

Hyperleptinemia and cardiovascular system

Hiperleptinemia și sistemul cardiovascular

**Daniela Miricescu¹, Alexandra Totan¹, Constantin Ștefani^{2,3},
Ana Maria Alexandra Stănescu², Maria Greabu¹**

¹Disciplina Biochimie, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România

²Departamentul Medicină de Familie, Facultatea de Medicină Generală,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România

³Spitalul Universitar de Urgență Militar Central „Dr. Carol Davila”, București, România

ABSTRACT

Leptin is the satiety hormone, synthesized in the adipose tissue that reduces food intake, being involved in glucose and lipid metabolism. Hyperleptinemia correlates with obesity and represents a risk factor in the pathology of the cardiovascular system. Increased concentrations of leptin have been observed in patients with hypertension or atherosclerosis. *In vitro* studies suggest the angiogenic role of leptin. The purpose of this review is to present the metabolic effects of hyperleptinemia in the cardiovascular system.

Keywords: adipose tissue, hyperleptinemia, cardiovascular diseases

REZUMAT

Leptina este hormonul sațietății, sintetizat la nivelul țesutului adipos, hormon care reduce aportul de alimente, fiind implicat, de asemenea, și în metabolismul glucozei și al lipidelor. Hiperleptinemia se corelează cu obezitatea și reprezintă un factor de risc în patologia sistemului cardiovascular. Concentrații crescute de leptină au fost observate la pacienți cu hipertensiune sau ateroscleroză. Studiile realizate *in vitro* sugerează rolul angiogenic al leptinei. Scopul acestui review este de a prezenta efectele metabolice ale hiperleptinemiei la nivelul sistemului cardiovascular.

Cuvinte cheie: țesut adipos, hiperleptinemie, afecțiuni cardiovasculare

INTRODUCERE

Leptina, hormonul sațietății, a fost descoperită în urmă cu 25 de ani, fiind sintetizată de către adipocite și codificată de gena obezității *ob*. A prezentat și prezintă un interes deosebit de mare în domeniul cercetării țesutului adipos alb, dar și al cercetării afecțiunilor înrudite cu acesta, precum hipertensiunea arterială, ateroscleroza coronariană, hipertrofia miocardică, diabetul și dislipidemia (1).

Leptina se corelează cu depozitele de grăsime ale organismului și acționează pentru menținerea homeostaziei energetice la nivelul țesuturilor centrale și periferice. Acest hormon polipeptidic este implicat de asemenea și în patogeniza altor procese fiziologice, precum reproducerea, homeostazia osoasă și funcția imunitară (2). Leptina acționează

asupra celulelor țintă prin legarea de receptorii membranei plasmatică, identificându-se până în prezent șase izoforme notate ob-R. Izoformele sunt clasificate în trei clase, după cum urmează: forma lungă (ob-Rb), forma scurtă (ob-Ra, c, d, f: izoforme predominante de la nivelul inimii; majoritatea efectelor biologice ale leptinei sunt mediate de izoforma ob-Rb), iar ultima izoformă reprezintă forma secretorie (ob-Re) (3,4). Acest hormon crește vasodilatația și perfuzia sângelui în țesutul adipos prin inducerea activității enzimei oxid nitric sintază la nivelul celulele endoteliale și musculare netede. Obezitatea se caracterizează prin niveluri crescute de leptină, acest hormon interacționând chiar cu hormoni implicați în metabolismul energetic, precum insulina (5,6).

RECEPTORII LEPTINEI

Receptorii leptinei sunt produșii genei *db*, care au fost identificați pentru prima dată prin tehnici de clonare, existând cel puțin șase izoforme notate de la *a* la *f* (obRa-obRf). Domeniul extracelular este conservat la toate izoformele receptorului, însă lungimea domeniilor intracelulare poate varia (7).

Izoformele obRa, obRc, obRd și obRf prezintă domenii intracelulare scurte, cu 32 până la 40 resturi de aminoacizi, în timp ce izoforma obRb are un domeniu intracelular lung, care prezintă aproximativ 306 aminoacizi și pare să medieze majoritatea efectelor biologice ale leptinei. Receptorii leptinei sunt prezenți în multe țesuturi periferice, inclusiv în cele ale sistemului cardiovascular (8).

HIPERLEPTINEMIA

Concentrațiile plasmatice ale leptinei sunt direct proporționale cu cantitatea de țesut adipos. Hiperleptinemia este implicată în angiogeneză, calcifieri vasculare și tromboză, fiind considerată un factor de risc cardiovascular în rândul persoanelor obeze (9).

Studii realizate pe culturi celulare (celule endoteliale) au observat faptul că leptina poate stimula în mod direct producerea de specii reactive ale oxigenului (SRO), precum peroxidul de hidrogen (H₂O₂) și radicalul hidroxil (HO), dar poate fi și un precursor aterogenic (10). Leptina poate stimula proliferarea monocitelor și macrofagelor, asemeni moleculelor proinflamatorii, cu producția în final de citokine inflamatorii (11). Expunerea monocitelor la concentrații crescute de leptină crește activitatea proteinkinazei C și a lipoproteinlipazei de la nivelul macrofagelor, care sunt molecule proaterogene (9). Leptina stimulează în mod indirect producerea de citokine inflamatorii precum IL-6, TNF- α , care cresc activitatea NADPH oxidazei, cu generarea de anion superoxid (O_2^-). Leptina stimulează acumularea de colesterol, în special în prezența unor concentrații crescute de glucoză, promovând în acest fel procesul de peroxidare lipidică (12).

LEPTINA ȘI AFECȚIUNILE CARDIOVASCULARE

Până în prezent, s-au realizat studii clinice pentru a descoperi efectele leptinei asupra sistemului cardiovascular, incluzând pacienți cu hipertensiune, diabet, ateroscleroză sau afecțiuni coronariene. Leptina poate conduce la obezitate, care este asoci-

ată cu hipertensiune arterială. Studii realizate *in vitro* au demonstrat la pacienți cu afecțiune coronariană activarea oxidului nitric la nivelul celulelor endoteliale aortice umane (13). Hiperleptinemia acută – care se manifestă prin creșterea expresiei receptorului α care activează proliferarea peroxizomilor, ca urmare a β -oxidării acizilor grași și reglarea slabă a lipogenezei – prezintă un efect protector la nivel cardiac, dar și la nivelul altor organe (14). Hiperleptinemia cronică conduce la scăderea procesului de oxidare a acizilor grași și crește absorbția lor celulară chiar de către cardiomiocite, conducând în final la apoptoza lor (15,16). Hiperleptinemia este asociată cu afecțiuni cardiovasculare precum hipertensiunea, diabetul sau ateroscleroza (15-17).

EPECTELE METABOLICE ALE LEPTINEI LA NIVEL CARDIAC

Obezitatea se caracterizează prin modificări la nivelul metabolismului cardiac; astfel, este redusă utilizarea miocardică a glucozei și crește utilizarea acizilor grași și a consumului de oxigen miocardic. Aceste schimbări pot genera acumularea de lipide intracelulare, contribuind la creșterea prevalenței cardiomiopatiilor în rândul populației obeze. Leptina, adiponectina și TNF- α sunt biomarkeri cruciali cu impact asupra funcției cardiace (18).

La șoarecii cu dietă bogată în grăsimi, Wright JJ și colaboratorii au observat adaptarea rapidă a cordului acestor animale la excesul caloric. Consumul de oxigen miocardic și oxidarea acizilor grași sunt crescute la numai 2 săptămâni de la începutul dietei hipercalorice, în timp ce rata de oxidare a glucozei prin glicoliză este redusă. Aceste modificări metabolice au fost asociate cu perturbări ale transportului glucozei GLUT4, dar o activitate normală pentru piruvatdehidrogenază și malonil-CoA (19).

La șobolanii tineri diabetici Zucker de 11 săptămâni, Chatham și Seymour au observat modificări semnificative ale metabolismului glucidic oxidativ și nonoxidativ la nivel cardiac, în absența modificărilor excesive ale funcției sistolice. Aceste modele animale au dezvoltat hiperglicemie după vârsta de 6 săptămâni, astfel încât, la scurt timp după dezvoltarea diabetului, există modificări ale metabolismului cardiac indus de carbohidrați, modificări care ar putea contribui la dezvoltarea cardiomiopatiei diabetice la animalele obeze (20). Analizând profilul adipokinelor la șobolani diabetici, s-a observat o creștere semnificativă a raportului leptină / adiponectină, în principal din cauza scăderii nivelului de

adiponectină, precum și din cauza creșterii expresiei IL-6. Efectele metabolice ale leptinei asupra metabolismului cardiomiocitelor s-au observat și prin tratarea celulelor cu forme individuale recombinante ale acestei adipokine (18).

Oxidarea acizilor grași este declanșată prin activarea AMPK (proteinkinaza activată de AMP) la nivel cardiac, care reduce activitatea acetyl-CoA carboxilazei. Leptina modifică metabolismul cardiac în inimile izolate de șobolani prin creșterea oxidării acizilor grași independent de AMPK. Leptina nu are efect asupra activității cardiace a AMPK sau a fosforilării AMPK și nu produce modificări ale activității acetyl-CoA carboxilazei sau ale concentrației de malonil-CoA (21). Oxidul nitric și proteinkinaza activată mitogenic p38 (p38 MAPK) sunt cunoscute în a stimula absorbția de glucoză (22). Leptina stimulează oxidul nitric (NO) prin activarea căilor de semnalizare JAK6/STAT (Janus kinase 6 / Signal Transducer and Activator of Transcription). Creșterea producției de NO stimulează p38 MAPK, producând în paralel stimularea oxidării acizilor grași și inhibarea funcției cardiace. Prin urmare, leptina pare să stimuleze oxidarea acizilor grași printr-un mecanism mediat de căile de semnalizare STAT3 / oxid nitric / p38 MAPK (23). Leptina pare a fi responsabilă de schimbările metabolice prin creșterea expresiei enzimelor implicate în procesul de oxidare a acizilor grași de la nivel mitochondrial.

LEPTINA ȘI HIPERTENSIUNEA

Leptina este implicată în patogeneza hipertensiunii prin creșterea producției de citokine proinflamatorii, precum TNF- α , interleukină IL-6 și formarea de SRO în celulele endoteliale. Acest hormon induce disfuncția endotelială prin reducerea biodisponibilității NO la nivelul celulelor endoteliale (24,25). Într-un studiu realizat de către Poniedziałek-Czajkowska E și colaboratorii la 34 de femei gravide cu hipertensiune gestațională, s-a observat un nivel seric statistic crescut de leptină, corelat cu un indice de masă corporală (IMC) crescut. Leptina poate fi un marker predictiv în monitorizarea hipertensiunii gestaționale (26).

Pentru a testa asocierea între leptină și hipertensiune, Von Schnurbein J și colaboratorii au măsurat tensiunea arterială, ritmul cardiac în repaus, testul Schellong, ritmul cardiac, metabolizii catecolaminelor și nivelurile de aldosteron la 6 pacienți cu deficiență congenitală de leptină înainte și după începerea terapiei cu leptină. Rezultatele studiului ilustrează faptul că hipertensiunea arterială asocia-

tă obezității nu depinde de prezența leptinei. Terapia pe termen scurt cu leptină poate crește tensiunea arterială și ritmul cardiac la persoanele obeze, astfel că leptina joacă cel puțin un rol aditiv în hipertensiunea arterială asociată obezității, mecanisme care nu sunt încă în totalitate elucidate (27). Huang IC și colaboratorii au testat 80 de pacienți cu hipertensiune, la care nivelul seric de leptină a fost statistic crescut comparativ cu lotul de voluntari sănătoși (28).

LEPTINA ȘI ATEROSCLEROZA

Leptina facilitează în obezitate dezvoltarea trombozei și a aterosclerozei prin mecanisme care includ stimularea hipertrofiei, proliferarea, migrația și calcifierea celulelor vasculare și musculare netede. Efectele sale angiogenice asupra proliferării și remodelării celulelor endoteliale și asupra disfuncției endoteliale pot conduce la creșterea SO și la scăderea biodisponibilității NO (29,30). Studii realizate *in vivo*, pe șoarecii care prezentau deficiență de leptină, au raportat o rată scăzută în dezvoltarea ateroscleroză. Studii pe subiecți umani au raportat concentrații plasmatice de leptină crescute care au fost asociate cu ateroscleroza (31,32). Niveluri serice crescute de leptină au fost descoperite de către Liu și colaboratorii a fi crescute și la pacienți care prezentau valvă aortică calcificată, proces patologic similar cu cel al aterosclerozei, în special la pacienții cu vârsta mai mică de 65 de ani sau la cei cu disfuncție renală (33).

LEPTINA ȘI ANGIOGENEZA

Angiogeneza reprezintă mecanismul biologic al formării de noi vase de sânge din cele preexistente, care joacă roluri importante în multe afecțiuni fiziologice și patologice, precum vindecarea rănilor, ciclul menstrual, creșterea placentei și a glandelor mamare în timpul sarcinii, dezvoltarea tumorilor, în afecțiuni cardiovasculare, artrite, retinopatii și ateroscleroză (34).

Angiogeneza include evenimente coordonate, cum ar fi degradarea matricei extracelulare, migrația și proliferarea celulelor endoteliale și murale pentru a forma noul vas, formarea lumenului și edificarea peretelui vasului prin stratul de celule murale care este asociat cu pericitele și / sau mușchi netezi (35). Leptina poate fi un factor angiogenic puternic sau un inductor al angiogenezei. Fiind produsul proteic al genei *ob*, poate induce un potențial angiogenic la nivelul celulelor endoteliale (36).

Studii realizate *in vitro* au sugerat faptul că leptina induce proliferarea și / sau supraviețuirea celulară asemănător factorului de creștere vascular endotelial (VEGF) 165 (37).

Leptina și VEGF induc o creștere similară a permeabilității vasculare la șoareci la nivel ocular, deoarece poate potența angiogeneza mediată de VEGF. Leptina crește indirect angiogeneza prin inducerea activității metaloproteinazei-2 (MMP-2) și a activității MMP-9. Prin inducerea activității NO sintazei, leptina reglează vasodilatația și permeabilitatea vasculară în țesutul adipos (38,39).

Garonna și colaboratorii au observat faptul că leptina promovează proliferarea, migrarea direcționată și diferențierea celulelor endoteliale prin creșterea activității ciclooxigenazei-2 (COX-2) și determină o fosforilare rapidă a VEGF R2 prin intermediul căilor de semnalizare p38 MAPK / AKT (proteinkinaza B). Calea de semnalizare MAPK, care include p38 MAPK, reglează expresia COX-2 la nivelul celulelor endoteliale tratate cu stimuli fiziologici și patologici (40).

Într-un studiu condus de către Fei Yu și colaboratorii, folosind celule endoteliale EA Hy926, s-a demonstrat că leptina, prin intermediul căii de semnalizare AKT, favorizează proliferarea și diferențierea angiogenică și capacitatea de regenerare a țesuturilor endogene. Folosirea copolimerului format din acid lactic și lactonă conjugat cu leptină reprezintă materiale promițătoare pentru formarea de grefe (41).

Ngo Va și colaboratorii au investigat dacă leptina poate promova diferențierea odontogenă și angiogeneza în celulele pulpare dentare umane (HDPCs) *via* MAPK. Leptina poate induce angiogeneza, diferențiere odontogenă și mineralizare în celulele pulpare prin activarea căii de semnalizare MAPK (42).

Scopul studiului *in vivo* condus de către Choi SH și colaboratorii a fost de a evalua efectele lepti-

nei asupra formării reparative a dentinei și prezența angiogenezei în țesutul pulpar. S-au folosit 24 de șobolani de 7 săptămâni de sex masculin. Leptina are capacitatea de a induce angiogeneza, diferențiere odontogenă și mineralizare în țesutul pulpar la șobolanii incluși în studiu. Leptina a prezentat, de asemenea, răspunsuri inflamatorii favorabile în țesutul pulpar și formarea de noi vase de sânge (43).

Dacă sunt studii care demonstrează efectele angiogenice ale leptinei, alte studii au indicat proprietăți antiangiogenice pentru leptină. Wang CN și colaboratorii au observat comportarea leptinei ca o citokină inflamatorie și proteină antiangiogenă. Acest rol al leptinei a fost observat în apariția simptomelor preeclampsiei în lichidul amniotic și ar putea fi considerată ca un biomarker predictiv pentru preeclampsie (44). Sunt însă necesare studii viitoare pentru a stabili mecanismul exact prin care leptina induce angiogeneza în condiții fiziologice și patologice sau, dimpotrivă, cel prin care poate avea efecte opuse.

CONCLUZII

Hiperleptinemia reprezintă un factor de risc în dezvoltarea unor afecțiuni cardiovasculare precum ateroscleroza și hipertensiunea. Leptina este implicată la nivel cardiovascular în oxidarea acizilor grași printr-un mecanism mediat de căile de semnalizare JAK/STAT / NO / p38 MAPK. Acest hormon polipeptidic și VEGF sunt considerați factori angiogenici. Leptina ar putea fi considerată un parametru foarte valoros în patogeneza afecțiunilor cardiovasculare asociate cu obezitatea.

Notă

Toți autorii au contribuit în mod egal la scrierea manuscrisului.

BIBLIOGRAFIE

- Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2013; 216:T17-36.
- Hou N, Luo JD. Leptin and cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:905-13.
- Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
- Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: Cardiovascular consequences. *Circ Res* 2007; 101:545-59.
- Tigno XT, Selaru IK, Angeloni SV et al. Is microvascular flow rate related to ghrelin, leptin and adiponectin levels? *Clin Hemorheol Microcirc* 2003; 29:409-16.
- Kamba T, Tam BY, Hashizume H et al. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult Microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H560-76.
- Amundson DE, Djurkovic S, Matwyloff GN. The obesity paradox. *Crit Care Clin* 2010; 26:583-96.
- Bjorbaek C, Uotani S, da SB, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:32686-95.
- Maingrette F, Renier G. Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: Involvement of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* 2003; 52: 2121-2128.
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 1999; 13: 1231-1238.
- Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: The

- possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003; 170: 21-29.
12. O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucosedependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem* 2002; 277: 42557-42562.
 13. Vecchione C, Maffei A, Colella S et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 2002;51:168-73.
 14. Wolk R, Somers VK. Leptin and vascular function: Friend or foe? *Eur Heart J* 2006; 27:2263-5.
 15. Palanivel R, Eguchi M, Shuralyova I et al. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism* 2006; 55:1067-75.
 16. Mc Gaffin KR, Zou B, McTiernan CF et al. Leptin attenuate cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 2009; 83:313-24.
 17. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 2007; 101:335-47.
 18. Palanivel R, Vu V, Park M et al. Differential impact of adipokines derived from primary adipocytes of wild-type versus streptozotocin-induced diabetic rats on glucose and fatty acid metabolism in cardiomyocytes. *J Endocrinol* 2008; 199:389-97.
 19. Wright JJ, Kim J, Buchanan J et al. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res* 2009;82:351-60.
 20. Chatham JC, Seymour AM. Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res* 2002;55:104-12.
 21. Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonylCoA axis. *J Biol Chem* 2002;277:29424-30.
 22. Almeida A, Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 2004;6:45-51.
 23. Sharma V, Mustafa S, Patel N et al. Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 2009;617:113-7.
 24. Rodríguez A, Fortuño A, Gómez-Ambrosi J et al. The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinol* 2007;148:324-31.
 25. Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: The possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003;170:21-9.
 26. Poniedziałek-Czajkowska E, Mierzyński R, Dłuski D et al. Adipokines and Endothelium Dysfunction Markers in Pregnant Women with Gestational Hypertension. *Int J Hypertens* 2019;2019:7541846.
 27. Von Schnurbein J, Manzoor J, Brandt S et al. Leptin Is Not Essential for Obesity-Associated Hypertension 2019;12(4):460-475.
 28. Huang IC, Chang CC, Hsu BG et al. Association of hyperleptinemia with peripheral arterial disease in hypertensive patients. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi* 2017;29(3):148-153.
 29. Beltowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens* 2006;24:789-801.
 30. Tahergorabi Z, Khazaei M. Changes of serum angiogenic biomarkers and their correlations with serum leptin concentration. *Bratisl Lek Listy* 2014;115:330-3.
 31. McMahon M, Skaggs BJ, Sahakian L et al. High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1619-24.
 32. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M et al. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3872-8.
 33. Liu Y, Gu Y, Shen Y et al. Association Between Serum Leptin Level and Calcific Aortic Valve Disease. *J Am Heart Assoc* 2019; 8(19):e012495.
 34. Salehi E, Amjadi F, Khazaei M. Angiogenesis in Health and Disease: Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Isfahan Med School* 2011;29:1-15.
 35. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
 36. Artwohl M, Roden M, Hölzenbein T et al. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:577-80.
 37. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281:168.
 38. Park HY, Kwon HM, Lim HJ et al. Potential role of leptin in angiogenesis: Leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 2001;33:95-102.
 39. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C et al. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6390-5.
 40. Garonna E, Botham KM, Birdsey GM et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 couples cyclo-oxygenase-2 with pro-angiogenic actions of leptin on human endothelial cells. *PLoS One* 2011;6:e18823.
 41. Fei Yu, Runqing Fu, Lu Liu et al. Leptin-induced angiogenesis of EA-Hy926 endothelial cells via the Akt and Wnt signaling pathways in vitro and in vivo. *Frontiers in Pharmacology* 2019; 10: article 1275.
 42. Ngo VA, Jung JY, Koh JT. Leptin induces odontogenic differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells via activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Endod* 2018; 44(4):585-591.
 43. Choi SH, Jang JH, Koh JT et al. Effect of leptin on odontoblastic differentiation and angiogenesis: an in vivo study. *J Endod* 2019; 45(11):1332-1341.
 44. Wang CN, Chang SD, Peng HH et al. Change in amniotic fluid level of multiple anti-angiogenic proteins before development of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1431-41.