielniczej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej
w zaburzeniach towarzyszących otyłości**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnej Biochemii
Medycznej
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Paweł Dobrzyń

Warszawa, 2024

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów	6
2. Streszczenie	13
3. Abstract	15
4. Wstęp	17
4.1. Budowa i funkcja tkanki tłuszczowej	17
4.2. Biała tkanka tłuszczowa.....	17
4.3. Brunatna tkanka tłuszczowa	18
4.4. Beżowa tkanka tłuszczowa	19
4.5. Różnicowanie się adipocytów	20
4.6. Metabolizm tkanki tłuszczowej	22
4.6.1. Lipogeneza.....	22
4.6.2. Lipoliza.....	25
4.6.3. β -oksydacja kwasów tłuszczowych	27
4.6.4. Łańcuch oddechowy	28
4.7. Stan zapalny tkanki tłuszczowej	30
4.7.1. Biała tkanka tłuszczowa	30
4.7.2. Brunatna i beżowa tkanka tłuszczowa.....	33
4.8. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa	34
4.9. Desaturaza stearoilo-CoA 1	38
4.9.1. Regulacja ekspresji i aktywności desaturazy stearoilo-CoA.....	38
4.9.2. Rola SCD1 w regulacji metabolizmu	39
4.9.3. Rola SCD1 w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej	40
4.9.4. Rola SCD1 w funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego	41
5. Założenia i cele pracy	43
6. Materiały i metody.....	44
6.1. Model <i>in vivo</i>	44
6.1.1. Analiza biochemiczna osocza.....	44
6.1.2. Dootrzewnowy test obciążenia glukozą	45
6.1.3. Przygotowanie tkanek do analiz histologicznych.....	45
6.1.4. Barwienia histochemiczne	46
6.1.5. Analizy histologiczne	46
6.1.6. Mikroskopia elektronowa	47
6.1.7. Gęstość sieci naczyń krwionośnych	47
6.1.8. Pomiar aktywności ATGL.....	48
6.1.9. Badanie polaryzacji makrofagów z użyciem cytometrii przepływowej.....	49

6.2.	Modele <i>in vitro</i>	49
6.2.1.	Okołonaczyniowe adipocyty pierwotne	49
6.2.2.	Otrzymywanie medium pochodowlanego.....	50
6.2.3.	Pomiar zawartości adipokin w medium pochodowlanym.....	50
6.2.4.	Barwienie komórek czerwienią oleistą.....	51
6.2.5.	Pomiar tempa lipolizy.....	51
6.2.6.	Pomiar dokomórkowego transportu glukozy	52
6.2.7.	Pomiar poziomu ATP	52
6.2.8.	Przygotowanie kwasów tłuszczowych połączonych z albuminą	53
6.2.9.	Ocena toksyczności kwasów tłuszczowych	53
6.2.10.	Barwienie immunocytochemiczne.....	55
6.2.11.	Pomiar tempa zużycia tlenu	55
6.2.12.	Pomiar produkcji reaktywnych form tlenu	56
6.2.13.	Pomiar masy mitochondriów i potencjału błonowego	56
6.2.14.	Immunoprecypitacja chromatyny	56
6.2.15.	ChIP-qPCR	58
6.2.16.	Komórki śródbłónka	59
6.2.17.	Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych.....	60
6.2.18.	Traktowanie komórek medium pochodowlanym znad okołonaczyniowych adipocytów	60
6.2.19.	Test angiogenezy <i>in vitro</i>	61
6.2.20.	Test migracji VSMC	61
6.2.21.	Pomiar tempa proliferacji z użyciem cytometrii przepływowej	62
6.2.22.	Analiza wpływu angiotensyny II na przeżywalność VSMC	62
6.2.23.	Badanie zdolności skurczu VSMC	63
6.3.	Badanie poziomu białek metodą Western blotting	64
6.3.1.	Homogenizacja tkanek	64
6.3.2.	Liza komórek.....	64
6.3.3.	Pomiar stężenia białka	64
6.3.4.	Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących	65
6.3.5.	Transfer białek na membranę i immunodetekcja	65
6.4.	Izolacja lipidów z tkanek i komórek.....	68
6.5.	Rozdział lipidów obojętnych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)	68
6.6.	Analiza ilościowa kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS).....	69
6.7.	Analiza poziomu mRNA	71
6.7.1.	Izolacja RNA i synteza cDNA	71
6.7.2.	RT-qPCR	71

6.8.	Analiza statystyczna	73
6.9.	Lista odczynników	74
7.	Wyniki	78
7.1.	Fenotyp myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą wysokotłuszczową (HF)	78
7.2.	Test obciążenia glukozą.....	80
7.3.	Zmiany morfologiczne w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1-/-	81
7.4.	Zmiany w gęstości sieci naczyń krwionośnych w TPVAT i APVAT.....	83
7.5.	Zawartość kolagenu w ścianie aorty myszy	85
7.6.	Skład lipidów w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą HF.....	86
7.7.	Skład i zawartości kwasów tłuszczowych w TPVAT	88
7.8.	Skład i zawartości kwasów tłuszczowych w APVAT	95
7.9.	Zmiany wartości indeksu desaturacji kwasów tłuszczowych w TPVAT i APVAT	102
7.10.	Szlak lipolizy w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1-/-	103
7.11.	β -oksydacja kwasów tłuszczowych w PVAT myszy	105
7.12.	Funkcjonowanie mitochondriów w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1-/-	107
7.13.	Różnicowanie makrofagów w PVAT myszy WT i SCD1-/-	110
7.14.	Poziom markerów stanu zapalnego w PVAT myszy WT i SCD1-/-	114
7.15.	Wpływ braku SCD1 na metabolizm okołonaczyniowych adipocytów <i>in vitro</i> ...	116
7.16.	Wpływ kwasu palmitynowego na dynamikę mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach.....	118
7.17.	Wpływ kwasu palmitynowego na funkcję oddechową mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach.....	120
7.18.	Wpływ medium ACM na fenotyp VSMC.....	122
7.19.	Wpływ medium ACM na migrację i proliferację VSMC	125
7.20.	Wpływ medium ACM na zdolność VSMC do skurczu	128
7.21.	Wpływ medium ACM na aktywację EC.....	129
7.22.	Wpływ wyciszenia SCD1 na profil adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty	133
7.23.	Wpływ SCD1 na epigenetyczną regulację ekspresji <i>Adipoq</i> i <i>Il-6</i>	134
8.	Dyskusja	138
8.1.	Wpływ wyciszenia SCD1 i diety HF na fenotyp myszy.....	138
8.2.	Rola SCD1 w regulacji lipolizy w PVAT.....	139
8.3.	Rola SCD1 w regulacji β -oksydacji w PVAT	141
8.4.	Wpływ wyciszenia SCD1 na dynamikę mitochondriów w PVAT	143
8.5.	Wpływ diety HF na rozwój reakcji zapalnej w PVAT	144
8.6.	Oddziaływanie pomiędzy okołonaczyniowymi adipocytami a VSMC	146
8.7.	Wpływ SCD1 na oddziaływanie pomiędzy okołonaczyniowymi adipocytami a EC	149

8.8. Rola SCD1 w regulacji ekspresji genów adiponektyny i IL-6	152
8.9. Podsumowanie	154
9. Wnioski końcowe	157
10. Bibliografia.....	158
11. Spis publikacji doktoranta.....	193

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AAA** (ang. abdominal aorta aneurysm) - tętniak aorty brzusznej
- ABHD5** (ang. α/β -hydrolase domain-containing protein 5) - białko zawierające domenę α/β -hydrolazy 5
- AC** (ang. adenyl cyclase) - cyklaza adenylanowa
- ACC** (ang. acetyl-CoA carboxylase) - karboksylaza acetylo-CoA
- ACLY** (ang. ATP citrate lyase) - ATP-liaza cytrynianowa
- ACM** (ang. adipocyte-conditioned medium) - medium pochodzące z adipocytów
- ACS** (ang. acyl-CoA synthase) - syntaza acylo-CoA
- ADIPOQ** (ang. adiponectin) - adiponektyna
- Adipor1/2** (ang. adiponectin receptor 1/2) - receptor adiponektyny 1/2
- AGPAT** (ang. acylglycerol-3-phosphate acyltransferase) - acylotransferaza acyloglicerolo-3-fosforanowa
- AHSG** (ang. alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein) - glikoproteina alfa-2-Heremans-Schmid
- AKT** (ang. protein kinase B) - kinaza białkowa B
- AMPK** (ang. AMP-activated protein kinase) - kinaza białkowa aktywowana przez AMP
- AngII** (ang. angiotensin II) - angiotensyna II
- ANGPT-L3** (ang. angiopoietin-like 3) - angipoetyna L3
- ANP** (ang. atrial natriuretic peptide) - przedsionkowy peptyd natriuretyczny
- APC** (ang. adipose progenitor cells) - komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej
- APVAT** (ang. abdominal perivascular adipose tissue) - brzuszny odcinek okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej
- ATGL** (ang. adipose triglyceride lipase) - swoista dla adipocytów lipaza triacylogliceroli
- ATP** (ang. adenosine triphosphate) - adenozyntrifosforan
- BAT** (ang. brown adipose tissue) - brunatna tkanka tłuszczowa
- Bcl2** (ang. B-cell lymphoma protein 2) - białko chłoniaka komórek B 2
- BeAT** (ang. beige adipose tissue) - beżowa tkanka tłuszczowa
- BMP2/4** (ang. bone morphogenic protein 2/4) - czynnik morfogenezy kości 2/4
- C/EBP** (ang. CAAT/enhancer binding protein) - białko wiążące CAAT/enhancer
- CACT** (ang. carnitine-acylcarnitine translocase) - translokaza karnityny-acylokarnityny
- CALD1** (ang. caldesmon) - kaldesmon
- cAMP** (ang. cyclic adenosine monophosphate) - cykliczny adenozyntomono fosforan

- cGMP** (ang. cyclic guanosine monophosphate) - cykliczny guanozynomonofosforan
- ChIP** (ang. chromatin immunoprecipitation) - immunoprecypitacja chromatyny
- ChREBP** (ang. carbohydrate regulatory element-binding protein) - białko wiążące element regulatorowy odpowiedzi na węglowodany
- Cidea** (ang. cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector a) - efektor A podjednostki alfa czynnika fragmentacji DNA indukującego śmierć komórki
- CPT1** (ang. palmitoyl transferase 1) - palmitoilotransferaza karnitynowa 1
- CREB** (ang. cAMP response element-binding protein) - białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
- CRP** (ang. C-reactive protein) - białko C-reaktywne
- DAG** (ang. diacylglycerols) - diacyloglicerol
- DAMP** (ang. damage-associated molecular patterns) - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem
- DEX** (ang. dexamethasone) - deksametazon
- DGAT** (ang. diacylglycerol acyltransferase) - acylotransferaza diacyloglicerolowa
- Drp1** (dynamin-related protein 1) - białko pokrewne dynaminie 1
- Ebf2** (ang. early B-cell factor 2) - czynnik wczesnego różnicowania komórek B 2
- EC** (ang. endothelial cells) - komórki śródbłónka
- EGF** (ang. epidermal growth factor) - czynnik wzrostu naskórka
- ELOVL** (ang. elongation of very long-chain fatty acids) - elongaza kwasów tłuszczowych
- eNOS** (ang. endothelial nitric oxide synthase) - śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
- ER** (ang. endoplasmic reticulum) - retikulum endoplazmatyczne
- ERK1/2** (ang. extracellular signal-regulated kinase) - kinaza regulowana przez sygnał zewnątrzkomórkowy
- EZH2** (ang. enhancer of Zeste 2) - metylotransferaza sekwencji wzmacniającej Zeste 2
- FABP4** (ang. fatty acid binding protein 4) - białko wiążące kwasy tłuszczowe 4
- FADH₂** (ang. flavin adenine dinucleotide) - dinukleotyd flawinoadenionowy
- FAS** (ang. fatty acid synthase) - syntaza kwasów tłuszczowych
- FAT** (ang. fatty acid translocase) - translokaza kwasów tłuszczowych
- FCCP** (ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) - fluorokarboksylowy cykliczny estr kwasu fosforowego
- FFA** (ang. free fatty acids) - wolne kwasy tłuszczowe
- FGF** (ang. fibroblast growth factor) - czynnik wzrostu fibroblastów
- Fis1** (ang. mitochondrial fission protein 1) - białko fizji mitochondriów 1

- FOXO1** (ang. forkhead box O1) - czynnik z rodziny forkhead box 1
- FSC** (ang. forward scatter) - rozproszenie do przodu
- G0S2** (ang. G0/G1 switch gene 2) - przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego
- Gapdh** (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
- GC/MS** (ang. gas chromatography/mass spectrometry) - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
- GC-A** (ang. guanyl cyclase) - cyklaza guanylanowa A
- GLUT4** (ang. glucose transporter 4) - transporter glukozy 4
- GPAT** (ang. glycerol-3-phosphate acyltransferase) - acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa
- GR** (ang. glikocorticosteroid receptor) - receptor glikokortykosteroidowy
- GR** (ang. glucocorticoid receptor) - receptor glukokortykoidowy
- Gs** (ang. stimulating G protein) - białko stymulujące G
- GTP** (ang. guanosine triphosphate) - guanozynotrifosforan
- HGF** (ang. hepatocyte growth factor) - czynnik wzrostu hepatocytów
- Hoxc8** (ang. homeobox c8) - homeoboks C8
- HSL** (ang. hormone-sensitive lipase) - lipaza wrażliwa na hormony
- IBMX** (ang. 3-isobutyl-1-methylxanthine) - 3-izobutyl-1-metyloksantyna
- ICAM-1** (ang. intracellular adhesion molecule 1) - międzykomórkowa cząsteczka adhezji 1
- IFN γ** - interferon gamma
- IGFBP** (ang. insulin-like growth factor binding protein) - białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
- IGF-I/II** (ang. insulin-like growth factor I/II) - insulipodobny czynnik wzrostu I/II
- IGFR** (ang. insulin-like growth factor receptor) - receptor dla insulionopodobnego czynnika wzrostu
- IL** (ang. interleukin) - interleukina
- IR** (ang. insulin receptor) - receptor insulinowy
- IRS** (ang. insulin receptor substrate) - substrat receptora insulinowego
- KLK** (ang. β -Klotho coreceptor) - koreceptor β -Klotho
- KLF4** (ang. Krüppel-like factor 4) - czynnik Krüppel-podobny
- KNG2** - kininogen 2
- LCHAD** (ang. long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza długłańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA

- LCKT** (ang. long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase) - tiolaza długołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA
- LDL** (ang. low-density lipoprotein) - lipoproteina o małej gęstości
- Lep** (ang. leptin) - leptyna
- LPL** (ang. lipoprotein lipase) - lipaza lipoproteinowa
- LPS** (ang. lipopolysaccharide) - lipopolisacharyd
- LRP1** (ang. low-density lipoprotein receptor related protein 1) - białko podobne do receptora lipoproteiny o małej gęstości 1
- LXR** (ang. liver X receptor) - receptor wątrobowy X
- MAG** (ang. monoacylglycerol) - monoacyloglicerole
- MAGL** (ang. monoacylglycerol lipase) - lipaza monoacylogliceroli
- MAPK** (ang. mitogen-activated protein kinase) - kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny
- MCAD** (ang. medium-chain acyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza średniołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA
- MCHAD** (ang. medium-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza średniołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA
- MCKT** (ang. medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase) - tiolaza średniołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA
- MCP1** (ang. monocyte chemotactic peptide 1) - peptyd chemotaktyczny monocytów 1
- Mest** (ang. mesoderm-specific transcript) - transkrypt specyficzny dla mezodermy
- Mfn1/2** (ang. mitofisn 1/2) - mitofuzyna 1/2
- mTOR** (ang. mechanistic target of rapamycin) - mechanistyczny cel dla rapamycyny
- mTORC1/2** (ang. mechanistic target of rapamycin) - kompleks mechanistycznego celu dla rapamycyny 1/2
- MUFA** (ang. monounsaturated fatty acids) - jednonienasycone kwasy tłuszczowe
- MyD88** (ang. myeloid differentiation factor 88) - czynnik różnicowania mieloidalnego 88
- Myf5** (ang. myogenic factor 5) - czynnik miogenezy 5
- MYH11** (ang. myosin heavy chain 11) - ciężki łańcuch miozyny 11
- NADH/NAD⁺** (ang. reduced/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide) - zredukowana/utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadenionowego
- Nampt** (ang. visfatin) - wizsfatyna
- NF-κB** (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - jądrowy czynnik transkrypcyjny enhancera lekkiego łańcucha kappa aktywowanych komórek B

- NLR** (ang. nucleotide binding oligomerization domain like receptor) - receptor podobny do białek zawierających domenę oligomeryzacji nukleotydów
- NLRP3** (ang. . nucleotide-oligomerization domain-containing protein-like receptor) - inflammasom
- Nnat** (ang. neuronatin) - neuronatyna
- Opa1** (ang. optic atrophy protein 1) - białko atrofia optycznej 1
- OXPHOS** (ang. oxidative phosphorylation complexes) - kompleksy białkowe fosforylacji oksydacyjnej
- PAP** (ang. phosphatidate phosphatase) - fosfataza kwasu fosfatydowego
- PCNA** (ang. proliferating cell nuclear antigen) - jądrowy antygen komórek proliferujących
- PDE3B** (ang. phosphodiesterase 3B) - fosfodiesteraza 3B
- Pdgfra** (ang. platelet-derived growth factor receptor alpha) - receptor A czynnika wzrostu wydzielanego przez trombocyty
- PKD1** (ang. phosphoinositide-dependent kinase 1) - kinaza zależna od 3-fosfatydyloinozytolu
- PEPCK** (ang. phosphoenolpyruvate carboxykinase) - karboksykinaza fosfoenolopirogrnianu
- PGC1 α** (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) - koaktywator 1 alfa receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma
- PI3K** (ang. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate 3-Kinase) - kinaza 4,5-fosfatydyloinozytolu 3
- PKA** (ang. protein kinase A) - kinaza białkowa A
- PKC δ** (ang. protein kinase C δ) - kinaza białkowa C delta
- PKG** (ang. protein kinase G) - kinaza białkowa G
- PL** (ang. phospholipids) - fosfolipidy
- PLIN1** (ang. perilipin 1) - perylipina 1
- PPAR γ/α** (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ/α) - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma/alfa
- PPP** (ang. pentose phosphate pathway) - szlak pentozofosforanowy
- Prdm16** (ang. PR domain containing 16) - białko zawierające domenę PR 16
- PREF-1** (ang. preadipocyte factor 1) - czynnik preadipocytów 1
- PTP1B** (ang. protein tyrosine phosphatase 1 B) - białkowa fosfataza tyrozyny 1 B
- PTX3** (ang. pentraxin 3) - pentraksyna 3
- PUFA** (ang. polyunsaturated fatty acids) - wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- qPCR** (ang. quantitative polymerase chain reaction) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

- RAGE** (ang. receptor for advanced glycation end products) - receptor dla zaawansowanych produktów końcowych glikacji
- RANTES** (ang. regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) - chemokina regulowana przy aktywacji, ulegająca ekspresji i wydzielana przez normalne komórki T
- Retn** (ang. resistin) - rezystyna
- ROS** (ang. reactive oxygen species) - reaktywne formy tlenu
- RZG** (ang. rosiglitazone) - rosiglitazon
- S6K** (ang. ribosomal protein S6 kinase) - kinaza białkowa rybosomalnego białka S6
- SCAD** (ang. short-chain acyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza krótkołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA
- SCD1** (ang. stearoyl-CoA desaturase 1) - desaturaza stearoilo-CoA 1
- SCHAD** (ang. short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza krótkołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA
- SFA** (ang. saturated fatty acids) - nasycone kwasy tłuszczowe
- SM22 α** (ang. transgelin) - transgelina
- Sncg** (ang. synuclein γ) - synukleina gamma
- SREBP1c** (ang. sterol regulatory element-binding protein 1c) - białko wiążące element regulatorowy odpowiedzi na sterole 1c
- SSC** (ang. side scatter) - rozproszenie w bok
- STK3/4** (ang. serine/threonine protein kinase 3/4) - kinaza serynowo-treoninowa 3/4
- SVF** (ang. stromal vascular fraction) - zrębowa frakcja naczyniowa
- TAG** (ang. triacylglycerols) - triacyloglicerole
- TGF β** (ang. transforming growth factor β) - transformujący czynnik wzrostu β
- TLR4** (ang. Toll-like receptor 4) - receptor Toll-podobny 4
- TNF** (ang. tumor necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworu
- TNFR** (ang. tumor necrosis factor receptor) - receptor czynnika martwicy nowotworu
- TPVAT** (ang. thoracic perivascular adipose tissue) - piersiowy odcinek okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej
- TSC2** (ang. tuberous sclerosis complex 2) - kompleks stwardnienia guzowego 2
- UCP1** (ang. uncoupling protein 1) - białko rozprzegające 1
- VAT** (ang. visceral adipose tissue) - trzewna tkanka tłuszczowa
- VCAM -1** (ang. vascular-cell adhesion molecule 1) - naczyniowa cząsteczka adhezji 1
- VEGF** (ang. vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłónki naczyń

VLCAD (ang. very long-chain acyl-CoA dehydrogenase) - dehydrogenaza bardzo długołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA

VLDL (ang. very low-density lipoprotein) - lipoproteina o bardzo małej gęstości

VSMC (ang. vascular smooth muscle cells) - komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych

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

WT (ang. wild type mouse) - mysz typu dzikiego

Zic1 (ang. zinc finger protein of the cerebellum 1) - białko z motywem palca cynkowego mózdzku

β3-AR (ang. β3-adrenergic receptor) - receptor adrenergiczny β3

2. STRESZCZENIE

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (PVAT) ze względu na bliskie sąsiedztwo ściany naczyń krwionośnych, utrzymuje homeostazę układu sercowo-naczyniowego poprzez lokalnie wydzielane adipokiny. W stanie otyłości, gdy funkcjonowanie PVAT jest zaburzone, profil uwalnianych adipokin faworyzuje rozwój stanu zapalnego naczyń oraz przekształcenie fenotypowe komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC). Zmiany te leżą u podstaw wielu schorzeń, takich jak miażdżycy czy nadciśnienie tętnicze. U myszy aortalna okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa dzieli się na odcinek piersiowy (TPVAT) i brzuszny (APVAT). TPVAT posiada cechy histologiczne i fizjologiczne zbliżone do brunatnej tkanki tłuszczowej, charakteryzując się wysoką aktywnością oksydacyjną i wysoką zawartością mitochondriów. Z kolei APVAT posiada cechy białej tkanki tłuszczowej, co wiąże się z magazynowaniem lipidów i niższą aktywnością metaboliczną.

Desaturaza stearoilo-CoA 1 (SCD1) katalizuje przekształcenie nasyconych kwasów tłuszczowych w jednonienasycone kwasy tłuszczowe. W trakcie otyłości ekspresja i aktywność SCD1 w tkance tłuszczowej wzrasta, co wpływa na metabolizm i zapalenie tkanki tłuszczowej. Brak ekspresji SCD1 zwiększa ekspresję cytokin prozapalnych, które promują rekrutację makrofagów i rozwój przewlekłego stanu zapalnego. Ponadto, myszy z brakiem SCD1 charakteryzują się pogłębionymi zmianami miażdżycowymi. Aktywacja SCD1 zmniejsza poziom zwapnienia w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz hamuje ich patologiczne przemodelowanie poprzez zmniejszanie akumulacji cholesterolu oraz wygaszanie prozapalnej aktywacji komórek śródbłonna. Dotychczasowe badania skupiały się na roli SCD1 w regulacji homeostazy naczyniowej, nie obejmowały natomiast interakcji pomiędzy PVAT a naczyniami krwionośnymi. Z tego powodu, celem niniejszej pracy doktorskiej było poznanie zależnych od SCD1 szlaków sygnałowych, zaangażowanych w regulację funkcjonowania PVAT w stanie fizjologicznym i w warunkach obciążenia dietą wzbogaconą w tłuszcz (HF).

Przeprowadzone badania wykazały, że PVAT myszy SCD1^{-/-}, w wyniku karmienia dietą HF, magazynuje mniej triacylogliceroli niż PVAT myszy typu dzikiego (WT). Było to związane ze zwiększoną aktywacją procesu lipolizy. Poziom fosforylacji kinazy aktywowanej przez AMP i poziom białka dehydrogenazy bardzo długołańcuchowych acylo-CoA kwasów tłuszczowych, będących markerami β -oksydacji kwasów tłuszczowych, był podwyższony w PVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF. Obserwacja ta była zgodna z wyższym poziomem białek łańcucha fosforylacji oksydacyjnej i białka rozpręgającego 1 oraz ze zwiększoną

gęstością grzebieni mitochondrialnych. Wyniki te sugerują, że adipocyty z wyciszoną ekspresją SCD1 posiadają zwiększoną aktywność kataboliczną oraz zdolność do termogenezy niż adipocyty WT. Zależność ta została również potwierdzona w modelu *in vitro*, gdzie adipocyty z brakiem SCD1 charakteryzowały się wyższym tempem zużycia tlenu oraz poziomem fragmentacji mitochondriów. W PVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF stwierdzono też wyższy poziom markerów stanu zapalnego oraz makrofagów M1 niż w PVAT myszy WT. W warunkach *in vitro* wykazano, że czynniki wydzielane przez adipocyty SCD1^{-/-} pobudzają angiogenezę oraz aktywację komórek śródbłonna (EC). VSMC traktowane czynnikami wydzielanymi przez adipocyty z brakiem ekspresji SCD1 ulegały patologicznym zmianom fenotypowym w większym stopniu niż VSMC traktowane czynnikami wydzielanymi przez adipocyty WT. Wyjaśnieniem tych zjawisk może być wyższy poziom prozapalnych adipokin wydzielanych przez adipocyty z wyciszeniem SCD1. Wykazano również, że SCD1 kontroluje ekspresję adiponektyny i interleukiny 6 poprzez zmiany w poziomie potrójnej metylacji histonu 3 na lizynie 27 (H3K27me3) w promotorach ich genów. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na kluczową rolę SCD1 w regulacji metabolizmu PVAT, który przekłada się na odpowiedni poziom aktywacji odpowiedzi zapalnej w adipocytach oraz utrzymanie homeostazy EC i VSMC.

3. ABSTRACT

Perivascular adipose tissue (PVAT), located adjacent to blood vessel walls, plays a critical role in maintaining cardiovascular homeostasis by secreting local adipokines. In obesity, the function of PVAT becomes impaired, and its adipokine profile promotes vascular inflammation and phenotypic switching of vascular smooth muscle cells (VSMCs). These changes underlie various conditions, such as atherosclerosis and hypertension. In mice, aortic PVAT is divided into thoracic (TPVAT) and abdominal (APVAT) segments. TPVAT shares histological and physiological traits with brown adipose tissue, exhibiting high oxidative activity and mitochondrial content, while APVAT resembles white adipose tissue, characterized by lipid storage and lower metabolic activity.

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) catalyzes the conversion of saturated fatty acids into monounsaturated fatty acids. During obesity, SCD1 expression and activity increase in adipose tissue, impacting its metabolism and inflammation. SCD1 deficiency elevates pro-inflammatory cytokine expression, promoting macrophage recruitment and chronic inflammation. Furthermore, SCD1-deficient mice exhibit more pronounced atherosclerotic changes. SCD1 also reduces calcification in VSMCs and prevents their pathological remodeling by decreasing cholesterol accumulation and suppressing endothelial cell (EC) pro-inflammatory activation. Although prior studies have explored the role of SCD1 in vascular homeostasis, they have not addressed interactions between PVAT and blood vessels. Therefore, this doctoral thesis aimed to investigate SCD1-dependent signaling pathways involved in PVAT function under physiological and high-fat diet (HF) conditions.

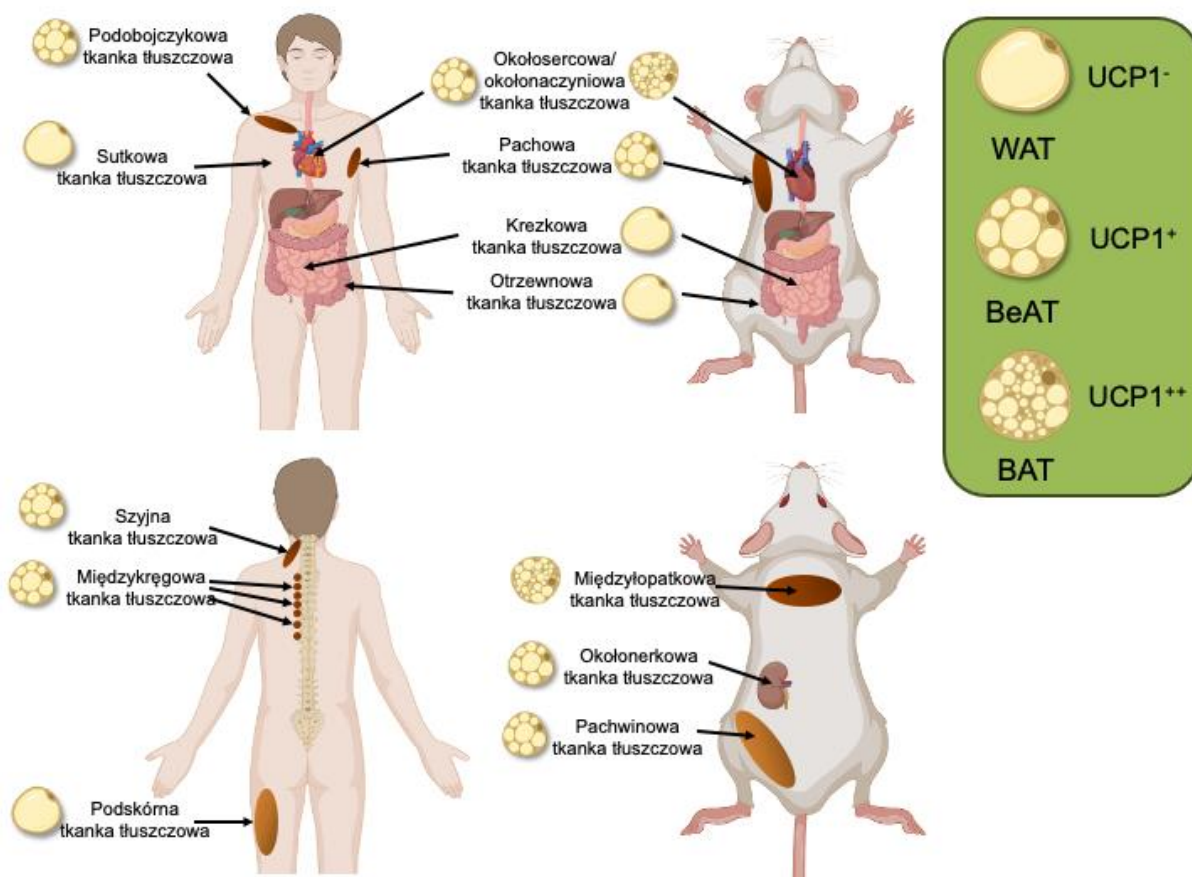
The study revealed that PVAT in SCD1-deficient mice stored less triglycerides when fed a HF diet compared to wild-type (WT) mice, correlating with increased lipolysis. Levels of AMP-activated protein kinase phosphorylation and very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, markers of fatty acid β -oxidation, were elevated in SCD1^{-/-} PVAT after HF diet. These findings align with higher levels of oxidative phosphorylation proteins, uncoupling protein 1, and increased mitochondrial cristae density, suggesting that SCD1^{-/-} adipocytes exhibit greater catabolic activity and thermogenic capacity than WT adipocytes. This trend was also confirmed *in vitro*, where SCD1^{-/-} adipocytes displayed higher oxygen consumption rates and mitochondrial fragmentation. Inflammatory markers and M1 macrophage levels were higher in PVAT of HF-fed SCD1^{-/-} mice than in WT PVAT. *In vitro* experiments demonstrated that factors secreted by SCD1^{-/-} adipocytes stimulated angiogenesis and EC activation. VSMCs exposed to SCD1^{-/-} adipocyte secretions underwent

more extensive pathological phenotypic changes than those treated with WT adipocyte secretions, likely due to elevated pro-inflammatory adipokines from SCD1^{-/-} adipocytes. Additionally, SCD1 was shown to regulate adiponectin and interleukin-6 expression through modifications in histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) at their gene promoters. The findings of this dissertation highlight the critical role of SCD1 in regulating PVAT metabolism, which affects inflammatory responses in adipocytes and maintains EC and VSMC homeostasis.

4. WSTĘP

4.1. Budowa i funkcja tkanki tłuszczowej

Ze względu na właściwości fizjologiczne oraz cechy histologiczne, tkankę tłuszczową dzielimy na trzy typy: białą tkankę tłuszczową (ang. white adipose tissue, WAT), brunatną tkankę tłuszczową (ang. brown adipose tissue, BAT) i beżową tkankę tłuszczową (ang. beige adipose tissue, BeAT) (Zwick i wsp., 2018). Główne rodzaje tkanki tłuszczowej i ich rozmieszczenie w ciele człowieka i myszy przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Lokalizacja anatomiczna tkanki tłuszczowej u człowieka i u myszy. BAT - brunatna tkanka tłuszczowa, BeAT - beżowa tkanka tłuszczowa, UCP1 - białko rozprzęgające 1, WAT - biała tkanka tłuszczowa.

4.2. Biała tkanka tłuszczowa

Podstawową funkcją WAT jest magazynowanie zapasów energetycznych w postaci triacylogliceroli (ang. triacylglycerols, TAG). Zarówno u człowieka, jak i u myszy WAT ze względu na anatomiczną lokalizację dzielimy na dwie części: trzewną i podskórną (Zwick i wsp., 2018). Trzewna tkanka tłuszczowa u ludzi stanowi 5-20% całkowitej masy WAT (Karastergiou i Fried, 2017). Trzewna tkanka tłuszczowa u ludzi znajduje się wewnątrz jamy otrzewnej i składa się z otrzewnowej tkanki tłuszczowej, związanej z siecią otrzewnową

i tworzącej tzw. fartuch tłuszczowy oraz z krezkowej tkanki tłuszczowej, związanej z kreską jelitową (Chusyd i wsp., 2016). Podskórna tkanka tłuszczowa stanowi około 80% WAT u ludzi i jest zlokalizowana głównie w okolicy brzusznej oraz pośladkowo-udowej (Karastergiou i Fried, 2017). U gryzoni w części trzewnej WAT wyróżnia się krezkową, okołonerkową i gonadową tkankę tłuszczową, natomiast podskórna tkanka tłuszczowa dzieli się na pachwinową i pachową (Zwick i wsp., 2018; Chusyd i wsp., 2016). W obrazie histologicznym WAT składa się adipocytów, których obszar w większości zajęty jest przez jedną, wielką kroplę lipidową, która spycha jądro komórkowe oraz pozostałe organelle na wąski obszar cytoplazmy, położony peryferyjnie (Reyes-Farias i wsp., 2021; Rosen i Spiegelman, 2014).

4.3. Brunatna tkanka tłuszczowa

W przeciwieństwie do WAT, BAT charakteryzuje się intensywnym katabolizmem kwasów tłuszczowych i termogenezą (Angueira i wsp., 2020). Pomimo, że BAT stanowi małą część całkowitej masy tkanki tłuszczowej u myszy i u ludzi, to w warunkach ekspozycji na niskie temperatury może zwiększyć wydatek energetyczny organizmu o 100% u myszy i o 40-80% u ludzi (Angueira i wsp., 2020, Ouellet i wsp., 2012). Obraz histologiczny BAT różni się znacząco od WAT, ponieważ w adipocytach BAT znajduje się wiele małych kropli lipidowych zamiast jednej wielkiej (Cannon i Nedergaard, 2004). Ponadto, BAT charakteryzuje się gęstym unaczynieniem, licznymi mitochondriami i ekspresją białka rozprzegającego 1 (ang. uncoupling protein 1, UCP1), odpowiedzialnego za termogenezę (Cannon i Nedergaard, 2004). Duże ilości BAT u noworodków znajdują się w przestrzeni międzyłopatkowej, jednak tkanka ta zanika w późniejszych etapach życia (Lidell i wsp., 2013). U dorosłych ludzi BAT obecna jest w przestrzeniach międzykręgowych, w regionie szyjnym, pachowym, wzdłuż tchawicy, naczyń krwionośnych oraz w okolicach nerek i nadnerczy (Lidell i wsp., 2013, Ouellet i wsp., 2011). U gryzoni BAT znajduje się głównie w przestrzeni międzyłopatkowej oraz regionach szyjnych, pachowych, okołonaczyniowych i okołonerkowych (Zhang i wsp., 2018). Aktywacja BAT u myszy chroni je przed przyrostem masy ciała i zespołem metabolicznym (Harms i Seale, 2013). Przeszczepienie BAT otyłym myszom zwiększyło ich wrażliwość na insulinę oraz zmniejszyło ich masę ciała (Liu i wsp., 2015; Min i wsp., 2016). Aktywacja BAT u ludzi również niesie korzyści metaboliczne poprzez zwiększenie wydatku energetycznego, wrażliwości na insulinę i redukcji masy ciała. Aktywowany BAT ma zdolność wychwytu chylomikronów i lipoprotein o bardzo małej

gęstości (ang. very low-density lipoprotein, VLDL) przez co zmniejsza stężenie TAG we krwi (Bartelt i wsp., 2011; Yoneshiro i wsp., 2019).

4.4. Beżowa tkanka tłuszczowa

W przeciwieństwie do BAT, obecność adipocytów przeprowadzających proces termogenezy w BeAT jest indukowalna i przejściowa. Proces pojawienia się brunatnych adipocytów w BeAT zwany jest brązowieniem, a same adipocyty określa się jako adipocyty beżowe (Cinti, 2005). Beżowe adipocyty zlokalizowane są wewnątrz WAT i podobnie jak adipocyty brunatne, charakteryzują się obecnością wielu małych kropli lipidowych, dużą liczbą mitochondriów i obecnością białka UCP1 (Cinti, 2005). Brązowienie jest zależne od czynników środowiskowych, takich jak niskie temperatury, wysiłek fizyczny, aktywacja receptora β 3-adrenergicznego (ang. β 3-adrenergic receptor, β 3-AR) czy farmakologiczna aktywacja receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) (Harms i Seale, 2013; Kajimura i wsp., 2015). Beżowe adipocyty rozwijają się wewnątrz WAT w wyniku różnicowania się komórek progenitorowych na drodze adipogenezy *de novo*, aktywacji termogenicznego fenotypu w już istniejących białych adipocytach lub jako efekt proliferacji beżowych adipocytów (Park i wsp., 2021; Shao i wsp., 2019; Wang i wsp., 2013).

Aktywacja brązowienia w tkance tłuszczowej uruchamia ekspresję genów specyficznych dla BAT. Dodatkowo, dochodzi do przemodelowania kropli lipidowych, w wyniku czego powstają adipocyty zawierające wiele mniejszych kropli oraz do rozwoju sieci mitochondrialnej (Kim i wsp., 2019). Różnicowanie się BeAT jest również regulowane przez makrofagi. Wykazano, że cytokiny wydzielane przez makrofagi M2, w szczególności interleukina 4 (ang. interleukin 4, IL-4), są w stanie aktywować brązowienie tkanki tłuszczowej (Fischer i wsp., 2017; Henriques i wsp., 2020; Qiu i wsp., 2014). W przeciwieństwie do BAT, uruchomienie brązowienia WAT zależy od czynników zewnętrznych i ma charakter przejściowy (Roh i wsp., 2018; Rosenwald i wsp., 2013). Ustanie stymulacji β 3-AR skutkuje utratą przez beżowe adipocyty ekspresji UCP1, oraz reorganizacją kropli lipidowych, które łączą się ze sobą tworząc ponownie jedną wielką kroplę, charakterystyczną dla WAT (Roh i wsp., 2018). Proces ten zależny jest od mitofagii, zależnej od ligazy ubikwityny E3: Parkiny oraz od kinaz serynowo-treoninowych 3 i 4 (ang. serine/threonine protein kinase 3/4, STK3/4) (Lu i wsp., 2018; Cho i wsp., 2021). Białe adipocyty, które powróciły do swojego pierwotnego fenotypu po przejściowej zamianie

w adipocyty beżowe (tzw. „adipocyty poprzednio beżowe”, ang. previously beige adipocytes) wykazują niewiele różnic w profilu ekspresji genów w porównaniu z białymi adipocytami, które nigdy nie przeszły procesu transróżnicowania (Roh i wsp., 2018). Niemniej jednak, adipocyty „poprzednio beżowe” wykazują zwiększoną obecność pojedynczej metylacji lizyny 4 histonu 3 (H3K4me1) w promotorach genów termogenezy. Znacznik ten jest często obecny w aktywnych promotorach i w znajdujących się ich sąsiedztwie sekwencjach wzmacniających (tzw. enhancerach). Dzięki temu adipocyty „poprzednio beżowe” mogą szybciej niż adipocyty białe uruchomić proces brązowienia w przypadku ponownego wystąpienia odpowiedniego bodźca (Roh i wsp., 2018).

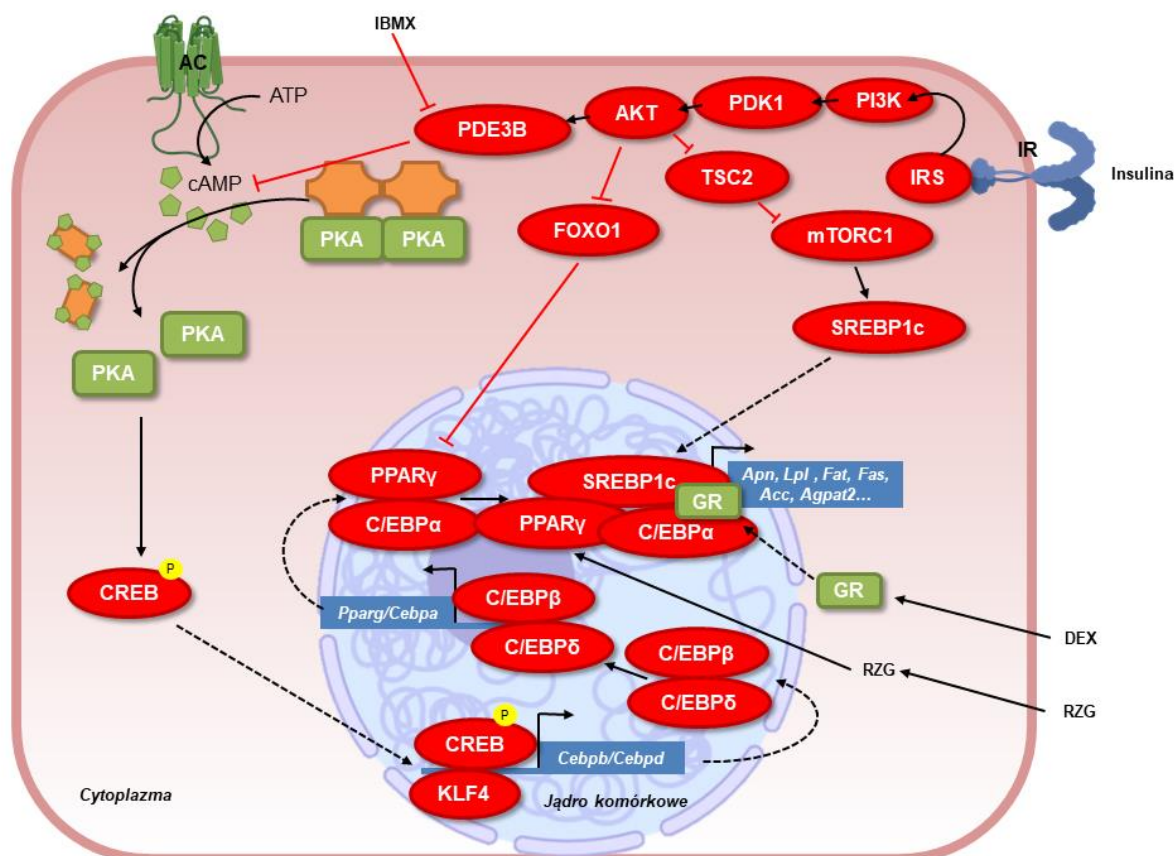
4.5. Różnicowanie się adipocytów

W skład wszystkich rodzajów tkanki tłuszczowej wchodzi frakcja komórek nie będąca adipocytami, zwana zrębową frakcją naczyniową (ang. stromal vascular fraction, SVF). SVF jest heterogenną populacją komórek, która poza komórkami odporności wrodzonej (makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne) i nabytej (limfocyty T), fibroblastami, neuronami i komórkami śródbłónki (ang. endothelial cells, EC), obejmuje również komórki progenitorowe tkanki tłuszczowej (ang. adipose progenitor cells, APC), które posiadają zdolność do różnicowania się w adipocyty, osteocyty, chondrocyty i miocyty (Qin i wsp., 2023). Populacja komórek APC, która jest wyspecjalizowana do różnicowania się wyłącznie w kierunku adipocytów zwana jest populacją preadipocytów (Qin i wsp., 2023). Sygnałem przekształcającym komórki APC w preadipocyty jest m.in. czynnik morfogenezy kości 2/4 (ang. bone morphogenic protein 2/4, BMP2/4) (Huang i wsp., 2009; Tang i wsp., 2004). Aktywacja szlaku Wnt może natomiast hamować ten proces (Bennett i wsp., 2005). Specjalizacja komórek APC do preadipocytów jest kontrolowana przez białka wiążące CAAT/enhancer β i δ (CAAT/enhancer binding protein β/δ , C/EBP β/δ) (Ntambi i Young-Cheul, 2000; Zhang i wsp., 2020). Proces różnicowania się adipocytów *in vitro* rozpoczyna się, gdy preadipocyty w fazie G0 cyklu komórkowego przechodzą krótkotrwały etap ekspansji klonalnej, ograniczający się do dwóch podziałów mitotycznych (Tang, i wsp., 2003). Po ponownym wejściu komórek w fazę G0 dochodzi do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego adenozymonofosforanu (ang. cyclic adenosine monophosphate, cAMP), który aktywuje kinazę białkową A, która aktywuje białko wiążące element odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP response element-binding protein, CREB). Aktywowany CREB wraz z czynnikiem Krüppel-podobnym 4 (ang. Krüppel-like factor 4,

KLF4) wiąże się z promotorami genów kodujących C/EBP β / δ (Reusch i wsp., 2000; Thonberg i wsp., Mayr i Montminy 2001; Zhang i wsp., 2004; Birsoy i wsp., 2008). C/EBP β / δ i KLF4 aktywują transkrypcję genów kodujących C/EBP α i PPAR γ . Ponadto, C/EBP α i PPAR γ wykazują wzajemną aktywację kodujących ich genów i są wymagane do osiągnięcia przez adipocyt stanu pełnego zróżnicowania (Nielsen i wsp., 2008; Siersbæk i wsp., 2012). C/EBP α i PPAR γ kontrolują transkrypcję genów kodujących białka będących regulatorami różnicowania się adipocytów. Zalicza się do nich: białko wiążące kwasy tłuszczowe 4 (ang. fatty acid binding protein 4, FABP4), transporter glukozy 4 (ang. glucose transporter 4, GLUT4), adiponektynę, karboksykinazę fosfoenolopirogrnianu (ang. phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK), translokazę kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid translocase, FAT), acylotransferazę glicerolo-3-fosforanową 2 (ang. 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 2, AGPAT2), lipazę lipoproteinową (ang. lipoprotein lipase, LPL), leptynę i perylipinę 1 (ang. perilipin 1, PLIN1) (Nielsen i wsp., 2008; Lefterova i wsp., 2008; Tontonoz i wsp., 2008; Lowe i wsp., 2011). Aktywność C/EBP α i PPAR γ jest regulowana na wielu poziomach. Insulina jest hormonem silnie aktywującym różnicowanie adipocytów poprzez aktywację kinazy białkowej B (ang. protein kinase B, AKT), która aktywuje kompleks 1 mechanistycznego celu rapamycyny (ang. mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) poprzez blokowanie kompleksu stwardnienia guzowego 2 (ang. tuberous sclerosis complex 2, TSC2). Aktywacja mTORC1 prowadzi do zwiększonej ekspresji oraz do aktywacji białka wiążącego element regulatorowy odpowiedzi na sterole 1c (ang. sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c). SREBP1c jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym transkrypcję genów kodujących białka kluczowe dla różnicowania adipocytów, m.in.: LPL, karboksylazę acetylo-C (ang. acetyl-CoA carboxylase, ACC), syntazę kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid synthase, FAS) i PPAR γ (Kim i Spiegelman, 1996; Bakan i Laplante, 2012; Kim i wsp., 1998; Moldes i wsp., 1999; Zhang i wsp., 2009).

Insulina ponadto indukuje różnicowanie adipocytów poprzez zależny od AKT mechanizm translokacji czynnika z rodziny forkhead box 1 (ang. forkhead box O1, FOXO1) hamującego transkrypcję genu kodującego PPAR γ z jądra komórkowego do cytoplazmy. W badaniach *in vitro*, w celu różnicowania adipocytów z komórek APC, pożywkę hodowlaną uzupełnia się 3-izobutyl-1-metyloksantyną (ang. 3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX), deksametazonem (ang. dexamethasone, DEX), rosiglitazonem (ang. rosiglitazone, RZG) i insuliną. IBMX działa jako inhibitor fosfodiesterazy 3B (ang. phosphodiesterase 3B,

PDE3B), co skutkuje utrzymaniem wysokiego poziomu cAMP w komórce. DEX wiąże się z receptorem glikokortykosteroidowym (ang. glikocorticosteroid receptor, GR), który aktywuje ekspresję genów specyficznych dla adipocytów, natomiast RZG jest agonistą PPAR γ (Zhao et al, 2019). Główne czynniki odpowiadające za różnicowanie się adipocytów i ich interakcje zostały przedstawione na rycinie 2.



Rycina 2. Szlaki sygnałowe regulujące różnicowanie się adipocytów. AC - cyklaza adenylanowa, ACC - karboksylaza acetylo-CoA - Agpat2 - acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa 2, AKT - kinaza białkowa B, *Apn* - gen kodujący adiponektynę, ATP - adenosynotryfosforan, C/EBP α / β / δ - białka wiążące CAAT/enhancer α / β / δ , cAMP - cykliczny adenosynomonofosforan, CREB - białko wiążące element odpowiedzi na cAMP, DEX - deksametazon, *Fas* - gen kodujący syntazę kwasów tłuszczowych, *Fat* - gen kodujący translokazę kwasów tłuszczowych, GR - receptor glikokortykoidowy, IBMX - 3-izobutyl-1-metyloksantyna, IR - receptor insulinowy, IRS - substrat dla receptora insulinowego, KLF4 - czynnik Krüppel-podobny 4, *Lpl* - gen kodujący lipazę lipoproteinową, mTORC1 - kompleks 1 mechanistycznego celu rapamycyny, PDE3B - fosfodiesteraza 3 B, PDK1 - kinaza zależna od 3-fosfatydyloinozytolu, PI3K - kinaza 4,5-fosfatydyloinozytolu 3, PKA - kinaza białkowa A, PPAR γ - receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów γ , RZG - rosiglitazon, SREBP1c - białko wiążące element regulatorowy odpowiedzi na sterole 1c, TSC2 - kompleks stwardnienia guzowego 2. Na podstawie: Siersbæk i wsp., 2012, zmodyfikowano.

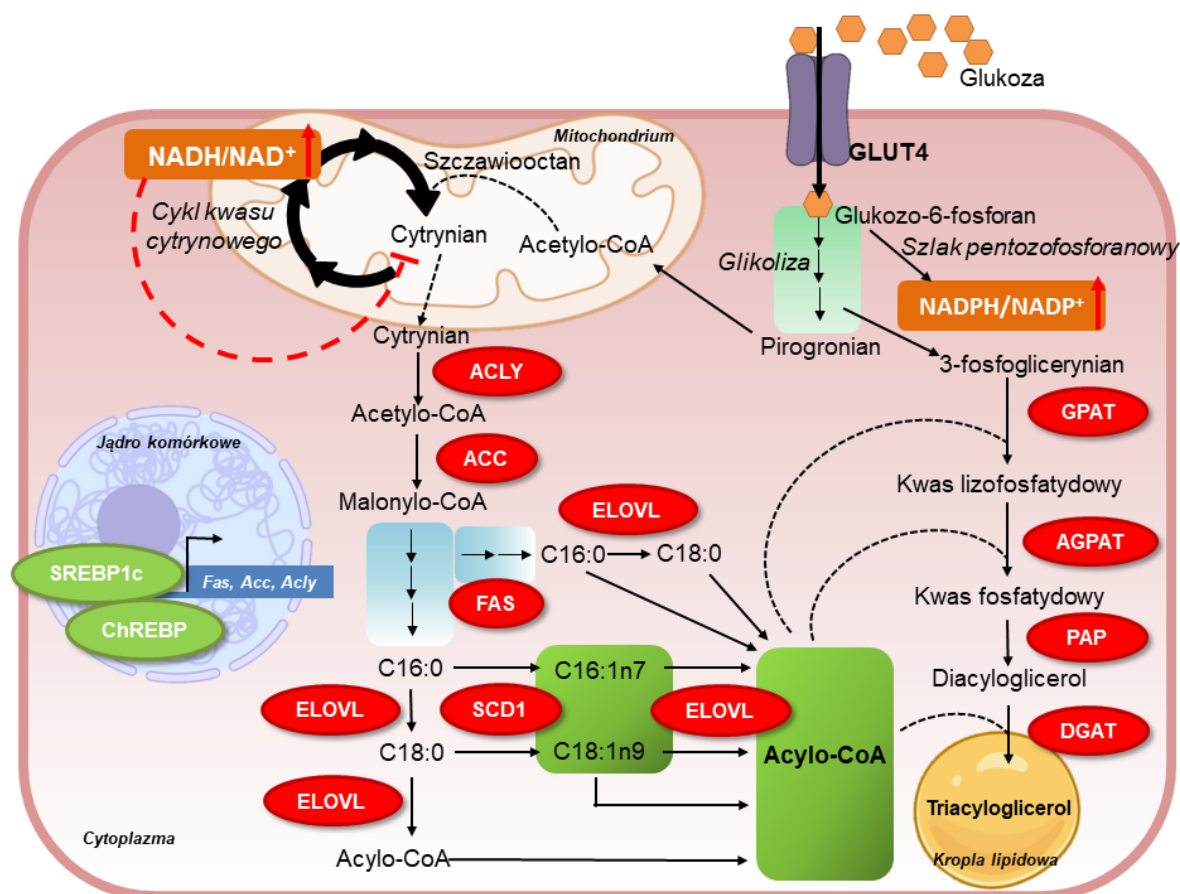
4.6. Metabolizm tkanki tłuszczowej

4.6.1. Lipogeneza

Ze względu na potrzebę szybkiego przełączania się między przemianami katabolicznymi i anabolicznymi, metabolizm tkanki tłuszczowej jest ściśle regulowany. WAT

przechowuje TAG zdeponowane w kroplach lipidowych. Kropla lipidowa tworzona jest w retikulum endoplazmatycznym (ang. endoplasmic reticulum, ER) przez enzymy zakotwiczone w ER i jest otoczona pojedynczą błoną fosfolipidową oraz związanymi z nią białkami (Cottier i Schneider 2022; Choudhary i wsp., 2015, 2020, 2021). W wyniku hydrolizy TAG związanych z lipoproteinami, katalizowanej przez LPL, uwalniane są wolne kwasy tłuszczowe (ang. free fatty acids, FFA) i glicerol. Podczas gdy glicerol jest uwalniany do krwioobiegu, FFA są transportowane do wnętrza adipocytu przez translokazę kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid translocase, FAT) (Pepino i wsp., 2014). Po przetransportowaniu do wnętrza adipocytu, FFA ulegają aktywacji przez syntazę acylo-CoA (ang. acyl-CoA synthase, ACS), która produkuje cząsteczki acylo-CoA będące substratami reakcji acylacji glicerolo-3-fosforanu, pochodzącego z glikolizy (Song i wsp., 2018). Powstałe cząsteczki TAG stanowią podstawowy budulec kropli lipidowej (Choudhary i wsp., 2021).

Innym źródłem kwasów tłuszczowych w adipocycie jest synteza lipidów *de novo*, której podstawowym substratem jest glukoza (Strable i Ntambi, 2010). W przeciwieństwie do akumulacji tłuszczu pochodzącego z diety, lipogeneza *de novo* jest kosztowna energetycznie, ponieważ polega na utlenianiu glukozy w celu wytworzenia cząsteczki acetylo-CoA jako substratu do syntezy kwasu cytrynowego (Rycina 3). Początkowo powstający kwas cytrynowy włączany jest do cyklu kwasu cytrynowego, co podnosi stosunek zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) do formy utlenionej (NAD^+). Wysoki stosunek NADH/NAD^+ hamuje cykl kwasu cytrynowego, a powstający cytrynian jest eksportowany do cytozolu (Xu i wsp., 2021). Kwas cytrynowy jest następnie przekształcany przez ATP-liazę cytrynianową (ang. ATP citrate lyase, ACLY) w acetylo-CoA (Rycina 3). Acetylo-CoA ulega następnie karboksylacji do malonylo-CoA w reakcji katalizowanej przez karboksylazę ACC, po czym następuje wieloetapowa reakcja syntezy acylo-CoA, katalizowana przez FAS, która ma zdolność do syntezy maksymalnie 16-węglowej cząsteczki acylo-CoA, tj. kwasu palmitynowego (Strable i Ntambi, 2010).



Rycina 3. Przebieg lipogenezy *de novo* w adipocytach. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, ACLY - liaza cytrynianowa, AGPAT - acylotransferaza acyloglicerolo-3-fosforanowa, DGAT - acylotransferaza diacyloglicerolowa, ELOVL - elongaza bardzo długich łańcuchów kwasów tłuszczowych, FAS - syntaza kwasów tłuszczowych, GLUT4 - transporter glukozy 4, GPAT - acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa, NADH/NAD⁺ - zredukowana/utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadenionowego, NADPH/NADP⁺ - zredukowana/utleniona forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadenionowego, PAP - fosfataza kwasu fosfatydowego, SCD1 - desaturaza stearoil-CoA. Na podstawie: Song i wsp., 2018, zmodyfikowano.

Powstała cząsteczka kwasu palmitynowego może ulec reakcji elongacji, katalizowanej przez elongazy (ang. elongation of very long-chain fatty acids, ELOVL) lub ulec reakcji desaturacji, katalizowanej przez desaturazę stearoil-CoA 1 (ang. stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1) (Strable i Ntambi, 2010). W reakcji glikolizy powstaje również glicerolo-3 fosforan, będący prekursorem do syntezy glicerolu, stanowiącego rusztowanie dla przyłączanych później acylo-CoA (Strable i Ntambi, 2010). Lipogeneza *de novo* stwarza ponadto potrzebę syntezy nukleotydów. Z tego powodu cząsteczka glukozy-6-fosforanu, powstająca w pierwszej reakcji glikolizy, włączana jest w szlak pentozofosforanowy (ang. pentose phosphate pathway, PPP) (Rycina 3). Powstający w PPP NADPH wykorzystywany jest jako donor elektronów, potrzebny w reakcjach redoks katalizowanych m.in. przez FAS i SCD1 (Jin i wsp., 2018). Powstające acylo-CoA są wykorzystywane do syntezy TAG w kilkustopniowym procesie, katalizowanym przez acylotransferazy CoA (Strable i Ntambi, 2010). Transkrypcja genów kodujących enzymy zaangażowane w proces lipogenezy *de novo*

znajduje się pod kontrolą SREPB1c i białka wiążącego element regulatorowy odpowiedzi na węglowodany (ang. carbohydrate regulatory element-binding protein, ChREBP) (Strable i Ntambi, 2010).

4.6.2. Lipoliza

W sytuacji niewystarczającej podaży substratów energetycznych pochodzących z pożywienia, rezerwy energetyczne zmagazynowane w tkance tłuszczowej ulegają mobilizacji. Tkanka tłuszczowa uwalnia kwasy tłuszczowe związane z glicerolem w formie TAG w procesie lipolizy. Głównym białkiem regulującym lipolizę w tkance tłuszczowej jest kinaza białkowa A (ang. protein kinase A, PKA), która jest aktywowana m.in. w odpowiedzi na noradrenalinę pochodzącą z części współczulnej autonomicznego układu nerwowego, niską temperaturę, głódzenie czy wysiłek fizyczny (Arner, 2005; Braun i wsp., 2018; Frühbeck i wsp., 2014). Pierwszym białkiem ograniczającym lipolizę w adipocytach jest PLIN1, ponieważ oddziela kroplę lipidową od cytozolu i stanowi fizyczną barierę dla lipaz obecnych w cytoplazmie (Sztalryd i Brasaemle, 2017). W anabolicznym stanie komórki, z PLIN1 związane jest białko ABHD5 (ang. α/β -hydrolase domain-containing protein 5, ABHD5), będące aktywatorem swoistej dla adipocytów lipazy triacylogliceroli (ang. adipose triglyceride lipase, ATGL) (Chouchani i Kajimura, 2019). Po aktywacji lipolizy, PLIN1 jest fosforylowana przez PKA, co powoduje oddzielenie się PLIN1 od kropli lipidowej oraz uwolnienie ABHD5 (Chouchani i Kajimura, 2019). ABHD5 następnie wiąże się z ATGL, co umożliwia hydrolizę TAG, w wyniku której uwalniana jest cząsteczka diacyloglicerolu (ang. diacylglycerols, DAG) i FFA (Chouchani i Kajimura, 2019). Negatywnym regulatorem ATGL jest białko G0S2 (ang. G0/G1 switch gene 2), które znajduje się w adipocytach na wysokim poziomie i oddziałuje z domeną hydrolazową ATGL (Yang i wsp., 2010; Schweiger i wsp., 2012). Wyciszenie ekspresji genu *G0s2* w adipocytach znacznie zwiększyło tempo lipolizy zarówno podstawowej, jak i indukowanej hormonalnie (Schweiger i wsp., 2012).

Lipaza zależna od hormonów (ang. hormone-sensitive lipase, HSL) jest aktywowana przez PKA i jest lipazą rozkładającą głównie DAG i w mniejszym stopniu TAG i monoacyloglicerole (ang. monoacylglycerol, MAG) (Reczens i wsp., 2021). Ostatnim etapem lipolizy jest katalizowana przez lipazę monoacylogliceroli (ang. monoacylglycerol lipase, MAGL) hydroliza monoacylogliceroli. Jej produktem jest cząsteczka glicerolu i FFA (Gil-Ordóñez i wsp., 2018). Powstałe w procesie lipolizy cząsteczki FFA są transportowane na zewnątrz komórki przez FABP4 (Thompson i Bernlohr, 2010). Poza noradrenaliną, hormony takie jak hormon wzrostu, tyroksyna i glukagon mają zdolność do aktywacji lipolizy w adipocytach (Frühbeck i wsp., 2014), natomiast insulina oraz insulipopodobny czynnik wzrostu I (ang. insulin-like growth factor I, IGF-I) są silnymi inhibitorami lipolizy, ponieważ

aktywują PDE3B, która katalizuje przekształcenie cAMP w 5'AMP. Spadek poziomu AMP w komórce prowadzi do dezaktywacji PKA (Flier i wsp., 2023; Ludwig i wsp., 2021 Petersen i Shulman, 2018). Przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. atrial natriuretic peptide, ANP) aktywuje lipolizę w adipocytach za pośrednictwem cykazy guanylanowej A (ang. guanyl cyclase A, GC-A). Katalizuje ona przekształcenie guanozynotrifosforanu (GTP) w cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP). cGMP hamuje PDE3B oraz aktywuje kinazę białkową G (ang. protein kinase G, PKG), która wraz z PKA aktywuje ATGL i HSL (Frühbeck i wsp., 2014). Schemat przebiegu lipolizy przedstawiony został na rycinie 4.

4.6.3. β -oksydacja kwasów tłuszczowych

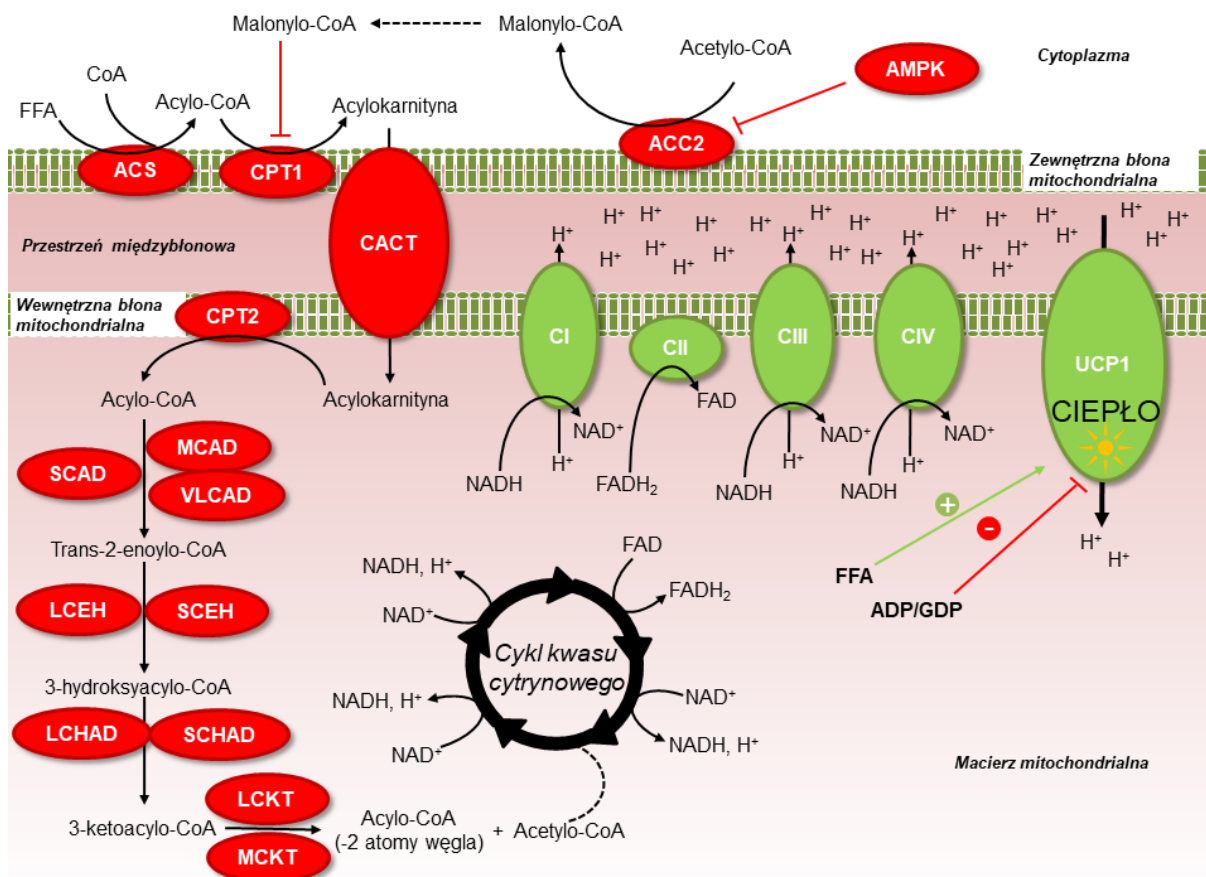
Aktywność metaboliczna WAT ogranicza się do przeprowadzania reakcji reestryfikacji kwasów tłuszczowych po hydrolizie TAG związanych z lipoproteinami, lipogenezy *de novo* oraz do lipolizy TAG zmagazynowanych w kropli lipidowej (Chouchani i Kajimura, 2019; Strable i Ntambi, 2010). Przemiany kataboliczne, takie jak utlenianie kwasów tłuszczowych, nie są zatem procesami, które zachodzą w WAT na znaczącym poziomie (Schirinzi i wsp., 2023). Zadaniem BAT i BeAT jest natomiast produkcja ciepła w procesie termogenezy. Źródłem energii potrzebnym do wytworzenia ciepła są zredukowane nukleotydy: NADH i dinukleotyd flawinoadenionowy (ang. flavin adenine dinucleotide, FADH₂), które powstają w cyklu kwasu cytrynowego. Acetylo-CoA, będący substratem cyklu kwasu cytrynowego powstaje w wyniku mitochondrialnego utleniania kwasów tłuszczowych (β -oksydacji) (Gonzalez-Hurtado i wsp., 2018). Częsteczki FFA muszą w pierwszej kolejności zostać aktywowane poprzez dodanie cząsteczki CoA. Krótkołańcuchowe (2-6 atomów węgla) i średniołańcuchowe (7-12 atomów węgla) cząsteczki acylo-CoA ulegają biernej dyfuzji przez błony mitochondrialne i nie wymagają do tego celu specjalnych transporterów (Kemp i wsp., 2024). Długołańcuchowe (13-21 atomów węgla) acylo-CoA muszą zostać przetransportowane do macierzy mitochondrialnej. W pierwszej kolejności palmitoilotransferaza karnitynowa 1 (ang. palmitoyl transferase 1, CPT1), związana z zewnętrzną błoną mitochondrialną katalizuje syntezę cząsteczki acylokarnityny z cząsteczek acylo-CoA i karnityny. Etap ten jest kluczowy w rozpoczęciu kaskady β -oksydacji i tempo jego zachodzenia determinuje tempo β -oksydacji w komórce (Houten i Wanders, 2010). W następnym etapie translokaza karnityny-acylokarnityny (ang. carnitine–acylcarnitine translocase, CACT) transportuje cząsteczkę acylokarnityny do macierzy mitochondrialnej, jednocześnie transportując cząsteczkę karnityny z macierzy mitochondrialnej do cytozolu (Houten i Wanders, 2010; Longo i wsp., 2016; Adeva-Andany i wsp., 2019). Cząsteczki karnityny i acylo-CoA uwalniane są

w wyniku reakcji katalizowanej przez CPT2, która polega na rozkładzie cząsteczki acylokarnityny (Houten i Wanders, 2010; Longo i wsp., 2016; Adeva-Andany i wsp., 2019; Sim i wsp., 2002; Kompare i Rizzo, 2008). Etap β -oksydacji, polegający na wprowadzeniu wiązania podwójnego w cząsteczce acylo-CoA i wytworzenie trans-2-enoylo-CoA katalizowany jest przez różne dehydrogenazy acylo-CoA, w zależności od długości łańcucha kwasu tłuszczowego. W następnym etapie cząsteczki trans-2-enoylo-CoA poddawane są reakcji hydratacji, katalizowanej przez hydratazy enoylo-CoA. Powstająca w wyniku hydratacji cząsteczka 3-hydroksyacylo-CoA ulega następnie utlenieniu do 3-ketoacylo-CoA, katalizowanym przez dehydrogenazę długołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA (ang. long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, LCHAD), dehydrogenazę średniołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA (ang. medium-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, MCHAD) lub dehydrogenazę krótkołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA (ang. short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, SCHAD), w zależności od długości łańcucha 3-hydroksyacylo-CoA (Houten i Wanders, 2010; Longo i wsp., 2016; Adeva-Andany i wsp., 2019; Sim i wsp., 2002; Kompare i Rizzo, 2008). Ostatnim etapem β -oksydacji jest cykliczna reakcja uwalniająca cząsteczki acetylo-CoA z cząsteczek 3-ketoacylo-CoA. Reakcja ta jest katalizowana przez tiolazę średniołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA (ang. medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase, MCKT) lub przez tiolazę długołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA (ang. long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase, LCKT). Łańcuch acylo-CoA jest skracany o 2 atomy węgla na cykl reakcji, a powstałe cząsteczki acetylo-CoA włączane są w cykl kwasu cytrynowego. Proces β -oksydacji jest regulowany allosterycznie przez malonylo-CoA, powstający w reakcji katalizowanej przez ACC. Malonylo-CoA wiąże się z CPT1, blokując tym samym reakcję syntezy acylokarnityny. Fosforylacja ACC przez kinazę białkową aktywowaną przez AMP (ang. AMP-activated protein kinase, AMPK) hamuje syntezę malonylo-CoA, co prowadzi do spadku jego stężenia w komórce. Spadek stężenia malonylo-CoA prowadzi do zniesienia inhibicji CPT1 co pozawala na aktywację β -oksydacji (Abu-Elheiga i wsp., 2000; Carling i wsp., 1987; McGarry i wsp., 1978).

4.6.4. Łańcuch oddechowy

Powstałe w wyniku β -oksydacji cząsteczki acetylo-CoA włączane są do cyklu kwasu cytrynowego, w którym wytwarzane są zredukowane nukleotydy: NADH i FADH₂. Służą one jako przenośnik elektronów i ulegają utlenieniu w kompleksach łańcucha oddechowego. Kompleksy I, III i IV posiadają aktywność pomp protonowych, które przemieszczają jony H⁺ z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej (Sugano i wsp., 1976).

W komórkach UCP1⁻ powstała w ten sposób siła protonomotoryczna jest źródłem energii wykorzystywanym przez syntazę ATP. Jony H⁺ wracają do macierzy mitochondrialnej zgodnie z gradientem przez kanał utworzony przez podjednostki syntazy ATP (Chouchani i Kajimura, 2019).



Rycina 5. β -oksydacja i termogeneza w adipocytach. ACC2 - karboksylaza acetylo-CoA 2, ACS - syntaza acylo-CoA, ADP - adenosynodifosforan, AMPK - kinaza białkowa aktywowana przez adenosynomonofosforan, CACT - translokaza karnityny-acylokarnityny, CI/II/III/IV - kompleks I/II/III/IV łańcucha oddechowego, CPT1/2 - palmitoilotransferaza karnitynowa 1/2, FADH₂/FAD - zredukowana/utleniona forma dinukleotydu flawionoadeninowego, GDP - guanosynomonofosforan, LCEH - hydratata długołańcuchowych 2-enoylo-CoA, LCHAD - dehydrogenaza długołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA, LCKT - tiolaza długołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA, MCAD - dehydrogenaza średniołańcuchowych acylo-CoA, MCKT - tiolaza średniołańcuchowych 3-ketoacylo-CoA, NADH/NAD⁺ - zredukowana/utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadenionowego, SCAD - dehydrogenaza krótkołańcuchowych acylo-CoA, SCEH - hydratata krótkołańcuchowych 2-enoylo-CoA, SCHAD - dehydrogenaza krótkołańcuchowych 3-hydroksyacylo-CoA, UCP1 - białko rozprzęgające 1, VLCAD - dehydrogenaza bardzodługołańcuchowych acylo-CoA. Na podstawie Chouchani i Kajimura, 2019, zmodyfikowano.

W komórkach UCP1⁺ większość jonów H⁺ powraca do macierzy mitochondrialnej poprzez kanał UCP1, co prowadzi do wytworzenia ciepła w procesie tzw. termogenezy bezdrzeniowej (ang. non-shivering thermogenesis) (Sugano i wsp., 1976). FFA, oprócz paliwa do wytwarzania gradientu H⁺ w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, posiadają również właściwości aktywujące UCP1 poprzez bezpośrednie wiązanie z tym białkiem (Fedorenko i wsp., 2012; Gagelin i wsp., 2023). Aktywacja nerwów współczulnych

proceeds to increased lipolysis in adipocytes UCP1⁺, nevertheless it has been confirmed, that inhibition of lipolysis in brown adipocytes does not lead to inhibition of thermogenesis (Gagelin i wsp., 2023). Integration of metabolic pathways β -oxidation and mitochondrial chain in adipocytes UCP1⁺ presented in figure 5.

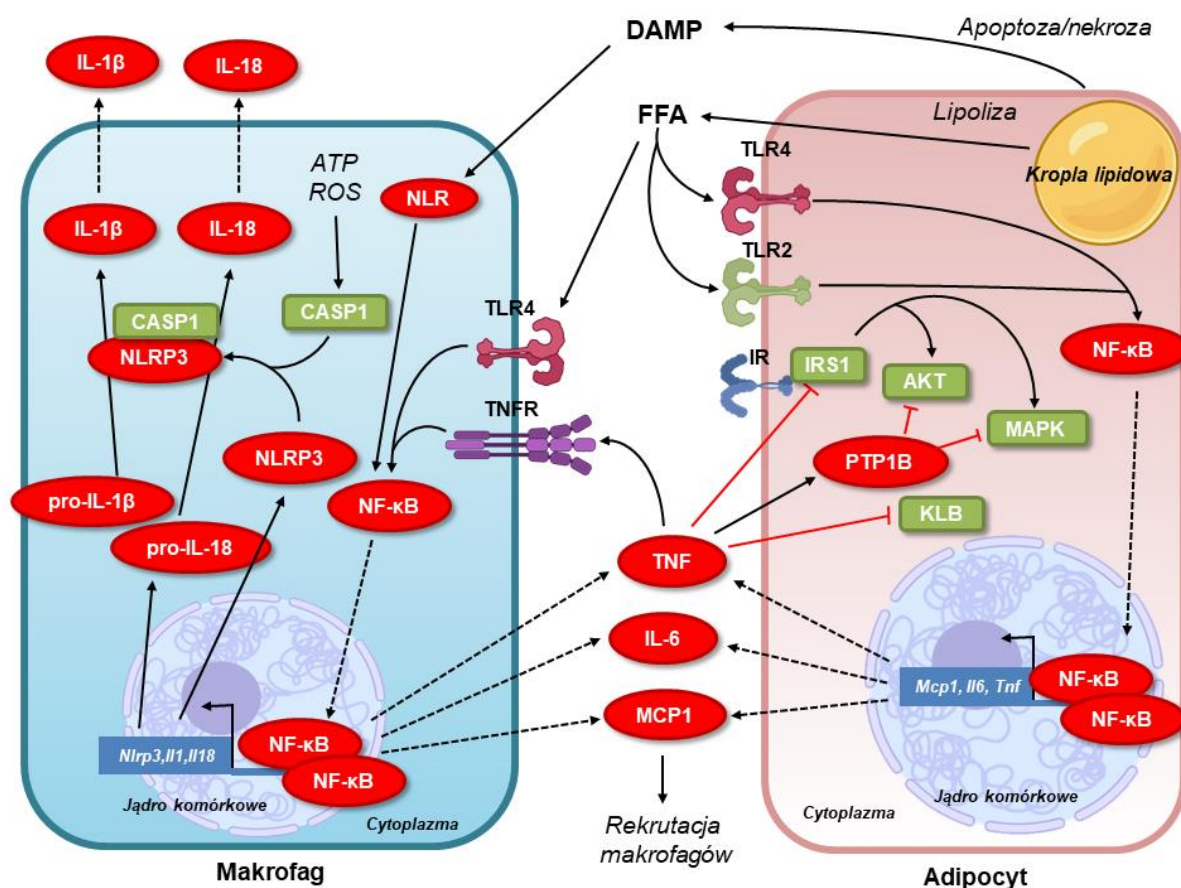
4.7. Stan zapalny tkanki tłuszczowej

4.7.1. Biała tkanka tłuszczowa

In conditions of positive energy balance WAT increases its volume as a result of enlargement of already existing adipocytes (hypertrophy) or as a result of differentiation of new adipocytes from SVF precursors (hyperplasia) (Ghaben i Scherer, 2019). In obesity, when the level of excess energy is significant, hypertrophy of adipocytes prevails over hyperplasia. When the capacity of existing adipocytes is exceeded, stress of adipocytes occurs, resulting in inflammatory reaction, apoptosis or necrosis (Ghaben i Scherer, 2019). Inflammation of adipose tissue during obesity can also be triggered by other factors. In people living with obesity, increased permeability of the intestinal wall leads to lipopolysaccharide (ang. lipopolysaccharide, LPS), which is a component of the cell wall of Gram-negative bacteria, living in the intestine. LPS is a strong activator of Toll-like receptor 4 (ang. Toll-like receptor 4, TLR4), which is present on the surface of adipocytes (Cani i wsp., 2008). LPS activation of TLR4 is an important factor in initiating or deepening inflammation of visceral adipose tissue during obesity (Kim i wsp., 2007; Wernstedt Asterholm i wsp., 2014). Inflammation of adipose tissue can also affect the inflammatory state of other tissues. Visceral adipose tissue shows more intense lipolysis than subcutaneous, which generates more FFA entering the bloodstream (Björntorp, 1991). Circulating FFA are captured by different types of cells, including those participating in homeostasis of glucose (e.g. hepatocytes, myocytes) (Björntorp, 1991). High concentration of FFA leads to impairment of function of these cells and decrease of their sensitivity to insulin (Belfort i wsp., 2005). This phenomenon is called lipotoxicity and is one of the basic causes of insulin resistance, which is a characteristic symptom of obesity (Belfort i wsp., 2005). FFA, especially in the form of saturated, also act on the same adipocytes as proinflammatory factors, activating receptors TLR2 and TLR4, which activate the nuclear transcription factor enhancer of the κ chain of activated B cells (ang. nuclear

factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B), który reguluje transkrypcję genów kodujących czynniki odpowiedzi na stres i zapalenie. Jednym z nich jest peptyd chemotaktyczny monocytów 1 (ang. monocyte chemotactic peptide 1, MCP1) (Saad i wsp., 2016). Poza MCP1, czynnikami regulowanymi przez NF- κ B są czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor, TNF), interferon γ (IFN γ) i interleukina 6 (IL-6) (Kirwan i wsp., 2017). Głównym czynnikiem indukującym insulinooporność jest TNF, który hamuje fosforylację IRS, indukuje aktywność białkowej fosfatazy tyrozyny 1B (ang. protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B), która utrzymuje w nieaktywnym stanie AKT i kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (ang. mitogen-activated protein kinase, MAPK) oraz indukuje produkcję ceramidów. TNF hamuje też działanie niezależnego od insuliny mechanizmu wychwytu glukozy w brunatnych adipocytach. Wykazano, że TNF hamuje działanie czynnika wzrostu fibroblastów 21 (ang. fibroblast growth factor 21, FGF21), który aktywuje wychwyt glukozy w sposób zależny od GLUT1 poprzez represję koreceptora β -Klotho (ang. β -Klotho coreceptor, KLB), odpowiadającego na sygnał FGF21 (Díaz-Delfín i wsp., 2012). TNF jest też czynnikiem indukującym apoptozę adipocytów (Zhang i wsp., 2001; Nisoli i wsp., 2006). Czynniki uwalnianie przez adipocyty w trakcie zapalenia (np. MCP1) i apoptozy (np. fragmenty błony komórkowej, mleczan, kreatyna, ATP, kwasy nukleinowe) stanowią sygnały chemotaktyczne dla makrofagów. Makrofagi rekrutowane do tkanki tłuszczowej (ang. adipose tissue macrophages, ATM) tworzą dwie subpopulacje: M1 i M2 (Ravichandran, 2010). M1 ATM wykazują silnie prozapalny fenotyp. Są komórkami posiadającymi wysoki poziom receptora TNF (ang. tumor necrosis factor receptor, TNFR), TLR4, TLR2 i markera CD11c. Ponadto, makrofagi M1 charakteryzują się wysokim poziomem lokalizacji jądrowej czynnika NF- κ B (Kirwan i wsp., 2017; Murray, 2017). M2 ATM z kolei posiadają fenotyp wygaszający zapalenie i promujący proliferację komórek (Murray, 2017). Posiadają one wysoki poziom ekspresji receptora IL-4 (ang. interleukin 4 receptor, IL-4R), którego aktywacja hamuje ekspresję genów kodujących TNF i IL-6 (Murray, 2017). Ponadto, makrofagi M2 wytwarzają dużą ilość IL-10 o działaniu przeciwzapalnym. Rodzaj odpowiedzi immunologicznej ze strony ATM zależy od rodzaju i natężenia czynników znajdujących się w WAT. Fizjologicznym zadaniem ATM jest usuwanie uszkodzonych adipocytów (Prieur i wsp., 2010). Nadmierna hipertrofia adipocytów w otyłości indukuje ich apoptozę, co wymaga zwiększenia liczby makrofagów (Xu i wsp., 2003; Cinti i wsp., 2005). W przeciwieństwie do innych tkanek, usuwanie adipocytów przez ATM wzmacnia odpowiedź zapalną, dlatego w celu ochrony tkanki przed uszkodzeniami, M2 ATM produkują czynniki mitygujące zapalenie (Waqas i wsp., 2017; Dai i wsp., 2017).

W warunkach homeostazy M1 i M2 ATM pozostają w równowadze i nie dochodzi do eskalacji zapalenia (Fischer-Posovszky i wsp., 2011). W pierwszych etapach rozwoju otyłości czynniki prozapalne, wydzielane przez adipocyty i M1 ATM, również są równoważone przez M2 ATM (Shaul i wsp., 2010). Jednak coraz rozleglejsze uszkodzenia adipocytów prowadzą do uruchomienia pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego i przewagi czynników prozapalnych (Shaul i wsp., 2010). Co więcej, w warunkach nasilonej śmierci adipocytów spowodowanej przekroczeniem możliwości magazynujących tkanki tłuszczowej, zdolność makrofagów do wydajnej fagocytozy jest niewystarczająca. Uwolnione komponenty komórkowe stanowią sygnał wzmacniający zapalenie (Luo i wsp., 2019). W odróżnieniu od ostrego zapalenia, mającego miejsce w przypadku infekcji, reakcja zapalna w WAT w czasie otyłości jest mało intensywna i przewlekła. Z tego powodu M1 ATM posiadają inny wzór ekspresji genów niż klasyczne makrofagi M1, zaangażowane w zwalczanie infekcji (Kratz i wsp., 2014). Zarówno M1, jak i M2 ATM posiadają wyższy poziom ekspresji genów zaangażowanych w lizosomalny metabolizm lipidów niż klasyczne makrofagi. Związane jest to z faktem, że fagocytoza adipocytów wymaga intensywnej hydrolizy lipidów (Xu i wsp., 2013). Ponadto, ekspresja receptorów PPAR w M1 ATM jest wyższa niż w klasycznych makrofagach M1. Zależna od lipidów aktywacja PPAR w M1 ATM ogranicza silną odpowiedź zapalną jednocześnie rozciągając ją w czasie (Odegaard i wsp., 2008; 2007; Kang i wsp., 2008). Inflamasomy to białkowe kompleksy znajdujące się w cytoplazmie komórki, pośredniczące w odpowiedzi na stres. Wewnątrzkomórkowym receptorem odpowiadającym za reakcję zapalną w makrofagach, związaną z otyłością jest inflamason NLRP3 (ang. nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 inflammasome, NLRP3) (Swanson i wsp., 2019). Związanie FFA z TLR4 wywołuje aktywację NLRP3, który w sposób zależny od kaspazy 1 indukuje proteolityczne dojrzewanie IL-1 β i IL-18, które są markerami przewlekłego zapalenia tkanki tłuszczowej (Wen i wsp., 2011; Swanson i wsp., 2019). Czynnikiem aktywującym NLRP3 są też reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), ATP i destabilizacja lizosomów (Wen i wsp., 2011; Swanson i wsp., 2019). Poza TLR4 i TLR2, NLRP3 może również być aktywowany przez receptor podobny do białek zawierających domenę oligomeryzacji nukleotydów (ang. nucleotide-oligomerization domain-containing protein-like receptor, NLR) który wiąże wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (ang. damage-associated molecular patterns, DAMP), pochodzące z nekrotycznych adipocytów. Szlaki sygnałowe przedstawiające interakcję makrofagów i adipocytów w trakcie rozwoju zapalenia WAT zostały przedstawione na rycinie 6.



Rycina 6. Mechanizm odpowiedzi zapalnej w WAT. AKT - kinaza białkowa B, ATP - adenozymonofosforan, CASP1 - kaspaza 1, DAMP - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem, FFA - wolne kwasy tłuszczowe, IL-1 β /6/18 - interleukina 1 β /6/18, IR - receptor insulinowy, IRS1 - substrat receptora insulinowego 1, KLB - koreceptor β -Klotho, MAPK - kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny, MCP1 - peptyd chemotaktyczny monocytów 1, NF- κ B - czynnik jądrowy κ aktywowanych komórek B, NLR - receptor podobny do białek zawierających domenę oligomeryzacji nukleotydów, NLRP3 - inflammasom, PTP1B - białkowa fosfataza tyrozyny 1 B, ROS - reaktywne formy tlenu, TLR2/4 - receptor toll-podobny 2/4, TNF - czynnik martwicy nowotworu, TNFR - receptor czynnika martwicy nowotworów. Na podstawie: Ravaut i wsp., 2020, zmodyfikowano.

4.7.2. Brunatna i beżowa tkanka tłuszczowa

W BAT myszy karmionych dietą wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HF) poziom mRNA markerów zapalenia oraz poziom infiltracji przez makrofagi są mniejsze niż w WAT, co sugeruje względną oporność na zapalenie (Fitzgibbons i wsp., 2011). Niemniej jednak, wydłużony czas diety HF jest w stanie znacząco podnieść ekspresję markerów zapalenia takich jak F4/80 czy TNF. Wzrost ten jest związany ze zwiększoną infiltracją makrofagów oraz ze zwiększoną ekspresją genów kodujących cytokiny prozapalne w samych adipocytach (Sakamoto i wsp., 2016; Roberts-Toler i wsp., 2015; Bae i wsp., 2014). Podobnie jak w WAT, konsekwencjami metabolicznymi zapalenia BAT jest insulinooporność. Zapalenie BAT prowadzi do spadku intensywności metabolizmu tej tkanki. Aktywacja TLR4 przez LPS prowadziła do represji brązowienia WAT, a zablokowanie ekspresji TLR4 prowadziło do zniesienia tego efektu (Okla i wsp., 2018). Długotrwałe podawanie myszom LPS prowadziło

do spadku poziomu UCP1 w BAT (Nøhr i wsp., 2017) a dootrzewnowe podanie TNF prowadziło do zmniejszenia poziomu UCP1 w BeAT (Sakamoto i wsp., 2016). Również inne czynniki prozapalne, takie jak IL-1 β , onkostatyna M czy fraktalkina CX3CL1 prowadzą do spadku poziomu UCP1 w BAT oraz hamują brązowienie WAT (Goto i wsp., 2016; Sanchez-Infantes i wsp., 2014; Sánchez-Infantes i wsp., 2017; Polyák i wsp., 2016). Zdolność do brązowienia WAT różni się w zależności od lokalizacji anatomicznej tej tkanki u myszy i u ludzi (Cancello i wsp., 2006). Podskórna tkanka tłuszczowa charakteryzuje się mniejszym stopniem infiltracji przez prozapalne makrofagi niż tkanka trzewna, co skorelowane jest z większą zdolnością tkanki podskórnej do brązowienia (Pou i wsp., 2007; Fontana i wsp., 2007). Pochodząca z M1 ATM IL-18 wykazuje silny efekt hamujący brązownie WAT. Efekt ten wydaje się specyficzny dla procesu brązowienia, ponieważ wpływ IL-18 na markery termogenezy w klasycznym BAT jest dużo mniej wyraźny (Pazos i wsp., 2015).

4.8. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (ang. perivascular adipose tissue, PVAT) to rodzaj tkanki tłuszczowej towarzyszący naczyniom krwionośnym. Z uwagi na bliskie sąsiedztwo PVAT ze ścianą naczynia krwionośnego oraz związek funkcjonalny pomiędzy tymi strukturami, PVAT uważany jest obecnie za integralną część układu krwionośnego. U człowieka i u myszy PVAT otacza większość naczyń krwionośnych w organizmie, poza naczyniami zlokalizowanymi w mózgu oraz kapilarami (Gao, 2007). Początkowo PVAT był uważany jedynie za strukturę ochronną i podporową dla tętnic (de Souza i wsp., 1984). Jedne z pierwszych badań rozpoznających wpływ PVAT na skurcz naczynia krwionośnego wykazały, że obecność PVAT na szczurzej aortie ma wpływ przeciwskurczowy, antagonizujący działanie noradrenaliny (Soltis i Cassis, 1991). Badania identyfikujące czynniki rozluźniające wydzielane przez tkankę tłuszczową (ang. adipose-derived relaxing factors, ADRF) otaczającą szczurzą aortę (Löhn i wsp., 2002; Dubrovska i wsp., 2004; Gollasch i wsp., 2004) zapoczątkowały postrzeganie PVAT jako element aktywnie regulujący homeostazę naczyniową. U myszy, PVAT zlokalizowany dookoła aorty dzieli się na odcinek piersiowy (ang. thoracic PVAT, TPVAT) i brzuszny (ang. abdominal PVAT, APVAT) (Li i wsp., 2021).

TPVAT posiada typowe dla BAT cechy histologiczne: obfity obszar cytoplazmy, liczne mitochondria i wiele małych kropli lipidowych wewnątrz adipocytu (Fitzgibbons i wsp., 2011; Padilla i wsp., 2013). TPVAT, podobnie jak BAT wykazuje względną oporność na

zapalenie wywołane dietą. Karmienie myszy dietą HF prowadziło do hipertrofii adipocytów w TPVAT i BAT, oraz nieznacznie zwiększonej infiltracji przez M1 ATM. Zmiany te były powiązane ze zwiększeniem poziomu UCP1 (Fitzgibbons i wsp., 2011). Wysoki poziom ekspresji UCP1 w TPVAT w trakcie otyłości ma charakter adaptacyjny, ponieważ białko to zużywa nadmiarowe FFA, pochodzące z lipolizy. Przeciwwzapalne działanie UCP1 związane jest m.in. z hamowaniem inflammasomu NLRP3 i dojrzewania IL-1 β (Gu i wsp., 2021). Brak UCP1 prowadził do zwiększenia stresu siateczki śródplazmatycznej i indukcji reakcji zapalnej w BAT (Bond i wsp., 2018). TPVAT reguluje homeostazę naczyniową pozostając w interakcji z komponentami ściany naczynia za pomocą wydzielanych czynników, takich jak adipokiny i cytokiny. W stanie fizjologicznym TPVAT wydziela duże ilości adiponektyny, IL-4, IL-10, transformującego czynnika wzrostu β (ang. transforming growth factor β , TGF β), i omentyny, które hamują rozwój zapalenia i obniżają poziom stresu oksydacyjnego w ścianie aorty, co przekłada się na prawidłowe funkcjonowanie EC i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ang. vascular smooth muscle cells, VSMC) (Schütz i wsp., 2019; Liu i wsp., 2017; Adachi i wsp., 2022). Ponadto, okołonaczyniowe adipocyty wykazują ekspresję białka podobnego do receptora lipoproteiny o małej gęstości 1 (ang. low-density lipoprotein receptor related protein 1, LRP1), które hamuje zapalenie wewnątrz naczynia krwionośnego (Mu i wsp., 2021). BMP jest czynnikiem wydzielanym przez TPVAT, który przyczynia się do promowania brunatnego fenotypu adipocytów. Wysoki poziom ekspresji markerów termogenezy w TPVAT związany jest z działaniem hamującym zatrzymywanie cholesterolu w ścianie aorty i obniżeniem poziomu lokalnego zapalenia (Mu i wsp., 2021). Niemniej jednak, ochronne działanie TPVAT na aortę jest zachowane przez krótki czas od wystąpienia niefizjologicznych warunków. 4 tygodnie diety HF u myszy spowodowały wzrost poziomu brązowienia w TPVAT oraz produkcji homeostatycznych cytokin takich jak FGF21, BMP8B i kininogenu 2 (KNG2) (Mestres-Arenas i wsp., 2022). Wynik ten sugeruje intensyfikację homeostatycznego profilu sekrecyjnego TPVAT w pierwszych tygodniach otyłości wywołanej dietą. Wydłużony okres trwania otyłości wywołanej dietą (16 tygodni) prowadził do zapalenia TPVAT, zwiększenia produkcji ROS przez TPVAT i ścianę tętnicy oraz do skurczu aorty. APVAT związana jest z brzuszny odcinkiem aorty i posiada cechy histologiczne charakterystyczne dla BeAT (Padilla i wsp., 2013). W wyniku karmienia myszy dietą HF, APVAT akumuluje tłuszcz w większym stopniu niż TPVAT, co jest związane z niższym poziomem ekspresji UCP1, oraz większym stopniem zapalenia (Police i wsp., 2009; Henrichot i wsp., 2005). Niemniej jednak, krótkotrwałe karmienie myszy dietą HF nie wywołuje w APVAT reakcji zapalnej (Mestres-Arenas i wsp., 2021), a adiponektyna

wydzielana przez APVAT powoduje produkcję tlenu azotu w EC oraz hamuje rozwój płytki miażdżycowej u myszy z brakiem ekspresji apolipoproteiny E (ApoE^{-/-}) (Kalisz i wsp., 2021). APVAT wydzielają mniejsze ilości adiponektyny i IL-10 niż TPVAT, oraz większe ilości cytokin prozapalnych (Padilla i wsp., 2013). W przebiegu otyłości APVAT, wykazuje wysoki poziom infiltracji przez makrofagi (Li i wsp., 2017; 2019) oraz wydzielają adipokiny: rezystynę i wisfatynę (Park i wsp., 2014). Zarówno rezystyna, jak i wisfatyna wydzielana przez PVAT prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji osteopontyny w VSMC, która jest markerem ich syntetycznego fenotypu (Park i wsp., 2014). Ekspresja osteopontyny w VSMC powiązana jest z rozwojem tętniaka aorty brzusznej (ang. abdominal aorta aneurysm, AAA) (Bruemmer i wsp., 2003). U pacjentów cierpiących na AAA stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy nasileniem patologii aorty a zapaleniem APVAT (Henrichot i wsp., 2005; Ding i wsp., 2022).

W warunkach fizjologicznych, PVAT wywiera korzystne działanie na ścianę naczynia. Szczurze aorty pozbawione PVAT wykazywały słabszą odporność na stres mechaniczny oraz utratę elastyczności niż aorty z nieusuniętym PVAT (Watts, i wsp., 2020; Tuttle i wsp., 2022). Prawidłowo funkcjonująca PVAT obok wydzielania czynników hamujących miażdżycę bierze również udział w termoregulacji myszy (Chang i wsp., 2012; Xiong i wsp., 2018). W trakcie otyłości duże ilości FFA pochodzących z lipolizy przedostają się do przestrzeni międzykomórkowej, indukując zjawisko lipotoksyczności (Saad i wsp., 2016). Ochronne właściwości PVAT wynikają z zależnego od UCP1 utleniania FFA, co znosi efekt lipotoksyczności wywołany otyłością (Fitzgibbons i wsp., 2011). Podstawowe cechy TPVAT i APVAT zestawiono w tabeli 1.

Nieprawidłowe proporcje w profilu adipokin, cytokin i innych czynników wydzielanych przez PVAT, będące wynikiem zaburzeń metabolicznych związanych m.in. z otyłością, mają negatywny wpływ na komórki wchodzące w skład naczynia krwionośnego. Zjawisko to zostało nazwane dysfunkcją PVAT (Guzik i wsp., 2007). Dysfunkcyjny PVAT wydzielają duże ilości prozapalnych czynników, takich jak wisfatyna, chemeryna, rezystyna, IL-6, TNF i ROS, które indukują skurcz naczyń poprzez zmniejszenie biodostępności tlenu azotu, aktywują EC, zwiększając ekspresję białek adhezji komórkowej, prowadząc tym samym do lokalnej akumulacji komórek odpornościowych, oraz zmieniając fenotyp VSMC, co prowadzi do utraty elastyczności i integralności naczynia (Guzik i wsp., 2007). PVAT zawiera ponadto liczne populacje komórek odpornościowych o różnym stopniu zróżnicowania. W PVAT naczyń wieńcowych świń, które przeszły zabieg angioplastyki balonowej stwierdzono obecność komórek prozapalnych. Wynik ten sugeruje istnienie rozwoju odpowiedzi immunologicznej w PVAT w wyniku uszkodzenia naczynia (Okamoto i wsp., 2001).

Obecność tego rodzaju komórek została później powiązana z utratą przeciwskurczowego działania PVAT (Withers i wsp., 2011) oraz z rozwojem miażdżycy (Vela i wsp., 2007). Zarówno same adipocyty w PVAT, jak i komórki odpornościowe są źródłem czynników modulujących działanie naczyń krwionośnych, a w przebiegu zaburzeń metabolicznych ich zmieniony profil inicjuje i pogłębia nieprawidłowości w strukturze i funkcji EC i VSMC. Nieprawidłowości te, takie jak dysfunkcja EC czy utrata kurczliwości i przełączenie fenotypowe VSMC są głównymi czynnikami przyczyniającymi się do rozwoju patologii naczyniowych, takich jak miażdżycy, tętniaki i nadciśnienie.

Tabela 1. Porównanie cech TPVAT i APVAT. Na podstawie Li i wsp., 2021, zmodyfikowano.

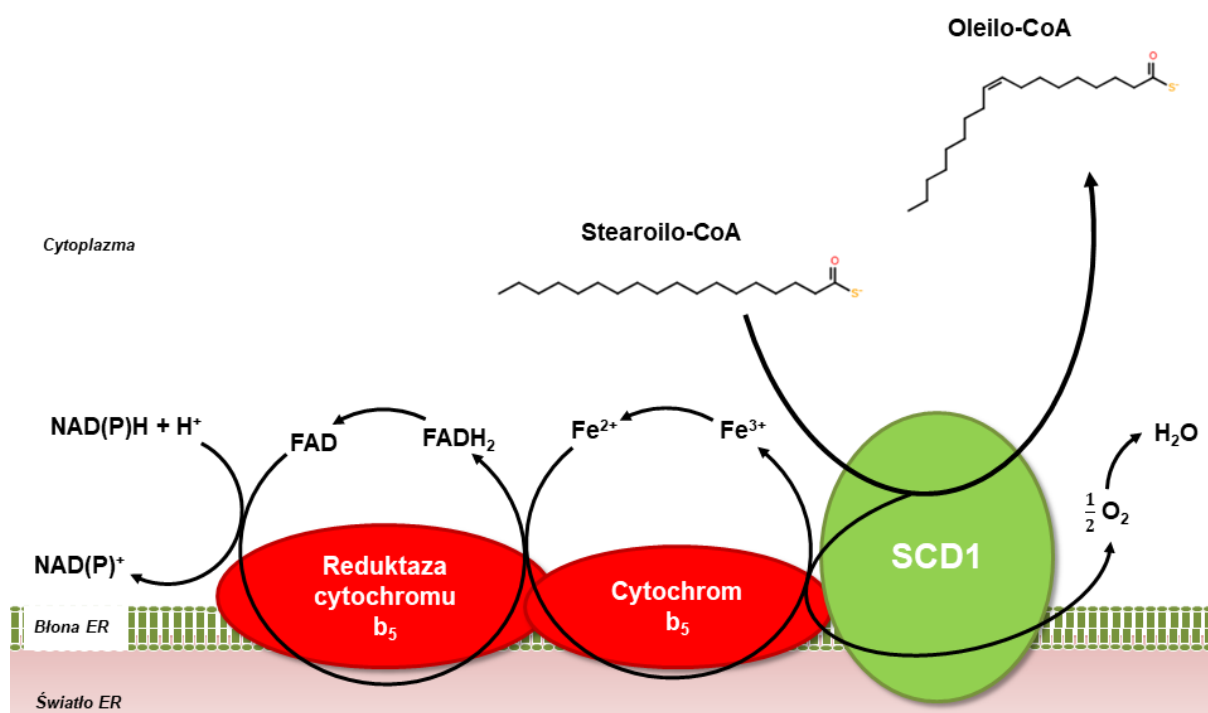
Cecha	TPVAT	APVAT
Lokalizacja	Odcinek od łuku aorty do przepony	Odcinek od przepony do rozwidlenia aorty
Rozmiar adipocytów	20 μm - 50 μm	50 μm - 100 μm
Rodzaj adipocytów	Brunatne	Białe i beżowe
Mitochondria	Bardzo liczne	Średnio liczne lub mało liczne
Krople lipidowe	Wiele małych	Wiele małych lub jedna duża
Ekspresja UCP1	Wysoka	Niska
Pochodzenie embrionalne	Wiele linii komórkowych, w tym multipotencjalne komórki neuroektodermy i mezoderma	Mezoderma
Markery komórek progenitorowych/macierzystych	$SM22\alpha^+$, $Myf5^+/Myf5^-$, $Pparg^+$, $Pdgfra^+$, $Zic1^+$	$SM22\alpha^+$, $Pparg^+$, $Zic1^-$
Geny ulegające ekspresji na wysokim poziomie	<i>Ucp1</i> , <i>Prdm16</i> , <i>Pgc1a</i> , <i>Cidea</i> , <i>Pparg</i> , <i>Ebf2</i>	<i>Hoxc8</i> , <i>Nnat</i> , <i>Sncg</i> , <i>Mest</i>
Wpływ na homeostazę naczyniową	U myszy przeciwmiażdżycowy i przeciwzapalny. U ludzi przyczynia się do rozwoju miażdżycy	U myszy i ludzi prozapalny i promujący formowanie się tętniaków aorty

Cidea - efektor A podjednostki alfa czynnika fragmentacji DNA indukującego śmierć komórki, *Ebf2* - czynnik wczesnego różnicowania komórek B 2, *Hoxc8* - homeoboks C8, *Mest* - transkrypt specyficzny dla mezodermy, *Myf5* - czynnik miogenezy 5, *Nnat* - neuronatyna, *Pdgfra* - receptor α czynnika wzrostu wydzielanego przez trombocyty, *Pparg* - receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów gamma, *Prdm16* - białko zawierające domenę PR 16, *SM22 α* - transgelina, *Sncg* - synukleina gamma, *Ucp1* - białko rozprzegające 1, *Zic1* - białko z motywem palca cynkowego mózdzku.

4.9. Desaturaza stearoilo-CoA 1

4.9.1. Regulacja ekspresji i aktywności desaturazy stearoilo-CoA

Desaturaza stearoilo-CoA 1 (ang. stearyl-CoA desaturase 1, SCD1) jest enzymem szlaku lipogenezy, obecnym w wielu tkankach w organizmie, m.in. w tkance tłuszczowej, skórze, sercu, wątrobie i wyspach trzustkowych (Zhang i wsp., 2020; Dziewulska i wsp., 2020; Fang i wsp., 2022; Dobosz i wsp., 2023; Olichwier i wsp., 2020). SCD1 jest enzymem zakotwiczonym w błonie ER, katalizującym przekształcenie nasyconych kwasów tłuszczowych (ang. saturated fatty acids, SFA): palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0) w jednonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. monounsaturated fatty acids, MUFA), tj. odpowiednio: palmitoolieinowy (C16:1) i oleinowy (C18:1) (ALJohani i wsp., 2017). Transkrypcja genu kodującego SCD1 znajduje się pod kontrolą lipogennych czynników transkrypcyjnych, takich jak receptor wątrobowy X (ang. liver X receptor, LXR), SREBP1c i ChREBP (ALJohani i wsp., 2017; Chen i wsp., 2004). Ekspresja i aktywność SCD1 są regulowane przez czynniki będące składnikami diety. Wykazano, że kwas C16:1 hamuje poziom ekspresji i aktywność SCD1 (Yang i wsp., 2011; Cao i wsp., 2008). Z kolei SFA, fruktoza, glukoza i etanol podnoszą ekspresję i aktywność SCD1 (Brenner i wsp., 2003; Lê i wsp., 2008). Mechanizm reakcji katalizowanej przez SCD1 obejmuje kaskadę reakcji redoks, zapoczątkowaną przez przejęcie elektronu z cząsteczki NADPH przez związany z reduktazą cytochromu b₅ FAD. Transport elektronów na cytochrom b₅ pozwala na przejściową redukcję Fe³⁺ do Fe²⁺, która z kolei umożliwia reakcję desaturacji. Reakcja ta jest zatem reakcją utleniania, zależną od końcowego akceptora elektronów: atomu tlenu, który w wyniku tej reakcji uwalniany jest w postaci cząsteczki wody (Shen i wsp., 2004; Wang i wsp., 2015; Petroff i wsp., 2021). Schemat reakcji katalizowanej przez SCD1 został przedstawiony na rycinie 7.



Rycina 7. Mechanizm reakcji desaturacji katalizowanej przez desaturazę stearoil-CoA 1 (SCD1). CoA - koenzym A, ER - retikulum endoplazmatyczne, FADH₂/FAD - zredukowana/utleniona forma dinukleotydu flawionoadeninowego, NAD(P)H/NAD(P)⁺ - zredukowana/utleniona forma (fosforanu) dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Na podstawie: Tabaczar i wsp., 2018, zmodyfikowano.

4.9.2. Rola SCD1 w regulacji metabolizmu

MUFA wytworzone przez SCD1 stanowią substraty do syntezy bardziej złożonych frakcji lipidowych, takich jak TAG, DAG, estry cholesterolu i fosfolipidy (ang. phospholipids, PL). Z tego powodu, dostępność MUFA/aktywność SCD1 determinuje tempo zachodzenia wielu przemian metabolicznych w komórce (ALJohani i wsp., 2017). Aktywność SCD1 powiązana jest z wieloma zaburzeniami, takimi jak nowotwory, otyłość, cukrzyca typu drugiego i zapalenie (Tracz-Gaszewska i wsp., 2023; Liu i wsp., 2011; Hulver i wsp., 2005). W otyłości, poziom i aktywność SCD1 w tkance tłuszczowej wzrasta (Warensjö i wsp., 2006; Attie i wsp., 2002). Myszy z unieczynnieniem genu *Scd1* (SCD1^{-/-}) oraz z wyciszeniem *Scd1* wyłącznie w wątrobie były odporne na otyłość wywołaną dietą HF oraz dietą wysokowęglowodanową (Ntambi i wsp., 2002; Miyazaki i wsp., 2007; 2009). Indeks desaturacji, jako stosunek MUFA/SFA, jest pośrednim wskaźnikiem aktywności SCD1. Podwyższony indeks desaturacji w surowicy pacjentów związany jest ze zwiększonym ryzykiem otyłości, insulinooporności i cukrzycy typu drugiego (Warensjö i wsp., 2005; Yew Tan i wsp., 2015; Wang i wsp., 2003). SCD1 bierze ponadto udział w regulacji utleniania kwasów tłuszczowych. Zahamowanie aktywności SCD1 w mięśniach szkieletowych prowadziło do zwiększenia poziomu fosforylacji AMPK, wzrostu i β -oksydacji (Dobrzyń i wsp., 2004). U pacjentów żyjących z otyłością stwierdzono wzrost ekspresji SCD1,

akumulację TAG i obniżenie tempa β -oksydacji (Hulver i wsp., 2005). SCD1 reguluje też lipolizę, choć wpływ SCD1 na ten proces wydaje się zależeć od kontekstu metabolicznego i rodzaju tkanki. Brak SCD1 w mięśniu sercowym oraz w BAT prowadził do zwiększenia tempa lipolizy (Bednarski i wsp., 2016; Lee i wsp., 2004). W białych adipocytach 3T3-L1 zahamowanie aktywności SCD1 prowadziło do zahamowania lipolizy poprzez zmniejszenie poziomu białek poziomu HSL i ATGL, a brak SCD1 w tkance tłuszczowej i w wątrobie nie zmienił tempa lipolizy (Flowers i wsp., 2012).

Przewlekłe, uogólnione zapalenie, charakterystyczne dla otyłości, wywołane jest m.in. przez akumulację SFA (Johnson i wsp., 2008; Lundman i wsp., 2007; Tamer i wsp., 2020), jednocześnie MUFA hamują rozwój reakcji zapalnej poprzez indukcję polaryzacji M2 ATM oraz hamowanie inflammasomu NLRP3 (Yang et al., 2019; Finucane i wsp., 2015). Co więcej, indukcja aktywności SCD1 w makrofagach prowadziła do obniżenia odpowiedzi zapalnej poprzez zahamowanie czynnika różnicowania mieloidalnego 88 (ang. myeloid differentiation factor 88, MyD88) (Hsieh i wsp., 2020). Inhibicja SCD1 w adipocytach również prowadziła do zwiększenia ekspresji markerów zapalenia (Ralston i wsp., 2016), a nadekspresja SCD1 w komórkach mięśni szkieletowych prowadziła do zmniejszenia stresu ER i zapalenia wywołanych kwasem palmitynowym (Peter i wsp., 2009). Polimorfizmy genów *SCD1* są związane ze zmianami w poziomie czynników prozapalnych, wrażliwości na insulinę oraz dystrybucji tkanki tłuszczowej u ludzi (Gong i wsp., 2011; Stryjecki i wsp., 2012; Warensjö i wsp., 2007). Wyniki te wskazują, że podwyższona aktywność SCD1 związana jest z regulacją reakcji zapalnej.

4.9.3. Rola SCD1 w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej

SCD1 jest enzymem ulegającym ekspresji na wysokim poziomie w WAT i BAT (Liu i wsp., 2011). Badania z użyciem adipocytów 3T3-L1 oraz mysich modeli z wyciszeniem ekspresji SCD1 dostarczyły informacji pozwalających na ustalenie roli SCD1 w regulacji metabolizmu i funkcji sekrecyjnej tkanki tłuszczowej. Myszy z wyciszeniem SCD1 w całym organizmie charakteryzowały się podwyższonym poziomem ekspresji GLUT1 w trzewnej WAT, co wpływało na poprawioną tolerancję glukozy w warunkach diety HF. Było to powiązane ze zwiększoną produkcją adiponektyny (Hyun i wsp., 2010). Brak ekspresji SCD1 był powiązany również z podwyższonym poziomem GLUT4 w brunatnych adipocytach, co aktywowało szlak insulinowy (Rahman i wsp., 2005).

SCD1 jest negatywnym regulatorem brązowienia WAT. Brak SCD1 prowadził do zwiększenia poziomu ekspresji genów termogenezy w adipocytach zróżnicowanych z SVF

oraz w trzewnej WAT (Liu i wsp., 2020). Z drugiej jednak strony, ekspozycja na zimno prowadziła do zwiększenia ekspresji SCD1 i syntezy kwasu oleinowego w podskórnej tkance tłuszczowej. Zmiany te były powiązane ze wzrostem poziomu UCP1, lipolizy i lipofagii (Zou i wsp., 2020). Sprzeczność ta może być spowodowana różnicami w fenotypie metabolicznym podskórnej i trzewnej WAT oraz odmienną rolą SCD1 w regulacji metabolizmu tych tkanek. Poziom MUFA jest dodatnie skorelowany z masą WAT (Yew Tan i wsp., 2015). Myszy SCD1^{-/-} wykazują zmniejszony poziom syntezy TAG i estrów cholesterolu oraz wykazują zmniejszoną masę WAT (Miyazaki i wsp., 2000). Również adipocyty 3T3-L1, w których zahamowana jest aktywność SCD1, akumulują mniejsze ilości TAG (Ralston i Mutch, 2015; Ralston i wsp., 2014). Pomimo, że MUFA podlegają mniej wydajnej estryfikacji niż SFA, oraz pomimo spadku akumulacji TAG w WAT myszy z globalnym wyciszeniem, poziom enzymów szlaku lipogenezy był u nich podwyższony (Burhans i wsp., 2015). Myszy z globalnym unieczynnieniem SCD1 z jednoczesną nadekspresją SCD1 w wątrobie wykazywały natomiast zmniejszony poziom enzymów lipogenezy w tkance tłuszczowej, ale masa tej tkanki była wyższa niż u myszy z globalnym unieczynnieniem SCD1. Prowadzi to do konkluzji, że lipogeneza *de novo* w tkance tłuszczowej jest głównie regulowana przez kwas C18:1, syntezowany przez SCD1 w wątrobie (Miyazaki i wsp., 2007; Burhans i wsp., 2015).

4.9.4. Rola SCD1 w funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego

SCD1 odgrywa również istotną rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej. Fizyczny nacisk na komórki śródbłonna, wywołany przepływem krwi, prowadzi do zależnego od PPAR γ zwiększenia ekspresji SCD1 (Qin i wsp., 2007). Nadekspresja SCD1 w mezenchymalnych komórkach macierzystych, wyizolowanych ze szpiku kostnego, zwiększała poziom zróżnicowania tych komórek w kierunku EC (Lu i wsp., 2014). Aktywność SCD1 ma ochronny wpływ na przeżywalność EC i utrzymanie integralności naczyń krwionośnych. Nadekspresja SCD1 w ludzkich EC chroniła je przed lipotoksycznością wywołaną kwasem C16:0 (Peter i wsp., 2008). W początkowym etapie rozwoju miażdżycy dochodzi do akumulacji LDL w wewnętrznej warstwie tętnicy, w tym w EC. Akumulacja lipidów w EC prowadzi do wyhamowania aktywności SREBP1 i spadku ekspresji SCD1. Niski poziom ekspresji SCD1 prowadzi do zwiększenia poziomu śmierci EC na drodze ferroptozy i w konsekwencji przerwania ciągłości wewnętrznej warstwy tętnicy (Wang i wsp., 2024). Nadekspresja SREBP1 lub suplementacja MUFA zmniejszała toksyczny wpływ LDL na EC (Wang i wsp., 2024). Dodatkowo, SCD1 jest czynnikiem

pośredniczącym

w korzystnym wpływie treningu aerobowego na EC (Cavallero i wsp., 2024). W EC myszy mających możliwość treningu aerobowego *ad libitum* stwierdzono wyższy poziom SCD1 i MUFA. Było to związane z poprawionymi parametrami przepływu krwi w tętnicach (Cavallero i wsp., 2024). Jednocześnie myszy z unieczynnieniem SCD1 w EC miały podwyższony poziom białek adhezji komórkowej, aktywację szlaku NF- κ B i utrudniony przepływ krwi przez aortę (Cavallero i wsp., 2024). Przedstawione wyniki mogą stanowić potencjalne wytłumaczenie, dlaczego myszy SCD1^{-/-} LDLR^{-/-} pomimo korzystnego fenotypu metabolicznego, wykazują pogorszone objawy miażdżycy w aorcie (MacDonald i wsp., 2009; Brown i wsp., 2008). Wykazano ponadto, że SCD1 jest istotnym czynnikiem pośredniczącym w indukcji angiogenezy przez ischemiczne kardiomiocyty. Sugeruje to, że SCD1 może być zaangażowana w rewaskularyzację mięśnia sercowego po zawale (Gan i wsp., 2022). SCD1 reguluje również funkcję VSMC. Zahamowanie aktywności SCD1 w VSMC prowadziło do zwiększenia stresu ER i powstawania zwapnień (Masuda i wsp., 2015), a nadekspresja SCD1 w VSMC prowadziła do zmniejszenia lipotoksycznego efektu utlenionej formy lipoprotein i małej gęstości (ang. oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) poprzez aktywację lipofagii. Wyniki te pokazują, że aktywność SCD1 może mieć hamujący wpływ na rozwój miażdżycy zarówno poprzez wpływanie na EC, jak i VSMC. Globalne unieczynnienie SCD1 prowadzi do aktywacji metabolizmu glukozy z jednoczesnym wyhamowaniem β -oksydacji (Dobrzyn i wsp., 2008). Myszy ob/ob, które rozwijają spontanicznie otyłość z powodu braku możliwości wytwarzania leptyny po globalnym unieczynnieniu SCD1 mają poprawioną funkcję skurczową i rozkurczową serca, co było związane ze zmniejszonym poziomem akumulacji tłuszczu w kardiomiocytach oraz ze zahamowaniem ich apoptozy (Dobrzyn i wsp., 2010). Obniżenie poziomu TAG w sercu myszy z unieczynnieniem SCD1 związane jest z aktywacją szlaku lipolizy (Bednarski i wsp., 2016).

5. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

PVAT wydziela spektrum czynników regulujących homeostazę naczyniową. Zaburzenia metaboliczne tkanki tłuszczowej wywołane otyłością powiązane są ze zmiennym profilem wydzielanych przez PVAT adipokin, co prowadzi do rozwoju wielu powikłań, w tym komplikacji sercowo-naczyniowych. U myszy aortalna okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa dzieli się na odcinek piersiowy (TPVAT) i brzuszny (APVAT). TPVAT posiada cechy histologiczne i fizjologiczne zbliżone do brunatnej tkanki tłuszczowej (BAT), charakteryzując się wysoką aktywnością oksydacyjną i wysoką zawartością mitochondriów. Z kolei APVAT posiada cechy białej tkanki tłuszczowej, co wiąże się z magazynowaniem lipidów i niższą aktywnością metaboliczną. W takcie otyłości TPVAT wykazuje większą niż APVAT odporność na powstawanie stanu zapalnego i rekrutację prozapalnych makrofagów.

Desaturaza stearoilo-CoA 1 (SCD1) jest enzymem katalizującym przekształcenie nasyconych kwasów tłuszczowych w jednonienasycone kwasy tłuszczowe. W trakcie otyłości ekspresja i aktywność SCD1 w tkance tłuszczowej wzrasta, co wpływa na metabolizm i zapalenie tkanki tłuszczowej. Brak ekspresji SCD1 zwiększa ekspresję cytokin prozapalnych w tkance tłuszczowej, które promują rekrutację makrofagów i rozwój przewlekłego stanu zapalnego. Ponadto, myszy z wyciszeniem SCD1 charakteryzują się pogłębionymi zmianami miażdżycowymi. Z drugiej strony, nadekspresja SCD1 zmniejsza poziom zwapnienia w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz hamuje ich patologiczne przemodelowanie poprzez zmniejszanie akumulacji cholesterolu oraz wygaszanie prozapalnej aktywacji komórek śródbłonna.

Dotychczasowe badania, które skupiały się na roli SCD1 w regulacji homeostazy naczyniowej nie obejmowały interakcji pomiędzy PVAT a naczyniami krwionośnymi. Z tego powodu, celem niniejszej pracy doktorskiej było poznanie zależnych od SCD1 szlaków sygnałowych zaangażowanych w regulację funkcjonowania PVAT. Szczegółowe zagadnienia badawcze obejmowały:

1. Poznanie roli SCD1 w regulacji metabolizmu energetycznego TPVAT i APVAT myszy,
2. Określenie wpływu ekspresji SCD1 na rozwój stanu zapalnego w PVAT wywołanego dietą wysokotłuszczową,
3. Zbadanie wpływu SCD1 na związek pomiędzy funkcją wydzielniczą okołonaczyniowych adipocytów a funkcjonowaniem komórek śródbłonna naczyniowego i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

6. MATERIAŁY I METODY

6.1. Model *in vivo*

W celu zbadania roli SCD1 w regulacji funkcjonowania PVAT, wykorzystano samce myszy z globalnym nokautem genu *Scd1* (SCD1^{-/-}) (Miyazaki i wsp., 2001). Jako grupę kontrolną wykorzystano samce myszy typu dzikiego (ang. wild type, WT), szczepu C57BL6/J. Kontrolne myszy WT i SCD1^{-/-} karmione były standardową dietą laboratoryjną (chow) (Ssniff, Soest, Niemcy, nr kat. v153x), w której 8% wartości energetycznej stanowi tłuszcz. W celu wywołania stanu zaawansowanej otyłości, myszy WT i SCD1^{-/-} karmione były dietą HF (Ssniff, nr kat. E15742-34), w której 60% wartości energetycznej pochodzi z tłuszczu przez 16 tygodni (16 HF). Dieta HF zawierała dwa rodzaje MUFA: kwas C 16:1 (0,94%) i kwas 18:1 (13,97%). Stan wczesnej otyłości u myszy WT i SCD1^{-/-} indukowano poprzez karmienie myszy dietą HF przez 8 tygodni (8 HF). Myszy poddawano eutanazji w wieku 20-22 tygodni. Dostęp do pokarmu i wody był nieograniczony. Myszy hodowane były w temperaturze otoczenia 19±2°C o stałej wilgotności powietrza (około 55%). Cykl dnia/nocy był regulowany automatycznie i trwał odpowiednio 12/12 godzin. Przyrost masy ciała myszy był monitorowany systematycznie, co 7 dni. TPVAT i APVAT izolowano poprzez wycięcie aorty wraz z PVAT. Po kilkukrotnym przepłukaniu aorty w zimnym buforze fosforanowym PBS (ang. phosphate-buffered saline) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH = 7,4), zawierającym 10 mM EDTA w celu usunięcia krwi, PVAT oddzielono od aorty za pomocą pęsety. TPVAT izolowano z piersiowego odcinka aorty: pomiędzy łukiem aorty a przeponą. APVAT izolowano z brzuszego odcinka aorty: od przepony do rozwidlenia biodrowego aorty. Następnie tkanki przenoszono do plastikowych probówek i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Tkanki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Wszystkie procedury z udziałem zwierząt zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

6.1.1. Analiza biochemiczna osocza

Krew myszy pobierano metodą punkcji serca. Po otwarciu klatki piersiowej, od strony koniuszka serca wprowadzano jałową igłę iniekcyjną o wymiarach 0,6 mm x 25 mm do lewej komory serca i pobierano krew poprzez powolne odwodzenie tłoka strzykawki. Krew następnie przenoszono do probówki i odwirowywano w temperaturze 4°C z prędkością

1500 x g przez 10 minut. Osocze przenoszono następnie do nowej probówki i zamrażano natychmiast w ciekłym azocie. Osocze przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz.

Stężenie glukozy w osoczu zostało zmierzone za pomocą zestawu firmy BioSystems (nr kat. 11503), zgodnie z protokołem producenta. Do 1 ml odczynnika zawierającego oksydazę glukozową dodawano 10 µl osocza lub standardu glukozy o stężeniu 5,55 mM. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym zmierzono absorbancję mieszaniny za pomocą czytnika TECAN Infinite M200 Pro (Männedorf, Szwajcaria) przy długości fali 500 nm.

Stężenie cholesterolu w osoczu zostało zmierzone za pomocą zestawu firmy BioSystems (nr kat. 11505), zgodnie z protokołem producenta. Do 1 ml odczynnika zawierającego oksydazę cholesterolową dodawano 10 µl osocza lub standardu cholesterolu o stężeniu 5,18 mM. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym zmierzono absorbancję mieszaniny za pomocą czytnika TECAN Infinite M200 Pro przy długości fali 500 nm.

Stężenie TAG w osoczu zostało zmierzony za pomocą zestawu firmy BioSystems (nr kat. 11505), zgodnie z protokołem producenta. Do 1 ml odczynnika zawierającego oksydazę glicerolo-3fosforanową dodawano 10 µl osocza lub standardu glicerolu o stężeniu 2,26 mM. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym zmierzono absorbancję mieszaniny za pomocą czytnika TECAN Infinite M200 Pro przy długości fali 500 nm.

6.1.2. Dootrzewnowy test obciążenia glukozą

Test obciążenia glukozą wykonywano w ostatnim tygodniu trwania eksperymentu. Przed testem, myszy były głodzone przez 12 godzin. W pierwszej kolejności dokonano pomiaru stężenia glukozy na czczo. Następnie dootrzewnowo podawano glukozę w dawce 2 g/kg masy ciała. Zmiany w poziomie glukozy mierzono po czasie 15, 30, 60, 90 i 120 minut. Pomiarów dokonywano za pomocą glukometru Optium Xido. Krew pobierano z końcówki naciętego ogona myszy.

6.1.3. Przygotowanie tkanek do analiz histologicznych

Tkanki utrwalano przez 3 dni w 4% roztworze paraformaldehydu w 4°C. Po wypłukaniu paraformaldehydu, tkanki odwodniono w rosnącym stężeniu etanolu: 50%; 70%; 80%; 90% i 100%. Tkanki inkubowano przez 1 godzinę w każdym roztworze etanolu. Następnie przeniesiono je do mieszaniny etanol:ksylen, zmieszanych w stosunku 1:1 (v:v) na 1 godzinę,

a następnie do 100% ksylenu na 1 godzinę. Tkanki zostały następnie przeniesione do mieszaniny ksylenu:parafina o temperaturze 52°C na 1 godzinę, a następnie umieszczone w parafinie o temperaturze 52°C na 18 godzin. Tkanki zatopiono w bloczku parafinowym za pomocą zatapiarki modułowej (Microm EC350). Po zatopieniu w parafinie, tkanki pocięto na skrawki o grubości 5µm za pomocą mikrotomu Zeiss Hyrax M55. Preparaty wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN.

6.1.4. Barwienia histochemiczne

Przed wykonaniem barwienia, z tkanek usunięto parafinę poprzez inkubację preparatów 2 x 3 minuty w ksylenu oraz 1 x 3 minuty w mieszaninie ksylenu:etanol w stosunku 1:1 (v:v). Następnie tkanki inkubowano po 3 minuty w roztworach o malejącym stężeniu etanolu: 100%; 95%; 70%; 50%. Tkanki przenoszono następnie do wody na 10 minut. Do oceny struktury PVAT wykorzystano barwienie hematoksyliną i eozyną. Preparaty inkubowano w pierwszej kolejności w roztworze z hematoksyliną (Sigma, nr kat. GHS116) przez 1 minutę. Po wypłukaniu nadmiaru barwnika w wodzie, preparaty barwiono eozyną (Sigma, nr kat. HT110116) przez 1 minutę. Nadmiar barwnika również wypłukano wodą. Hematoksylina barwi jądra komórkowe na fioletowo, natomiast eozyna barwi cytoplazmę komórki na różowo. W celu wybarwienia włókien kolagenowych, uwodnione tkanki traktowano hematoksyliną przez 1 minutę. Po odpłukaniu nadmiaru barwnika w wodzie, tkanki barwiono w mieszaninie kwasu pikrynowego i czerwieni Syriusza (Abcam, nr kat. 146832) przez 10 minut. Nadmiar barwnika został wypłukany w wodzie. Po wykonaniu barwienia, tkanki poddano odwodnieniu poprzez inkubację w rosnących stężeniach etanolu: 50%; 70%; 95%; 100%. Każda inkubacja trwała 1 minutę. Aby uzyskać klarowny obraz, tkanki następnie inkubowano w mieszaninie ksylenu:etanol w stosunku 1:1 (v:v) przez 1 minutę, a następnie preparat inkubowano w ksylenu przez 2 minuty. Po wyschnięciu, na preparaty nakropiono medium do preparatów mikroskopowych (Leica, nr kat. 140464300011) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym.

6.1.5. Analizy histologiczne

Zdjęcia preparatów TPVAT i APVAT mysz WT i SCD1^{-/-}, wybarwionych za pomocą hematoksyliny i eozyny lub czerwieni Syriusza zostały wykonane mikroskopem świetlnym Olympus VS110 (Olympus, Tokyo, Japonia). Udział kropli lipidowych w całkowitej powierzchni tkanki obliczono jak opisano wcześniej przez Tero i wsp., (2022) z użyciem

oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Stany Zjednoczone). Obraz tkanki został przekształcony tak, aby wykluczyć wszystkie obszary nie zajmowane krople lipidowe. Następnie, wygenerowano obraz obejmujący cały obszar tkanki, z wyłączeniem kropli lipidowych. Powstałe obrazy nałożono na siebie i obliczono powierzchnię całkowitej tkanki i tkanki z wykluczonymi kroplami lipidowymi. Udział kolagenu w ścianie aorty został określony na podstawie intensywności wybarwienia czerwienią Syriusza za pomocą oprogramowania ImageJ.

6.1.6. Mikroskopia elektronowa

Po wycięciu, fragmenty tkanek o objętości około 1 mm³ zostały wypłukane zimnym PBS, zawierającym 1 mM EDTA. Następnie tkanki zostały przeniesione do 2,5% roztworu aldehydu glutarowego na 2 godziny, w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym wypłukaniu w zimnym PBS, tkanki przeniesiono do 1% roztworu tlenku osmu i inkubowano 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie próby trzykrotnie przepłukano wodą destylowaną przez 10 minut. Tkanki zostały odwodnione poprzez inkubację w rosnącym stężeniu etanolu (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Tkanki były inkubowane w każdym roztworze przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie tkanki zostały zanurzone w żywicy epoksydowej Agar 100 (Agar Scientific, Wielka Brytania) i inkubowane przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie próby zalano świeżą żywicą w silikonowych foremkach i polimeryzowano w piecu w temperaturze 60°C przez 48 godzin. Z utwardzonych bloków wycięto ultracienkie skrawki o grubości 60 nm za pomocą ultramikrotomu (Leica Ultracut). Skrawki przeniesiono na siatki miedziane pokryte filmem z formvaru i kontrastowano przez 10 minut w 2% roztworze octanu uranylu, a następnie przez 5 minut w 0,4% roztworze cytrynianu ołowiu. Tkanki obrazowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1400 (Tokio, Japonia) przy napięciu przyspieszającym 80kV w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Oceny ultrastruktury mitochondriów dokonano przy powiększeniu 8000 x z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ.

6.1.7. Gęstość sieci naczyń krwionośnych

Gęstość sieci naczyń krwionośnych określono zgodnie z protokołem opublikowanym przez Willows i wsp., (2022). Po wyizolowaniu, PVAT został przeniesiony do 2% roztworu paraformaldehydu i inkubowany przez 24 godziny w 4°C. Następnie, paraformaldehyd wypłukano za pomocą PBS i dokonano redukcji grubości preparatu (osi Z) poprzez ściśnięcie

preparatów między szkiełkami mikroskopowymi przez 1,5 godziny w 4°C. Po redukcji osi Z, preparaty przeniesiono do roztworu 2,5% BSA i 1% detergentu Triton X-100 w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania i zwiększenia przepuszczalności błon biologicznych. Następnie preparaty przeniesiono do 5% roztworu H₂O₂ w 20% dimetylosulfotlenku (DMSO) w 100% metanolu w celu wygaszenia autofluorescencji. Inkubację prowadzono 24 godziny w 4°C. Po wygaszeniu autofluorescencji, próby inkubowano z roztworem izolektyny skoniugowanej z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor488 (Thermo Fisher, nr kat. I21411) o stężeniu 5 µg/ml w 4°C przez 24 godziny. Po wypłukaniu barwnika, preparaty zamknięto, używając medium do preparatów fluorescencyjnych. Obrazowania dokonano za pomocą skanującego mikroskopu konfokalnego Leica SP8 w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Gęstość naczyń została obliczona jako udział powierzchni naczyń w całkowitej przeanalizowanej powierzchni za pomocą oprogramowania ImageJ.

6.1.8. Pomiar aktywności ATGL

Aktywność ATGL w PVAT została zmierzona za pomocą substratu dla lipaz EnzCheck (Thermo Fischer, nr kat. E33955). Tkanki zostały zhomogenizowane w buforze zawierającym 20 mM Tris-HCl pH=7,4; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 2 mM Na₃VO₄ 1 mM PMSF; 10 mM 2-merkaptotetanolu; 5 µg/ml pepstatyny; 10 µg leupetyny i 1,4 µg aprotyny za pomocą homogenizatora nożowego IKA T10 basic. Próby odwirowywano z prędkością 10000 x g w 4°C przez 10 minut. Nadsącz został przeniesiony do nowych probówek i dokonano pomiaru stężenia białka używając odczynnika Bradford Protein Assay. Mieszanina reakcyjna została przygotowana poprzez rozcieńczenie substratu dla lipaz EnzCheck o stężeniu 20 µM w buforze A do końcowego stężenia 1 µM. Rozcieńczony substrat ogrzano w temperaturze 37°C. Do pomiaru użyto 30µg białka z próby i 50 µl roztworu substratu dla lipaz EnzCheck. Kończącą objętość dopasowano do 100 µl za pomocą buforu A. Odczytu fluorescencji dokonano za pomocą czytnika TECAN Infinite M200 Pro w temperaturze 37°C, przy długościach fali wzbudzenia/emisji odpowiednio 485/510 nm. Fluorescencję mierzono co 30 s przez 90 minut z wytrząsaniem trwającym 2s, poprzedzającym każdy odczyt. Aktywność ATGL została obliczona na podstawie kąta nachylenia wykresu wzrostu fluorescencji do osi x, używając odcinka wykresu, w którym wzrost wartości fluorescencji miał charakter liniowy.

6.1.9. Badanie polaryzacji makrofagów z użyciem cytometrii przepływowej

Polaryzacja makrofagów w PVAT została określona na podstawie obecności markerów, występujących na powierzchni komórek SVF. Po uśmierceniu myszy, aorta z PVAT była zanurzana w zimnym buforze PBS, zawierającym 10 mM EDTA, a następnie PVAT był oddzielany od aort za pomocą nożyczek chirurgicznych. Tkanki były poddawane trawieniu kolagenazą typu I (Gibco, nr kat. 17100-017) o stężeniu 1 mg/ml w temperaturze 37°C przez 1 godzinę z wytrząsaniem. SVF została oddzielona od adipocytów za pomocą wirowania z prędkością 700 x g, 4°C, 10 minut. Po usunięciu nadsącza, komórki utrwalano poprzez zawieszenie ich w 100% etanolu i przechowywane w 4°C do czasu dalszych analiz. W celu wybarwienia komórek przeciwciałami, w pierwszej kolejności dokonywano stopniowej rehydratacji w zmniejszających się stężeniach etanolu: 100%, 95%, 80%, 70%, 50%. Po każdej zmianie roztworu etanolu, komórki wirowano przy 700 x g, 4°C, 5 minut. Następnie komórki zawieszono w buforze FACS, zawierającym PBS; 5 mM EDTA i 0,5% FBS. Fragmenty krystalizujące (ang. crystallizable fragment, Fc) endogennych receptorów zablokowano poprzez inkubację z przeciwciałem anti-CD16/32 przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Nadmiar przeciwciał został wypłukany za pomocą wirowania z buforem FACS przy 700 x g, 4 °C, 50 minut. Następnie komórki wybarwiono przeciwciałami anti-CD45, anti-F4/80, anti-CD11c i anti-CD206, inkubując komórki w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Pomiarów dokonano za pomocą cytometru spektralnego Cytek (Fremont, CA, Stany Zjednoczone) Aurora w Pracowni Cytometrii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie, wyposażonego w lasery 355 nm; 405 nm; 488 nm; 561 nm i 640 nm. Poziom ekspresji CD11c, będącego markerem makrofagów M1 i CD206, będącego markerem makrofagów M2 określono w populacji komórek wykazujących ekspresję F4/80 i CD45.

6.2. Modele *in vitro*

6.2.1. Okołonaczyniowe adipocyty pierwotne

W celu określenia wpływu SCD1 na regulację funkcjonowania okołonaczyniowych adipocytów *in vitro*, wykorzystano komórki pochodzące z SVF w TPVAT, izolowanego z myszy WT i SCD1-/- w wieku 4 - 6 tygodni. SVF została oddzielona od adipocytów poprzez trawienie TPVAT kolagenazą typu I (Gibco, nr kat. 17100-017) w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez 1 godzinę. Następnie próby wirowano z prędkością 700 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu, komórki SVF znajdowały się w osadzie,

a adipocyty unosiły się na powierzchni roztworu kolagenazy. Po izolacji, komórki były wysiewane w gęstości 10^5 komórek/dołek na sześciodołkową płytkę (średnica dołka 35 mm) (Falcon, nr kat. 353046) i hodowane w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 21% O₂ w powietrzu nasyconym parą wodną do osiągnięcia konfluencji z użyciem mieszaniny pożywek: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), o stężeniu glukozy wynoszącym 4,5g/l (Biowest, nr kat. L0102-500) i Ham's F12 (Biowest, nr kat. L0135-500) w stosunku 1:1 (v:v) z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (ang. fetal bovine serum, FBS) (Biowest, nr kat. S1520-500), mieszaniny antybiotyków: streptomycyny i penicyliny o stężeniu 100 µg/ml (Biowest, nr kat. L0018-100), FGF2 o stężeniu 10 ng/µl (Biotechne, nr kat. 233-FB-010/CF) i czynnika wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor, EGF) o stężeniu 10 ng/µl (Biotechne, nr kat. 236-EG). Po osiągnięciu przez komórki konfluencji, pobudzano ich różnicowanie poprzez uzupełnienie pożywki DMEM/F12 15% FBS insuliną o stężeniu 10 µg/ml (Sigma, nr kat. 11070-73-8), deksametazonem o stężeniu 1µM (Sigma, nr kat. D4902), rosiglitazonem o stężeniu 1 µM (Sigma, nr kat. R2408) i 3-izobutylo-1-metyloksantyną (IBMX) o stężeniu 0,5 mM (Sigma, nr kat. I5879). Różnicowanie prowadzono przez 7 dni, zmieniając pożywkę co drugi dzień. Aby adipocyty mogły osiągnąć stan maksymalnego zróżnicowania *in vitro*, po początkowej fazie różnicowania, w której stosowana jest mieszanina aktywatorów adipogenezy, stosuje się pożywkę hodowlaną uzupełnioną insuliną (Zebisch i wsp., 2012). W celu podtrzymania różnicowania w okołonaczyniowych adipocytach, zmieniano pożywkę na DMEM/F12 15% FBS, zawierającą jedynie insulinę o stężeniu 10 µg/ml. Podtrzymanie różnicowania trwało 48 godzin. W niniejszej pracy adipocyty wyizolowane z PVAT myszy SCD1^{-/-} oznaczone zostały jako SCD1 KO.

6.2.2. Otrzymywanie medium pohodowlanego

Medium pohodowlane znad pierwotnych okołonaczyniowych adipocytów (ang. adipocyte conditioned medium, ACM) otrzymano poprzez hodowlę zróżnicowanych komórek z pożywką DMEM/F12 bez FBS przez 24 godziny. Po tym czasie, pożywka została zebrana i przefiltrowana przez filtr strzykawkowy o średnicy poru 0,22 µm (Roth, nr kat. P816.1). Następnie pożywkę przechowywano w temperaturze -80°C.

6.2.3. Pomiar zawartości adipokin w medium pohodowlanym

W celu określenia względnej zawartości adipokin w ACM znad okołonaczyniowych adipocytów pierwotnych, wykorzystano zestaw Proteome Profiler Mouse Adipokine Array

Kit (Biotechne, nr kat. ARY013). Zestaw zawiera membrany z unieruchomionymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko konkretnym adipokinom. Membrany wstępnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w buforze reakcyjnym w celu uwodnienia przeciwciał. Następnie, 500 μ l WT ACM lub SCD1 KO ACM dodano do buforu reakcyjnego wraz z mieszaniną przeciwciał drugorzędowych. Mieszaninę inkubowano z membranami w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po inkubacji usunięto bufor reakcyjny z przeciwciałami i membrany wypłukano buforem płuczącym 3 x 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu, membrany inkubowano z zawiesiną streptawidyny skoniugowanej z peroksydazą chrzanową przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Membrany następnie płukano roztworem płuczającym 3 x 10 minut w temperaturze pokojowej. Do wizualizacji zawartości adipokin w medium pohodowlanym użyto załączonego do zestawu odczynnika Chemi Reagent Mix, zawierającego substrat dla peroksydazy chrzanowej. Produktem ubocznym reakcji peroksydacji jest luminescencja, której intensywność była rejestrowana za pomocą kliszy rentgenowskiej Medical X-ray Blue (Carestream, nr kat. 166 6007). Analizy densytometryczne zostały przeprowadzone za pomocą oprogramowania ImageJ.

6.2.4. Barwienie komórek czerwinią oleistą

Czerwień oleista jest barwnikiem rozpuszczalnym w tłuszczach, który wiąże się specyficznie z neutralnymi lipidami, takimi jak TAG i estry cholesterolu. Po usunięciu pożywki hodowlanej, komórki zostały przepłukane buforem fosforanowym PBS. Następnie komórki utrwalono za pomocą 4% paraformaldehydu przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przepłukiwano izopropanolem przez 10 minut w temperaturze pokojowej i inkubowano z 0,5% roztworem czerwieni oleistej rozpuszczonej w izopropanolu przez 10 minut. Nadmiar barwnika został usunięty poprzez kilkukrotne przepłukanie wodą destylowaną. Komórki były obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym Leica AF 7000 (Leica, Wetzlar, Niemcy) w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie

6.2.5. Pomiar tempa lipolizy

Pomiaru aktywności lipolitycznej adipocytów dokonano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu (Abcam, nr kat. ab185433), bazującego na ilościowym oznaczaniu glicerolu, będącego końcowym produktem hydrolizy TAG. Komórki hodowano w płytce

96-cio dołkowej (Falcon, nr kat. 353072). Po usunięciu pożywki hodowlanej i dwukrotnym przepłukaniu za pomocą buforu płuczącego, do komórek dodano 150 μ l medium pomiarowego i inkubowano z nim komórki przez 3 godziny. W tym czasie, komórki uwalniały glicerol do medium. Jednocześnie przygotowano krzywą standardową poprzez seryjne rozcieńczenie 100 mM glicerolu w medium pomiarowym w taki sposób, żeby końcowe rozcieńczenia standardu wynosiły kolejno: 0, 2, 4, 6, 8 i 10 nmol/dołek. Reakcję dla krzywej standardowej i próbek eksperymentalnych prowadzono w końcowej objętości 100 μ l, zawierającej 50 μ l medium pomiarowego z glicerolem i 50 μ l mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 46 μ l medium pomiarowego, 2 μ l mieszaniny enzymów utleniających glicerol i 2 μ l sondy kolorymetrycznej. Wynikiem reakcji produktów utleniania glicerolu i sondy był barwny produkt, którego ilość została zmierzona po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, przy długości fali 570 nm za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro.

6.2.6. Pomiar dokomórkowego transportu glukozy

Do pomiaru wychwytu glukozy przez okołonaczyniowe adipocyty pierwotne zastosowano fluorescencyjny analog glukozy: (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoksyglukozę (2-NBDG) (Abcam, nr kat. 235976). Przed pomiarem zmieniono pożywkę z DMEM/F12 15% FBS na DMEM/F12 0% FBS na 4 godziny. Po tym czasie dodano 2-NBDG o stężeniu 100 μ M, rozpuszczony w DMEM/F12 bez dodatku FBS. Komórki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po inkubacji, komórki przepłukano trzykrotnie za pomocą zimnego PBS, aby usunąć niewchłonięty barwnik. Odczytu fluorescencji dokonywano za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro przy długościach fali wzbudzenia/emisji: 465/540 nm.

6.2.7. Pomiar poziomu ATP

Ilość ATP produkowanego przez okołonaczyniowe adipocyty pierwotne została zmierzona z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu, zgodnie z protokołem producenta (Abcam, nr kat. ab113849). Zestaw ten służy do pomiaru luminescencji jako produktu ubocznego zależnej od ATP aktywności lucyferazy. W pierwszej kolejności przygotowano krzywą standardową poprzez seryjne rozcieńczenie ATP w 50 μ l buforu pomiarowego w następujących stężeniach: 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 oraz próbę ślepą, nie zawierającą ATP. W celu pomiaru ATP, komórki poddano lizie w buforze pomiarowym, zawierającym detergent. Następnie, do przygotowanych prób oraz do standardu dodano roztwór substratu lucyferazy i lucyferazy o objętości 50 μ l. Przygotowane próby inkubowano

przez 10 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie dokonano pomiaru luminescencji za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro.

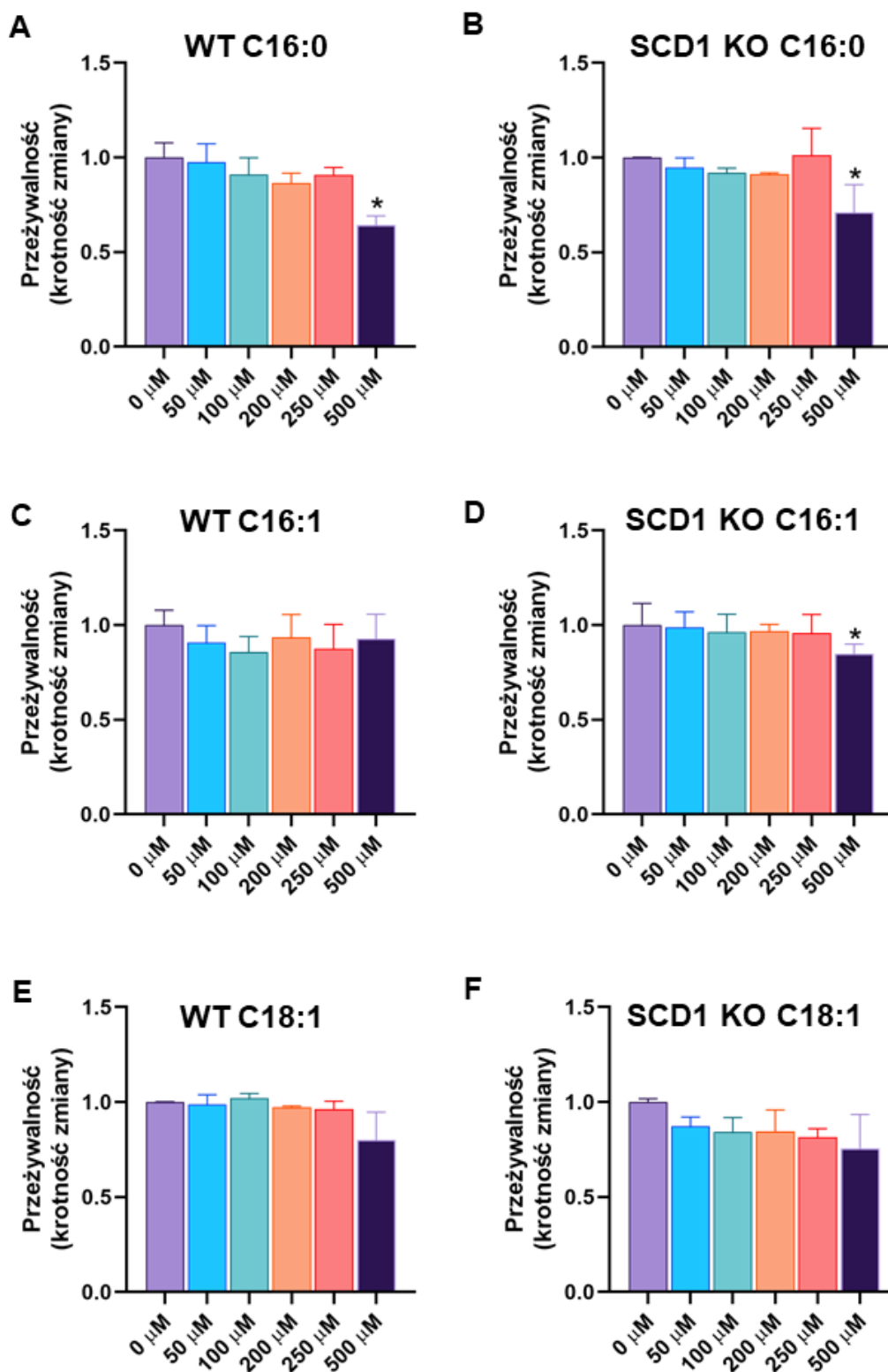
6.2.8. Przygotowanie kwasów tłuszczowych połączonych z albuminą

Kwasy tłuszczowe: C16:0 (Sigma, nr kat. P9417), C16:1 (Sigma, nr kat. P0500) i C18:1 (Sigma, nr kat. O1383) zostały przygotowane w kompleksie z wolną od kwasów tłuszczowych albuminą surowicy bydlęcej (ang. bovine serum albumin, BSA), jak opisano przez Alsabeeh i wsp., 2018. Dla każdego kwasu przeprowadzono reakcję zmydlania z 0,1 M NaOH i 10% roztworem BSA (Bioshop, nr kat. ALB001). w temperaturze 70°C przez 4 godziny. Otrzymane kompleksy kwasów tłuszczowych o końcowym stężeniu 25 mM przefiltrowano przez filtr o rozmiarze porów 0,45 µm (Roth, nr kat. P818.1) i przechowywano w temperaturze -20°C.

6.2.9. Ocena toksyczności kwasów tłuszczowych

Po zróżnicowaniu okołonaczyniowych adipocytów, pożywka DMEM/F12 15% FBS została zmieniona na DMEM/F12 bez FBS. Po 24 godzinach w warunkach pozbawionych FBS, komórkom przywracano FBS o stężeniu 5% z dodatkiem kwasów tłuszczowych. Stopień toksyczności kwasów tłuszczowych wywieranej na adipocyty został określony przy użyciu odczynnika CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega, nr kat. G8080). Metoda ta pozwala na pośrednie określenie żywotności komórek dzięki kolorymetrycznej metodzie pomiaru aktywności metabolicznej. Rezazurina o kolorze niebieskim przekształcana jest do rezorufiny o kolorze czerwonym (aktywność dehydrogenazy NAD(P)H) wyłącznie przez komórki wykazujące aktywność metaboliczną. 50 µl odczynnika CellTiter-Blue rozpuszczano w 550 µl DMEM. Komórki inkubowano z odczynnikiem przez 1 godzinę w 37°C, po czym zmierzono absorbancję pożywki za pomocą czytnika TECAN Infinite M200 Pro przy długości fali 570 nm. Stwierdzono, że kwas C16:0 w stężeniu 500 µM był toksyczny dla adipocytów WT i SCD1 KO (Rycina 8A, B). Kwas C16:1 wywierał toksyczny wpływ na adipocyty SCD1 KO w stężeniu 500 µM, lecz nie na adipocyty WT (Rycina 8C, D). Kwas C18:1 nie wpływał na przeżywalność adipocytów WT i SCD1 KO bez względu na stężenie (Rycina 8E, F). W przypadku doświadczeń z wpływem kwasu C16:0 na adipocyty, wybrano stężenie 200 µM, ponieważ jest ono zbliżone do fizjologicznego oraz jest szeroko stosowane w badaniach nad zjawiskiem lipotoksyczności (Shultz, 1991). W przypadku doświadczeń z wpływem kwasów C16:1 i C18:1 na adipocyty, wybrano stężenie 50 µM. Stężenie takie jest często wykorzystywane w doświadczeniach nad fizjologiczną odpowiedzią komórek na

kwasy tłuszczowe z jednoczesnym pominięciem lipotoksycznego wpływu wyższych stężeń (Alsabeeh i wsp., 2018).



Rycina 8. Wpływ kwasów tłuszczowych na przeżywalność okołonaczyniowych adipocytów pierwotnych. Wpływ kwasu 16:0, 16:1 oraz 18:0 na przeżywalność adipocytów WT (A, C, E, odpowiednio) oraz adipocytów SCD1 KO (B, D, F, odpowiednio). * $p < 0,05$ vs. 0 μM . N=3 niezależne eksperymenty.

6.2.10. Barwienie immunocytochemiczne

W celu wybarwienia adipocytów z użyciem przeciwciał monoklonalnych, pierwotne adipocyty, wyizolowane z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} oraz komórki A7r5 hodowano na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w 24-dółkowej płytce (Falcon, nr kat. 353047). Po usunięciu medium znad komórek i trzykrotnym przepłukaniu zimnym PBS, komórki utrwalano 4% roztworem PFA przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, po wypłukaniu PFA, w celu umożliwienia przeciwciałom dostanie się do wnętrza komórek, błony „uprzepuszczalniono” poprzez inkubację z 0,2% roztworem detergentu Triton x-100. Po wypłukaniu Tritonu x-100, miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał zostały zablokowane poprzez inkubację z 1% roztworem BSA przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi: anty-OXPHOS; anty-fosfoERK1/2 lub anty-PLIN1. Po inkubacji, nadmiar przeciwciał został wypłukany za pomocą PBS. Następnie zastosowano przeciwciała drugorzędowe anty-mysz, wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 488 lub anty-królik, wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 563. Komórki inkubowano z przeciwciałem przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu przeciwciała, jądra komórkowe wybarwiono 4',6-diamidyno-2-fenylindolem (DAPI) o stężeniu 0,5 µg/ml przez 5 minut. Włókna aktynowe wybarwiono falloidyną (Thermo Scientific, nr kat. A12379) o stężeniu 0,5 µg/ml przez 5 minut. Po barwieniu, komórki przepłukano trzykrotnie zimnym PBS, a następnie preparaty zamknięto używając medium do preparatów fluorescencyjnych. Komórki obrazowano przy użyciu skanującego mikroskopu konfokalnego Leica SP8 w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie.

6.2.11. Pomiar tempa zużycia tlenu

Tempo zużycia tlenu (ang. oxygen consumption rate, OCR) przez okołonaczyniowe adipocyty pierwotne zostało zmierzone przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu, wykorzystującego wrażliwą na tlen sondę (Abcam, nr kat. ab197243). Zmniejszające się stężenie tlenu w pożywce skutkuje aktywacją fluorescencji sondy. Po usunięciu pożywki hodowlanej, do komórek została dodana pożywka DMEM/F12 bez FBS z rozpuszczoną sondą w stężeniu roboczym (1x). Aby uniknąć napływu tlenu do próby w trakcie pomiaru, na wierzch pożywki z sondą dodano warstwę oleju mineralnego. Zmiany fluorescencji w próbce śledzono za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro przy długości fali wzbudzenia

380 nm. Fluorescencję mierzono przy długości fali 650 nm co 30 sekund. OCR przedstawiono jako wzrost intensywności fluorescencji w próbie.

6.2.12. Pomiar produkcji reaktywnych form tlenu

Poziom ROS produkowanych przez okołonaczyniowe adipocyty został przeprowadzony za pomocą dihydroetydyny (DHE) (Abcam, nr kat. ab236206). Adipocyty były hodowane w płytce 96-cio dołkowej. DHE rozpuszczono w PBS w stosunku 1:1000. Po usunięciu pożywki hodowlanej, komórki wypłukano zimnym PBS. Następnie do komórek dodano 100 μ l roztworu DHE i dokonano natychmiast odczytu fluorescencji przy długościach fal wzbudzenia/emisji odpowiednio 510 /600 nm za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro.

6.2.13. Pomiar masy mitochondriów i potencjału błonowego

Do pomiaru masy mitochondriów użyto barwnika MitoTracker Green (Thermo Fisher, nr kat. M7512), a do pomiaru potencjału błonowego użyto tetrametylorodoaminy (TMRM) (Thermo Fisher, nr kat. T668). Do 10 ml pożywki DMEM. dodano 1,93 μ l Mitotracker Green oraz 5 μ l TMRM. Komórki hodowano w 96-cio dołkowej płytce. Po usunięciu pożywki hodowlanej i przepłukaniu komórek zimnym PBS, dodano 100 μ l roztworu Mito Tracker Green i TMRM w DMEM i inkubowano 30 minut w 37°C. Następnie przepłukano komórki zimnym PBS i dokonano odczytu fluorescencji. Dla Mitotracker Green wartości długości fali wzbudzenia/emisji to odpowiednio: 490/512 nm. Dla TMRM wartości długości fali wzbudzenia/emisji to odpowiednio: 552/574 nm. Masa mitochondriów jest proporcjonalna do wartości fluorescencji Mito Tracker Green, natomiast potencjał błonowy mitochondriów obliczono jako stosunek TMRM/Mito Tracker Green. Pomiarów fluorescencji dokonano za pomocą aparatu TECAN Infinite M200 Pro

6.2.14. Immunoprecypitacja chromatyny

Immunoprecypitacja chromatyny (ang. chromatin immunoprecipitation, ChIP), wyizolowanej z okołonaczyniowych adipocytów, została wykonana jak opisano uprzednio (Hiraïke, 2023), z modyfikacjami. Po zakończeniu traktowania komórek kwasami tłuszczowymi, pożywka hodowlana została usunięta, a komórki zostały przepłukane PBS. Z uwagi na fakt, że adipocyty zawierają duże ilości lipidów, które mogą potencjalnie wpływać na wydajność ChIP, zastosowano metodę wzbogacenia frakcji jądrowej przed utrwaleniem komórek. W tym celu komórki inkubowano przez 10 minut z buforem hipotonicznym, zawierającym 10 mM Tris-HCl pH=7,5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂ i 0,1%

IGEPAL CA-630 o objętości 1,5 ml. Następnie komórki zebrano za pomocą skrobaka (Falcon, nr kat. 353086) i zawieszono w buforze hipotonicznym, do którego dodano 37% roztwór paraformaldehydu, do końcowego stężenia 1%. Komórki utrwalano przez 7 minut w temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając. Utrwalanie wygaszono poprzez dodanie 2,5 M glicyny do końcowego stężenia 125 mM. Komórki inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając. Następnie komórki odwirowano przy 440x g, 4°C, 5 minut. Komórki przepłukano zimnym PBS i odwirowano przy 5800 x g, 4°C, 5 minut. Osady zamrożono w ciekłym azocie. Po wyjęciu z azotu, komórki poddano lizie za pomocą buforu zawierającego 10 mM Tris-HCl pH=7,5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂ i 0,5% IGEPAL CA-630. Komórki inkubowano w lodzie przez 10 minut, po czym je odwirowano przy 5800 x g, 4°C, 5 minut. Następnie komórki zawieszono w buforze zawierającym 1% siarczan dodecyłu sodu (SDS); 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH=8 i inkubowano w lodzie 10 minut. Wyizolowaną chromatynę poddano rozbiciu ultradźwiękami w sonikatorze wyposażonym w łaźnię wodą (Bioruptor Standard, Diagenode). W sonikatorze ustawiono wysoką częstotliwość fal ultradźwiękowych, po czym wykonano 5 cykli sonikacji. Na każdy cykl składało się 30 sekund emisji ultradźwięków i 30 sekund przerwy. Następnie próby odwirowano przy 20400 x g, 4°C, 5 minut. Nadsącz przeniesiono do nowych probówek i rozcieńczono 10-krotnie w buforze zawierającym 0,00033% SDS; 0,037% Triton X-100; 0,0377 mM EDTA; 0,566 mM Tris-HCl pH=8 i 167 mM NaCl. Na tym etapie pobrano też 10% objętości każdej próby i przechowywano w 4°C do czasu dalszych analiz. Do próbek na każde 1000 µl dodano 1 µl przeciwciała skierowanego przeciwko histonowi 3, posiadającemu potrójną metylację lizyny 27 (H3K27me3). Próby inkubowano z przeciwciałami 24 godziny w 4°C, delikatnie mieszając. Po inkubacji z przeciwciałami, do próbek dodano 40 µl zawiesiny kulek agarozowych (Thermo Fischer, nr kat. 26159) i inkubowano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Kompleksy przeciwciało-kulki agarozowe zostały odwirowane przy prędkości 3000 x g w 4°C przez 1 minutę. Kompleksy poddano wysalaniu: najpierw zawieszono je w buforze o niskim stężeniu soli, zawierającym 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20mM Tris-HCl pH=8; 150 mM NaCl. Kompleksy odwirowano w 3000 x g w 4°C przez 1 minutę. Następnie kompleksy zawieszono w buforze o wysokim stężeniu soli, zawierającym 0,1% SDS; 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH=8; 500 mM NaCl. Kompleksy odwirowano w 3000 x g w 4°C przez 1 minutę, a następnie zawieszono w buforze zawierającym jonu litu: 0,25 M LiCl; 1% IGEPAL CA-630; 1% Na-deoksychoalanu; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH=8. Kompleksy odwirowano w 3000 x g w 4°C przez 1 minutę, a następnie zawieszono w buforze zawierającym 1% SDS

i 0,1 M NaHCO₃. Z oczyszczonych próbek zawierających chromatynę usunięto RNA za pomocą RNazy A/T1 (Thermo Fisher, nr kat. EN0551). Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po usunięciu RNA, z próbek usunięto białka za pomocą proteinazy K (Thermo Fisher, nr kat. 26160). Reakcję prowadzono w 55°C przez 18 godzin. Następnie DNA pozyskany z ChIP oraz z uprzednio zachowanego 10% całkowitej ilości chromatyny oczyszczono za pomocą zestawu PureLink PCR Purification Kit (Thermo Fisher, nr kat. K310001), zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, DNA w próbkach został odwodniony poprzez dodanie izopropanolu. Mieszanina została następnie nałożona na kolumnę zawierającą złożę krzemionkowe. W wyniku wirowania, białka oraz inne zanieczyszczenia zostały usunięte z kolumny, podczas gdy DNA pozostawał unieruchomiony w warstwie krzemionki. W ostatniej fazie dokonano wypłukania DNA z kolumny za pomocą nisko jonowego buforu elucyjnego.

6.2.15. ChIP-qPCR

Otrzymane w wyniku immunoprecypitacji chromatyny fragmenty DNA przeanalizowano za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Mieszanina reakcyjna zawierała 5 µl odczynnika SsoAdv Univer SYBR Green MIX (Biorad, nr kat. 1725272), 0,5 µl każdego ze starterów (Tabela 2), oraz 4 µl matrycy DNA. Reakcję prowadzono w termocyklerze Biorad CFX Connect Real-Time PCR Detection System. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: 95°C, 5 min, następnie 40 cykli 60 °C, 30 s, następnie 72°C, 30 s. Po każdym cyklu następował odczyt intensywności fluorescencji. Po zakończonej reakcji odczytano wartości Ct, stanowiące numer cyklu, w którym wartość fluorescencji przekroczyła wartość graniczną w fazie wzrostu wykładniczego. Wynik ChIP-qPCR przedstawiono jako procent DNA obecny w próbce po ChIP (procent całkowitego wejściowego DNA, ang. input Ct). w porównaniu z całkowitym DNA z uwzględnieniem stopnia rozcieńczenia (ang. dilution factor, DF). W pierwszej kolejności obliczono Ct całkowitego wejściowego DNA (Adjusted Input Ct), stanowiący numer cyklu fazy, w której wartość fluorescencji przekroczyła wartość graniczną (Input Ct), pomniejszony o DF:

$$\text{Adjusted Input Ct} = \text{Input Ct} - \log_2(\text{DF})$$

Następnie obliczono wartość ΔC_t , stanowiącą różnicę w wartości C_t uzyskaną dla próby po ChIP (ChIP C_t) i Adjusted Input C_t :

$$\Delta C_t = \text{ChIP } C_t - \text{Adjusted Input } C_t$$

Procent całkowitego wejściowego DNA (% input) obliczano zgodnie ze wzorem:

$$\% \text{ input} = 2^{-\Delta C_t} \times 100$$

Wartości otrzymane w wyniku obliczeń odpowiadają ilości H3K27me3 w regionach promotorowych genów adiponektyny (*Adipoq*) i interleukiny 6 (*Il6*). W każdym promotorze zbadano trzy losowo wybrane obszary. Każdy obszar został oznaczony wartością orientacyjnej odległości badanego odcinka od miejsca startu transkrypcji (-100pz, -300pz itd). Startery wykorzystane w analizach ChIP-qPCR zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystane w analizach ChIP-qPCR.

Nazwa	Sekwencja startera forward (5'-3')	Sekwencja startera reverse (5'-3')
<i>Adipoq_100</i>	TTCCCAGACCCAAGCTGGATTA	CCACCCAGTCAAGGCCAATAGC
<i>Adipoq_300</i>	ATGGCTGAACCACACAGCTTCA	AGGGGTCAGGAGACCTCCCTTT
<i>Adipoq_500</i>	TGCATGCATATTTGCACACCAA	TCAATTCCCAGCACCCACAGTA
<i>Il6_20</i>	AGGTTTCCAATCAGCCCCAC	AGCTACAGACATCCCCAGTCTC
<i>Il6_600</i>	CCACTGGGGAGAATGCAGAG	GGAGTTGCCAGGTGGGTAAAG
<i>Il6_800</i>	CTGCAACAGACCTTCAAGCC	TAGTGCTGATCCCACTGCTG

6.2.16. Komórki śródbłonna

Jako model EC, użyto komórek EA.hy926. Linia ta jest hybrydą fuzyjną ludzkich komórek śródbłonna żyły odpiszczelowej (ang. human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) i linii komórkowej ludzkiego raka płuca A549. Linia ta posiada ekspresję typowych dla śródbłonna markerów, takich jak czynnik von Willebranda czy VE-kadheryny oraz wykazuje zdolność do tworzenia struktur kapilarnych *in vitro* (Ahn i wsp., 1995). Komórki były wysiewane na płytkę sześciodołkową o gęstości 2×10^5 na dołek i hodowane

w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 21% O₂ w atmosferze nasyconej parą wodną z pożywką DMEM, zawierającą FBS o stężeniu 10% i mieszaniną antybiotyków: streptomycyny i penicyliny o stężeniu 100 µg/ml. Pasaż komórek był przeprowadzany, kiedy komórki osiągały ok. 80% konfluencji. Po usunięciu pożywki, komórki były najpierw odklejane od płytki za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA (Biowest, nr kat. L0930). Następnie, trypsyna była neutralizowana poprzez dodanie DMEM z 10% FBS. Komórki odwirowywano przy prędkości 700 x g, w temperaturze pokojowej, przez 5 minut.

6.2.17. Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych

Jako model VSMC wykorzystano linię komórkową A7r5, wyprowadzoną z embrionalnych komórek mięśni gładkich, otrzymanych z łuku aorty szczura. A7r5 wykazują ekspresję markerów typowych dla VSMC: α -aktynę i ciężkie łańcuchy miozyny, co sprawia, że model ten jest odpowiedni do badań nad stopniem zróżnicowania, szlakami sygnałowymi i kurczliwością tych komórek. Komórki były wysiewane na płytkę sześciodołkową o gęstości 2×10^5 na dołek i hodowane w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 21% O₂ w powietrzu nasyconym parą wodną z pożywką DMEM, zawierającą FBS o stężeniu 10% i mieszaniną antybiotyków: streptomycyny i penicyliny o stężeniu 100 µg/ml. Pasaż komórek był przeprowadzany, kiedy komórki osiągały ok. 80% konfluencji. Po usunięciu pożywki, komórki były najpierw odklejane od płytki za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA. Następnie, trypsyna była neutralizowana poprzez dodanie DMEM z 10% FBS. Komórki odwirowywano przy prędkości 700 x g, w temperaturze pokojowej, przez 5 minut.

6.2.18. Traktowanie komórek medium pochodzonym z naczyń adipocytów

W celu zbadania wpływu ACM na EC i VSMC, komórki inkubowane z pożywką bez dodatku FBS przez 24 godziny w pożywce DMEM bez FBS. Następnie, ACM z naczyń pierwotnych adipocytów (izolowanych z PVAT, myszy WT lub SCD1^{-/-}) zmieszano z DMEM (medium do hodowli EC i VSMC) w stosunku 1:1 (v:v), i uzupełniono FBS do stężenia 2%. Tak przygotowane medium posłużyło do inkubacji komórek EC i VSMC przez 24 godziny. Po 24 godzinach, komórki zbierano za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA i przechowywano w -80°C po uprzednim zamrożeniu ich w ciekłym azocie.

6.2.19. Test angiogenezy *in vitro*

W celu zbadania wpływu medium pochodowlanego znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub z wyciszeniem SCD1 na zdolność do tworzenia struktur kapilarnych, zapoczątkowujących proces angiogenezy, wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw do angiogenezy *in vitro* (Sigma, nr kat. ECM625). Zestaw ten zawiera mieszaninę białek macierzy pozakomórkowej, które w temperaturze poniżej 4°C pozostają w formie monomerycznej. W wyniku podniesienia temperatury, białka ulegają nieodwracalnej polimeryzacji. Powstająca macierz pozakomórkowa wchodzi w interakcję z EC, w wyniku której te przybierają charakterystyczny, kapilarny kształt. Po zmieszaniu 900 µl mieszaniny białek ze 100 µl wody destylowanej, po 50 µl mieszaniny przeniesiono do dołków w 96-ciodołkowej płytce. Następnie płytkę inkubowano w 37°C przez 30 minut, aby białka macierzy uległy polimeryzacji. Po inkubacji w pożywce bez dodatku FBS przez 24 godziny, EC przenoszono do dołków zawierających 10 µl mieszaniny DMEM i ACM w stosunku 1:1 (v:v), o końcowym stężeniu FBS 2%. Na każdy dołek wysiewano 10^4 komórek. Tworzenie się struktur kapilarnych obserwowano w mikroskopie Leica AF7000 w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Mikroskop był wyposażony w komorę przyżyciową i wykonywał zdjęcie w każdym z badanych dołków co 30 minut. Długość kapilar w każdym dołku została zmierzona za pomocą oprogramowania ImageJ.

6.2.20. Test migracji VSMC

Zdolność do migracji komórek A7r5 została zmierzona za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu EZCel Cell Migration/Chemotaxis Assay Kit (Biovision, nr kat. K910-12). Po zakończonej inkubacji komórek A7r5 z medium pochodowlanym, komórki odklejono od płytki za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA, po czym zawieszono je w DMEM bez FBS (10^6 komórek/ml). Krzywa standardowa została przygotowana poprzez dodanie do dolnych komór migracyjnych kolejno: 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781 i 390 komórek w 100 µl pożywki. Próbę ślepą stanowiła pożywka bez komórek. Dla grup eksperymentalnych, do dolnych komór migracyjnych dodano 600 µl medium pochodowlanego znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub z wyciszeniem SCD1. Do górnych komór migracyjnych dodano 3×10^5 komórek. Komorę zamknięto i inkubowano przez 4 godziny w 37°C. Po zakończeniu procesu migracji, usunięto górne komory migracyjne, a dolna część została odwirowana przy 500 x g, 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto pożywkę i komórki zawieszono w mieszaninie 550 µl odczynnika lizującego komórki i 50 µl

barwnika komórkowego. Próby inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Następnie 150 µl próby przeniesiono do płytki 96-cio dołkowej i dokonano odczytu fluorescencji przy długościach fali wzbudzenia/emisji odpowiednio: 530/590 nm. Intensywność migracji została obliczona na podstawie intensywności fluorescencji porównanej z krzywą standardową.

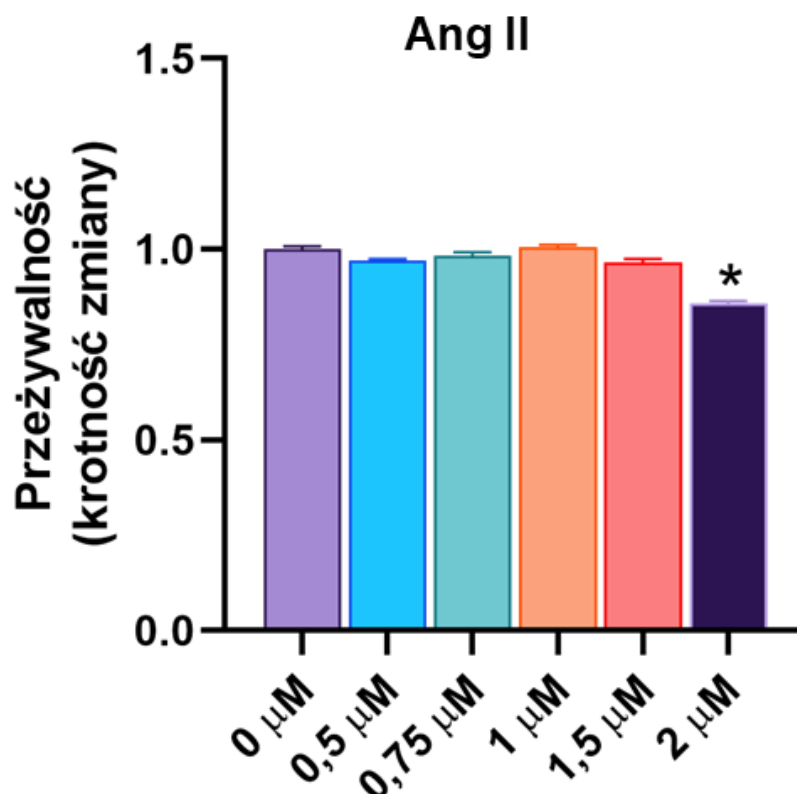
6.2.21. Pomiar tempa proliferacji z użyciem cytometrii przepływowej

W celu określenia tempa proliferacji komórek A7r5 w odpowiedzi na traktowanie medium pochodzonym z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub z wyciszeniem SCD1, dokonano pomiaru ilości DNA w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny. Badanie to opiera się na założeniu, że komórki w fazie G2-M cyklu komórkowego posiadają dwukrotnie większą ilość DNA, niż komórki w fazie G0-G1. Komórki będące w fazie S posiadają ilość DNA większą niż komórki w fazie G0-G1 i mniejszą niż komórki w fazie G2-M. Po zakończeniu traktowania ACM, komórki A7r5 zostały oklejone od płytki za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA i odwirowane z prędkością 500 x g, 5 minut, w temperaturze pokojowej. Następnie komórki utrwalono poprzez zawieszenie ich w 70% etanolu i inkubowano przez 1 godzinę w 4°C. Etanol został usunięty poprzez dwukrotne wirowanie przy prędkości 1000 x g, przez 5 minut w temperaturze pokojowej i przepłukanie PBS. Następnie komórki zawieszono w buforze ekstrakcyjnym, zawierającym 0,2 M Na₂HPO₄ i 8 mM kwasu cytrynowego i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki odwirowano i zawieszono w buforze barwiącym, zawierającym 38 mM cytrynianu sodu, 50 µg/ml jodku propidyny i 50 µg/ml RNazy A/T1 (Thermo Fisher, nr kat. EN0551). Komórki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc je przed światłem. Pomiarów dokonano za pomocą cytometru przepływowego Cytometer BD FACSCalibur w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie.

6.2.22. Analiza wpływu angiotensyny II na przeżywalność VSMC

Komórki A7r5 stanowią dogodny model badań nad biologią VSMC ze względu na wysoki poziom ekspresji markerów fenotypu kurczliwego (Kennedy i wsp., 2014). Komórki A7r5 wykazują zdolność do skurczu w odpowiedzi na zewnętrzne czynniki, takie jak angiotensyna II lub wazopresyna (Vetterkind i wsp., 2012; Geissbuehler i wsp., 2010). W celu zbadania wpływu angiotensyny II na żywotność komórek A7r5, przeprowadzono test przeżywalności z wykorzystaniem odczynnika CellTiter-Blue Cell Viability Assay. Po inkubacji komórek A7r5 z różnymi stężeniami angiotensyny II przez 24 godziny w pożywce

zawierającej 10% FBS, medium zmieniono na DMEM bez dodatku FBS, zawierający odczynnik CellTiter-Blue. Komórki inkubowano przez 1 godzinę w 37°C, po czym zmierzono absorbancję pożywki za pomocą TECAN Infinite M200 Pro przy długości fali 570 nm. Stwierdzono, że AngII jest toksyczna dla komórek A7r5 w stężeniu 2 μ M (Rycina 9). Do wywołania skurczu zastosowano 0,5 μ M AngII.



Rycina 9. Przeżywalność komórek A7r5 w obecności angiotensyny II (Ang II). * $p < 0,05$ vs. 0 μ M. N= 3 niezależne eksperymenty.

6.2.23. Badanie zdolności skurczu VSMC

Komórki hodowano na płytce wyposażonej w biosensory na dnie dołków, w pożywce DMEM z 10% FBS. Do określenia zmian zdolności skurczu VSMC w wyniku traktowania ACM wykorzystano urządzenie Agilent xCELLigence RTCA CardioECR System (Agilent, Santa Clara, CA, Stany Zjednoczone). Instrument ten wyposażony jest w mikroelektrody, mierzące w czasie rzeczywistym stopień oporu elektrycznego wywołanego przez komórki hodowane na przeznaczoną do tego celu płytce. Skurcz komórek, który związany jest ze zmianą ich kształtu, pociąga za sobą redukcję powierzchni kontaktu komórki z elektrodą. Zmniejszenie powierzchni kontaktu komórki i elektrody prowadzi do zmniejszenia oporu elektrycznego, co jest wyrażane za pomocą wielkości tzw. indeksu komórkowego. Im większy następuje spadek wartości indeksu komórkowego, tym intensywniejszy jest skurcz

komórki. Po osiągnięciu konfluencji ~ 80%, komórki inkubowano w DMEM bez dodatku FBS przez 24 godziny w pożywce DMEM bez FBS. Następnie komórki hodowano w DMEM z 2% FBS z dodatkiem ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 przez 24 godziny. W celu wywołania skurczu komórek, pożywkę zmieniano na DMEM z 10% FBS, zawierający 1 μ M AngII i natychmiast rozpoczynano pomiar oporu elektrycznego wywarzanego przez komórki.

6.3. Badanie poziomu białek metodą Western blotting

6.3.1. Homogenizacja tkanek

Próby TPVAT i APVAT zostały zawieszone w buforze do homogenizacji, zawierającym 20 mM Tris-HCl pH=7,4; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 2 mM Na₃VO₄ 1 mM PMSF; 10 mM 2-merkaptoetanolu; 5 μ g/ml pepstatyny; 10 μ g leupetyny i 1,4 μ g aprotyniny. Następnie tkanki poddano homogenizacji za pomocą homogenizatora nożowego IKA T10 basic (Staufen, Niemcy). Próby odwirowano z prędkością 10000 x g, w 4°C, 10 minut. Nadsącz przenoszono do nowych probówek, po czym dokonywano pomiaru stężenia białka, wykorzystując odczynnik Bradford Protein Assay.

6.3.2. Liza komórek

Komórki pochodzące z doświadczeń *in vitro*, po zebraniu z naczynia hodowlanego, odwirowywano z prędkością 1000 x g, 4 °C, 10 minut. Osady komórkowe zawieszano w buforze do homogenizacji, zawierającym 20 mM Tris-HCl pH=7,4; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 2 mM Na₃VO₄ 1 mM PMSF; 10 mM 2-merkaptoetanolu; 5 μ g/ml pepstatyny; 10 μ g leupetyny i 1,4 μ g aprotyniny. Lizy komórek dokonywano w sonikatorze wyposażonym w łaźnię wodą (Diagenode). W sonikatorze ustawiono wysoką częstotliwość fal ultradźwiękowych, po czym wykonano 10 cykli sonikacji. Na każdy cykl składało się 60 sekund emisji ultradźwięków i 60 sekund przerwy. Próby odwirowano z prędkością 10000 x g, w 4 °C, 10 minut. Nadsącz przenoszono do nowych probówek. Następnie dokonywano pomiaru stężenia białka, wykorzystując odczynnik Bradford Protein Assay.

6.3.3. Pomiar stężenia białka

Stężenie białka w próbkach zostało określone przy użyciu odczynnika Bradford Protein Assay (Biorad, nr kat. 5000006). Odczynnik rozcieńczano w wodzie destylowanej w stosunku 1:5 (v:v). Następnie przygotowywano serię rozcieńczeń BSA o stężeniach: 500; 250; 125; 63

i 0 µg/ml. Do 100 µl rozcieńczonego odczynnika Bradford dodawano po 4 µl białka. Białko obecne w próbce zmieniało kolor odczynnika na niebieski. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w 96-cio dołkowej płytce. Intensywność niebieskiej barwy mierzono za pomocą czytnika płytek TECAN Infinite M200 Pro, przy długości fali 595 nm. Ilość białka w badanej próbce obliczano na podstawie krzywej wzorcowej.

6.3.4. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Próby przed elektroforezą poddawano denaturacji poprzez zmieszanie ich z 4-krotnie stężonym buforem denaturującym, zawierającym 8% SDS; 30% glicerolu; 0,25 M Tris; 10% 2-merkaptioetanolu; 0,03% błękitu bromofenolowego w stosunku 4:1 (v:v). Następnie próby inkubowano przez 5 minut w 65°C. W trakcie elektroforezy, próby przechodziły w pierwszej kolejności przez żel zagęszczający, zawierający 5% akryloamidu; 0,625 M Tris-HCl pH= 8,5; 2,15 mM SDS; 0,05% APS; 0,01% TEMED. Następnie białka ulegały rozdziałowi w żelu rozdzielającym, zawierającym 10% akryloamidu oraz 0,625 M Tris-HCl pH= 8,5; 2,15 mM SDS; 0,04% APS; 0,05% TEMED. W przypadku każdej próby, elektroforezie poddawano 20 µg białka. Do elektroforezy wykorzystano układ dwóch buforów: katodowego (1 M Tris-HCl, pH=8,9) i anodowego (0,1 M Tris; 0,1 M trycyny i 0,1% SDS). Elektroforezę prowadzono pod napięciem 90 V przez około 3 godziny. Masę cząsteczkową białek określano względem markera Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher; nr kat. 26619).

6.3.5. Transfer białek na membranę i immunodetekcja

Po rozdziale elektroforetycznym, białka były przenoszone na membranę PVDF (Roth, nr kat. T830.1), metodą transferu mokrego, w buforze zawierającym 25 mM Tris; 1,92 M glicyny i 10% metanolu. Transfer prowadzono w aparacie Criterion Blotter (Biorad, nr kat. 1656024) przy natężeniu prądu 0,25 A, w temperaturze 4°C przez 18 godzin. Po zakończonym transferze, miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał blokowano 3% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze TBST, zawierającym 0,02 M Tris-HCl pH=7,4; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween-20. Membrany blokowano przez 1 godzinę, a po trzykrotnym wypłukaniu, membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 24 godziny w 4°C. Po wypłukaniu nadmiaru przeciwciał z membrany za pomocą buforu TBST, membrany inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową, w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Listę przeciwciał użytych w niniejszej pracy przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Lista przeciwciał wykorzystanych do immunodetekcji.

Nazwa	Masa bialka	Gospo-darz	Rozcieńczenie	Producent (nr kat.)	Zastosowanie
anty-ABHD5	39 kDa	mysz	1:750	Santa Cruz (sc-100468)	WB
anty-ACC	260 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#3662)	WB
anty-ADIPOQ	30 kDa	mysz	1:1000	Abcam (ab22554)	WB
anty-AKT1	62 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#2938)	WB
anty-AMPK	64 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#2532)	WB
anty-ATGL	54 kDa	królik	1:0000	Cell Signaling (#2138)	WB
anty-CALD1	93 kDa	królik	1:1000	Abcam (ab32330)	WB
anty-CASP3	32-17 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-7272)	WB
anty-CD11c	150 kDa	królik	1:100	Thermo Fisher (25-0114-81)	FC
anty-CD16/32	50-65/40 kDa	królik	1:100	Biologend (156605)	FC
anty-CD206	175 kDa	królik	1:100	Thermo Fisher (48-2061-80)	FC
anty-CD45	220 kDa	królik	1:100	Thermo Fisher (69-0459-42)	FC
anty-eNOS	133 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-376751)	WB
anty-ERK1/2	42-44 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#9102)	WB
anty-F4/80	160 kDa	mysz	1:500	Santa Cruz (sc-377009)	WB/FC
anty-FN1	220 kDa	królik	1:1000	Abcam (ab2413)	WB
anty-G0S2	11 kDa	królik	1:500	Santa Cruz (sc-133423)	WB
anty-GAPDH	36 kDa	mysz	1:1000	Merck (#MAB374)	WB
anty-GLUT4	55 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-53566)	WB
anty-H3K24me3	15 kDa	królik	1:1000	Sigma (07-449)	ChIP
anty-HSL	84 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-74489)	WB
anty-IL-1 β	17 kDa	królik	1:1000	Thermo Fisher (P420B)	WB
anty-IL-6	21 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-65327)	WB
anty-MYH11	200 kDa	królik	1:1000	Abcam (ab133567)	WB

anty-NF-κB	50 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-8414)	WB
anty-NLRP3	110 kDa	królik	1:1000	Thermo Fisher (MA5-32255)	WB
anty-OXPHOS	20-55 kDa	mysz	1:1000	Abcam (ab110413)	WB/ICC
anty-pACC (Ser79)	260 kDa	królik	1:1000	Merck (#07-303)	WB
anty-pAKT1(Ser473)	62 kDa	królik	1:750	Cell Signaling (#9275)	WB
anty-pAMPK (Thr172)	64 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#2531)	WB
anty-PCNA	38 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-56)	WB
anty-peNOS (Ser1177)	133 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-81510)	WB
anty-pERK1/2 Thr202/Thr204	42-44 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#9101)	WB
anty-PGC1α	33 kDa	królik	1:1000	Biiotechne (NBP1-04676)	WB
anty-pHSL (Ser565)	84 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#4137)	WB
anty-PLIN1	62 kDa	królik	1:250	Cell Signaling (#9349)	ICC
anty-PPARα	52 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-398394)	WB
anty-pS6K (Thr389)	70 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#9205)	WB
anty-S6K	70 kDa	królik	1:1000	Cell Signaling (#9202)	WB
anty-SELE	107 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-137054)	WB
anty-SPP1	65 kDa	królik	1:1000	Abcam (ab8448)	WB
anty-UCP1	91 kDa	królik	1:1000	Abcam (ab10983)	WB
anty-VEGF	21 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-7269)	WB
anty-VLCAD	70 kDa	mysz	1:1000	Santa Cruz (sc-376239)	WB
anty-β-tubulina	55 kDa	mysz	1:1000	Sigma (T0198)	WB
anty-mysz AlexaFluor 488	-	królik	1:1000	Thermo Fisher (A28175)	ICC
anty-królik AlexaFluor563	-	koza	1:1000	Thermo Fisher (A31576)	ICC

WB, Western Blot; ICC, barwienie immunocytochemiczne; FC, cytomteria przepływowa; ChIP, immunoprecypitacji chromatyny.

Po wypłukaniu nadmiaru przeciwciał za pomocą buforu TBST, dokonano detekcji białek z wykorzystaniem reakcji chemiluminescencyjnej, katalizowanej przez peroksydazę

chrzanową. Substratem dla reakcji był odczynnik Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, nr kat. 34578). Luminescencję rejestrowano na kliszy rentgenowskiej Medical X-ray Blue (Fujifilm, Tokio, Japonia). Otrzymane prążki poddawano analizie densytometrycznej w programie ImageJ.

6.4. Izolacja lipidów z tkanek i komórek

Izolację lipidów przeprowadzono zgodnie z protokołem opracowanym przez Bligh i Dyer (1959). W celu izolacji frakcji lipowej, tkanki umieszczano w 1 ml mieszaniny chloroformu (Poch, nr kat. 234430111) i metanolu (Poch, nr kat. 621990110), zmieszanych w stosunku 2:1 (v:v), zawierającej 0,01% 2,6-di-terto-butylo-4-metylofenol (BHT) (Sigma, nr kat. 34750). W przypadku izolacji lipidów z adipocytów hodowanych *in vitro*, komórki zbierano za pomocą skrobaka, zawieszono w schłodzonym PBS i wirowano przy 1500 x g w 4°C przez 5 minut. Zebrany osad zawieszono ponownie w 1 ml PBS i 900 µl przeznaczano na izolację frakcji lipidowej, a pozostałe 100 µl przeznaczano na pomiar stężenia białka. Komórki przeznaczone do izolacji lipidów wirowano ponownie w 1500 x g, 4°C, 5 minut, po czym zawieszano je w 1 ml mieszaniny chloroform:metanol (2:1/v:v). Tkanki i komórki poddano homogenizacji za pomocą homogenizatora nożowego (IKA T10 basic). Następnie, do homogenatu dodawano 500 µl wody i mieszano. Próby wirowano z prędkością 1700 x g w 4°C przez 10 minut. Dolną frakcję cholorofmowo-metanolową, zawierającą lipidy, przenoszono do nowej probówki i po szczelnym zamknięciu przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz.

6.5. Rozdział lipidów obojętnych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Mieszaninę chloroform:metanol (2:1/v:v), zawierającą lipidy odparowano pod strumieniem azotu. Powstały osad rozpuszczano ponownie w mieszaninie chloroform:metanol w stosunku 2:1 (v:v), przy czym objętość dodanego rozpuszczalnika zależna była od masy tkanki (lub stężenia białka w przypadku frakcji lipidowych wyizolowanych z komórek hodowanych *in vitro*). Na każdą ścieżkę nakładano 100 µl roztworu lipidów zawieszonych w mieszaninie chloroform:metanol. W 100 µl mieszaniny chloroform:metanol znajdowała się ilość lipidów odpowiadająca 250 µg białka w przypadku komórek i 0,3 mg (do wizualizacji frakcji TAG) lub 0,6 mg (do wizualizacji frakcji DAG i FFA) w przypadku tkanek. Rozdziału

chromatograficznego dokonano na szklanych płytkach o wymiarach 20 cm x 20 cm, pokrytych warstwą krzemionki o grubości 0,25 mm (Merck Milipore, nr kat. 60G F254) w układzie rozwijającym, składającym się z heptanu (Poch, nr kat. 470470156), eteru diizopropylowego (Merck Milipore, nr kat. 38270) i kwasu octowego (Poch, nr kat. 568760114), zmieszanych w stosunku 60:40:3 (v:v:v). Po rozdziale chromatograficznym, płytkę zanurzano w 10% roztworze CuSO_4 (Poch, nr kat. 658310116) w 8% H_3PO_4 (Poch, nr kat. 569150111). Następnie płytkę wypalano w piecu o temperaturze 140°C przez 20 minut, w celu uwidocznienia frakcji lipidowych. Względna zawartość poszczególnych frakcji lipidowych określono na podstawie analizy densytometrycznej, wykonanej z użyciem oprogramowania ImageJ.

6.6. Analiza ilościowa kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS)

Po rozdzieleniu lipidów za pomocą TLC, prążki odpowiadające frakcjom TAG, DAG, FFA i PL zdrapano i zebrano. Do probówek z zebranymi frakcjami lipidowymi dodano 100 μl kwasu pentadekanowego ($\text{C}_{15:0}$) o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, jako standard wewnętrzny. Lipidy ekstrahowano z krzemionki za pomocą mieszaniny chloroform:metanol (9:1 v:v) i zawiesinę przeniesiono do nowych probówek. Po odparowaniu mieszaniny chloroform:metanol, osady rozpuszczano w 500 μl 14% roztworu BF_3 w metanolu i ogrzewano w 100°C przez 30 minut (w przypadku frakcji TAG i PL) lub przez 10 minut (w przypadku frakcji FFA i DAG). Po wystudzeniu, do zawiesin powstałych estrów kwasów tłuszczowych dodawano 1 ml heksanu i mieszano. Następnie dodawano 500 μl wody i po zmieszaniu mieszaninę odwirowano przy prędkości 1700 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Górną warstwę zbierano do nowej probówki, odparowano w strumieniu azotu i osad rozpuszczano w 100 μl heksanu.

Kwasy tłuszczowe w próbach identyfikowano za pomocą chromatografu gazowego Agilent 7890A, sprzężonego ze spektrometrem mas Agilent 5975C VL MSD. Rozdziału dokonano przy użyciu kolumny kapilarnej Agilent, HP-5 MS o długości 30 m. Detekcja jonów kwasów tłuszczowych prowadzona była przez detektor o stałej temperaturze 260°C i zmieniającej się temperaturze kolumny: początkowo temperatura kolumny wynosiła 50°C, następnie była ona ogrzewana do 200°C w tempie 10°C/minutę. Temperatura 200°C utrzymywana była przez 10 minut. Następnie kolumnę ogrzewano do 220°C w tempie 10°C/minutę przyrostu temperatury i utrzymywano ją przez 30 minut. Do identyfikacji kwasów tłuszczowych posłużono się wartościami czasu retencji w kolumnie oraz widm jonów

charakterystycznych dla każdego kwasu tłuszczowego, korzystając z biblioteki NIST (National Institute of Standards and Technology). Wartości dla każdego z widm zostały obliczone za pomocą oprogramowania MSD ChemStation Data Analysis. Oznaczenia i pełne nazwy zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych zostały przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4. Kwasy tłuszczowe zidentyfikowane za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Kwas tłuszczowy	Nazwa zwyczajowa
C14:0	kwas tetradekanowy
C16:1	kwas palmitooleinowy
C16:0	kwas palmitynowy
C18:2n6	kwas linolowy
C18:1n9	kwas oleinowy
C18:1n7	kwas wakcenowy
C18:0	kwas stearynowy
C20:4	kwas arachidonowy
C20:5n3	kwas eikozapentaenowy
C20:3n6	kwas linolenowy
C20:2	kwas eikozadineonowy
C20:1	kwas eikozenowy
C20:0	kwas arachidowy
C22:6n3	kwas dokozaheksaenowy
C22:1n9	kwas erukowy
C22:0	kwas dokozanowy
C24:0	kwas tetrakozanowy

6.7. Analiza poziomu mRNA

6.7.1. Izolacja RNA i synteza cDNA

RNA z komórek wyizolowano za pomocą zestawu RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, nr kat. 74804) zgodnie z protokołem producenta. Komórki zawieszono w 1 ml odczynnika QIAzol Lysis Reagent i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 200 μ l chloroformu i mieszano. Próby odwirowywano z prędkością 12000 x g w 4°C przez 15 minut. Górną warstwę przenoszono do nowej probówki i dodawano 70% etanol w objętości odpowiadającej objętości próby. Mieszaninę nanoszono na kolumnę ze złożem krzemionkowym. RNA wypłukiwano ze złoża za pomocą nisko jonowego buforu elucyjnego. Stężenie oraz czystość RNA określano za pomocą spektrofotometru Implen Nanophotometer (Monachium, Niemcy).

W trakcie izolacji RNA, do próby dostaje się również DNA mogący zaburzyć odczyty w reakcji PCR. W celu usunięcia DNA, 1 μ g próby RNA inkubowano z 1U DNazy w odpowiednim buforze (A&A Biotechnology, nr kat. 1009-10) i wodzie zawierającej 0,1% pirowęglaanu dietylu (DEPC). Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 10 μ l. Próby inkubowano w 37°C przez 30 minut. Następnie, w celu inaktywacji DNazy, próby były podgrzewane do 75°C i inkubowane przez 10 minut.

Syntezę cDNA przeprowadzono za pomocą zestawu Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, nr kat. K1631), zgodnie z protokołem producenta. Mieszanina reakcyjna zawierała 1 μ g RNA; 0,5 μ g/ μ l oligo(dT); 10 mM dNTP; 20 U/ μ l inhibitora nukleaz; 200 U/ μ l odwrotnej transkryptazy i 4 μ l buforu do odwrotnej transkrypcji. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w 42°C przez 1 godzinę. W celu inaktywacji enzymów, próby były podgrzewane do 75°C i inkubowane przez 10 minut.

6.7.2. RT-qPCR

Analizy poziomu mRNA przeprowadzono za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym na matrycy cDNA. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 μ l odczynnika SsoAdv Univer SYBR Green MIX (Biorad, nr kat. 1725272), 0,5 μ l każdego ze starterów oraz 25 μ g matrycy DNA. Mieszaninę reakcyjną uzupełniano 4 μ l wody destylowanej, do końcowej objętości 10 μ l. Reakcję prowadzono w termocyklerze Biorad CFX Connect Real-Time PCR Detection System. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: 95°C, 5 minut, 40 cykli 60°C, 30 sekund, następnie 72°C, 30 sekund. Po każdym cyklu następował odczyt

intensywności fluorescencji. Po zakończonej reakcji odczytano wartości C_t , stanowiące numer cyklu, w którym wartość fluorescencji przekroczyła wartość graniczną w fazie wzrostu wykładniczego. Jako kontrolę wewnętrzną ilości cDNA wykorzystano pary starterów powielające fragment mRNA genu kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*). W tabeli 5. przedstawiono listę starterów wykorzystanych do PCR. Krotność zmiany została obliczona metodą $\Delta\Delta C_q$:

Najpierw obliczano ΔC_q dla próby eksperymentalnej:

$$\Delta C_q S = C_{qTS} - C_{qRS}$$

Gdzie:

$\Delta C_q S$ - wartość C_q dla próby eksperymentalnej

C_{qTS} - wartość C_q dla badanego genu w próbce eksperymentalnej

C_{qRS} - wartość C_q dla genu referencyjnego (*Gapdh*) w próbce eksperymentalnej

Następnie obliczano wartość C_q dla próby kontrolnej:

$$\Delta C_q C = C_{qTC} - C_{qRC}$$

Gdzie:

$\Delta C_q S$ - wartość C_q dla próby kontrolnej

C_{qTS} - wartość C_q dla badanego genu w próbce kontrolnej

C_{qRS} - wartość C_q dla genu referencyjnego (*Gapdh*) w próbce kontrolnej

Następnie obliczano wartość $\Delta\Delta C_q$:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q S - \Delta C_q C$$

Krotność zmiany wyrażano jako:

$$\text{Krotność zmiany} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Tabela 5. Lista starterów wykorzystanych do reakcji RT-qPCR.

Nazwa	Sekwencja startera forward (5'-3')	Sekwencja startera reverse (5'-3')
<i>Adipoq</i>	GTTCCCAATGTACCCATTTCGC	TGTTGCAGTAGAACTTGCCAG
<i>Adipor1</i>	TCTTCGGGATGTTCTTCCTGG	TTTGGA AAAAGTCCGAGAGAC
<i>Adipor2</i>	GGAGTGTTCTGTTGGCTTAGG	GCAGCTCCGGTGATATAGAGG
<i>Cidea</i>	GGTGGACACAGAGGAGTTCTTTC	CGAAGGTGACTCTGGCTATTCC
<i>Drp1</i>	TTACGGTTCCCTAAACTTCACG	GTCACGGGCAACCTTTTACGA
<i>Fabp4</i>	TGAAATCACCGCAGACGACAGG	GCTTGTACCATCTCGTTTTCTC
<i>Fis1</i>	TGTCCAAGAGCACGCAATTTG	CCTCGCACATACTTTAGAGCCT
<i>Gapdh</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CACATTGGGGGTAGGGAACAC
<i>GAPDH</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	AGTAGAGGCAGGGATGATGTT
<i>ICAM1</i>	AGCGGCTGACGTGTGCAGTAAT	TCTGAGACCTCTGGCTTCGTCA
<i>Lep</i>	GCAGTGCCTATCCAGAAAGTCC	GGAATGAAGTCCAAGCCAGTG
<i>Lpl</i>	GCGTAGCAGGAAGTCTGACCAA	AGCGTCATCAGGAGAAAGGCG
<i>Mfn1</i>	CCAGGTACAGATGTCACCACAG	TTGGAGAGCCGCTCATTACCT
<i>Mfn2</i>	GTGGAATACGCCAGTGAGAAGC	CAACTTGCTGGCACAGATGAGC
<i>Nampt</i>	GCAGAAGCCGAGTTCAACATC	TTTTCACGGCATCAAAGTAGGA
<i>Opa1</i>	TGGAAAATGGTTTCGAGAGTCAG	CATTCCGTCTCTAGGTTAAAGC
<i>Pgc1a</i>	AAGATCAAGGTCCCCAGGCA	TGTGTGCGGTGTCTGTAGTGG
<i>Pparg</i>	GGCTTTTGAGGAACTCCCTGG	GGCTTTTGAGGAACTCCCTGG
<i>Retn</i>	GTCCAGCAATTTAAGCCAATGTT	AAGAACCCTTTCATTTCCCTCC
<i>Ucp1</i>	GCTTTGCCTCACTCAGGATTGG	CCAATGAACACTGCCACACCTC
<i>VCAM1</i>	GATTCTGTGCCCACAGTAAGGC	TGGTCACAGAGCCACCTTCTTG

6.8. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna uzyskanych wyników została wykonana za pomocą programu GraphPad Prism 8. Dla porównań wielokrotnych zastosowano dwuczynnikową analizę

wariancji (two-way ANOVA) oraz test post-hoc Tukey'a. Dla porównań między dwiema grupami zastosowano test T-Studenta. Wyniki na wykresach przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe.

6.9. Lista odczynników

Pozostałe odczynniki, których nie uwzględniono w opisie metod, wykorzystane w niniejszej pracy zostały przedstawione w tabeli 6.

Tabela 6. Lista odczynników

Nazwa	Producent	Nr kat.
(2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoksyglukoza (2-NBDG)	Abcam	235976
2,6-ditert-butylo-4-metylofenol (BHT)	Fluka	34750
2-merkaptotoetaol	Acros	125472500
2-propanol	POCH	751500111
3-izobutylo-1-metyloksantyna (IBMX)	Sigma	I5879
4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI)	ThermoFisher	62247
Akryloamid	Bioshop	ACR004
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	Bioshop	ALB001
Aldehyd glutarowy	Merck	G5882
Alkohol etylowy (EtOH)	POCH	396420113
Aprotynina	ROTH	A162.2
Błękit bromofenolowy	POCH	184070219
Bufor fosforanowy (PBS)	Sigma	D8537
Chlorek litu	Sigma	L9650
Chlorek magnezu	POCH	612050110
Chlorek sodu	Sigma	S7653
Chloroform	POCH	234430111

Cytrynian sodu	Merck	567446
Czerwień oleista	Sigma	O0625
Deksametazon	Sigma	D4902
Deoksycholan sodu	Sigma	264103
Dihydroetydyna (DHE)	Abcam	ab236206
Dimetylosulfotlenek	Sigma	D8418
Dodecylosiarczan sodu	POCH	796630119
Eozyna	Sigma	HT110116
Eter diizopropylowy	Sigma	38270
Falloidyna	ThermoFisher	A12379
Fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF)	Sigma	P7626
Glicerol	POCH	443320113
Glicyna	Acros	158920010
Glukoza	Sigma	G8270
Heksan	POCH	466310111
Hematoksylina	Sigma	GHS116
Heptan	POCH	470470156
Insulina	Sigma	11070-73-8
Jodek propidyny	Merck	537059
Kolagenaza typu I	Gibco	17100-017
Ksilen	Chempur	115208603
Kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosiarkowy (HEPES)	Sigma	H3784
kwas etylenoglikol-bis-(2-aminoetylo)tetra-octowy (EGTA)	Acros	409911000
Kwas octowy	POCH	568760114
Kwas ortofosforowy	POCH	569150111

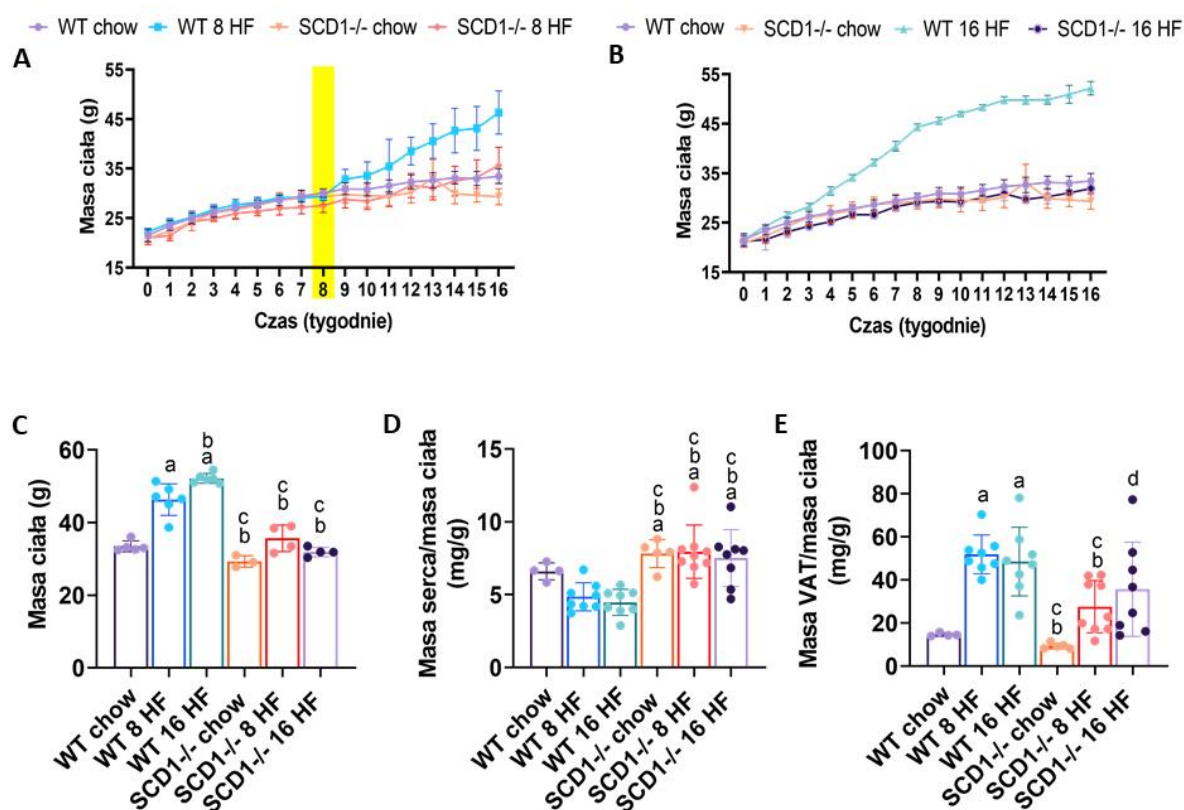
Kwas pentadekaenowy	Merck	W433400
Kwas wersenowy (EDTA)	POCH	593280117
Leupeptyna	ROTH	CN33.1
Metanol (MeOH)	POCH	621990110
Monolaurynian polioksyetylenosorbitolu (Tween-20)	Sigma	P2287
N',N',N',N',-tetrametylenodiamina (TEMED)	Sigma	P2287
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma	T9281
Nadtlenek wodoru	Sigma	H1009
Odczynnik Bradford	Biorad	50000006
Oktylofenoksy-poli(etylenoksy) etanol (IGEPAL CA630)	Sigma	I8896
Oleinian sodu	Sigma	O7501
Ortowandan sodu	Sigma	S6508
Palmitooleinian sodu	Cayman	21911
Palmitynian sodu	Sigma	P9767
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	P6148
Pepstatyna A	Bioshop	PRP605
Pirowęglan dietylu (DEPC)	Bioshop	DEP001
Plodowa surowica bydlęca (FBS)	Sigma	10500
Rnaza A/T1	Thermo Fisher	EN0551
Roziglitazon	Sigma	R2408
Siarczan miedzi	POCH	658310116
Streptomycyna/Penicylina	Gibco	15140122
Tetrametylorodoamina (TMRM)	ThermoFisher	T668
Tlenek osmu	Merck	75632
Tris-hydroksymetyloaminometan	Sigma	T1503
Triton X-100	Sigma	T8787

Trycyna	Sigma	T0377
Trypsyna-EDTA	Sigma	T3924
Wodorofosforan disodu	Merck	71643
Wodorotlenek sodu	POCH	81098118
Wodorowęglan sodu	Sigma	401676

7. WYNIKI

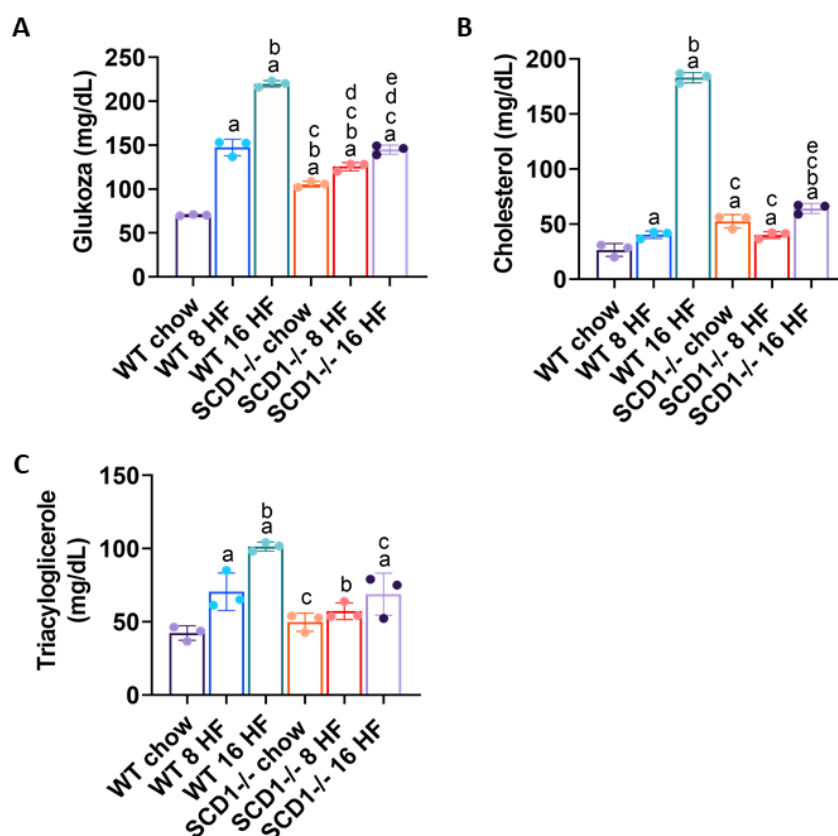
7.1. Fenotyp myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą wysokotłuszczową (HF)

W celu wywołania stanu wczesnej otyłości u myszy WT i SCD1^{-/-}, były one karmione dietą wysokotłuszczową przez okres 8 tygodni (grupy 8 HF). Natomiast w celu wywołania zaawansowanej otyłości, myszy były karmione dietą HF przez okres 16 tygodni (grupy 16 HF). Średnia wyjściowa masa ciała myszy WT była podobna do masy ciała myszy SCD1^{-/-} (Rycina 10A, B). U myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni zaobserwowano wzrost masy ciała w porównaniu z myszami WT karmionymi dietą chow (Rycina 10A, B, C). U myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF nie stwierdzono istotnych zmian w masie ciała w stosunku do myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow, bez względu na długość trwania diety (Rycina 10A, B, C). Masa ciała myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow była podobna w czasie trwania eksperymentu (Rycina 10A, B, C).



Rycina 10. Fenotyp myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Zmiany masy ciała myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 8 tygodni. (B) Zmiany masy ciała myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni. (C) Masa ciała myszy WT i SCD1^{-/-} na koniec eksperymentu. (D) Stosunek masy serca do masy ciała. (E) Stosunek masy trzewnej tkanki tłuszczowej do masy ciała. VAT - trzewna tkanka tłuszczowa. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow, **e** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} 8 HF. N=4-8 myszy/grupę.

Masa serca w stosunku do masy ciała była podobna zarówno na diecie chow, jak i na diecie HF, w przypadku myszy WT (Rycina 10D). U myszy SCD1^{-/-} dieta HF również nie wpłynęła na stosunek masy serca do masy ciała (Rycina 10D). Niemniej jednak, stosunek masy serca do masy ciała u myszy SCD1^{-/-} był wyższy niż u myszy kontrolnych WT (Rycina 10D). Stłuszczenie ciała myszy WT, wyrażone jako stosunek trzewnej tkanki tłuszczowej (ang. visceral adipose tissue, VAT) do całkowitej masy ciała było zwiększone u myszy WT po 8 i 16 tygodniach diety HF w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 10E). Po 8 tygodniach diety HF stłuszczenie ciała u myszy SCD1^{-/-} HF było niższe niż u myszy WT (Rycina 10E). Stłuszczenie ciała po 16 tygodniach diety HF było podobne zarówno u myszy WT, jak i SCD1^{-/-} (Rycina 10E).



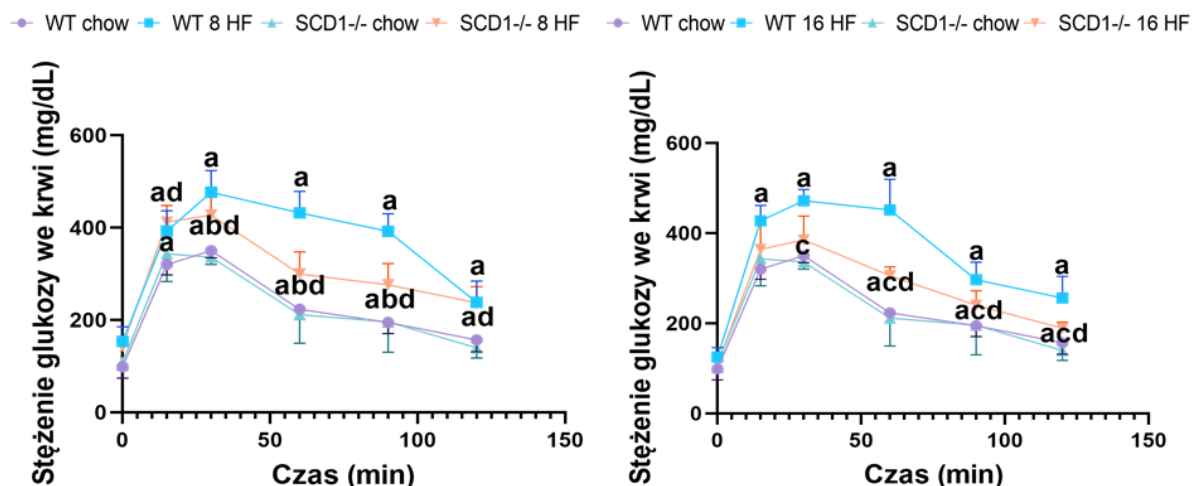
Rycina 11. Parametry biochemiczne osocza myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Stężenie glukozy, (B) stężenie cholesterolu całkowitego, (C) stężenie triacylogliceroli we krwi myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow, **e** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

Stężenie glukozy we krwi myszy WT karmionych dietą HF wzrastało wraz z długością diety w stosunku do myszy WT chow (Rycina 11A). Na diecie chow stężenie glukozy we krwi myszy SCD1^{-/-} było wyższe niż u myszy WT (Rycina 11A). W wyniku karmienia myszy SCD1^{-/-} dietą HF przez 8 lub 16 tygodni, stężenie glukozy we krwi także wzrosło względem myszy WT na diecie chow, jednak wzrost ten był niższy niż u myszy WT na diecie

HF (Rycina 11A). Stężenie cholesterolu we krwi myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni było wyższe niż u myszy WT na diecie chow (Rycina 11B). U myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow, stężenie cholesterolu było wyższe niż u myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 11B). U myszy SCD1^{-/-} na diecie HF stwierdzono wzrost stężenia cholesterolu jedynie po 16 tygodniach HF w stosunku do myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 11B). Stężenie cholesterolu u myszy SCD1^{-/-} po 16 tygodniach diety HF było niższe niż w przypadku myszy WT karmionych dietą HF przez 16 tygodni (Rycina 11B). Stężenie TAG we krwi myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni było wyższe od stężenia TAG u myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 11C). U myszy SCD1^{-/-} nie zaobserwowano wzrostu stężenia TAG w wyniku karmienia dietą HF (Rycina 11C). Ponadto, stężenie TAG u myszy SCD1^{-/-} na diecie HF było niższe niż u myszy WT karmionych dietą HF, zarówno po 8, jak i 16 tygodniach (Rycina 11C).

7.2. Test obciążenia glukozą

Otyłość jest powiązana ze zjawiskiem nietolerancji glukozy, które charakteryzuje się wysokim poziomem glikemii na czczo oraz utrudnionym wychwytem glukozy przez tkanki obwodowe (Rohm i wsp., 2022). W celu określenia wpływu wyciszenia SCD1 na metabolizm glukozy w trakcie diety HF trwającej 8 i 16 tygodni, wykonano dootrzewnowy test obciążenia glukozą. Zarówno myszy WT, jak i SCD1^{-/-} karmione dietą chow wykazywały prawidłową tolerancję glukozy ze spadkiem jej poziomu do wartości zbliżonych do wyjściowych po 120 minutach od podania (Rycina 12A, B). U myszy SCD1^{-/-} po 8 tygodniach diety HF stwierdzono wolniejszy spadek poziomu glukozy niż u myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow (Rycina 12A). Spadek ten był jednak wyraźnie szybszy niż w przypadku myszy WT karmionych dietą HF przez 8 tygodni (Rycina 12A). Podobny efekt stwierdzono w przypadku myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni (Rycina 12B). Myszy SCD1^{-/-} wykazywały szybszy spadek stężenia glukozy we krwi niż myszy WT (Rycina 12B). Ponadto, podczas gdy stężenie glukozy we krwi myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni po 120 minutach był podobny do stężenia glukozy u myszy karmionych dietą chow, to u myszy WT utrzymywał się on na wysokim poziomie (Rycina 12B). Wyniki te wskazują, że myszy SCD1^{-/-} mają poprawioną tolerancję glukozy w warunkach karmienia dietą HF w porównaniu z myszami WT.



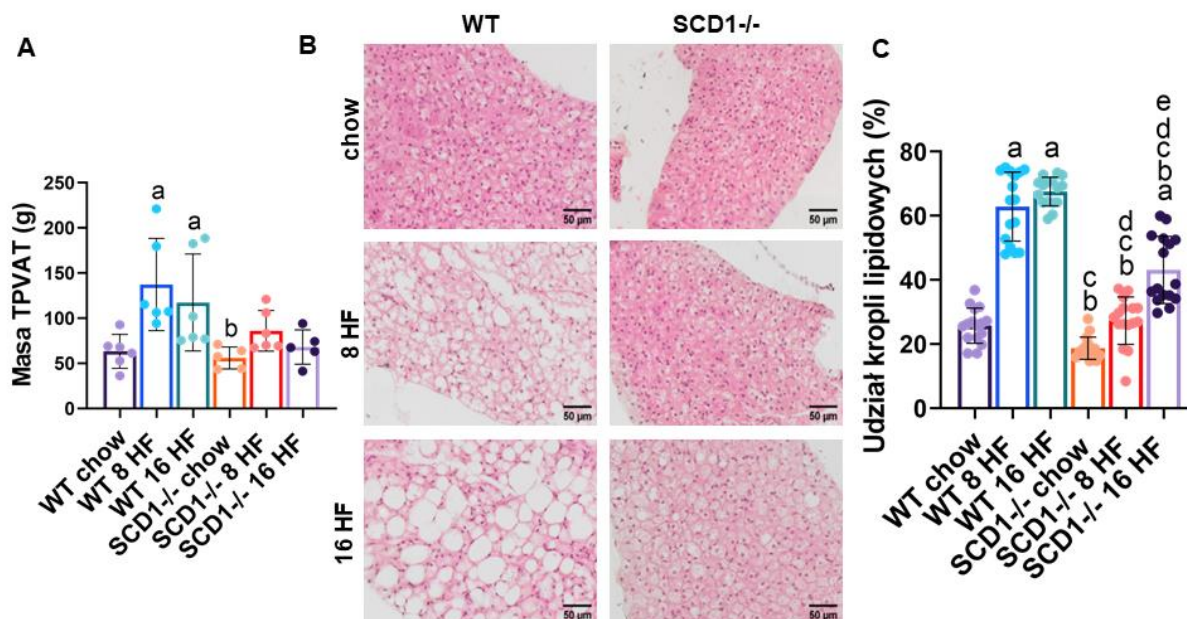
Rycina 12. Test obciążenia glukozą myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez (A) 8 tygodni lub (B) 16 tygodni. a $p < 0,05$ vs. WT chow, b $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, c $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, d $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow. N=6 myszy/grupę.

7.3. Zmiany morfologiczne w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}

W przypadku myszy WT, zaobserwowano wzrost masy TPVAT po 8 i 16 tygodniach karmienia dietą HF w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 13A). Nie stwierdzono natomiast wzrostu masy TPVAT u myszy SCD1^{-/-} w wyniku karmienia dietą HF w stosunku do TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 13A).

BAT charakteryzuje się małymi, drobnymi kroplami lipidowymi w obrębie pojedynczego adipocytu oraz dużą ilością cytoplazmy (Marlatt i Ravussin, 2017). Biała tkanka tłuszczowa WAT składa się natomiast z adipocytów posiadających jedną wielką kroplę lipidową, spychającą jądro komórkowe i pozostałe organelle na wąski obszar cytoplazmy (Reyes-Farias i wsp., 2021). Przeprowadzone badania wykazały, że TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow posiadał typową dla BAT morfologię (Rycina 13B).

TPVAT



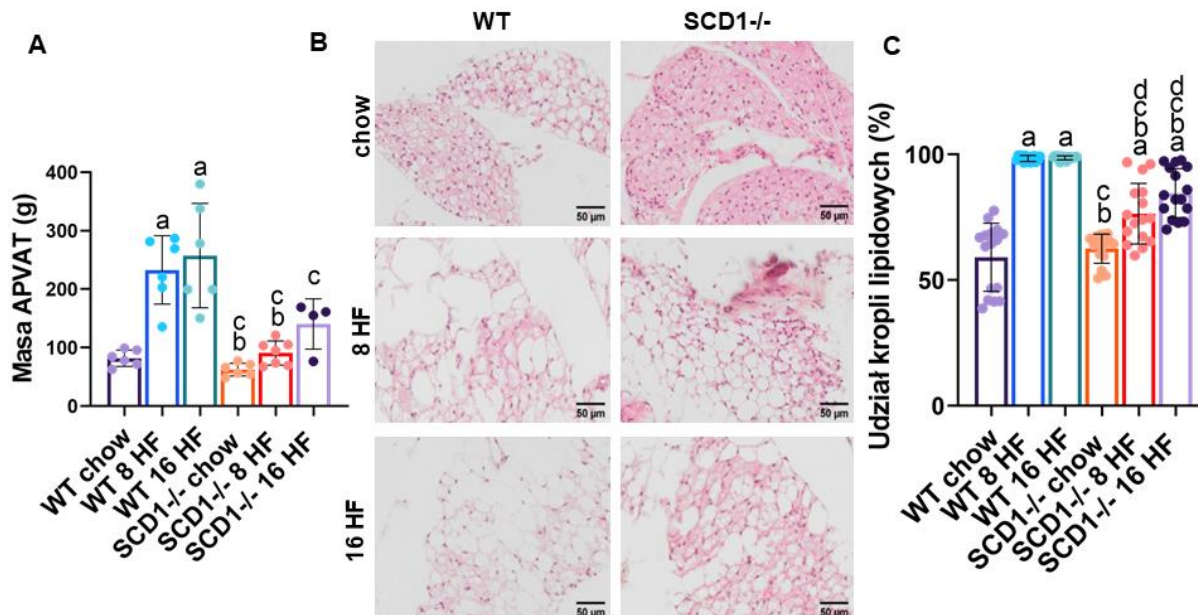
Rycina 13. Morfologia TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. (A) Masa TPVAT. (B) Preparaty histologiczne TPVAT wybarwione hematoksyliną i eozyną (powiększenie 200 x). (C) Poziom hipertrofii adipocytów w TPVAT. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1-/- chow. N=4 myszy/grupę.

Analiza udziału powierzchni zajmowanej przez krople lipidowe w stosunku do całkowitej powierzchni tkanki jest ilościowym wskaźnikiem poziomu hipertrofii adipocytów. Poziom hipertrofii WT TPVAT był wyższy w wyniku karmienia HF przez 8 i 16 tygodni niż w WT TPVAT na diecie chow (Rycina 13C). Wzrost ten nie był zależny od czasu trwania diety HF (Rycina 13C). W TPVAT myszy SCD1-/- karmienie dietą HF również prowadziło do zwiększenia poziomu hipertrofii adipocytów w porównaniu z TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 13C). Wzrost hipertrofii TPVAT u myszy SCD1-/- na diecie HF był jednak mniej wyraźny niż w przypadku TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 13C).

W przypadku APVAT, u myszy WT stwierdzono znaczny przyrost masy tej tkanki w wyniku karmienia myszy dietą HF przez 8 i 16 tygodni w porównaniu z APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 14A). Karmienie myszy SCD1-/- dietą HF przez 8 i 16 tygodni nie prowadziło do wzrostu masy APVAT w porównaniu z APVAT myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 14A). Pod względem morfologicznym, APVAT myszy WT i SCD1-/- wykazywał zarówno cechy charakterystyczne dla BAT, jak i WAT (Rycina 14B). Dieta HF spowodowała znaczny rozrost adipocytów w APVAT myszy WT i SCD1-/- (Rycina 14B). Analiza poziomu hipertrofii adipocytów wykazała, że akumulacja lipidów w APVAT myszy WT jest istotnie zwiększona po 8 i 16 tygodniach HF w porównaniu z APVAT myszy WT na

diecie chow. Wzrost ten był również obecny w APVAT u myszy SCD1^{-/-} na diecie HF, jednak był on mniej wyraźny niż w przypadku WT APVAT na diecie HF (Rycina 14C).

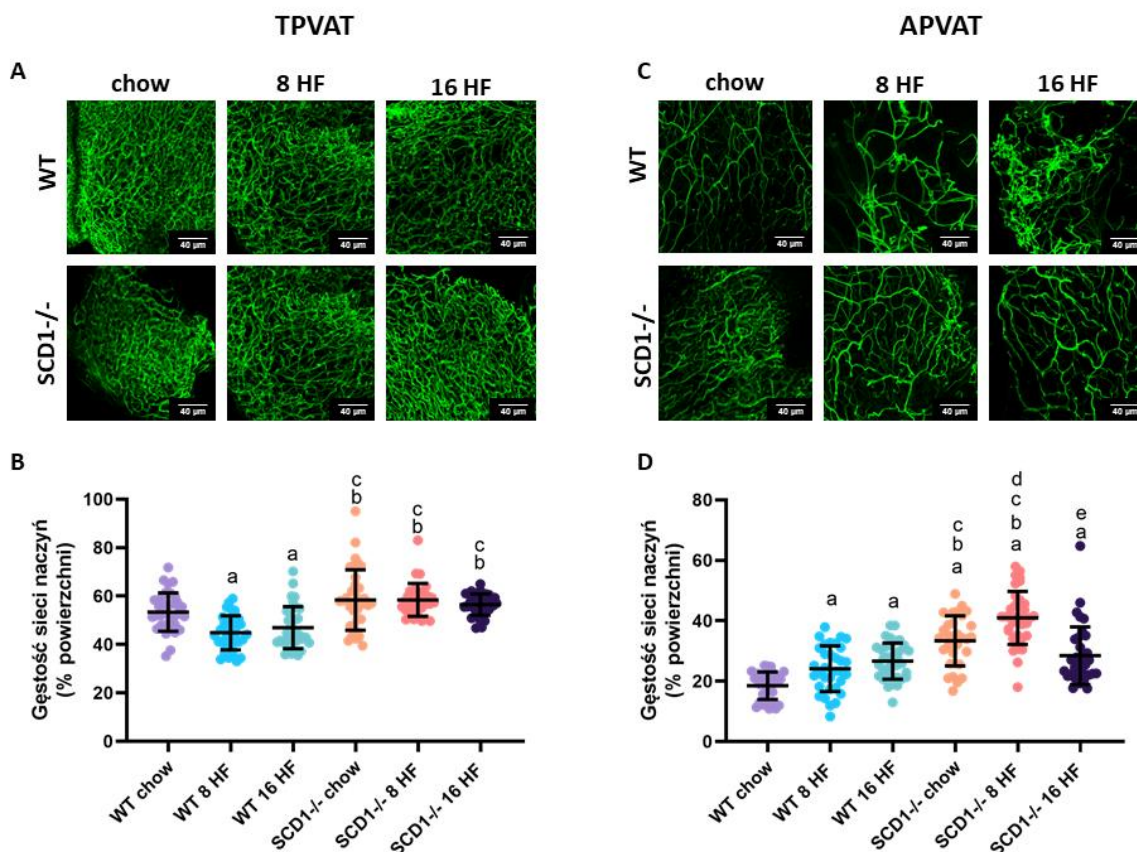
APVAT



Rycina 14. Morfologia APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Masa APVAT. (B) Preparaty histologiczne APVAT wybarwione hematoksyliną i eozyną (powiększenie 200 x). (C) Poziom hipertrofii adipocytów w APVAT. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow. N=4 myszy/grupę.

7.4. Zmiany w gęstości sieci naczyń krwionośnych w TPVAT i APVAT

Odpowiedni stopień unaczynienia okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej jest kluczowy ze względu na jej wysoką aktywność metaboliczną. W TPVAT myszy WT stwierdzono zmniejszenie gęstości sieci naczyń w wyniku karmienia dietą HF przez 8 i 16 tygodni w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow. Efekt ten nie był zależny od długości trwania diety HF (Rycina 15A, B). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni gęstość sieci naczyń była wyższa niż w TPVAT myszy WT karmionych dietą HF (Rycina 15A, B). Karmienie dietą HF myszy SCD1^{-/-} nie spowodowało natomiast zmian w gęstości naczyń w TPVAT w porównaniu z TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 15A, B).



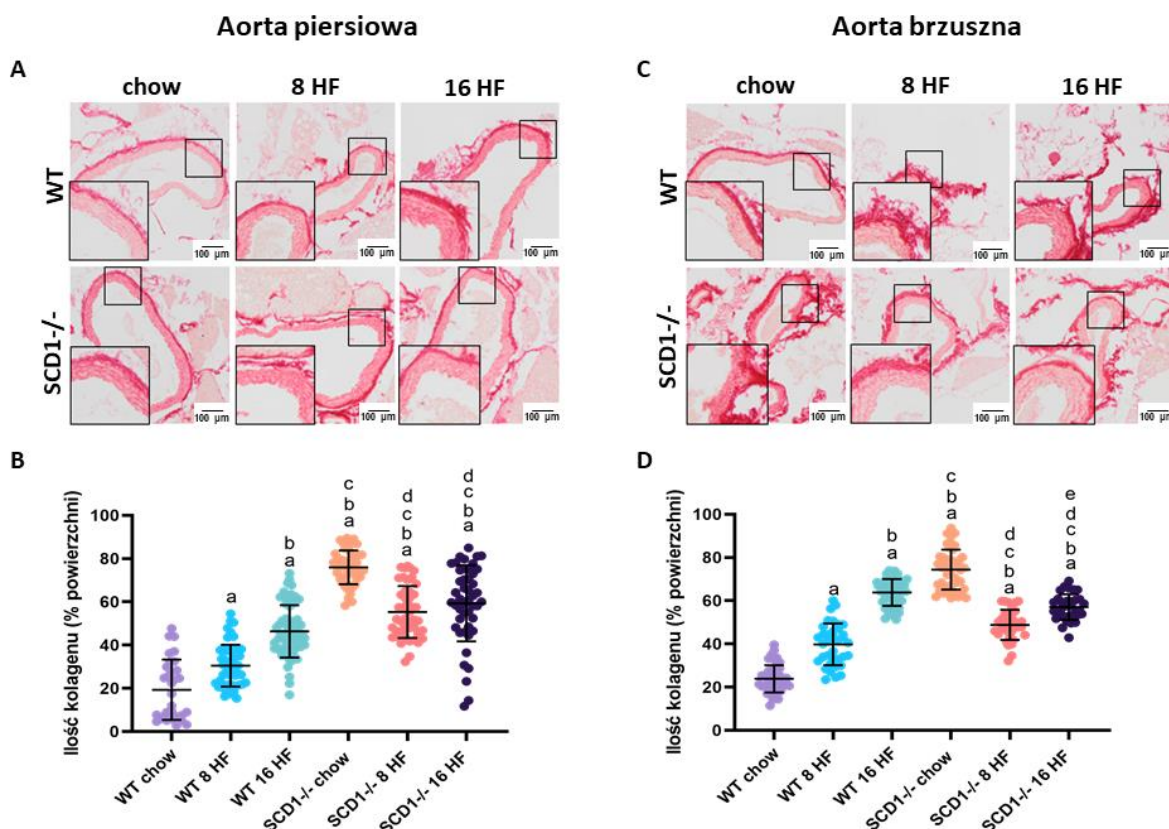
Rycina 15. Gęstość sieci naczyń krwionośnych w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Reprezentacyjne zdjęcia sieci naczyń w TPVAT (powiększenie 200 x). (B) Gęstość sieci naczyń przedstawiona jako procent powierzchni zajmowanej przez naczynia w TPVAT. (C) Reprezentacyjne zdjęcia sieci naczyń w APVAT (powiększenie 200 x). (D) Gęstość sieci naczyń przedstawiona jako procent powierzchni zajmowanej przez naczynia w APVAT. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow, **e** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

W APVAT myszy WT dieta HF spowodowała zwiększenie gęstości sieci naczyń w porównaniu z APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 15C, D). Wzrost unaczynienia w APVAT myszy SCD1^{-/-} w stosunku do myszy WT został zaobserwowany po 8 tygodniach diety HF oraz na diecie chow (Rycina 15C, D).

Przedstawione wyniki wskazują, że dieta HF wywiera odmienny efekt na gęstość unaczynienia w PVAT: w TPVAT dochodzi do spadku gęstości naczyń, natomiast w APVAT dochodzi do jej wzrostu. Dodatkowo, brak genu SCD1 zwiększa gęstość naczyń w PVAT w warunkach diety HF w porównaniu z PVAT myszy WT na diecie HF.

7.5. Zawartość kolagenu w ścianie aorty myszy

Dieta HF prowadzi do zwiększonej produkcji białek macierzy pozakomórkowej przez komórki mięśni gładkich ściany tętnicy, w tym kolagenu. Prowadzi to do utraty elastyczności ściany naczynia (Santana i wsp., 2014).



Rycina 16. Zawartość kolagenu w ścianie aorty myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Preparaty histologiczne odcinka piersiowego aorty myszy wybarwione za pomocą czerwieni Syriusza (powiększenie 200 x). (B) Zmiany poziomu kolagenu w ścianie aorty piersiowej. (C) Preparaty histologiczne odcinka brzusznej aorty wybarwione za pomocą czerwieni Syriusza (powiększenie 200 x). (D) Zmiany poziomu kolagenu w ścianie aorty brzusznej. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} chow, **e** $p < 0,05$ vs. SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

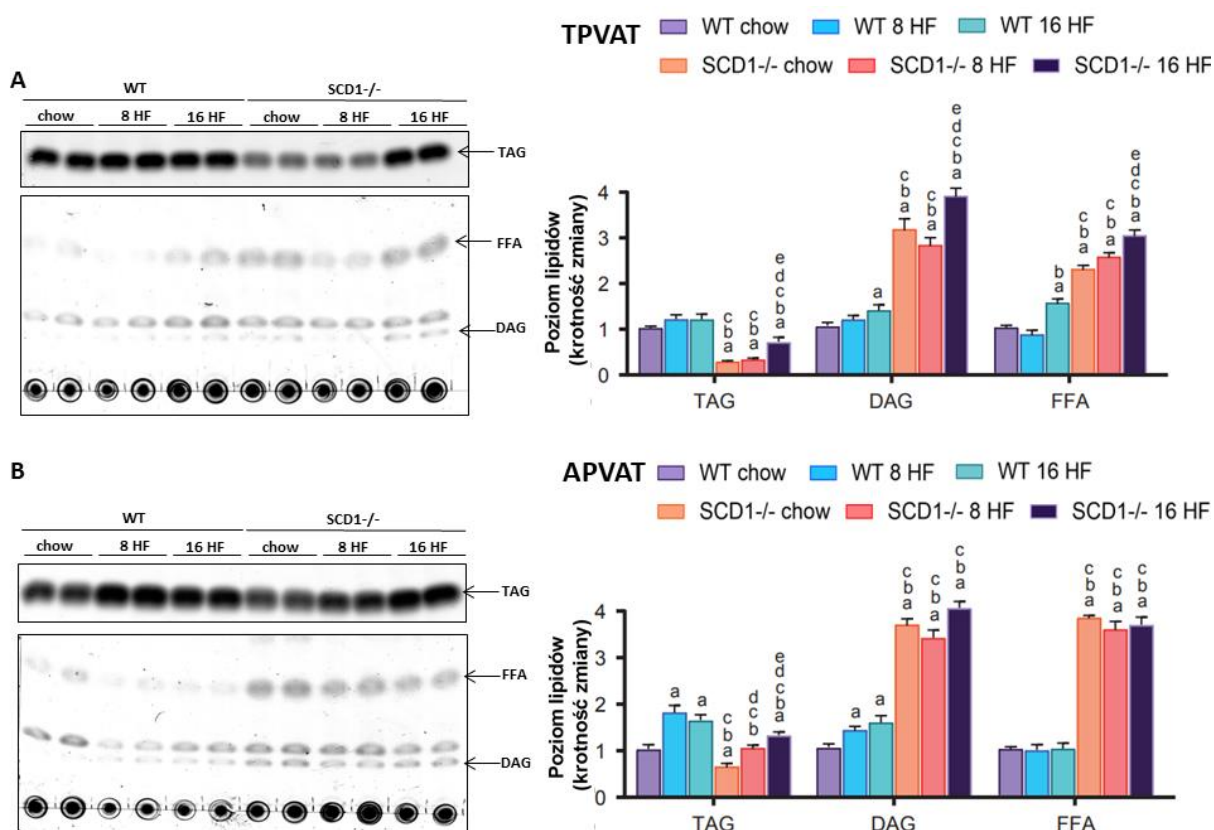
Dieta HF prowadziła do zwiększenia zawartości kolagenu w odcinku piersiowym aorty myszy WT w porównaniu z aortą piersiową myszy WT na diecie chow (Rycina 16A, B). Poziom kolagenu w ścianie aorty piersiowej myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow był wyższy niż w ścianie aorty piersiowej myszy WT na diecie chow (Rycina 16A, B). Karmienie myszy SCD1^{-/-} dietą HF przez 8 i 16 tygodni prowadziło do spadku poziomu kolagenu w ścianie aorty piersiowej w porównaniu z myszami SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 16A, B). Niemniej jednak, poziom kolagenu w odcinku piersiowym aorty myszy SCD1^{-/-} na diecie HF był wyższy niż u myszy WT na diecie HF (Rycina 16A, B). Ściana odcinka brzusznej aorty charakteryzowała się zwiększonym poziomem kolagenu u myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni w porównaniu z aortą brzuszną myszy WT na

diecie chow (Rycina 16C, D). U myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow i HF, poziom kolagenu w ścianie aorty brzusznej był wyższy niż w ścianie aorty brzusznej myszy WT na diecie chow lub HF (Rycina 16C, D).

Przedstawione dane pozwalają stwierdzić, że wyciszenie genu SCD1 prowadzi do zwiększenia depozycji kolagenu w ścianie aorty zarówno w odcinku brzusznej jak i piersiowej.

7.6. Skład lipidów w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą HF

W celu określenia wpływu SCD1 na zmiany składu lipidów obojętnych w trakcie diety HF, dokonano rozdzielania chromatograficznego frakcji lipidowych wyizolowanych z TPVAT i APVAT. W TPVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni nie stwierdzono zmian w poziomie TAG w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 17A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF, poziom TAG był niższy niż w TPVAT myszy WT karmionych tym samym typem diety (Rycina 17A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni poziom TAG był wyższy niż w TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF przez 8 tygodni (Rycina 17A). Poziom DAG w TPVAT myszy WT wzrósł jedynie po 16 tygodniach HF w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 17A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF, poziom DAG był wyższy niż w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 17A). Najwyższy poziom DAG stwierdzono w TPVAT myszy SCD1^{-/-} po 16 tygodniach HF (Rycina 17A). Poziom FFA w TPVAT myszy WT karmionych dietą HF wzrósł jedynie po 16 tygodniach w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 17A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych zarówno dietą chow lub HF, poziom FFA był wyższy niż w TPVAT myszy WT karmionych dietą chow lub HF (Rycina 17A).



Rycina 17. Zawartość lipidów w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. (A) Poziom triacylogliceroli (TAG), diacylogliceroli (DAG) i wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w TPVAT i (B) APVAT. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow, **b** $p < 0,05$ vs. WT 8 HF, **c** $p < 0,05$ vs. WT 16 HF, **d** $p < 0,05$ vs. SCD1-/- chow, **e** $p < 0,05$ vs. SCD1-/- 8 HF. $N = 6$ myszy/grupę.

Poziom TAG w APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni był wyższy niż w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 17B). Poziom TAG w APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 tygodni nie różnił się od poziomu TAG w APVAT myszy karmionych dietą HF przez 16 tygodni (Rycina 17B). Poziom TAG w APVAT myszy SCD1-/- na diecie chow i HF był niższy niż w APVAT myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 17B). Poziom DAG w APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni wzrósł w stosunku do poziomu DAG w APVAT myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 17B). W APVAT myszy SCD1-/- poziom DAG był wyższy niż w APVAT myszy WT zarówno na diecie chow, jak i na diecie HF (Rycina 17B). Poziom FFA w APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni był podobny jak w APVAT myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 17B). Poziom FFA w APVAT myszy SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF był wyższy niż w APVAT myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 17B).

Przedstawione wyniki demonstrowają zmniejszoną zdolność PVAT myszy SCD1^{-/-} do gromadzenia TAG w odpowiedzi na HF, co jest połączone ze wzrostem zawartości FFA i DAG.

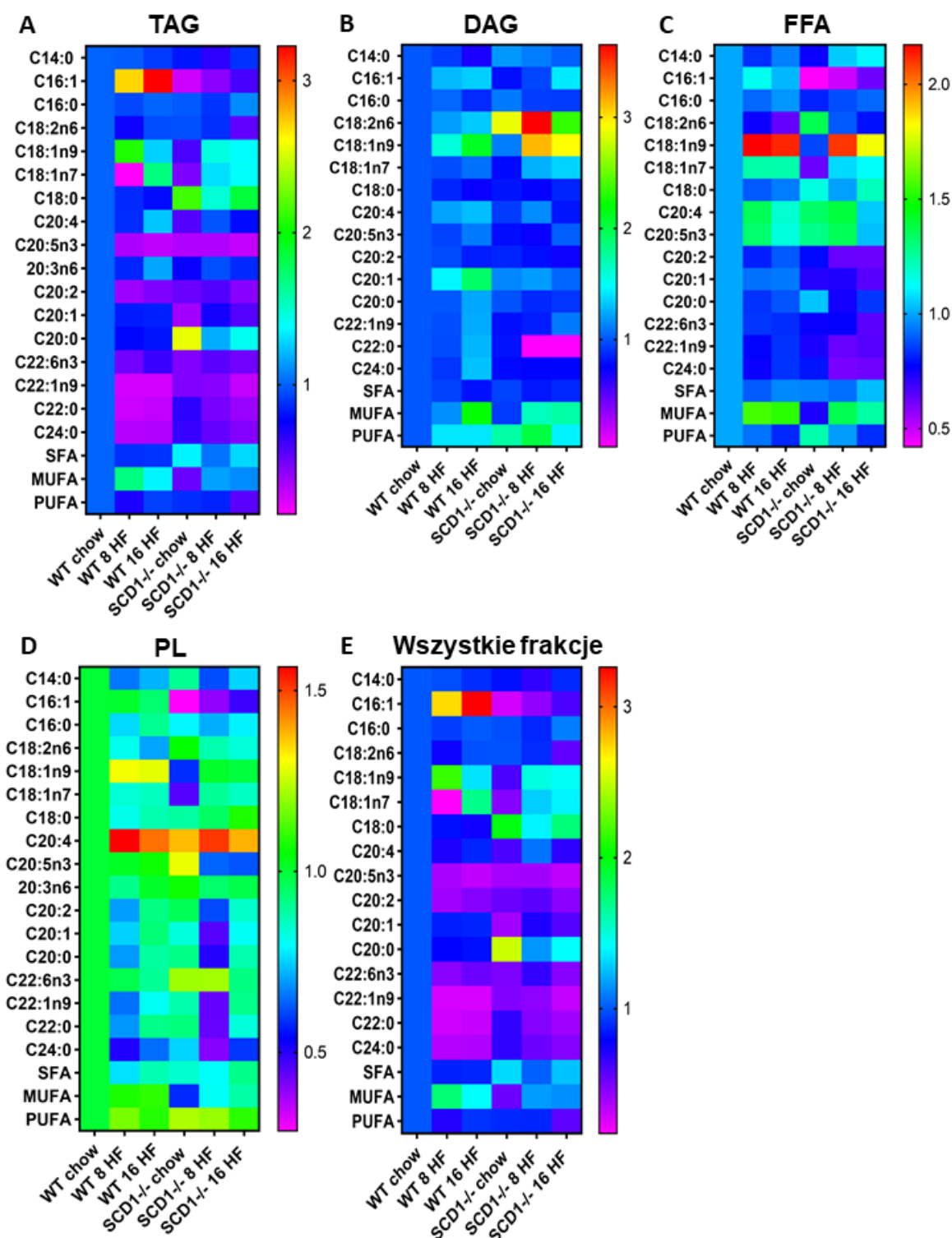
7.7. Skład i zawartości kwasów tłuszczowych w TPVAT

W tabelach 7-10 przedstawiono udział procentowy kwasów tłuszczowych w poszczególnych frakcjach lipidowych wyizolowanych z TPVAT. Na rycinie 18. przedstawiono krotność zmiany zawartości kwasów tłuszczowych względem grupy WT chow. We frakcji TAG największe zmiany dotyczyły kwasów palmitooleinowego (C16:1) i oleinowego (C18:1n9) (Rycina 18A). Poziom kwasu C16:1 był wyższy w TPVAT myszy WT na diecie HF w stosunku do TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF zawartość kwasu C16:1 była niższa niż w TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 18A). Zawartość kwasu C18:1n9 była wyższa w TPVAT myszy WT na diecie HF niż w TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18A). Poziom kwasu C18:1n9 w TPVAT u myszy SCD1^{-/-} był niższy niż w TPVAT u myszy WT na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni (Rycina 18A). Ponadto, we frakcji TAG wyizolowanej z TPVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono akumulację kwasu stearynowego (C18:0) zarówno na diecie chow, jak i HF w porównaniu z myszami WT na diecie chow i HF (Rycina 18A). Zmiany te doprowadziły do zwiększenia ilości wszystkich SFA w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF w porównaniu z myszami WT na diecie chow i HF (Rycina 18A). W TPVAT myszy WT we frakcji DAG, największy wzrost spowodowany dietą HF, stwierdzono dla kwasów C18:1n9 i eikozenowego (C20:1) (Rycina 18B). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow i HF przez 8 i 16 tygodni, we frakcji DAG największej zmianie uległ poziom kwasu linolowego (C18:2n6), który był wyższy niż w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 18B). Ponadto, w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF we frakcji DAG odnotowano wzrost poziomu kwasu C18:1n9 w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 18B).

We frakcji FFA w TPVAT myszy WT karmionych dietą HF stwierdzono wzrost zawartości kwasu C18:1n9 w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 18C). Zawartość kwasu C18:1n9 we frakcji FFA w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow była niższa niż w TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18C). We frakcji FFA w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF stwierdzono wzrostu poziomu kwasu C18:1n9 w porównaniu do myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 18C). Poziom kwasu C18:1n9 we frakcji FFA

w TPVAT u myszy SCD1-/- na diecie chow i HF trwającej 16 tygodni był niższy niż we frakcji FFA w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF trwającej 16 tygodni (Rycina 18C). We frakcji FFA w TPVAT myszy SCD1-/- karmionych dietą chow i HF zaobserwowano wyraźny spadek zawartości kwasu C16:1 w porównaniu z frakcją FFA w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 81C). We frakcji PL wyizolowanych z TPVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni stwierdzono podwyższony poziom kwasu tetrakozanowego (C20:4) w porównaniu z frakcją PL w TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18D). Ponadto, poziom kwasu C20:4 we frakcji PL w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow był wyższy niż we frakcji PL w TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18D). Poziom kwasu C20:4 we frakcji PL w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni był niższy niż we frakcji PL w TPVAT myszy WT na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni (Rycina 18C). W wyniku karmienia myszy WT dietą HF przez 8 i 16 tygodni stwierdzono wzrost zawartości kwasu C18:1n9 w TPVAT we frakcji PL w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 18D). Dieta HF spowodowała podwyższenie poziomu kwasu C18:1n9 we frakcji PL w TPVAT myszy SCD1-/- w porównaniu z myszami SCD1-/- na diecie chow (Rycina 18D). Zawartość kwasu C18:1n9 we frakcji PL w TPVAT u myszy SCD1-/- była niższa niż we frakcji PL TPVAT myszy WT, zarówno na diecie chow, jak i na diecie HF (Rycina 18D).

Karmienie myszy WT dietą HF przez 8 i 16 tygodni spowodowało spadek zawartości SFA w porównaniu z TPVAT myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 18E). Ponadto, w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie HF stwierdzono spadek poziomu MUFA względem TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 18 E). W TPVAT myszy SCD1-/- stwierdzono wyższy poziom SFA zarówno na diecie chow, jak i HF w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18E). TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow wykazywał znaczny spadek zawartości MUFA względem TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18E). W TPVAT myszy SCD1-/- na diecie HF poziom MUFA był wyższy w porównaniu do TPVAT myszy WT na diecie chow. Wzrost ten był jednak mniejszy niż w przypadku TPVAT myszy WT na diecie HF w odniesieniu do TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 18E).



Rycina 19. Względna zawartość kwasów tłuszczowych w TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji triacylogliceroli (TAG). (B) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji diacylogliceroli (DAG). (C) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). (D) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL). (E) Zawartość kwasów tłuszczowych we wszystkich frakcjach kwasów tłuszczowych w APVAT. MUFA - jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA - wielonienasycone kwasy tłuszczowe, SFA - nasycone kwasy tłuszczowe. N=6 myszy/grupę.

Tabela 7. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji triacylogliceroli w TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1^{-/-} chow; e p < 0,05 vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

TPVAT - Triacyloglicerole (TAG)						
Kwas tłuszczowy	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 ^{-/-} chow	SCD1 ^{-/-} 8 HF	SCD1 ^{-/-} 16 HF
C14:0	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,4 ± 0,3
C16:1	2,5 ± 0,1	6,7 ± 0,3 ^a	8,0 ± 0,8 ^a	0,7 ± 0,1 ^{b,c}	1,1 ± 0,1 ^{b,c}	1,5 ± 0,1 ^{b,c}
C16:0	24,1 ± 0,8	22,6 ± 1,3	24,3 ± 2,4	23,7 ± 1,0	21,4 ± 0,1 ^{a,c}	26,3 ± 1,4 ^{a,b,d,e}
C18:2n6	25,7 ± 0,6	18,7 ± 0,2 ^a	24,4 ± 4,9 ^b	24,5 ± 1,3 ^b	23,5 ± 0,4 ^{ab}	13,7 ± 4,2 ^{a,b,c,d,e}
C18:1n9	14,2 ± 0,4	29,3 ± 3,3 ^a	18,0 ± 2,0 ^{ab}	8,3 ± 0,6 ^{a,b,c}	20,3 ± 0,1 ^{a,b,c,d}	19,5 ± 0,8 ^{a,b,d}
C18:1n7	1,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2
C18:0	13,6 ± 0,4	11,8 ± 1,3	10,9 ± 1,3 ^{ab}	29,4 ± 0,6 ^{a,b,c}	20,4 ± 0,4 ^{a,b,c,d}	25,5 ± 3,7 ^{a,b,c,d,e}
C20:4	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,3 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2
C20:5n3	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C20:3n6	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C20:2	2,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
C20:1	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
C20:0	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C22:6n3	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C22:1n9	3,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1
C22:0	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C24:0	1,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
SFA	44,6 ± 0,8	39,0 ± 2,4 ^a	39,4 ± 3,3 ^{ab}	59,9 ± 1,0 ^{a,b,c}	46,7 ± 0,3 ^{b,c,d}	57,2 ± 2,7 ^{a,b,c,e}
MUFA	22,9 ± 0,1	38,3 ± 2,3 ^a	30,9 ± 1,7 ^{ab}	11,8 ± 0,3 ^{a,b,c}	26,3 ± 0,1 ^{a,b,c,d}	25,1 ± 0,6 ^{b,c,d}
PUFA	32,5 ± 0,5	22,7 ± 0,1 ^a	29,7 ± 4,1 ^b	28,3 ± 0,9 ^{ab}	27,0 ± 0,3 ^{ab}	17,7 ± 3,2 ^{a,b,c,d,e}

Tabela 8. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji diacylogliceroli w TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupę.

TPVAT - Diacylglycerole (DAG)						
	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
Kwas tłuszczowy						
C14:0	4,7 ± 0,1	4,3 ± 0,3	3,2 ± 1,0	5,5 ± 0,2	5,2 ± 0,3	4,7 ± 0,2
C16:1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1
C16:0	34,9 ± 4,6	36,5 ± 1,6	30,6 ± 5,7 ^{a,b}	38,5 ± 1,2 ^{a,c}	32,4 ± 0,1 ^{b,d}	32,3 ± 0,1 ^{b,d}
C18:2n6	2,5 ± 0,5	3,0 ± 1,2	3,3 ± 0,8	7,0 ± 0,8 ^{a,b,c}	9,0 ± 0,1 ^{a,b,c}	5,8 ± 0,1 ^{a,e}
C18:1n9	3,4 ± 0,3	5,4 ± 1,0	7,1 ± 1,3 ^a	3,8 ± 0,2 ^c	10,6 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	9,9 ± 0,1 ^{a,b,d}
C18:1n7	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	7,1 ± 5,5 ^{a,b}	0,8 ± 0,5 ^c	1,3 ± 0,1 ^c	1,4 ± 0,1 ^c
C18:0	33,9 ± 2,9	29,1 ± 0,3 ^a	24,8 ± 7,7 ^{a,b}	27,5 ± 2,5 ^a	25,3 ± 0,1 ^{a,b}	29,1 ± 0,1 ^{a,c,e}
C20:4	2,9 ± 0,1	3,6 ± 1,3	3,8 ± 1,2	2,7 ± 1,0	3,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
C20:5n3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1
C20:2	4,1 ± 0,8	4,0 ± 0,4	3,4 ± 0,8	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,1	2,9 ± 0,1
C20:1	1,0 ± 0,9	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,5	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1
C20:0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
C22:1n9	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	4,0 ± 1,1	2,6 ± 0,4	2,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1
C22:0	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,6	1,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C24:0	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,5 ± 1,3	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1
SFA	79,4 ± 2,4	75,4 ± 3,5 ^a	66,1 ± 9,0 ^{a,b}	76,4 ± 1,3 ^{a,c}	66,4 ± 0,1 ^{a,b,d}	69,8 ± 0,1 ^{a,b,c,d}
MUFA	10,2 ± 0,8	13,2 ± 0,7	22,4 ± 7,1 ^{a,b}	9,6 ± 0,3 ^c	17,4 ± 0,1 ^{a,b,c,d}	18,2 ± 0,1 ^{a,b,c,d}
PUFA	10,4 ± 1,6	11,4 ± 3,9	11,5 ± 1,9	14,0 ± 1,1	16,2 ± 0,1	12,0 ± 0,1

Tabela 9. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupę.

TPVAT - Wolne kwasy tłuszczowe (FFA)						
Kwas tłuszczowy	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
C14:0	3,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1 ^d
C16:1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1 ^{a,b,c}	1,2 ± 0,1 ^{a,b,c}	1,5 ± 0,2 ^{b,c}
C16:0	28,6 ± 0,1	26,2 ± 0,3 ^a	28,3 ± 0,8 ^b	23,5 ± 0,7 ^{a,b,c}	25,2 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	26,3 ± 0,8 ^{a,c,d,e}
C18:2n6	15,6 ± 0,8	11,8 ± 0,3 ^{a,b}	9,8 ± 0,1 ^{a,b}	21,2 ± 0,3 ^{a,b,c}	13,9 ± 0,9 ^{a,b,c,d}	12,3 ± 0,3 ^{a,c,d,e}
C18:1n9	6,8 ± 0,7	14,8 ± 0,1 ^a	14,4 ± 0,2 ^a	5,9 ± 0,1 ^{b,c}	14,3 ± 0,6 ^{a,d}	12,3 ± 0,9 ^{a,b,c,d,e}
C18:1n7	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C18:0	21,1 ± 1,5	18,8 ± 0,5 ^a	19,9 ± 0,4 ^{a,b}	24,5 ± 0,5 ^{a,b,c}	20,9 ± 0,3 ^{b,c,d}	25,6 ± 2,7 ^{a,b,c,d,e}
C20:4	5,8 ± 0,5	7,8 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	7,7 ± 0,1 ^a	8,0 ± 0,3 ^{a,c}	6,0 ± 0,1 ^{b,d,e}
C20:5n3	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1
C20:2	3,3 ± 0,4	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,1 ^a
C20:1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C20:0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
C22:6n3	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1
C22:1n9	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
C24:0	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
SFA	56,4 ± 1,5	50,4 ± 0,5 ^a	54,2 ± 0,2 ^{a,b}	53,4 ± 0,1 ^{a,b}	51,7 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	57,9 ± 1,5 ^{a,b,c,d,e}
MUFA	14,5 ± 0,3	22,4 ± 0,2 ^a	21,9 ± 0,3 ^a	10,5 ± 0,0 ^{a,b,c}	19,6 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	17,9 ± 1,0 ^{a,b,c,d,e}
PUFA	29,1 ± 1,2	27,2 ± 0,4 ^a	23,9 ± 0,1 ^{a,b}	36,1 ± 0,1 ^{a,b,c}	28,7 ± 0,5 ^{b,c,d}	24,2 ± 0,5 ^{a,b,c,d,e}

Tabela 10. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów w TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupę.

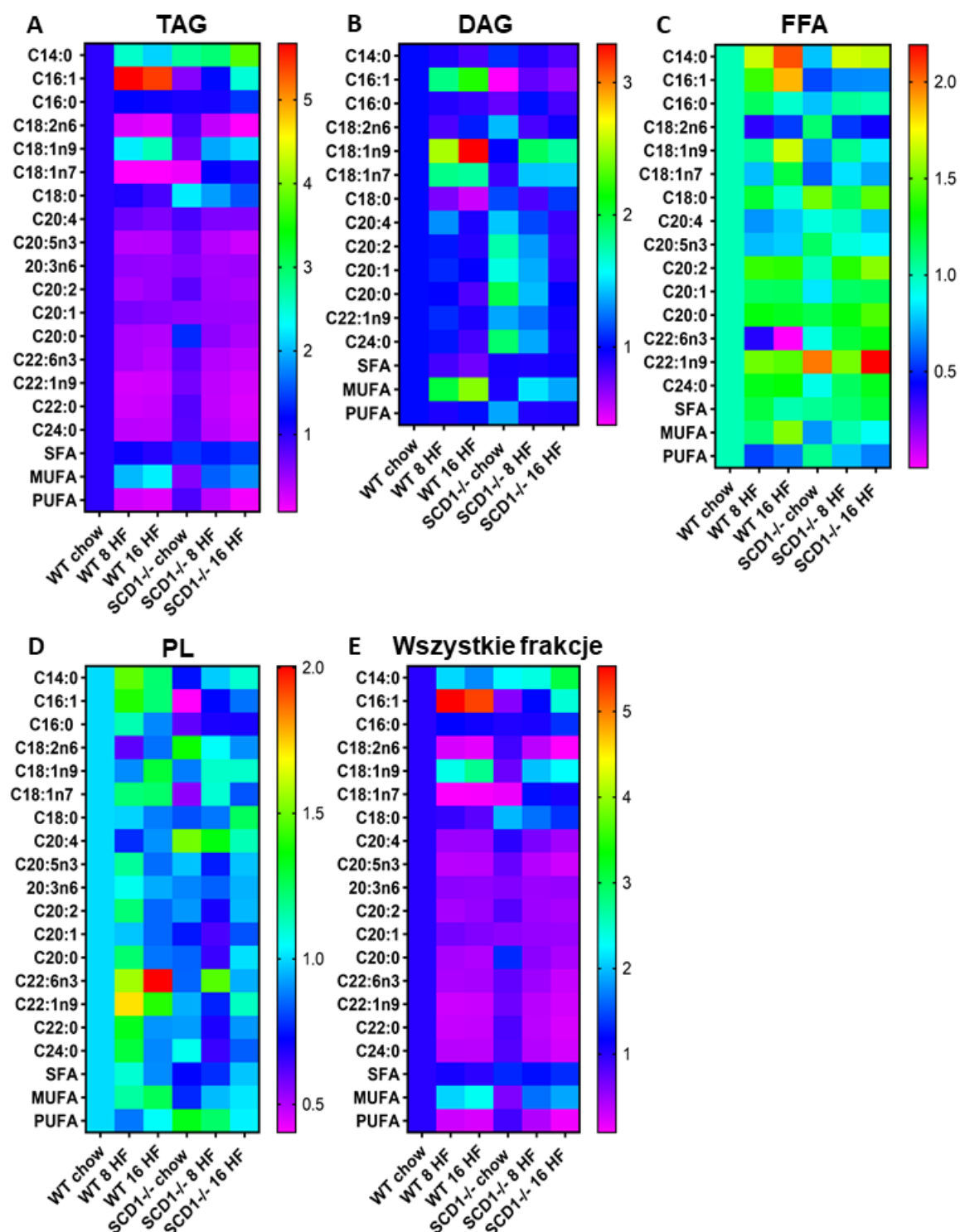
Kwas tłuszczowy	TPVAT - Fosfolipidy (PL)					
	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
C14:0	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
C16:1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1 ^{a,b,c}	0,6 ± 0,1 ^{a,b}	0,7 ± 0,1
C16:0	16,4 ± 0,2	12,6 ± 0,1 ^a	14,8 ± 0,1 ^{a,b}	12,9 ± 0,3 ^{a,c}	11,7 ± 0,2 ^{a,c,d}	12,8 ± 0,9 ^{a,c,e}
C18:2n6	15,7 ± 0,5	12,7 ± 0,2 ^a	11,0 ± 0,1 ^{a,b}	16,5 ± 0,4 ^{a,b,c}	13,7 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	13,0 ± 0,3 ^{a,c,d}
C18:1n9	5,7 ± 0,1	7,3 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,1 ^{a,b}	3,3 ± 0,1 ^{a,b,c}	5,7 ± 0,3 ^{b,c,d}	5,6 ± 0,2 ^{b,c,d}
C18:1n7	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1
C18:0	19,4 ± 0,1	15,9 ± 0,1 ^a	17,0 ± 0,5 ^{a,b}	17,5 ± 0,3 ^{a,b}	18,5 ± 0,6 ^{a,b,c,d}	21,0 ± 1,1 ^{a,b,c,d,e}
C20:4	21,8 ± 0,4	33,9 ± 0,2 ^a	31,6 ± 0,2 ^{a,b}	29,8 ± 1,9 ^{a,b,c}	32,7 ± 0,9 ^{a,b,c,d}	30,1 ± 0,2 ^{a,b,c,e}
C20:5n3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
C20:3n6	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C20:2	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1
C20:1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C20:0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C22:6n3	8,5 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,7 ± 0,1	10,3 ± 2,0 ^{a,b,c}	10,4 ± 0,7 ^{a,b,c}	7,9 ± 0,1 ^{d,e}
C22:1n9	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
C22:0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C24:0	1,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1
SFA	40,4 ± 0,0	31,3 ± 0,1 ^a	35,1 ± 0,3 ^{a,b}	34,4 ± 0,6 ^{a,b,c}	32,5 ± 0,8 ^{a,b,c,d}	37,1 ± 0,2 ^{a,b,c,d,e}
MUFA	10,8 ± 0,2	11,6 ± 0,2	11,8 ± 0,0 ^a	6,1 ± 0,2 ^{a,b,c}	8,7 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	9,5 ± 0,2 ^{a,b,c,d}
PUFA	48,8 ± 0,1	57,1 ± 0,1 ^a	53,1 ± 0,3 ^{a,b}	59,5 ± 0,8 ^{a,b,c}	58,8 ± 0,1 ^{a,b,c,d}	53,4 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e}

7.8. Skład i zawartości kwasów tłuszczowych w APVAT

Tabele 11-14 przedstawiają udział procentowy kwasów tłuszczowych zidentyfikowanych w poszczególnych frakcjach lipidowych wyizolowanych z APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. W APVAT myszy WT karmionych dietą HF we frakcji TAG zaobserwowano wzrost zawartości kwasu C16:1 zarówno po 8 i 16 tygodniach w porównaniu z frakcją TAG w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 19A). W APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow we frakcji TAG stwierdzono spadek zawartości kwasu C16:1 względem myszy WT na diecie chow (Rycina 19A). Poziom kwasu C16:1 w APVAT myszy SCD1^{-/-} wzrósł po 8 i 16 tygodniach diety HF w porównaniu z myszami SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 19A). W APVAT myszy WT po 8 i 16 tygodniach diety HF we frakcji TAG poziom kwasu C14:0 nie uległ zmianie w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 19A). Poziom kwasu C14:0 wzrósł we frakcji TAG w APVAT u myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF w porównaniu frakcją TAG w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 19A). Dieta HF spowodowała podwyższenie zawartości kwasów C18:1n9 i C16:1 we frakcji DAG w APVAT myszy WT w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 19B). We frakcji DAG w APVAT myszy SCD1^{-/-} zarówno na diecie chow, jak i HF, poziom kwasu C16:1 był niższy niż u myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 19B). We frakcji DAG w APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF stwierdzono ponadto wzrost poziomu kwasu C18:1 w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 19B). Wzrost ten był jednak mniej wyraźny niż we frakcji DAG w APVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 19B). We frakcji FFA w APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 16 tygodni zaobserwowano wzrost poziomu kwasu C14:0 w stosunku do myszy WT na diecie chow (Rycina 19C). U myszy SCD1^{-/-} poziom kwasu C14:0 we frakcji FFA w APVAT wzrósł po 8 i 16 tygodniach diety HF w porównaniu z frakcją FFA w APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 19C). W APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} we frakcji FFA w wyniku karmienia dietą HF przez 8 i 16 tygodni doszło do spadku poziomu kwasu C18:2n6 w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 19C). We frakcji PL w APVAT u myszy WT karmionych dietą HF przez 16 tygodni stwierdzono wzrost zawartości kwasu C18:1n9 w porównaniu frakcją PL w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 19D). Było to związane ze spadkiem zawartości kwasu C18:0 po 8 i 16 tygodniach diety HF we frakcji PL w APVAT myszy WT względem myszy WT na diecie chow (Rycina 19D). We frakcji PL w APVAT myszy SCD1^{-/-} karmienie dietą HF przez 16 tygodni spowodowało wzrost zawartości kwasu C18:0 w porównaniu z myszami WT na diecie chow (Rycina 19D). Poziom kwasu C18:1 we frakcji PL w APVAT myszy

SCD1^{-/-} na diecie chow i HF trwającej 8 i 16 tygodni nie uległ zmianie w porównaniu z frakcją PL w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 19D).

Podsumowując, w APVAT myszy WT na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni stwierdzono istotny wzrost zawartości MUFA w porównaniu z APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 19E). Wzrost MUFA został również zaobserwowany w APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF w porównaniu z APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow. Wzrost ten był jednak mniej wyraźny niż w APVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 19E).



Rycina 19. Względna zawartość kwasów tłuszczowych w APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji triacylogliceroli (TAG). (B) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji diacylogliceroli (DAG). (C) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). (D) Zawartość kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów (PL). (E) Zawartość kwasów tłuszczowych we wszystkich frakcjach kwasów tłuszczowych w APVAT. MUFA - mononienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA - wielonienasycone kwasy tłuszczowe, SFA - nasycone kwasy tłuszczowe. N=6 myszy/grupę.

Tabela 11. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji triacylogliceroli w APVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupa

	APVAT - Triacyloglicerole (TAG)					
	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
Kwas tłuszczowy						
C14:0	0,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,1 ^{a,c}
C16:1	1,6 ± 0,1	9,1 ± 0,1 ^a	8,7 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,1 ^{b,c}	2,0 ± 0,1 ^{b,c,d}	4,0 ± 0,2 ^{a,c,d,e}
C16:0	23,5 ± 4,3	28,2 ± 0,3 ^a	26,8 ± 0,6 ^{a,b}	25,4 ± 0,3 ^{a,b}	25,6 ± 0,7 ^{a,b}	33,2 ± 0,5 ^{a,b,c,d,e}
C18:2n6	34,5 ± 1,2	8,4 ± 1,1 ^a	6,3 ± 0,2 ^{a,b}	29,5 ± 0,9 ^{a,b,c}	12,2 ± 0,6 ^{a,b,c,d}	2,6 ± 0,1 ^{a,b,c,d,e}
C18:1n9	16,3 ± 0,8	36,5 ± 1,6 ^a	42,8 ± 0,9 ^{a,b}	11,3 ± 0,2 ^{a,b,c}	31,5 ± 0,9 ^{a,b,c,d}	35,0 ± 0,6 ^{a,b,c,d,e}
C18:1n7	2,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^{b,c,d}	2,6 ± 0,1 ^{b,c,d}
C18:0	9,5 ± 1,4	10,0 ± 0,1	8,4 ± 0,3 ^b	21,2 ± 0,9 ^{a,b,c}	18,0 ± 1,1 ^{a,b,c,d}	14,8 ± 0,2 ^{a,b,c,d,e}
C20:4	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
C20:5n3	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C20:3n6	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
C20:2	1,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
C20:1	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C20:0	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C22:6n3	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
C22:1n9	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C22:0	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C24:0	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
SFA	36,3 ± 2,0	41,3 ± 0,5 ^a	37,8 ± 0,6 ^b	51,4 ± 0,5 ^{a,b,c}	47,1 ± 1,1 ^{a,b,c,d}	51,9 ± 0,3 ^{a,b,c,e}
MUFA	23,6 ± 0,6	47,2 ± 1,2 ^a	53,0 ± 0,7 ^{a,b}	14,7 ± 0,1 ^{a,b,c}	37,8 ± 0,9 ^{a,b,c,d}	42,8 ± 0,3 ^{a,b,c,d,e}
PUFA	40,1 ± 1,4	11,5 ± 0,1 ^a	9,2 ± 0,1 ^{a,b}	33,9 ± 0,6 ^{a,b,c}	15,1 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	5,3 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e}

Tabela 12. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji diacylogliceroli w APVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupa.

APVAT - Diacyloglicerole (DAG)						
Kwas tłuszczowy	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
C14:0	4,2 ± 0,5	3,8 ± 0,1	3,4 ± 1,3	4,6 ± 1,2	3,8 ± 0,6	3,4 ± 1,0
C16:1	2,4 ± 0,3	4,4 ± 0,1	5,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1 ^{b,c}	1,8 ± 0,1 ^c	1,6 ± 0,1 ^c
C16:0	36,1 ± 1,6	35,6 ± 0,1 ^a	33,9 ± 2,0 ^a	29,5 ± 6,5 ^{a,b,c}	39,7 ± 1,9 ^{b,c,d}	32,4 ± 2,4 ^{a,b,c}
C18:2n6	10,7 ± 2,3	8,8 ± 0,1	11,2 ± 2,8	15,1 ± 2,7 ^{a,b,c}	8,8 ± 1,4 ^d	10,2 ± 1,8 ^d
C18:1n9	7,1 ± 0,4	17,9 ± 0,1	23,4 ± 1,3	6,9 ± 0,9	13,7 ± 0,6	12,7 ± 0,5
C18:1n7	1,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,5	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2
C18:0	29,8 ± 2,0	21,7 ± 0,1 ^a	16,4 ± 0,9 ^{a,b}	35,0 ± 5,0 ^{b,c}	24,9 ± 1,6 ^{a,b,c,d}	33,8 ± 2,0 ^{a,b,c,d}
C20:4	2,4 ± 0,4	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2	3,4 ± 0,5	2,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2
C20:2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C22:1n9	3,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,0 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1
C24:0	2,7 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
SFA	72,8 ± 2,6	61,2 ± 0,8 ^a	53,7 ± 1,7 ^{a,b}	69,3 ± 2,5 ^{a,b,c}	68,5 ± 0,8 ^{a,b,c}	69,7 ± 1,6 ^{a,b,c}
MUFA	14,0 ± 0,5	26,8 ± 0,3 ^a	32,8 ± 0,9 ^{a,b}	12,0 ± 0,9 ^{b,c}	19,9 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	18,0 ± 0,5 ^{a,b,c,d}
PUFA	13,2 ± 2,2	12,0 ± 1,2	13,5 ± 2,3	18,7 ± 2,3 ^{a,b,c}	11,6 ± 1,3 ^d	12,3 ± 1,5 ^d

Tabela 13. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w APVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1-/- chow; e p < 0,05 vs SCD1-/- 8 HF. N=6 myszy/grupę.

APVAT - Wolne kwasy tłuszczowe (FFA)						
Kwas tłuszczowy	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 -/- chow	SCD1 -/- 8 HF	SCD1 -/- 16 HF
C14:0	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,2	5,1 ± 0,5 ^a	1,9 ± 0,3 ^{b,c}	4,1 ± 0,2 ^d	4,0 ± 0,2 ^d
C16:1	2,0 ± 0,1	2,8 ± 0,2	3,7 ± 0,5	1,1 ± 0,1 ^c	1,3 ± 0,1 ^c	1,3 ± 0,1 ^c
C16:0	29,8 ± 0,2	34,5 ± 0,7 ^a	28,4 ± 4,0 ^b	23,1 ± 4,1 ^{a,b,c}	33,4 ± 0,3 ^{b,c,d}	30,1 ± 1,3 ^{b,d}
C18:2n6	17,3 ± 0,3	6,3 ± 0,2 ^a	9,4 ± 0,9 ^{a,b}	19,4 ± 2,2 ^{a,b,c}	9,3 ± 0,1 ^{a,b,d}	7,2 ± 0,7 ^{a,c,d,e}
C18:1n9	9,7 ± 0,1	10,5 ± 0,2	16,2 ± 1,6 ^{a,b}	6,6 ± 0,7 ^{a,b,c}	10,4 ± 0,3 ^{c,d}	8,1 ± 0,4 ^{b,c,e}
C18:1n7	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1
C18:0	20,3 ± 0,1	24,9 ± 0,4 ^a	19,4 ± 0,7 ^b	30,5 ± 1,8 ^{a,b,c}	24,3 ± 0,4 ^{a,c,d}	29,8 ± 0,2 ^{a,b,c,e}
C20:4	5,5 ± 0,1	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,2	5,1 ± 1,7	5,4 ± 0,9	4,2 ± 0,9
C20:5n3	2,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2
C20:2	2,8 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,4	2,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	4,4 ± 0,1
C20:1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
C20:0	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1
C22:6n3	1,6 ± 0,1	0,6 ± 1,0	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,1 ^c
C22:1n9	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
C24:0	1,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1
SFA	55,5 ± 0,4	67,2 ± 0,7 ^a	56,7 ± 3,2 ^b	58,5 ± 2,2 ^{a,b,c}	65,3 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	67,7 ± 1,2 ^{a,c,d,e}
MUFA	15,1 ± 0,2	16,4 ± 0,3	23,9 ± 2,1 ^{a,b}	10,1 ± 0,6 ^{a,b,c}	15,0 ± 0,2 ^{c,d}	12,5 ± 0,4 ^{b,c,d}
PUFA	29,4 ± 0,1	16,4 ± 0,8 ^a	19,4 ± 1,1 ^{a,b}	31,4 ± 1,9 ^{b,c}	19,7 ± 0,6 ^{a,b,c,d}	19,7 ± 0,1 ^{a,b,d,e}

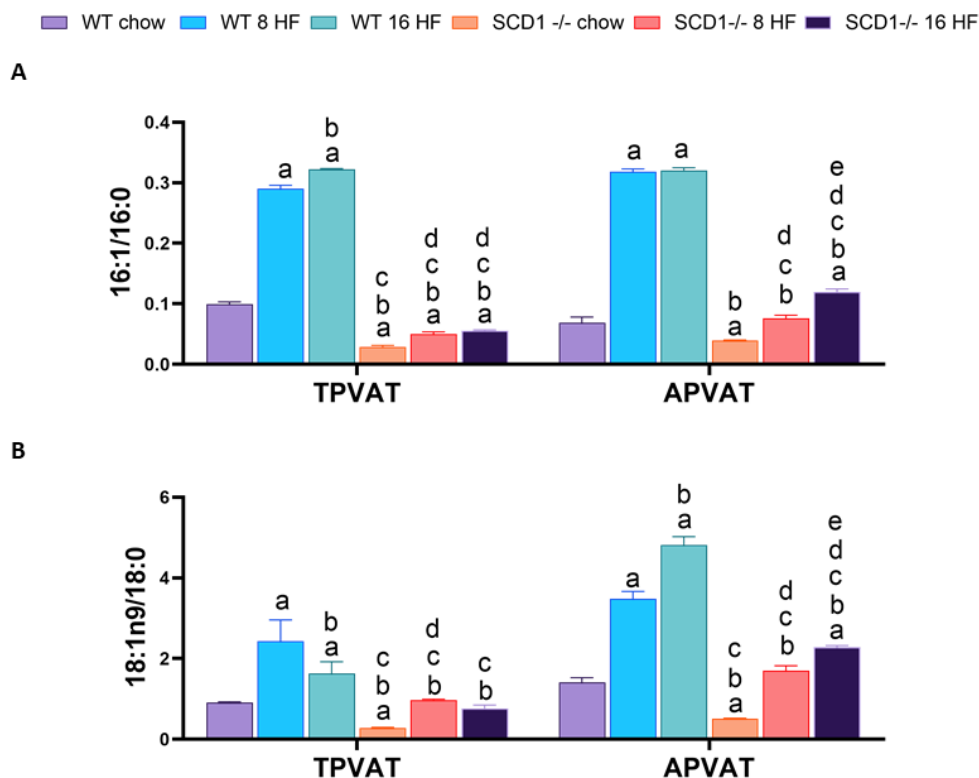
Tabela 14. Zawartość procentowa kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidów w APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1^{-/-} chow; e p < 0,05 vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

Kwas tłuszczowy	APVAT - Fosfolipidy (PL)					
	WT chow	WT 8 HF	WT 16 HF	SCD1 ^{-/-} chow	SCD1 ^{-/-} 8 HF	SCD1 ^{-/-} 16 HF
C14:0	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1
C16:1	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
C16:0	21,3 ± 2,5	24,1 ± 0,6 ^a	18,9 ± 0,2 ^{a,b}	12,8 ± 0,6 ^{a,b,c}	14,6 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	14,7 ± 0,5 ^{a,b,c,d}
C18:2n6	12,6 ± 1,2	7,7 ± 0,5 ^a	10,9 ± 0,3 ^{a,b}	17,3 ± 1,4 ^{a,b,c}	13,2 ± 0,2 ^{a,b,c,d}	11,4 ± 0,4 ^{a,b,c,d}
C18:1n9	4,5 ± 0,4	4,1 ± 0,2	5,8 ± 0,1 ^{a,b}	4,0 ± 0,4 ^c	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1
C18:1n7	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
C18:0	20,6 ± 2,0	20,2 ± 0,2	18,1 ± 0,4 ^{a,b}	16,9 ± 0,7 ^{a,b}	17,8 ± 0,3 ^{a,b}	25,7 ± 1,4 ^{a,b,c,d,e}
C20:4	22,2 ± 1,9	17,2 ± 0,4 ^a	20,1 ± 0,2 ^{a,b}	33,4 ± 2,2 ^{a,b,c}	30,0 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	25,2 ± 0,7 ^{a,b,c,d,e}
C20:5n3	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
C20:3n6	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C20:2	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C20:1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
C20:0	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C22:6n3	6,3 ± 0,6	9,9 ± 0,4 ^a	12,6 ± 0,1 ^{a,b}	5,3 ± 0,3 ^{a,b}	9,2 ± 0,1 ^{a,c,d}	5,9 ± 0,2 ^{a,c,e}
C22:1n9	1,6 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,1 ^b	1,8 ± 0,1
C22:0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
C24:0	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
SFA	46,3 ± 3,7	50,3 ± 0,6 ^a	41,5 ± 0,1 ^{a,b}	33,7 ± 1,1 ^{a,b,c}	35,9 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	44,8 ± 1,2 ^{b,c,d,e}
MUFA	9,5 ± 0,6	11,2 ± 0,3	12,1 ± 0,1 ^a	7,4 ± 0,2 ^{a,b,c}	9,3 ± 0,0 ^{b,c,d}	9,6 ± 0,1 ^{c,d}
PUFA	44,2 ± 2,8	38,5 ± 0,4 ^a	46,4 ± 0,1 ^{a,b}	58,9 ± 1,0 ^{a,b,c}	54,8 ± 0,5 ^{a,b,c,d}	45,6 ± 1,0 ^{b,d,e}

7.9. Zmiany wartości indeksu desaturacji kwasów tłuszczowych w TPVAT i APVAT

Różnice w kompozycji SFA i MUFA w PVAT myszy WT i SCD1-/- na diecie chow i HF sugerują, że na skład kwasów tłuszczowych wpływa zarówno dieta, jak i aktywność SCD1. Indeks desaturacji jest pośrednim wskaźnikiem aktywności SCD1. Z tego powodu obliczono jego wartość dla substratów i produktów SCD1, tj. 16:1/16:0 oraz 18:1n9/18:0. W TPVAT myszy WT indeks desaturacji C16 wzrósł zarówno po 8 i 16 tygodniach karmienia dietą HF w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 20A). W TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow i HF zaobserwowano spadek indeksu desaturacji C16 względem wszystkich grup WT (Rycina 20A). Ponadto, w TPVAT myszy SCD1-/- karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni stwierdzono wzrost wartości indeksu desaturacji C16 względem myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 20A). W APVAT myszy WT indeks desaturacji C16 wzrósł względem myszy WT karmionych dietą chow po 8 i 16 tygodniach diety HF (Rycina 20A). W APVAT myszy SCD1-/- na diecie chow odnotowano niższy indeks desaturacji C16 niż w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 20A). Dieta HF spowodowała wzrost wartości indeksu desaturacji C16 w APVAT myszy SCD1-/- w porównaniu do myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 20A). Indeks desaturacji C18 w TPVAT u myszy WT w wyniku karmienia dietą HF wzrósł w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 20B). Po 8 i 16 tygodniach diety HF w TPVAT myszy SCD1-/- odnotowano spadek indeksu desaturacji C18 względem myszy WT karmionych HF przez 8 i 16 tygodni (Rycina 20B). W TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow stwierdzono niższy poziom indeksu desaturacji niż w TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 20B). W TPVAT myszy SCD1-/- karmionych dietą HF przez 8 tygodni stwierdzono podwyższoną wartość indeksu desaturacji C18 w stosunku do TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 20B). Po 16 tygodniach diety HF w TPVAT myszy SCD1-/- nie zaobserwowano zmian indeksu desaturacji C18 względem myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 20B). Indeks desaturacji C18 w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow i HF był niższy niż indeks desaturacji w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 20B). Wartość indeksu desaturacji C18 w APVAT myszy WT była wyższa na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni w stosunku do myszy WT na diecie chow (Rycina 20B). W APVAT myszy SCD1-/- na diecie HF indeks desaturacji C18 był również wyższy w stosunku do APVAT myszy WT na diecie chow. Był on jednak niższy niż w APVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 20B).

Przedstawione wyniki pokazują, że SCD1 jest główną desaturazą utrzymującą równowagę między MUFA i SFA w PVAT w trakcie karmienia myszy dietą HF. Ponadto, aktywność SCD1 w PVAT zwiększa się w odpowiedzi na HF.

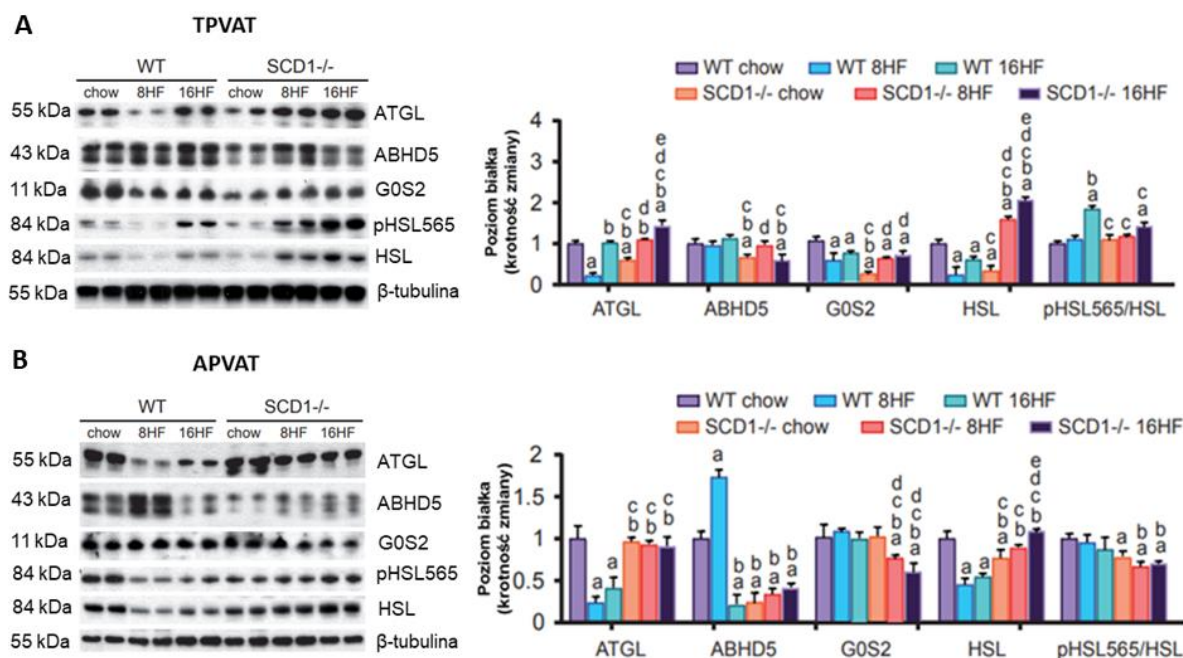


Rycina 20. Wartość indeksu desaturacji (A) C16 i (B) C18 w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF przez 8 lub 16 tygodni. a p<0,05 vs. WT chow; b p < 0,05 vs WT 8 HF; c p < 0,05 vs WT 16 HF; d p < 0,05 vs SCD1^{-/-} chow; e p <0,05 vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

7.10. Szlak lipolizy w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}

Zmniejszona zawartość TAG w PVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF, połączona ze zwiększoną ilością DAG i FFA (Rycina 21A, B), sugeruje aktywację szlaku lipolizy. Głównymi lipazami zaangażowanymi w ten proces są ATGL i HSL (Lafontan i Langin, 2009). Poziom białka ATGL i HSL w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF był wyższy niż w TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 21A). Wzrost zawartości białek ATGL i HSL u myszy SCD1^{-/-} był zależny od długości trwania diety (Rycina 21A). Poziom białka ABHD5, aktywatora ATGL był niższy w TPVAT myszy SCD1^{-/-} niż w TPVAT myszy WT na diecie chow i po 16 tygodniach diety HF (Rycina 21A). G0S2 jest negatywnym regulatorem aktywności ATGL (Yang i wsp., 2010). Poziom białka G0S2 w TPVAT myszy WT karmionych dietą HF był niższy w stosunku do myszy WT na diecie chow (Rycina 21A).

W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow stwierdzono spadek poziomu białka G0S2 w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 21A). Poziom białka G0S2 był wyższy w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF w porównaniu z TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 21A).



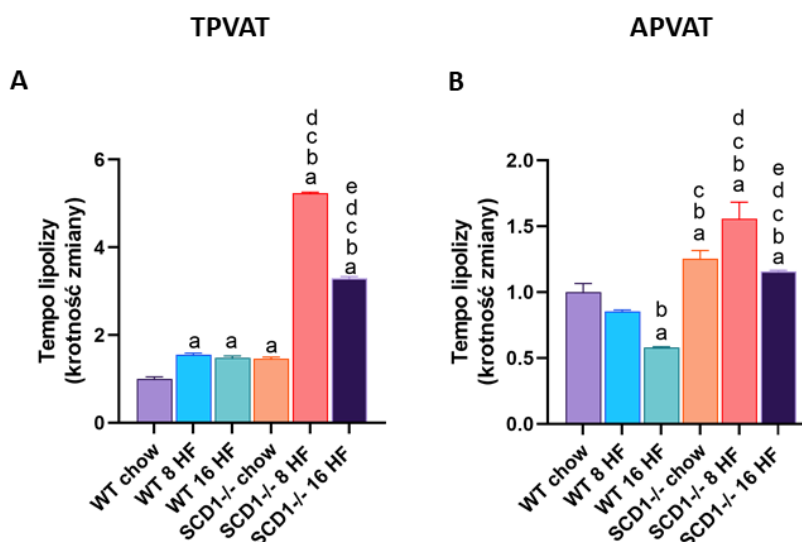
Rycina 21. Wpływ braku SCD1 na lipolizę w (A) TPVAT i (B) APVAT myszy karmionych dietą chow i HF. ABHD5 - białko zawierające domenę α/β -hydrolazy 5, ATGL - swoista dla adipocytów lipaza triacylogliceroli, G0S2 - białko przełączające G0/G1 2, HSL - lipaza wrażliwa na hormony. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow; **b** $p < 0,05$ vs WT 8 HF; **c** $p < 0,05$ vs WT 16 HF; **d** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} chow; **e** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

Fosforylacja HSL na serynie 565 (pHSL565) hamuje aktywność tego enzymu (Garton i Yeaman, 1990). Poziom pHSL565 był wyższy w TPVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 21A).

W APVAT myszy WT na diecie HF poziom białka HSL i ATGL był niższy w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 21B). W APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF poziom białek HSL i ATGL był wyższy niż u myszy WT karmionych dietą HF (Rycina 21B). Poziom białka ABHD5 w APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF był niższy niż w APVAT myszy WT na diecie chow oraz po 8 tygodniach diety HF (Rycina 21B). Poziom białka G0S2 był niższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF względem APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 21B). Poziom pHSL565 był niższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow i HF przez 8 i 16 tygodni w porównaniu z APVAT myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 21B).

Aktywność ATGL w TPVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni była wyższa w porównaniu do myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 22A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni stwierdzono wyraźny wzrost aktywności ATGL w porównaniu do myszy SCD1^{-/-} na diecie chow oraz do myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 22A). W APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 16 tygodni stwierdzono spadek aktywności ATGL w porównaniu do myszy WT karmionych dietą chow (Rycina 22B). W APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych zarówno dietą chow, jak i HF przez 8 i 16 tygodni zanotowano wzrost aktywności ATGL względem myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 22B). Najwyższą aktywność ATGL stwierdzono w APVAT myszy SCD1^{-/-} po 8 tygodniach diety HF (Rycina 22B).

Przedstawione wyniki wskazują, że w PVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF szlak lipolizy jest aktywowany w porównaniu z PVAT myszy WT na diecie HF.

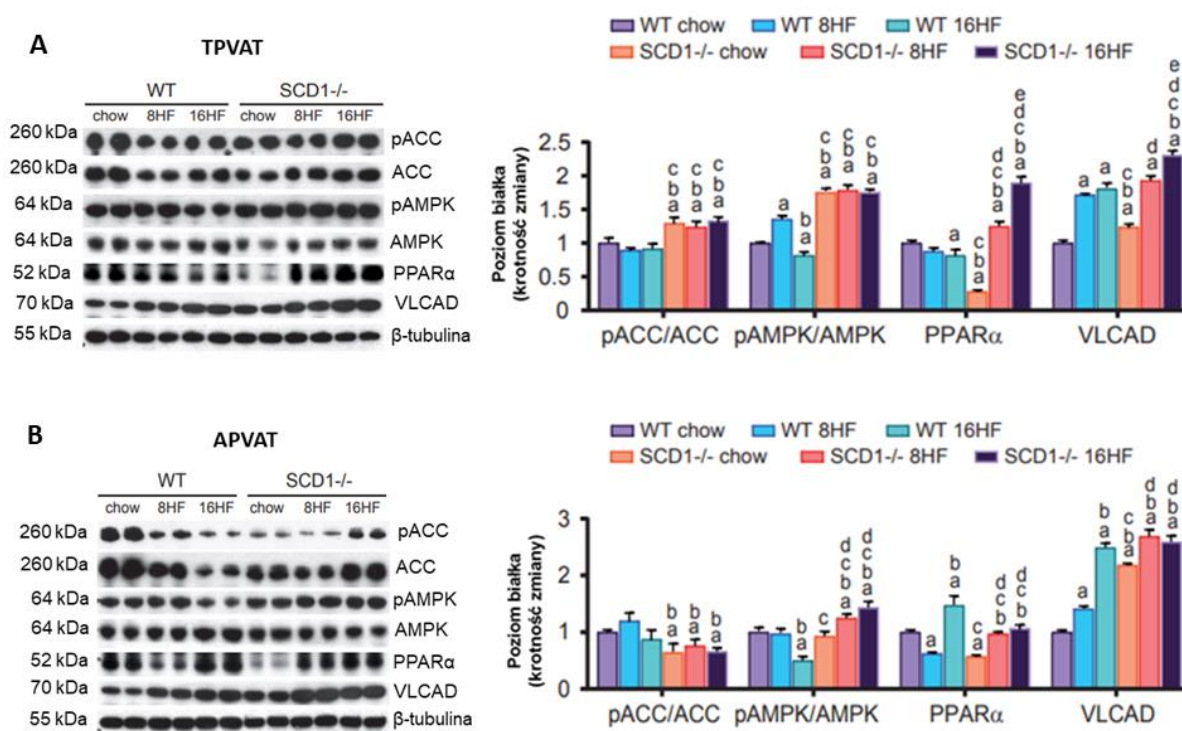


Rycina 22. Aktywność ATGL w (A) TPVAT i (B) APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF przez 8 lub 16 tygodni. a $p < 0,05$ vs. WT chow; b $p < 0,05$ vs WT 8 HF; c $p < 0,05$ vs WT 16 HF; d $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} chow; e $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

7.11. β -oksydacja kwasów tłuszczowych w PVAT myszy

Proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach jest regulowany przez AMPK, która wpływa na wewnątrzkomórkowy poziom malonylo-CoA poprzez regulację aktywności ACC. W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF poziom fosforylacji AMPK i ACC był wyższy niż u myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 23A). PPAR α należy do rodziny receptorów jądrowych, które regulują ekspresję genów zaangażowanych w β -oksydację kwasów tłuszczowych (Montaigne i wsp., 2021). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow stwierdzono niższy poziom białka PPAR α w stosunku do myszy WT na diecie

chow (Rycina 23A). W wyniku karmienia myszy SCD1^{-/-} dietą HF w TPVAT doszło do wzrostu poziomu białka PPAR α w porównaniu do myszy WT na diecie HF (Rycina 23A). Dehydrogenaza bardzo długołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA (ang. very long-chain acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD) jest enzymem katalizującym wprowadzenie podwójnego wiązania między drugim a trzecim atomem węgla w cząsteczce długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (C14-C20), co umożliwia ich włączenie w szlak β -oksydacji (Mezhnina i wsp., 2020). Poziom białka VLCAD był wyższy w TPVAT u myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych HF przez 8 i 16 tygodni w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 23A). Największy wzrost poziomu białka VLCAD stwierdzono w przypadku TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 23A).



Rycina 23. Wpływ wyciszenia SCD1 na β -oksydację w (A) TPVAT i (B) APVAT myszy. ACC - karboksylaza acetylo-CoA, AMPK - kinaza białkowa aktywowana przez AMP, PPAR α - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów alfa, VLCAD - dehydrogenaza bardzo długołańcuchowych acyloCoA kwasów tłuszczowych. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow; **b** $p < 0,05$ vs WT 8 HF; **c** $p < 0,05$ vs WT 16 HF; **d** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} chow; **e** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

W APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF przez 8 i 16 tygodni poziom fosforylacji ACC był niższy niż u myszy WT na diecie chow (Rycina 23B). Poziom fosforylacji AMPK był wyższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} po diecie HF niż u myszy WT karmionych HF (Rycina 23B). Poziom białka PPAR α był wyższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} po 8 tygodniach diety HF niż u myszy WT po 8 tygodniach diety HF (Rycina 23B).

W APVAT myszy SCD1^{-/-} poziom białka VLCAD był wyższy niż u myszy WT na diecie chow i po 8 tygodniach diety HF (Rycina 23B).

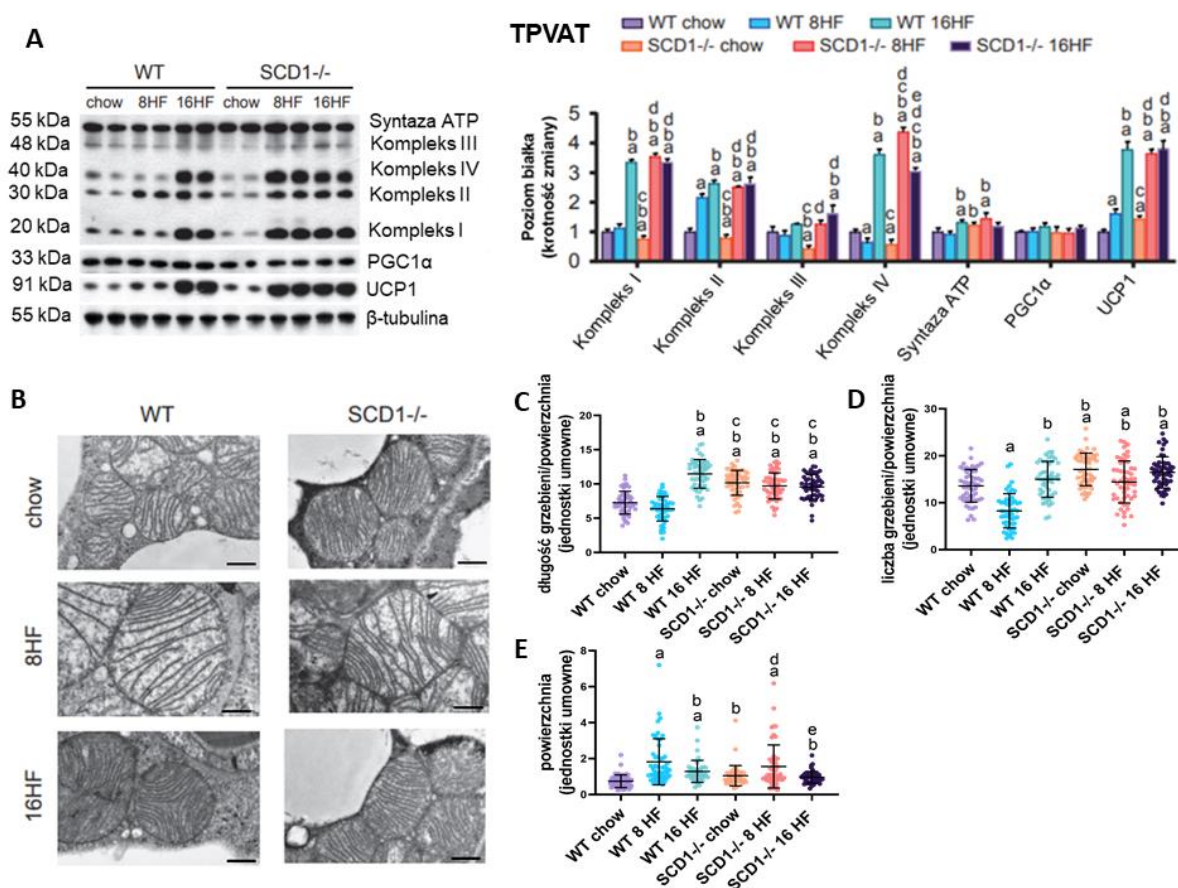
Powyższe wyniki wskazują, że SCD1 reguluje β -oksydację kwasów tłuszczowych w PVAT. Wpływ SCD1 na β -oksydację jest jednak zależny od kontekstu metabolicznego oraz od lokalizacji anatomicznej PVAT.

7.12. Funkcjonowanie mitochondriów w TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}

Zdolność do prowadzenia procesu tlenowego oddychania komórkowego i fosforylacji oksydacyjnej jest zdeterminowana przez obecność kompleksów białkowych łańcucha oddechowego, przeprowadzających proces fosforylacji oksydacyjnej (ang. oxidative phosphorylation complexes, OXPHOS). Poziom białek kompleksów I, II, III i IV w TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow był niższy w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 24A). Poziom białka kompleksów I, II, III i IV był wyższy w TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 24A). Poziom białka syntazy ATP w TPVAT myszy WT karmionych HF przez 16 tygodni był wyższy w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 24A). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono wzrost poziomu białka syntazy ATP po 8 tygodniach diety HF względem myszy WT na diecie chow (Rycina 24A). Wzrostowi poziomowi białek kompleksów OXPHOS w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF względem TPVAT myszy WT na diecie chow towarzyszył wzrost poziomu białka UCP1 (Rycina 24A). Poziom białka koaktywatora 1 α receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC1 α) w wyniku karmienia dietą HF nie uległ zmianie w TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} w porównaniu do TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 24A). Poziom białka PGC1 α w TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF nie uległ również zmianie w stosunku do TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 24A).

Długość grzebieni w mitochondriach w TPVAT myszy WT była wyższa po 16 tygodniach diety HF w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 24B, C). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} dieta HF nie wpłynęła na długość grzebieni mitochondrialnych w porównaniu do myszy SCD1^{-/-} na diecie chow. Była ona natomiast wyższa niż w mitochondriach w TPVAT myszy WT na diecie chow i HF trwającej przez 8 tygodni (Rycina 24B, C). W TPVAT myszy WT na diecie HF trwającej 8 tygodni stwierdzono spadek

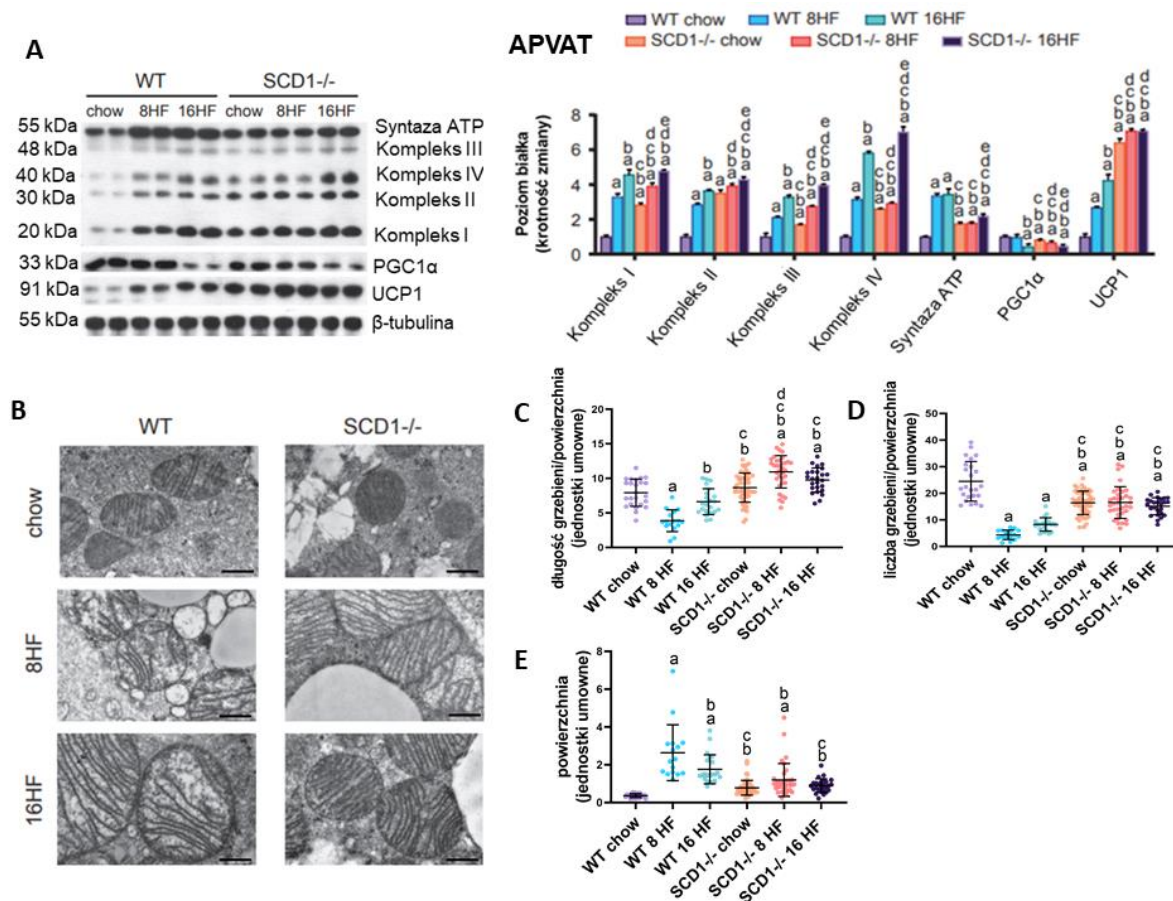
średniej liczby grzebieni mitochondrialnych w stosunku do TPVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 24B, D). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} dieta HF nie miała wpływu na średnią liczbę grzebieni mitochondrialnych (Rycina 24B, D). Średnia powierzchnia mitochondriów w TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} była wyższa po 8 tygodniach diety HF w porównaniu z myszami WT na diecie chow. Nie stwierdzono różnic w powierzchni mitochondriów pomiędzy TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} na diecie chow (Rycina 24B, E).



Rycina 24. Zmiany funkcjonalne mitochondriów w TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. (A) Poziom białek zaangażowanych w przemiany oksydacyjne zachodzące w mitochondriach. OXPHOS - kompleksy łańcucha fosforylacji oksydacyjnej, PGC1α - koaktywator 1α receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma, UCP1 - białko rozprzęgające 1. (B) Reprezentacyjne zdjęcia mitochondriów z mikroskopu elektronowego. Skala na zdjęciach odpowiada długości 500 nm (powiększenie 8000 x). (C) Stosunek sumy długości grzebieni mitochondrialnych do powierzchni mitochondriów. (D) Stosunek liczby grzebieni mitochondrialnych do powierzchni mitochondriów. (E) Średnia powierzchnia mitochondriów. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow; **b** $p < 0,05$ vs WT 8 HF; **c** $p < 0,05$ vs WT 16 HF; **d** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} chow; **e** $p < 0,05$ vs SCD1^{-/-} 8 HF. N=6 myszy/grupę.

W APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą chow stwierdzono wzrost zawartości białek kompleksów I, II i III w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 25A). Podobny wzrost zaobserwowano w przypadku APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 8 tygodni względem myszy WT na diecie HF trwającej 8 tygodni (Rycina 25A). Zawartość białka kompleksu IV była wyższa w APVAT myszy SCD1^{-/-} po 16 tygodniach diety HF w porównaniu do myszy WT na diecie HF trwającej 16 tygodni (Rycina 25A).

Poziom białka PGC1 α był niższy w APVAT myszy SCD1 $^{-/-}$ na diecie chow i HF niż w APVAT myszy WT zarówno na diecie chow, jak i HF (Rycina 25A). Poziom białka UCP1 był wyższy w APVAT myszy SCD1 $^{-/-}$ niż u myszy WT zarówno na diecie chow, jak i HF (Rycina 25A).



Rycina 25. Zmiany funkcjonalne mitochondriów w APVAT myszy WT i SCD1 $^{-/-}$. (A) Poziom białek zaangażowanych w przemiany oksydacyjne zachodzące w mitochondriach. OXPHOS - kompleksy łańcucha fosforylacji oksydacyjnej, PGC1 α - koaktywator 1 α receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma, UCP1 - białko rozprężające 1. (B) Reprezentacyjne zdjęcia mitochondriów z mikroskopu elektronowego. Skala na zdjęciach odpowiada długości 500 nm (powiększenie 8000 x). (C) Stosunek sumy długości grzebieni mitochondrialnych do powierzchni mitochondrialnych. (D) Stosunek liczby grzebieni mitochondrialnych do powierzchni mitochondrialnych. (E) Średnia powierzchnia mitochondrialnych. **a** $p < 0,05$ vs. WT chow; **b** $p < 0,05$ vs WT 8 HF; **c** $p < 0,05$ vs WT 16 HF; **d** $p < 0,05$ vs SCD1 $^{-/-}$ chow; **e** $p < 0,05$ vs SCD1 $^{-/-}$ 8 HF. N=6 myszy/grupę.

Średnia długość i liczba grzebieni mitochondrialnych w APVAT myszy WT na diecie HF była niższa niż w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 25B, C, D). Długość grzebieni mitochondrialnych w APVAT myszy SCD1 $^{-/-}$ karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni była wyższa niż w przypadku myszy WT na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni (Rycina 25B, C, D). W APVAT myszy WT karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni stwierdzono wzrost powierzchni mitochondrialnych w stosunku do APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 25B, E). Największy wzrost powierzchni mitochondrialnych w APVAT myszy WT i SCD1 $^{-/-}$ odnotowano po 8 tygodniach diety HF względem APVAT myszy WT na

diecie chow (Rycina 25B, E). W APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF średnia powierzchnia mitochondriów była mniejsza niż u myszy WT na diecie HF (Rycina 25B, E).

Wyniki te sugerują, że brak SCD1 w PVAT podczas diety HF prowadzi do zwiększenia gęstości grzebieni mitochondrialnych, co związane jest ze zwiększoną zawartością białek OXPHOS i UCP1.

7.13. Różnicowanie makrofagów w PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}

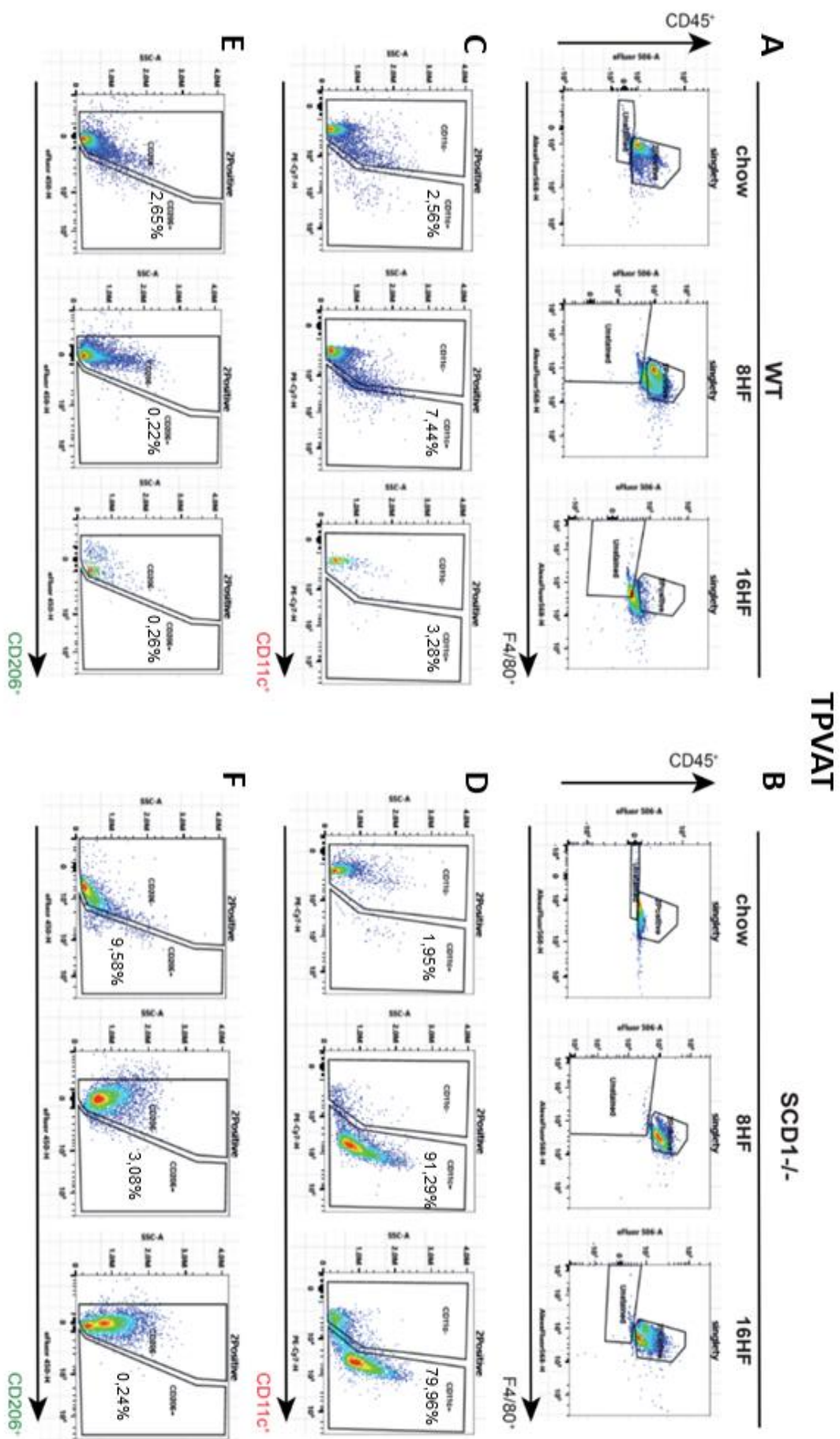
Makrofagi są najliczniej reprezentowaną populacją komórek odporności nieswoistej w tkance tłuszczowej, a ich uproszczona klasyfikacja wyróżnia dwie subpopulacje. Subpopulacja M1 charakteryzuje się ekspresją białka powierzchniowego CD11c oraz fenotypem promującym rozwój stanu zapalnego poprzez wydzielanie dużych ilości cytokin prozapalnych (Weisberg i wsp., 2003). Subpopulacja M2 charakteryzuje się obecnością antygenu CD206 i posiada fenotyp hamujący zapalenie, jednocześnie wykazując właściwości naprawcze poprzez promowanie proliferacji innych komórek (Yunna i wsp., 2020).

W celu określenia poziomu polaryzacji makrofagów M1 i M2 w PVAT, wyizolowano frakcję komórek SVF. Aby zidentyfikować makrofagi, za pomocą cytometrii przepływowej we frakcji tej zidentyfikowano komórki wykazujące ekspresję białek F4/80 i CD45 (Rycina 26A, B). Następnie określono, jaki procent komórek F4/80⁺ CD45⁺ stanowią komórki CD11c⁺ i CD206. W TPVAT myszy WT i SCD1^{-/-} na diecie chow stwierdzono niewielką różnicę w liczbie komórek CD11c⁺ (Rycina 26C, D). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 8 i 16 tygodni liczba komórek CD11c⁺ była wyższa w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie HF (Rycina 26C, D). W TPVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni liczba komórek CD206⁺ była wyższa niż u myszy WT na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni (Rycina 26E, F). Po 16 tygodniach diety HF w TPVAT myszy SCD1^{-/-} liczba komórek CD206⁺ spadła do poziomu porównywalnego z TPVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF (Rycina 26E, F).

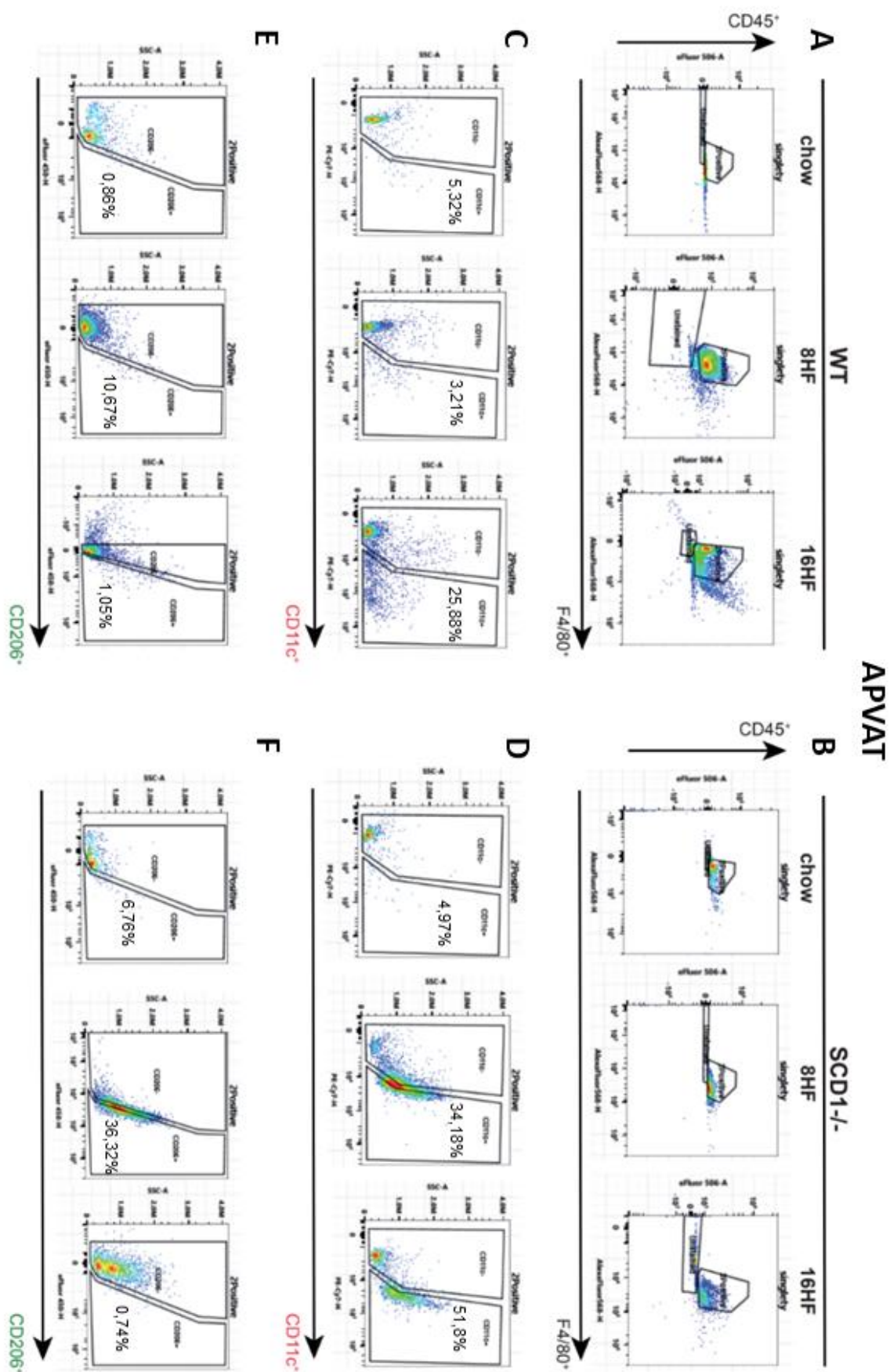
W przypadku SVF wyizolowanej z APVAT zastosowano taką samą strategię identyfikacji populacji makrofagów (Rycina 27A, B). W APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} na diecie chow poziom komórek CD11c⁺ był podobny (Rycina 27C, D). W APVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF stwierdzono wzrost liczby komórek CD11c⁺ w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 27C). Po 8 i 16 tygodniach diety HF w APVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono wzrost ilości komórek CD11c⁺ w porównaniu do myszy WT na diecie HF (Rycina 27 C, D). Komórki CD206⁺ były bardziej licznie w APVAT myszy SCD1^{-/-} na

diecie chow i HF trwającej 8 tygodni niż u myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 27E, F). Po 16 tygodniach diety HF doszło do spadku liczby komórek CD206⁺ w APVAT myszy SCD1-/- do poziomu podobnego jak w APVAT myszy WT na diecie HF trwającej 16 tygodni (Rycina 27E, F).

Wyniki te sugerują, że myszy WT są bardziej odporne na wywołaną dietą prozapalną polaryzację makrofagów w PVAT niż myszy SCD1-/-. Dodatkowo, APVAT myszy WT wykazuje większą podatność na polaryzację makrofagów typu M1 niż TPVAT myszy WT w trakcie karmienia dietą HF. Ponadto, myszy SCD1-/- mają zwiększoną liczbę makrofagów antyzapalnych CD206⁺ na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni niż myszy WT. Efekt ten przestaje być widoczny po 16 tygodniach diety HF.



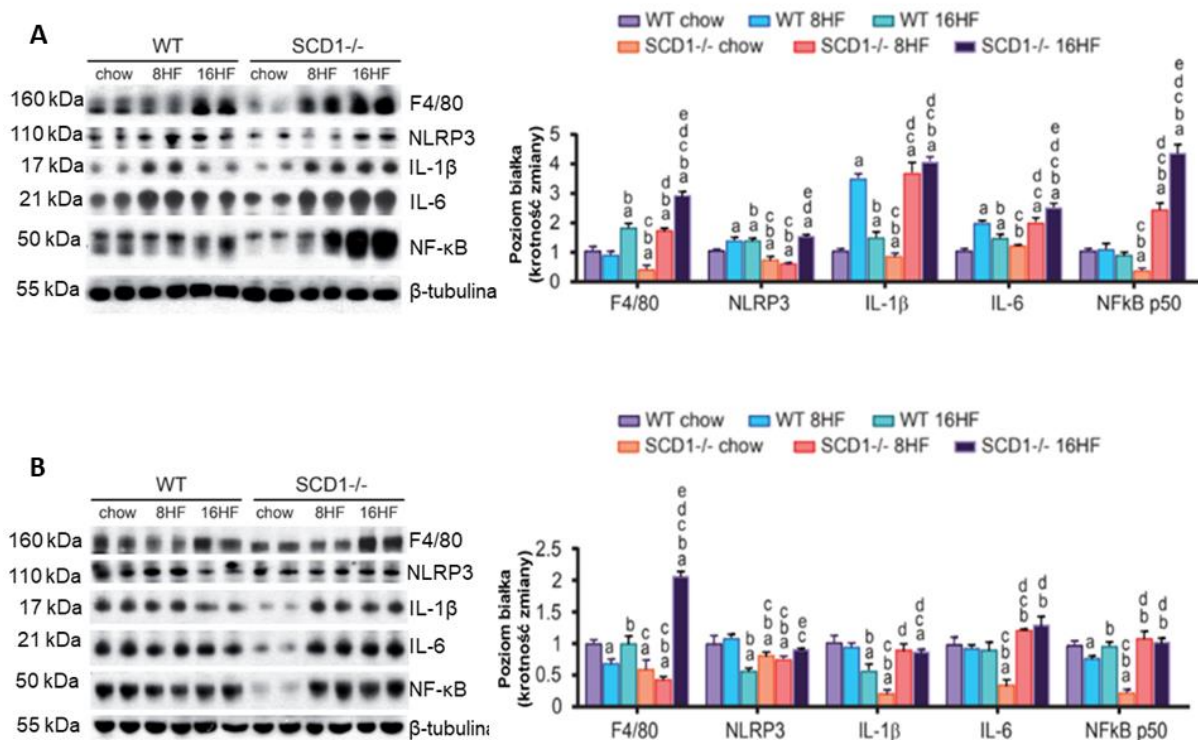
Rycina 26. Poziom polaryzacji makrofagów w TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych dietą chow lub HF przez 8 lub 16 tygodni. (A) komórki CD45⁺ i F4/80⁺ w TPVAT myszy WT. (B) Komórki CD45⁺ i F4/80⁺ w TPVAT myszy SCD1-/. (C) Komórki CD11c⁺ w TPVAT myszy WT. (D) Komórki CD11c⁺ w TPVAT myszy SCD1-/. (E) Komórki CD206⁺ w TPVAT myszy WT. (F) Komórki CD206⁺ w TPVAT myszy SCD1-/. N=6 myszy/grupę.



Rycina 27. Poziom polaryzacji makrofagów w APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} karmionych dietą chow lub HF przez 8 lub 16 tygodni. (A) komórki CD45⁺ i F4/80⁺ w APVAT myszy WT. (B) Komórki CD45⁺ i F4/80⁺ w TPVAT myszy SCD1^{-/-}. (C) Komórki CD11c⁺ w APVAT myszy WT. (D) Komórki CD11c⁺ w APVAT myszy SCD1^{-/-} (E) Komórki CD206⁺ w APVAT myszy WT. (F) Komórki CD206⁺ w APVAT myszy SCD1^{-/-}. N=6 myszy/grupa.

7.14. Poziom markerów stanu zapalnego w PVAT myszy WT i SCD1-/-

Antygen F4/80 jest glikoproteiną obecną na powierzchni makrofagów, dlatego jego zwiększona ilość sugeruje podwyższoną liczbę makrofagów w tkance (Morris i wsp., 1991). Zawartość białka F4/80 była niższa w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow w stosunku do myszy WT na diecie chow (Rycina 28A). Po 8 i 16 tygodniach diety HF poziom F4/80 był wyższy w TPVAT myszy SCD1-/- w porównaniu z TPVAT myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 28A). Inflammasom NLRP3, jest kompleksem enzymatycznym katalizującym dojrzewanie cytokin prozapalnych: IL-1 β i IL-18 (Legrand-Poels i wsp., 2014). Poziom białka NLRP3 był niższy w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni w porównaniu do myszy WT na diecie chow HF (Rycina 28A). Po 16 tygodniach diety HF w TPVAT myszy SCD1-/- odnotowano wzrost poziomu białka NLRP3 w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 28A). Poziom białka IL-1 β był wyższy w TPVAT myszy WT i SCD1-/- karmionych HF w porównaniu z TPVAT myszy WT i SCD1-/- na diecie chow (Rycina 28A). Niemniej jednak, poziom IL-1 β w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow był niższy niż u myszy WT na diecie chow (Rycina 28A). Poziom IL-6 był podwyższony w TPVAT u myszy WT i SCD1-/- na diecie HF w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 28A). Poziom białka IL-6 był również wyższy w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie HF w porównaniu z TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow (Rycina 28A). Poziom IL-6 w TPVAT myszy SCD1-/- był wyższy niż w TPVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF (Rycina 28A). NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym, który aktywuje ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź na stres w różnych typach komórek, jak np. makrofagi lub adipocyty (Griffin 2022). Poziom białka NF- κ B p50 w TPVAT myszy SCD1-/- na diecie chow był niższy niż u myszy WT na diecie chow (Rycina 28A). W wyniku karmienia myszy SCD1-/- dietą HF przez 8 i 16 tygodni, w TPVAT doszło do wzrostu poziomu białka NF- κ B p50 w porównaniu do myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 28A).



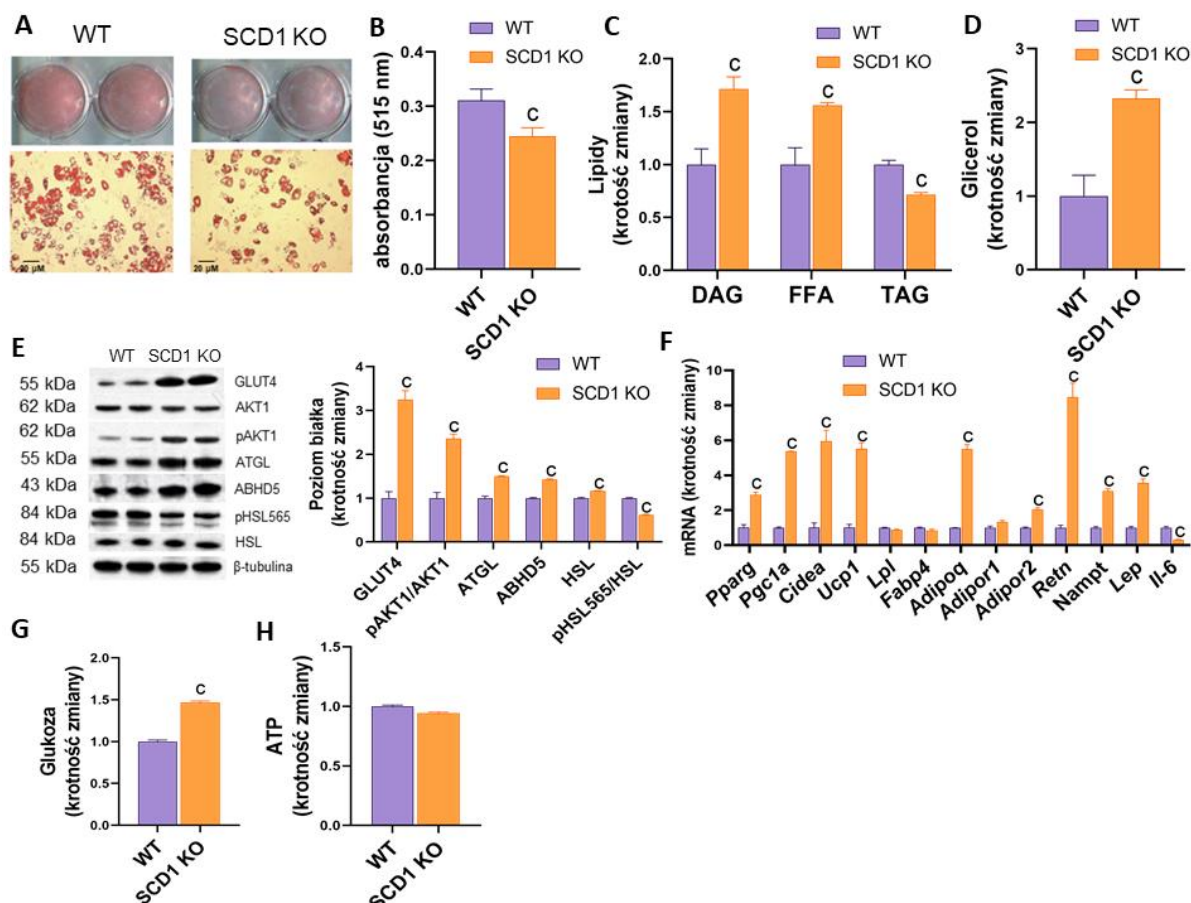
Rycina 28. Poziom białka markerów stanu zapalnego w (A) TPVAT i (B) APVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. IL-1β - interleukina-1β, IL-6 - interleukina 6, NF-κB - jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa aktywowanych, komórek B, NLRP3 - receptor nod-podobny rodziny 3 zawierający domenę pirynową. **a** $p < 0.05$ vs. WT chow; **b** $p < 0.05$ vs. WT 8HF; **c** $p < 0.05$ vs. WT 16HF; **d** $p < 0.05$ vs. SCD1^{-/-} chow; **e** $p < 0.05$ vs. SCD1^{-/-} 8HF. N=6 myszy/grupę.

W APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni zaobserwowano spadek poziomu białka F4/80 w stosunku do APVAT myszy WT na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni (Rycina 28B). Niemniej jednak, w wyniku karmienia myszy SCD1^{-/-} dietą HF przez 16 tygodni, w APVAT doszło do wzrostu poziomu F4/80 w stosunku do myszy WT na diecie chow i HF (Rycina 28B). Poziom białka NLRP3 w APVAT myszy SCD1^{-/-} był niższy niż u myszy WT na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni (Rycina 28B). Poziom białka NLRP3 był wyższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} karmionych dietą HF przez 16 tygodni w porównaniu do myszy WT na diecie HF trwającej 16 tygodni (Rycina 28B). Poziom białka IL-β był wyższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} niż w APVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF (Rycina 28B). W APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie chow stwierdzono spadek poziomu białka IL-6 w porównaniu do myszy WT na diecie chow (Rycina 28B). Poziom białka IL-6 był wyższy w APVAT myszy SCD1^{-/-} na diecie HF trwającej 8 i 16 tygodni niż u myszy WT na analogicznych dietach (Rycina 28B). Poziom białka NF-κB p50 w APVAT myszy SCD1^{-/-} był niższy niż w APVAT myszy WT na diecie chow (Rycina 28B).

Przedstawione wyniki wykazują, że wyciszenie SCD1 prowadzi do podwyższenia poziomu markerów stanu zapalnego w TPVAT i APVAT w warunkach diety HF.

7.15. Wpływ braku SCD1 na metabolizm okołonaczyniowych adipocytów *in vitro*

W celu określenia wpływu SCD1 na metabolizm okołonaczyniowych adipocytów wyizolowano SVF z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. Następnie przeprowadzono ich różnicowanie w kierunku adipocytów. W niniejszej pracy okołonaczyniowe adipocyty uzyskane z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 oznaczone są jako SCD1 KO. Zdolność do akumulacji TAG w komórkach określono za pomocą barwienia czerwienią oleistą. Stwierdzono, że komórki wyizolowane z PVAT myszy SCD1^{-/-} charakteryzują się słabszym wybarwieniem czerwienią oleistą w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT, co sugeruje zredukowaną zdolność do akumulacji TAG (Rycina 29A, B). Rozdział chromatograficzny frakcji lipidowej wyizolowanej ze zróżnicowanych adipocytów potwierdził zredukowaną ilość TAG w komórkach z wyciszeniem SCD1 w porównaniu do komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT, przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu DAG i FFA (Rycina 29C). Adipocyty z brakiem ekspresji SCD1 wydzielają większą niż komórki wyizolowane z PVAT myszy WT, ilość glicerolu, będącego końcowym produktem lipolizy (Rycina 29D). Poziom białka ATGL i jej aktywatora ABHD5 był wyższy w komórkach z wyciszeniem SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 29E). Poziom białka HSL był wyższy w komórkach z brakiem SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT, natomiast poziom fosforylacji hamującej aktywność HSL na serynie 565 był niższy w komórkach z wyciszeniem SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 29E). Wyniki te sugerują aktywację lipolizy w komórkach z brakiem SCD1 w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT.



Rycina 29. Metabolizm lipidów i glukozy w okolonaczyniowych adipocytach WT i SCD1 KO. (A) Reprezentacyjne zdjęcia adipocytów zróżnicowanych *in vitro* i wybarwionych za pomocą czerwieni oleistej (powiększenie 200 x). (B) Stopień wybarwienia lipidów czerwienią oleistą w komórkach. (C) Rozdział chromatograficzny lipidów. (D) Stężenie glicerolu wydzielanego do medium hodowlanego przez komórki. (E) Poziom białek metabolizmu glukozy i lipolizy. (F) Analiza RT-qPCR markerów adipocytów i wybranych adipokiny. (G) Poziom transportu glukozy do wnętrza komórek (H) Poziom ATP w adipocytach. ABHD5 - białko zawierające domenę α/β -hydrolazy 5, *Adipoq* - gen kodujący adiponektynę, *Adipor1/2* - gen kodujący receptor adiponektyny 1/2, AKT1 - kinaza białkowa B, ATGL - swoista dla adipocytów lipaza triglicerydowa, *Cidea* - gen kodujący efektor A podjednostki alfa czynnika fragmentacji DNA indukującego śmierć komórki, *Fabp4* - gen kodujący białko wiążące kwasy tłuszczowe 4, GLUT4 - transporter glukozy 4, HSL - lipaza wrażliwa na hormony, *Il-6* - gen kodujący interleukinę 6, *Lep* - gen kodujący leptynę, *Lpl* - gen kodujący lipazę lipoproteinową *Nampt* - gen kodujący wisfatynę, *Pgc1a* - gen kodujący koaktywator 1 alfa receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma, *Pparg* - gen kodujący receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma, *Retn* - gen kodujący rezystynę, *Ucp1* - gen kodujący białko rozprężające 1. c $p < 0,05$ vs WT. N=3 niezależne eksperymenty.

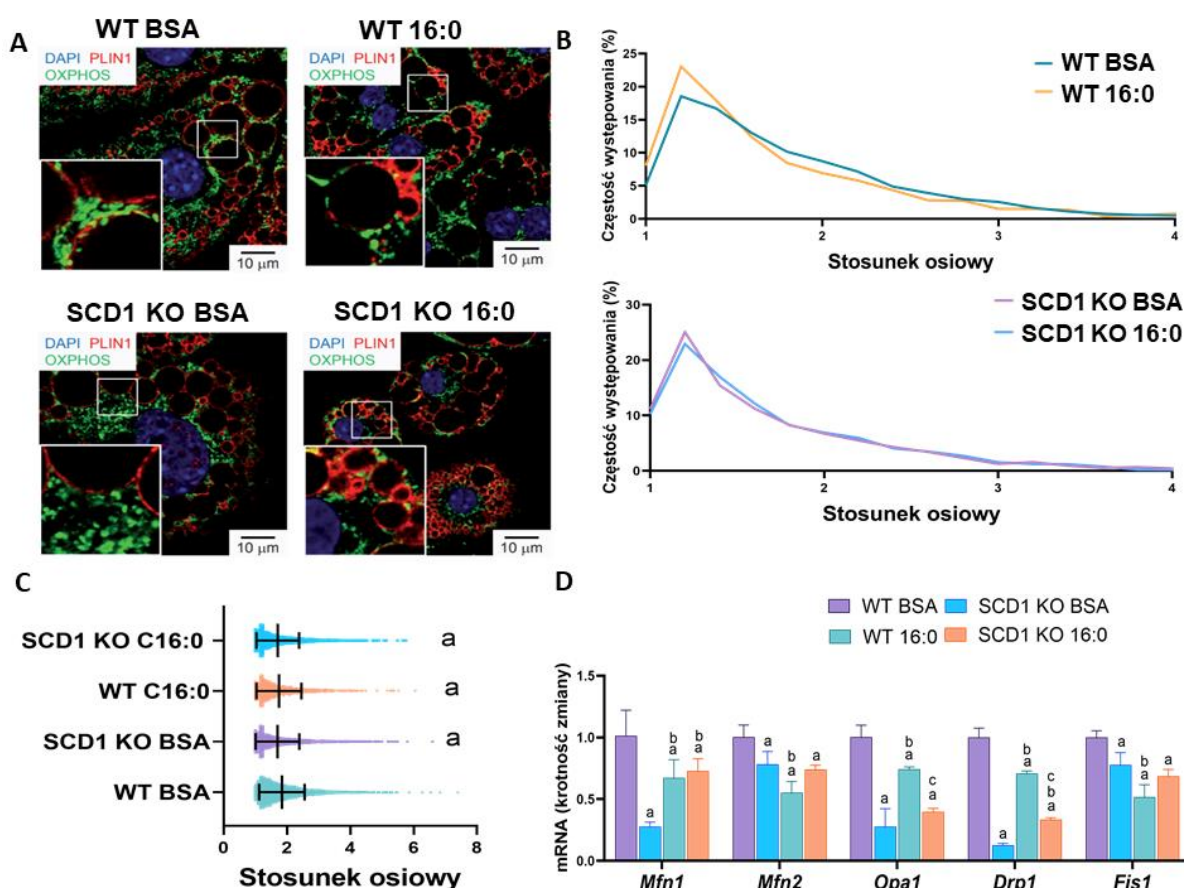
Poziom mRNA genów, które są markerami brunatnych adipocytów, tj. *Pparg*, *Pgc1a*, *Cidea* i *Ucp1*, był wyższy w komórkach z wyciszonym SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 29F). Poziom mRNA genów *Lpl* i *Fabp4* nie różnił się między adipocytami wyizolowanymi z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} (Rycina 29F). Poziom mRNA kodujących adiponektynę, rezystynę, wisfatynę i leptynę był wyższy w adipocytach z brakiem ekspresji SCD1 niż w adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 29F). Adipocyty z wyciszeniem SCD1 wykazywały niższy poziom mRNA kodującego IL-6 niż adipocyty wyizolowane z PVAT myszy WT (Rycina 29F). Poziom

mRNA receptora adiponektyny 2 (ang. adiponectin receptor 2, *Adipor2*) był wyższy w adipocytach z brakiem ekspresji SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT, natomiast poziom mRNA *Adipor1* był na takim samym poziomie w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} (Rycina 29F). Transport glukozy do wnętrza komórki był wyższy w adipocytach z unieczynnieniem SCD1 w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT (Rycina 29G), a ilość produkowanego ATP nie różniła się między komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} (Rycina 29H). Poziom białka transportera GLUT4 oraz fosforylacja kinazy AKT1 były wyższe w komórkach z brakiem ekspresji SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT, co sugeruje aktywację szlaku insulinowego (Rycina 29E). Przedstawione dane sugerują, że unieczynnienie SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach prowadzi do zwiększonej lipolizy, oraz aktywacji metabolizmu glukozy. Dodatkowo, okołonaczyniowe adipocyty z wyciszonym SCD1 wykazują wyższą ekspresję genów będących markerami brunatnych adipocytów.

7.16. Wpływ kwasu palmitynowego na dynamikę mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach

Jednym z mechanizmów lipotoksyczności wywołanej przez kwas C16:0 jest upośledzenie funkcji mitochondriów (Belosludtsev i wsp., 2006; Raja i wsp., 2022). W celu określenia roli SCD1 w odpowiedzi mitochondriów na kwas C16:0, okołonaczyniowe adipocyty wyizolowane z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} zostały potraktowane kwasem C16:0 o stężeniu 500 μ M. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej określono poziom fragmentacji sieci mitochondrialnej w okołonaczyniowych adipocytach. Dla każdego zidentyfikowanego mitochondrium wyliczona została wartość stosunku osiowego, który odzwierciedla kulistość mitochondriów w taki sposób, że stosunek osiowy = 1 oznacza kształt kuli. Każda wyższa wartość stosunku osiowego wskazuje na bardziej wydłużony kształt mitochondrium. Im wyższa jest wartość stosunku osiowego, tym odpowiada ona bardziej wydłużonemu kształtowi. Komórki wyizolowane z PVAT myszy WT potraktowane kwasem C16:0 wykazywały wyższy poziom fragmentacji mitochondriów (niższe wartości stosunku osiowego) niż komórki kontrolne wyizolowane z PVAT myszy WT (Rycina 30A, B, C). Komórki z wyciszeniem SCD1 traktowane kwasem C16:0 wykazywały taki sam poziom fragmentacji mitochondriów co komórki kontrolne SCD1 KO (Rycina 30B, C). Komórki wyizolowane z PVAT myszy WT traktowane kwasem C16:0 charakteryzowały się podobnym

poziomem fragmentacji mitochondriów jak komórki kontrolne z wyciszeniem SCD1 i komórki z brakiem SCD1 traktowane kwasem C16:0 (Rycina 30B, C). Wyniki te pokazują, że kwas C16:0 zwiększa poziom fragmentacji mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy WT, lecz nie w okołonaczyniowych adipocytach z brakiem ekspresji SCD1.



Rycina 30. Wpływ kwasu palmitynowego (16:0) na morfologię mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach WT i SCD1 KO. (A) Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego wybarwione DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), PLIN1 - perylipina 1 i OXPHOS - kompleksy fosforylacji oksydacyjnej (powiększenie 1000 x). (B) Rozkład wartości stosunku osiowego. (C) Średnie wartości stosunku osiowego. (D) Poziom mRNA genów fuzji i fizji mitochondriów. *Drp1* - białko pokrewne dynaminy 1, *Fis1* - białko fizji mitochondriów 1, *Mfn1/2* - mitofuzyna 1/2, *Opa1* - białko atrofii optycznej 1. **a** $p < 0,05$ vs WT BSA, **b** $p < 0,05$ vs WT C16:0, **c** $p < 0,05$ vs SCD1 KO BSA. N=3 niezależne eksperymenty.

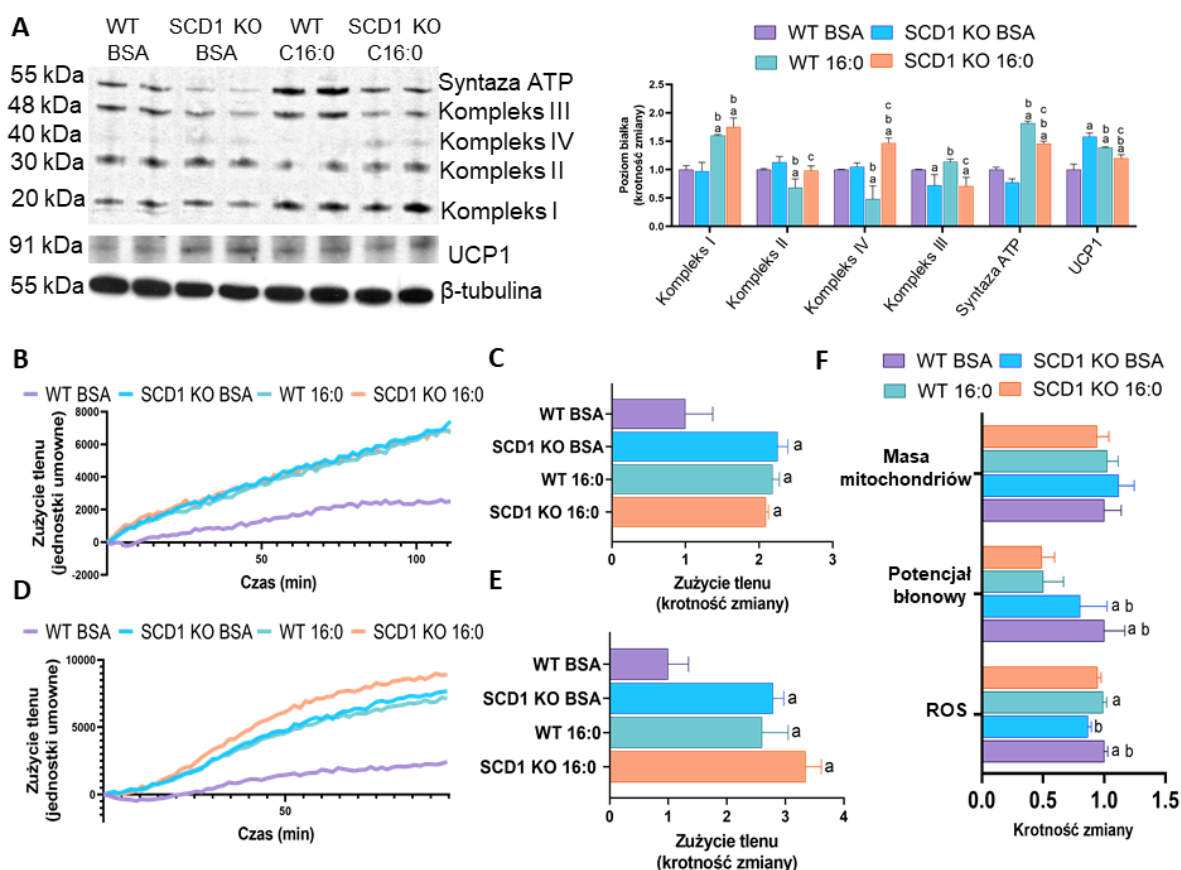
Zmiany w poziomie fragmentacji mitochondriów sugerują zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces fuzji i fizji mitochondriów. W wyniku traktowania komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT kwasem C16:0 stwierdzono obniżony poziom mRNA genów mitofuzyny 1 i 2 (ang. mitofusin 1/2, *Mfn1/2*) w porównaniu z kontrolnymi komórkami WT (Rycina 30D). Geny te kodują białka odpowiedzialne za fuzję mitochondriów (Lin i wsp., 2022). Poziom mRNA genów *Mfn1* i *Mfn2* był niższy w komórkach kontrolnych z wyciszeniem SCD1 i z wyciszeniem SCD1 traktowanych

kwasem C16:0 niż w komórkach kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 30D). mRNA genu kodującego białko atrofii optycznej (ang. optic atrophy 1, *Opa1*), biorącego udział w fuzji mitochondriów był niższy w komórkach kontrolnych z wyciszeniem SCD1 niż w komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 (Rycina 30D). Poziom mRNA genu kodującego białko pokrewne dynaminy (ang. dynamin-related protein 1, *Drp1*) odpowiedzialnego za fizję mitochondriów był niższy w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT traktowanych kwasem C16:0 niż w komórkach kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} (Rycina 30D). Poziom ekspresji *Opa1* i *Drp1* w komórkach z wyciszeniem SCD1 traktowanych kwasem C16:0 był wyższy niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT traktowanych kwasem C16:0 (Rycina 30D). Poziom mRNA genu kodującego białko fizji mitochondriów (ang. fission protein 1, *Fis1*) był niższy w komórkach WT traktowanych kwasem palmitynowym niż w kontrolnych komórkach WT (Rycina 30D). Zarówno w komórkach z brakiem ekspresji SCD1 traktowanych kwasem C16:0, jak i w komórkach kontrolnych z wyciszeniem SCD1, poziom mRNA *Fis1* był niższy niż w komórkach kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 30D). Przedstawione wyniki wskazują, że zarówno traktowanie komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT kwasem C16:0, jak i wyciszenie ekspresji SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach, prowadzi do zwiększonego poziomu fragmentacji mitochondriów. Obserwowane zmiany związane są ze zmianami w ekspresji genów fizji i fuzji mitochondriów.

7.17. Wpływ kwasu palmitynowego na funkcję oddechową mitochondriów w okołonaczyniowych adipocytach

Fragmentacja mitochondriów jest pozytywnie skorelowana z intensywnością oddychania komórkowego (Yu et al. 2006; Ngo i wsp., 2023). W celu zweryfikowania, czy zwiększona fragmentacja mitochondriów w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} oraz WT w wyniku traktowania kwasem C16:0 jest związana z intensyfikacją oddychania komórkowego, dokonano pomiaru zawartości białka kompleksów OXPHOS oraz UCP1. W komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 zawartość białek kompleksów I, II i IV była podobna jak w komórkach kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 31A). Zawartość białka kompleksu III była niższa w komórkach kontrolnych z wyciszeniem SCD1 względem komórek kontrolnych WT (Rycina 31A). W komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 stwierdzono natomiast wzrost poziomu białka UCP1

w porównaniu z komórkami kontrolnymi wyizolowanymi z PVAT myszy WT (Rycina 31A). W przypadku adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} traktowanych kwasem C16:0 stwierdzono wzrost poziomu białka kompleksu I, syntazy ATP oraz UCP1 w stosunku do kontrolnych adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 31A).



Rycina 31. Wpływ kwasu palmitynowego na funkcję oddechową mitochondriów w okolonaczyniowych adipocytach WT i SCD1 KO. (A) Poziom białka kompleksów fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) i białka rozprężającego 1 (UCP1) w adipocytach. (B, C) Tempo zużycia tlenu w warunkach podstawowych. (D, E) Maksymalna zużycie tlenu stymulowane FCCP - fluorokarboksylowy cykliczny ester fosforanu. (F) Poziom produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), potencjał błonowy i masa mitochondriów. **a** $p < 0,05$ vs WT BSA, **b** $p < 0,05$ vs WT 16:0, **c** $p < 0,05$ vs SCD1 KO BSA. N=3 niezależne eksperymenty.

Tempo zużycia tlenu w adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} traktowanych kwasem C16:0 oraz w kontrolnych adipocytach z wyciszeniem SCD1, było wyższe niż w adipocytach kontrolnych WT (Rycina 31B, C). W celu określenia maksymalnej zdolności respiracyjnej, potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej został rozproszony poprzez potraktowanie komórek fluorokarboksylowym cyklicznym estrem kwasu fosforowego (ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazide, FCCP). Maksymalny potencjał oddechowy był wyższy w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT traktowanych kwasem C16:0 niż w komórkach kontrolnych wyizolowanych z PVAT

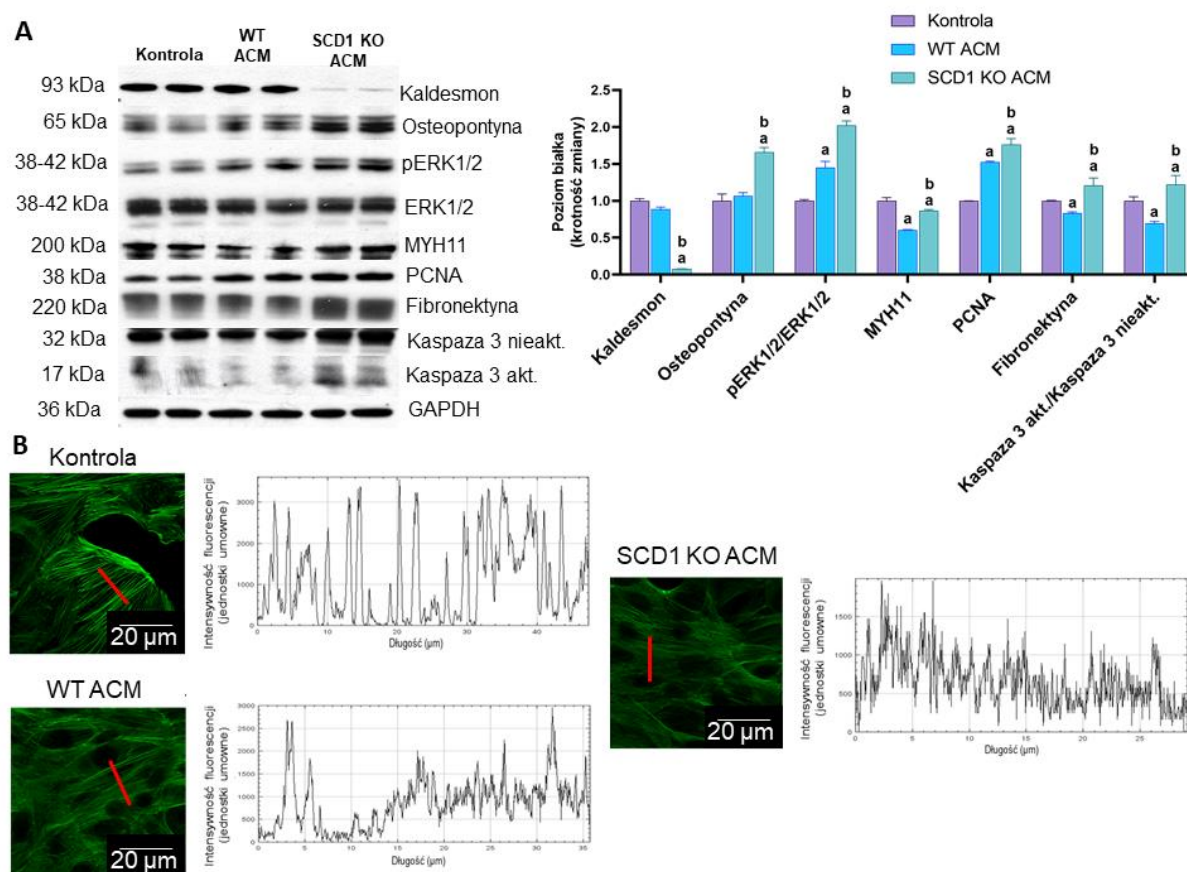
myszy WT (Rycina 31D, E). Zarówno komórki kontrolne z wyciszeniem SCD1 oraz komórki z brakiem ekspresji SCD1 traktowane kwasem C16:0 wykazywały podobny poziom maksymalnej zdolności respiracyjnej co komórki wyizolowane z PVAT myszy WT traktowane kwasem C16:0 (Rycina 31D, E). Komórki kontrolne z brakiem ekspresji SCD1 wykazywały niższy stopień produkcji ROS niż komórki kontrolne wyizolowane z PVAT myszy WT (Rycina 31F). Traktowanie komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} kwasem C16:0, podniosło produkcję ROS względem odpowiednio: komórek kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT i komórek kontrolnych z unieczynnieniem SCD1 (Rycina 31F). Potencjał w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej był podobny w przypadku komórek kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}, natomiast traktowanie tych komórek kwasem C16:0 spowodowało obniżenie potencjału błonowego (Rycina 31F). Traktowanie adipocytów kwasem C16:0 nie wpłynęło na masę mitochondriów w adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} (Rycina 31F). Na podstawie przedstawionych powyżej wyników można wnioskować, że traktowanie kwasem C16:0 komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT prowadzi do aktywacji ich mitochondriów i intensyfikacji oddychania komórkowego w stopniu podobnym do obserwowanego w kontrolnych komórkach z wyciszeniem SCD1. Dodatkowo, adipocyty z brakiem ekspresji SCD1 traktowane kwasem C16:0, nie wykazywały zmian w dynamice mitochondriów oraz w oddychaniu komórkowym.

7.18. Wpływ medium ACM na fenotyp VSMC

VSMC stanowią główny typ komórek wchodzących w skład środkowej ściany tętnicy. Badania nad okołonaczyniową tkanką tłuszczową wykazały, że zmiany w metabolizmie adipocytów PVAT mogą wpływać na funkcjonowanie VSMC, m.in. poprzez lokalnie wydzielane cytokiny i adipokiny (Chang i wsp., 2020). W celu określenia wpływu SCD1 na interakcję okołonaczyniowych adipocytów z VSMC, zebrano medium pochodzące z okolonaczyniowych adipocytów WT i SCD1 KO, zróżnicowanych *in vitro*, i uzupełniono nim pożywkę szczyrzej linii VSMC: komórek A7r5. Po inkubacji komórek A7r5 z medium z okolonaczyniowych adipocytów określono poziom markerów fenotypu VSMC.

Kaldesmon jest białkiem wiążącym aktynę, które bierze udział w skurczu VSMC poprzez oddziaływanie z miozyną, tropomiozyną i kalmoduliną (Wang 2001). Kaldesmon jest markerem kurczliwego fenotypu VSMC i w trakcie przejścia w fenotyp syntetyczny ulega szybkiej degradacji (Glukhova i wsp., 1988; Jiang i wsp., 2010). Traktowanie VSMC medium

znad adipocytów WT (ang. WT adipocyte-conditioned medium, WT ACM) nie spowodowało zmian w poziomie białka kaldesmonu w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 32A). Silny spadek poziomu białka kaldesmonu został natomiast zaobserwowany w przypadku VSMC traktowanych medium ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-}. (Rycina 32A). Poziom białka osteopontyny jest podwyższony w VSMC o fenotypie syntetycznym i promuje migrację i proliferację tych komórek (Qiu et al., 2012; Liu i wsp., 2014; Jiang i wsp., 2014). Traktowanie VSMC za pomocą ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT nie spowodowało zmian w poziomie białka osteopontyny w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 32A). Poziom białka osteopontyny w komórkach traktowanych za pomocą ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} był wyższy niż w komórkach kontrolnych (Rycina 32A).



Rycina 32. Zmiany fenotypu komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC) w odpowiedzi na traktowanie medium pochodzącym z adipocytów WT lub SCD1 KO. (A) Poziom białek, które są wskaźnikami fenotypu VSMC. ERK1/2 - kinaza regulowana przez sygnał zewnątrzkomórkowy, GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, MYH11 - ciężki łańcuch miozyny 11, PCNA - jądrowy antygen komórek proliferujących. (B) Organizacja filamentów aktynowych w VSMC traktowanych WT ACM lub SCD1 KO ACM. Czerwone linie reprezentują miejsce przekroju poprzecznego komórki, w którym dokonano pomiaru fluorescencji (powiększenie 1000 x). a p<0,05 vs kontrola, b p<0,05 vs WT ACM. N=3 niezależne eksperymenty.

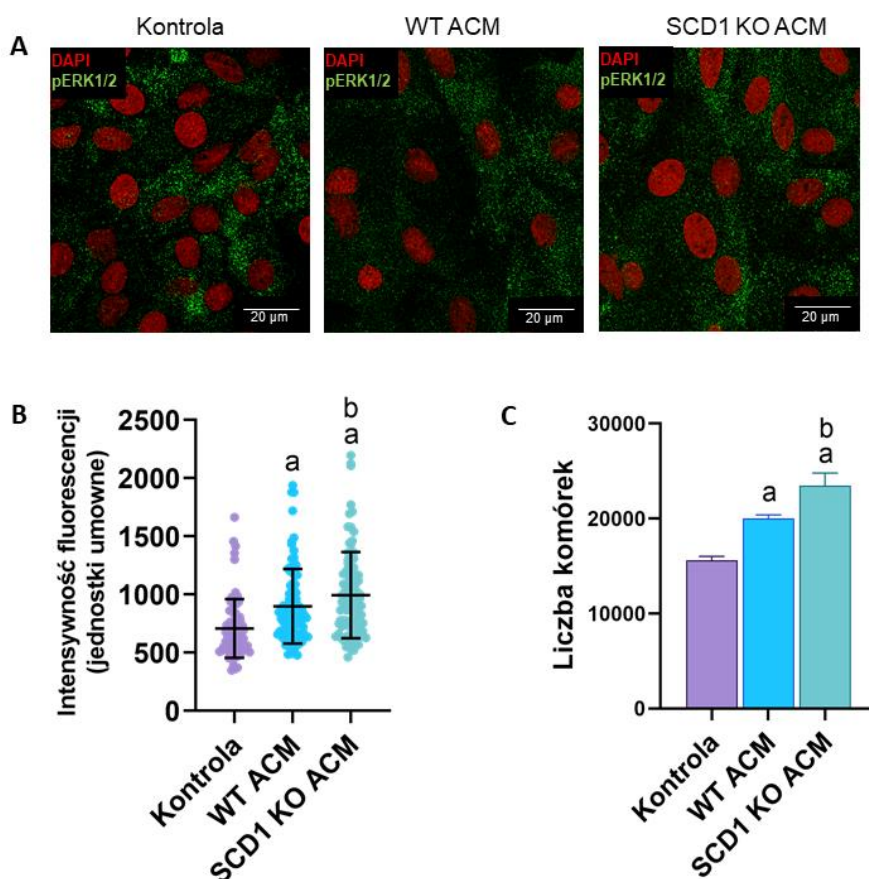
Kinaza regulowana przez sygnał zewnątrzkomórkowy (ang. extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) jest kinazą białkową należącą do szlaku sygnałowego Ras/Raf/MEK/ERK (Touyz, 2001). Fosforylacja ERK1/2 skutkuje aktywacją migracji oraz progresją cyklu komórkowego w VSMC (Touyz i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2003). Traktowanie VSMC za pomocą ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- spowodowało wzrost fosforylacji ERK1/2 w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 32A). Poziom fosforylacji ERK1/2 w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- był wyższy niż w komórkach kontrolnych oraz w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 32A). Ciężki łańcuch miozyny 11 (ang. myosin heavy chain 11, MYH11) jest białkiem charakterystycznym dla kurczliwego fenotypu VSMC, utrzymującym integralność ściany tętnic. Mutacje w genie MYH11 prowadzą do hiperplazji VSMC i promocji fenotypu syntetycznego (Zhu i wsp., 2006; Pannu i wsp., 2007). W wyniku traktowania VSMC ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT oraz ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- poziom białka MYH11 spadł w stosunku do komórek kontrolnych, przy czym większy spadek stwierdzono w przypadku ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 32A). Jądrowy antygen komórek proliferujących (ang. proliferating cell nuclear antigen, PCNA) bierze udział w syntezie DNA podczas fazy S cyklu komórkowego. Jego poziom wzrasta w VSMC które podlegają aktywnej proliferacji (Zhao i wsp., 2013). Traktowanie komórek A7r5 WT ACM spowodowało wzrost poziomu PCNA w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 32A). W VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- poziom białka PCNA był wyższy niż w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT oraz niż w komórkach kontrolnych (Rycina 32A). Fibronektyna jest białkiem macierzy pozakomórkowej i markerem syntetycznego fenotypu VSMC, promującym ich migrację i proliferację (Barillari i wsp., 2001). Poziom białka fibronektyny był niższy w komórkach A7r5 traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT w porównaniu z komórkami kontrolnymi, natomiast w przypadku komórek traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- stwierdzono wzrost poziomu białka fibronektyny względem komórek kontrolnych (Rycina 32A). Kaspaza 3 jest enzymem aktywowanym proteolitycznie w procesie apoptozy (Geng i wsp., 1998). Aktywacja kaspazy 3 w komórkach o fenotypie VSMC znajdujących się wewnątrz płytki miażdżycowej związana jest z jej zmniejszoną stabilnością oraz ze zwiększonym ryzykiem okluzji światła tętnicy (Geng i wsp., 1998). W komórkach A7r5

traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT, poziom aktywnej kaspazy 3 był niższy niż w komórkach kontrolnych (Rycina 32A). W przypadku komórek traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-}, poziom aktywnej kaspazy 3 był wyższy niż w komórkach kontrolnych i traktowanych WT ACM (Rycina 32A). Analiza intensywności fluorescencji przekrojów poprzecznych komórek kontrolnych wykazała, że komórki te wykazują regularnie rozmieszczone maksima. Taki rozkład intensywności fluorescencji świadczy o równoległym rozmieszczeniu filamentów aktynowych w komórce. (Rycina 32B). Traktowanie komórek A7r5 zarówno przez ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT, jak i przez ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} prowadzi do zaniku regularności występowania maksimów intensywności fluorescencji, co może świadczyć o dezorganizacji filamentów aktynowych (Rycina 32B). Przedstawione dane sugerują, że traktowanie komórek A7r5 ACM prowadzi do nabycia przez te komórki fenotypu syntetycznego, jednak efekt ten jest wyraźniejszy w przypadku ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-}. Zmiany te mogą mieć wpływ na zdolność skurczu komórek A7r5.

7.19. Wpływ medium ACM na migrację i proliferację VSMC

Traktowanie VSMC ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} spowodowało zwiększenie poziomu fosforylacji kinaz ERK1/2 w większym stopniu niż w przypadku VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 32A). ERK1/2 jest istotnym czynnikiem aktywującym migrację oraz proliferację VSMC. W wyniku aktywacji, ERK1/2 migruje do jądra komórkowego, gdzie reguluje aktywność określonych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego, apoptozy i zapalenia (Roskoski 2012). W celu określenia, czy podwyższony poziom fosforylacji ERK1/2 skutkuje zwiększonym poziomem migracji tych kinaz do jądra komórkowego, zmierzono poziom ufosforylowanej formy ERK1/2 w VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} (Rycina 33A). Traktowanie VSMC za pomocą ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} prowadziło do zwiększenia poziomu translokacji fosfo-ERK1/2 do jądra komórkowego w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 33A, B). Poziom lokalizacji jądrowej ufosforylowanej formy ERK1/2 w przypadku VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} był wyższy

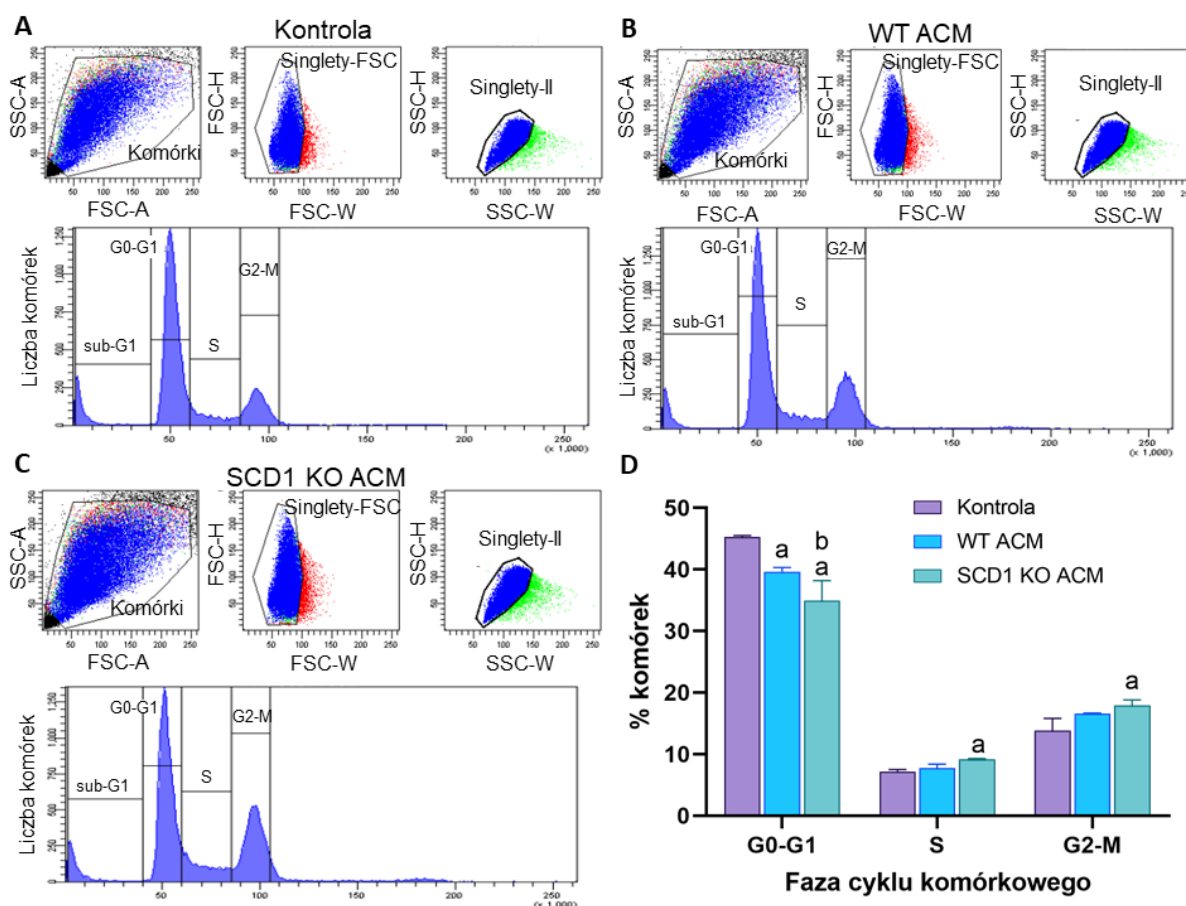
niż w przypadku VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 33A, B). VSMC traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} migrowały szybciej niż komórki kontrolne (Rycina 33C). Komórki traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} wykazywały natomiast wyższe tempo migracji niż komórki traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 33C).



Rycina 33. Wpływ traktowania VSMC medium pochodzonym z adipocytów WT lub SCD1 KO na translokację ERK1/2 do jądra komórkowego oraz na zdolność VSMC do migracji. (A) Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Kolor czerwony: jądra komórkowe, kolor zielony: fosfo-ERK1/2 (powiększenie 1000 x). (B) Intensywność fluorescencji pochodzącej od ufosforylowanej formy kinazy regulowanej przez sygnał zewnątrzkomórkowy (ERK1/2) w obrębie jąder komórkowych VSMC w odpowiedzi na traktowanie WT ACM lub SCD1 KO ACM. (C) Test migracji VSMC w odpowiedzi na traktowanie WT lub SCD1 KO ACM. **a** $p < 0,05$ vs kontrola, **b** $p < 0,05$ vs WT ACM. N=3 niezależne eksperymenty.

W celu analizy tempa proliferacji VSMC w odpowiedzi na traktowanie ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}, wykonano test faz cyklu komórkowego z użyciem cytometrii przepływowej. DNA komórek został wybarwiony jodkiem propidyny. W celu wyizolowania populacji komórek o prawidłowej morfologii za pomocą wykresu rozproszenia do przodu (ang. forward scatter, FSC) vs. wykresu

rozproszenia w bok (ang. side scatter, SSC) wybrano żywe komórki, odrzucając zanieczyszczenia i fragmenty komórkowe. Liniową zależność pomiędzy całkowitym sygnałem fluorescencji a wysokością maksimów fluorescencji wykorzystano do odrzucenia dupletów oraz innych agregatów komórkowych. Populacje komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zostały określone na podstawie charakterystycznych maksimów fluorescencji, odpowiadających fazom G0-G1, S i G2-M (Rycina 34A, B, C).



Rycina 34. Analiza faz cyklu komórkowego VSMC w odpowiedzi na traktowanie ACM znad okolonaczyniowych adipocytów WT lub SCD1 KO. (A) Strategia bramkowania oraz profil faz cyklu komórkowego w komórkach kontrolnych. (B) Strategia bramkowania oraz profil faz cyklu komórkowego w komórkach traktowanych WT ACM. (C) Strategia bramkowania oraz profil faz cyklu komórkowego w komórkach traktowanych SCD1- KO ACM. (D) Udział procentowy komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. FSC - rozproszenie do przodu, SSC - rozproszenie w bok. **a** $p < 0,05$ vs kontrola, **b** $p < 0,05$ vs WT ACM. N=3 niezależne eksperymenty.

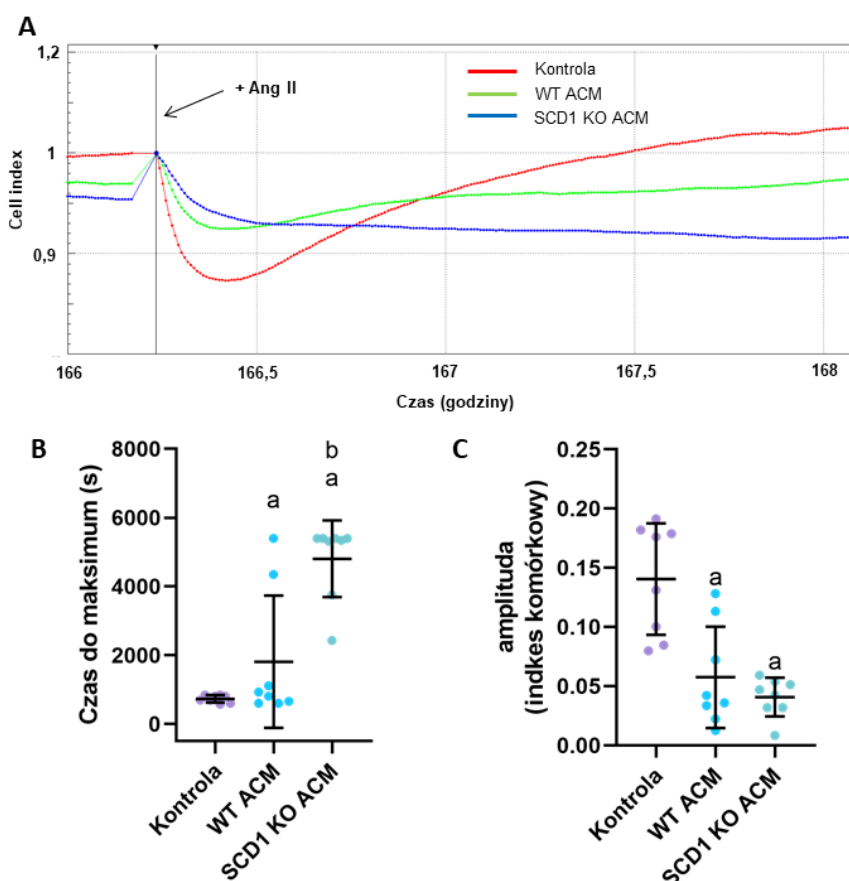
Wykazano, że traktowanie VSMC ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- prowadzi do zmniejszenia liczby komórek w fazie G0-G1 cyklu komórkowego w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 34D). Liczba komórek w fazie G0-G1 była niższa w wyniku traktowania komórek ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1-/- niż w wyniku traktowania ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy

WT (Rycina 34D). Liczba komórek w fazie S i G2-M wzrosła w stosunku do komórek kontrolnych jedynie w przypadku VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} (Rycina 34D).

Przedstawione wyniki wskazują, że wyciszenie SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach prowadzi do zwiększonej migracji i proliferacji VSMC w warunkach *in vitro*.

7.20. Wpływ medium ACM na zdolność VSMC do skurczu

Do określenia zmian zdolności skurczu VSMC w wyniku traktowania ACM wykorzystano urządzenie Agilent xCELLigence RTCA CardioECR System. Skurcz VSMC został wywołany poprzez dodanie 1 μ M angiotensyny II (ang. angiotensin II, AngII) (Rycina 35A). Komórki traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} charakteryzowały się zmniejszoną zdolnością do skurczu w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 35A). Amplituda skurczu VSMC była niższa w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 35B). Czas do osiągnięcia maksymalnego skurczu w VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} był dłuższy niż w komórkach kontrolnych (Rycina 35C). W VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-}, czas do osiągnięcia maksymalnego skurczu był dłuższy niż w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 35C). Przedstawione dane wskazują, że czynniki wydzielane przez okołonaczyniowe adipocyty upośledzają zdolność skurczu VSMC, przy czym unieczynnienie SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach zwiększa ten efekt.



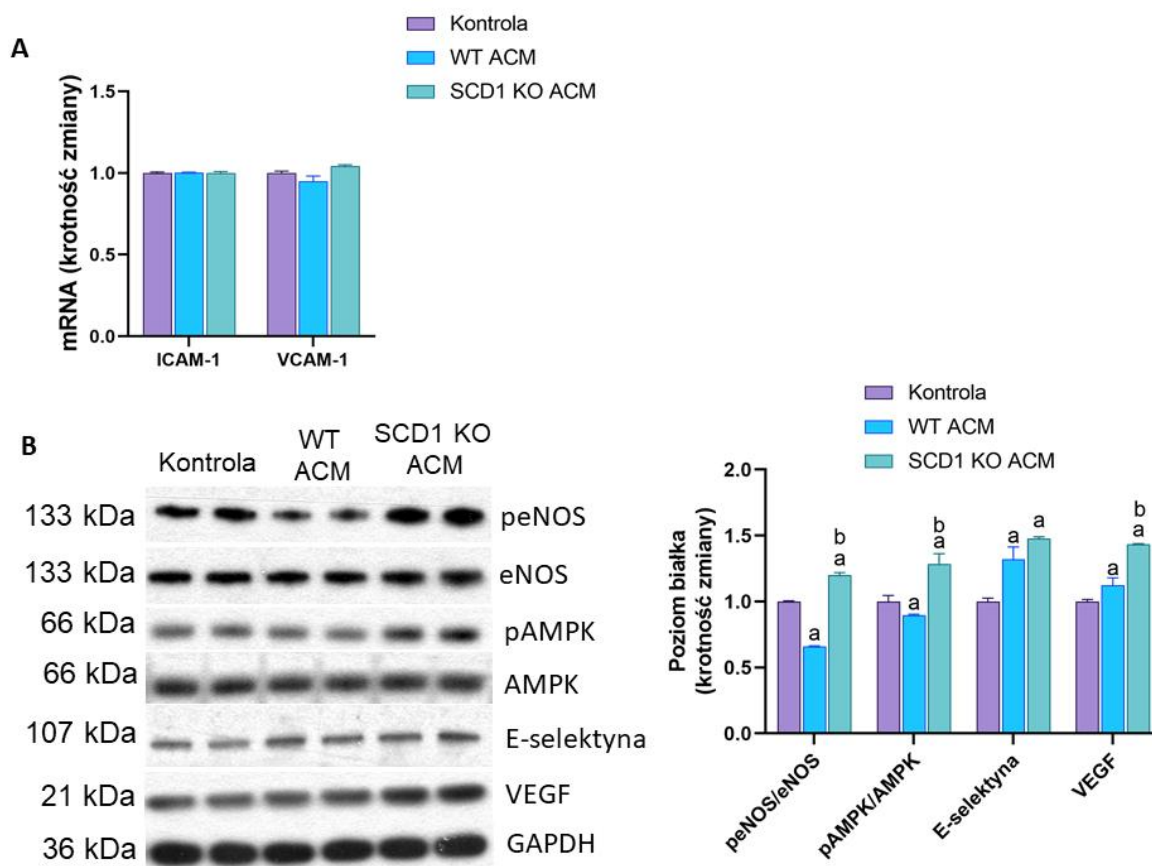
Rycina 35. Wpływ traktowania VSMC ACM pochodzącym z naczyń okołonaczyniowych adipocytów WT lub SCD1 KO na skurcz. (A) Wykres zależności wartości indeksu komórkowego od czasu. Indeks komórkowy jest wielkością opisującą zmiany w oporze elektrycznym wywieranym przez komórki w trakcie skurczu. Strzałką zaznaczono moment dodania do pożywki 1 μ M angiotensyny II (Ang II). (B) Amplituda skurczu VSMC. (C) Czas potrzebny do osiągnięcia maksimum skurczu przez VSMC. **a** $p < 0,05$ vs kontrola, **b** $p < 0,05$ vs WT ACM. $N=3$ niezależne eksperymenty.

7.21. Wpływ medium ACM na aktywację EC

Śródbłonek wyścieła wewnętrzną stronę naczyń krwionośnych i pozostaje w bezpośrednim kontakcie z krwią. Wykazano związek pomiędzy zaburzeniami w funkcjonowaniu PVAT a nieprawidłową aktywacją śródbłonka, przyczyniającą się do rozwoju zaburzeń homeostazy naczyniowej (Koenen i wsp., 2021; Nosalski i Guzik 2017).

W celu wyjaśnienia związku pomiędzy SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach a funkcją śródbłonka naczyń krwionośnych, komórki EA.hy926 były traktowane ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT lub ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-}. Następnie określono poziom mRNA oraz białek związanych z aktywacją śródbłonka. Traktowanie EC przy użyciu ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} nie wpłynęło na poziom mRNA genów kodujących naczyniową cząsteczkę adhezji 1 (ang. vascular-cell adhesion molecule 1, VCAM -1)

i międzykomórkową cząsteczkę adhezji (ang. intracellular adhesion molecule 1, ICAM-1) w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 36A).



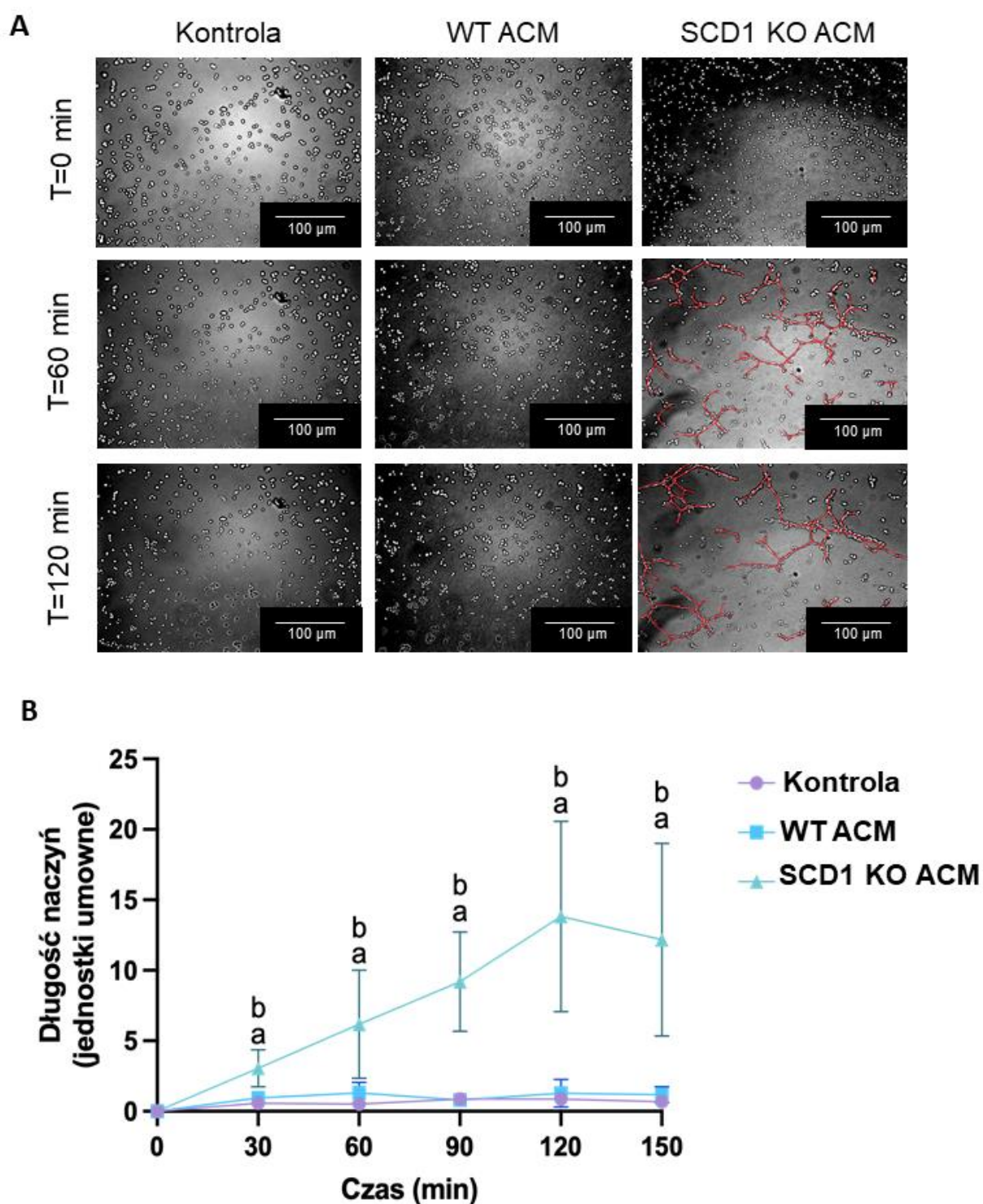
Rycina 36. Zmiany fenotypu komórek śródbłonka w odpowiedzi na ACM pochodzący z okolonaczyniowych adipocytów WT lub SCD1 KO. (A) Poziom mRNA genów kodujących białka adhezji komórkowej: VCAM-1 - międzynaczyniowa cząsteczka adhezji 1; ICAM-1 - międzykomórkowa cząsteczka adhezji. (B) Poziom białek aktywacji komórek śródbłonka. AMPK - kinaza białkowa aktywowana przez AMP, eNOS - śródbłonkowa syntaza tlenu azotu, VEGF - czynnik wzrostu śródbłonka naczyń. **a** $p < 0,05$ vs kontrola, **b** $p < 0,05$ vs WT ACM. N=3 niezależne eksperymenty.

Poziom fosforylacji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (ang. endothelial nitric oxide synthase, eNOS) oraz aktywującej ją kinazy AMPK był niższy w EC traktowanych ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT niż w komórkach kontrolnych (Rycina 36B). W EC traktowanych ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} zaobserwowano wzrost poziomu fosforylacji eNOS i AMPK w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 36B). E-selektyna jest białkiem biorącym udział w rozwoju stanu zapalnego. Umożliwia przyleganie leukocytów do śródbłonka naczyń co umożliwia dotarcie komórek odpornościowym do zmienionych chorobowo obszarów tkanek (Zhang i wsp., 2024). Poziom E-selektyny w EC traktowanych ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} był

wyższy w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 36B). Czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyń (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) jest czynnikiem stymulującym angiogenezę (Eelen i wsp., 2020). W komórkach śródbłónka traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono wzrost poziomu VEGF w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 36B), przy czym największy wzrost stwierdzono w EC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} (Rycina 36B).

W celu zweryfikowania, czy zwiększony poziom VEGF w komórkach śródbłónka traktowanych WT ACM lub SCD1 KO ACM przeprowadzono test angiogenezy *in vitro*. Za pomocą oprogramowania ImageJ zmierzono średnią długość kapilar tworzących się na mieszaninie białek macierzy pozakomórkowej Matrigel. Średnia długość kapilar tworzonych przez EC traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT była podobna jak w komórkach kontrolnych (Rycina 37B). Średnia długość kapilar tworzonych przez EC traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} była wyższa w porównaniu z komórkami traktowanymi ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT oraz z komórkami kontrolnymi (Rycina 37B).

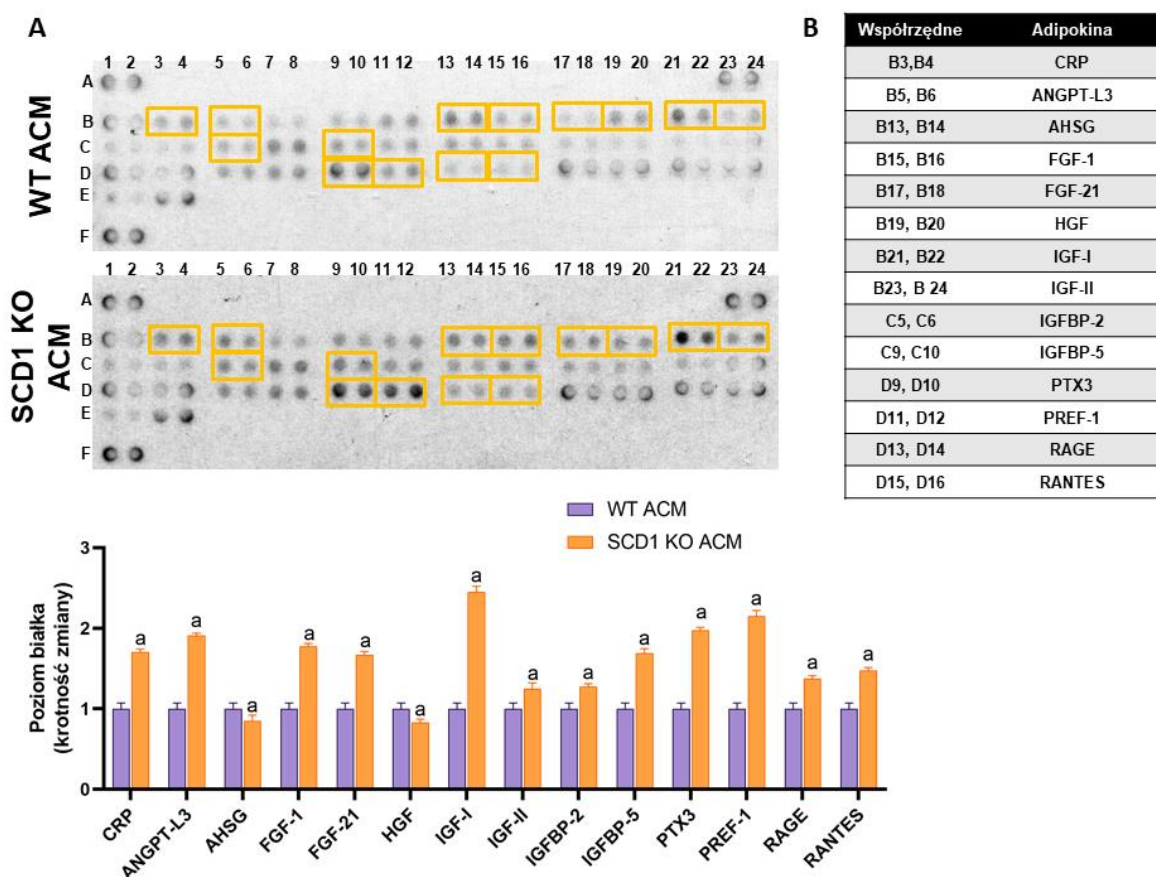
Podsumowując, przedstawione wyniki sugerują, że traktowanie EC ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} prowadzi do aktywacji eNOS i AMPK oraz zwiększonego poziomu białka adhezyjnego e-selektyny oraz angiogenezy.



Rycina 37. Zdolność komórek śródbłónka traktowanych medium pochodzącym z adipocytów WT lub SCD1 KO do angiogenezy *in vitro*. (A) Reprezentacyjne zdjęcia komórek śródbłónka na powierzchni żelu składającego się z białek macierzy pozakomórkowej (powiększenie 200 x). Kolorem czerwonym zaznaczono przebieg utworzonych naczyń (B) Średnia długość kapilar utworzonych przez komórki śródbłónka w czasie. **a** $p < 0,05$ vs kontrola, **b** $p < 0,05$ vs WT ACM. N=3 niezależne eksperymenty.

7.22. Wpływ wyciszenia SCD1 na profil adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty

Zróznicowana odpowiedź VSMC i EC na traktowanie ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-} sugeruje różnice w profilu czynników wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty wyizolowane z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. Dokonano zatem pomiaru poziomu białka 38 adipokin w ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i SCD1^{-/-}. Poziom 14 adipokin był istotnie różny pomiędzy ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} (Rycina 28A, B).



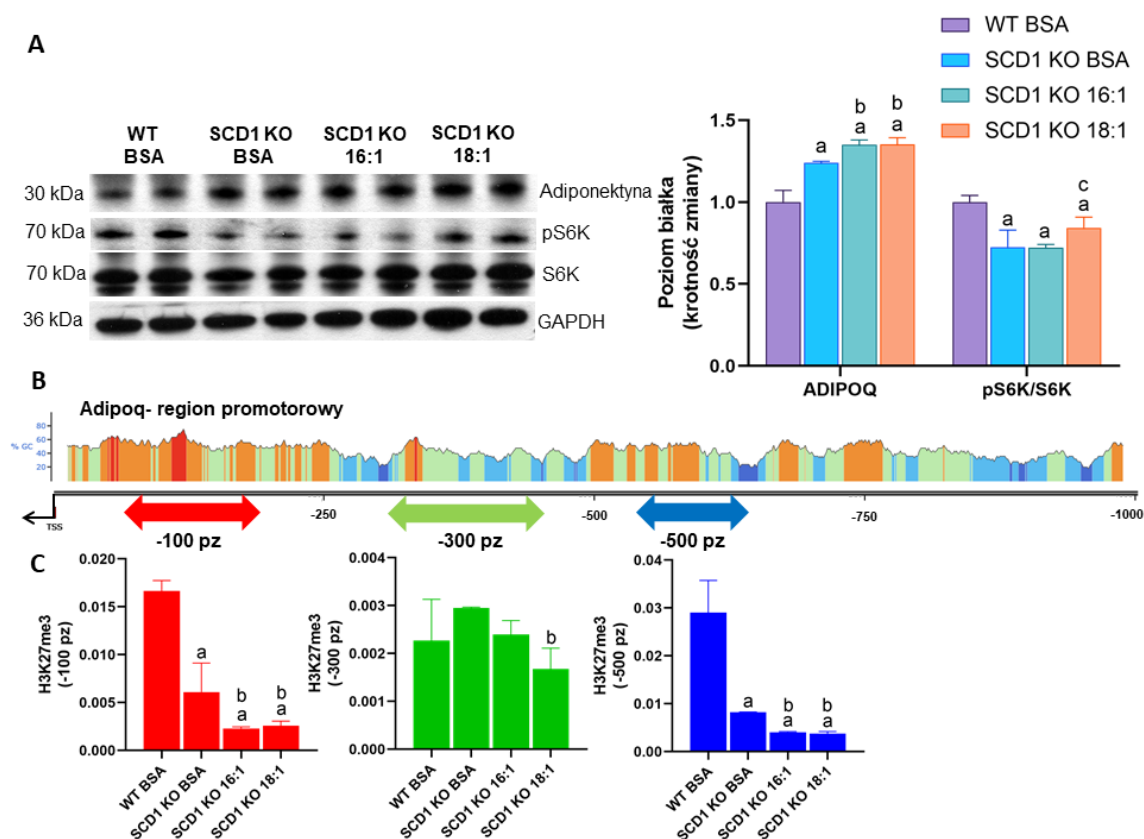
Rycina 38. Profil adipokin w medium pochodzącym z adipocytów WT ACM i SCD1 KO. (A) Poziom adipokin obecnych w medium pochodzącym z okołonaczyniowych adipocytów WT i SCD1^{-/-}. (B) Tabela przedstawiająca nazwy poszczególnych czynników oraz współrzędne odpowiadających im kropek. AHSG - alfa-2-hydroksyglobulina, ANGPT-L3 - angiopoetyna 3, CRP - białko C-reaktywne, FGF-1/21 - czynnik wzrostu fibroblastów 1/21, HGF - czynnik wzrostu hepatocytów, IGFBP-2/5 - białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 2/5, IGF-I/II - insulinopodobny czynnik wzrostu I/II, PREF-1 - czynnik preadipocytów 1, PTX3 - pentraksyna 3, RAGE - receptor dla zaawansowanych końcowych produktów glikacji, RANTES, - chemokina regulowana przy aktywacji, ulegająca ekspresji i wydzielana przez normalne komórki T. **a** p < 0,05 vs WT. N=3 niezależne eksperymenty.

W ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono niższy poziom dwóch adipokin, tj. glikoproteiny alfa-2-Heremans-Schmid (ang. Alpha-2-Heremans-Schmid Glycoprotein, AHSB) i czynnika wzrostu hepatocytów (ang. hepatocyte growth factor, HGF), w porównaniu z WT ACM (Rycina 38A, B). AHSB jest białkiem fazy ostrej zapalenia, wydzielanym głównie przez wątrobę oraz w mniejszym stopniu przez tkankę tłuszczową. (Chattopadhyay i wsp., 2021; Kim i wsp., 2022). HGF jest natomiast białkiem biorącym udział w utrzymaniu homeostazy naczyniowej poprzez regulację działania EC i VSMC (Ma i wsp., 2003; Okada i wsp., 2000; Taher i wsp., 2002; Kim i wsp., 2022). Ponadto, HGF bierze udział w regulacji rozwoju zapalenia (Molnarfi i wsp., 2015). W ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono także wyższy poziom czynników wzrostu fibroblastów 1 i 21 (ang. fibroblast growth factor 1/21 FGF-1/21) oraz insulinopodobnych czynników wzrostu (ang. fibroblast growth factor I/II, IGF-I/II) (Rycina 38A, B) w porównaniu z ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT. Czynniki te są zaangażowane w regulację wzrostu, różnicowania oraz metabolizmu wielu typów komórek (Yang i wsp., 2023; Gasser i wsp., 2022; LeRoith i wsp., 2021). Również poziom chemokiny regulowanej przy aktywacji, ulegającej ekspresji i wydzielanej przez normalne komórki T (ang. regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES), zaangażowanej w rozwój zespołu metabolicznego podczas przebiegu otyłości (Rakotoarivelo i wsp., 2020), był podwyższony w ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SD1^{-/-} w porównaniu z ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 38 A, B). Przedstawione wyniki wskazują, że brak SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach zmienia profil wydzielanych adipokin

7.23. Wpływ SCD1 na epigenetyczną regulację ekspresji *Adipoq* i *Il-6*

Lokalnie wydzielane adipokiny przyczyniają się do utrzymania homeostazy naczyniowej, m.in. poprzez oddziaływanie z VSMC i EC (Cai i wsp., 2023). Jedną z przyczyn różnic w odpowiedzi VSMC i EC na ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} jest zmiana w profilu adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty (Rycina 38). Analiza poziomu mRNA *Adipoq* i *Il-6* wykazała, że brak ekspresji SCD1 prowadzi do wzrostu poziomu mRNA *Adipoq* oraz spadku *Il-6* w okołonaczyniowych adipocytach (Rycina 29F). Zawartość adiponektyny w okołonaczyniowych adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} była wyższa w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT (Rycina 39A).

Traktowanie okołonaczyniowych adipocytów z wyciszeniem SCD1 kwasem C16:1 i C18:1 prowadziło do podwyższenia poziomu białka adiponektyny w porównaniu do komórek kontrolnych wyizolowanych z PVAT myszy WT, jak i SCD1^{-/-} (Rycina 39A). Wzrost poziomu białka adiponektyny w komórkach kontrolnych z unieczynnieniem SCD1 oraz w komórkach z unieczynnieniem SCD1 traktowanych kwasem C16:1 lub C18:1 był związany ze spadkiem poziomu fosforylacji kinazy białkowej rybosomalnego białka S6 (ang. ribosomal protein S6 kinase, S6K). Kinaza ta zaangażowana jest w represję transkrypcji genu *Adipoq* poprzez promowanie trimetylacji lizyny 27 histonu 3 (H3K27me3) w regionie promotorowym (Yi 2016). Aby określić, czy wzrost poziomu białka adiponektyny jest związany ze zmniejszoną obecnością H3K27me3 w regionie promotorowym genu *Adipoq*, dokonano immunoprecypitacji chromatyny za pomocą przeciwciała skierowanego przeciwko H3K27me3. Następnie wybrano trzy fragmenty promotora *Adipoq*, których obecność po immunoprecypitacji określono w reakcji qPCR (Rycina 39B, C).

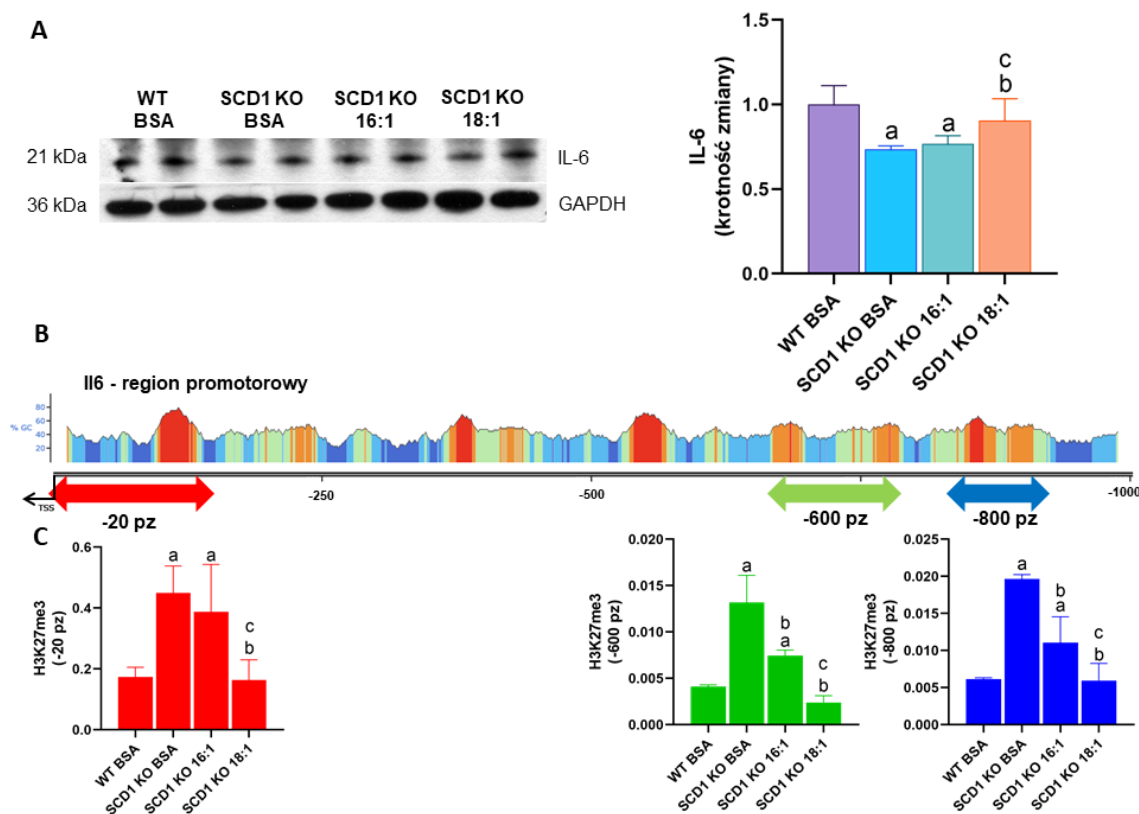


Rycina 39. Wpływ braku ekspresji SCD1 na poziom białka adiponektyny. (A) Zawartość białka adiponektyny oraz poziom fosforylacji kinazy S6K. (B) Mapa regionu promotorowego genu *Adipoq*. Strzałkami zaznaczono lokalizację fragmentów amplifikowanych w reakcji qPCR po immunoprecypitacji chromatyny. Ujemne wartości wskazują na położenie badanego fragmentu promotora względem miejsca startu transkrypcji (TSS). (C) Wyniki analizy ChIP-qPCR dla wybranych fragmentów regionu promotorowego. Immunoprecypitacji dokonano z użyciem, przeciwciał H3K27me3. pz - pary zasad nukleotydów, C16:1 - kwas palmitooleinowy, C18:1 - kwas oleinowy. **a** $p < 0,05$ vs WT BSA, **b** $p < 0,05$ vs SCD1 KO BSA, **c** $p < 0,05$ vs SCD1 KO 16:1. N=3 niezależne eksperymenty.

Stwierdzono, że we fragmentach położonych 100 par zasad (-100 pz) i -500 pz od miejsca startu transkrypcji, poziom H3K27me3 był niższy w kontrolnych komórkach z wyciszeniem SCD1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 39C). Poziom H3K27me3 był niższy w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy z brakiem ekspresji SCD1 traktowanych C16:1 lub C18:1 niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT oraz niż w komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 (Rycina 39C). Przedstawione wyniki wskazują, że brak SCD1 prowadzi do zwiększonego poziomu białka adiponektyny w okołonaczyniowych adipocytach, co jest związane ze zmniejszoną represją transkrypcji za pośrednictwem H3K27me3. Ponadto, efekt ten jest pogłębiony w wyniku traktowania komórek kwasami C16:1 i C18:1, które są produktami reakcji katalizowanej przez SCD1

IL-6 jest cytokiną prozapalną, uwalnianą przez wiele typów komórek, w tym również przez tkankę tłuszczową (Mohamed-Ali i wsp., 1997). Myszy z wyciszeniem ekspresji SCD1 w całym organizmie lub z brakiem SCD1 w skórze charakteryzują się podwyższonym poziomem IL-6 w osoczu (Dumas i wsp., 2019; MacDonald i wsp., 2009). W okołonaczyniowych adipocytach wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} stwierdzono spadek poziomu białka IL-6 w porównaniu z adipocytami wyizolowanymi z PVAT myszy WT (Rycina 40A). W komórkach z wyciszeniem SCD1, traktowanych C16:1, poziom IL-6 był niższy niż w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy WT (Rycina 40A). Traktowanie komórek z unieczynnieniem SCD1 kwasem C18:1 spowodowało wzrost poziomu IL-6 w porównaniu z komórkami kontrolnymi SCD1^{-/-} (Rycina 40A). Analiza ChIP-qPCR regionu promotorowego genu *Il-6* wykazała wyższy poziom H3K27me3 w komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 w porównaniu z komórkami wyizolowanymi z PVAT myszy WT we wszystkich trzech badanych fragmentach (-20 pz, -600 pz i -800 pz) (Rycina 40B, C). We fragmencie -20 pz w komórkach z unieczynnieniem SCD1 traktowanych C16:1, poziom H3K27me3 był niezmienny w odniesieniu do komórek kontrolnych z wyciszeniem SCD1, natomiast we fragmentach -600 pz i -800 pz w komórkach z wyciszeniem SCD1 traktowanych 16:1 poziom H3K27me3 był niższy niż w komórkach kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1 (Rycina 40B, C). Traktowanie komórek z brakiem ekspresji SCD1 kwasem C18:1 spowodowało spadek poziomu H3K27me3 w porównaniu z adipocytami kontrolnymi z unieczynnieniem SCD1 w każdym z trzech badanych odcinków promotora *Il-6* (Rycina 40B, C). Przedstawione wyniki wskazują, że obniżony poziom białka IL-6 w adipocytach z brakiem ekspresji SCD1 jest związany z podwyższonym poziomem H3K27me3 w promotorze genu *Il-6*. Traktowanie komórek z wyciszeniem SCD1 kwasem C18:1

prowadziło do zwiększenia poziomu białka IL-6, co było powiązane z obniżeniem poziomu H3K27me3 w promotorze genu *Il-6*.



Rycina 40. Wpływ wyciszenia ekspresji SCD1 na ekspresję IL-6. (A) Poziom białka IL-6. (B) Mapa regionu promotorowego genu *Il-6*. Strzałkami zaznaczono lokalizację fragmentów amplifikowanych w reakcji qPCR po immunoprecypitacji chromatyny. Ujemne wartości wskazują na położenie badanego fragmentu promotora względem miejsca startu transkrypcji (TSS). (C) Wyniki analizy ChIP-qPCR dla wybranych fragmentów regionu promotorowego. Immunoprecypitacji dokonano z użyciem przeciwciał H3K27me3. Pz - pary zasad, C16:1 - kwas palmitoleinowy, C18:1 - kwas oleinowy. **a** $p < 0,05$ vs WT BSA, **b** $p < 0,05$ vs SCD1 KO BSA, **c** $p < 0,05$ vs SCD1 KO C16:1. N=3 niezależne eksperymenty.

Podsumowując, stwierdzono, że ekspresja dwóch antagonistycznie działających adipokin, tj. adiponektyny i IL-6, ulega zmianie w komórkach wyizolowanych z PVAT myszy SCD1^{-/-} względem komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT. Podczas gdy poziom adiponektyny rośnie w komórkach z wyciszeniem SCD1 w odniesieniu do komórek wyizolowanych z PVAT myszy WT, to poziom IL-6 maleje. Kwasy C16:1 i C18:1 są głównymi produktami SCD1 (Ntambi i wsp., 2002). Traktowanie komórek z brakiem ekspresji SCD1 kwasem C18:1 podnosiło poziom białka adiponektyny i IL-6 w porównaniu do komórek kontrolnych z brakiem ekspresji SCD1. Wynik ten sugeruje, że SCD1 reguluje ekspresję genów tych białek poprzez regulację w poziomie kwasu C18:0. Powyższe zmiany były związane ze zmianami w dostępności chromatyny regulowanej za pomocą H3K27me3. Zarówno adiponektyna, jak i IL-6 mogą potencjalnie przyczyniać się do zmian stwierdzonych w EC i VSMC w wyniku traktowania tych komórek ACM (Rycina 32-37).

8. DYSKUSJA

8.1. Wpływ wyciszenia SCD1 i diety HF na fenotyp myszy

W niniejszej pracy doktorskiej określono wpływ SCD1 na regulację metabolizmu i funkcji wydzielniczej PVAT. Wykazano, że karmienie myszy z wyciszeniem SCD1 dietą HF zarówno przez 8, jak i 16 tygodni nie zwiększa istotnie masy ich ciała oraz nie prowadzi do podwyższenia stężenia cholesterolu i TAG we krwi. Stężenie glukozy we krwi na czczo, jak i dootrzewnowy test obciążenia glukozą wskazują, że myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF mają poprawioną tolerancję glukozy względem myszy WT. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami demonstrującymi, że myszy z wyciszeniem SCD1 charakteryzują się wyższym metabolizmem glukozy w mięśniach szkieletowych oraz w mięśniu sercowym oraz zwiększoną wrażliwością na insulinę (Rahman i wsp., 2003; Dobrzyn i wsp., 2008). Wykazano ponadto, że okołonaczyniowe adipocyty z brakiem ekspresji SCD1 wykazują większy poziom dokomórkowego transportu glukozy, co wiązało się z większą zawartością białka GLUT4 oraz fosforylacją AKT. Wyniki te są odmienne od tych otrzymanych dla białych adipocytów 3T3-L1, w których zahamowanie aktywności SCD1 spowodowało obniżenie intensywności metabolizmu glukozy (Yee i wsp., 2013). Powodem tej różnicy może być fakt, że w przeciwieństwie do klasycznych białych adipocytów, okołonaczyniowe adipocyty przeprowadzają proces termogenezy i charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną, w tym katabolizmem glukozy (Qi i wsp., 2018; Maliszewska i Kretowski 2021).

Zaprezentowane w tej pracy badania wykazały, że stężenie cholesterolu całkowitego we krwi myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow było wyższe niż u myszy WT na diecie chow. Zależność tę można wytłumaczyć faktem, że myszy z brakiem ekspresji SCD1 wykazują zwiększony poziom LDL wraz ze spadkiem HDL (Attie i wsp., 2007). Taki profil lipoprotein może potencjalnie sprzyjać rozwojowi miażdżycy (Attie i wsp., 2007). Wysoki poziom cholesterolu u myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow może być wytłumaczony faktem, że z powodu braku aktywności SCD1 myszy te są pozbawione endogennej źródła MUFA które mają właściwości obniżające poziom cholesterolu (Flowers i wsp., 2006; Miyazaki i wsp., 2006). Egzogenna podaż MUFA pochodząca z diety HF może zatem przyczyniać się do spadku poziomu cholesterolu u myszy z wyciszeniem SCD1 (Flowers i wsp., 2006).

8.2. Rola SCD1 w regulacji lipolizy w PVAT

Wykazano, że dieta HF spowodowała zwiększoną akumulację lipidów w TPVAT i APVAT myszy WT. Świadczy o tym zarówno wzrost masy tych tkanek oraz zwiększenie objętości adipocytów. Co ciekawe, zarówno w przypadku TPVAT, jak i APVAT wzrost masy tkanki i hipertrofia adipocytów nie były zależne od czasu trwania diety HF. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska może być specyficzne umiejscowienie i funkcja PVAT, determinujące jego ograniczoną zdolność do magazynowania lipidów. W ciele myszy tkanką tłuszczową o największej objętości, która wykazuje jednocześnie największe zdolności magazynujące w odpowiedzi na dietę HF, jest trzewna WAT i to ten typ tkanki magazynuje większość nadmiarowych TAG w stanie otyłości (Sugimoto i wsp., 2023; Guo i wsp., 2024; Dhawan i Sharma, 2020). Przedłużający się stan nadwyżki energetycznej w trakcie diety HF może zatem przekraczać zdolności magazynujące PVAT, prowadząc do zahamowania hipertrofii adipocytów, co tłumaczy brak zmian w masie TPVAT i APVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF względem TPVAT i APVAT po 8 tygodniach diety HF. Zarówno 8 jak i 16 tygodni diety HF w TPVAT i APVAT myszy WT doprowadziło do wyraźnego spadku poziomu białek HSL i ATGL. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, w których dieta HF powoduje spadek poziomu białka HSL i jego aktywności w wątrobie (Lee i wsp., 2022), podskórnej WAT (Oh i wsp., 2023) oraz mięśniach szkieletowych (Ko i wsp., 2018). Poziom białka ATGL w wątrobie myszy również był obniżony na diecie HF (Zhang i wsp., 2024). Wyniki te sugerują, że obniżenie poziomu białek ATGL i HSL w PVAT myszy WT w warunkach karmienia dietą HF jest odpowiedzią podobną do tej obserwowanej w przypadku innych tkanek o intensywnym katabolizmie kwasów tłuszczowych.

TPVAT i APVAT myszy z brakiem SCD1 akumulował w wyniku diety HF mniej tłuszczu niż TPVAT i APVAT myszy WT. Dodatkowo, TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 charakteryzował się zwiększonym poziomem DAG i FFA. Podobny efekt w wyniku wyciszenia SCD1 zaobserwowano w pierwotnych adipocytach *in vitro*. Wyniki te sugerują aktywację szlaku lipolizy w PVAT wywołaną brakiem SCD1. Rzeczywiście, poziom białek ATGL i HSL w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF był wyższy niż w TPVAT i APVAT myszy WT na diecie HF. Co ciekawe, wzrost aktywności ATGL w TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF nie był powiązany ze wzrostem poziomu białka ABHD5, które jest aktywatorem ATGL. Ponadto, poziom białka G0S2, będącego inhibitorem ATGL wzrósł w TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF względem myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow. Wyjaśnieniem tej

niezgodności mogą być modyfikacje potranslacyjne ATGL, modyfikacje potranslacyjne innych białek szlaku lipolizy lub oddziaływanie ATGL z tymi białkami. Na poziom aktywności ATGL wpływają bowiem czynniki takie jak np. dostępność kropli lipidowych, ograniczana przez PLIN1, poziom fosforylacji ABHD5 lub fosforylacja ATGL (Lafontan i Langin, 2009). Fosforylacja PLIN1 przez PKA skutkuje uwolnieniem ABHD5 związanego z PLIN1, co umożliwia aktywację ATGL (Marcinkiewicz i wsp., 2006; Lafontan i Langin, 2009). Również aktywacja ATGL za pośrednictwem AMPK jest procesem regulującym podstawowy, niezależny od stymulacji hormonami proces lipolizy (Zimmermann i wsp., 2004; Gaidhu i wsp., 2012). Zarówno w TPVAT, jak i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF stwierdzono podwyższony stopień fosforylacji AMPK. Wydaje się zatem możliwe, że kinaza ta może odpowiadać za wzrost aktywności ATGL w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF pomimo braku wzrostu w poziomie ABHD5 lub wzrostu w poziomie G0S2. Pomimo, że specyficzności substratowe ATGL i HSL częściowo się na siebie nakładają, to ATGL preferencyjnie hydrolizuje TAG, podczas gdy HSL hydrolizuje DAG (Zimmermann i wsp., 2004). Wysoki poziom DAG w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow odpowiadał niższemu niż u myszy WT poziomowi białka HSL. Zarówno wzrost poziomu białka HSL w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF względem TPVAT i APVAT myszy WT na diecie HF, jak i spadek hamującej fosforylacji HSL na serynie 565 świadczą o tym, że zależna od HSL lipoliza jest aktywowana. Co więcej, spadek fosforylacji HSL na serynie 565 został również stwierdzony *in vitro*. Wyniki te sugerują aktywację lipolizy w okołonaczyniowych adipocytach, wywołaną brakiem SCD1. Aktywacja lipolizy obejmuje w tym przypadku zarówno HSL, jak i ATGL. Wpływ braku ekspresji SCD1 na skład lipidów w TPVAT i APVAT (tj. podwyższenie poziomu DAG i FFA przy jednoczesnym spadku zawartości TAG) jest podobny do tego obserwowanego także w innych tkankach, np. brak ekspresji SCD1 w skórze prowadził do podwyższenia poziomu FFA przy jednoczesnym obniżeniu poziomu TAG (Sampath i wsp., 2009). Ponadto, wyciszenie SCD1 w mięśniach szkieletowych spowodowało zwiększenie poziomu DAG (Pinnamaneni i wsp., 2006), a zahamowanie aktywności SCD1 w adipocytach 3T3-L1 zmniejszyło zawartość TAG, natomiast podwyższyło poziom DAG i FFA (Ralston i Mutch 2015). Z drugiej strony, brak SCD1 w innych tkankach wywoływał także odwrotny efekt niż w okołonaczyniowych adipocytach. W sercu myszy wyciszenie SCD1 spowodowało spadek zawartości TAG i FFA, natomiast nie stwierdzono zmian w poziomie DAG (Bednarski i wsp., 2016). Brak SCD1 w jelicie cienkim był natomiast powiązany ze spadkiem zawartości DAG (Burchat i wsp., 2022). Przedstawione dane sugerują, że wpływ SCD1 na

poziom poszczególnych frakcji lipidowych jest tkankowo specyficzny. Zmiany w metabolizmie lipidów w TPVAT i APVAT w trakcie diety HF nie były do tej pory przedmiotem szczegółowych badań naukowych. Wyniki omówione powyżej pokazują, że lipoliza jest zahamowana w APVAT myszy WT w trakcie diety HF. Efekt ten nie występuje w TPVAT myszy WT, gdzie lipoliza ulega aktywacji. Różnica ta podkreśla odmienny charakter TPVAT i APVAT w odpowiedzi na dietę HF, który może wynikać z różnic pomiędzy komórkowymi prekursorami tych tkanek. TPVAT i APVAT do pewnego stopnia współdzielą bowiem swoje pochodzenie embrionalne, jednak rozwijają się z prekursorów o odmiennym wzorze ekspresji genów (Li i wsp., 2021). Większość dostępnych badań nad rozwojem PVAT dotyczy TPVAT (Hepler i wsp., 2017; Tran i wsp., 2018; Angueira i wsp., 2021). Niemniej jednak, dostępne dane wskazują, że do rozwoju APVAT nie jest konieczny czynnik transkrypcyjny *Zic1*, który jest charakterystyczny dla BAT i TPVAT (Angueira i wsp., 2021). Jest to prawdopodobny powód, dla którego TPVAT wykazuje wyższą aktywność metaboliczną niż APVAT, oraz wyższy poziom białka UCP1 (Tran i wsp., 2018; Sasoh i wsp., 2021).

8.3. Rola SCD1 w regulacji β -oksydacji w PVAT

AMPK jest kinazą białkową kontrolującą procesy metaboliczne komórki, uruchamiającą przemiany kataboliczne w odpowiedzi na wzrost wewnątrzkomórkowego stosunku AMP/ATP (Brownsey i wsp., 1997). AMPK aktywuje β -oksydację poprzez hamowanie aktywności ACC (Brownsey i wsp., 1997). W TPVAT i APVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF stwierdzono spadek fosforylacji AMPK. Co ciekawe, efektu takiego nie stwierdzono w TPVAT i APVAT myszy WT po 8 tygodniach diety HF. Wynik ten sugeruje, że spadek intensywności przemian katabolicznych w PVAT może zależeć od długości trwania diety HF. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których odnotowano spadek aktywności AMPK w BAT, WAT oraz w sercu w wyniku karmienia szczurów dietą HF (Lindholm i wsp., 2013). Aktywacja AMPK w BAT w wyniku diety HF może być jednym z mechanizmów adaptacyjnych mającym na celu zużycie nadmiarowych kwasów tłuszczowych w procesie β -oksydacji (Alcalá i wsp., 2017; So i wsp., 2011; Tseng i wsp., 2010). Wzrost fosforylacji AMPK w TPVAT myszy WT po 8 tygodniach diety HF sugeruje aktywację takiego mechanizmu. Spadkowi w poziomie fosforylacji AMPK w PVAT myszy WT po 16 tygodniach diety HF nie towarzyszyły zmiany w poziomie fosforylacji ACC.

W związku z tym, możliwe jest, że po 16 tygodniach diety HF w PVAT myszy WT intensywność β -oksydacji nie ulega zmianie pomimo spadku fosforylacji AMPK. Poziom białka PPAR α , kontrolującego transkrypcję genów β -oksydacji (Nakamura i wsp., 2014) w TPVAT myszy WT był niższy po 16 tygodniach diety HF w porównaniu z TPVAT myszy WT na diecie chow. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami, w których stwierdzono spadek poziomu białka PPAR α w BAT myszy karmionych dietą HF (Li i wsp., 2021). Fakt, iż spadek zawartości białka PPAR α nie został odnotowany w TPVAT myszy WT po 8 tygodniach diety HF sugeruje istnienie odpowiedzi przystosowawczej, która nie może jednak zostać podtrzymana, gdy dieta HF trwa 16 tygodni. Wynik jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami demonstrującymi, że w początkowym okresie karmienia myszy dietą HF dochodzi do wzrostu poziomu ekspresji genów β -oksydacji (Alcalá i wsp., 2017; So i wsp., 2011; Tseng i wsp., 2010). Co ciekawe, poziom białka PPAR α był niższy w APVAT myszy WT po 8 tygodniach diety HF w porównaniu z APVAT myszy WT na diecie chow, lecz po 16 tygodniach zaobserwowano wzrost jego poziomu. Wynik ten może sugerować, że adaptacyjna aktywacja PPAR α w APVAT myszy WT jest opóźniona i pojawia się po 16 tygodniach diety HF. W TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 karmienie dietą HF prowadziło do wzrostu poziomu fosforylacji ACC, co było połączone ze wzrostem fosforylacji AMPK. Ze względu na fakt, że zmianom tym towarzyszył wzrost poziomu białka VLCAD, można stwierdzić, że w TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF β -oksydacja ulega aktywacji. W APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF nie stwierdzono wzrostu fosforylacji ACC pomimo, iż poziom fosforylacji AMPK był podwyższony. Badania wskazują, że fosforylacja ACC nie jest konieczna, aby aktywować β -oksydację w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych (Zordoky i wsp., 2014; O'Neill i wsp., 2015) oraz termogenezę w BAT (Mottillo i wsp., 2016). W związku z tym możliwe jest, że β -oksydacja w APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF również jest aktywowana pomimo braku wzrostu fosforylacji ACC. Przemawia za tym zarówno wzrost fosforylacji AMPK, jak i wzrost poziomu białka VLCAD w stosunku do APVAT myszy WT na diecie HF. Można zatem przypuszczać, że brak SCD1 w warunkach diety HF prowadzi do aktywacji β -oksydacji w TPVAT i APVAT. Niezgodność pomiędzy poziomem fosforylacji ACC i AMPK obserwowana w APVAT może także wynikać z różnic w odpowiedzi na HF pomiędzy tymi tkankami (Li i wsp., 2021). TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 utrzymuje bowiem swój brunatny fenotyp, charakteryzujący się m.in. wysokim stopniem β -oksydacji (Li i wsp., 2021). Natomiast APVAT wykazuje cechy BeAT, który oprócz komórek o fenotypie brunatnym, wykazujących aktywny katabolizm kwasów tłuszczowych, posiada również duży

udział komórek o charakterystyce WAT (Li i wsp., 2021). Charakterystyczna budowa APVAT myszy z wyciszeniem SCD1, zawierająca zarówno adipocyty z jedną dużą kroplą lipidową, jak i adipocyty z wieloma mniejszymi kroplami lipidowymi oraz wyższy niż u myszy WT poziom białka UCP1 sugeruje, że tkanka ta również może posiadać cechy BeAT. Z tego powodu niższy stopień fosforylacji ACC może być skutkiem fenotypu faworyzującego magazynowanie lipidów.

8.4. Wpływ wyciszenia SCD1 na dynamikę mitochondriów w PVAT

Zmiany w poziomie białek regulujących β -oksydację, stwierdzone w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF były powiązane ze zmianami w ultrastrukturze mitochondriów. W PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF stwierdzono wzrost gęstości grzebieni mitochondrialnych w porównaniu z PVAT myszy WT na diecie HF. Wzrost gęstości grzebieni mitochondrialnych jest związany ze zwiększonym oddychaniem komórkowym (Nielsen i wsp., 2017). Stwierdzono również wzrost poziomu białek OXPHOS i UCP1 w TPVAT i APVAT myszy z brakiem SCD1 pod wpływem diety HF. Podobne zmiany zaobserwowane zostały w mysim BAT na diecie HF (Alcalá i wsp., 2017). Wyniki te sugerują, że zwiększenie poziomu β -oksydacji w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF jest pozytywnie skorelowana z aktywacją oddychania komórkowego. Badanie okołonaczyniowych adipocytów zróżnicowanych *in vitro* potwierdziło, że adipocyty myszy z wyciszeniem SCD1 wykazują zwiększony OCR i poziom białka UCP1 niż komórki WT. Ponadto, mitochondria w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 zróżnicowanych *in vitro* wykazywały zwiększony poziom fizji mitochondriów, co było związane ze spadkiem ekspresji genów odpowiedzialnych za ich fuzję, tj. *Mfn1*, *Mfn2* i *Opa1*. Ponieważ aktywność mitochondriów jest pozytywnie skorelowana z ich fragmentacją (Yu i wsp., 2006; Ngo i wsp., 2023), otrzymane wyniki sugerują, że brak SCD1 aktywuje przemiany oksydacyjne w okołonaczyniowych adipocytach poprzez zmiany w strukturze sieci mitochondrialnej. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być brak zdolności adipocytów z wyciszoną ekspresją SCD1 do przekształcania SFA w MUFA, co prowadzi do nadmiaru SFA w różnych frakcjach lipidowych, w tym w PL, wchodzących również w skład wewnętrznej błony mitochondrialnej. Stan taki utrudnia utrzymanie prawidłowego gradientu H^+ , co prowadzi do uruchomienia mechanizmu kompensacyjnego, polegającego na zwiększeniu intensywności oddychania komórkowego w celu wytworzenia siły redukcyjnej pozwalającej na wypompowanie jonów H^+ z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni

międzybłonowej (Yang i wsp., 2012). O aktywacji podobnego mechanizmu świadczy podwyższony poziom OCR i UCP1 w adipocytach z wyciszeniem SCD1 oraz fakt, że traktowanie adipocytów WT kwasem C16:0 spowodowało podwyższanie poziomu OCR i białka UCP1 do poziomu obserwowanego w adipocytach z brakiem ekspresji SCD1. Zmianom tym towarzyszył silny spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Co więcej, podwyższony poziom OCR w adipocytach z wyciszeniem SCD1 nie był powiązany z wyższą produkcją ATP. Wynik ten świadczy o tym, że mitochondrialny gradient H^+ i produkcja ATP są rozprężone za pomocą UCP1, co jest cechą charakterystyczną dla brunatnych adipocytów (Alcalá i wsp., 2017). Obserwowany wzrost poziomu białek OXPHOS i UCP1 w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 jest zatem prawdopodobnym skutkiem akumulacji SFA. Może to przyczyniać się do spadku potencjału błonowego mitochondriów i aktywacji mechanizmu kompensacyjnego, polegającego na podwyższeniu gęstości grzebieni mitochondrialnych oraz poziomu białek OXPHOS i UCP1.

8.5. Wpływ diety HF na rozwój reakcji zapalnej w PVAT

Badania z wykorzystaniem myszy z wyciszeniem SCD1 wykazały, że wykazują one większą podatność na rozwój miażdżycy i lokalnego zapalenia naczyń. Wynika to m.in. z wysokiego stężenia cholesterolu związanego z LDL i z większego poziomu aktywacji EC (Brown i wsp., 2008; MacDonald i wsp., 2009). Przeprowadzone badania wykazały, że w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni poziom makrofagów M2 CD206⁺ był wyższy niż u myszy WT na diecie chow i HF trwającej 8 tygodni. Sugeruje to odpowiedź hamującą zapalenie. Jednak po 16 tygodniach diety HF zarówno w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 liczba komórek CD206⁺ spadła względem TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow, co sugeruje utratę przeciwzapalnej odpowiedzi w wyniku przedłużającej się diety HF. Zmiana tego typu może potencjalnie prowadzić do większego poziomu zapalenia i większego ryzyka miażdżycy lub innych komplikacji naczyniowych (Nosalski i Guzik 2017). TPVAT myszy WT wykazywał większą odporność na indukcję różnicowania się makrofagów w kierunku M1 w wyniku diety HF niż APVAT myszy WT, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Fitzgibbons i wsp., 2011; Police i wsp., 2009). Różnicowanie się makrofagów w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1, karmionych dietą HF było natomiast intensywniejsze niż w przypadku TPVAT i APVAT myszy WT. Zarówno po 8, jak i 16 tygodniach diety HF, poziom makrofagów CD11c⁺ był znacznie wyższy w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1

niż w TPVAT i APVAT myszy WT. Obserwowana indukcja polaryzacji makrofagów M1 w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF może być powiązana z akumulacją nasyconych FFA, takich jak C16:0, które są aktywatorami szlaku TLR4/NF- κ B w adipocytach i makrofagach (Ravaut i wsp., 2020). Wzrost poziomu FFA w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 był związany ze wzrostem poziomu białka UCP1. Podwyższenie poziomu białka UCP1 w brunatnych adipocytach jest związane ze zwiększoną β -oksydacją (Mottillo i wsp., 2016), dlatego jego wzrost może być częścią adaptacyjnej odpowiedzi na akumulację FFA wywołujących zapalenie (Wu i wsp., 2012; Bertholet i wsp., 2017). Obserwowany wzrost w poziomie białka UCP1 w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 współwystępuje ze zwiększonym poziomem reakcji zapalnej, co sugeruje, że homeostatyczna odpowiedź polegająca na zwiększeniu poziomu białka UCP1 jest niewystarczająca do zniesienia prozapalnego wpływu nasyconych FFA. Innym czynnikiem mogącym przyczyniać się do rozwoju zapalenia w PVAT myszy z brakiem ekspresji SCD1 są DAG, które w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 pochodzą głównie z procesu lipolizy. DAG aktywują kinazę białkową C δ (ang. protein kinase C, PKC δ) w mięśniach szkieletowych, a zahamowanie ATGL, głównej lipazy generującej w komórce DAG skutkowało obniżeniem zapalenia (Sharma i wsp., 2019; Jani i wsp., 2023). Co ciekawe, w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow poziom markerów zapalenia był obniżony w stosunku do TPVAT i APVAT myszy WT na diecie chow. To sugeruje, że czynniki prozapalne obecne w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF są nieobecne lub występują na niskim poziomie, gdy myszy te karmione są dietą o niskiej zawartości tłuszczu. Przykładem takich czynników mogą być ceramidy, które indukują zapalenie oraz których poziom u myszy z brakiem ekspresji SCD1 na diecie chow jest niższy niż u myszy WT na diecie chow (Dobrzyn i wsp., 2005). Niski poziom ceramidów jest związany z zahamowaną reakcją zapalną (Sun i wsp., 2024), natomiast dieta HF podnosi poziom ceramidów (Zalewska i wsp., 2019). Zmiana w ekspresji markerów zapalenia w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 w wyniku diety HF może zatem być związana z wyższym ich poziomem. Wspomniana powyżej zwiększona podatność na miażdżycę u myszy z wyciszeniem SCD1 może zatem częściowo wynikać ze zwiększonego zapalenia PVAT. TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 zarówno na diecie chow, jak i HF charakteryzuje się spadkiem zawartości kwasu C16:1 w lipidach obojętnych oraz we frakcji PL. Kwas C16:1 ma działanie hamujące zapalenie tkanki tłuszczowej w przebiegu otyłości (Simão i wsp., 2022; de Souza i wsp., 2018). Obniżona zawartość C16:1

może zatem być potencjalnym czynnikiem przyczyniającym się do nadmiernej aktywacji odpowiedzi zapalnej w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie HF.

8.6. Oddziaływanie pomiędzy okolonaczyniowymi adipocytami a VSMC

VSMC są komórkami tworzącymi środkową warstwę ściany naczyń krwionośnych (łac. *tunica media*). Prawidłowe VSMC posiadają wrzecionowaty kształt oraz wykazują ekspresję markerów fenotypu kurczliwego, m. in. MYH11, kaldesmonu i kalponiny (Owens, 1995). W komórkach A7r5, będących modelem VSMC pochodzących z łuku aorty, traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1, poziom białka kaldesmonu był znacznie niższy niż w komórkach kontrolnych. Ponadto, w VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 oraz znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT stwierdzono wzrost fosforylacji ERK1/2 i jego translokacji do jądra komórkowego oraz wzrost poziomu białka osteopontyny, fibronektyny i PCNA. Niemniej jednak, wzrost w poziomie tych białek był bardziej wyraźny w VSMC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 niż w VSMC traktowanych WT ACM. Wyniki te wskazują na zwiększony poziom proliferacji VSMC w wyniku traktowania ich ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1, co potwierdziła analiza cytometryczna. Ponadto, komórki traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 wykazywały zwiększone tempo migracji, co może być związane ze wzrostem poziomu białka osteopontyny oraz spadkiem poziomu białka kaldesmonu (Li i wsp., 2007). Przełączeniu fenotypowemu VSMC towarzyszy intensywny proces apoptozy. Początkowo proces ten służy usunięciu ze ściany naczynia nieprawidłowych komórek i przyczynia się do wydajnej odbudowy warstwy mięśni gładkich w tętnicy, jednak w zaawansowanej miażdżycy, nasilona apoptoza VSMC koreluje z niestabilnością płytki miażdżycowej (Kim i wsp., 2019). Kluczową kaspazą szlaku apoptozy jest kaspaza 3, która występuje w komórce w nieaktywnej formie zymogenu. Kaspaza 3 aktywowana w wyniku stresu oksydacyjnego, uszkodzenia DNA oraz przez czynniki proapoptyczne, takie jak białko chłoniaka komórek B 2 (ang. B-cell lymphoma protein 2, Bcl2) lub TNF (Asadi i wsp., 2022; Eskandari i Eaves, 2022). W komórkach A7r5 traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 stwierdzono podwyższony poziom aktywnej formy kaspazy 3, co sugeruje zwiększenie poziomu apoptozy. W kontrolnych VSMC kształt komórek był wrzecionowaty z równolegle ułożonymi filamentami

aktywnymi. Taka organizacja cytoszkieletu VSMC była związana z wyraźnym skurczem VSMC w wyniku stymulacji angiotensyną II, charakteryzującym się dużą amplitudą skurczu oraz powolnym powrotem tych komórek do stanu wyjściowego. VSMC traktowane zarówno ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1, jak i znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT wykazywały dezorganizację filamentów aktynowych. Dezorganizacja układu aktyny może prowadzić do nieefektywnego generowania siły skurczu (Herr i wsp., 2014). Amplituda skurczu VSMC w wyniku traktowania komórek ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT uległa obniżeniu, a czas do osiągnięcia maksimum skurczu był znacznie wydłużony w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Co więcej, spadek siły skurczu w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 i ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT był powiązany ze spadkiem poziomu białka MYH11, który jest kluczowym markerem fenotypu kurczliwego, a spadek jego poziomu wskazuje na przełączenie fenotypowe VSMC (Brown i wsp., 2018; Lim i wsp., 2020). Wyniki te sugerują, że czynniki zawarte w ACM znad okołonaczyniowych adipocytów WT oraz z wyciszeniem SCD1 upośledzają zdolność skurczu VSMC oraz promują ich migrację. Ponadto, przedstawione wyniki wskazują, że efekt wzbudzający przełączenie fenotypowe VSMC jest silniejszy w przypadku komórek traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 niż ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT.

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują, że czynniki wydzielane przez okołonaczyniowe adipocyty *in vitro* prowadzą do przełączenia fenotypowego VSMC w kierunku fenotypu syntetycznego, co związane jest ze zwiększonym stopniem migracji i proliferacji VSMC oraz ze zmniejszoną zdolnością do skurczu. Przeprowadzone analizy *in vitro* sugerują, że funkcja wydzielnicza okołonaczyniowych adipocytów z brakiem ekspresji SCD1 również może się przyczyniać do obserwowanego fenotypu *in vivo*. W ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 zidentyfikowano kilka białkowych czynników, mogących potencjalnie przyczyniać się do przełączenia fenotypowego VSMC. Podwyższony poziom markerów fenotypu syntetycznego VSMC może być spowodowany zwiększonym poziomem chemokiny RANTES, która ma zdolność do zwiększania ekspresji osteopontyny i PCNA w VSMC (Lin i wsp., 2018). Również podwyższony poziom CRP i IGF-I/II w medium pohodowlanym znad adipocytów z wyciszeniem SCD1 może być potencjalnie wpływać na przełączenie fenotypowe VSMC,

którym towarzyszy spadek zdolności tych komórek do skurczu (Henze i wsp., 2019; Duan i wsp., 2000; Shuang i wsp., 2018; Jin i wsp., 2014; Miller i wsp., 2024). Okołonaczyniowe adipocyty z wyciszeniem SCD1 wykazują wyższy niż adipocyty WT poziom adiponektyny, która poprzez hamowanie skurczu VSMC może być odpowiedzialna za zahamowaną odpowiedź VSMC na stymulację angiotensyną II (Greenstein i wsp., 2009; Aghamohammadzadeh i wsp., 2015; Lynch i wsp., 2013). VSMC traktowane medium pochodzącym z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 charakteryzowały się też zwiększonym poziomem proliferacji i migracji. Białkowym czynnikiem zidentyfikowanym w medium pochodzącym z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 mogącym odpowiadać za to zjawisko jest FGF-1 (Takahashi i wsp., 2012; Li i wsp., 2002), którego poziom był wyższy w ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 niż w ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT. Z drugiej jednak strony, poziom HGF o właściwościach hamujących proliferację i migrację VSMC był obniżony w ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1, co również może być przyczyną zwiększonej proliferacji komórek traktowanych ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 (Morishita i wsp., 1996; Rittig i wsp., 2012). Zbadano również poziom mRNA genów kodujących adipokiny, których nie obejmowała analiza ACM. Stwierdzono, że w adipocytach z wyciszeniem SCD1 poziom mRNA kodujących wisfatynę, rezystynę i leptynę są podwyższone. Czynniki te mają dobrze udokumentowane działanie wpływające na patologiczne przełączenie fenotypowe VSMC, któremu towarzyszy zwiększony poziom migracji i proliferacji oraz zwiększony poziom produkcji białek macierzy pozakomórkowej (Romacho i wsp., 2009; Trovati i wsp., 2014; Martínez-Martínez i wsp., 2014; Huang i wsp., 2010; Calabro i wsp., 2004). Dlatego, o ile są one wydzielane do pożywki, to mogą potencjalnie przyczyniać się do zmian obserwowanych w VSMC traktowanych ACM z adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1.

Zbadano również stopień akumulacji kolagenu w aorcie myszy WT oraz z wyciszeniem SCD1. Podwyższona ilość kolagenu w aorcie często związana jest z chorobami takimi jak miażdżycy i nadciśnienie (Stakos i wsp., 2010). W patologicznym przebudowaniu aorty, polegającym na nadmiernej syntezie kolagenu biorą udział VSMC przechodzące przełączenie fenotypowe w kierunku fenotypu syntetycznego (Gong i wsp., 2020). U myszy z wyciszeniem SCD1 na diecie chow i HF stwierdzono wyższy niż u myszy WT poziom białka kolagenu w obu badanych odcinkach aorty: piersiowej i brzusznej. Dieta

HF w przypadku myszy WT również prowadziła do zwiększonej syntezy kolagenu w obu odcinkach aorty, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Hsu i wsp., 2004). Przedstawione w niniejszej pracy wyniki sugerują, że zwiększony stopień akumulacji kolagenu w aorcie myszy z wyciszeniem SCD1 może być skutkiem pogłębionej reakcji zapalnej lub zmienionego profilu adipokin wydzielanych przez PVAT.

8.7. Wpływ SCD1 na oddziaływanie pomiędzy okolonaczyniowymi adipocytami a EC

EC są komórkami tworzącymi najbardziej wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych, pozostając w bezpośrednim kontakcie z krwią (Krüger-Genge i wsp., 2019). EC biorą udział w procesach zapalnych poprzez ekspozycję na powierzchni białek adhezji komórkowej, np. VCAM-1 lub ICAM-1 (Singh i wsp., 2023). eNOS jest enzymem, który w EC katalizuje reakcję syntezy NO z cząsteczki L-argininy (Channon, 2004). eNOS jest aktywowany przez czynniki mechaniczne, np. ciśnienie krwi (Cui i wsp., 2011), czynniki hormonalne, np. insulinę lub VEGF (Montagnani i wsp., 2001; Gentile i wsp., 2013) oraz kinazy, takie jak AKT i AMPK (Yao i wsp., 2023; Sanz-Gómez i wsp., 2022). W komórkach EC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT fosforylacja eNOS była niższa w porównaniu z kontrolą, natomiast w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1, fosforylacja eNOS była wyższa niż w komórkach kontrolnych. Sugeruje to aktywację eNOS i potencjalnie zwiększony poziom produkcji NO. Co więcej, zwiększony poziom fosforylacji eNOS w komórkach traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 jest zgodny z wyższym poziomem fosforylacji AMPK, co sugeruje, że aktywacja eNOS mogła być zależna od aktywacji tej kinazy. Ponadto, EC traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 oraz ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT wykazywały wyższy poziom białka e-selektyny, która umożliwia rekrutację komórek odpornościowych, przyczyniając się do regulacji rozwoju stanu zapalnego (Zhang i wsp., 2024). Co ciekawe, w wyniku traktowania EC ACM znad komórek WT oraz z wyciszeniem SCD1 nie stwierdzono zwiększenia poziomu mRNA kodujących ICAM-1 i VCAM-1. Zjawisko to może być wytłumaczone faktem, że EC odpowiadają na czynniki prozapalne na dwa sposoby. Odpowiedź typu I to odpowiedź natychmiastowa, polegająca na potranskrypcyjnych mechanizmach regulacji ekspresji białek adhezji. W modelu tym już istniejące podjednostki białkowe są składane i ekspozowane na

powierzchni komórki bez zmian w poziomie kodujących je mRNA (Díaz-Pérez i wsp., 2016). Odpowiedź typu II ma miejsce, gdy stymulacja czynnikami prozapalnymi ma charakter długotrwały i wtedy wiąże się ona ze zmianami w poziomie mRNA genów kodujących białka adhezji komórkowej (Singh i wsp., 2021). W EC po traktowaniu ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 oraz ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT stwierdzono podwyższony poziom białka VEGF. VEGF jest krytycznym czynnikiem promującym angiogenezę poprzez stymulację proliferacji, migracji i różnicowania się EC. Najwyższy poziom białka VEGF stwierdzono w EC traktowanych ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1. Co więcej, komórki EC traktowane ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 wykazywały duży potencjał do angiogenezy *in vitro*. Wynik ten sugeruje, że czynniki wydzielane przez okołonaczyniowe adipocyty z brakiem ekspresji SCD1 mają zdolność do indukowania angiogenezy *in vitro* oraz do aktywacji eNOS poprzez AMPK. SCD1 może stymulować angiogenezę w guzach wątroby. Proces ten zależny jest od szlaku AMPK-mTOR-SREBP1, który SCD1 aktywuje poprzez syntezę MUFA (Liu i wsp., 2019). Z drugiej jednak strony, myszy z wyciszeniem SCD1 wykazują zmniejszony potencjał do rewaskularyzacji po zawale mięśnia sercowego (Gan i wsp., 2022). Sposób regulacji angiogenezy przez SCD1 może zatem być tkankowo specyficzny. W TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1 po 8 i 16 tygodniach diety HF gęstość sieci naczyń krwionośnych była wyższa niż u myszy WT na diecie HF. Świadczy to o zwiększonym stopniu angiogenezy w TPVAT myszy z wyciszeniem SCD1. W APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 gęstość sieci naczyń na diecie chow i po 8 tygodniach diety HF również była wyższa niż w APVAT myszy WT na diecie chow i po 8 tygodniach diety HF. Wyniki te wskazują, że brak SCD1 w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej stymuluje angiogenezę. Adipocyty w trakcie rozwoju tkanki tłuszczowej oraz stanu zapalnego wzbudzają formowanie się nowych naczyń krwionośnych, m.in., aby uniknąć stanu hipoksji wynikającej z niewystarczająco rozwiniętej sieci naczyń (Park i wsp., 2017; Michailidou i wsp., 2012). Wykonany test angiogenezy *in vitro* sugeruje, że za zwiększony stopień angiogenezy w PVAT mogą przynajmniej częściowo odpowiadać czynniki wydzielane przez okołonaczyniowe adipocyty. Poza przystosowawczym charakterem zwiększonej angiogenezy w tkankach, może ona również być markerem przewlekłego zapalenia wynikającego z hipoksji, która jest cechą charakterystyczną otyłości (Konisti i wsp., 2012; Corvera i wsp., 2022). W warunkach wzmożonej angiogenezy wywołanej stanem patologicznym, powstająca sieć naczyń krwionośnych jest nadmiernie rozgałęziona i niezorganizowana, a połączenia

międzykomórkowe są nieprawidłowo ukształtowane. Prowadzi to do zaburzenia funkcjonowania tkanki, m.in. poprzez pogłębienie zmian zapalnych (Dudley i Griffioen, 2023). Dieta HF prowadziła do intensywnej polaryzacji ATM w kierunku M1 oraz zwiększała ekspresję markerów zapalenia w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1. Wynik ten może być związany ze zwiększonym rozrostem sieci naczyń w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1. Z drugiej strony wykazano, że okołonaczyniowe adipocyty z wyciszeniem SCD1 posiadają wyższy poziom białek OXPHOS i UCP1, mają wyższą gęstość grzebieni mitochondrialnych, a ponadto w okołonaczyniowych adipocytach myszy z brakiem ekspresji SCD1 stwierdzono wyższe OCR *in vitro*. Ponieważ wszystkie te wyniki świadczą o zwiększonej intensywności metabolicznej adipocytów z wyciszeniem SCD1, zwiększenie gęstości sieci naczyń w obrębie PVAT może stanowić element zapewniający zaopatrzenie tkanek w tlen na odpowiednim poziomie. Zwiększenie poziomu białka e-selektyny w EC traktowanych ACM może mieć związek z obecnością prozapalnych czynników, takich jak RANTES (Dickhout i wsp., 2016), PTX3 (Kocyigit i wsp., 2014) i fetuina A (Siegel-Axel i wsp., 2014). Zwiększony poziom aktywacji eNOS może być związany z faktem, iż adipocyty z wyciszeniem SCD1 wykazują podwyższony poziom białka adiponektyny i IGF-I, które są aktywatorami tego enzymu (Ouchi i wsp., 2004; Kobayashi i wsp., 2004). Może jednak wynikać to również z faktu, że IL-6, która hamuje aktywność eNOS (Song i wsp., 2023),

w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 występuje na niższym poziomie niż w komórkach WT. Ponadto, za zwiększoną zdolność EC do angiogenezy *in vitro* mogą być odpowiedzialne następujące czynniki, których poziom był wyższym w ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 niż w ACM znad adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy WT: RANTES, który posiada zdolność do aktywacji EC w procesie rewaskularyzacji po uszkodzeniu ischemicznym (Suffee i wsp., 2017), IGF-II, który w procesie angiogenezy zwiększa aktywność p38 MAPK i metaloproteinaza macierzy 2 (ang. matrix metalloproteinase 2, MMP-2), która umożliwia tworzenie się naczyń poprzez proteolityczny rozkład białek macierzy pozakomórkowej (Lee i wsp., 2000) lub FGF1 i FGF21, które utrzymują ciągłość naczyń poprzez indukcję proliferacji i przeżywalności EC, oraz poprzez zwiększanie angiogenezy (Buehler i wsp., 2002; Hayrabedian i wsp., 2005; Pandit i wsp., 1998; Huang i wsp., 2019; Lü i wsp., 2010).

8.8. Rola SCD1 w regulacji ekspresji genów adiponektyny i IL-6

Poziom mRNA genu kodującego adiponektynę w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 był wyższy niż w adipocytach WT. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są zgodne z wcześniejszymi badaniami demonstrującymi, że brak ekspresji SCD1 zwiększa poziom białka adiponektyny w WAT (Hyun i wsp., 2010). Co ciekawe, również brak SCD1 wątrobie prowadził do podwyższenia poziomu białka adiponektyny w WAT oraz we krwi (Aljohani i wsp., 2019). Transkrypcja genu *Adipoq* jest regulowana epigenetycznie przez metylotransferazę sekwencji wzmacniającą Zeste 2 (ang. enhancer of Zeste 2, EZH2), która modyfikuje lizynę 27 histonu 3 poprzez wprowadzanie potrójnej metylacji (H3K27me3). Modyfikacja ta jest związana zamkniętą, nieaktywną transkrypcyjnie chromatyną (Yi i wsp., 2016). EZH2 jest aktywowana m.in. przez S6K i oba te białka są zaangażowane w represję genu adiponektyny poprzez zwiększanie ilości H3K27me3 w promotorze *Adipoq* (Yi i wsp., 2022). Wyniki ChIP-qPCR potwierdziły, że zwiększenie poziomu ekspresji adiponektyny w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 jest związane ze zmniejszeniem poziomu H3K27me3 w promotorze. Co więcej, traktowanie adipocytów z wyciszeniem SCD1 kwasami C16:1 i C18:1 zwiększyło ekspresję adiponektyny w stosunku do komórek kontrolnych z wyciszeniem SCD1. Zwiększenie ekspresji adiponektyny wiązało się ze spadkiem fosforylacji S6K. Wynik ten jest zgodny z wcześniej opublikowanymi badaniami, które demonstrują, że MUFA wpływają pozytywnie na ekspresję adiponektyny (Scoditti i wsp., 2015). Z drugiej strony, otrzymane wyniki sugerują, że zarówno brak możliwości syntezy MUFA przez komórki z wyciszeniem SCD1, jak i suplementacja MUFA jest w stanie podnieść poziom ekspresji *Adipoq*. To paradoksalne zjawisko może być wytłumaczone złożonością mechanizmów regulujących ekspresję genów adipokin. Zwiększenie ekspresji adiponektyny w komórkach z wyciszeniem SCD1 może być związane z uruchomieniem mechanizmu mającego na celu zniesienie skutków akumulacji SFA. Adiponektyna wykazuje bowiem właściwości przeciwzapalne i zwiększające wrażliwość na insulinę, a zatem przeciwstawne do tych wywołanych przez akumulację SFA (Ravaut i wsp., 2020; Straub i Scherer, 2019). Ponadto, adiponektyna wzmaga β -oksydację kwasów tłuszczowych poprzez aktywację AMPK (Straub i Scherer 2019). Traktowanie adipocytów wyizolowanych z PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 kwasami C16:1 i C18:1 może prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak PPAR γ , co może aktywować ekspresję kontrolowanych przez nie genów, w tym *Adipoq* (Li i wsp., 2019; Busato i Bionaz 2021). Do tej pory brak jest badań wykazujących zależność pomiędzy

aktywnością kompleksów mTOR a poziomem MUFA w komórce. Niemniej jednak, mTOR jest zaangażowany w regulację S6K w odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe, w tym na dostępność substancji odżywczych. MUFA zmieniają wewnątrzkomórkowy poziom cAMP, wpływając na aktywację AMPK (Ralston i wsp., 2020). AMPK moduluje aktywność mTOR, co może mieć bezpośrednie powiązanie z osią S6K/EZH2, która zmienia poziom ekspresji adiponektyny poprzez regulację poziomu H3K27me3 w promotorze. Do wyjaśnienia dokładnego mechanizmu potrzebne są dalsze badania, jednak wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że spadek fosforylacji S6K zależy od dostępności MUFA. Spadek ten powiązany jest ze spadkiem H3K27me3 w promotorze genu adiponektyny oraz ze wzrostem poziomu kodowanego przez ten gen białka (André i Cota 2012; Frias i wsp., 2023; Chen i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2012).

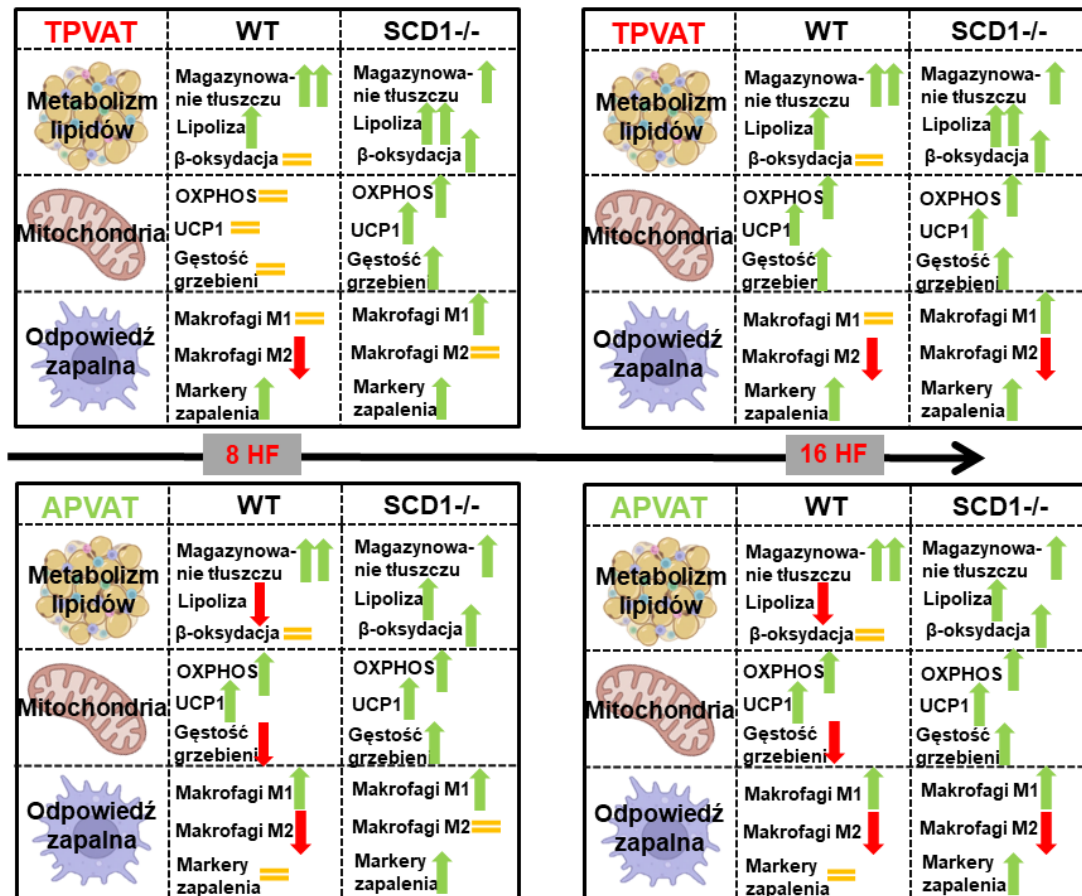
IL-6 jest cytokiną prozapalną, której poziom w trakcie otyłości jest podwyższony (Mauer i wsp., 2015; Carey i Febbraio, 2004). Jeśli wzrost poziomu IL-6 jest krótkotrwały, to wywiera to korzystny efekt metaboliczny. Poziom mRNA *Il-6* w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 był niższy niż w adipocytach WT. Wynik ten jest odwrotny w stosunku do tego, który został opisany u myszy z brakiem SCD1 w skórze, które wykazywały zwiększony poziom IL-6 (Dumas i wsp., 2019). Nadekspresja SCD1 w adipocytach 3T3-L1 zwiększyła metylację promotora genu *Il-6st*, zaangażowanego w przekazywanie sygnałów IL-6, co było związane z obniżeniem jego ekspresji (Malodobra-Mazur i wsp., 2014). Z drugiej strony, podanie rekombinowanej IL-6 myszom na diecie HF prowadziło do zwiększenia ekspresji genów kodujących enzymy lipogenezy, tj. ACC, FAS i SCD1, w wątrobie (Vida i wsp., 2015). Również samice myszy karmione dietą HF w trakcie lub przed ciążą wydzielaly duże ilości IL-6, co wywoływało stłuszczenie wątroby u potomstwa związane ze zwiększoną ekspresją SCD1 (Cao i wsp., 2020). Wyniki te świadczą o dwukierunkowym modelu regulacji pomiędzy IL-6 i SCD1, w którym IL-6 może działać jako mechanizm regulacyjny aktywujący ekspresję/aktywność SCD1. Efekt braku SCD1

w okołonaczyniowych adipocytach, w których dochodzi do zmniejszenia ekspresji *Il-6*, potwierdza tę zależność. Zmniejszenie poziomu H3K27me3 w promotorze *Il-6* jest związane ze zniesieniem represji tego genu i rozwojem zależnego od IL-6 stanu zapalnego (Wu i wsp., 2020; Zhao i wsp., 2020; Wang i wsp., 2017). Wykazano, że w okołonaczyniowych adipocytach z wyciszeniem SCD1 dochodzi do spadku poziomu IL-6 względem adipocytów WT, co jest związane ze wzrostem hamującej transkrypcję H3K27me3 we wszystkich trzech analizowanych odcinkach promotora IL-6. Co więcej, suplementacja komórek kwasem

C18:1, lecz nie C16:1, zwiększyła poziom IL-6 w okołonaczyniowych adipocytach, co było związane ze spadkiem H3K27me3 w promotorze genu *Il-6* do poziomu porównywalnego z komórkami WT. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami demonstrującymi, że suplementacja kwasem C18:1 jest w stanie zwiększyć poziom ekspresji *Il-6* w komórkach nabłonka płuc królika (Wang i wsp., 2014), w komórkach mięśni szkieletowych (Granados i wsp., 2011) oraz w nabłonku jelita cienkiego (Yoshida i wsp., 2001). Podsumowując, wynik ChIP-qPCR dla promotora genu *Il-6* sugeruje, że SCD1 reguluje produkcję IL-6 w okołonaczyniowych adipocytach poprzez zależną od poziomu kwasu C18:1 kontrolę poziomu H3K27me3 w promotorze genu *Il-6*.

8.9. Podsumowanie

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej dostarczają nowych informacji dotyczących roli SCD1 w regulacji metabolizmu, rozwoju stanu zapalnego oraz funkcji wydzielniczej PVAT. Brak SCD1 w TPVAT i APVAT prowadzi do zmniejszenia możliwości magazynowania TAG w trakcie diety HF, co związane jest z aktywacją procesu lipolizy (Rycina 41). Podwyższona lipoliza, spowodowana brakiem SCD1, powiązana była z aktywacją β -oksydacji oraz ze zwiększoną aktywnością oksydacyjną mitochondriów (Rycina 41). Przedstawione zmiany metaboliczne w TPVAT i APVAT myszy z wyciszeniem SCD1 w trakcie diety HF prowadzą do zwiększenia poziomu zapalenia oraz polaryzacji makrofagów w kierunku typu M1 (Rycina 41).

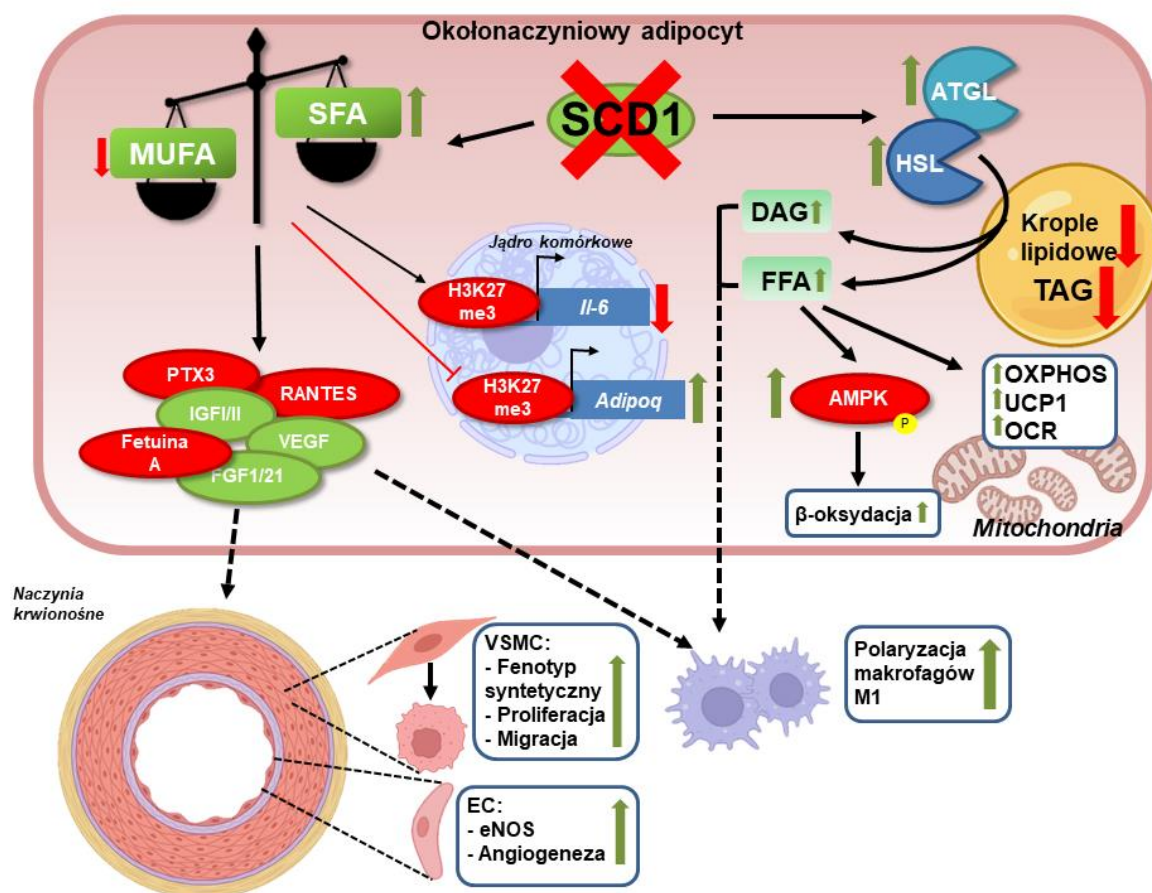


Rycina 41. Wpływ wyciszenia ekspresji SCD1 na metabolizm lipidów, funkcjonowanie mitochondriów i rozwój stanu zapalnego na TPVAT i APVAT myszy WT i SCD1^{-/-} na diecie HF. OXPHOS - kompleksy łańcucha oddechowego, UCP1 - białko rozprężające 1.

Prawdopodobny mechanizm molekularny leżący u podstaw zjawisk obserwowanych w PVAT myszy z wyciszeniem SCD1 został przedstawiony na rycinie 42. Brak SCD1 w adipocytach prowadzi do aktywacji lipolizy poprzez aktywację lipaz ATGL i HSL. Konsekwencją tej aktywacji jest zmniejszenie zawartości TAG, związane ze zmniejszoną objętością kropli lipidowych. W wyniku aktywowanej lipolizy, wewnątrzkomórkowy poziom DAG i FFA ulega podwyższeniu. Wysoki poziom FFA może przyczyniać się do zwiększenia aktywności oksydacyjnej mitochondriów. FFA i DAG mogą również działać jako czynnik aktywujący rekrutację prozapalnych makrofagów. Zmiany w stosunku SFA/MUFA mogą także być czynnikiem zmieniającym profil adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty. Wykazano, że wyciszenie SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach zwiększa poziom białka adiponektyny oraz zmniejsza poziom białka IL-6 poprzez zmiany w ilości H3K27me3 w promotorach kodujących je genów. Wyciszenie SCD1 w okołonaczyniowych adipocytach zmienia ponadto profil innych wydzielanych adipokin, które mogą przyczyniać się do pobudzenia angiogenezy oraz aktywacji eNOS w EC. Czynniki wydzielane przez okołonaczyniowe adipocyty z wyciszeniem SCD1 mogą ponadto odpowiadać za patologiczne

przełączenie fenotypowe VSMC, któremu towarzyszy wzmożona proliferacja i migracja oraz zmniejszenie zdolności do skurczu tych komórek.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej mogą przyczynić się do zrozumienia zależnych od SCD1 procesów regulujących prawidłowe funkcjonowanie PVAT w warunkach stresu wywołanego nadwyżką energetyczną pochodzącą z diety HF. W pracy wykazano zależność pomiędzy zmianami metabolicznymi zachodzącymi w okołonaczyniowych adipocytach w trakcie otyłości oraz ich funkcją wydzielniczą, za pomocą której PVAT przyczynia się do utrzymania homeostazy naczyń krwionośnych.



Rycina 42. Mechanizm działania zależnych od SCD1 zmian metabolicznych w okolonaczyniowych adipocytach oraz ich wpływ na homeostazę naczyńową. *Adipoq* - gen kodujący adiponektynę, AMPK - kinaza aktywowana przez adenosynomonofosforan, ATGL - specyficzna dla adipocytów lipaza triacylogliceroli, DAG - diacyloglicerole, EC - komórki śródbłonka, eNOS - syntaza tlenu azotu, FFA - wolne kwasy tłuszczowe, FGF - czynnik wzrostu fibroblastów, HSL - lipaza wrażliwa na hormony, IGF - insulinopodobny czynnik wzrostu, *Il-6* - interleukina 6, MUFA - jednoniensycone kwasy tłuszczowe, SFA - nasycone kwasy tłuszczowe, OCR - tempo zużycia tlenu, OXPHOS - kompleksy łańcucha oddechowego, PTX3 - pentraksyna 3, TAG - triacyloglicerole, UCP1 - białko rozprzęgające 1, VEGF - śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń, VSMC - komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

9. WNIOSKI KOŃCOWE

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- 1) Wyciszenie ekspresji SCD1 prowadzi do mniejszej akumulacji TAG w TPVAT i APVAT myszy w trakcie diety HF. Jest to związane z aktywacją lipaz ATGL i HSL.
- 2) SCD1 reguluje proces β -oksydacji w okołonaczyniowych adipocytach, wpływając na poziom białek VLCAD i PPAR α oraz na poziom fosforylacji AMPK i ACC.
- 3) Brak ekspresji SCD1 wpływa na strukturę i funkcję mitochondriów w PVAT, podwyższając poziom białek OXPHOS i UCP1 oraz zwiększając gęstość grzebieni mitochondrialnych i tempo zużycia tlenu w okołonaczyniowych adipocytach.
- 4) Wyciszenie SCD1, w warunkach obciążenia dietą HF, zwiększa rekrutację prozapalnych makrofagów CD11c⁺ oraz podwyższa poziom białek IL-1 β , IL-6 i NF- κ B w TPVAT i APVAT, prowadząc do rozwoju odpowiedzi zapalnej w tych tkankach.
- 5) Brak ekspresji SCD1 zmienia profil adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty, co przyczynia się do aktywacji eNOS w EC oraz pobudza angiogenezę poprzez zwiększanie poziomu białka VEGF w tych komórkach.
- 6) Zmiany w profilu adipokin wydzielanych przez okołonaczyniowe adipocyty spowodowane wyciszeniem ekspresji SCD1, prowadzą do patologicznych zmian fenotypowych w VSMC. Jest to powiązane z podwyższeniem poziomu białek osteopontyny i fibronektyny oraz ze wzrostem tempa migracji i proliferacji VSMC, co wpływa na obniżoną zdolność tych komórek do skurczu.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., Wakil, S. J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1444–1449.
2. Adachi, Y., Ueda, K., Nomura, S., Ito, K., Katoh, M., Katagiri, M., Yamada, S., Hashimoto, M., Zhai, B., Numata, G., Otani, A., Hinata, M., Hiraike, Y., Waki, H., Takeda, N., Morita, H., Ushiku, T., Yamauchi, T., Takimoto, E., Komuro, I. (2022). Beiging of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nature Communications*, 13(1), 5117.
3. Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C., Mouriño-Bayolo, D. (2019). Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73–90.
4. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S., Heagerty, A. M. (2015). Effects of obesity on perivascular adipose tissue vasorelaxant function: nitric oxide, inflammation and elevated systemic blood pressure. *Journal of Vascular Research*, 52(5), 299–305.
5. Ahmed, B., Sultana, R., Greene, M. W. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 137, 111315.
6. Ahn, K., Pan, S., Beningo, K., Hupe, D. (1995). A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences*, 56(26), 2331–2341.
7. Alcalá, M., Calderon-Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., Viana, M., Herrero, L. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports*, 7(1), 16082.
8. ALJohani, A. M., Syed, D. N., Ntambi, J. M. (2017). Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(12), 831–842.
9. Aljohani, A., Khan, M. I., Bonneville, A., Guo, C., Jeffery, J., O'Neill, L., Syed, D. N., Lewis, S. A., Burhans, M., Mukhtar, H., Ntambi, J. M. (2019). Hepatic stearoyl CoA desaturase 1 deficiency increases glucose uptake in adipose tissue partially through the PGC-1 α -FGF21 axis in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19475–19485.
10. Alsabeeh, N., Chausse, B., Kakimoto, P. A., Kowaltowski, A. J., Shirihai, O. (2018). Cell culture models of fatty acid overload: Problems and Solutions. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(2), 143–151.
11. André, C., Cota, D. (2012). Coupling nutrient sensing to metabolic homeostasis: the role of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 502–510.
12. Angueira, A. R., Sakers, A. P., Holman, C. D., Cheng, L., Arbocco, M. N., Shamsi, F., Lynes, M. D., Shrestha, R., Okada, C., Batmanov, K., Susztak, K., Tseng, Y. H.,

- Liaw, L., Seale, P. (2021). Defining the lineage of thermogenic perivascular adipose tissue. *Nature Metabolism*, 3(4), 469–484.
13. Angueira, A. R., Shapira, S. N., Ishibashi, J., Sampat, S., Sostre-Colón, J., Emmett, M. J., Titchenell, P. M., Lazar, M. A., Lim, H. W., Seale, P. (2020). Early B cell factor activity controls developmental and adaptive thermogenic gene programming in adipocytes. *Cell Reports*, 30(9), 2869–2878.e4.
 14. Arner P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*, 19(4), 471–482.
 15. Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633–1645.
 16. Attie, A. D., Flowers, M. T., Flowers, J. B., Groen, A. K., Kuipers, F., Ntambi, J. M. (2007). Stearoyl-CoA desaturase deficiency, hypercholesterolemia, cholestasis, and diabetes. *Nutrition Reviews*, 65(6 Pt 2), S35–S38.
 17. Attie, A. D., Krauss, R. M., Gray-Keller, M. P., Brownlie, A., Miyazaki, M., Kastelein, J. J., Lusis, A. J., Stalenhoef, A. F., Stoehr, J. P., Hayden, M. R., Ntambi, J. M. (2002). Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *Journal of Lipid Research*, 43(11), 1899–1907.
 18. Bae, J., Ricciardi, C. J., Esposito, D., Komarnytsky, S., Hu, P., Curry, B. J., Brown, P. L., Gao, Z., Biggerstaff, J. P., Chen, J., Zhao, L. (2014). Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 306(10), C918–C930.
 19. Bakan, I., Laplante, M. (2012). Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Current Opinion in Lipidology*, 23(3), 226–234.
 20. Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistritto G, Volpi A, Ensoli B, Manzari V. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function. *Atherosclerosis*. 2001 Feb 1;154(2):377-85.
 21. Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, 17(2), 200–205.
 22. Bednarski, T., Olichwier, A., Opasinska, A., Pyrkowska, A., Gan, A. M., Ntambi, J. M., Dobrzyn, P. (2016). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(12 Pt A), 2029–2037.
 23. Begum, M., Choubey, M., Tirumalasetty, M. B., Arbee, S., Mohib, M. M., Wahiduzzaman, M., Mamun, M. A., Uddin, M. B., & Mohiuddin, M. S. (2023). Adiponectin: a promising target for the treatment of diabetes and its complications. *Life*, 13(11), 2213.

24. Belfort, R., Mandarino, L., Kashyap, S., Wirfel, K., Pratipanawatr, T., Berria, R., DeFronzo, R. A., Cusi, K. (2005). Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*, 54(6), 1640–1648.
25. Belosludtsev, K., Saris, N. E., Andersson, L. C., Belosludtseva, N., Agafonov, A., Sharma, A., Moshkov, D. A., Mironova, G. D. (2006). On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca^{2+} in mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(2), 113–120.
26. Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., MacDougald, O. A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3324–3329.
27. Bertholet, A. M., Kazak, L., Chouchani, E. T., Bogaczyńska, M. G., Paranjpe, I., Wainwright, G. L., Bétourné, A., Kajimura, S., Spiegelman, B. M., Kirichok, Y. (2017). Mitochondrial patch clamp of beige adipocytes reveals UCP1-positive and UCP1-negative cells both exhibiting futile creatine cycling. *Cell Metabolism*, 25(4), 811–822.e4.
28. Birsoy, K., Chen, Z., Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metabolism*, 7(4), 339–347.
29. Björntorp P. (1991). Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*, 14(12), 1132–1143.
30. Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
31. Bond, L. M., Burhans, M. S., Ntambi, J. M. (2018). Uncoupling protein-1 deficiency promotes brown adipose tissue inflammation and ER stress. *PloS One*, 13(11), e0205726.
32. Braun, K., Oeckl, J., Westermeier, J., Li, Y., & Klingenspor, M. (2018). Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *Journal of Experimental Biology*, 221(Pt Suppl 1), jeb165381.
33. Brenner, R. R., Rimoldi, O. J., Lombardo, Y. B., González, M. S., Bernasconi, A. M., Chicco, A., Basabe, J. C. (2003). Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids*, 38(7), 733–742.
34. Brown, I. A. M., Diederich, L., Good, M. E., DeLalio, L. J., Murphy, S. A., Cortese-Krott, M. M., Hall, J. L., Le, T. H., Isakson, B. E. (2018). Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(9), 1969–1985.
35. Brown, J. M., Chung, S., Sawyer, J. K., Degirolamo, C., Alger, H. M., Nguyen, T., Zhu, X., Duong, M. N., Wibley, A. L., Shah, R., Davis, M. A., Kelley, K., Wilson, M. D., Kent, C., Parks, J. S., Rudel, L. L. (2008). Inhibition of stearyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation*, 118(14), 1467–1475.
36. Brownsey, R. W., Zhande, R., Boone, A. N. (1997). Isoforms of acetyl-CoA carboxylase: structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochemical Society Transactions*, 25(4), 1232–1238.

37. Bruemmer, D., Collins, A. R., Noh, G., Wang, W., Territo, M., Arias-Magallona, S., Fishbein, M. C., Blaschke, F., Kintscher, U., Graf, K., Law, R. E., Hsueh, W. A. (2003). Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1318–1331.
38. Buehler, A., Martire, A., Strohm, C., Wolfram, S., Fernandez, B., Palmen, M., Wehrens, X. H., Doevendans, P. A., Franz, W. M., Schaper, W., Zimmermann, R. (2002). Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovascular Research*, 55(4), 768–777.
39. Burchat, N., Akal, T., Ntambi, J. M., Trivedi, N., Suresh, R., & Sampath, H. (2022). SCD1 is nutritionally and spatially regulated in the intestine and influences systemic postprandial lipid homeostasis and gut-liver crosstalk. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(9), 159195.
40. Burhans, M. S., Flowers, M. T., Harrington, K. R., Bond, L. M., Guo, C. A., Anderson, R. M., Ntambi, J. M. (2015). Hepatic oleate regulates adipose tissue lipogenesis and fatty acid oxidation. *Journal of Lipid Research*, 56(2), 304–318.
41. Busato, S., Bionaz, M. (2021). When two plus two is more than four: evidence for a synergistic effect of fatty acids on peroxisome proliferator-activated receptor activity in a bovine hepatic model. *Genes*, 12(8), 1283.
42. Cai, M., Zhao, D., Han, X., Han, S., Zhang, W., Zang, Z., Gai, C., Rong, R., Gao, T. (2023). The role of perivascular adipose tissue-secreted adipocytokines in cardiovascular disease. *Frontiers in Immunology*, 14, 1271051.
43. Calabro, P., Samudio, I., Willerson, J. T., Yeh, E. T. (2004). Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*, 110(21), 3335–3340.
44. Campbell, L. E., Anderson, A. M., Chen, Y., Johnson, S. M., McMahon, C. E., Liu, J. (2022). Identification of motifs and mechanisms for lipid droplet targeting of the lipolytic inhibitors G0S2 and HIG2. *Journal of Cell Science*, 135(24), jcs260236.
45. Canello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., Guerre-Millo, M., Clément, K. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, 55(6), 1554–1561.
46. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470–1481.
47. Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359.
48. Cao, B., Liu, C., Zhang, Q., Dong, Y. (2020). Maternal high-fat diet leads to non-alcoholic fatty liver disease through upregulating hepatic SCD1 expression in neonate rats. *Frontiers in Nutrition*, 7, 581723.
49. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, 134(6), 933–944.

50. Carey, A. L., Febbraio, M. A. (2004). Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe?. *Diabetologia*, 47(7), 1135–1142.
51. Carling, D., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, 223(2), 217–222.
52. Cavallero, S., Roustaei, M., Satta, S., Cho, J. M., Phan, H., Baek, K. I., Blázquez-Medela, A. M., Gonzalez-Ramos, S., Vu, K., Park, S. K., Yokota, T., Sumner, J., Mack, J. J., Sigmund, C. D., Reddy, S. T., Li, R., Hsiai, T. K. (2024). Exercise mitigates flow recirculation and activates metabolic transducer SCD1 to catalyze vascular protective metabolites. *Science Advances*, 10(7), eadj7481.
53. Chang, L., Garcia-Barrio, M. T., Chen, Y. E. (2020). Perivascular adipose tissue regulates vascular function by targeting vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 40(5), 1094–1109.
54. Chang, L., Villacorta, L., Li, R., Hamblin, M., Xu, W., Dou, C., Zhang, J., Wu, J., Zeng, R., Chen, Y. E. (2012). Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation*, 126(9), 1067–1078.
55. Channon K. M. (2004). Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(8), 323–327.
56. Chattopadhyay, D., Das, S., Guria, S., Basu, S., Mukherjee, S. (2021). Fetuin-A regulates adipose tissue macrophage content and activation in insulin resistant mice through MCP-1 and iNOS: involvement of IFN γ -JAK2-STAT1 pathway. *The Biochemical Journal*, 478(22), 4027–4043.
57. Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11245–11250.
58. Chen, Z., Zhang, Y., Jia, C., Wang, Y., Lai, P., Zhou, X., Wang, Y., Song, Q., Lin, J., Ren, Z., Gao, Q., Zhao, Z., Zheng, H., Wan, Z., Gao, T., Zhao, A., Dai, Y., Bai, X. (2014). mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene*, 33(37), 4548–4557.
59. Cho, Y. K., Son, Y., Saha, A., Kim, D., Choi, C., Kim, M., Park, J. H., Im, H., Han, J., Kim, K., Jung, Y. S., Yun, J., Bae, E. J., Seong, J. K., Lee, M. O., Lee, S., Granneman, J. G., Lee, Y. H. (2021). STK3/STK4 signalling in adipocytes regulates mitophagy and energy expenditure. *Nature Metabolism*, 3(3), 428–441.
60. Chouchani, E. T., Kajimura, S. (2019). Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nature Metabolism*, 1(2), 189–200.
61. Choudhary, V., & Schneider, R. (2021). A unique junctional interface at contact sites between the endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 650186.
62. Choudhary, V., El Atab, O., Mizzon, G., Prinz, W. A., Schneider, R. (2020). Seipin and Nem1 establish discrete ER subdomains to initiate yeast lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 219(7), e201910177.

63. Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *Journal of Cell Biology*, 211(2), 261–271.
64. Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., Nagy, T. R. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in Nutrition*, 3, 10.
65. Cinti S. (2005). The adipose organ. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 73(1), 9–15.
66. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2347–2355.
67. Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N. D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A. A., Sharma, R., Hudgins, L. C., Ntambi, J. M., Friedman, J. M. (2002). Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*, 297(5579), 240–243.
68. Corvera, S., Solivan-Rivera, J., Yang Loureiro, Z. (2022). Angiogenesis in adipose tissue and obesity. *Angiogenesis*, 25(4), 439–453.
69. Cottier, S., Schneider, R. (2022). Lipid droplets form a network interconnected by the endoplasmic reticulum through which their proteins equilibrate. *Journal of Cell Science*, 135(5), jcs258819.
70. Cui, B., Huang, L., Fang, Y., Guo, R., Yin, Y., Zhao, X. (2011). Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation. *Microvascular Research*, 81(1), 143–150.
71. da Costa, R. M., Fais, R. S., Dechand, C. R. P., Louzada-Junior, P., Alberici, L. C., Lobato, N. S., Tostes, R. C. (2017). Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. *British Journal of Pharmacology*, 174(20), 3527–3541.
72. Dai, L., Bhargava, P., Stanya, K. J., Alexander, R. K., Liou, Y. H., Jacobi, D., Knudsen, N. H., Hyde, A., Gangl, M. R., Liu, S., Lee, C. H. (2017). Macrophage alternative activation confers protection against lipotoxicity-induced cell death. *Molecular Metabolism*, 6(10), 1186–1197.
73. de Souza, C. O., Vannice, G. K., Rosa Neto, J. C., Calder, P. C. (2018). Is Palmitoleic Acid a Plausible Nonpharmacological Strategy to Prevent or Control Chronic Metabolic and Inflammatory Disorders?. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(1), 10.1002/mnfr.201700504.
74. de Souza, R. R., Ferraz de Carvalho, C. A., Merluzzi Filho, T. J., Andrade Vieira, J. A. (1984). Functional anatomy of the perivascular tissue in the adductor canal. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch*, 130(5), 733–738.
75. Dhawan, D., Sharma, S. (2020). Abdominal obesity, adipokines and non-communicable diseases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 203, 105737.

76. Díaz-Delfin, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., Villarroya, F. (2012). TNF- α represses β -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology*, 153(9), 4238–4245.
77. Díaz-Pérez, F. I., Hiden, U., Gauster, M., Lang, I., Konya, V., Heinemann, A., Lögl, J., Saffery, R., Desoye, G., Cvitic, S. (2016). Post-transcriptional down regulation of ICAM-1 in feto-placental endothelium in GDM. *Cell Adhesion and Migration*, 10(1-2), 18–27.
78. Dickhout, A., Kaczor, D. M., Heinzmann, A. C. A., Brouns, S. L. N., Heemskerk, J. W. M., van Zandvoort, M. A. M. J., Koenen, R. R. (2021). Rapid internalization and nuclear translocation of CCL5 and CXCL4 in endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7332.
79. Ding, S., Gan, T., Xiang, Y., Zhu, X., Jin, Y., Ning, H., Guo, T., Zhao, S., Xie, J., Yuan, Z. (2022). FOS gene associated immune infiltration signature in perivascular adipose tissues of abdominal aortic aneurysm. *Gene*, 831, 146576.
80. Dobosz, A. M., Janikiewicz, J., Krogulec, E., Dziewulska, A., Ajduk, A., Szpila, M., Nieznańska, H., Szczepankiewicz, A. A., Wypych, D., Dobrzyn, A. (2023). Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 in the mouse impairs pancreatic islet morphogenesis and promotes loss of β -cell identity and α -cell expansion in the mature pancreas. *Molecular Metabolism*, 67, 101659.
81. Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Lee, S. H., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D. G., Friedman, J. M., Ntambi, J. M. (2005). Stearyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(3), E599–E607.
82. Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D. G., Friedman, J. M., Ntambi, J. M. (2004). Stearyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6409–6414.
83. Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Ntambi, J. M. (2010). Loss of stearyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2202–2210.
84. Dobrzyn, P., Sampath, H., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Ntambi, J. M. (2008). Loss of stearyl-CoA desaturase 1 inhibits fatty acid oxidation and increases glucose utilization in the heart. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 294(2), E357–E364.
85. Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., Viana, M., Herrero, L. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports*, 7(1), 16082.
86. Duan, C., Bauchat, J. R., Hsieh, T. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation Research*, 86(1), 15–23.

87. Dubrovská, G., Verlohren, S., Luft, F. C., Gollasch, M. (2004). Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 286(3), H1107–H1113.
88. Dudley, A. C., Griffioen, A. W. (2023). Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*, 26(3), 313–347.
89. Dumas, S. N., Guo, C. A., Kim, J. K., Friedline, R. H., Ntambi, J. M. (2019). Interleukin-6 derived from cutaneous deficiency of stearoyl-CoA desaturase-1 may mediate metabolic organ crosstalk among skin, adipose tissue and liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 87–91.
90. Dzięwulska, A., Dobosz, A. M., Dobrzyn, A., Smolinska, A., Kolczynska, K., Ntambi, J. M., Dobrzyn, P. (2020). SCD1 regulates the AMPK/SIRT1 pathway and histone acetylation through changes in adenine nucleotide metabolism in skeletal muscle. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 1129–1140.
91. Eelen, G., Treppe, L., Li, X., Carmeliet, P. (2020). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research*, 127(2), 310–329.
92. Engin, A. B. (2024). Mechanism of obesity-related lipotoxicity and clinical perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1460, 131–166.
93. Eskandari, E., Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159.
94. Fang, R., Yang, S., Gu, X., Li, C., Bi, N., Wang, H. L. (2022). Early-life exposure to bisphenol A induces dysregulation of lipid homeostasis by the upregulation of SCD1 in male mice. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 304, 119201.
95. Fedorenko, A., Lishko, P. V., Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151(2), 400–413.
96. Finucane, O. M., Lyons, C. L., Murphy, A. M., Reynolds, C. M., Klinger, R., Healy, N. P., Cooke, A. A., Coll, R. C., McAllan, L., Nilaweera, K. N., O'Reilly, M. E., Tierney, A. C., Morine, M. J., Alcalá-Díaz, J. F., López-Miranda, J., O'Connor, D. P., O'Neill, L. A., McGillicuddy, F. C., Roche, H. M. (2015). Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes*, 64(6), 2116–2128.
97. Fischer, K., Ruiz, H. H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D. J., van der Heide, V., Kalinovich, A. V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., Shin, A. C., Divanovic, S., Brombacher, F., Glasmacher, E., Keipert, S., Jastroch, M., Nagler, J., Schramm, K. W., Medrikova, D., Collden, G., Buettner, C. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature Medicine*, 23(5), 623–630.
98. Fischer-Posovszky, P., Wang, Q. A., Asterholm, I. W., Rutkowski, J. M., Scherer, P. E. (2011). Targeted deletion of adipocytes by apoptosis leads to adipose tissue recruitment of alternatively activated M2 macrophages. *Endocrinology*, 152(8), 3074–3081.
99. Fitzgibbons, T. P., Kogan, S., Aouadi, M., Hendricks, G. M., Straubhaar, J., Czech, M. P. (2011). Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their

- resistance to diet-induced inflammation. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(4), H1425–H1437.
100. Flier J. S. (2023). Moderating "the great debate": The carbohydrate-insulin vs. the energy balance models of obesity. *Cell metabolism*, 35(5), 737–741.
 101. Flowers, M. T., Ade, L., Strable, M. S., & Ntambi, J. M. (2012). Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1646–1653.
 102. Flowers, M. T., Groen, A. K., Oler, A. T., Keller, M. P., Choi, Y., Schueler, K. L., Richards, O. C., Lan, H., Miyazaki, M., Kuipers, F., Kendzierski, C. M., Ntambi, J. M., Attie, A. D. (2006). Cholestasis and hypercholesterolemia in SCD1-deficient mice fed a low-fat, high-carbohydrate diet. *Journal of Lipid Research*, 47(12), 2668–2680.
 103. Frias, M. A., Hatipoglu, A., Foster, D. A. (2023). Regulation of mTOR by phosphatidic acid. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 34(3), 170–180.
 104. Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition Research Reviews*, 27(1), 63–93.
 105. Gagelin, A., Largeau, C., Masscheleyn, S., Piel, M. S., Calderón-Mora, D., Bouillaud, F., Hénin, J., Miroux, B. (2023). Molecular determinants of inhibition of UCP1-mediated respiratory uncoupling. *Nature Communications*, 14(1), 2594.
 106. Gaidhu, M. P., Bikopoulos, G., Ceddia, R. B. (2012). Chronic AICAR-induced AMP-kinase activation regulates adipocyte lipolysis in a time-dependent and fat depot-specific manner in rats. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(11), C1192–C1197.
 107. Gan, A. M., Tracz-Gaszewska, Z., Ellert-Miklaszewska, A., Navrulin, V. O., Ntambi, J. M., Dobrzyn, P. (2022). Stearoyl-CoA desaturase regulates angiogenesis and energy metabolism in ischemic cardiomyocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10459.
 108. Gao Y. J. (2007). Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Current Pharmaceutical Design*, 13(21), 2185–2192.
 109. Garton, A. J., Yeaman, S. J. (1990). Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *European Journal of Biochemistry*, 191(1), 245–250.
 110. Gasser, E., Sancar, G., Downes, M., Evans, R. M. (2022). Metabolic messengers: fibroblast growth factor 1. *Nature Metabolism*, 4(6), 663–671.
 111. Geissbuehler, M., Spielmann, T., Formey, A., Märki, I., Leutenegger, M., Hinz, B., Johnsson, K., Van De Ville, D., Lasser, T. (2010). Triplet imaging of oxygen consumption during the contraction of a single smooth muscle cell (A7r5). *Biophysical journal*, 98(2), 339–349.
 112. Geng, Y. J., Azuma, T., Tang, J. X., Hartwig, J. H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P., Kwiatkowski, D. J. (1998). Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle

- cells exposed to proinflammatory cytokines. *European Journal of Cell Biology*, 77(4), 294–302.
113. Ghaben, A. L., Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258.
 114. Gil-Ordóñez, A., Martín-Fontecha, M., Ortega-Gutiérrez, S., López-Rodríguez, M. L. (2018). Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target. *Biochemical Pharmacology*, 157, 18–32.
 115. Glukhova, M. A., Kabakov, A. E., Frid, M. G., Ornatsky, O. I., Belkin, A. M., Mukhin, D. N., Orekhov, A. N., Koteliansky, V. E., Smirnov, V. N. (1988). Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9542–9546.
 116. Gollasch, M., Dubrovskaya, G. (2004). Paracrine role for periaortic adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(12), 647–653.
 117. Gong, J., Campos, H., McGarvey, S., Wu, Z., Goldberg, R., Baylin, A. (2011). Genetic variation in stearoyl-CoA desaturase 1 is associated with metabolic syndrome prevalence in Costa Rican adults. *Journal of Nutrition*, 141(12), 2211–2218.
 118. Gong, J., Zhou, D., Jiang, L., Qiu, P., Milewicz, D. M., Chen, Y. E., & Yang, B. (2020). In vitro lineage-specific differentiation of vascular smooth muscle cells in response to SMAD3 deficiency: implications for SMAD3-related thoracic aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(7), 1651–1663.
 119. Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Choi, J., Wolfgang, M. J. (2018). Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Molecular Metabolism*, 7, 45–56.
 120. Goto, T., Naknukool, S., Yoshitake, R., Hanafusa, Y., Tokiwa, S., Li, Y., Sakamoto, T., Nitta, T., Kim, M., Takahashi, N., Yu, R., Daiyasu, H., Seno, S., Matsuda, H., Kawada, T. (2016). Proinflammatory cytokine interleukin-1 β suppresses cold-induced thermogenesis in adipocytes. *Cytokine*, 77, 107–114.
 121. Granados, N., Amengual, J., Ribot, J., Palou, A., & Bonet, M. L. (2011). Distinct effects of oleic acid and its trans-isomer elaidic acid on the expression of myokines and adipokines in cell models. *The British Journal of Nutrition*, 105(8), 1226–1234.
 122. Greenstein, A. S., Khavandi, K., Withers, S. B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., Laing, I., Yates, A. P., Pemberton, P. W., Malik, R. A., Heagerty, A. M. (2009). Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*, 119(12), 1661–1670.
 123. Gu, P., Hui, X., Zheng, Q., Gao, Y., Jin, L., Jiang, W., Zhou, C., Liu, T., Huang, Y., Liu, Q., Nie, T., Wang, Y., Wang, Y., Zhao, J., Xu, A. (2021). Mitochondrial uncoupling protein 1 antagonizes atherosclerosis by blocking NLRP3 inflammasome-dependent interleukin-1 β production. *Science Advances*, 7(50), eabl4024.

124. Guo, Q., Li, N., Shi, H., Gan, Y., Wang, W., Jia, J., Zhou, Y. (2024). Aerobic exercise prevents high-fat-diet-induced adipose tissue dysfunction in male mice. *Nutrients*, 16(20), 3451.
125. Guzik, T. J., Marvar, P. J., Czesnikiewicz-Guzik, M., Korbout, R. (2007). Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. *Journal of Physiology and Pharmacology : an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 58(4), 591–610.
126. Harms, M., Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–1263.
127. Hayrabyan, S., Kyurkchiev, S., Kehayov, I. (2005). FGF-1 and S100A13 possibly contribute to angiogenesis in endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 67(1-2), 87–101.
128. Henrichot, E., Juge-Aubry, C. E., Pernin, A., Pache, J. C., Velebit, V., Dayer, J. M., Meda, P., Chizzolini, C., Meier, C. A. (2005). Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis?. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(12), 2594–2599.
129. Henriques, F., Bedard, A. H., Guilherme, A., Kelly, M., Chi, J., Zhang, P., Lifshitz, L. M., Bellvé, K., Rowland, L. A., Yenilmez, B., Kumar, S., Wang, Y., Luban, J., Weinstein, L. S., Lin, J. D., Cohen, P., Czech, M. P. (2020). Single-cell RNA profiling reveals adipocyte to macrophage signaling sufficient to enhance thermogenesis. *Cell Reports*, 32(5), 107998.
130. Henze, L. A., Luong, T. T. D., Boehme, B., Masyout, J., Schneider, M. P., Brachs, S., Lang, F., Pieske, B., Pasch, A., Eckardt, K. U., Voelkl, J., Alesutan, I. (2019). Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells. *Aging*, 11(15), 5445–5462.
131. Hepler, C., Vishvanath, L., Gupta, R. K. (2017). Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes and Development*, 31(2), 127–140.
132. Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., Blüher, M., Klein, S., Kahn, B. B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*, 484(7394), 333–338.
133. Herr, M. J., Mabry, S. E., Jennings, L. K. (2014). Tetraspanin CD9 regulates cell contraction and actin arrangement via RhoA in human vascular smooth muscle cells. *PloS One*, 9(9), e106999.
134. Hiraike Y. (2023). Chromatin immunoprecipitation with mouse adipocytes using hypotonic buffer to enrich nuclear fraction before fixation. *STAR Protocols*, 4(1), 102093
135. Houten, S. M., Wanders, R. J. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5), 469–477.
136. Hsieh, W. Y., Zhou, Q. D., York, A. G., Williams, K. J., Scumpia, P. O., Kronenberger, E. B., Hoi, X. P., Su, B., Chi, X., Bui, V. L., Khialeeva, E., Kaplan, A., Son, Y. M., Divakaruni, A. S., Sun, J., Smale, S. T., Flavell, R. A., Bensinger, S. J. (2020). Toll-like receptors induce signal-specific reprogramming of the macrophage lipidome. *Cell Metabolism*, 32(1), 128–143.e5.

137. Hsu, H. H., Tawfik, O., Sun, F. (2004). Mechanism of dystrophic calcification in rabbit aortas: temporal and spatial distributions of calcifying vesicles and calcification-related structural proteins. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 13(1), 3–10.
138. Huang, F., Xiong, X., Wang, H., You, S., Zeng, H. (2010). Leptin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via regulating cell cycle, activating ERK1/2 and NF-kappaB. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(5), 325–331.
139. Huang, H., Song, T. J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M. D., Tang, Q. Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12670–12675.
140. Huang, W., Shao, M., Liu, H., Chen, J., Hu, J., Zhu, L., Liu, F., Wang, D., Zou, Y., Xiong, Y., Wang, X. (2019). Fibroblast growth factor 21 enhances angiogenesis and wound healing of human brain microvascular endothelial cells by activating PPAR γ . *Journal of Pharmacological Sciences*, 140(2), 120–127.
141. Hulver, M. W., Berggren, J. R., Carper, M. J., Miyazaki, M., Ntambi, J. M., Hoffman, E. P., Thyfault, J. P., Stevens, R., Dohm, G. L., Houmard, J. A., Muoio, D. M. (2005). Elevated stearyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metabolism*, 2(4), 251–261.
142. Hyun, C. K., Kim, E. D., Flowers, M. T., Liu, X., Kim, E., Strable, M., Ntambi, J. M. (2010). Adipose-specific deletion of stearyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), 480–486.
143. Jani, S., Da Eira, D., Ceddia, R. B. (2023). Insulin-resistant female rat skeletal muscles display diacylglycerol-mediated protein kinase C activation and inflammation without ceramide accumulation. *Journal of Physiology*, 601(10), 1745–1759.
144. Jiang, H., Lun, Y., Wu, X., Xia, Q., Zhang, X., Xin, S., Zhang, J. (2014). Association between the hypomethylation of osteopontin and integrin β 3 promoters and vascular smooth muscle cell phenotype switching in great saphenous varicose veins. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18747–18761.
145. Jiang, Q., Huang, R., Cai, S., Wang, C. L. (2010). Caldesmon regulates the motility of vascular smooth muscle cells by modulating the actin cytoskeleton stability. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 6.
146. Jin, C., Guo, J., Qiu, X., Ma, K., Xiang, M., Zhu, X., Guo, J. (2014). IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 34(4), 325–331.
147. Jin, E. S., Lee, M. H., Murphy, R. E., Malloy, C. R. (2018). Pentose phosphate pathway activity parallels lipogenesis but not antioxidant processes in rat liver. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 314(6), E543–E551.

148. Johnson, L., Mander, A. P., Jones, L. R., Emmett, P. M., Jebb, S. A. (2008). Energy-dense, low-fiber, high-fat dietary pattern is associated with increased fatness in childhood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), 846–854.
149. Kajimura, S., Spiegelman, B. M., Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546–559.
150. Kalisz, M., Chmielowska, M., Martyńska, L., Domańska, A., Bik, W., Litwiniuk, A. (2021). All-trans-retinoic acid ameliorates atherosclerosis, promotes perivascular adipose tissue browning, and increases adiponectin production in Apo-E mice. *Scientific Reports*, 11(1), 4451.
151. Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B., Lee, C. H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metabolism*, 7(6), 485–495.
152. Karastergiou, K., Fried, S. K. (2017). Cellular mechanisms driving sex differences in adipose tissue biology and body shape in humans and mouse models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1043, 29–51.
153. Kemp, F., Braverman, E. L., Byersdorfer, C. A. (2024). Fatty acid oxidation in immune function. *Frontiers in Immunology*, 15, 1420336.
154. Kennedy, E., Hakimjavadi, R., Greene, C., Mooney, C. J., Fitzpatrick, E., Collins, L. E., Loscher, C. E., Guha, S., Morrow, D., Redmond, E. M., Cahill, P. A. (2014). Embryonic rat vascular smooth muscle cells revisited - a model for neonatal, neointimal SMC or differentiated vascular stem cells? *Vascular Cell*, 6(1), 6.
155. Kim, J. B., Spiegelman, B. M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes and Development*, 10(9), 1096–1107.
156. Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M., Spiegelman, B. M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARGamma through the production of endogenous ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4333–4337.
157. Kim, J. E., Kim, J. S., Jo, M. J., Cho, E., Ahn, S. Y., Kwon, Y. J., Ko, G. J. (2022). The roles and associated mechanisms of adipokines in development of metabolic syndrome. *Molecules*, 27(2), 334.
158. Kim, J. Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M. E., Hofmann, S. M., Schraw, T., Durand, J. L., Li, H., Li, G., Jelicks, L. A., Mehler, M. F., Hui, D. Y., Deshaies, Y., Shulman, G. I., Schwartz, G. J., Scherer, P. E. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2621–2637.
159. Kim, S. M., Huh, J. W., Kim, E. Y., Shin, M. K., Park, J. E., Kim, S. W., Lee, W., Choi, B., Chang, E. J. (2019). Endothelial dysfunction induces atherosclerosis: increased aggrecan expression promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *BMB Reports*, 52(2), 145–150.
160. Kirwan, A. M., Lenighan, Y. M., O'Reilly, M. E., McGillicuddy, F. C., Roche, H. M. (2017). Nutritional modulation of metabolic inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 45(4), 979–985.

161. Ko, K., Woo, J., Bae, J. Y., Roh, H. T., Lee, Y. H., Shin, K. O. (2018). Exercise training improves intramuscular triglyceride lipolysis sensitivity in high-fat diet induced obese mice. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 81.
162. Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2004). Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circulation Research*, 94(4), e27–e31.
163. Kocyigit, I., Eroglu, E., Orselik, O., Unal, A., Gungor, O., Ozturk, F., Karakukcu, C., Imamoglu, H., Sipahioglu, M. H., Tokgoz, B., Oymak, O. (2014). Pentraxin 3 as a novel bio-marker of inflammation and endothelial dysfunction in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of Nephrology*, 27(2), 181–186.
164. Koenen, M., Hill, M. A., Cohen, P., Sowers, J. R. (2021). Obesity, adipose tissue and vascular dysfunction. *Circulation Research*, 128(7), 951–968.
165. Kompare, M., Rizzo, W. B. (2008). Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Seminars in Pediatric Neurology*, 15(3), 140–149.
166. Kong, L. R., Zhou, Y. P., Chen, D. R., Ruan, C. C., Gao, P. J. (2018). Decrease of perivascular adipose tissue browning is associated with vascular dysfunction in spontaneous hypertensive rats during aging. *Frontiers in Physiology*, 9, 400.
167. Konisti, S., Kiriakidis, S., Paleolog, E. M. (2012). Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 8(3), 153–162.
168. Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K. Q., Kuzma, J. N., Larson, I., Billing, P. S., Landerholm, R. W., Crouthamel, M., Gozal, D., Hwang, S., Singh, P. K., Becker, L. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metabolism*, 20(4), 614–625.
169. Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., Jung, F. (2019). Vascular endothelial cell biology: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411.
170. Lafontan, M., Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*, 48(5), 275–297.
171. Lê, K. A., Faeh, D., Stettler, R., Debard, C., Loizon, E., Vidal, H., Boesch, C., Ravussin, E., Tappy, L. (2008). Effects of four-week high-fructose diet on gene expression in skeletal muscle of healthy men. *Diabetes and Metabolism*, 34(1), 82–85.
172. Lee, M. R., Kim, J. E., Jin, Y. J., Roh, Y. J., Seol, A., Song, H. J., Jung, M. W., Hong, J. T., Jang, M., Hwang, D. Y. (2022). Anti-obesity effects of agar (*Gelidium amansii*)-derived oligosaccharides in high-fat diet-treated C57BL/6N mice due to differential regulations of lipogenesis and lipolysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 86(12), 1648–1657.
173. Lee, O. H., Bae, S. K., Bae, M. H., Lee, Y. M., Moon, E. J., Cha, H. J., Kwon, Y. G., Kim, K. W. (2000). Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *British Journal of Cancer*, 82(2), 385–391.
174. Lee, S. H., Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Rahman, S. M., Miyazaki, M., Ntambi, J. M. (2004). Lack of stearoyl-CoA desaturase 1 upregulates basal thermogenesis but

- causes hypothermia in a cold environment. *Journal of Lipid Research*, 45(9), 1674–1682.
175. Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Jr, Liu, X. S., Lazar, M. A. (2008). PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes and Development*, 22(21), 2941–2952.
 176. Legrand-Poels, S., Esser, N., L'homme, L., Scheen, A., Paquot, N., Piette, J. (2014). Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 131–141.
 177. LeRoith, D., Holly, J. M. P., Forbes, B. E. (2021). Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors. *Molecular Metabolism*, 52, 101245.
 178. Li, G., Oparil, S., Kelpke, S. S., Chen, Y. F., Thompson, J. A. (2002). Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation*, 106(7), 854–859.
 179. Li, J. J., Han, M., Wen, J. K., Li, A. Y. (2007). Osteopontin stimulates vascular smooth muscle cell migration by inducing FAK phosphorylation and ILK dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1), 13–19.
 180. Li, R. M., Chen, S. Q., Zeng, N. X., Zheng, S. H., Guan, L., Liu, H. M., Zhou, L. Q., Xu, J. W. (2017). Browning of abdominal aorta perivascular adipose tissue inhibits adipose tissue inflammation. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 15(9), 450–457.
 181. Li, X. Z., Yan, Y., Zhang, J. F., Sun, J. F., Sun, B., Yan, C. G., Choi, S. H., Johnson, B. J., Kim, J. K., Smith, S. B. (2019). Oleic acid in the absence of a PPAR γ agonist increases adipogenic gene expression in bovine muscle satellite cells¹. *Journal of Animal Science*, 97(10), 4114–4123.
 182. Li, X., Ballantyne, L. L., Yu, Y., Funk, C. D. (2019). Perivascular adipose tissue-derived extracellular vesicle miR-221-3p mediates vascular remodeling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(11), 12704–12722.
 183. Li, X., Ma, Z., Zhu, Y. Z. (2021). Regional heterogeneity of perivascular adipose tissue: morphology, origin, and secretome. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 697720.
 184. Lidell, M. E., Betz, M. J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K. A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M., Enerbäck, S. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature Medicine*, 19(5), 631–634.
 185. Lim, W. W., Corden, B., Ng, B., Vanezis, K., D'Agostino, G., Widjaja, A. A., Song, W. H., Xie, C., Su, L., Kwek, X. Y., Tee, N. G. Z., Dong, J., Ko, N. S. J., Wang, M., Pua, C. J., Jamal, M. H., Soh, B., Viswanathan, S., Schafer, S., Cook, S. A. (2020). Interleukin-11 is important for vascular smooth muscle phenotypic switching and aortic inflammation, fibrosis and remodeling in mouse models. *Scientific Reports*, 10(1), 17853.

186. Lin, C. S., Hsieh, P. S., Hwang, L. L., Lee, Y. H., Tsai, S. H., Tu, Y. C., Hung, Y. W., Liu, C. C., Chuang, Y. P., Liao, M. T., Chien, S., Tsai, M. C. (2018). The CCL5/CCR5 axis promotes vascular smooth muscle cell proliferation and atherogenic phenotype switching. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 47(2), 707–720.
187. Lin, J., Duan, J., Wang, Q., Xu, S., Zhou, S., Yao, K. (2022). Mitochondrial dynamics and mitophagy in cardiometabolic disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 917135.
188. Lindholm, C. R., Ertel, R. L., Bauwens, J. D., Schmuck, E. G., Mulligan, J. D., Saupe, K. W. (2013). A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(2), 165–175.
189. Liu, G., Kuang, S., Cao, R., Wang, J., Peng, Q., Sun, C. (2019). Sorafenib kills liver cancer cells by disrupting SCD1-mediated synthesis of monounsaturated fatty acids via the ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 signaling pathway. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(9), 10089–10103.
190. Liu, J., Liu, Q., Wan, Y., Zhao, Z., Yu, H., Luo, H., Tang, Z. (2014). Osteopontin promotes the progression of gastric cancer through the NF- κ B pathway regulated by the MAPK and PI3K. *International Journal of Oncology*, 45(1), 282–290.
191. Liu, K., Lin, L., Li, Q., Xue, Y., Zheng, F., Wang, G., Zheng, C., Du, L., Hu, M., Huang, Y., Shao, C., Kong, X., Melino, G., Shi, Y., Wang, Y. (2020). Scd1 controls de novo beige fat biogenesis through succinate-dependent regulation of mitochondrial complex II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(5), 2462–2472.
192. Liu, P., Huang, G., Cao, Z., Xie, Q., Wei, T., Huang, C., Li, Q., Sun, M., Shen, W., Gao, P. (2017). Haematopoietic TLR4 deletion attenuates perivascular brown adipose tissue inflammation in atherosclerotic mice. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(9), 946–957.
193. Liu, X., Strable, M. S., Ntambi, J. M. (2011). Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(1), 15–22.
194. Liu, X., Wang, S., You, Y., Meng, M., Zheng, Z., Dong, M., Lin, J., Zhao, Q., Zhang, C., Yuan, X., Hu, T., Liu, L., Huang, Y., Zhang, L., Wang, D., Zhan, J., Jong Lee, H., Speakman, J. R., Jin, W. (2015). Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice. *Endocrinology*, 156(7), 2461–2469.
195. Löhn, M., Dubrovskaja, G., Lauterbach, B., Luft, F. C., Gollasch, M., Sharma, A. M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 1057–1063.
196. Longo, N., Frigeni, M., Pasquali, M. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(10), 2422–2435.

197. Lowe, C. E., O'Rahilly, S., Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 16), 2681–2686.
198. Lu, X., Altshuler-Keylin, S., Wang, Q., Chen, Y., Henrique Sponton, C., Ikeda, K., Maretich, P., Yoneshiro, T., Kajimura, S. (2018). Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism. *Science Signaling*, 11(527), eaap8526.
199. Lü, Y., Liu, J. H., Zhang, L. K., DU, J., Zeng, X. J., Hao, G., Huang, J., Zhao, D. H., Wang, G. Z., Zhang, Y. C. (2010). Fibroblast growth factor 21 as a possible endogenous factor inhibits apoptosis in cardiac endothelial cells. *Chinese Medical Journal*, 123(23), 3417–3421.
200. Lu, Y., Zhou, Z., Tao, J., Dou, B., Gao, M., Liu, Y. (2014). Overexpression of stearyl-CoA desaturase 1 in bone marrow mesenchymal stem cells enhance the expression of induced endothelial cells. *Lipids in Health and Disease*, 13, 53.
201. Ludwig, D. S., Aronne, L. J., Astrup, A., de Cabo, R., Cantley, L. C., Friedman, M. I., Heymsfield, S. B., Johnson, J. D., King, J. C., Krauss, R. M., Lieberman, D. E., Taubes, G., Volek, J. S., Westman, E. C., Willett, W. C., Yancy, W. S., Ebbeling, C. B. (2021). The carbohydrate-insulin model: a physiological perspective on the obesity pandemic. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114(6), 1873–1885.
202. Lundman, P., Boquist, S., Samnegård, A., Bennermo, M., Held, C., Ericsson, C. G., Silveira, A., Hamsten, A., Tornvall, P. (2007). A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 17(3), 195–202.
203. Luo, B., Wang, Z., Zhang, Z., Shen, Z., Zhang, Z. (2019). The deficiency of macrophage erythropoietin signaling contributes to delayed acute inflammation resolution in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1865(2), 339–349.
204. Lynch, F. M., Withers, S. B., Yao, Z., Werner, M. E., Edwards, G., Weston, A. H., Heagerty, A. M. (2013). Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 304(6), H786–H795.
205. Ma, H., Calderon, T. M., Kessel, T., Ashton, A. W., Berman, J. W. (2003). Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. *Circulation Research*, 93(11), 1066–1073.
206. MacDonald, M. L., van Eck, M., Hildebrand, R. B., Wong, B. W., Bissada, N., Ruddle, P., Kontush, A., Hussein, H., Pouladi, M. A., Chapman, M. J., Fievet, C., van Berkel, T. J., Staels, B., McManus, B. M., Hayden, M. R. (2009). Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(3), 341–347.
207. Maliszewska, K., Kretowski, A. (2021). Brown adipose tissue and its role in insulin and glucose homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1530.
208. Malodobra-Mazur, M., Dziewulska, A., Kozinski, K., Dobrzyn, P., Kolczynska, K., Janikiewicz, J., Dobrzyn, A. (2014). Stearyl-CoA desaturase regulates

- inflammatory gene expression by changing DNA methylation level in 3T3 adipocytes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 55, 40–50.
209. Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., Brasaemle, D. L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11901–11909.
 210. Marlatt, K. L., Ravussin, E. (2017). Brown adipose tissue: an update on recent findings. *Current Obesity Reports*, 6(4), 389–396.
 211. Martínez-Martínez, E., Miana, M., Jurado-López, R., Bartolomé, M. V., Souza Neto, F. V., Salaices, M., López-Andrés, N., Cachofeiro, V. (2014). The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *International Journal of Obesity* (2005), 38(12), 1565–1572.
 212. Masuda, M., Miyazaki-Anzai, S., Keenan, A. L., Okamura, K., Kendrick, J., Chonchol, M., Offermanns, S., Ntambi, J. M., Kuro-O, M., Miyazaki, M. (2015). Saturated phosphatidic acids mediate saturated fatty acid-induced vascular calcification and lipotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 4544–4558.
 213. Mauer, J., Denson, J. L., Brüning, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in Immunology*, 36(2), 92–101.
 214. Mayr, B., Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(8), 599–609.
 215. McGarry, J. D., Stark, M. J., Foster, D. W. (1978). Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *Journal of Biological Chemistry*, 253(22), 8291–8293.
 216. Mestres-Arenas, A., Villarroya, J., Giralt, M., Villarroya, F., Peyrou, M. (2021). A differential pattern of batokine expression in perivascular adipose tissue depots from mice. *Frontiers in Physiology*, 12, 714530.
 217. Mezhnina, V., Pearce, R., Poe, A., Velingkaar, N., Astafev, A., Ebeigbe, O. P., Makwana, K., Sandler, Y., Kondratov, R. V. (2020). CR reprograms acetyl-CoA metabolism and induces long-chain acyl-CoA dehydrogenase and CrAT expression. *Aging Cell*, 19(11), e13266.
 218. Michailidou, Z., Turban, S., Miller, E., Zou, X., Schrader, J., Ratcliffe, P. J., Hadoke, P. W., Walker, B. R., Iredale, J. P., Morton, N. M., Seckl, J. R. (2012). Increased angiogenesis protects against adipose hypoxia and fibrosis in metabolic disease-resistant 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1)-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4188–4197.
 219. Mikolajczyk, T. P., Nosalski, R., Szczepaniak, P., Budzyn, K., Osmenda, G., Skiba, D., Sagan, A., Wu, J., Vinh, A., Marvar, P. J., Guzik, B., Podolec, J., Drummond, G., Lob, H. E., Harrison, D. G., Guzik, T. J. (2016). Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(5), 1987–1999.
 220. Miller, L. R., Bickel, M. A., Tarantini, S., Runion, M. E., Matakchiera, Z., Vance, M. L., Hibbs, C., Vaden, H., Nagykaldi, D., Martin, T., Bullen, E. C., Pinckard, J., Kiss, T., Howard, E. W., Yabluchanskiy, A., Conley, S. M. (2024). IGF1R deficiency in

- vascular smooth muscle cells impairs myogenic autoregulation and cognition in mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 16, 1320808.
221. Min, S. Y., Kady, J., Nam, M., Rojas-Rodriguez, R., Berkenwald, A., Kim, J. H., Noh, H. L., Kim, J. K., Cooper, M. P., Fitzgibbons, T., Brehm, M. A., Corvera, S. (2016). Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nature Medicine*, 22(3), 312–318.
 222. Miyazaki, M., Flowers, M. T., Sampath, H., Chu, K., Otzelberger, C., Liu, X., Ntambi, J. M. (2007). Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metabolism*, 6(6), 484–496.
 223. Miyazaki, M., Kim, Y. C., Gray-Keller, M. P., Attie, A. D., Ntambi, J. M. (2000). The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30132–30138.
 224. Miyazaki, M., Kim, Y. C., Ntambi, J. M. (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1018–1024.
 225. Miyazaki, M., Man, W. C., Ntambi, J. M. (2001). Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *Journal of Nutrition*, 131(9), 2260–2268.
 226. Miyazaki, M., Sampath, H., Liu, X., Flowers, M. T., Chu, K., Dobrzyn, A., Ntambi, J. M. (2009). Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(4), 818–822.
 227. Moldes, M., Boizard, M., Liepvre, X. L., Fève, B., Dugail, I., Pairault, J. (1999). Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element-binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c) trans-factors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *The Biochemical Journal*, 344 Pt 3(Pt 3), 873–880.
 228. Molnarfi, N., Benkhoucha, M., Funakoshi, H., Nakamura, T., Lalive, P. H. (2015). Hepatocyte growth factor: a regulator of inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 14(4), 293–303.
 229. Montaigne, D., Butruille, L., Staels, B. (2021). PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nature Reviews. Cardiology*, 18(12), 809–823.
 230. Morishita, R., Nakamura, S., Nakamura, Y., Aoki, M., Moriguchi, A., Kida, I., Yo, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., Ogihara, T. (1997). Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes*, 46(1), 138–142.
 231. Mottillo, E. P., Desjardins, E. M., Crane, J. D., Smith, B. K., Green, A. E., Ducommun, S., Henriksen, T. I., Rebalka, I. A., Razi, A., Sakamoto, K., Scheele, C., Kemp, B. E., Hawke, T. J., Ortega, J., Granneman, J. G., & Steinberg, G. R. (2016).

- Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function. *Cell Metabolism*, 24(1), 118–129.
232. Mu, W., Qian, S., Song, Y., Yang, L., Song, S., Yang, Q., Liu, H., Liu, Y., Pan, D., Tang, Y., Tang, Q. Q. (2021). BMP4-mediated browning of perivascular adipose tissue governs an anti-inflammatory program and prevents atherosclerosis. *Redox Biology*, 43, 101979.
 233. Murray P. J. (2017). Macrophage polarization. *Annual Review of Physiology*, 79, 541–566.
 234. Ngo, J., Choi, D. W., Stanley, I. A., Stiles, L., Molina, A. J. A., Chen, P. H., Lako, A., Sung, I. C. H., Goswami, R., Kim, M. Y., Miller, N., Baghdasarian, S., Kim-Vasquez, D., Jones, A. E., Roach, B., Gutierrez, V., Erion, K., Divakaruni, A. S., Liesa, M., Danial, N. N., Shirihai, O. S. (2023). Mitochondrial morphology controls fatty acid utilization by changing CPT1 sensitivity to malonyl-CoA. *The EMBO Journal*, 42(11), e111901.
 235. Nielsen, R., Pedersen, T. A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., Denissov, S., Børgesen, M., Francoijs, K. J., Mandrup, S., Stunnenberg, H. G. (2008). Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes and Development*, 22(21), 2953–2967.
 236. Nigro, E., Scudiero, O., Monaco, M. L., Palmieri, A., Mazzarella, G., Costagliola, C., Bianco, A., Daniele, A. (2014). New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed Research International*, 2014, 658913.
 237. Nisoli, E., Cardile, A., Bulbarelli, A., Tedesco, L., Bracale, R., Cozzi, V., Morroni, M., Cinti, S., Valerio, A., Carruba, M. O. (2006). White adipocytes are less prone to apoptotic stimuli than brown adipocytes in rodent. *Cell Death and Differentiation*, 13(12), 2154–2156.
 238. Nøhr, M. K., Bobba, N., Richelsen, B., Lund, S., Pedersen, S. B. (2017). Inflammation downregulates UCP1 expression in brown adipocytes potentially via SIRT1 and DBC1 Interaction. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 1006.
 239. Nosalski, R., Guzik, T. J. (2017). Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *British Journal of Pharmacology*, 174(20), 3496–3513.
 240. Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendzierski, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., Attie, A. D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11482–11486.
 241. Ntambi, J. M., Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition*, 130(12), 3122S–3126S.
 242. Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148), 1116–1120.

243. Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C. R., Goforth, M. H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A. W., Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metabolism*, 7(6), 496–507.
244. Oh, J., Ahn, S., Zhou, X., Lim, Y. J., Hong, S., Kim, H. S. (2023). Effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells and lipid accumulation in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 15(24), 5110.
245. Ohtomo, T., Ino, K., Miyashita, R., Chigira, M., Nakamura, M., Someya, K., Inaba, N., Fujita, M., Takagi, M., Yamada, J. (2017). Chronic high-fat feeding impairs adaptive induction of mitochondrial fatty acid combustion-associated proteins in brown adipose tissue of mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 32–38.
246. Okada, M., Hojo, Y., Ikeda, U., Takahashi, M., Takizawa, T., Morishita, R., Shimada, K. (2000). Interaction between monocytes and vascular smooth muscle cells induces expression of hepatocyte growth factor. *Journal of Hypertension*, 18(12), 1825–1831.
247. Okamoto, E., Couse, T., De Leon, H., Vinten-Johansen, J., Goodman, R. B., Scott, N. A., Wilcox, J. N. (2001). Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation*, 104(18), 2228–2235.
248. Okla, M., Zaher, W., Alfayez, M., Chung, S. (2018). Inhibitory effects of toll-like receptor 4, NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β on white adipocyte browning. *Inflammation*, 41(2), 626–642.
249. Olichwier, A., Balatskyi, V. V., Wolosiewicz, M., Ntambi, J. M., Dobrzyn, P. (2020). Interplay between thyroid hormones and stearoyl-CoA desaturase 1 in the regulation of lipid metabolism in the heart. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 109.
250. O'Neill, H. M., Lally, J. S., Galic, S., Pulinilkunnil, T., Ford, R. J., Dyck, J. R., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., Steinberg, G. R. (2015). Skeletal muscle ACC2 S212 phosphorylation is not required for the control of fatty acid oxidation during exercise. *Physiological Reports*, 3(7), e12444.
251. Ouchi, N., Kobayashi, H., Kihara, S., Kumada, M., Sato, K., Inoue, T., Funahashi, T., Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1304–1309.
252. Ouellet, V., Labbé, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E. E., Richard, D., Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 545–552.
253. Ouellet, V., Routhier-Labadie, A., Bellemare, W., Lakhal-Chaieb, L., Turcotte, E., Carpentier, A. C., Richard, D. (2011). Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(1), 192–199.
254. Owens G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 75(3),

255. Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J., Laughlin, M. H. (2013). Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(7), R543–R552.
256. Pandit, A. S., Feldman, D. S., Caulfield, J., Thompson, A. (1998). Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth Factors* (Chur, Switzerland), 15(2), 113–123.
257. Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C. L., Scherer, S., Liu, Y., Presley, C., Guo, D., Estrera, A. L., Safi, H. J., Brasier, A. R., Vick, G. W., Marian, A. J., Raman, C. S., Buja, L. M., Milewicz, D. M. (2007). MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Human Molecular Genetics*, 16(20), 2453–2462.
258. Park, J., Kim, M., Sun, K., An, Y. A., Gu, X., Scherer, P. E. (2017). VEGF-A-expressing adipose tissue shows rapid beiging and enhanced survival after transplantation and confers IL-4-independent metabolic improvements. *Diabetes*, 66(6), 1479–1490.
259. Park, J., Shin, S., Liu, L., Jahan, I., Ong, S. G., Xu, P., Berry, D. C., Jiang, Y. (2021). Progenitor-like characteristics in a subgroup of UCP1+ cells within white adipose tissue. *Developmental Cell*, 56(7), 985–999.e4.
260. Park, S. Y., Kim, K. H., Seo, K. W., Bae, J. U., Kim, Y. H., Lee, S. J., Lee, W. S., Kim, C. D. (2014). Resistin derived from diabetic perivascular adipose tissue up-regulates vascular expression of osteopontin via the AP-1 signalling pathway. *Journal of Pathology*, 232(1), 87–97.
261. Pazos, P., Lima, L., Tovar, S., González-Touceda, D., Diéguez, C., García, M. C. (2015). Divergent responses to thermogenic stimuli in BAT and subcutaneous adipose tissue from interleukin 18 and interleukin 18 receptor 1-deficient mice. *Scientific Reports*, 5, 17977.
262. Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D., Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 34, 281–303.
263. Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Machicao, F., Schick, F., Machann, J., Stefan, N., Thamer, C., Häring, H. U., Schleicher, E. (2009). Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity *in vivo*. *Diabetes*, 58(8), 1757–1765.
264. Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Rittig, K., Cegan, A., Lutz, P., Machicao, F., Häring, H. U., Schleicher, E. (2008). Induction of stearyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E339–E349.
265. Petroff, A. B., Weir, R. L., Yates, C. R., Ng, J. D., Baudry, J. (2021). Sequential dynamics of stearyl-CoA desaturase-1(SCD1)/ligand binding and unbinding mechanism: a computational study. *Biomolecules*, 11(10), 1435.
266. Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma

- (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7153–7164.
267. Pinnamaneni, S. K., Southgate, R. J., Febbraio, M. A., Watt, M. J. (2006). Stearoyl CoA desaturase 1 is elevated in obesity but protects against fatty acid-induced skeletal muscle insulin resistance in vitro. *Diabetologia*, 49(12), 3027–3037.
 268. Police, S. B., Thatcher, S. E., Charnigo, R., Daugherty, A., Cassis, L. A. (2009). Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(10), 1458–1464.
 269. Pollard, A. E., Martins, L., Muckett, P. J., Khadayate, S., Bornot, A., Clausen, M., Admyre, T., Bjursell, M., Fiadeiro, R., Wilson, L., Whilding, C., Kotiadis, V. N., Duchen, M. R., Sutton, D., Penfold, L., Sardini, A., Bohlooly-Y, M., Smith, D. M., Read, J. A., Snowden, M. A., Carling, D. (2019). AMPK activation protects against diet induced obesity through Ucp1-independent thermogenesis in subcutaneous white adipose tissue. *Nature Metabolism*, 1(3), 340–349.
 270. Polyák, Á., Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Kovács, K. J. (2016). Brown adipose tissue in obesity: fractalkine-receptor dependent immune cell recruitment affects metabolic-related gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(11), 1614–1622.
 271. Pou, K. M., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Maurovich-Horvat, P., Larson, M. G., Keaney, J. F., Jr, Meigs, J. B., Lipinska, I., Kathiresan, S., Murabito, J. M., O'Donnell, C. J., Benjamin, E. J., Fox, C. S. (2007). Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 116(11), 1234–1241.
 272. Prieur, X., Roszer, T., Ricote, M. (2010). Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(3), 327–337.
 273. Qi, X. Y., Qu, S. L., Xiong, W. H., Rom, O., Chang, L., Jiang, Z. S. (2018). Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 134.
 274. Qin, X., Tian, J., Zhang, P., Fan, Y., Chen, L., Guan, Y., Fu, Y., Zhu, Y., Chien, S., Wang, N. (2007). Laminar shear stress up-regulates the expression of stearoyl-CoA desaturase-1 in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 74(3), 506–514.
 275. Qin, Y., Ge, G., Yang, P., Wang, L., Qiao, Y., Pan, G., Yang, H., Bai, J., Cui, W., Geng, D. (2023). An update on adipose-derived stem cells for regenerative medicine: where challenge meets opportunity. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 10(20), e2207334.
 276. Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., Palmiter, R. D., Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*, 157(6), 1292–1308.

277. Qiu, Z. B., Xu, H., Duan, C., Chen, X. (2012). Osteopontin is required for angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Die Pharmazie*, 67(6), 553–558.
278. Rahman, S. M., Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Lee, S. H., Miyazaki, M., Ntambi, J. M. (2003). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 11110–11115.
279. Rahman, S. M., Dobrzyn, A., Lee, S. H., Dobrzyn, P., Miyazaki, M., Ntambi, J. M. (2005). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(2), E381–E387.
280. Raja, A. A., Dandare, A., Khan, M. J., Khan, M. J. (2022). Free fatty acid overload targets mitochondria: gene expression analysis of palmitic acid-treated endothelial cells. *Genes*, 13(10), 1704.
281. Rakotoarivelo, V., Variya, B., Langlois, M. F., Ramanathan, S. (2020). Chemokines in Human Obesity. *Cytokine*, 127, 154953.
282. Ralston, J. C., Badoud, F., Cattrysse, B., McNicholas, P. D., Mutch, D. M. (2014). Inhibition of stearyl-CoA desaturase-1 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes upregulates elongase 6 and downregulates genes affecting triacylglycerol synthesis. *International Journal of Obesity* (2005), 38(11), 1449–1456.
283. Ralston, J. C., Metherel, A. H., Stark, K. D., Mutch, D. M. (2016). SCD1 mediates the influence of exogenous saturated and monounsaturated fatty acids in adipocytes: Effects on cellular stress, inflammatory markers and fatty acid elongation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 241–248.
284. Ralston, J. C., Mutch, D. M. (2015). SCD1 inhibition during 3T3-L1 adipocyte differentiation remodels triacylglycerol, diacylglycerol and phospholipid fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 98, 29–37.
285. Ralston, J. C., Nguyen-Tu, M. S., Lyons, C. L., Cooke, A. A., Murphy, A. M., Falvey, A., Finucane, O. M., McGillicuddy, F. C., Rutter, G. A., Roche, H. M. (2020). Dietary substitution of SFA with MUFA within high-fat diets attenuates hyperinsulinaemia and pancreatic islet dysfunction. *The British Journal of Nutrition*, 124(3), 247–255.
286. Ravaut, G., Légiot, A., Bergeron, K. F., Mounier, C. (2020). Monounsaturated fatty acids in obesity-related inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 330.
287. Ravichandran K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1807–1817.
288. Reczens, E., Mouisel, E., Langin, D. (2021). Hormone-sensitive lipase: sixty years later. *Progress in Lipid Research*, 82, 101084.
289. Reusch, J. E., Colton, L. A., Klemm, D. J. (2000). CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 1008–1020.

290. Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L., Sánchez-Infantes, D. (2021). White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochemical Pharmacology*, 192, 114723.
291. Rittig, K., Dolderer, J. H., Balletshofer, B., Machann, J., Schick, F., Meile, T., Küper, M., Stock, U. A., Staiger, H., Machicao, F., Schaller, H. E., Königsrainer, A., Häring, H. U., Siegel-Axel, D. I. (2012). The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells. *Diabetologia*, 55(5), 1514–1525.
292. Roberts-Toler, C., O'Neill, B. T., Cypess, A. M. (2015). Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(9), 1765-1770
293. Roh, H. C., Tsai, L. T. Y., Shao, M., Tenen, D., Shen, Y., Kumari, M., Lyubetskaya, A., Jacobs, C., Dawes, B., Gupta, R. K., Rosen, E. D. (2018). Warming induces significant reprogramming of beige, but not brown, adipocyte cellular identity. *Cell Metabolism*, 27(5), 1121–1137.e5.
294. Rohm, T. V., Meier, D. T., Olefsky, J. M., Donath, M. Y. (2022). Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*, 55(1), 31–55.
295. Romacho, T., Azcutia, V., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Cercas, E., Nevado, J., Carraro, R., Rodríguez-Mañas, L., Sánchez-Ferrer, C. F., Peiró, C. (2009). Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia*, 52(11), 2455–2463.
296. Rosen, E. D., Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156(1-2), 20–44.
297. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T., Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, 15(6), 659–667.
298. Roskoski R., Jr (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143.
299. Saad, M. J., Santos, A., Prada, P. O. (2016). Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 31(4), 283–293.
300. Sakamoto, T., Nitta, T., Maruno, K., Yeh, Y. S., Kuwata, H., Tomita, K., Goto, T., Takahashi, N., Kawada, T. (2016). Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 310(8), E676–E687.
301. Sampath, H., Flowers, M. T., Liu, X., Paton, C. M., Sullivan, R., Chu, K., Zhao, M., Ntambi, J. M. (2009). Skin-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase-1 alters skin lipid composition and protects mice from high fat diet-induced obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), 19961–19973.
302. Sánchez-Infantes, D., Cereijo, R., Peyrou, M., Piquer-Garcia, I., Stephens, J. M., Villarroya, F. (2017). Oncostatin m impairs brown adipose tissue thermogenic function and the browning of subcutaneous white adipose tissue. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 25(1), 85–93.

303. Sanchez-Infantes, D., White, U. A., Elks, C. M., Morrison, R. F., Gimble, J. M., Considine, R. V., Ferrante, A. W., Ravussin, E., Stephens, J. M. (2014). Oncostatin m is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(2), E217–E225.
304. Santana, A. B., de Souza Oliveira, T. C., Bianconi, B. L., Barauna, V. G., Santos, E. W., Alves, T. P., Silva, J. C., Fiorino, P., Borelli, P., Irigoyen, M. C., Krieger, J. E., Lacchini, S. (2014). Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. *BioMed Research International*, 2014, 914102.
305. Sanz-Gómez, M., Aledavood, E., Beroiz-Salaverri, M., Lagartera, L., Vega-Martín, E., Gil-Ortega, M., Cumella, J., Pérez, C., Luque, F. J., Estarellas, C., Fernández-Alfonso, M. S., Castro, A. (2022). Novel indolic AMPK modulators induce vasodilatation through activation of the AMPK-eNOS-NO pathway. *Scientific Reports*, 12(1), 4225.
306. Sasoh, T., Kugo, H., Kondo, Y., Miyamoto, K., Minami, M., Higashihara, M., Kawamoto, H., Takeshita, F., Moriyama, T., Zaima, N. (2021). Different effects of high-fat and high-sucrose diets on the physiology of perivascular adipose tissues of the thoracic and abdominal aorta. *Adipocyte*, 10(1), 412–423.
307. Schirinzi, V., Poli, C., Berteotti, C., Leone, A. (2023). Browning of adipocytes: a potential therapeutic approach to obesity. *Nutrients*, 15(9), 2229.
308. Schütz, E., Gogiraju, R., Pavlaki, M., Drosos, I., Georgiadis, G. S., Argyriou, C., Rim Ben Hallou, A., Konstantinou, F., Mikroulis, D., Schüler, R., Bochenek, M. L., Gachkar, S., Buschmann, K., Lankeit, M., Karbach, S. H., Münzel, T., Tziakas, D., Konstantinides, S., Schäfer, K. (2019). Age-dependent and -independent effects of perivascular adipose tissue and its paracrine activities during neointima formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 282.
309. Schweiger, M., Eichmann, T. O., Taschler, U., Zimmermann, R., Zechner, R., & Lass, A. (2014). Measurement of lipolysis. *Methods in Enzymology*, 538, 171–193.
310. Schweiger, M., Paar, M., Eder, C., Brandis, J., Moser, E., Gorkiewicz, G., Grond, S., Radner, F. P., Cerik, I., Cornaciu, I., Oberer, M., Kersten, S., Zechner, R., Zimmermann, R., Lass, A. (2012). G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *Journal of Lipid Research*, 53(11), 2307–2317.
311. Scoditti, E., Massaro, M., Carluccio, M. A., Pellegrino, M., Wabitsch, M., Calabriso, N., Storelli, C., De Caterina, R. (2015). Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PloS One*, 10(6), e0128218.
312. Shao, M., Wang, Q. A., Song, A., Vishvanath, L., Busbuso, N. C., Scherer, P. E., Gupta, R. K. (2019). Cellular origins of beige fat cells revisited. *Diabetes*, 68(10), 1874–1885.
313. Sharma, A., Maurya, C. K., Arha, D., Rai, A. K., Singh, S., Varshney, S., Schertzer, J. D., Tamrakar, A. K. (2019). Nod1-mediated lipolysis promotes diacylglycerol accumulation and successive inflammation via PKC δ -IRAK axis in adipocytes. *Biochimica et biophysica acta. Molecular Basis of Disease*, 1865(1), 136–146.

314. Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S., Obin, M. S. (2010). Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c⁺ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes*, 59(5), 1171–1181.
315. Shen, J., Wu, G., Tsai, A. L., Zhou, M. (2020). Structure and mechanism of a unique diiron center in mammalian stearyl-CoA desaturase. *Journal of Molecular Biology*, 432(18), 5152–5161.
316. Shimizu, I., Aprahamian, T., Kikuchi, R., Shimizu, A., Papanicolaou, K. N., MacLauchlan, S., Maruyama, S., Walsh, K. (2014). Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2099–2112.
317. Shuang, T., Fu, M., Yang, G., Wu, L., Wang, R. (2018). The interaction of IGF-1/IGF-1R and hydrogen sulfide on the proliferation of mouse primary vascular smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 149, 143–152.
318. Siegel-Axel, D. I., Ullrich, S., Stefan, N., Rittig, K., Gerst, F., Klingler, C., Schmidt, U., Schreiner, B., Randrianarisoa, E., Schaller, H. E., Stock, U. A., Weigert, C., Königsrainer, A., Häring, H. U. (2014). Fetuin-A influences vascular cell growth and production of proinflammatory and angiogenic proteins by human perivascular fat cells. *Diabetologia*, 57(5), 1057–1066.
319. Siersbæk, R., Nielsen, R., Mandrup, S. (2012). Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(2), 56–64.
320. Sim, K. G., Hammond, J., Wilcken, B. (2002). Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 323(1-2), 37–58.
321. Simão, J. J., Cruz, M. M., Abdala, F. M., Bolsoni-Lopes, A., Armelin-Correa, L., Alonso-Vale, M. I. C. (2022). Palmitoleic acid acts on adipose-derived stromal cells and promotes anti-hypertrophic and anti-inflammatory effects in obese mice. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1194.
322. Singh, M., Thakur, M., Mishra, M., Yadav, M., Vibhuti, R., Menon, A. M., Nagda, G., Dwivedi, V. P., Dakal, T. C., Yadav, V. (2021). Gene regulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): A molecule with multiple functions. *Immunology Letters*, 240, 123–136.
323. Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C., Singh, R. (2023). ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 548, 117487.
324. So, M., Gaidhu, M. P., Maghdoori, B., Ceddia, R. B. (2011). Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 99.
325. Soltis, E. E., Cassis, L. A. (1991). Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice*, 13(2), 277–296.
326. Song, M., Wang, Y., Annex, B. H., Popel, A. S. (2023). Experiment-based computational model predicts that IL-6 classic and trans-signaling exhibit similar

- potency in inducing downstream signaling in endothelial cells. *NPJ Systems Biology and Applications*, 9(1), 45.
327. Song, Z., Xiaoli, A. M., Yang, F. (2018). Regulation and metabolic significance of de novo lipogenesis in adipose tissues. *Nutrients*, 10(10), 1383.
 328. Stakos, D. A., Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Mitrousi, K., Tsigalou, C., Boudoulas, H. (2010). Associations between collagen synthesis and degradation and aortic function in arterial hypertension. *American Journal of Hypertension*, 23(5), 488–494.
 329. Strable, M. S., Ntambi, J. M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(3), 199–214.
 330. Straub, L. G., Scherer, P. E. (2019). Metabolic messengers: adiponectin. *Nature Metabolism*, 1(3), 334–339.
 331. Stryjecki, C., Roke, K., Clarke, S., Nielsen, D., Badawi, A., El-Sohehy, A., Ma, D. W., Mutch, D. M. (2012). Enzymatic activity and genetic variation in SCD1 modulate the relationship between fatty acids and inflammation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(3), 421–427.
 332. Suffee, N., Le Visage, C., Hlawaty, H., Aid-Launais, R., Vanneaux, V., Larghero, J., Haddad, O., Oudar, O., Charnaux, N., Sutton, A. (2017). Pro-angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. *Scientific Reports*, 7(1), 13294.
 333. Sugano, T., Shimada, M., Tatsumi, H. (1976). Oxidative phosphorylation in brown adipose tissue mitochondria from rats kept under normal environmental conditions. *Journal of Biochemistry*, 80(1), 177–186.
 334. Sugimoto, K., Shinagawa, T., Kuroki, K., Toma, S., Hosomi, R., Yoshida, M., Fukunaga, K. (2023). Dietary bamboo charcoal decreased visceral adipose tissue weight by enhancing fecal lipid excretions in mice with high-fat diet-induced obesity. *Preventive Nutrition and Food Science*, 28(3), 246–254.
 335. Sun, Q., Xing, X., Wang, H., Wan, K., Fan, R., Liu, C., Wang, Y., Wu, W., Wang, Y., Wang, R. (2024). SCD1 is the critical signaling hub to mediate metabolic diseases: mechanism and the development of its inhibitors. *Biomedicine and Pharmacotherapy Biomedecine and Pharmacotherapie*, 170, 115586.
 336. Swanson, K. V., Deng, M., Ting, J. P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews. Immunology*, 19(8), 477–489.
 337. Sztalryd, C., Brasaemle, D. L. (2017). The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10 Pt B), 1221–1232.
 338. Tabaczar, S., Wolosiewicz, M., Filip, A., Olichwier, A., Dobrzyn, P. (2018) The role of stearoyl-CoA desaturase 1 in the regulation of cardiac metabolism. *Postepy Biochemii*, 64 (2-3).
 339. Taher, T. E., Derksen, P. W., de Boer, O. J., Spaargaren, M., Teeling, P., van der Wal, A. C., Pals, S. T. (2002). Hepatocyte growth factor triggers signaling cascades

- mediating vascular smooth muscle cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(1), 80–86.
340. Takahashi, M., Okubo, N., Chosa, N., Takahashi, N., Ibi, M., Kamo, M., Mizuki, H., Ishisaki, A., Kyakumoto, S. (2012). Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(3), 357–364.
 341. Tamer, F., Ulug, E., Akyol, A., Nergiz-Unal, R. (2020). The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 135, 110914.
 342. Tang, Q. Q., Otto, T. C., Lane, M. D. (2003). Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 44–49.
 343. Tang, Q. Q., Otto, T. C., Lane, M. D. (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9607–9611.
 344. Tero, B. W., Fortier, B., Soucy, A. N., Paquette, G., Liaw, L. (2022). Quantification of lipid area within thermogenic mouse perivascular adipose tissue using standardized image analysis in FIJI. *Journal of Vascular Research*, 59(1), 43–49.
 345. Thompson, B. R., Lobo, S., Bernlohr, D. A. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318(1-2), 24–33.
 346. Thonberg, H., Fredriksson, J. M., Nedergaard, J., Cannon, B. (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via α 1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 1), 73–79.
 347. Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4401–4406.
 348. Tiwary, S., Nandwani, A., Khan, R., Datta, M. (2021). GRP75 mediates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling during palmitate-induced pancreatic β -cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6), 101368.
 349. Tontonoz, P., Spiegelman, B. M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 289–312.
 350. Touyz, R. M., He, G., El Mabrouk, M., Diep, Q., Mardigyan, V., Schiffrin, E. L. (2001). Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 19(3 Pt 2), 553–559.

351. Tracz-Gaszewska, Z., Sowka, A., Dobrzyn, P. (2023). Stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition impairs triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 238(12), 2888–2903.
352. Tran, K. V., Fitzgibbons, T., Min, S. Y., DeSouza, T., Corvera, S. (2018). Distinct adipocyte progenitor cells are associated with regional phenotypes of perivascular aortic fat in mice. *Molecular Metabolism*, 9, 199–206.
353. Trovati, M., Doronzo, G., Barale, C., Vaccheris, C., Russo, I., Cavalot, F. (2014). Leptin and vascular smooth muscle cells. *Current Pharmaceutical Design*, 20(4), 625–634.
354. Tseng, Y. H., Cypess, A. M., Kahn, C. R. (2010). Cellular Bioenergetics as a Target for Obesity Therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(6), 465–482.
355. Tuttle, T., Darios, E., Watts, S. W., Roccabianca, S. (2022). Aortic stiffness is lower when PVAT is included: a novel ex vivo mechanics study. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 322(6), H1003–H1013.
356. Vela, D., Buja, L. M., Madjid, M., Burke, A., Naghavi, M., Willerson, J. T., Casscells, S. W., Litovsky, S. (2007). The role of periadventitial fat in atherosclerosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 131(3), 481–487.
357. Vetterkind, S., Saphirstein, R. J., Morgan, K. G. (2012). Stimulus-specific activation and actin dependency of distinct, spatially separated ERK1/2 fractions in A7r5 smooth muscle cells. *PloS One*, 7(2), e30409.
358. Victorio, J. A., Fontes, M. T., Rossoni, L. V., Davel, A. P. (2016). Different anti-contractile function and nitric oxide production of thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Frontiers in Physiology*, 7, 295.
359. Vida, M., Gavito, A. L., Pavón, F. J., Bautista, D., Serrano, A., Suarez, J., Arrabal, S., Decara, J., Romero-Cuevas, M., Rodríguez de Fonseca, F., Baixeras, E. (2015). Chronic administration of recombinant IL-6 upregulates lipogenic enzyme expression and aggravates high-fat-diet-induced steatosis in IL-6-deficient mice. *Disease Models & Mechanisms*, 8(7), 721–731.
360. Wang C. L. (2001). Caldesmon and smooth-muscle regulation. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 35(3), 275–288.
361. Wang, H., Klein, M. G., Zou, H., Lane, W., Snell, G., Levin, I., Li, K., Sang, B. C. (2015). Crystal structure of human stearoyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(7), 581–585.
362. Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z. J., Pankow, J. S., Eckfeldt, J. H., ARIC Study Investigators (2003). Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(1), 91–98.
363. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, 19(10), 1338–1344.
364. Wang, X., Chen, Y., Meng, H., Ruan, J., Meng, F. (2024). SREBP-1-mediated lipogenesis confers resistance to ferroptosis and improves endothelial injury. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 38(13), e23806.

365. Wang, Y., Ji, M., Wang, L., Chen, L., Li, J. (2014). Xuebijing injection improves the respiratory function in rabbits with oleic acid-induced acute lung injury by inhibiting IL-6 expression and promoting IL-10 expression at the protein and mRNA levels. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(5), 1593–1598.
366. Wang, Z., Zhang, Y., Fang, J., Yu, F., Heng, D., Fan, Y., Xu, J., Peng, B., Liu, W., Han, S., He, X. (2017). Decreased methylation level of H3K27me3 increases seizure susceptibility. *Molecular Neurobiology*, 54(9), 7343–7352.
367. Waqas, S. F. H., Hoang, A. C., Lin, Y. T., Ampem, G., Azegrouz, H., Balogh, L., Thuróczy, J., Chen, J. C., Gerling, I. C., Nam, S., Lim, J. S., Martinez-Ibañez, J., Real, J. T., Paschke, S., Quillet, R., Ayachi, S., Simonin, F., Schneider, E. M., Brinkman, J. A., Lamming, D. W., Röszer, T. (2017). Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 127(7), 2842–2854.
368. Warensjö, E., Ingelsson, E., Lundmark, P., Lannfelt, L., Syvänen, A. C., Vessby, B., Risérus, U. (2007). Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(7), 1732–1740.
369. Warensjö, E., Ohrvall, M., Vessby, B. (2006). Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 16(2), 128–136.
370. Warensjö, E., Risérus, U., Vessby, B. (2005). Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia*, 48(10), 1999–2005.
371. Watts, S. W., Flood, E. D., Garver, H., Fink, G. D., Roccabianca, S. (2020). A new function for perivascular adipose tissue (PVAT): assistance of arterial stress relaxation. *Scientific Reports*, 10(1), 1807.
372. 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. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808.
373. Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., Brickey, W. J., Ting, J. P. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology*, 12(5), 408–415.
374. Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T. S., Wang, Q. A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z. V., Scherer, P. E. (2014). Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metabolism*, 20(1), 103–118.
375. Willows, J. W., Blaszkiewicz, M., Townsend, K. L. (2022). A clearing-free protocol for imaging intact whole adipose tissue innervation in mice. *STAR Protocols*, 3(1), 101109.
376. Withers, S. B., Agabiti-Rosei, C., Livingstone, D. M., Little, M. C., Aslam, R., Malik, R. A., Heagerty, A. M. (2011). Macrophage activation is responsible for loss of anticontractile function in inflamed perivascular fat. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(4), 908–913.

377. Wu, C., Chen, W., He, J., Jin, S., Liu, Y., Yi, Y., Gao, Z., Yang, J., Yang, J., Cui, J., Zhao, W. (2020). Interplay of m6A and H3K27 trimethylation restrains inflammation during bacterial infection. *Science Advances*, 6(34), eaba0647.
378. Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376.
379. Xiong, W., Zhao, X., Villacorta, L., Rom, O., Garcia-Barrio, M. T., Guo, Y., Fan, Y., Zhu, T., Zhang, J., Zeng, R., Chen, Y. E., Jiang, Z., Chang, L. (2018). Brown adipocyte-specific PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) deletion impairs perivascular adipose tissue development and enhances atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1738–1747.
380. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1821–1830.
381. Xu, M., Ding, L., Liang, J., Yang, X., Liu, Y., Wang, Y., Ding, M., Huang, X. (2021). NAD kinase sustains lipogenesis and mitochondrial metabolism through fatty acid synthesis. *Cell Reports*, 37(13), 110157.
382. Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M. J., & Ferrante, A. W., Jr (2013). Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metabolism*, 18(6), 816–830.
383. Xue, Y., Xu, X., Zhang, X. Q., Farokhzad, O. C., Langer, R. (2016). Preventing diet-induced obesity in mice by adipose tissue transformation and angiogenesis using targeted nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), 5552–5557.
384. Yan, W., Wang, Y., Xiao, Y., Wen, J., Wu, J., Du, L., Cai, W. (2014). Palmitate induces TRB3 expression and promotes apoptosis in human liver cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 33(3), 823–834.
385. Yang, C., Aye, C. C., Li, X., Diaz Ramos, A., Zorzano, A., Mora, S. (2012). Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Bioscience Reports*, 32(5), 465–478.
386. Yang, M., Liu, C., Jiang, N., Liu, Y., Luo, S., Li, C., Zhao, H., Han, Y., Chen, W., Li, L., Xiao, L., Sun, L. (2023). Fibroblast growth factor 21 in metabolic syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1220426.
387. Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G. B., Chi, Y. I., Guerin, T. M., Smart, E. J., Liu, J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metabolism*, 11(3), 194–205.

388. Yang, Z. H., Miyahara, H., Hatanaka, A. (2011). Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids in Health and Disease*, 10, 120.
389. Yang, Z. H., Pryor, M., Noguchi, A., Sampson, M., Johnson, B., Pryor, M., Donkor, K., Amar, M., Remaley, A. T. (2019). Dietary palmitoleic acid attenuates atherosclerosis progression and hyperlipidemia in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(12), e1900120.
390. Yao, L., Liang, X., Liu, Y., Li, B., Hong, M., Wang, X., Chen, B., Liu, Z., Wang, P. (2023). Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in diabetic tubulopathy. *Redox Biology*, 68, 102946.
391. Yee, J. K., Wahjudi, P. N., Vega, J., Lim, S., Martin, A., Patterson, M. E., Cohen, J. N., Mao, C. S., Lee, W. N. (2013). Stearoyl-CoA desaturase enzyme 1 inhibition reduces glucose utilization for de novo fatty acid synthesis and cell proliferation in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 9(4), 809–816.
392. Yew Tan, C., Virtue, S., Murfitt, S., Roberts, L. D., Phua, Y. H., Dale, M., Griffin, J. L., Tinahones, F., Scherer, P. E., Vidal-Puig, A. (2015). Adipose tissue fatty acid chain length and mono-unsaturation increases with obesity and insulin resistance. *Scientific Reports*, 5, 18366.
393. Yi, S. A., Jeon, Y. J., Lee, M. G., Nam, K. H., Ann, S., Lee, J., Han, J. W. (2022). S6K1 controls adiponectin expression by inducing a transcriptional switch: BMAL1-to-EZH2. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(3), 324–333.
394. Yi, S. A., Um, S. H., Lee, J., Yoo, J. H., Bang, S. Y., Park, E. K., Lee, M. G., Nam, K. H., Jeon, Y. J., Park, J. W., You, J. S., Lee, S. J., Bae, G. U., Rhie, J. W., Kozma, S. C., Thomas, G., Han, J. W. (2016). S6K1 phosphorylation of H2B mediates EZH2 trimethylation of H3: A determinant of early adipogenesis. *Molecular Cell*, 62(3), 443–452.
395. Yoneshiro, T., Wang, Q., Tajima, K., Matsushita, M., Maki, H., Igarashi, K., Dai, Z., White, P. J., McGarrah, R. W., Ilkayeva, O. R., Deleye, Y., Oguri, Y., Kuroda, M., Ikeda, K., Li, H., Ueno, A., Ohishi, M., Ishikawa, T., Kim, K., Chen, Y., Kajimura, S. (2019). BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*, 572(7771), 614–619.
396. Yoshida, H., Miura, S., Kishikawa, H., Hirokawa, M., Nakamizo, H., Nakatsumi, R. C., Suzuki, H., Saito, H., Ishii, H. (2001). Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *Journal of Nutrition*, 131(11), 2943–2950.
397. Yu, T., Robotham, J. L., Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2653–2658.
398. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173090.

399. Zalewska, A., Maciejczyk, M., Szulimowska, J., Imierska, M., Błachnio-Zabielska, A. (2019). High-fat diet affects ceramide content disturbs mitochondrial redox balance, and induces apoptosis in the submandibular glands of mice. *Biomolecules*, 9(12), 877.
400. Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., Brandsch, M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425(1), 88–90.
401. Zhang, G., He, B., Weber, G. F. (2003). Growth factor signaling induces metastasis genes in transformed cells: molecular connection between Akt kinase and osteopontin in breast cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6507–6519.
402. Zhang, H. H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C. L., Manning, B. D. (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PloS One*, 4(7), e6189.
403. Zhang, H. H., Kumar, S., Barnett, A. H., Eggo, M. C. (2001). Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(6), 2817–2825.
404. Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C., Lane, M. D. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4471–4478.
405. Zhang, J., Huang, S., Zhu, Z., Gatt, A., Liu, J. (2024). E-selectin in vascular pathophysiology. *Frontiers in Immunology*, 15, 1401399.
406. Zhang, K., Yang, X., Zhao, Q., Li, Z., Fu, F., Zhang, H., Zheng, M., & Zhang, S. (2020). Molecular mechanism of stem cell differentiation into adipocytes and adipocyte differentiation of malignant tumor. *Stem Cells International*, 2020, 8892300.
407. Zhang, N., Wang, Y., Zhang, J., Liu, B., Deng, X., Xin, S., Xu, K. (2020). N-glycosylation of CREBH improves lipid metabolism and attenuates lipotoxicity in NAFLD by modulating PPAR α and SCD-1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(11), 15338–15363.
408. Zhang, S., Cui, Z., Zhang, H., Wang, P., Wang, F., Zhang, J. (2024). Pea albumin extracted from pea (*Pisum sativum* L.) seeds ameliorates high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by regulating lipogenesis and lipolysis pathways. *Nutrients*, 16(14), 2232.
409. Zhang, Y., Xu, S., Lin, J., Yao, G., Han, Z., Liang, B., Zou, Z., Chen, Z., Song, Q., Dai, Y., Gao, T., Liu, A., Bai, X. (2012). mTORC1 is a target of nordihydroguaiaretic acid to prevent breast tumor growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(2), 379–388.
410. Zhao, X., Hu, H., Wang, C., Bai, L., Wang, Y., Wang, W., Wang, J. (2019). A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells. *Analytical Biochemistry*, 568, 57–64.
411. Zhao, Y., Lv, M., Lin, H., Cui, Y., Wei, X., Qin, Y., Kohama, K., Gao, Y. (2013). Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth

- muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(3), 488–493.
412. Zhao, Z., Zhang, Y., Gao, D., Zhang, Y., Han, W., Xu, X., Song, Q., Zhao, C., Yang, J. (2022). Inhibition of histone H3 lysine-27 demethylase activity relieves rheumatoid arthritis symptoms via repression of IL6 transcription in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 13, 818070.
 413. Zhu, L., Vranckx, R., Khau Van Kien, P., Lalande, A., Boisset, N., Mathieu, F., Wegman, M., Glancy, L., Gasc, J. M., Brunotte, F., Bruneval, P., Wolf, J. E., Michel, J. B., Jeunemaitre, X. (2006). Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nature Genetics*, 38(3), 343–349.
 414. Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 306(5700), 1383–1386.
 415. Zordoky, B. N., Nagendran, J., Pulinilkunnil, T., Kienesberger, P. C., Masson, G., Waller, T. J., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., Dyck, J. R. (2014). AMPK-dependent inhibitory phosphorylation of ACC is not essential for maintaining myocardial fatty acid oxidation. *Circulation Research*, 115(5), 518–524.
 416. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., Plikus, M. V. (2018). Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metabolism*, 27(1), 68–83.

11. SPIS PUBLIKACJI DOKTORANTA

- 1) **Sowka, A.**, Dobrzyn, P. (2021). Role of perivascular adipose tissue-derived adiponectin in vascular homeostasis. *Cells*, 10(6), 1485.
- 2) Balatskyi, V. V., **Sowka, A.**, Dobrzyn, P., Piven, O. O. (2023). WNT/ β -catenin pathway is a key regulator of cardiac function and energetic metabolism. *Acta Physiologica*, 237(3), e13912.
- 3) Dobrzyn, P., Balatskyi, V. V., Wolosiewicz, M., Dobosz, A., Tracz-Gaszewska, Z., **Sowka, A.**, Kendziorek, M., Krogulec, E., Navrulin, V. „Effects of cellular lipids on heart in pathology and physiology”. *Cellular Lipid in Health and Disease* pod red. James Mukasa Ntambi, Elsevier, ISBN: 9780443218224.
- 4) Tracz-Gaszewska, Z., **Sowka, A.**, Dobrzyn, P. (2023). Stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition impairs triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 238(12), 2888–2903.
- 5) Lasek, R., Piszczek, I., Krolkowski, M., **Sówka, A.**, Bartosik, D. (2023). A plasmid-borne gene cluster flanked by two restriction-modification systems enables an arctic strain of *Psychrobacter* sp. to decompose SDS. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 551.
- 6) Olichwier, A., **Sowka, A.**, Balatskyi, V. V., Gan, A. M., Dziewulska, A., Dobrzyn, P. (2024). SCD1-related epigenetic modifications affect hormone-sensitive lipase (Lipe) gene expression in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1871(1), 119608.
- 7) **Sowka, A.**, Balatskyi, V.V., Navrulin, V.O., Ntambi, J.M., Dobrzyn, P. (2024). Stearoyl-CoA desaturase 1 regulates metabolism and inflammation in mouse perivascular adipose tissue in response to a high-fat diet. *Journal of Cellular Physiology* (praca przyjęta do druku, DOI: 10.1002/jcp.31510)