

PS-834 Endotoksin ile İndüklenmiş Üveitte Silier Cisimde Fetuin'in Histopatolojik Etkileri

Tuba Bayram¹, Fatih Ulaş¹, Büşra Yaprak Bayrak², Serdal Çelebi¹

¹Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Bolu

²Kocaeli Sağlık Bilimleri Üniversitesi Derince Eğitim Araştırma Hastanesi, Kocaeli

GİRİŞ-AMAÇ

Fetuin, yaklaşık serum albuminine benzer biçimde pre-dominant olarak karaciğerden kaynaklanan 60 KDa ağırlığında bir serum glikoproteinidir (1). Karaciğer dışı fetuin, koroid pleksusta, böbreklerde ve diğer bütün büyük organlarda fetal gelişim süresince sentezlenir. Fetuin serum elektroforezinin α -2 bandında görülür ve serumdaki konsantrasyonu 0,4 ile 1,0 g/L seviyelerinde değişir (1,2).

Çalışmalarda fetuin, kalsiyum ve fosfat içeren aşırı doymuş solüsyonda spontan hidroksiapatit oluşumunun ve kalsifikasyonun güçlü bir inhibitörü olduğu ortaya konulmuştur. Yanı sıra hücrelerde transforme edici büyüme faktör beta (TGF- β) ile antagonist etki göstererek biyolojik aktivitede de rol oynamaktadır. İnsanlarda fetuin sekresyonunu etkileyen faktörler arasında şiddetli siroz, karaciğer hasarı, akut viral hepatit ve kanser gibi durumlar bildirilmiştir (3-5). Hepatit hariç bu hastalıklara sahip bireylerde fetuin plazma düzeyleri azalmıştır. Fetuinin yüksek düzeyleri obezite, metabolik sendrom, Tip 2 diabetes mellitus, non-alkolik yağlı karaciğer rahatsızlığı, iske mi ve miyokardiyal infarktüs ile ilişkili bulunmuştur (1,6-9). Yaralanmalarda ve enfeksiyonlarda fetuinin, negatif ya da pozitif akut faz reaktanı olarak görev almasıyla bifazik bir protein olduğu söylenebilir (10). Fetuin, letal sistemik inflamatuvar hastalıkların hayvan modellerinde daha büyük bir terapötik potansiyele sahiptir ve 20-100 mg/kg dozda fetuin uygulamasının letal endotoksemiye karşı doza bağlı bir koruma sağladığı gösterilmiştir (11).

İnflamasyon ve yaralanmaların akut fazında pro-inflamatuvar sitokinlerden tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin 1 (IL-1), ve interlökin 6 (IL-6) düzeylerinin arttığı görülürken; dolaşımdaki fetuin düzeyinin azaldığı görülmüştür (12). Dahası yüksek konsantrasyonlardaki fetuin anti-inflamatuvar olarak hareket etmekte ve makrofaj kültürlerinde bakteriyel endotoksini ile uyarılmış pro-inflamatuvar sitokinlerin [TNF- α , IL-1 ve nitrik oksit (NO)] üretimini inhibe etmektedir (13).

Otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar, toksin maruziyeti ve henüz bilinmeyen birçok diğer etkene bağlı olarak gelişen üveit, tam körlüğe yol açabilen inflamatuvar bir göz hastalığıdır (14). İntraoküler yapıların inflamatuvar hastalığı olan üveit, ciddi oküler komplikasyonlara ve görme kaybına neden olabilir (14). Nonenfeksiyöz üveitlerin tedavisinde kullanılmakta olan immünsupresan ajanlar, bağışıklık sistemini genel olarak baskılamakta veya saptırmaktadırlar (15). Bu tedavi yöntemlerinin sebep oldukları ciddi yan etkiler ile tedaviye dirençli olgular, hekimleri yeni tedavi arayışlarına itmektedir (15). Üveite karşı geliştirilen ortak bir farmakolojik stratejinin intraoküler inflamasyonun regülasyonu ve supresyonunu içermesi olasıdır. Fetuin sahip olduğu iddia edilen anti-inflamatuvar etkiyle, oküler bir inflamasyon olan üveit tedavisi için yeni bir yaklaşım olabilir.

Endotoksin ile indüklenmiş üveit (EİÜ), bir endotoksin olan gram negatif bakteri hücre duvarı komponenti lipopolisakkaridin (LPS) enjeksiyonu ile akut oküler inflamasyonun geliştiği bir hayvan modelidir (14, 16). Ön kamaradaki hücre infiltrasyonu ve protein kaçağı, LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra maksimum seviyeye ulaşır. Nötrofil aracılı pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6, LPS ile indüklenen üveit patogenezinde rol almaktadır (17).

Bu çalışmada sıçanlarda LPS ile oluşturduğumuz akut EİÜ'de fetuinin inflamasyondaki histopatolojik etkilerini ortaya çıkarmayı amaçladık. Sıçanlarda intraperitoneal endotoksin verilerek oluşturulan deneysel akut anterior üveitte fetuinin inflamatuvar özelliğini gösteren bir çalışmanın henüz yapılmamış olması ile çalışmamız özgünlüğünü korumaktadır.

YÖNTEM-GEREÇLER

Bu çalışmada, sıçanlarda deneysel intraoküler akut inflamasyon üzerinde fetuinin histopatolojik etkisini araştırmak amacıyla, 200-250 g ağırlığındaki 8-10 haftalık erişkin erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Denekler 22-24 °C sıcaklık ve %45-60 nemli odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta barındırıldı. Herhangi bir yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın beslendi.

Kontrol grubu dahil tüm gruplarda 6'şar hayvan olacak şekilde 4 grup aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol Grubu: Serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak uygulanıp, sağlıklı kontrol olarak ayrıldı.

2. LPS Grubu: İkinci gruba sadece 150 µg/kg (ip) LPS (Salmonella typhimurium, Sigma Chemical Co.) uygulanıp endotoksin ile EIÜ oluşturuldu.

3. Fetuin Grubu: LPS uygulaması yapılmaksızın sadece 100 mg/kg (ip) fetuin (Sigma Chemical Co.) uygulandı.

4. LPS + Fetuin Grubu: 150 µg/kg (ip) LPS uygulanıp, hemen ardından 100 mg/kg (ip) fetuin (Sigma Chemical Co.) uygulandı.

Enjeksiyon sonrası 24. saatte tüm hayvanlara ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) uygulandı. Genel anestezi altında tüm sıçanlar intrakardiyak yüksek doz anestezi yöntemiyle sakrifiye edildi. Hayvanların sol gözleri, optik sinir çok kısa kalmayacak şekilde enükleasyon yöntemiyle alındı. Alınan gözlerden diseksiye edilen dokular, histopatolojik inceleme yapılabilecek şekilde tespit solüsyonlarına alındı.

Sol gözün silier cisim bölgesinden alınan 1 cm³'lük dokular %4'lük tamponlanmış nötral formalin içine alınıp rutin ışık mikroskopik takip için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji Laboratuvarı'na getirildi. Dokular tespit edildikten sonra rutin ışık mikroskopik takip prosedürüne uygun olarak sırasıyla %70, %80, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Dokular şeffaflaştırılmak üzere iki kez toluenden geçirildikten sonra 1:1 oranda karıştırılmış parafin (56-58°C) + toluol karışımında bekletildi. Daha sonra iki ayrı sert parafinde (56-58°C) 1,5 saat bekletildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin blok haline getirilen doku örneklerinden mikrotom aracılığıyla 3-5 µm kalınlığında alınan kesitler, pozitif şarjlı lamalar (Thermo Scientific) üzerine yapıştırıldı. 58°C'deki etüvde deparafinize edilen kesitler toluolde şeffaflaştırılarak kurutulduktan sonra sırayla % 100, %96, %90 ve %70'lik alkollerden geçirildi. Daha sonra distile sudan geçirilen kesitlere Hematoksilen+Eozin (H+E) boyası uygulandı. Boyandıktan sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulanan kesitler entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlarda, Olympus U-TV0.5XC-3 marka dijital kamera ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus U-MDOB3, Tokyo, Japonya) x40, x100 ve x200 büyütmelemlerde altında doku morfolojisinin incelemesi, bir patolog tarafından inflamasyon bölgesinin tespit edilmesi ve üvetin değerlendirilmesi amacıyla histopatolojik inceleme yapıldı ve inflamasyon histopatolojik olarak 0-3 arasında literatüre uygun şekilde derecelendirildi (18).

0: İnflamasyon yok

1: Hafif derecede inflamasyon

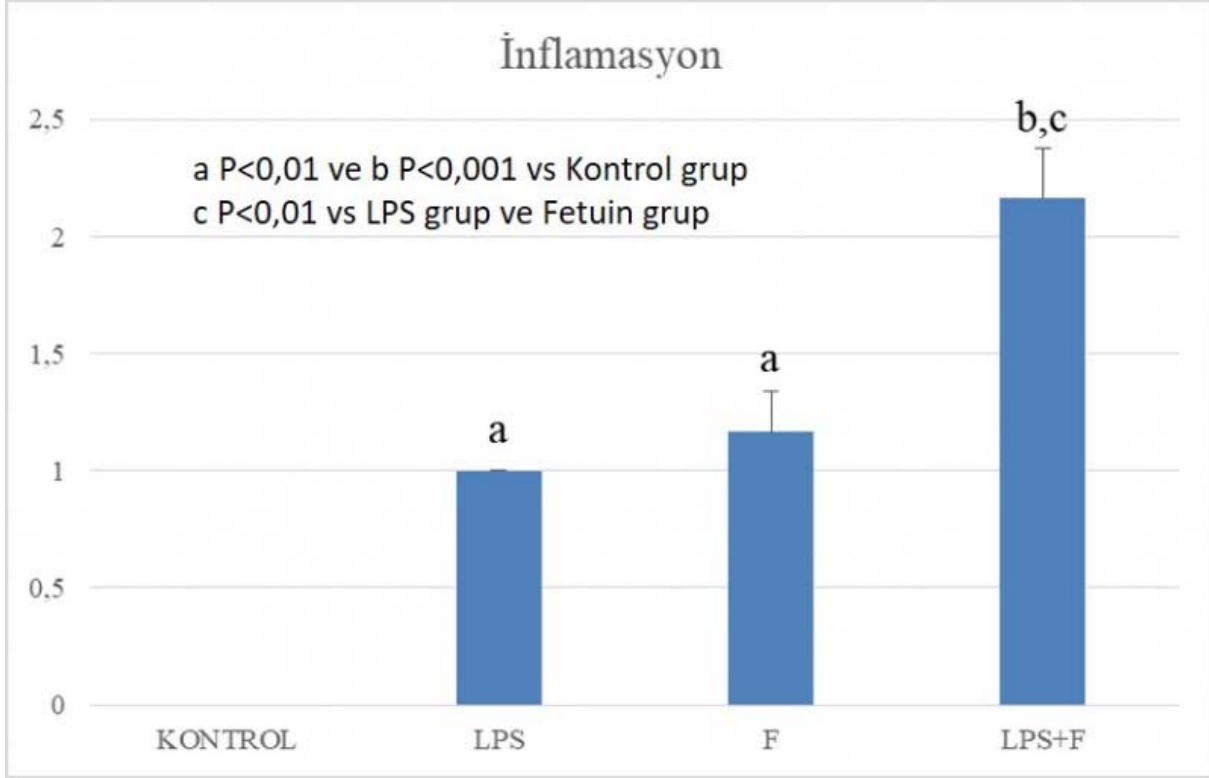
2: Orta derecede inflamasyon

3: Ağır derecede inflamasyon

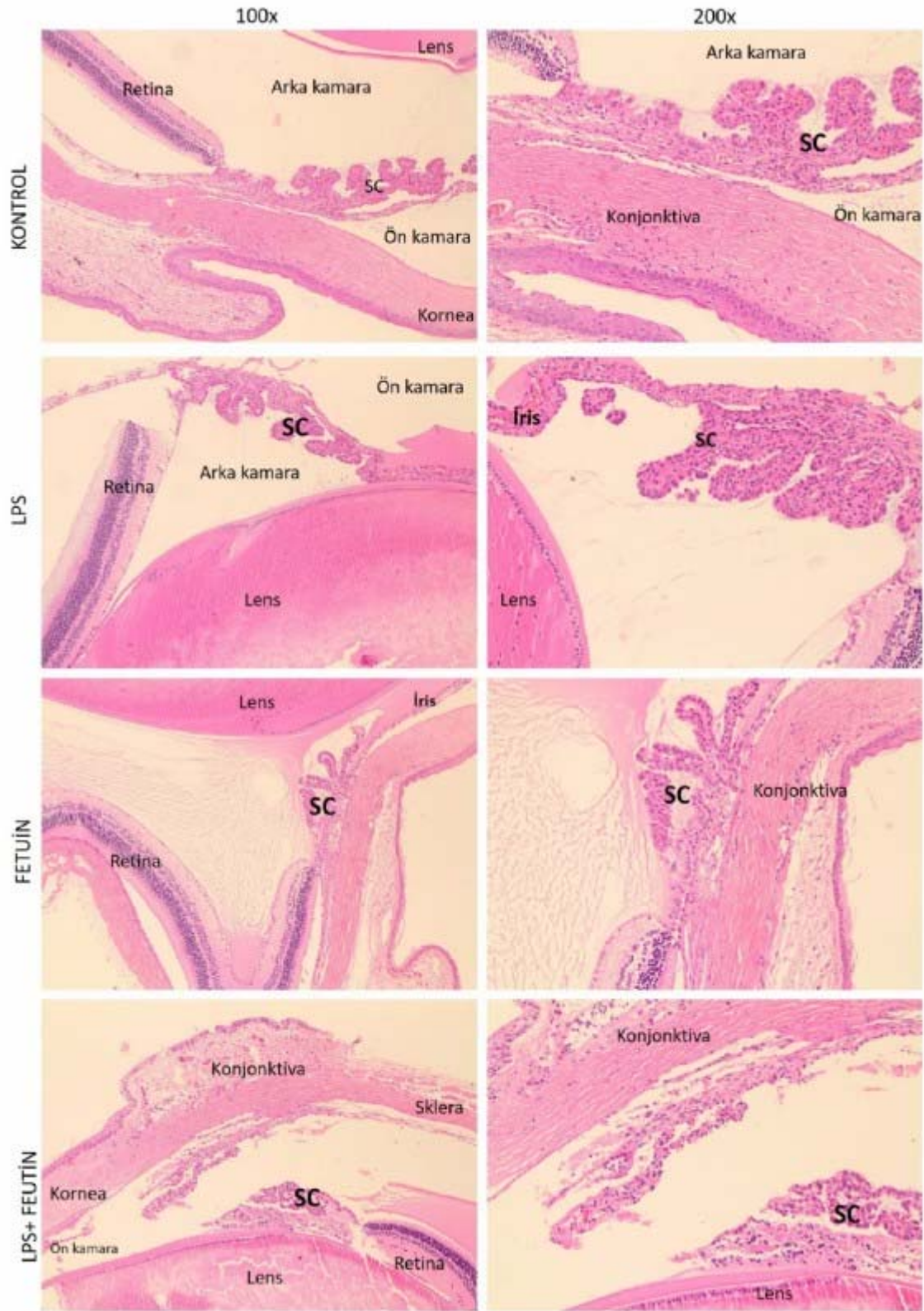
BULGULAR

Silier cisimdeki inflamasyon skorları Grafik 1'de verildi. Tüm deney gruplarında inflamasyon skorları ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı ($P<0,01$) ve LPS+ Fetuin grubunda en yüksek düzeyde inflamasyon görüldü ($P<0,001$). Mikrograflarda büyük büyütmelemlerde özellikle silier stromada inflamasyonun LPS, Fetuin ve LPS+Fetuin gruplarında arttığı görülmüştür (Şekil 1). Sadece LPS ve sadece Fetuin gruplarında epitelyal yapı strüktürünü korumuştur ancak LPS+Fetuin grubunda silier parmaksı çıkıntılar kaybolmuş, pigmentli ve pigmentsiz epitel tamamen dejenere olmuş, bazı bölgelerde hipertrofik görünüm kazanmış. Hipertrofik silier cismin etrafında bazı bölgelerde staz benzeri eritrosit birikimlerine ve vaskülarizasyon artışına rastlanmıştır (Şekil 2).

Grafik 1: LPS ile indüklenen üveit modelinde histopatolojik inflamasyon skorları

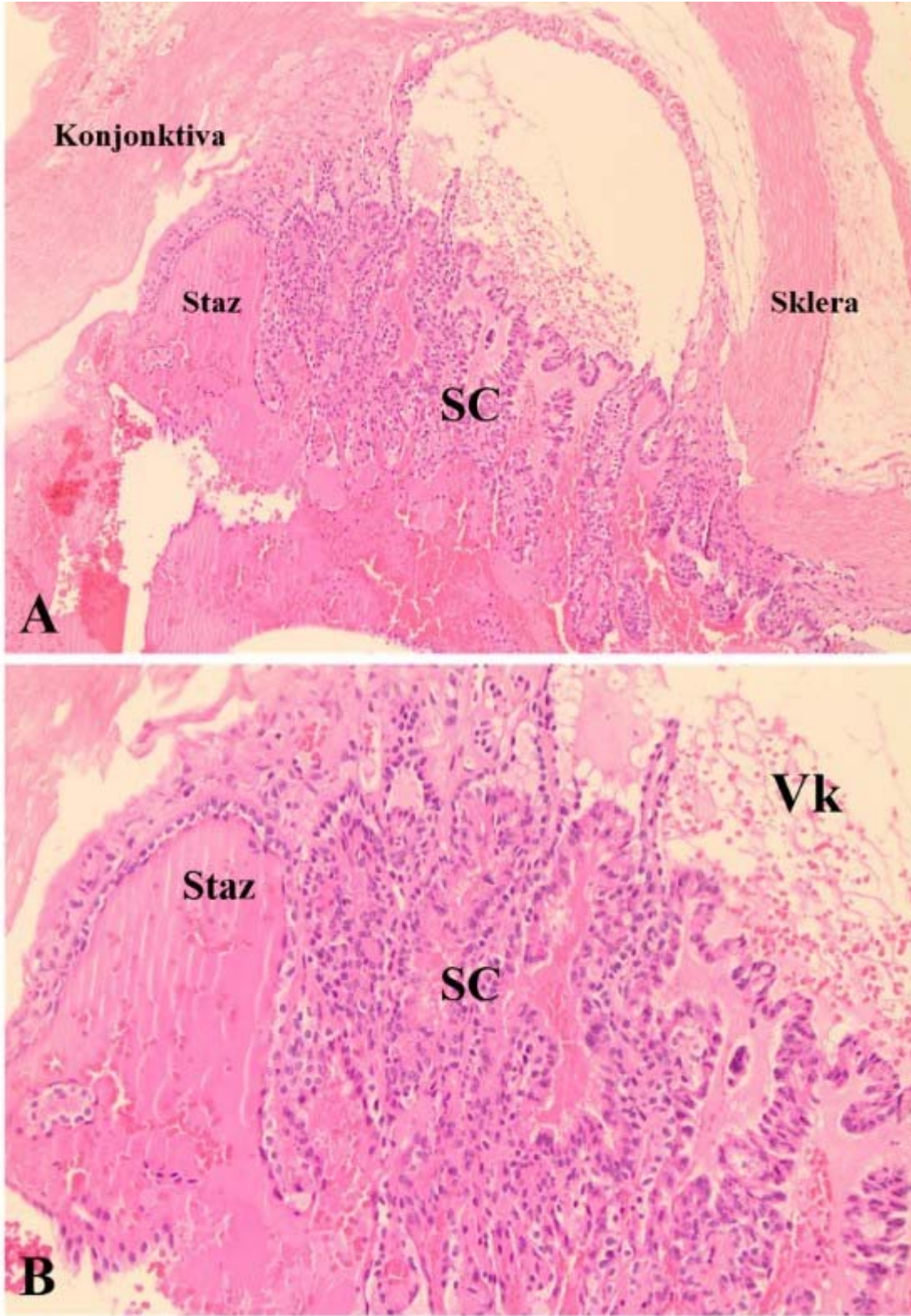


Şekil 1



Şekil 1. 24 saatlik uygulama sonrası sıçan gözlerinden elde edilen silier cisimlerin (SC) Hematoksilen+Eozin boyanmış kesitleri (100x, 200x).

Şekil 2



Şekil 2. 24 saatlik LPS+Fetuin uygulaması sonrası sıçan gözlerinden elde edilen silier cisimin (SC) Hematoksilen+Eozin boyanmış kesiti (A: 100x, B: 200x). Hipertrofik silier cismin etrafında yoğun staz ve damarlanmada artış (Vk) dikkat çekmektedir.

TARTIŞMA

Üveit, dünya çapında görme engelliliği ve körlüğün en önemli nedenlerinden birisidir (19). Göz küresinin damardan zengin olan üveanın inflamasyonuna üveit denir (19). Üveit insidansı 14-52,4 / 100 000 olup, tüm

dünyadaki prevalansı %0,73'tür (20).

İntraoküler inflamasyon farklı mekanizmalar içerdiğinden, üveitin değişik formlarının patogenezinin ve tedavi yaklaşımlarının anlaşılması için çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu hayvan modelleri, üveit için yeni tedavi edici ajanların geliştirilmesini ve bu ajanların test edilmesini mümkün kılar (21).

Endotoksinle indüklenen üveit; deney hayvanına bir endotoksin olan LPS'nin verilmesiyle 24 saat sonra pik yapan, göze lokalize inflamatuvar cevapla karakterize akut geçici bir olaydır. Bu hayvan modelindeki üveit tipi akut ön üveittir ve bu model akut ön üveitin hem patofizyolojisini hem de potansiyel tedavisini araştıran çalışmalarda kullanılmaktadır (21).

Bu çalışmada LPS ile oluşturulan akut EİÜ'de fetuinin histopatolojik etkisi araştırılmıştır. Histopatolojik değerlendirmede özellikle silier stromada inflamasyonun LPS, Fetuin ve LPS+Fetuin gruplarında arttığı görülmüştür. En şiddetli inflamasyonun LPS+Fetuin grubunda olduğu görülmüştür. Bununla birlikte silier cismin yapısını koruyamadığı, epitelyal hücrelerin şiddetli hipertrofi gösterdiği ve yoğun staz ile birlikte damarlanmanın arttığı izlenmiştir.

Yüksek oranda saflaştırılmış fetuinin in vitro monositlerde sitokin ekspresyonunu indüklediği için güçlü bir pro-inflamatuar etkisini gösteren veriler mevcuttur (22). İnflamasyonun iskemik inmenin akut fazında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. İnmede, beyin iskemisine bağlı olarak indüklenen, kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde geçici bir artış vardır. Bu, fetuin ve periferik immün hücreler (makrofaj / monositler gibi) gibi dolaşımdaki proteinlerin girişine izin verir. İnme hastalarının semptomların başlamasından 72 saat sonra TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi bazı sitokinlerin plazma seviyelerinin belirgin şekilde daha yüksek olduğunu gösterilmiştir. Bu hastalarda son kanıtlar fetuinin pro-inflamatuar rolünü ortaya çıkarmaktadır. Fetuinin akut iskemik inmeden sonra inflamatuvar bir rolü olabileceği hipotezini destekleyen çalışmalarda, bu glikoproteinin immüno-inflamatuar aktivasyonu nedeniyle iskemik nöronal hasarın gelişmesinde yeni bir temel olduğu öne sürülmüştür (23). Akut iskemik inmeli kişilerde daha yüksek fetuin düzeyleri ve beyaz kan hücreleri sayısı ile korelasyonları, fetuinin olası bir pro-inflamatuar rolünü akla getirmektedir (24). Daha önce akut üveit modelinde denenmemiş bir protein olarak fetuinin, bizim çalışmamızda pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerini LPS ile birlikte artırması, üveitte inflamasyonu indükleyici etkisini akla getirmiştir.

Fetuinin hipertrofik yağ dokusuna sızdığı ve esas olarak yağ dokusunun inflamasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (25). Akut faz cevabında sistemik inflamasyonun fetuin seviyelerini etkilemesinin yanı sıra, fetuinin bir adipokin de olduğuna dair yeni kanıtlar hayvan modellerinde desteklenmektedir (26,27). Yapılan insan çalışmalarda, plazma fetuin seviyelerinin metabolik sendrom ve aterosklerotik lipit profili ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır (28). Bu durumlar subklinik inflamasyon ve hipoadiponektinemi ile karakterizedir (29). Metabolik sendromlu hastalarda, subkutan adipoz dokudan fetuin salgılanması, lipopolisakkarit bağlayıcı protein, Yüksek Hareketli Grup Protein B1 (HMGB1), Toll Like Reseptör 2 (TLR-2) ve Toll Like Reseptör 4 (TLR-4) salgılanmasına paralel olarak normale kıyasla arttığı kaydedilmiştir (27). Sonuç olarak fetuin, kemoatraktan ve makrofaj polarize edici ajan olarak işlev gören otokrin veya parakrin yoldaki yağ dokusu inflamasyonuna katkıda bulunabilir (30). Bu nedenle inflamatuvar hastalıklarda fetuinin hücre ve dokulardaki sistemik ve lokal etkileri üzerine ayrı bir değerlendirmeye ihtiyaç vardır. LPS ile oluşturduğumuz akut üveit modelinde fetuinin sistemik uygulanmasının etkilerini araştırdığımız bu çalışmada, yüksek doz fetuinin inflamasyonu artırdığı ve LPS'nin etkilerini indüklediğini gösterdik.

Fetuinin yaralanma ile veya enfeksiyonla ilişkili inflamatuvar reaksiyonları düzenlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bir dizi çalışma, fetuinin sentezinin çeşitli klinik koşullarda farklı şekillerde düzenlenebileceğini göstermiştir (23). Endotoksemi, sistemik inflamasyon, sepsis ve romatoid artrit, pankreatit, kronik böbrek hastalığında serum fetuin düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla fetuinin bir anti-inflamatuar veya inflamasyonda koruyucu rolü olduğu ileri sürülmektedir (31).

SONUÇLAR

Bu çalışmada 100 mg/kg fetuin, endotoksin ile indüklenmiş akut üveitte, histopatolojik kesitlerde inflamasyonun şiddetini artırmıştır. Bu durum fetuinin sadece anti-inflamatuar etki değil düşük inflamatuvar hastalık koşullarında, özellikle yüksek dozlarda pro-inflamatuar etki gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle 100 mg/kg doz fetuinin sıçanlarda akut endotoksin ile indüklenmiş üveitte tedavi edici bir ajan olarak kullanılması mümkün olmayabilir. Bunun yanında fetuinin, EİÜ'de anti-inflamatuar etkisi olup olmadığını gösterebilmek için, farklı dozlarda ve farklı zaman aralıklarında yapılan yeni çalışmalara ihtiyaç doğurmuştur.

Histopatolojik analizler sonucunda fetuinin, sıçanlarda oluşturulan EİÜ modelinde pro-inflamatuar bir etki gösterdiğini saptamış olup, en yüksek inflamatuvar etkiyi ise LPS ile birlikte gösterdiğini ortaya koyduk. Oküler inflamasyonda fetuinin bütün özellikleri bilinmemesinin yanı sıra farklı dozlarının olası terapötik etkileri de henüz açığa çıkarılmamıştır. Fetuinin olası inflamatuvar etkisinin ortaya konabilmesi için, hayvan çalışmalarının yanı sıra insanlarda yapılacak geniş popülasyonlu uzun dönem kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır. İleri moleküler çalışmalar, fetuinin sebep olduğu hücresel modifikasyonları ve buna bağlı olarak gerçekleşecek prognostik

etkilerini ortaya çıkarabilir. Dahası fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda fetuin aktivasyonunu modifiye eden faktörler de genetik, biyokimyasal ve klinik düzeyde araştırılmalıdır. Fetuin uygulamasının insanlarda tedavi seçeneği olarak kullanıldığını gösteren bir çalışma henüz yoktur. Çünkü fetuin iki yönlü bir molekül olduğu ve saf preparatlarının elde edilmesi güç olduğu için çeşitli patofizyolojik modellerde yararlı ya da zararlı olduğunu söylemek zordur. Fakat çalışmamız akut üveitte fetuinin pro-inflamatuar olabileceğini ve akut üveitin patogenezinde fetuinin akıldan çıkarılmaması gerektiğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. Yerlikaya KF, Mehmetoğlu İ. Fetuin-A ve Fizyopatolojik Etkileri. *Turkiye Klinikleri J Endocrin*, 2012; 7(1):21-7.
2. Westfeld R, Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Vascular calcification and fetuin-A deficiency in chronic kidney disease. *Trends Cardiovasc Med*, 2007; 17(4):124-8.
3. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Kröber SM, et al. Alpha2-HeremansSchmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care*, 2006; 29(4):853-7
4. Lorant DP, Grujicic M, Hoebaus C, Brix JM, Hoeller F, Scherthaner G, et al. Fetuin-A levels are increased in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *Diabetes Care*, 2011 Jan; 34(1):156-61.
5. Zhao C, Hou J, Wang S, Jiang R. Relation of Serum and Vitreous Concentrations of Fetuin-A with Diabetic Retinopathy. *Med Sci Monit*, 2015 Jun 25; 21:1839-42.
6. Sato H, Kazama JJ, Wada Y, Kuroda T, Narita I, Gejyo F, et al. Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A(AHSG) in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med*, 2007; 46(20):1685-91.
7. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Heidari E, Baharivand N, Sadeghi K, Sorkhabi R, et al. Matrix γ -carboxyglutamate protein and Fetuin-A, in wet type age-related macular degeneration. *Int J Ophthalmol*, 2015 Jun 18; 8(3):556-9.
8. Ix JH, Biggs ML, Mukamal KJ, Kizer JR, Zieman SJ, Siscovick DS, et al. Association of fetuin-a with incident diabetes mellitus in community-living older adults: the cardiovascular health study. *Circulation*, 2012 May 15; 125(19):2316-22.
9. Jung CH, Kim BY, Kim CH, Kang SK, Jung SH, Mok JO. Associations of serum fetuin-A levels with insulin resistance and vascular complications in patients with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, 2013 Sep; 10(5):459-67.
10. Wang H, Sama AE. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr Mol Med*, 2012 Jun; 12(5):625-33. Review.
11. Li W, Zhu S, Li J, Huang Y, Zhou R, Fan X, et al. A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation. *PLoS ONE*, 2011; 6(2):e16945.
12. Wang H, Zhang M, Soda K, Sama A, Tracey KJ. Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet*, 1997 Sep 20; 350(9081):861-2.
13. Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 Nov 24; 95(24):14429-34.
14. Shiratori K, Ohgami K, Ilieva IB, Koyama Y, Yoshida K, Ohno S. Inhibition of endotoxin-induced uveitis and potentiation of cyclooxygenase-2 protein expression by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004 Jan; 45(1):159-64.
15. Lee K, Bajwa A, Freitas-Neto CA, Metzinger JL, Wentworth BA, Foster CS. A comprehensive review and update on the biologic treatment of adult noninfectious uveitis: part II. *Expert Opin Biol Ther*, 2014 Nov; 14(11):1651-66.
16. Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, Cui HS, Hayasaka Y. A cholinergic agonist attenuates endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007 Jun; 48(6):2719-25.
17. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, et al. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I κ B kinase β inhibitor in rats. *Mol Vis*, 2012; 18:2586-97.

18. Abbaszadeh Hasiri M, Baghaei Moghaddam E, Khalili MR, Hossein Amini A, Eghtedari M, Azzizadeh M, et al. Intra-vitreous injection of methotrexate in experimental endotoxin-induced uveitis in rabbit. *Vet Res Forum*, 2018 Fall; 9(4):315-321.
19. American Academy of Ophthalmology. *Intraocular Inflammation and Uveitis*. Section 9. San Francisco: 2017-2018.
20. Tsirouki T, Dastiridou A, Symeonidis C, Tounakaki O, Brazitikou I, Kalogeropoulos C, Androudi S. A Focus on the Epidemiology of Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*, 2018; 26(1):2-16.
21. Behar-Cohen FF, Savoldelli M, Parel JM, Goureau O, Thillaye-Goldenberg B, Courtois Y, et al. Reduction of corneal edema in endotoxin-induced uveitis after application of L-NAME as nitric oxide synthase inhibitor in rats by iontophoresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998 May; 39(6):897-904.
22. Hennige AM, Staiger H, Wicke C, Machicao F, Fritsche A, Häring HU, et al. Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PLoS One*, 2008 Mar 12; 3(3):e1765.
23. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Di Sciacca R, Casuccio A, Bivona G, Bellia C, et al. Fetuin-A and CD40L plasma levels in acute ischemic stroke: differences in relation to TOAST subtype and correlation with clinical and laboratory variables. *Atherosclerosis*, 2010 Jan; 208(1):290-6.
24. Wang H, Li W, Zhu S, Li J, D'Amore J, Ward MF, Yang H, et al. Peripheral administration of fetuin-A attenuates early cerebral ischemic injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010; 30(3):493-504.
25. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003 Dec; 112(12):1796-808.
26. Perez-Sotelo D, Roca-Rivada A, Larrosa-Garcia M, Castela C, Baamonde I, Baltar J, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue express and secrete functional alpha2hsglycoprotein (fetuin A) especially in obesity. *Endocrine*, 2017; 55:435-446.
27. Jialal I, Devaraj S. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2018 Jan; 20:33(1).
28. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, et al. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*, 2006; 113:1760-7.
29. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*, 2006; 27:762-78.
30. Chatterjee P, Seal S, Mukherjee S, Kundu R, Mukherjee S, Ray S, et al. Adipocyte fetuin-A contributes to macrophage migration into adipose tissue and polarization of macrophages. *J Biol Chem*, 2013 Sep 27; 288(39):28324-30.
31. Komsa-Penkova RS, Golemanov GM, Radionova ZV, Tonchev PT, Iliev SD, Penkov VV. Fetuin-a – alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein: From structure to a novel marker of chronic diseases part 1. Fetuin-a as a calcium chaperone and inflammatory marker. *J Biomed Clin Res*. Vol 10 Number 2, 2017; 90-97.