

Nutrigenomics, angiogenesis and obesity

Nutrigenomika, angiogeneza a otyłość

Beata Kieć-Wilk¹, Wojciech Dudek², Aldona Dembińska-Kieć¹

¹Department of Clinical Biochemistry, Collegium Medicum Jagiellonian University (Zakład Biochemii Klinicznej Katedry Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

²Department of Gynecology, Regional Hospital in Myslenice. (Oddział Ginekologii Szpitala Wojewódzkiego w Myślenicach)

Abstract

A review concerning the possible connection between the angiogenesis, nutrients and development and remodelling of adipose tissue.

Key words: angiogenesis, nutrigenomics, adipogenesis, obesity

Streszczenie

W niniejszej pracy omówiono poznane mechanizmy i związek zachodzący między angiogenezą, wybranymi składnikami pokarmu — nutrientami — a mechanizmami prowadzącymi do rozwoju tkanki tłuszczowej.

Słowa kluczowe: angiogeneza, nutrigenomika, adipogeneza, otyłość

Introduction

Vasculogenesis and angiogenesis play essential roles in a number of physiological and pathological events such as fetal development, vascular and tissue remodelling in ischemia, inflammation and proliferative diabetic retinopathy, as well as in the promotion of solid tumour growth and invasiveness [1, 2]. The development and maturation/plasticity of adipose tissue vascularity are critical to the function of adipose tissue as the metabolic and an endocrine organ [3]. Recent studies evidenced that human endothelial progenitors and preadipocytes express a similar pattern of genes, proteins as cellular markers and proangiogenic factors such as CD 34, CD 133, vascular endothelial growth factor receptors, integrin and serine proteases [2–4].

The main principles of angiogenesis

The multi-step process of angiogenesis is organized by a sensitive balance of activators and inhibitors of endothelial and its progenitor cell recruitment. It includes

Wstęp

Waskulogeneza i angiogeneza odgrywają istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych — rozwój płodu, przebudowa tkanek i naczyń krwionośnych w procesie niedokrwienia lub zapalnym, w proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej, czy w rozwoju i wzroście guzów nowotworowych [1, 2].

Zarówno procesy rozwoju, jak i dojrzewania/plastyczności naczyń krwionośnych decydują o funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej jako metabolicznego i endokrynnego organu [3]. W ostatnich badaniach wykazano, że w komórkach progenitorowych śródbłonna oraz preadipocytów ekspresji ulegają podobne geny i białka: markery komórkowe i czynniki proangiogenne, takie jak CD34⁺, CD133, receptory czynnika wzrostu komórek śródbłonna (VEGFR), integryny, czy proteazy serynowe [2–4].

Główne etapy angiogenezy

Angiogeneza jest wieloetapowym procesem regulowanym wieloma czynnikami hamującymi i aktywującymi

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Beata Kieć-Wilk

ul. Kopernika 15a, 31–501 Krakow, Poland

tel: +48 (12) 421 40 06, fax: +48 (12) 421 40 73

e-mail: mbkiec@cyf-kr.edu.pl

induction of various growth factors, production of proteolytic enzymes to digest the basement membrane and extracellular matrix, endothelial cell migration, proliferation and tube formation, differentiation of pericytes/vascular smooth muscle with reconstruction of basement membranes. The ischemia, blood shear stress forces and cytokine-driven induction of the sequence of certain genes is responsible for the outgrowth and maturation of the new capillary network [1].

Angiogenic sprouting is dependent on degradation of the basement membrane protein, which is necessary for the activation of directed migration (invasion) of activated endothelial cells (EC) towards ischemic tissue [5]. Extracellular proteolysis involves two families of enzymes as urokinase- (uPA) and tissue-type (tPA) plasminogen activators and their inhibitor (PAI); as well as several kinds of matrix protein metalloproteinases (MMP 1–9) with their tissue inhibitors (TIMPs) [1, 3, 5]. There are several recognized proangiogenic growth factors and cytokines induced in ischemic tissue such as VEGF, tumour necrosis factor (TNF α), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-8, (IL-8), platelet derived growth factor (PDGF), angiopoietins, ephrins and vasoconstrictors such as angiotensin II (AngII), endothelin (ET), thromboxan (TXA $_2$), and others acting by its specific receptors, or inducing other angiogenic modulators such as nitric oxide (NO) [1, 5, 6]. Vascular endothelial growth factor is the main, most important angiogenic factor. It transduces its signals to the nucleus mainly through three receptors. The VEGFR-1 (Flt) induces the activation of EC, vessel wall permeability, fenestrae formation and pathological angiogenesis seen in cancer vasculature [7]. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in lymphangiogenesis. The VEGFR-2 (Flk/KDR) has tyrosine kinase activity thus regulates EC proliferation (cell cycle) by activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 mitogen activated protein kinases (MAPKs) and p70S6 kinase (S6K); migration of ECs via the stress-activated protein kinase 2/p38 pathway and survival (antiapoptotic effect) by Akt activation [8]. The VEGF gene expression is induced by several factors such as hypoxia (by the involvement of the hypoxia-inducible-factor HIF-1), insulin, growth factors and cytokines including NO [1, 6, 8]. Vascular endothelial growth factor signalling is initiated through the assembly of a multi-component complex composed of the vascular endothelial (VE)-cadherin, β -catenin, VEGFR-2 and PI3-kinase. This complex then stimulates Akt leading to the downstream activation and nuclear translocation of transcription factor NF- κ B, Bcl-2 synthesis, induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene expression followed by infiltration of macrophages and tubulogenesis [9]. The ephrin

komórki śródbłonna oraz ich progenitory. W skład tych procesów wchodzi aktywacja czynników wzrostu, powstawanie enzymów proteolitycznych trawiących błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową, migracja i proliferacja komórek endotelianych, tworzenie tubul oraz różnicowanie się pericytów i komórek mięśni gładkich ścian naczyń. Niedokrwienie, podwyższona siła ścinania (*shear stress*) czy cytokiny aktywują panel specyficznych genów odpowiedzialnych za wzrost i dojrzewanie nowej sieci naczyniowej [1].

Towarzyszące angiogenezie rozgałęzianie naczyń zależy od trawienia błony podstawnej, co jest czynnikiem niezbędnym do aktywacji migracji (inwazji) komórek śródbłonna (EC) w obrębie niedokrwionej tkanki [5]. W proteolizie zewnątrzkomórkowej bierze udział urokinazowy (uPA) i tkankowy (tPA) aktywator plazminogenu, ich inhibitor (PAI), a także metalloproteinazy (MMP 1–9) wraz z ich tkankowymi inhibitorami (TIMPs) [1, 3, 5]. W niedotlenionych tkankach dochodzi do aktywacji, generowania i uwalniania proangiogennych czynników wzrostu i cytokin — VEGF, czynnik martwicy nowotworu α (TNF α), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), interleukina 8 (IL-8), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) — oraz czynników obkurczających naczynia — angiotensyna II (AngII), endoteliny (ET), tromboksan (TXA $_2$), a także modulatory procesu angiogenezy — tlenek azotu (NO) [1, 5, 6]. Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna stanowi jeden z głównych czynników stymulujących angiogenezę, oddziałuje na komórki poprzez specyficzne receptory błonowe (VEGFR). Receptor VEGFR-1 (Flt) indukuje aktywację EC, przepuszczalność ścian naczyń oraz patologiczną angiogenezę obserwowaną w unaczynianiu guzów [7]. Natomiast VEGFR-3 odgrywa ważną rolę w procesie limfogenezy. Receptor VEGFR-2 (Flk/KDR), o aktywności kinazy tyrozynowej, reguluje proliferację EC aktywowaną zewnątrzkomórkowym sygnałem przy udziale (ERK) 1/2 *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) i p70S6 kinazę (S6K), a także proliferację komórek śródbłonna zależną od kinazy białkowej aktywowanej przez stres 2/p38 i przeżywalność EC poprzez antyapoptotyczny efekt zależny od szlaku Akt [8]. Ekspresja genu VEGF ulega aktywacji pod wpływem takich czynników, jak: niedotlenienie tkanek (w tym procesie jest zaangażowany czynnik indukowany hipoksją 1 [HIF-1]), insulina, czynniki wzrostu czy cytokiny wraz z tlenkiem azotu [1, 6, 8]. Sygnał wewnątrzkomórkowy zależny od VEGF jest aktywowany poprzez wieloczynnikowy kompleks sygnałów przekaznikowych, na który składają się naczyniowo-nabłonkowe VE-kadheryny, β -katenina, kinazy VEGFR-2 i PI3. Ten kompleks czynników stymuluje kinazę Akt, prowadząc do indukcji wewnątrzkomórkowego szlaku powodującego aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, syntezę Bcl-2, indukcję ekspre-

(EphB2) and its receptor EphB4 expressed on endothelial cell membranes determine arterio-venous shifting of capillary differentiation [10]. Nitric oxide (NO) synthesized by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) induced by several proangiogenic factors (including VEGF, TNF α , AngII, Insulin, leptin, adiponectin and others) plays an important role in angiogenesis. Nitric oxide protects endothelial cells against apoptosis and activate EC chemotaxis by stimulation of Akt, induction of Bcl-2 and antiapoptotic proteins (IAP) and other intracellular signalling pathways. On the other hand, by inhibition of the platelet aggregation and adhesion of inflammatory cells, thus inhibiting the access of generating proangiogenic factor (VEGF, PDGF, TNF α , All etc) cells, as well as by inhibition of vascular wall smooth muscle cells (VSMC) and basement membrane protein synthesis, NO is responsible for the maturation of the capillary network and pathological remodelling [1, 6, 11].

There also exist several endogenous inhibitors of angiogenesis. One example is thrombospondin (TSP) and its receptor CD36, or the products of matrix protein digestion such as angiostatin, maspin and others [1, 2, 5, 12].

Angiogenesis and adipose tissue plasticity

Primitive fat cell clusters resemble vascular structures with any or only a few preadipocytes, which was observed in several species of foetus [13]. There is also some evidence for overlapping of an autocrine/paracrine developmental relationship between pre-endothelial and pre-adipocyte cell fate [3]. Both types of cell express the $\alpha_3\beta_1$ integrin and release PAI-1, which supports coordination of angiogenesis and adipogenesis [13]. Both the adipose stromal vascular (non-fat containing cell) fractions (SVF) release VEGF, however, adipocytes are the main source of the proangiogenic VEGF, IL-8 and PAI-1, but not IL-6 released from differentiated adipose tissue stimulated by insulin. The main source of IL-6 is macrophages [14].

The angiopoietin 2 (Ang-2) gene expression supporting proangiogenic VEGF activity was found in preadipocytes as well as the ob/ob mice fat tissue under stimulation with leptin [13]. Leptin and adiponectin exert the regulatory effect on angiogenesis either directly or by inducing the infiltration of macrophages (the source of VEGF, metalloproteinases in the body) or by NO release [1, 2, 5, 15]. Long-form leptin receptor is expressed in endothelial cells and adipocytes in human and mouse adipose tissue. Its activation promotes the Erk1/2 and STAT3 phosphorylation mediating EC proliferation, migration and survival and, similarly to VEGF, increases the permeability of endothelium. Additionally, leptin increases VSMC proliferation and migration necessary for the maturation and remodelling of vessel walls [2, 16].

sji genów dla IL-8 oraz białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1) i w efekcie — infiltrację makrofagami tkanki oraz aktywację powstawania tubul nowej sieci kapilarnej [9]. Efryna (Eph B2) i jej receptor (Eph B4) znajdujący się na komórce śródbłonna decyduje o tętniczo-żylnym zmianie procesu różnicowania się kapilar [10]. Tlenek azotu, produkowany przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS), odgrywa istotną rolę w regulacji procesu angiogenezy poprzez indukcję kilku czynników proangiogennych: VEGF, TNF α , angiotensynę II (AngII), insulinę, leptynę, adiponektynę i inne. Tlenek azotu chroni komórki śródbłonna przez procesami apoptotycznymi i ma zdolność aktywacji chemotaksji EC; poprzez stymulację Akt, indukcję Bcl-2 oraz endogennych białkowych inhibitorów apoptozy (IAP) i innych wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu. Równocześnie NO poprzez ograniczenie agregacji płytek i adhezji komórek zapalnych hamuje generację takich czynników proangiogennych, jak VEGF, PDGF, TNF α , AngII itp., a także przez hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyń (VSMC) oraz białek błony podścieliska. Tlenek azotu odpowiada również za dojrzewanie sieci kapilarnej i jej przebudowę [1, 6, 11].

Poznano również wiele endogennych inhibitorów angiogenezy: trombospondynę (TSP) i jej receptor CD36, czy produkty trawienia białek macierzy jak angiostatyna, maspina i inne [1, 2, 5, 12].

Angiogeneza a plastyczność tkanki tłuszczowej

Układ prymitywnych komórek tłuszczowych płodu przypomina strukturę naczyń z pojedynczymi preadipocytami [13]. Istnieją publikacje udowadniające zamiany w trakcie rozwoju, pod wpływem czynników autokrynych/parakrynych, pomiędzy komórkami pre-endothelialnymi a preadipocytami w tkance tłuszczowej [3]. Oba typy komórek poprzez ekspresję $\alpha_3\beta_1$ integryn oraz uwalnianie na przykład PAI-1 wspierają angiogenezę i adipogenezę [13]. Występujące w obrębie tkanki tłuszczowej komórki nieakumulujące tłuszczów, tak zwane SVF (*stromal vascular fraction*), uwalniają wprawdzie VEGF, ale to dojrzałe adipocyty są głównie źródłem proangiogennych VEGF, IL-8, PAI-1 (ale nie IL-6) uwalnianych ze zróżnicowanej tkanki tłuszczowej aktywowanej przez insulinę. Źródłem IL-6 są makrofagi [14].

Ekspresję genu dla angiopoetyny (Ang-2) wspomagającej proangiogenne działanie VEGF wykazano w preadipocytach oraz w tkance tłuszczowej myszy ob/ob po stymulacji leptyną [13]. Leptyna i adiponektyna wykazują działanie regulujące angiogenezę zarówno bezpośrednio, poprzez aktywację infiltracji makrofagami (źródło VEGF, metalloproteinaz, IL-6), jak i poprzez uwalnia-

There is quite a lot of evidence suggesting that angiogenesis is a pivotal factor for adipogenesis. During fetal development, arteriolar differentiation and synthesis of extracellular matrix proteins precedes the differentiation of adipocytes [2, 13]. The undifferentiated vessel wall fibroblast, pericytes, as well as circulating stromal progenitor cells may serve as early preadipocytes [3, 17]. The VEGF (as well as leptin) are induced by ischemia (HIF-1) or insulin, and exposure to cold induces VEGF expression in the brown adipose tissue [5, 13, 18]. Remodelling of extracellular matrix proteins by endothelial, adipocyte or macrophage derived MMP-2 and MMP-9 is necessary for angiogenesis and adipogenesis [1, 2, 19].

Recently it was proved that treatment of animals with the antiangiogenic factors dose-dependently in a reversible manner decreases adipose tissue depot and body weight [20]. Thus thrombospondin (TSP) and maspin, the known antiangiogenic factors released from differentiated adipocytes, may limit the angiogenic activity of growing adipose tissue [21, 22].

The early phase of preadipocyte differentiation is induced by the sequence of the genes regulated by the two groups of transcriptional factors: the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Exogenous PPAR γ ligands cause a reduction of the VEGFR-1 and VEGFR-2 expression in endothelial cells, thus inhibiting angiogenesis by inhibition of endothelial cell migration and proliferation, as well as infiltration of macrophages [23], which is important for angiogenesis. However the induction of VEGF gene and protein by PPAR γ ligands in adipocytes and vascular smooth muscle cells was reported [24]. The inhibition of angiogenesis by the blocking of VEGFR-2 activity by the specific antibody inhibited the preadipocyte differentiation *in vivo* and *in vitro*, in spite of the fact that preadipocytes do not express VEGFR-2 [25]. These results strongly support the parallel, reciprocal regulation of angio- and adipogenesis by the, as yet not well recognized, paracrine manner [2, 13, 23, 25].

Developing blood vessels in fat tissue represent a potential target for the regulation of adipose tissue mass, and consequently metabolism and substrate-fuel buffering properties [26]. Using the micro-array method it has been demonstrated that the expression of many adipogenic genes (*SREBP-1*, *C/EBP α* or *PPAR γ*) were significantly decreased in adipose tissue from obese animals indicating a process of dedifferentiation, i.e. loss of adipocyte phenotype similar to the response seen after treatment of adipose tissue with TNF α [27]. Voros et al. reported that treatment of ob/ob as well as C57Bl/6 mice on high-fat diet for 15 weeks increases adipo- and angiogenesis, and is accompanied (dependent on the

nie NO [1, 2, 5, 15]. Długa forma receptora dla leptyny ulega ekspresji w komórkach śródbłonna i adipocytach zarówno u ludzi, jak i u myszy. Jego aktywacja promuje fosforylację Erk1/2 oraz STAT3, co uaktywnia proliferację, migrację, a także przeżywalność komórek śródbłonna podobnie do działania VEGF. Leptyna nasila również proliferację i migrację VSMC niezbędnych do dojrzewania i remodelingu ścian naczyń [2, 16].

Istnieją dowody sugerujące, że angiogeneza jest centralnym czynnikiem adipogenezy. Podczas rozwoju płodowego różnicowanie naczyń i synteza białek macierzy zewnątrzkomórkowej poprzedzają różnicowanie adipocytów [2, 13]. Niezróżnicowane fibroblasty ścian naczyń, pericyty, podobnie jak krążące we krwi komórki progenitorowe pochodzenia szpikowego, mogą służyć jako źródło preadipocytów [3, 17]. Czynniki wzrostu komórek śródbłonna, podobnie jak leptyna, jest uwalniany z tkanki tłuszczowej pod wpływem niedotlenienia (HIF-1), insuliny lub ekspozycji na zimno [5, 13, 18]. Przebudowa białek macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez MMP-2 i MMP-9 uwalnianych z komórek śródbłonna, adipocytów lub makrofagów jest procesem niezbędnym w angiogenezie i adipogenezie [1, 2, 19].

W ostatnich badaniach wykazano, że podawanie zwierzętom czynników antyangiogennych redukowało zależne od dawki odkładanie się tkanki tłuszczowej i spadek masy ciała [20]. W ten sposób trombospodyna (TSP) oraz maspina, znane czynniki antyangiogenne uwalniane ze zróżnicowanych adipocytów, mogą ograniczać aktywność angiogenną oraz masę rosnącej tkanki tłuszczowej [21, 22].

Wczesna faza dojrzewania preadipocytów zależy od wielu genów, których ekspresję regulują dwie grupy czynników transkrypcyjnych: białka wiążące się z sekwencją CCAAT (C/EBP) oraz receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów (PPARs). Egzogenne ligandy dla PPAR γ redukują ekspresję VEGFR-1 i VEGFR-2 w komórkach endotelialnych, przez co hamują proces angiogenezy na drodze zahamowania migracji i proliferacji EC oraz infiltracji przez makrofagi [23]. Pojawiły się również doniesienia dotyczące indukcji genu i białka VEGF poprzez ligandy PPAR γ w adipocytach i VSMC [24]. Zahamowanie szlaku przekazu wewnątrzkomórkowego PPAR γ w preadipocytach hamowało nie tylko różnicowanie się tkanki tłuszczowej, ale również angiogenezę [25]. Otrzymane wyniki potwierdzają występowanie równoczesnej parakrynej regulacji zarówno angiogenezy, jak i adipogenezy, której mechanizmów do końca jeszcze nie poznano [2, 13, 23, 25].

Rozwój naczyń krwionośnych w tkance tłuszczowej stanowi czynnik regulujący masę tkanki tłuszczowej także poprzez metabolizm i dostarczanie substancji odżywczych [26].

duration of feeding) by down-regulation of Ang-1 and elevation of TSP-1 [21].

The Wnt family of proteins are paracrine growth factors, highly expressed in preadipocytes, and are potent inhibitors of angiogenesis. Depending on the local conditions Wnt signalling causes precursor cell proliferation, apoptosis, differentiation or maintenance [28]. The inhibition of adipogenesis connected with the Wnt/fizzled cooperation resulted in down-regulation of C/EBP α and PPAR γ [28].

The involvement of the nutrient availability or energy supply signals (i.e. amino acid, glucose sufficiency), on the “nutrient sensors” i.e. mammalian target of rapamycin (mTOR) or CHOP-10/gadd 153 pathways regulating adipose tissue morphogenesis remains to be investigated [29, 30]. Moreover, the transcriptomics applied to obesity and caloric restriction studies in humans point to important changes in the “pro- and anti-inflammatory” gene expression changes in the stromal vascular fraction of the adipose tissue [31].

Polyphenols, angiogenesis and adipogenesis

Polyphenols, especially flavonoids, that are rich in fruits, soybeans, vegetables, herbs, roots and leaves, act as active components in the prevention of cancer, heart diseases and diabetes. Flavonoids are plant phytochemicals that cannot be synthesized by humans. The six classes of flavonoids (flavanones, flavones, flavonols, isoflavonoids, anthocyanins and flavans) vary in their structural characteristics around a heterocyclic oxygen ring [32].

Such compounds regulate tissue growth proliferation and differentiation acting directly on target cells as well as regulating the early, endothelial cells and their progenitor-mediated angiogenesis, and are thus recommended as supportive therapy connected with pathological angiogenesis [33, 34].

In adipose tissue polyphenols i.e. epigallocatechin gallate have been shown to exert a thermogenic effect, suppress adipogenesis by reduction of C/EBP α , PPAR γ and SREBP-1 gene expression, promote apoptosis of adipocytes and have implications in weight control in rodents as well as in humans [35].

Antiangioprevention and antiangiogenic therapy (preventive/therapeutic inhibition of tumour angiogenesis) are considered as efficient strategies for controlling the growth and metastasis of solid tumours as well as for other diseases involving pathological angiogenesis such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis and diabetic retinopathy [1, 2, 9, 10]. The bright spectrum of chemopreventive and antiangiogenic mechanisms of natural compounds were suggested to explain this activity. They

Przy użyciu metody mikromacierzy wykazano bardzo zmniejszoną ekspresję wielu adipogennych genów (SREBP-1, C/EBP α lub PPAR γ) w tkance tłuszczowej u zwierząt otyłych, wpływając na proces różnicowania się komórek. Obserwowano na przykład utratę fenotypu komórki tłuszczowej podobnie jak po stymulacji przez TNF α [27]. W badaniach przeprowadzonych przez Voros i wsp. [21]. U myszy ob/ob oraz C57Bl/6, u których zastosowano dietę wysokotłuszczową przez 15 tygodni, wykazano nasilenie adipo- i angiogenezy z równoczesnymi (zależnymi od czasu stosowania diety) zmianami w ekspresji czynników regulujących angiogenezę. Zaobserwowano zahamowanie ekspresji angiopoetyny 1 i zwiększenie stężenia TSP-1 [21].

Białka Wnt (*Wingless-type murine mammary tumor virus integration site*) błon komórkowych komórek progenitorowych oraz preadipocytów należą do białek istotnych do ich różnicowania się pod wpływem czynników środowiskowych. W zależności od miejscowych czynników szlak Wnt powoduje proliferację, różnicowanie lub podtrzymanie proliferacji nieodróżnicowanych komórek prekursorowych [28]. Wykazano, że aktywacja Wnt prowadzi do zahamowania angiogenezy [28]. Mechanizmem tego zjawiska jest współpraca białek Wnt/fizzled, która ogranicza ekspresję C/EBP α oraz PPAR γ , czyli również hamuje adipogenezę [28].

Nadal wymaga badań udział czynników pokarmowych lub energetycznych (np. aminokwasy, stężenie glukozy) działających na „sensory pokarmowe”, na przykład receptor-cel-rapamycyny w komórkach ssaków (mTOR) czy szlak CHOP-10/gadd 153 w regulacji morfogenezy tkanki tłuszczowej [29, 30]. Trzeba stwierdzić udział, rodzaj i aktywację czynników transkrypcyjnych (transkryptomika) mających związek z rozwojem otyłości oraz restrykcji kalorycznych. Prowadzi się badania (także wśród ludzi) udowadniające obecność istotnych zmian w ekspresji genów białek mediujących procesy zapalne i angiogenezę w komórkach progenitorowych tkanki tłuszczowej [31].

Polifenole, angiogeneza i adipogeneza

Polifenole, a w szczególności flawonoidy, bogato występują w roślinach, na przykład warzywach, ziołach i liściach. Od wieków używa się ich w medycynie naturalnej w celu prewencji raka, chorób serca, cukrzycy i innych. Flawonoidy są związkami, które nie mogą być zsyntetyzowane w organizmie ludzkim. Istnieje wiele klas flawonoidów (np. flawonole, flawony, flawonony, izoflawonoidy, antocyjaniny) różniące się między sobą strukturalną budową podstawników w obrębie pierścienia [32].

Stwierdzono, że związki te regulują wzrost, różnicowanie i proliferację tkanek, działając bezpośrednio na

include the antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative (cell cycle inhibition, growth factors and hormone intracellular signalling inhibition), proapoptotic and immune enhancing [36]. In addition to, and independently from, their antioxidant effects, plant polyphenols enhance the production of vasodilating factors such as NO, prostacyclin and endothelial hyperpolarizing factors (EDHF), inhibit the synthesis of vasoconstrictory endothelin I. The inhibitory effect on the prostate, breast, colon, lung and the other tumour angiogenesis and progression in experimental models correlates with the inhibition of metalloproteinases: MMP-2, MMP-9, as well as the VEGF protein and its receptor induction. Recent studies indicate that VEGF expression and release are prevented by red wine polyphenols. The effect of polyphenols is mediated by the prevention of growth factors or ischemia-induced redox sensitive activation of the polyvalent intracellular signalling including Stat3, NF κ B, PI3-kinase/Akt, p38 MAPK, pathways regulating the endothelial homeostasis and intracellular Ca²⁺ concentration [33, 34].

The soya-bean isoflavones binds and increases the transcriptional activity of oestrogen receptors (ER) and, similarly to estradiol, (E₂) rapidly increases the eNOS gene expression as well as direct NO release activating MAPK in a metalloproteinase and EGF, MEK-1, Src-dependending manner or increasing eNOS activity [37]. Most of the phytoestrogens and the other naturally occurring compounds such as phytic acid (IP6), vitamins, turmelic and curcumin, lactoferin were found to exert the anticancer chemoprevention activity also by inhibition of angiogenesis [32–34]. However, clinical evidence to support many of the currently claimed health benefits of these drugs remains to be confirmed. Despite the advantageous effects of some of these agents demonstrated *in vitro* and in experimental models, their mostly dose-related, possibly toxic, effects must also be of concern at the same time [34]. The presence of different numbers of –OH moieties on the B-ring of the flavonols may contribute to their antioxidant activity, as well as to their toxicity and antiangiogenic activity measured by the proliferation, migration and primitive capillary tubular structure formation [29]. The β -carotene induced expression of genes in endothelial, as well as endothelial progenitor cells *in vitro* measured by the micro-array pointed to the activation of chemotaxis, homing, decrease of *connexin 43*, induction of stress and xenobiotic phase I and II metabolizing enzyme groups of genes as well as to the proangiogenic activity of this compound [38, 39].

The mechanism of the flavone-induced antiadipogenic effect was documented to be connected with blocking insulin receptor substrate from phosphorylation, thus inhibiting glucose uptake (decrease of GLUT-4) and

komórki docelowe, w tym na komórki śródbłonna i ich progenitory — wpływając na angiogenezę [33, 34].

W tkance tłuszczowej wykazano, że polifenole mogą nasilać termogenezę, hamować adipogenezę poprzez hamowanie ekspresji genów *C/EBP α* , *PPAR γ* i *SREBP-1* oraz promować apoptozę adipocytów, co ma odzwierciedlenie w masie ciała zwierząt i ludzi [35].

Rozważa się terapię w celu zahamowania angiogenezy (np. terapeutyczne zahamowanie angiogenezy w guzie nowotworowym) jako efektywną strategię kontrolującą wzrost i rozsiew guzów nowotworowych, a także w chorobach z obecnością patologicznej angiogenezy, na przykład retinopatia cukrzycowa czy reumatoidalne zapalenie stawów [1, 2, 9, 10]. Dotyczy to czynników antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, hamujących proliferację (zahamowanie cyklu komórkowego, działanie podobne do czynników wzrostu, hormonów, inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu), czynników o działaniu proapoptotycznym czy zmieniającym odpowiedź układu odpornościowego [36]. Niezależnie od antyoksydacyjnego działania roślinne polifenole modyfikują biosyntezę czynników wazodylatacyjnych, takich jak NO, prostacykliny, śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF), hamują syntezę wazokonstrykcyjnej endoteliny I. Korzystny wpływ na przebieg raka prostaty, piersi, jelit, a także płuc tłumaczy się zahamowaniem angiogenezy w związku ze zmniejszeniem ekspresji metalloproteinaz: MMP-2, MMP-9, VEGF i jego receptorów. Udowodniono zahamowanie ekspresji genu oraz uwalnianie VEGF pod wpływem polifenoli z wina czerwonego. Odnotowano, że mechanizm hamującego działania polifenoli z winogron polega na prewencji indukowania przez niedotlenienie lub czynniki wzrostu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu Stat3, NF κ B, PI3-kinaza/Akt, p38 MAPK regulujących homeostazę i stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia także w śródbłonku [33, 34].

Izoflawony pochodzące z nasion soi nasilają aktywność receptorów estrogenowych (ER) na komórkach endotelialnych i, podobnie jak estradiol (E₂), nasilają ekspresję genu eNOS oraz uwalnianie NO na drodze aktywacji MAPK i EGF, MEK-1 oraz zwiększają aktywność eNOS [37]. Większość fitoestrogenów i innych składników pokarmowych (witaminy, kwas fitowy [IP6], kurkumina i inne) wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, aktywność chemoprotekcyjną również poprzez zahamowanie angiogenezy [32–34]. Przypisywane korzystne działanie tych leków wymaga jednak dalszych badań. Pomimo ochronnego działania tych związków zarówno w badaniach *in vitro*, jak i na modelach zwierząt eksperymentalnych, ich działanie niepożądane wymaga dalszych obserwacji [34]. Obecność różnej ilości podstawników –OH we flawonoidach może warunkować ich działanie antyoksydacyjne, a także ich toksyczność i działanie antyangiogenne mie-

increasing lipolysis by the hormone-sensitive lipase in adipose tissue. By decreasing the *C/EBP α* , *PPAR γ* and *SREBP-1* gene expression, flavonoids inhibit terminal differentiation of preadipocytes [35, 40].

Interestingly, animals receiving a high dose of beta-carotene gained more weight than control animals, which is consistent with proadipogenic PPAR/RXR/RAR theory. No such effect was seen with the low dose of β -carotene [41, 42]. This study also showed that chronic treatment with β -carotene induced a dose-dependent hypertrophy of white adipocytes and increased neoangiogenesis in subcutaneous WAT in all treated ferrets, which is in accordance with observations made by others [36, 38]. Retinoic acid (vitamin A) as well as supplementation with β -carotene inhibits the expression of resistin and proangiogenic leptin [41]. Interestingly, rodents with the knock-out β , β -carotene-15,15'-monooxygenase (*Bcmo1*^{-/-}) gene accumulate β -carotene and have increased body fat mass, which is, along with the above described, the possible proangiogenic and proadipogenic effects of β -carotene [43]. Thus polymorphisms of gene encoding proteins involved in bioavailability of naturally occurring substances in concert with polymorphism in genes of proteins involved in angiogenesis will determine the phenotype effects with regard to angiogenesis-related tissue remodelling [44].

Among women with a high activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) the frequency of green tea intake was associated with a statistically significant decreased risk of breast cancer in a Singapore Chinese Health Study [45].

Thus, parallel to mechanistic, epidemiological with the appropriately matched number of participants and case-control studies are required to prove the association between nutrient and angiogenesis cooperation in the regulation of the accumulation of adipose tissue mass.

References

1. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9: 653–660.
2. Hausman GJ, Richardson RL (2004) Adipose tissue angiogenesis. *J Animal Sci*, 82: 925–934.
3. Rodriguez AM, Elabd C, Amri Ez-Z, Alhaid G, Dani C (2005) The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87: 125–128.
4. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, Casteilla L (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Experim Cell Res*, 312: 727–736.
5. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249–257.
6. Dembinska-Kiec A, Dulak J, Partyka Ł, Huk I, Malinski T (1997) VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nat Med*, 3: 1177.

rzony za pomocą proliferacji, migracji oraz tworzenia prymitywnych struktur tubularnych [29]. W analizie aktywacji genów przez β -karoten w komórkach śródbłonka oraz śródbłonkowych komórkach progenitorowych w badaniach *in vitro* ocenianej metodą mikromacierzy stwierdzono głównie regulację chemotaksji, zagnieżdżenia się (*homing*), zmniejszenie ekspresji koneksyny 43 i aktywację enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków, a także działających proangiogenicznie [38, 39].

Wykazano, że w mechanizmie działania antyadipogenicznego flawonoidów rolę odgrywa zablokowanie, przez fosforylację, substratu dla receptora insulinowego (IRS), przez co dochodzi do zahamowania pobierania glukozy (zmniejszenie GLUT-4) i nasilenie lipolizy poprzez hormonozależną lipazę w tkance tłuszczowej. Zmniejszenie ekspresji genów *C/EBP α* , *PPAR γ* , *SREBP-1*, a także kateniny hamuje różnicowanie się preadipocytów [35, 40].

Zwierzęta otrzymujące duże dawki β -karotenu osiągały większą masę w porównaniu z grupą kontrolną, co potwierdza proadipogeniczną teorię działania kompleksu PPAR/RXR/RAR. Równocześnie tego efektu nie zaobserwowano przy zastosowaniu małych dawek β -karotenu [41, 42]. W tych badaniach stwierdzono również przerost białej tkanki tłuszczowej i nasilenie neoangiogenezy w podskórnej tkance tłuszczowej [36, 38]. Suplementacja kwasem retinowym (witamina A), podobnie jak β -karotenem, hamuje ekspresję rezystyny i proangiogenicznej leptyny [41]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach pozbawionych genu; 15,15'-monooxygenazy β -karotenu (*Bcmo1*^{-/-}) metabolizujących β -karoten odnotowano, że jego akumulacji towarzyszy zwiększona zdolność do przyrostu tkanki tłuszczowej, co potwierdza równoległe proangiogeniczne i proadipogeniczne działanie tego związku [43]. Dlatego też polimorfizm genów kodujących białka wpływające na biodostępność tych występujących naturalnie substancji w połączeniu z polimorfizmami genów białek regulujących angiogenezę determinują fenotypowy efekt związanego z angiogenezą remodelingu tkankowego [44].

W *Singapore Chinese Health Study* wykazano, że u kobiet ze zwiększoną aktywnością enzymu konwertującego (ACE) częstość picia zielonej herbaty wiązała się ze statystycznie istotnym, mniejszym ryzykiem rozwoju raka piersi [45].

Reasumując, wydaje się, że konieczne jest dalsze prowadzenie obserwacji epidemiologicznych z odpowiednio dobranymi grupami uczestników oraz badań dotyczących mechanizmu zjawisk w celu wykorzystania w terapii sugerowanego związku pomiędzy składnikami przyjmowanej diety a angiogenezą regulującą masę tkanki tłuszczowej.

7. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P (2003) Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1; novel target for stimulation of ischemic tissue revascularisation and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemostas*, 1: 1356–1370.
8. Zachary I, Gliki G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, 49: 568–581.
9. Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R (1999) Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor- κ B and induces monocyte chemoattractant protein 1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes*, 48: 1131–1137.
10. Joško J, Mazurek M (2004) Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit*, 10: RA89–RA98.
11. Heba G, Krzemiński T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, Dembińska-Kieć A (2001) The time course of tumor necrosis factor- α inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *J Vasc Res*, 38: 288.
12. Fata JE, Leco KJ, Voura EB et al (2001) Accelerated apoptosis in the TIMP-3 deficient mammary gland. *J Clin Invest*, 108: 831–841.
13. Cohen B, Barkan D, Levy Y et al (2001) Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissue. *J Biol Chem*, 276: 7697–7700.
14. Mick GJ, Wang X, McCornick K (2002) White adipocyte vascular endothelial growth factor; regulation by insulin. *Endocrinology*, 143: 948–953.
15. Park HY, Kwon HM, Lim HJ et al (2001) Potential role of leptin in angiogenesis; Leptin induces endothelial cell proliferation and expression of metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med*, 33: 95–102.
16. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cell. *Phys Therap Persp*, 109: 656–663.
17. Rechman J, Tractuev D, Li J et al (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109: 1292–1298.
18. Asano A, Kimura K, Saito M (1999) Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J Vet Med Sci*, 61: 403–409.
19. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (2001) Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9; involvement in adipose differentiation. *Diabetes*, 50: 2080–2086.
20. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY et al (2002) Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10730–10735.
21. Voros G, Maguoi E, Demeulemeester D et al (2005) Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology*, 146: 4545–4554.
22. Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N (2000) Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med*, 6: 196–199.
23. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 274: 9116–9121.
24. Emoto M, Anno TR, Sato Y et al. (2001) Troglitazone treatment increases plasma vascular endothelial growth factor in diabetic patients and its mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 276: 34167–34174.
25. Fukumura D, Ushiyama A, Duda DD (2003) Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res*, 93: e88–e97.
26. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Barzilai N (2002) Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes*, 51: 1016–1021.
27. Nadler ST, Stoer JP, Schueler KL (2000) The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 11371–11376.
28. Novakofski J (2004) Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Abim Sci*, 82: 905–915.
29. Kim JE, Chen J (2004) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*, 53: 2748–2756.
30. Maloney CA, Rees WD (2005) Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction*, 139: 401–410.
31. Viguerie N, Poitou C, Canello R, Stich V, Clement K, Langin D (2005) Transcriptomics applied to obesity and caloric restriction. *Biochimie*, 87: 117–123.
32. Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res*, 18: 1995–2018.
33. Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H et al (2004) Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokin*, 19: 245–263.
34. Stodet JC, Chataigneau T, Ndiaye M et al (2004) Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol*, 500: 299–313.
35. Chien PJ, Chen YC, Lu SC, Sheu F (2005) Dietary flavonoids suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Food Drug Analysis*, 13: 168–175.
36. Dembinska-Kieć A, Polus A, Grzybowska J et al (2005) Proangiogenic activity of beta-carotene is coupled with the activation of endothelial cell chemotaxis. *Biochim Biophys Acta*, 30: 222–239.
37. Benassayag C, Perrot-Applanat M, Ferre F (2002) Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatography*, 777: 233–248.
38. Kieć-Wilk B, Polus A, Grzybowska J et al (2005) Beta-carotene stimulates chemotaxis of human endothelial progenitor cells. *Clin Chem Lab Med*, 43: 488–498.
39. Cao Y, Cao R, Brakenhielm A (2002) Antiangiogenic mechanism of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem*, 13: 380–390.
40. Crespy V, Williamson G (2004) A review of the health effect of green tea catechins in vivo animal models. *J Nutr*, 134: 3431S–3440S.
41. Bonet LM, Morroni M, Zingaretti MC et al (2005) Morphology of ferret subcutaneous adipose tissue after 6-month daily supplementation with oral beta-carotene. *Biochim Biophys Act*, 1740: 305–312.
42. Serra F, Bonet ML, Puigserver P, Oliver J, Palou A (1999) Stimulation of uncoupling protein 1 expression in brown adipocytes by naturally occurring carotenoids. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23: 650–655.
43. von Lintig J, Hessel S, Eichinger A (2006) Analysis of *Bcmo1* knock-out mouse model uncovers a role of β -carotene for the regulation of lipid metabolism in oxidants and antioxidants in biology. The abstract book of the Oxygen Club of California. Santa Barbara; 15–18 March 2006: 21.
44. Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MWR (2002) Role of genetic polymorphisms in tumor angiogenesis. *Br J Cancer*, 87: 1057–1065.
45. Yuan JM, Koh WP, Sun CL, Kee HP, Yu MC (2005) Green tea intake gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis*, 26: 1389–1394.