

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Julijana S. Stanimirović

**Polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti
inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-
kalijumove pumpe u jetri gojaznih pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Јулијана С. Станимировић

**Полне разлике у регулацији експресије и
активности индуцибилне азот-моноксид-
синтазе и натријум-калијумове пумпе у
јетри гојазних пацова**

докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Julijana S. Stanimirović

**Sex differences in regulation of expression
and activity of inducible nitric oxid synthase
and sodium-potassium pump in liver of obese
rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

Prof. dr Esmā R. Isenović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Beograd, redovni profesor, Univerzitet privredne akademije u Novom Sadu-Stomatološki fakultet Pančevo, Srbija

Prof. dr Jelena Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Članovi komisije:

dr Milan Obradović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Beograd, Srbija

dr Predrag Jovanović, docent, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Beograd, Srbija

dr Branislava Ilinčić, docent, Univerzitet u Novom Sadu-Medicinski fakultet, Novi Sad, Srbija

Datum i mesto javne odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u okviru projekta 173033 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, pod rukovodstvom prof. dr Esme R. Isenović, naučnog savetnika.

Ovom prilikom se zahvaljujem:

Prof. Dr Esmi R. Isenović, naučnom savetniku Instituta „Vinča“ koja mi je pružila šansu da postanem deo njenog naučno-istraživačkog tima, na ukazanoj stručnoj pomoći i strpljenu tokom izrade ove doktorske disertacije. Neizmerno joj se zahvaljujem na izdvojenom vremenu i na velikom trudu pri pregledu i oceni ovog rada.

Prof. Dr Jeleni Đorđević, mentoru sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na predusretljivosti, stručnoj pomoći, dobronamernim sugestijama i velikom trudu pri pregledu i oceni ove doktorske disertacije.

Dr Milanu Obradoviću, naučnom saradniku Instituta „Vinča“, na velikoj podršci, strpljenju i stalnoj spremnosti da mi pomogne tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i na dragocenim savetima i prijateljstvu, koje je pružao od samog početka našeg zajedničkog rada.

Docentu, dr Predragu Vujoviću, na vremenu koje je posvetio pregledu i oceni doktorske disertacije, kao i dragocenim sugestijama prilikom konačnog formiranja teksta ove disertacije.

Docentu, dr Branislavi Ilinčić, na konstruktivnim sugestijama i vremenu koje je posvetila pregledu i oceni doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost iskazujem svim saradnicima na projektu: dr Vladanu Bajiću, dr Sanji Soskić, dr Božidarki Zarić, dr Emini Sudar Milovanović, dr Sonji Zafirović, MSc Anastasiji Panić, MSc Ivani Resanović i MSc Aleksandri Jovanović na predivnoj radnoj atmosferi, konstantnoj podršci i stalnoj spremnosti da mi nesebično prenesu svoje znanje.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojim bliskim prijateljima, na bezgraničnoj podršci, pomoći i ljubavi.

Ovu tezu posvećujem mojim roditeljima i sestri, kojima se ovom prilikom najtoplije zahvaljujem na neizmernoj ljubavi, podršci i strpljenju.

Polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-kalijumove pumpe u jetri gojaznih pacova

SAŽETAK

Gojaznost i posledično poremećen metabolizam lipida i glukoze u jetri su glavni faktori rizika za razvoj bolesti jetre. Polne razlike u gojaznosti i razvoju rezistencije na insulin (IR) i nealkoholne bolesti masne jetre (NAFLD) pripisuju se estrogenima, ali mehanizmi kojima ovi hormoni ostvaruju pomenute efekte nisu dovoljno istraženi. Pored toga što ostvaruju genomske efekte, estrogeni aktiviraju i signalne molekule u citoplazmi: fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K), protein kinazu B (Akt), Rho familiju malih GTP vezujućih proteina (Rho), kao i njihove nishodne efektore, Rho-vezane protein kinaze (ROCK), zatim AMP-aktivirajuće protein kinaze (AMPK) i kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima (ERK1/2). Dosadašnja istraživanja su pokazala da, pored protektivne uloge koju inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS) ima u jetri tokom različitih procesa (sepsa i ishemija), poremećaj u regulaciji njene ekspresije i aktivnosti mogu biti uključeni u razvoj IR u gojaznosti. Jedna od pratećih komplikacija IR je i poremećaj u regulaciji ekspresije i aktivnosti natrijum-kalijum adenozin trifosfataze (Na^+/K^+ -ATP-aza), koja učestvuje u realizaciji brojnih procesa u jetri. Poznato je da estradiol reguliše ekspresiju iNOS i Na^+/K^+ -ATPaze, ali podaci koji ukazuju na polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti ovih enzima u jetri gojaznih životinja nedostaju u literaturi.

U eksperimentima ove doktorske disertacije korišćeni su adultne ženke i mužjaci pacova *Wistar* soja. Jedna grupa pacova je hranjena standardnom laboratorijskom hranom (kontrolni pacovi), a druga standardnom laboratorijskom hranom obogaćenom sa 42% masti (gojazni pacovi). Nakon 10 nedelja životinje su žrtvovane, izolovane su jetre, a iz pune krvi su izdvajani serum i plazma. U serumu pacova određivane su koncentracije: glukoze, insulina, ukupnog holesterola, dok je u plazmi određivana koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) i koncentracija nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-), kao krajnjih produkata NO. U lizatu jetre pacova određivana je koncentracija glukoze, holesterola i SMK, kao i aktivnost Rho proteina. Aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze je određivana u frakciji plazma membrana ćelija jetre. Nivo iRNK za iNOS i α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze određivan je metodom qPCR. Western blot metodom

određivana je količina α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze, GLUT2 i FAT/CD36 u frakciji plazma membrana, dok je nivo ekspresije iNOS, NF κ B IRS-1, PI3K-p85 i PI3K-p110, RhoA, ROCK1 i ROCK2, ER α i ER β , kao i nivo fosforilacije mTOR, PDK1, Akt, ERK1/2 i AMPK α_1 kinaza određivan u lizatima ćelija jetre. Asocijacija IRS-1 proteina sa PI3K-p85 u lizatu jetre određivana je metodom koimunoprecipitacije.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da, za razliku od mužjaka, kod ženki pacova nema promena u koncentraciji insulina u serumu i vrednosti HOMA indeksa, dok je koncentracija glukoze u serumu smanjena. U membranskoj frakciji proteina jetre nivo GLUT2 proteina je smanjen kod gojaznih pacova oba pola, dok je nivo FAT/CD36 proteina smanjen kod gojaznih ženki, a povećan kod gojaznih mužjaka pacova. Nivo iRNK za iNOS i koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ je povećana, a nivoa iNOS proteina smanjen samo kod gojaznih mužjaka pacova. Nivo proteina α_1 - Na^+/K^+ -ATPaze i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze su smanjeni kod gojaznih pacova oba pola, dok je relativna ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze smanjena samo kod gojaznih mužjaka pacova. Nivo fosforilacije PDK1 i Akt na Thr³⁰⁸ smanjen je u jetri pacova oba pola, dok je nivo fosforilacije mTOR i Akt na Ser⁴⁷³ smanjen samo u jetri gojaznih mužjaka pacova. Nivo fosforilacije ERK1/2 i AMPK α_1 je povećan u jetri gojaznih ženki, a smanjen u jetri gojaznih mužjaka. Takođe, povećanje aktivnosti Rho proteina uočeno je samo u jetri gojaznih mužjaka, dok je nivo RhoA proteina smanjen samo u jetri gojaznih ženki pacova.

Rezultati u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da HF ishrana dovodi do razvoja sistemske IR i poremećaja metabolizma glukoze i lipida samo u jetri mužjaka pacova. Takođe, pokazane su polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS i Na^+/K^+ -ATP-aze, koja je posredovana učesćem signalnih molekula mTOR, Akt, ERK1/2, AMPK α i RhoA. Rezultati ove doktorske disertacije doprinose razumevanju polnih razlika u razvoju IR i mogu imati primenu u razvoju novih terapijskih pristupa u lečenju komplikacija u gojaznosti.

Ključne reči: gojaznost, iNOS, jetra, Na^+/K^+ -ATPaza, polne razlike

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

UDK broj: 612.621.31:[591.133.2+591.133.12/133.13]+612.35+613.25](043.3)

Sex differences in regulation of expression and activity of inducible nitric oxide synthase and sodium-potassium pump in liver of obese rats

ABSTRACT

Obesity and altered hepatic lipid and glucose metabolism are main risk factors for the development of liver diseases. Sex differences in obesity and development of insulin resistance (IR) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are attributed to estrogens, but the exact mechanisms of their effects have not been fully understood. In addition to genomic effects, estrogens also activate signaling molecules in the cytoplasm: phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), Rho family of small GTP binding proteins (Rho), as well as their effectors, Rho-associated protein kinases (ROCK), AMP-activating protein kinase (AMPK) and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2). Besides the protective role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the liver during various processes (sepsis and ischemia), the altered expression and activity of this enzyme may be involved in the development of IR in obesity. One of the common comorbidities of obesity-induced IR is altered expression and activity of sodium/potassium-adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase), which participates in numerous processes in the liver. It is known that estradiol regulates the expression of iNOS and Na^+/K^+ -ATPase, but there is no evidence on sex-specific differences in hepatic iNOS and Na^+/K^+ -ATPase expression/activity in obese animals.

For the experiments of this doctoral dissertation adult female and male Wistar rats were used. Control groups of rats were fed standard laboratory diets (control rats) and the other two groups were fed standard laboratory food enriched with 42% fat (obese rats). After 10 weeks, the animals were sacrificed, and livers, serum and plasma were isolated. Serum glucose, insulin and total cholesterol concentrations were determined, as well as plasma free fatty acids (FFA) and nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) concentrations. The concentrations of glucose, cholesterol and FFA, as well as the activity of Rho proteins, were determined in liver lysates. The hepatic Na^+/K^+ -ATPase activity was determined in the plasma membrane fraction. The iNOS and α_1 subunit of Na^+/K^+ -ATPase mRNA levels were determined by qRT-PCR. Western blot method was used to determine protein levels of α_1 - Na^+/K^+ -ATPase, GLUT2 and FAT/CD36 in the plasma membrane fraction, while protein levels of iNOS, NF κ B IRS-1, PI3K-p85 and

PI3K-p110, RhoA, ROCK1 and ROCK2, ER α and ER β , as well as phosphorylation levels of mTOR, PDK1, Akt, ERK1/2 and AMPK α_1 were determined in liver lysates. The association of IRS-1/PI3K-p85 in liver lysates was determined by co-immunoprecipitation.

The results of this doctoral dissertation show that, unlike males, there are no changes in serum insulin levels and HOMA indices in female rats, while serum glucose levels are reduced. GLUT2 protein level in the plasma membrane fraction in liver was decreased in obese rats of both sexes, while FAT/CD36 protein level was decreased in obese females, and increased in obese male rats. The iNOS mRNA level in liver and plasma NO $_2^-$ /NO $_3^-$ concentration were increased, and iNOS protein level was decreased only in obese male rats. The hepatic α_1 -Na $^+$ /K $^+$ -ATPase protein level and Na $^+$ /K $^+$ -ATPase activity were decreased in obese rats of both sexes, while α_1 -Na $^+$ /K $^+$ -ATPase mRNA level was decreased only in livers of obese male rats. The phosphorylation levels of PDK1 and Akt (Thr 308) were reduced in livers both female and male obese rats, while the phosphorylation levels of mTOR and Akt (Ser 473) were reduced only in livers of obese male rats. The phosphorylation level of ERK1/2 and AMPK α_1 was increased in livers of obese females and decreased in livers of obese males. Also, the increase of hepatic Rho activity was observed only in obese male rats, while the hepatic RhoA protein level was decreased only in obese female rats.

The results of this doctoral dissertation show that HF diet leads to the development of systemic IR and disturbance of hepatic glucose and lipid metabolism only in male rats. Also, obtained results show sex specific differences in the regulation of iNOS and Na $^+$ /K $^+$ -ATPase expression/activity which are mediated by the participation of mTOR, Akt, ERK1 / 2, AMPK α and RhoA signaling molecules. These results contribute to better understanding of pathogenesis and sex differences in obesity-induced IR in the liver and may lead to discovering new therapeutic approaches in the treatment of obesity complications.

Key Words: iNOS, liver, Na $^+$ /K $^+$ -ATPase, obesity, sex differences

Scientific Group: Biology

Specific Area Within A Group: Molecular Endocrinology

UDK number: 612.621.31: [[591.133.2+591.133.12/133.13]+612.35+613.25](043.3)

Spisak skraćenica

Akt	protein kinaza B (<i>engl. protein kinase B</i>)
ALP	alkalna fosfataza (<i>engl. Alkaline Phosphatase</i>)
AMP	adenozin monofosfat (<i>engl. adenosine monophosphate</i>)
AMPK	proteinska kinaza aktivirana AMP-om (<i>engl. AMP-activated protein kinase</i>)
APS	amonijum persulfat
ATP	adenozin-trifosfat
BCIP/NBT	reagens (<i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i>)
BH₄	tetrahidrobiopterin
BSA	albumin goveđeg seruma (<i>engl. bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementarna DNK (<i>engl. Complementary DNA</i>)
CH	domen homolog kolagenu (<i>engl. collagen homology</i>)
DEPC	dietilpirokarbonat (<i>engl. Diethylpyrocarbonate</i>)
DDC	dietilditiokarbamat (<i>engl. Diethyl-Dithiocarbamate</i>)
dNTP	dezoksinukleozid-trifosfata
DTT	ditiotritol (<i>engl. Dithiothreitol</i>)
ECL	pojačana hemiluminiscencija (<i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina (<i>engl. Etylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ER	receptor za estrogen (<i>engl. Estrogene Receptor</i>)
ERE	elementi koji odgovaraju na estrogen (<i>engl. Estrogen Responsive Elements</i>)
ERK1/2	ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 (<i>engl. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2</i>)
FABP	protein plazma membrane koji vezuje masne kiseline (<i>engl. fatty acid binding protein</i>)
FAT/CD36	translokaza masnih kiseline (<i>engl. fatty acid translocase</i>)

FATP	polipeptid za transport masnih kiselina (<i>engl. fatty acid transport polypeptide</i>)
FMN/FAD	flavin mononukleotid/flavin adenin dinukleotid
FXYP	proteini, tkivno-specifične regulatorne subjedinice Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze
GAP	protein koji stimulira intrinzičku GTPaznu aktivnost Rho (<i>engl. GTPase-activating protein</i>)
GDI	inhibitor disocijacije guaninskih nukleotida (<i>engl. GDP Dissociation Inhibitor</i>)
GDP	guanozin-difosfat
GEF	faktor izmene guaninskih nukleotida (<i>engl. Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>)
GLUT	familija transportera glukoze (<i>engl. glucose transporters</i>)
GTP	guanozin-trifosfat
GPGR	receptor za estrogen spregnut sa proteinom G (<i>engl. G-Protein coupled Estrogen Receptor</i>)
HDL	lipoproteini visoke gustine (<i>engl. High-Density Lipoprotein</i>)
HEPES	pufer (<i>engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HF ishrana	ishrana obogaćena mastima (<i>engl. High Fat Diet</i>)
HOMA-IR	metod za procenu stepena rezistencije na insulin (<i>engl. Homeostasis Model Assessment Index-IR</i>)
HOMA-β	metod za procenu funkcionalnog kapaciteta β-ćelija pankreasa (<i>engl. Homeostasis Model Assessment Index-β</i>)
HRP	peroksidaza rena (<i>engl. Horse Radish Peroxidase</i>)
IFN	interferon
IκB	inhibitor NFκB (<i>engl. Inhibitor of NFκB</i>)
IκK	IκB kinaza (<i>engl. IκB Kinase</i>)
IL	interleukin
IR	rezistencija na insulin (<i>engl. Insulin Resistance</i>)

IRS -1	supstrat receptora za insulin 1 (<i>engl. Insulin Receptor Substrate</i>)
KVB	kardiovaskularne bolesi
KVS	kardiovaskularni sistem
LDL	lipoproteini male gustine (<i>engl. Low-Density Lipoprotein</i>)
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginin metil ester, inhibitor iNOS proteina
MAPK (ERK1/2)	mitogenima aktivirane protein kinaze (<i>engl. Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MEK 1/2	kinaza MAPK (<i>engl. MAPK kinase</i>)
mTORC2	kompleks 2 ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (<i>engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2</i>)
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAFLD	nealkoholna bolest masne jetre (<i>engl. non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NDRG2	N-myc nishodno regulisan gen 2 (<i>engl. N-myc downstream-regulated gene 2</i>)
NFκB	transkripcioni faktor κ B (<i>engl. nuclear factor κB</i>)
Na⁺/K⁺-ATPaza	natrijum-kalijum adenzin-trifosfataza
NO	azot monoksid (<i>engl. Nitric Oxide</i>)
NOS	azot monoksid sintaza (<i>engl. NO Synthase</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i>)
PD98059	inhibitor aktivacije ERK1/2 kinaza
PK1	fosfoinozidid-zavisna protein kinaza 1 (<i>engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1</i>)
PH	domen homolog plekstrinu (<i>engl. Pleckstrin Homology</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3 kinaza (<i>engl. Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PIP3	fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (<i>engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>)
PVDF	poliviniliden fluorid membrana (<i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i>)

p110	110 kDa katalitička subjedinica
p85	85 kDa regulatorna subjedinica
Raf	kinaza kinaze MAPK (<i>engl. MAPK Kinase Kinase</i>)
Ras	guanozin-trifosfataza (<i>engl. guanosine triphosphatase; Rat Sarcoma</i>)
RBD	Rho-vezujući domen (<i>engl. Rho-binding domain</i>)
Rho	familija malih GTP vezujućih proteina
RIA	radioimunološka metoda (<i>engl. Radioimmunoassay</i>)
ROCK	Rho-vezane protein kinaze (<i>engl. Rho-associated protein kinase</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (<i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS (<i>engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SH2	domen (<i>engl. Src Homology 2</i>)
Shc	adapterski protein
SMK	slobodne masne kiseline
SOS	faktor koji izmenjuje guaninske nukleotide (<i>engl. guanine nucleotide exchange factors; Son Of Sevenless</i>)
TBS	fiziološki rastvor puferovan Tris-om (<i>engl. Tris-Buffered Saline</i>)
TBS-T	0,05% Tween 20 u TBS puferu
TEA	trietanolaminski pufer
TES	pufer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoze)
TNF-α	faktor nekroze tumora- α (<i>engl. tumor necrosis factor alpha</i>)
T2DM	<i>diabetes mellitus</i> tipa 2 (<i>engl. type 2 diabetes mellitus</i>)
VLDL	lipoproteini veoma male gustine (<i>engl. Very-Low-Density Lipoprotein</i>)
qRT-PCR	PCR u realnom vremenu (<i>engl. Quantitative Real Time-PCR</i>)
Y-27632	inhibitor aktivacije ROCK kinaza

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Gojaznost.....	1
1.1.1. Učestalost i epidemiologija gojaznosti.....	2
1.2. Uloga jetre u metabolizmu lipida i glukoze.....	3
1.2.1. Metabolizam lipida i glukoze u jetri u fiziološkim uslovima.....	3
1.2.2. Metabolizam lipida i glukoze u jetri u gojaznosti.....	4
1.3. Gojaznost i polne razlike.....	7
1.3.1. Estrogeni i receptori za estrogene.....	8
1.3.2. Efekti estrogena u jetri.....	9
1.3.3. Molekularni mehanizmi delovanja estrogena.....	10
1.4. Azot monoksid i inducibilna azot monoksid sintaza.....	15
1.4.1. Inducibilna azot monoksid sintaza u jetri.....	16
1.4.2. Inducibilna azot monoksid sintaza u gojaznosti.....	17
1.4.3. Molekularni mehanizmi regulacije inducibilne azot monoksid sintaze..	18
1.5. Natrijum-kalijum adenzin trifosfataza.....	20
1.5.1. Natrijum-kalijum adenzin trifosfataza u jetri.....	21
1.5.2. Natrijum-kalijum adenzin trifosfataza u gojaznosti.....	22
1.5.3. Molekularni mehanizmi regulacije natrijum-kalijum adenzin trifosfataze.....	23
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	25
2.1. Ciljevi.....	25
2.2. Hipoteza.....	26
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Eksperimentalni protokol – rad sa eksperimentalnim životinjama.....	27
3.2. Izolovanje seruma i plazme iz krvi pacova.....	28
3.3. Određivanje koncentracije glukoze u serumu i lizatu jetre pacova.....	28
3.4. Određivanje koncentracije insulina u serumu pacova.....	29

3.5.	Određivanje indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) i indeksa sekrecije insulina (HOMA-β).....	29
3.6.	Određivanje koncentracije ukupnog holesterola (HOL) u serumu i lizatu jetre pacova.....	30
3.7.	Određivanje koncentracije SMK u serumu i lizatu jetre pacova.....	30
3.8.	Određivanje nivoa (NO ₂ ⁻) i nitrata (NO ₃ ⁻) u plazmi pacova.....	31
3.9.	Izolacija ukupnih proteina jetre pacova.....	32
3.10.	Izolacija proteina plazma membrana iz jetre pacova.....	32
3.11.	Određivanje koncentracije proteina.....	33
3.12.	Određivanje aktivnosti Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u lizatu jetre pacova.....	33
3.13.	Određivanje aktivnosti Rho proteina u lizatu jetre pacova.....	34
3.14.	SDS-PAGE.....	35
3.15.	Western blot	35
3.16.	Koimunoprecipitacija.....	38
3.17.	Određivanje relativne ekspresije gena.....	38
3.17.1.	Izolacija ukupne RNK iz jetre pacova.....	38
3.17.2.	Prepis RNK u cDNK - reverzna transkripcija.....	39
3.17.3.	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR).....	39
3.18.	Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata.....	40
4.	REZULTATI.....	41
4.1.	Regulacija metabolizma glukoze i lipida u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.....	41
4.1.1.	Mase tela i metabolički parametri u plazmi i serumu pacova.....	41
4.1.2.	Masa jetre, koncentracija glukoze, holesterola i SMK u lizatu jetre pacova.....	43
4.1.3.	Nivo GLUT2 i FAT/CD36 proteina u jetri pacova.....	44
4.2.	Ekspresija gena za iNOS i nivo proteina u jetri i koncentracija NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ u plazmi gojaznih pacova oba pola.....	45
4.3.	Ekspresija gena za α1 subjedinicu Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze i aktivnost Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.....	47

4.4.	Signalni molekuli uključeni u regulaciju iNOS i Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.....	50
4.4.1.	Nivo subjedinice p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri pacova.....	50
4.4.2.	Nivo IRS-1 proteina i njegovu asocijaciju sa subjedinicom p85 PI3K u jetri pacova.....	51
4.4.3.	Nivo proteina subjedinica PI3K – p85 i p110 u jetri pacova.....	52
4.4.4.	Fosforilacija i nivo proteina mTOR, PDK1 i Akt u jetri pacova.....	54
4.4.5.	Fosforilacija i nivo proteina ERK1/2 i α ₁ subjedinice AMPK u jetri pacova.....	56
4.4.6.	Nivo RhoA, ROCK1 i ROCK2 i aktivnost Rho proteina u jetri pacova.....	58
4.4.7.	Nivo receptora za estrogene – ERα i ERβ u jetri pacova.....	61
5. DISKUSIJA.....		63
6. ZAKLJUČCI.....		81
7. LITERATURA.....		83
8. BIOGRAFIJA.....		115
9. PRILOZI.....		116

1. Uvod

1.1. Gojaznost

Na osnovu podataka Svetske zdravstvene organizacije (SZO), gojaznost se definiše kao prekomerno nagomilavanje masnog tkiva u organizmu koje ugrožava zdravlje i povećava mortalitet (SZO, 2000). Prekomerno skladištenje masnog tkiva u organizmu je posledica pozitivnog energetskeg balansa, koji je rezultat interakcije nekoliko faktora uključujući ishranu (povećan unos visokokalorične hrane, i smanjen unos hrane bogate mikronutrijentima i bioaktivnim jedinjenjima), smanjenu fizičku aktivnost (sedentarni način života), nutritivni i hormonski status u ranom životnom dobu, kao i genetičke, ekološke, kulturne i ekonomske faktore (Drewnowski, 2009; Winter i sar., 2013). Drugi etiološki faktori povezani sa razvojem gojaznosti su pojedine hromozomske aberacije (Prader-Vili sindrom), hormonski poremećaji (Kušingov sindrom), lezije ili tumori hipotalamusa i lekovi (steroidi i antidepresivi) (Delrue i Michaud, 2004; Stratakis, 2012; Hasnain i sar., 2012). Gojaznost predstavlja glavni i nezavisni faktor rizika za nastanak brojnih metaboličkih poremećaja i oboljenja, uključujući rezistenciju na insulin (IR, *engl. insulin resistance*), *diabetes mellitus* tipa 2 (T2DM, *engl. type 2 diabetes mellitus*), kardiovaskularne bolesti (KVB), dislipidemiju, nealkoholnu bolest masne jetre (NAFLD, *engl. non-alcoholic fatty liver disease*) i neke vrste karcinoma (Carmiel-Haggai i sar., 2005; Poirier i sar., 2006; Kahn i sar., 2006; Seyda Seydel i sar., 2016). Međutim, istraživanja su pokazala da nagomilavanje masnog tkiva u određenim delovima tela (visceralni depoi) znatno povećava rizik od razvoja IR i ostalih pratećih komorbiditeta u gojaznosti. Prvi naučnik koji je pedesetih godina prošlog veka ustanovio da mesto nagomilavanja masnog tkiva u organizmu utiče na

predispoziciju za razvoj metaboličkih poremećaja u gojaznosti, bio je Vague (Vague, 1956). Nakon toga, brojne epidemiološke studije su ukazale na vezu između abdominalne gojaznosti (nagomilavanje masnog tkiva u intraperitonealnim i gornjim torakalnim depoima) i razvoja IR (Ohlson i sar., 1985; Bjorntorp, 1992; Kissebah i Krakower, 1994; Carey i sar., 1997; Wang i sar., 2005). Sa druge strane, pokazano je da su osobe sa perifernim tipom gojaznosti (nagomilavanje subkutanog masnog tkiva u gluteo-femoralnim depoima) manje podložne razvoju metaboličkih poremećaja, uključujući IR i dislipidemije (Misra i sar., 1997; Snijder i sar., 2003; Tanko i sar., 2003; Snijder i sar., 2003; Porter i sar., 2009; Bays i sar., 2010). Rezultati ovih studija su u skladu sa tzv. portnom hipotezom koja se zasniva na konceptu povećane lipolitčke aktivnosti visceralnog masnog tkiva u odnosu na subkutano i retroperitonealno masno tkivo (Gallagher i sar., 2009). Povećan dotok slobodnih masnih kiselina (SMK) i glicerola u portnu cirkulaciju, poreklom iz visceralnog masnog tkiva, direktno utiče na jetru tako što smanjuje osetljivost na insulin, stimuliše glukoneogenezu i sintezu triglicerida, povećava oslobađanje glukoze i ugrožava metabolizam lipida (Kabir i sar., 2005).

1.1.1. Učestalost i epidemiologija gojaznosti

Učestalost gojaznosti i pratećih komorbiditeta u svetu je od 1980. do 2014. godine porasla sa 28% na 37% (Hossain i sar., 2007; Ng i sar., 2014). Više od 30% svetskog stanovništva ima prekomernu telesnu masu, a približno 13% je gojazno. Rezultati istraživanja zdravlja stanovnika Srbije u 2010. godini pokazuju da je 56% stanovništva predgojazno, dok je 19% stanovništva gojazno (Grujic i sar., 2010). Prema najnovijim podacima, učestalost gojaznosti kod dece uzrasta od 6 do 7 godina u Srbiji iznosi 6,9%, ukazujući na epidemiju gojaznosti u populaciji dece u Srbiji (Djordjic i sar., 2016). Epidemija gojaznosti je usko povezana sa porastom učestalosti T2DM. Statistički podaci pokazuju da je krajem 2000. godine broj obolelih od T2DM u svetu iznosio 171 milion, i očekuje se da će do kraja 2030. godine ovaj broj dostići 366 miliona (Wild i sar., 2004). Prema procenama Međunarodne federacije za dijabetes i na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje Srbije, Registra za dijabetes iz 2012. godine, 8% stanovnika Srbije ima dijabetes (RDS, 2012).

1.2. Uloga jetre u metabolizmu lipida i glukoze

Jetra je organ koji je najviše izložen nakupljanju lipida u gojaznosti (Yki-Jarvinen, 2010), i predstavlja mesto kompleksne regulacije metabolizma supstrata (glukoze, lipida itd.) od strane insulina i drugih hormona. Težine od 1200 do 1600 g, jetra predstavlja najveći organ (izuzimajući kožu) u telu čoveka i pacova, a smeštena je u abdominalnoj duplji, neposredno ispod dijafragme. Hepatociti čine približno 80% ćelija jetre, dok ostale ćelije uključuju bilijarne epitelne ćelije, sinusoidne endotelne, Kupferove ćelije (rezidentni makrofagi), stelatne, dendritične ćelije i nekoliko tipova limfocita (Michalopoulos i DeFrances, 1997). Jetra predstavlja glavno mesto regulacije metabolizma energetskih supstrata u organizmu, koja preuzima nutrijente iz digestivnog trakta portnom venom, iz sistemske cirkulacije hepaticnom arterijom i iz limfnog sistema. Nakon preuzimanja, nutrijenti se u jetri metabolišu, a potom se kontrolisano oslobodaju u cirkulaciju (Bradbury, 2006).

1.2.1. Metabolizam lipida i glukoze u jetri u fiziološkim uslovima

Jetra ima glavnu ulogu u skladištenju energije, s obzirom da ima veliki kapacitet za preuzimanje lipida iz cirkulacije, *de novo* lipogenezu, oksidaciju lipida i lipolizu. U jetri se SMK, zajedno sa glicerolom, koriste za sintezu triglicerida i transportuju u vidu lipoproteina veoma male gustine (VLDL, *engl. Very-Low-Density Lipoprotein*) u cirkulaciju. Deo VLDL se razlaže u lipoproteine male gustine (LDL, *engl. Low-Density Lipoprotein*) i SMK u perifernim tkivima. Jetra kontroliše koncentraciju holesterola u krvi uklanjanjem LDL i sintezom VLDL (Bechmann i sar., 2012). Lipoproteini visoke gustine (HDL, *engl. High-Density Lipoprotein*) prikupljaju holesterol, glicerol i SMK iz krvi i transportuju ih u jetru. Deo ukupnog pula SMK koji dospe u jetru je uključen u sintezu fosfolipida, glukoze, holesterola i drugih jedinjenja. Takođe, SMK se u procesu β -oksidacije u mitohondrijama hepatocita prevode u ketonska tela ili u energiju potrebnu za ćeliju. Transport SMK u ćelije jetre je kontrolisan proces. Mehanizmi transporta SMK u ćeliju nisu potpuno razjašnjeni, ali je poznato da SMK ulaze u hepatocite posredstvom transmembranskih proteina ili u manjoj meri difuzijom (Berk i Stump, 1999). Do sada su u jetri identifikovana tri transportera koji učestvuju u transportu SMK: protein plazma membrane koji vezuje masne kiseline (FABP, *engl.*

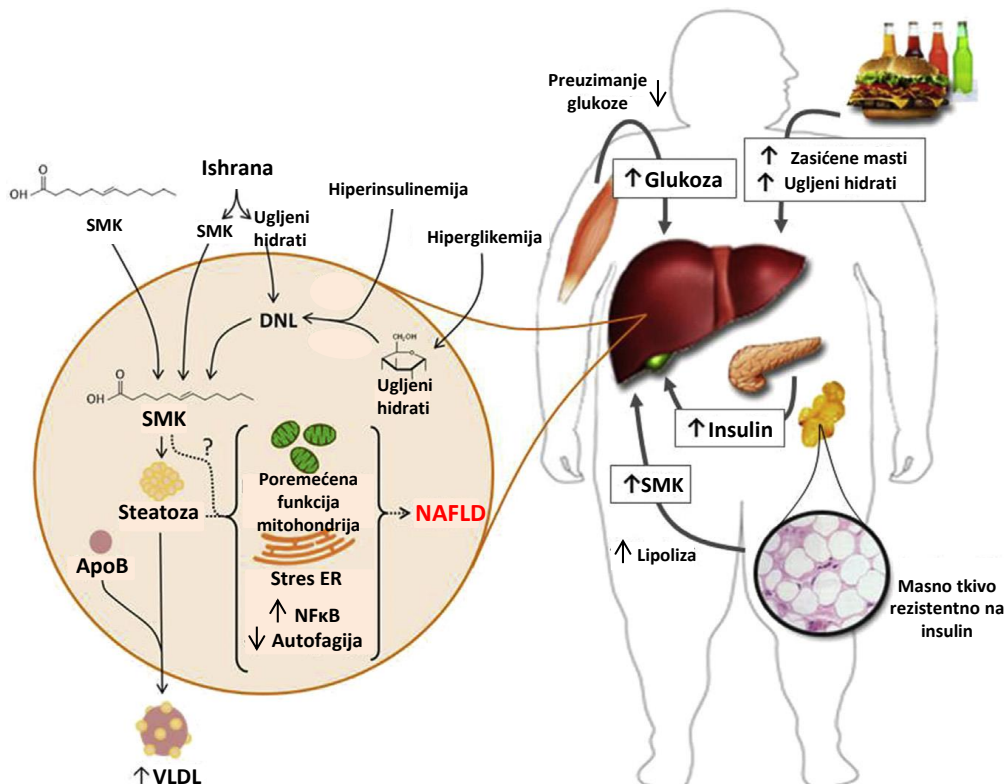
fatty acid binding protein) (Ursula i sar., 1989), polipeptid za transport masnih kiselina (FATP, *engl. fatty acid transport polypeptide*) (Hirsch i sar., 1998) i translokaza masnih kiselina (FAT/CD36, *engl. fatty acid translocase*) (Berk i Stump, 1999; Ibrahim i Abumrad, 2002). Najviše izučavan membranski protein koji učestvuje u transportu SMK u hepatocite je FAT/CD36. Studije su pokazale da je povećana translokacija FAT/CD36 proteina na plazma membranu hepatocita u gojznosti povezana sa razvojem IR i T2DM (Bradbury, 2006; Koonen i sar., 2007; Wilson i sar., 2016).

Sinteza glukoze u jetri je regulisana mehanizmom povratne sprege odnosno povećanje koncentracije glukoze u krvi dovodi do smanjenja sinteze glukoze u jetri i obrnuto (Nordlie i sar., 1999). Kompleksnija regulacija metabolizma glukoze uključuje α i β ćelije pankreasa, koje odgovaraju na promene koncentracije glukoze u plazmi tako što modifikuju sekreciju glukagona i insulina. Insulin ima glavnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze, tako što stimuliše ulazak glukoze u mišićne ćelije i ćelije masnog tkiva, sintezu glikogena u jetri i mišićima, i skladištenje lipida u adipocitima (Saltiel i Kahn, 2001). Insulinom stimulisan ulazak glukoze u ćeliju odvija se ugradnjom glukoznih transportera koji olakšavaju transport glukoze kroz ćelijsku membranu (GLUT, *engl. glucose transporter*) (Charron i sar., 1989). Do sada je opisano 14 GLUT izoformi, a u jetri pacova je lokalizovano pet izoformi: GLUT1, GLUT2, GLUT4, GLUT9, GLUT10 (Grobholz i sar., 1993; Garabadu i Krishnamurthy, 2017). Iako su sličnih struktura, svaki član GLUT familije je specifično distribuiran po tkivima i podložan je specifičnim regulatornim mehanizmima, da bi se zadovoljile potrebe različitih tkiva. GLUT su u hepatocitima prisutni u unutarćelijskim depoima i u plazma membrani (Hah i sar., 1992). U jetri je najzastupljeniji i najviše izučavan GLUT2 (Burcelin i sar., 2000; Burcelin i sar., 2000; Aschenbach i sar., 2009), koji dvosmerno transportuje glukozu preko plazma membrane ćelija jetre tj. učestvuje u oslobađanju glukoze nakon procesa glukoneogeneze ili glikogenolize, i preuzimanju glukoze iz cirkulacije (Stanley, 1981).

1.2.2. Metabolizam lipida i glukoze u jetri u gojznosti

Mehanizmi kojima gojznost dovodi do poremećaja metaboličkih procesa u jetri su danas predmet mnogobrojnih istraživanja (Steneberg i sar., 2005). Metaboličke i hormonske promene koje su posledica prevashodno abdominalne gojznosti, dovode

vremenom do nagomilavanja lipida u jetri. Smatra se da pojačano oslobađanje lipida iz visceralnog masnog tkiva u gojznosti povećava koncentraciju SMK u portnoj cirkulaciji (Bergman i Ader, 2000). Takođe, povećana koncentracija SMK u plazmi dovodi do inhibicije antilipolitičke aktivnosti inuslina, što dodatno povećava oslobađanje SMK u cirkulaciju (Boden, 2008). U zdravom organizmu jetra se brzo prilagođava pojačanom dotoku SMK u postprandijalnoj fazi njihovom brzom esterifikacijom (Griglio i Malewiak, 1975). Kada se prekorači kapacitet jetre za uklanjanje SMK (u vidu njihove sekrecije ili oksidacije), jetra ih skladišti u obliku triglicerida (Bjorntorp, 1992). Međutim, povećana sinteza triglicerida u gojznosti ne može da kompenzuje dotok velikih količina SMK u jetru tokom dužeg perioda (Fabbrini i sar., 2008), što direktno doprinosi razvoju IR u jetri, steatoze jetre i NAFLD (Slika 1.) (Reaven, 2001; McFarlane i sar., 2001; Carmiel-Haggai i sar., 2005; Kahn i sar., 2006). Takođe, hronično povećanje β -oksidacije SMK u mitohondrijama, dovodi do disfunkcije mitohondrija (Sunny i sar., 2011), inflamatornog odgovora (aktivacija Kupferovih ćelija) i lipoapoptoze hepatocita (Chung i sar., 1998; Satapati i sar., 2015).



Slika 1. Metabolizam glukoze i lipida u gojznosti. Apo-B – apolipoprotein B; DNL – *de novo* lipogeneza; ER – endoplazmatični retikulum; NFκB – nuklearni faktor κ B; SMK – slobodne masne kiseline; NAFLD – nealkoholna bolest masne jetre. Preuzeto i modifikovano iz (Bril i Cusi 2016).

Glavne karakteristike IR su povećana glukoneogeneza i lipogeneza, smanjena lipoliza i smanjeno preuzimanje glukoze u jetri (Exton i sar., 1969; Bjorntorp, 1990; Kissebah i Krakower, 1994; Bugianesi i sar., 2005; Mlinar i sar., 2007). IR predstavlja stanje u kome periferna ciljna tkiva ne mogu u punoj meri da odgovore na fiziološke, kao i suprafiziološke koncentracije insulina u cirkulaciji, pa stoga dolazi do smanjenog korišćenja glukoze kao izvora energije, povećane glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, što sve dovodi do hiperglikemije (Sowers i sar., 1994; Reaven i sar., 1996; Nolan i sar., 1997; Hunter i Garvey 1998; Boden, 1999). U početnom stadijumu razvoja IR, da bi se postigle fiziološke vrednosti koncentracije glukoze u krvi, pankreas pojačano luči insulin te dolazi do hiperinsulinemije (Reaven, 1988; Mlinar i sar., 2007). Iako hiperinsulinemija u početnoj fazi IR može da kompenzuje nastalu hiperglikemiju u nekoj meri, takođe može dovesti i do pojačanog dejstva insulina na tkiva koja zadržavaju normalnu osetljivost na insulin (McFarlane i sar., 2001). Nakon perioda kompenzatorne hiperinsulinemije ipak dolazi do poremećaja funkcije β -ćelija pankreasa, nedovoljnog lučenja insulina i poremećaja u metabolizmu lipida i glukoze u ćelijama (Petersen i Shulman, 2002).

Smanjena sekrecija insulina, u kombinaciji sa rezistencijom efektorskih ćelija na njegovo delovanje, rezultira T2DM, bolesti koja dostiže proporcije epidemije. Takođe, podatak da više od 90% gojaznih pacijenata sa T2DM boluje od NAFLD ukazuje na blisku vezu između ova dva patofiziološka stanja (Petersen i sar., 2006; Tolman i sar., 2007). NAFLD je bolest koju prati širok spektar stanja: masna jetra (steatoza), naprednija steatoza praćena nekroinflamacijom sa ili bez fibroze tkiva (nealkoholni stetohepatitis), i ozbiljniji poremećaji funkcije jetre kao što su ciroza i karcinom jetre (Musso i sar., 2009). Pacijenti sa NAFLD su gotovo uvek rezistentni na insulin, što povećava rizik za razvoj T2DM (Tolman i sar., 2007). Pokazano je da ishrana obogaćena mastima (HF ishrana, *engl. high fat diet*) nakon tri dana dovodi do razvoja NAFLD i posledično rezistencije hepatocita na insulin, ali ne i skeletnih miocita (Samuel i sar., 2004). Povećana sinteza i oslobađanje inflamatornih citokina iz masnog tkiva mogu doprineti razvoju rezistencije hepatocita na insulin. U prilog tome idu rezultati studije u kojoj su korišćeni gojazni miševi na režimu ishrane bogate mastima, a kod kojih je došlo do razvoja IR i steatoze jetre, iako koncentracija SMK u portnoj cirkulaciji nije bila povećana (Wueest i sar., 2012). U istoj studiji je zapažena povećana

koncentracija citokina u cirkulaciji, kao što su interleukini, poreklom iz intraperitonealnog masnog tkiva gojaznih miševa. Poznato je da intraperitonealno masno tkivo gojaznih osoba u poređenju sa subkutanom oslobađa dva do tri puta više interleukina u međucelijsku tečnost (Fried i sar., 1998).

1.3. Gojaznost i polne razlike

Odavno je poznato da postoje polne razlike u regionalnoj raspodeli i skladištenju masnog tkiva kod ljudi. Žene karakteriše ginoidni (gluteo-femoralni) tip gojaznosti, dok je kod muškaraca najčešće prisutan androidni (abdominalni) tip gojaznosti (Vague, 1956). Takođe, žene pre menopauze uglavnom imaju više subkutanog masnog tkiva, za razliku od muškaraca koji imaju više intra-abdominalnog masnog tkiva (Enzi i sar., 1986). Smatra se da su evolutivni pritisci favorizovali veće skladištenje masnog tkiva kod žena za reprodukciju i laktaciju, dok su muškarci predisponirani da troše energiju tokom sakupljanja i lova (Hoyenga i Hoyenga, 1982). Uprkos tome što muškarci imaju manje masnog tkiva u organizmu, učestalost pojave IR i ranih poremećaja metabolizma glukoze je tri puta veća u poređenju sa ženama (Kuhl i sar., 2005). Povećanje mase visceralnog masnog tkiva kod muškaraca paraćeno je povećanjem koncentracije insulina, SMK i triglicerida u postprandijalnoj fazi. Suprotno tome, prisustvo perifernih depoa masnog tkiva kod žena povezano je sa većom osetljivošću na insulin (Snijder i sar., 2003; Snijder i sar., 2004).

Polne razlike u gojaznosti i raspodeli masnog tkiva u organizmu pripisuju se pre svega polnim hormonima, ali i drugim činiocima, kao što su genetički faktori, ponašanje i socio-kulturološki faktori (Brown i Konner, 1987; Bjorntorp, 1996). Poznato je da je kod žena pre početka menopauze ređa pojava metaboličkih poremećaja koji nastaju kao posledica gojaznosti, u poređenju sa muškarcima slične životne dobi (Brown i Konner, 1987; Regitz-Zagrosek i sar., 2006). Žene pre menopauze imaju bolju toleranciju na glukozu i osetljivost na insulin u poređenju sa muškarcima (Legato, 1997; Geer i Shen, 2009). Takođe, uočene su značajne polne razlike u ekspresiji gena uključenih u metabolizam glukoze, lipida i steroida u jetri (Stahlberg i sar., 2004; Yang i sar., 2006; Gustavsson i sar., 2010). Smanjeno lučenje estrogenih hormona kod žena tokom menopauze direktno je povezano sa povećanjem visceralne gojaznosti, promenama u

raspodeli masnog tkiva u organizmu, kao i glukoznom intolerancijom (Shi i Clegg, 2009).

Rezultati studija na glodarima pokazuju da smanjena koncentracija estrogena u cirkulaciji usled ovarijektomije dovodi do povećanja masnog tkiva u organizmu, što se može ublažiti suplementacijom estrogenima (Siri i Ginsberg, 2003; Shen i sar., 2014). Kod miševa kojima je uklonjen gen (*engl. knockout*) za aromatazu postepeno se razvija gojaznost, smanjuju se glikoliza, hiperinsulinemija i dislipidemija (Asarian i Geary, 2002). U studiji Garcia-Carrizo i sar. (2017) pokazano je da su ženke pacova manje podložne razvoju periferne IR indukovane visokom koncentracijom SMK u cirkulaciji. Takođe, miševa kojima je uklonjen gen za receptor za estrogen (ER, *engl. estrogen receptor*) dolazi do razvoja masne jetre, IR u jetri i poremećene tolerancije na glukozu (Bryzgalova i sar., 2006), što ukazuje na to da estrogeni imaju važnu ulogu u razvoju NAFLD (Denzer i sar., 2009; Chiang, 2017; Reue, 2017). Veća količina abdominalnog masnog tkiva zajedno sa niskom koncentracijom endogenog estrogena kod muškaraca, može biti razlog veće učestalosti IR u poređenju sa ženama pre menopauze (Geer i Shen, 2009).

1.3.1. Estrogeni i receptori za estrogene

Estrogeni su polni hormoni, koji pored uloge u reprodukciji utiču i na raspodelu masnog tkiva u organizmu, energetske homeostazu i osetljivost na insulin (Shen i Shi, 2015). Iako su primarno ženski polni hormoni, estrogeni su prisutni i kod muškaraca, ali u manjoj koncentraciji. Tri najvažnija estrogena koja se sintetišu u organizmu su estron, estradiol i estriol, od kojih je estradiol dominantan. Estrogeni ostvaruju svoje efekte vezivanjem za ER, uključujući klasične nuklearne receptore ER α i ER β , i membranske receptore kao što je ER spregnut sa proteinom G (GPER, *engl. G protein-coupled ER*) (Cowley i sar., 1997). Nakon vezivanja estrogena, klasični nuklearni ER α i ER β formiraju homo- ili heterodimere i ostvaruju interakcije sa elementima odgovora na estrogene (ERE, *engl. estrogen response elements*) u promotoru ciljnih gena, ili sa drugim transkripcionim faktorima koji indukuju ekspresiju ciljnih gena (McKenna i sar., 1999). Pored toga, estrogeni učestvuju i u negenomskim signalnim putevima aktivacijom ER na ćelijskoj membrani i u citoplazmi (Kang i sar., 2010).

U ćelijama jetre se ekspimiraju i nukleusne i membranske forme ER (Iavarone i sar., 2003; Miceli i sar., 2011), pri čemu je ekspresija ER β manja u odnosu na ekspresiju ER α (Alvaro i sar., 2000). U studijama sa transgenim miševima je pokazano da je transkripciona aktivnost ER α najveća u ćelijama jetri (Ciana i sar., 2003; Ciana i sar., 2005). Ekspresija ER približno je jednaka u jetri ženki i mužjaka pacova i na sličan način se smanjuje tokom starenja kod oba pola (Lax i sar., 1983). Ekspresija ER α u ćelijama jetre pacova je nepromenjena nakon ovarijektomije, ali se značajno povećava nakon tretmana estrogenima (Mohamed i Abdel-Rahman, 2000).

1.3.2. Efekti estrogena u jetri

Protektivni efekti estrogena u metaboličkim tkivima se mogu pripisati signalnom putu posredstvom ER α . U prilog tome idu studije sa miševima kojima je uklonjen gen za ER α kod kojih dolazi do pojave steatoze jetre (Heine i sar., 2000; Bryzgalova i sar., 2006). HF ishrana kod miševa kojima je uklonjen gen za ER α (Zhu i sar., 2013; Zhu i sar., 2014) i GPER (Meoli i sar., 2014) specifičnih za jetru, dovodi do povećanog nagomilavanja lipida u jetri i poremećaja u signalnom putu insulina.



Slika 2. Fiziološki efekti estrogena u jetri.

Estrogeni ostvaruju brojne efekte (**Slika 2.**), uključujući stimulaciju lučenja insulina (Alonso-Magdalena i sar., 2008) i povećanje osetljivosti ćelija na insulin (smanjenjem glukoneogeneze i glikogenolize) (Ahmed-Sorour i Bailey, 1981). Takođe, estrogeni povećavaju osetljivost ćelija na dejstvo insulina stimulacijom signalne kaskade PI3K/Akt i povećanjem nivoa transportera za glukozu i SMK na plazma membrani ćelija (Brussaard i sar., 1997). Studija na pacovima je pokazala da hepatociti

ženki efikasnije preuzimaju SMK i sintetišu VLDL partikule, kojima se lipidi otpremaju u cirkulaciju (Kushlan i sar., 1981), čime se može smanjiti njihovo nagomilavanje u hepatocitima. Estrogeni regulišu aktivnost i ekspresiju gena uključenih u lipogenezu i tako inhibiraju lipogenezu (Courtney i sar., 1988; Gowri i sar., 2007). Takođe, estrogeni regulišu i aktivnost enzima jetre uključenih u sintezu masnih kiselina i holesterola (Villa i sar., 2012). Smanjena koncentracija estrogena u krvi ženki miševa ima za posledicu nagomilavanje lipida u jetri, čak i kada životinje nisu izložene povećanom unosu hrane, što ukazuje na direktnu ulogu estrogena u sprečavanju lipogeneze u jetri (D'Eon i sar., 2005). U studiji sa miševima kojima je uklonjen gen za aromatazu, pokazano je da dolazi do razvoja gojaznosti i steatoze jetre kao posledica poremećene oksidacije masnih kiselina i povećanog nivoa sintaze masnih kiselina u jetri ženki i mužjaka miševa (Fisher i sar., 1998). Učestalost steatoze jetre je često povezana sa niskim koncentracijama HDL-holesterola (HDL-C) i visokim koncentracijama LDL-holesterola (LDL-C) u cirkulaciji. Rezultati epidemioloških studija pokazuju da muškarci, kao i žene u menopauzi imaju visoku koncentraciju LDL-C i nisku koncentraciju HDL-C u plazmi, u poređenju sa ženama koje su u premenopauzalnom periodu, potvrđujući da visoke koncentracije estrogena u cirkulaciji smanjuju lipogenezu i doprinose smanjenom skladištenju lipida u jetri (Trapani i sar., 2012). Učestalost pojave NAFLD varira između polova, pri čemu je skoro dva puta veća kod muškaraca (42%) u poređenju sa ženama (24%) (Lazo i Clark, 2008; Williamson i sar., 2011; Lazo i sar., 2013). Takođe, NAFLD se češće javlja kod žena nakon menopauze u poređenju sa premenopauzom (Lazo i Clark, 2008; Kelley i sar., 2014), ukazujući na protektivnu ulogu estrogena u razvoju NAFLD (Carulli i sar., 2006; Polyzos i sar., 2013).

1.3.3. Molekularni mehanizmi delovanja estrogena

Pored toga što aktiviraju transkripciju gena (genomski efekti), vezivanje estrogena za ER dovodi i do brze aktivacije signalnih molekula u citoplazmi, uključujući fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K, *engl. Phosphatidylinositol 3- Kinase*), protein kinazu B (Akt, *engl. Protein Kinase B*), Rho familiju malih GTP vezujućih proteina (Rho), kao i njihove nishodne efektore, Rho-vezane protein kinaze (ROCK, *engl. Rho-associated protein kinase*), zatim protein kinaza aktivirana AMP-om (AMPK, *engl. AMP-activated protein kinase*) i kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima

(ERK1/2, *engl. Extracellular Regulated Protein Kinase*) (Ewart i Klip, 1995; Chambliss i Shaul, 2002; Oviedo i sar., 2011; Martínez de Morentin i sar., 2014).

Jedan od izučavanijih negenomskih efekata estrogena podrazumeva posttranslacione modifikacije PI3K/Akt proteina, što dovodi do aktivacije brojnih proteina i transkripcionih faktora, koji regulišu transkripciju gena (Kelly i Levin, 2001; Isenovic i sar., 2003; Levin, 2009). Formirani kompleks estrogen-ER aktivira supstrat receptora za insulin (IRS, *engl. Insulin Receptor Substrate*), fosforilacijom na Tyr čime se omogućava njegova asocijacija sa regulatornom p85 subjedinicom PI3K (Asarian i Geary, 2002). Nakon asocijacije dolazi do aktivacije p110-PI3K katalitičke subjedinice i njene translokacije ka plazma membrani (Downward, 1998). Aktivirana PI3K fosforiliše inozitolne molekule na položaju 3 čime se povećava koncentracija fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP₃, *engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), koji pripremaju Akt za fosforilaciju od strane PDK1 (Cantrell, 2001; Scheid i sar., 2002). Akt je serin (Ser)/treonin (Thr) kinaza koja poseduje domen homolog sa plekstrinom (PH, *engl. Pleckstrin Homology*) na N-terminalnom kraju, kao i katalitički domen na kratkom C-terminalnom repu (Downward, 1998; Whiteman i sar., 2002). PH domeni predstavljaju kratke sekvence u proteinima, značajne za ćelijsku lokalizaciju proteina i vezivanje za PIP₃, a ime im potiče od plekstrina, molekula u kome su otkrivene (Franke i sar., 1997). Nakon aktivacije PIP₃ dolazi do privremene translokacije Akt iz citoplazme ka plazma membrani, čime je omogućena njena aktivacija (Alessi i sar., 1997; Chan i Tschlis, 2001; Yang i sar., 2002; Hresko i sar., 2003). Akt ima dva mesta fosforilacije, na aminokiselinama Thr na poziciji 308 (Thr³⁰⁸) i Ser na poziciji 473 (Ser⁴⁷³), i u potpunosti biva aktivirana pri fosforilaciji na oba mesta. Fosfoinozitolid-zavisna protein kinaza 1 (PDK1; *engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*) parcijalno aktivira Akt tako što je fosforiliše na Thr³⁰⁸, dok mehanizam fosforilacije Akt na poziciji Ser⁴⁷³ još nije potpuno razjašnjen. Smatra se da ovu poziciju fosforiliše PDK2 kinaza, ali neki podaci ukazuju da PDK1 može fosforilisati obe pozicije (Alessi i Cohen, 1998; Sale i Sale, 2008). Takođe, poznato je da poziciju Ser⁴⁷³ fosforiliše i kompleks ciljnog molekula za rapamicin 2 kod sisara (mTORC2; *engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) koji se sastoji od mTOR kinaze i riktora (Andjelkovic i sar., 1999; Scheid i sar., 2002; Sarbassov i sar., 2005; Frias i sar., 2006). Akt ima glavnu ulogu u signalnim putevima koji učestvuju u

metabolizmu nutrijenata, regulaciji transkripcije, rastu i preživljavanju ćelija (Brazil i Hemmings, 2001). Do sada su okarakterisane tri izoforme (Akt 1-3), od kojih su Akt1 i Akt2 eksprimirane u jetri (Pauta i sar., 2016).

Brojne studije su pokazale da estrogenu učestvuju u regulaciji Rho/ROCK signalnog puta (Moore i sar., 2000; Riley i sar., 2005; Simoncini i sar., 2006; Fibbi i sar., 2009; Chavalmane i sar., 2010). Rho proteini (RhoA, B, C, D i E) su familija malih guanozin trifosfat (GTP) vezujućih proteina za čiju je aktivaciju potrebno prevođenje guanozini difosfata (GDP) u GTP. RhoA regulišu brojne ćelijske procese, uključujući migraciju, proliferaciju i adheziju ćelija (Sahai i Marshall, 2003; Benoit i sar., 2009). Neaktivna forma RhoA proteina u citoplazmi vezuje GDP i u kompleksu je sa inhibitorom disocijacije guaninskih nukleotida (GDI, *engl. GDP Dissociation Inhibitor*), koji onemogućava zamenu nukleotida. Faktor izmene guaninskih nukleotida (GEF, *engl. Guanine Nucleotide Exchange Factor*) tj. Rho aktivator stimuliše oslobađanje GDP, vezivanje GTP i translokaciju aktivirane RhoA do ćelijske membrane. Protein koji stimuliše intrinzičku GTPaznu aktivnost Rho (GAP, *engl. GTPase-activating protein*) inaktivira RhoA defosforilacijom GTP u GDP. Najvažniji nishodni efektori aktivirane RhoA su ROCK kinaze. Postoje dve izoforme ROCK proteina visoke homologije, ROCK1 i ROCK2, koje se takođe eksprimiraju u jetri (Ishizaki i sar., 1996; Nakagawa i sar., 1996). ROCK sadrže N-terminalni kinazni domen, spiralni zavoj α -heliksa u kome se nalazi mesto vezivanja Rho proteina i domen bogat cisteinom na C-terminusu. (Schmandke et al., 2007; Fujimura et al., 2011; Tan et al., 2011; Liu, 2012; Frisca et al., 2013). Pored regulacije aktivnosti Rho GDP-GTP ciklusom, skorašnje studije su ukazale i na kontrolu aktivnosti Rho proteina fosforilacijom/defosforilacijom na Ser¹⁸⁸, koju vrše protein kinaze A i G (Sauzeau i sar., 2000; Ellerbroek i sar., 2003). *In vitro* i *in vivo* studije pokazuju da fosforilacija RhoA na Ser¹⁸⁸ dovodi do povećane asocijacije sa inhibitorom disocijacije nukleotida, akumulacije ovog kompleksa u citoplazmi (Rolli-Derkinderen i sar., 2005) i posledične inhibicije RhoA/ROCK signalnog puta (Rolli-Derkinderen i sar., 2010). Tretman kastriranih mužjaka pacova estradiolom povećava osetljivost ROCK proteina na specifični inhibitor (Y-27632), ukazujući na to da estrogenu *in vivo* smanjuju aktivaciju RhoA/ROCK signalnog puta (Chavalmane i sar., 2010). Sve je više dokaza da je ekspresija RhoA i ROCK povećana u gojaznosti (Kanda i sar., 2006; Hara i sar., 2011;

Lee i sar., 2014; Soliman i sar., 2015; Soliman i sar., 2016), kao i da aktivirana ROCK fosforiliše Ser ostatke na IRS-1 dovodeći do inhibicije PI3K/Akt signalnog puta u adipocitima (Furukawa i sar., 2005). Jedna grupa autora ukazuje na ključnu ulogu ROCK1 u regulaciji signalnog puta insulina i leptina u gojaznosti, pri čemu delecija ROCK1 gena u hipotalamusu dovodi do razvoja gojaznosti kod miševa (Huang i sar., 2012). Gayard i sar. (2011) su pokazali da estradiol ostvaruje protektivne efekte na zidove krvnih sudova aktivacijom AMPK α_1 koja povećava nivo fosforilacije RhoA na Ser¹⁸⁸ i time inhibira aktivaciju RhoA/ROCK signalnog puta. Takođe, AMPK α_1 /RhoA signalni put je konstitutivno aktiviran samo u vaskulaturi ženki miševa što ukazuje da aktivacija ovog signalnog puta doprinosi polnim razlikama u funkciji vaskulature i učestvuje u protektivnim efektima estrogena (Gayard i sar., 2011). Međutim, studije koje ukazuju na polne razlike i ulogu estrogena u regulaciji RhoA/ROCK signalnog puta u jetri gojaznih pacova nedostaju u literaturi.

AMPK je visoko konzervirana Ser/Thr kinaza koja se eksprimira u svim tkivima u odgovoru na brojne fiziološke (mišićna kontrakcija, hormoni leptin i adiponektin) i patofiziološke stimuluse (oksidativni stres, osmotski šok, hipoksija, hipoglikemija) (Hardie, 2003). Najčešće se AMPK aktivira u odgovoru na negativan energetski balans (povećan odnos AMP/ATP), a uključena je u regulaciju metabolizma lipida i ugljenih hidrata (Sambandam i Lopaschuk, 2003; Hardie, 2007; Hardie, 2007). Sastoji se od tri subjedinice: katalitičke α subjedinice (α_1 , α_2), koja sadrži kinazni domen, i dve regulatorne subjedinice β (β_1 , β_2) i γ (γ_1 , γ_2 , γ_3) (Carling i sar., 2011). Aktivacija AMPK podrazumeva fosforilaciju α subjedinice na Thr¹⁷² uz prisustvo AMP, koju katalizuje nekoliko ushodnih kinaza, kao što je kalmodulin zavisna kinaza (Gowans i sar., 2013). AMPK ima ulogu senzora nutrijenata (Unger, 2004), te nije iznenađujuće da hiperglikemija dovodi do smanjenja aktivnosti AMPK. Smatra se da je smanjena aktivacija AMPK u jetri u stanju gojaznosti (Yu i sar., 2004) ključna u patogenezi hiperlipidemije i T2DM (Zang i sar., 2006). Izlaganje kulture hepatocita visokim koncentracijama glukoze inhibira fosforilaciju AMPK i dovodi do akumulacije lipida u ćelijama (Zang i sar., 2004). Takođe, AMPK aktivira katabolizam lipida tako što utiče na translokaciju FAT/CD36 proteina (Habets i sar., 2009) i inaktivira ključne enzime uključene u sintezu masnih kiselina i holesterola, kao što su acetil-CoA karboksilaza i HMG-CoA reduktaza (Hardie, 1992; Hardie, 2003). Studije su pokazale da estradiol

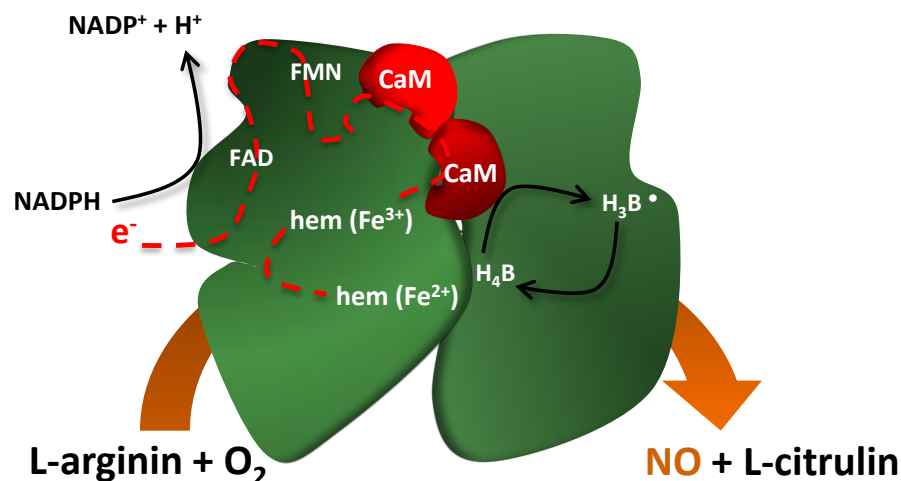
dovodi do aktivacije AMPK u jetri fosforilacijom α subjedinice, ali detaljan mehanizam aktivacije nije dovoljno razjašnjen (D'Eon i sar., 2008; Rogers i sar., 2009; Kim i sar., 2010; Pedram i sar., 2013). U studiji Rogers i sar. (2009) je pokazano da estradiol *ex vivo* dovodi do brze fosforilacije AMPK na Thr¹⁷². Takođe, rezultati skorašnje studije pokazuju da estradiol aktivira AMPK direktnom interakcijom ER α i $\beta\gamma$ -vezujućeg domena AMPK (Lipovka i sar., 2015).

Pokazano je da je estradiol jedan od glavnih regulatora aktivnosti ERK1/2 signalne kaskade (Migliaccio i sar., 1996; Levin, 2001; Sudar i sar., 2008). ERK1/2 pripadaju familiji MAPK Ser/Thr protein kinaza i uključene su u signalne puteve inicirane mitogenima i faktorima rasta (Blenis, 1993; Blumer i Johnson, 1994; Cano i Mahadevan, 1995). U osnovi signalnih puteva MAPK su tri kinaze: MAPK kinaze kinaza (Raf) koja fosforiliše i aktivira MAPK kinazu (MEK1/2), koja zatim aktivira ERK1/2 (Cano i Mahadevan, 1995). Estrogeni mogu da aktiviraju MAPK put aktivacijom signalnog puta koji uključuje adaptorski protein Shc, protein 2 koji se vezuje za receptor faktora rasta (Grb2, *engl. growth factor receptor-bound protein 2*), faktore razmene guaninskih nukleotida (SOS, *engl. guanine nucleotide exchange factors; Son of Sevenless*) i Ras (*engl. RAt Sarcoma*) proteine (Song i sar., 2002; Bulayeva i sar., 2004). Naime, adaptorski protein Shc se vezuje za estradiol-ER α kompleks pomoću svojih Src homologih 2 (SH2, *engl. Src homology 2*) domena, tako da dolazi do fosforilacije tirozinskih ostataka na domenu homologom kolagenu (CH, *engl. collagen homology*) (Pelicci i sar., 1995; Pelicci i sar., 1996). Fosforilisani tirozinski ostaci na CH domenu predstavljaju mesta za koja se vezuje SH2 domen proteina Grb2 (Brummer i sar., 2010) koji potom aktivira SOS (Rojas i sar., 2011; Pierre i sar., 2011). Poslednji u nizu ovog dela signalnog puta je Ras, koji pripada familiji malih GTP vezujućih proteina uključenih u različite signalne puteve u ćeliji. Ras je aktiviran kada je za njega vezan GTP, odnosno deaktiviran kada je za njega vezan GDP (Vetter i Wittinghofer, 2001; Wennerberg i sar., 2005). Aktivirani Ras regrutuje Raf na plazma membranu; aktivirana Raf dalje aktivira MEK1/2 koje dovode do fosforilacije i aktivacije ERK1/2 (Kyriakis i sar., 1992; Lewis i sar., 1998; Avruch i sar., 2001). Za potpunu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na aminokiselinama Thr na poziciji 202 (Thr²⁰²) i tirozin na poziciji 204 (Tyr²⁰⁴) (Cano i Mahadevan, 1995). Aktivirane ERK1/2 fosforilišu Tyr ostatke ciljnih proteina u

citoplazmi ili se translociraju u jedro (Widmann i sar., 1999; Kehat i Molkentin, 2010) gde direktno fosforilišu transkripcijske faktore kao što su ELK-1, c-Fos, p53, GATA4 i Ets1/2, koji predstavljaju regulatore rasta i proliferacije (Liang i sar., 2001; Kehat i Molkentin, 2010).

1.4. Azot monoksid i inducibilna azot monoksid sintaza

Azot monoksid (NO) je jedan od najmanjih bioaktivnih produkata ćelija, i veoma važan, visoko reaktivni signalni molekul uključen u brojne fiziološke i patofiziološke procese (Arthur, 1988). U organizmu NO nastaje kao produkt konverzije aminokiseline L-arginin u L-citrulin, u reakciji koju katalizuje enzim NO sintaza (NOS, *engl. NO synthase*) (Slika 3.). U jetri, NO ne samo da je neophodan za regulaciju protoka krvi (Mathie i sar., 1991; Pannen i Bauer, 1998), već ima važnu ulogu u imunskom odgovoru, omogućavajući učešće u antiinflamatornim, antimikrobnim, antitrombotskim i antioksidativnim aktivnostima (Adcock i sar., 1994; Kuo i sar., 1997; Taylor i sar., 1998; Sass i sar., 2001). Nekontrolisana sinteza NO može biti štetna u mnogim akutnim i hroničnim bolestima, uključujući sepsu, hemoragiju i hepatitis (Nussler i Billiar, 1993; Garcia-Monzon i sar., 2000). Velike količine NO reaguju sa superoksid anjonima formirajući peroksinitrite, koji mogu reagovati sa Tyr ostacima na različitim proteinima, formirajući 3-nitrotirozin, koji može dovesti do oštećenja tkiva (Halliwell, 1997; Garcia-Monzon i sar., 2000).



Slika 3. Prikaz građe i funkcije NOS. BH₄ – tetrahidrobiopterin; CaM – kalmodulin; e⁻ – elektron; FAD – flavin adenin dinukleotid; FMN – flavin mononukleotid; NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NO – azot monoksid; O₂ – kiseonik.

Do sada su klonirane i okarakterisane tri različite izoforme enzima NOS: neuronska (nNOS; tip-I; *engl. neuronal NOS*), inducibilna (iNOS; tip-II; *engl. inducible NOS*) i endotelna NOS (eNOS; tip-III; *engl. endothelial NOS*) (Arthur, 1988; Parola i Robino, 2001). Iako su sve tri izoforme NOS detektovane u jetri pacova, ekspresija nNOS je ograničena na nervne završetke koji inervišu krvne sudove većeg dijametra. Za razliku od eNOS i nNOS koje se eksprimiraju konstitutivno, iNOS se eksprimira u odgovoru na različite faktore inflamacije i oksidativni stres (Szabo i sar., 1994; Geller i sar., 1995). iNOS je predominantno lokalizovana u citoplazmi (Barnes i Karin, 1997) i poseduje veliki afinitet vezivanja za jone kalcijuma (Ca^{2+}). Aktivacija NOS obuhvata njegovu dimerizaciju i udruživanje sa dva molekula kalmodulina i nekoliko kofaktora, uključujući nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP) i kiseonik (O_2) kao kosupstrate i tetrahidrobiopterin (BH_4), flavin mononukleotid/flavin adenin dinukleotid (FMN/FAD) i hem (Baek i sar., 1993) (**Slika 3**). Pretpostavlja se da kofaktor BH_4 vrši alosteričku promenu kako bi stabilizovao aktivnu dimernu formu NOS i na taj način redukuje NOS pri stimulaciji i dovodi do njegove aktivacije.

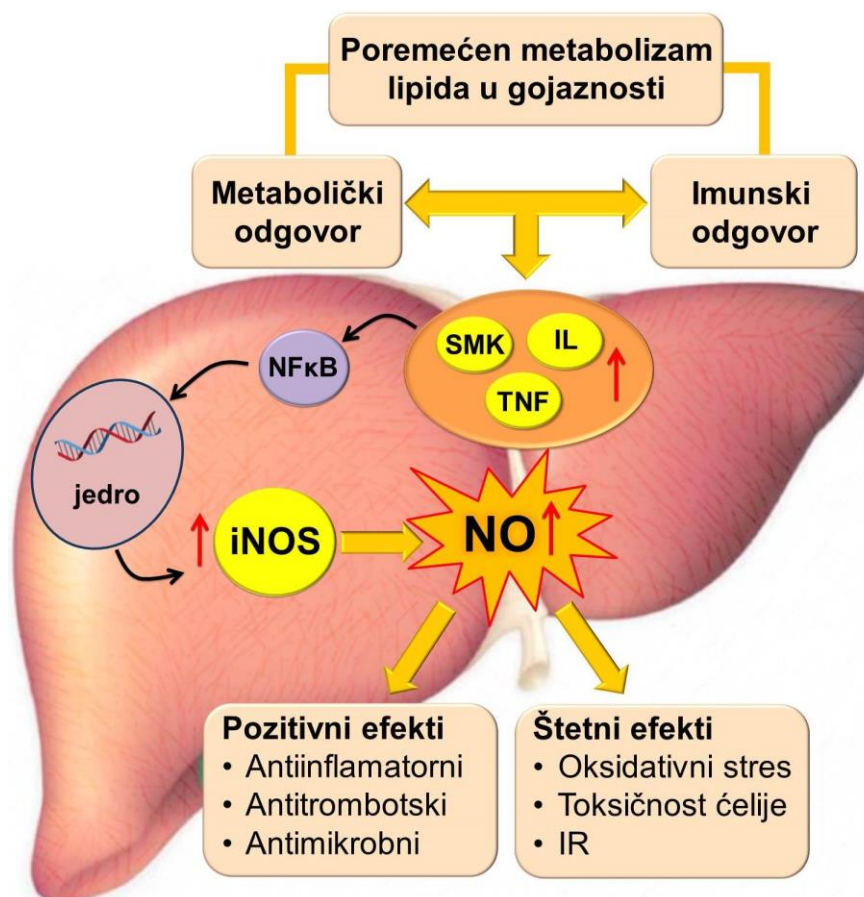
1.4.1. Inducibilna azot monoksid sintaza u jetri

Kontroverzni su podaci o ekspresiji iNOS u jetri u fiziološkim uslovima (Szabo i sar., 1994; Qatanani i Lazar, 2007), ali je poznato da su svi tipovi ćelija jetre sposobni da u različitim uslovima eksprimiraju iNOS (Noronha i sar., 2005). Nespecifična inhibicija iNOS doprinosi oštećenju jetre tokom ishemije/reperfuzije i sepse (Taylor i sar., 1998; Noronha i sar., 2005), ukazujući na protektivnu ulogu NO u jetri. Međutim, povećana ekspresija iNOS dovodi do prekomerne sinteze NO, koji dalje može izazvati genotoksična i citotoksična oštećenja jetre (Garcia-Monzon i sar., 2000). Balans u sintezi i razgradnji NO je ključan u određivanju njegovih protektivnih i citotoksičnih efekata. U studiji Szabo i sar. (1994) selektivni inhibitori iNOS su smanjili oštećenja jetre pacova izazvanim bakterijskim lipopolisaharidima (LPS). Rezultati koje su objavili Billiar i sar. (1989) pokazuju da Kupferove ćelije reaguju na inflamatorni stimulus indukujući ekspresiju iNOS, kao i ostali makrofagi. Brojni inflamatorni citokini, kao što su faktor nekroze tumora α ($\text{TNF}\alpha$), interleukin -1β ($\text{IL}-1\beta$), interferon- γ ($\text{IFN}-\gamma$), kao i SMK, uključeni su u regulaciju ekspresije iNOS i produkcije NO u jetri (Lara-Castro i Garvey, 2008; Hooper i sar., 2011) (**Slika 4**). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je

iNOS jedan od važnih medijatora koji ostvaruje vezu između metaboličkih poremećaja i inflamacije u gojznosti (Charbonneau i Marette, 2010).

1.4.2. Inducibilna azot monoksid sintaza u gojznosti

Inducibilna azot monoksid sintaza se ekspirira u različitim metaboličkim poremećajima karakterističnih za gojznost (**Slika 4.**) (Perreault i Marette, 2001; Dallaire i sar., 2008; Charbonneau i Marette, 2010; Kanuri i sar., 2017). Ranije je pokazano da indukcija ekspresije iNOS citokinima ili egzogeni tretman donorima NO umanjuje efekat insulina na transport glukoze u kulturi miocita ili *ex vivo* na izolovanim mišićima pacova (Bedard i sar., 1997; Kapur i sar., 1997). Takođe, pokazano je da korišćenje specifičnog inhibitora iNOS (L-NAME) dovodi do normalizacije transporta glukoze u miocitima (Bedard i sar., 1997). Predloženo je da indukcija iNOS može biti uključena u razvoj IR u patofiziološkim stanjima poput gojznosti, koje karakterišu povećane koncentracije citokina. Povećana koncentracija SMK u plazmi indukuje ekspresiju iNOS i sintezu NO u metaboličkim tkivima eksperimentalnih modela gojznosti (Shimabukuro i sar., 1998; Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010; Ha i Chae, 2010). U skeletnim mišićima i masnom tkivu osoba koje boluju od T2DM pokazano je da je ekspresija iNOS povećana i u pozitivnoj korelaciji sa IR i gojznošću (Engeli i sar., 2004; Torres i sar., 2004). Na važnu ulogu iNOS u patogenezi IR u gojznosti su ukazali Perreault i Marette (2001) konstruisanjem iNOS^{-/-} miševa. Rezultati istraživanja ovih autora pokazali su da delecija gena za iNOS sprečava razvoj IR u mišićima i stimuliše dejstvo insulina kod gojznih miševa. U istoj studiji ekspresija gena za iNOS je povećana dva do četiri puta u skeletnim mišićima i masnom tkivu, ali ne i u jetri gojznih miševa u poređenju sa miševima koje nisu bile na režimu HF ishrane (Perreault i Marette, 2001). Eksperimenti Fujimoto i sar. (2005) su pokazali da korišćenje inhibitora za iNOS ublažava simptome IR u jetri *ob/ob* miševa. Takođe, pokazano je da povećana ekspresija iNOS u jetri može inhibirati dejstvo insulina nitracijom Tyr ostataka na receptoru za insulin, IRS i Akt (Carvalho-Filho i sar., 2005). Kasnije su Charbonneau i Marette (2010) pokazali da infuzija lipida kod miševa indukuje ekspresiju iNOS, što dovodi do nitracije molekula signalnog puta insulina, ukazujući na ulogu iNOS u patologiji IR u jetri u gojznosti.



Slika 4. Mehanizam regulacije ekspresije iNOS u gojznosti; pozitivni i štetni efekti NO. IL – interleukin; iNOS – inducibilna azot-monoksid-sintaza; IR – rezistencija na insulin; NFκB – nuklearni faktor-κB; NO – azot monoksid; SMK – slobodne masne kiseline; TNF – faktor nekroze tumora.

1.4.3. Molekularni mehanizmi regulacije inducibilne azot monoksid sintaze

Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS je složen, visoko specifičan proces koji se dešava na različitim nivoima. Brojni hormoni i drugi faktori učestvuju u regulaciji ekspresije gena, posttranskripcionih i posttranslacionih modifikacija i aktivnosti iNOS. Sve je više dokaza da postoje polne razlike u pogledu inflamatornog odgovora u jetri i da se estrogenima može pripisati protektivno dejstvo (Harada i sar., 1985; Eckhoff i sar., 2002; Rusai i sar., 2011; Nweze i sar., 2012). Iako tačan mehanizam kojima polni hormoni regulišu inflamaciju u jetri nije poznat, smatra se da testosteron ima imunosupresivne efekte, dok estradiol ima imunoprotektivne efekte (Angele i Chaudry, 2005; Sener i sar., 2005). Ekspresija gena za iNOS je tokom indukovane inflamacije značajno povećana u jetri mužjaka i ovarijektomisanih ženki pacova (Inaba i sar., 2005). Takođe, Shimizu i sar. (2007) su pokazali da tretman estrogenima smanjuje ekspresiju

iNOS tokom oštećenja jetre usled hemoragičnog šoka. Međutim, podaci koji ukazuju na polne razlike u regulaciji ekspresije iNOS i sinteze NO u jetri gojaznih životinja nedostaju u literaturi.

Dosadašnje studije su pokazale da je ekspresija iNOS regulisana različitim signalnim putevima, od kojih su najviše izučavani PI3K/Akt i ERK1/2. U različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima ekspresija iNOS je indukovana faktorima transkripcije (Sass i sar., 2001), uključujući transkripcioni faktor κ B (NF κ B, *engl. nuclear factor κ B*) koji ostvaruje interakcije sa elementima u okviru promotora gena za iNOS (Murdolo i Smith, 2006; Musunuru, 2010). Familiju NF κ B čine pet članova: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50 i njegov prekursor p105) i NF κ B2 (p52 i njegov prekursor p100), koji formiraju homodimere (RelB) ili heterodimere (RelB i p100/p52 ili p50, c-Rel i p50 ili p65, p65 i p50, p65 i p52) (Xiao, 2004). Najčešća forma NF κ B familije je heterodimer p65/p50 i ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u odgovoru organizma na inflamaciju i stres (Pahl, 1999; Xiao, 2004). U neaktivnom stanju, molekul NF κ B nalazi se u citosolu, u kompleksu sa inhibitornim proteinom (I κ B, *engl. Inhibitor of NF κ B*) (Myers, 2004). Da bi se NF κ B aktivirao, neophodno je da dođe do fosforilacije I κ B, koju vrši I κ B kinaza (I κ K, *engl. I κ B Kinase*). I κ K se aktivira fosforilacijom od strane Akt ili ERK1/2, pa I κ K dalje fosforiliše I κ B. Nakon fosforilacije dolazi do proteolitičke digestije I κ B i NF κ B se translocira u jedro gde inicira transkripciju gena za iNOS (Hattori i sar., 2003).

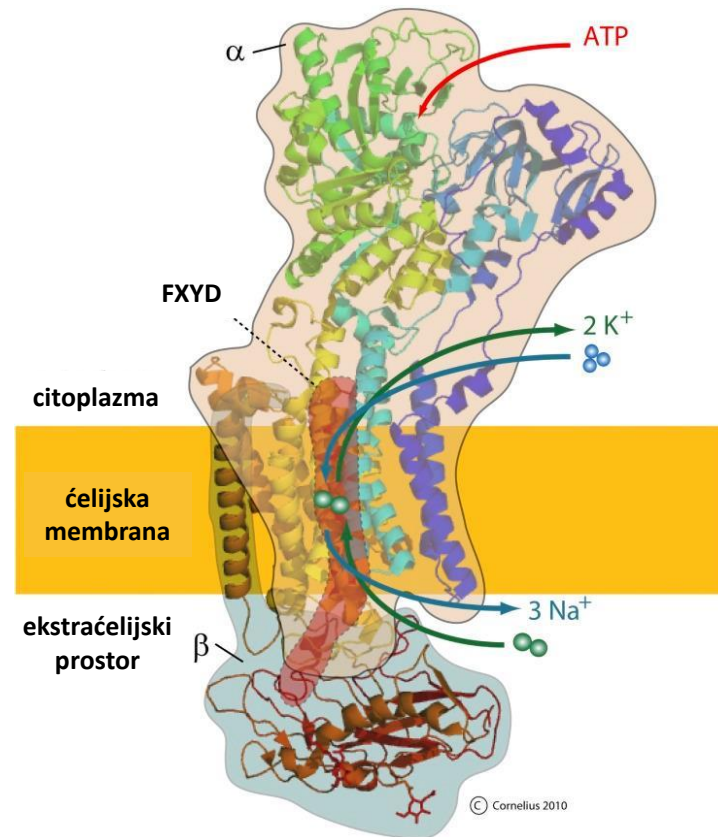
Studije su pokazale da inhibicija iNOS promoviše aktivaciju molekula signalnog puta insulina, uključujući IRS-1, IRS-2 i Akt u jetri gojaznih miševa (Fujimoto i sar., 2005; Carvalho-Filho i sar., 2005). Inhibicija Akt dovodi do smanjene aktivacije NF κ B, a posledično i do smanjene ekspresije iNOS i sinteze NO (Hattori i sar., 2003). Liu i saradnici (2015) su pokazali da se ekspresija iNOS u primarnoj kulturi hepatocita gojaznih miševa dešava preko PI3K/Akt signalnog puta. NO poreklom od iNOS reverzibilno inaktivira Akt procesom nitrozilacije *in vitro* i u intaktnim ćelijama, što utiče na proces fosforilacije Akt molekula na Thr³⁰⁸ ili Ser⁴⁷³ (Yasukawa i sar., 2005). Važnu ulogu u ekspresiji i aktivaciji iNOS i sinteze NO ima ERK1/2 signalni put (Zhao i Lee, 1999; Slomiany i Slomiany, 2002; Ellerhorst i sar., 2006). Pokazano je da ERK1/2 ima aktivnu ulogu u fosforilaciji i defosforilaciji I κ K i NF κ B, koji dovode do ekspresije iNOS u jetri (Mao i sar., 2016). Xu i sar. (2005) su pokazali da inhibicija

ERK1/2 signalnog puta može delimično inhibirati sintezu NO, kao i aktivaciju NFκB u jetri pacova tretiranih LPS-om.

1.5. Natrijum-kalijum adenozin trifosfataza

Natrijum-kalijum adenozin trifosfataza (Na^+/K^+ -ATPaza) je visoko konzerviran transmembranski enzim čija je osnovna funkcija održavanje elektrohemijskog gradijenta Na^+ i K^+ jona u skoro svim eukariotskim ćelijama. Energija za ovaj proces stvara se tokom hidrolize terminalne fosfatne veze u molekulu ATP, pri čemu nastaje ADP i oslobađa se orto fosfat (Sweadner i Goldin, 1980). Smatra se da Na^+/K^+ -ATP-aza značajno doprinosi potrošnji ukupne energije kod sisara (19-28% celokupnog sintetisanog ATP u stanju mirovanja) (Rolfe i Brown, 1997). Na^+/K^+ -ATPaza ima važnu ulogu u regulaciji brojnih funkcija, uključujući kontrolu volumena i kontraktilnosti ćelije, ćelijsku ekscitabilnost, jonsku homeostazu i procese apsorpcije (Dahl i Hokin, 1974). Takođe, Na^+/K^+ -ATP-aza je uključena u brojne funkcije koje ne zavise od transporta jona, kao što su proliferacija ćelija tumora, regulacija krvnog pritiska i metabolizma Ca^{2+} (Li i sar., 2011).

Funkcionalni molekul Na^+/K^+ -ATPaze je heterodimerni protein koji se sastoji od dve glavne subjedinice, α i β . Postoji više izoformi α i β subjedinica koje mogu formirati dvanaest različitih kombinacija molekula sa različitim transportnim i farmakološkim odlikama (Kaplan, 2002). Četiri α i tri β izoforme subjedinica Na^+/K^+ -ATPaze kodiraju različiti geni, i njihova sinteza se odvija nezavisno u endoplazmatskom retikulumu, nakon čega se brzo udružuju dajući funkcionalne jedinice molekula (Sweadner i sar., 1994). Subjedinica α je odgovorna za katalitičku funkciju molekula, transport jona i vezivanje kardijačnih glikozida, dok je β esencijalna za udruživanje subjedinica u funkcionalni molekul Na^+/K^+ -ATPaze (Kaplan, 2002). U jetri pacova su ekprimirane α_1 , β_1 i β_3 izoforme (Simon i sar., 1995; Arystarkhova i Sweadner, 1997). U nekim ćelijama, na stabilizaciju i funkciju Na^+/K^+ -ATPaze dodatno utiču FXYP proteini, koji se često nazivaju γ -subjedinice (**Slika 5.**) (Garty i Karlish, 2006).



Slika 5. Građa Na^+/K^+ -ATPaze. Na slici su prikazane subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze, α (žuta), β (plava) i γ ili FXYD (crvena); Na^+ , natrijum; K^+ , kalijum. Preuzeto i modificirano iz (Clausen, 2013).

1.5.1. Natrijum-kalijum adenozin trifosfataza u jetri

Aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u jetri je direktno povezana sa regulacijom brojnih transportera na plazma membrani, koji su uključeni u regulaciju unutarćelijske jonske homeostaze, membranskog potencijala, unutarćelijske pH, sekrecije i koncentrovanja žuči, apsorpcije ugljenih hidrata, aminokiselina. Studije su pokazale da Na^+/K^+ -ATPaza ima regulatornu ulogu u metabolizmu holesterola u jetri tako što učestvuje u sintezi i pravilnoj distribuciji holesterola u ćeliji (Chen i sar., 2009; Adamian i sar., 2011; Wang i sar., 2015). Takođe, postoje dokazi da holesterol u membrani omogućava optimalno funkcionisanje Na^+/K^+ -ATPaze, posebno u membranama kaveola, koje su bogate holesterolom (Gaestel, 2016). Hipertrofija jetre dešava se u različitim stanjima, kao što su: trudnoća, laktacija (Remesar i sar., 1981), regeneracija nakon parcijalne hepaktomije i gojaznost (Cleary i sar., 1980). Da bi se u navedenim stanjima održala hipertrofija jetre, neophodni su supstrati za sintezu nukleinskih kiselina i proteina, a ti procesi se karakterišu povećanom aktivnošću transmembranskih sistema za Na^+ -zavisni transport

aminokiselina među kojima je najznačajniji Na^+/K^+ -ATPaza, koja održava nizak nivo Na^+ u ćeliji neophodan za sekundarni transport aminokiselina (Fafournoux i sar., 1982; Pastor-Anglada i sar., 1987; Felipe i sar., 1989; Ruiz i sar., 1991; Ruiz-Montasell i sar., 1993).

1.5.2. Natrijum-kalijum adenozin trifosfataza u gojaznosti

Smanjena ekspresija i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze je povezana sa metaboličkim poremećajima vezanim za gojaznost i prateće komorbiditete, kao što su IR i T2DM (Vrbjar i sar., 1999; Iannello i sar., 2007). Rezultati ranijih studija su pokazali da gojaznost dovodi do smanjenja aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri miševa, što je u direktnoj vezi sa stanjima hiperglikemije ili hiperinsulinemije i povećanom koncentracijom SMK u membrani ćelija (Bray i Yukimura, 1978; Lin i sar., 1981; Iannello i sar., 1994). Promenjena koncentracija i poremećeno dejstvo insulina u stanju gojaznosti i IR ima velike posledice po aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze (Al-Khalili i sar., 2003). Insulin ostvaruje važnu ulogu u homeostazi K^+ regulacijom aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze, pospešujući unos K^+ sa istovremenim unosom glukoze u ćelije (Ewart i Klip, 1995). Značajno smanjenje aktivnosti i nivoa proteina Na^+/K^+ -ATPaze, kao i ekspresije subjedinica α_1 i α_2 , uočeno je u eritrocitima, srcu i aorti pacova kod kojih je došlo do razvoja IR i dijabetesa (Gupta i sar., 1991; Kowluru i sar., 2000; Michea i sar., 2001; Rosta i sar., 2009). Takođe, postoje dokazi o smanjenoj aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u eritrocitima pacijenata koji boluju od dijabetesa (Mimura i sar., 1994). Tokom gojaznosti povećana je koncentracija leptina što doprinosi smanjenju aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze (Sweeney i Klip, 2001). Gojaznost je usko povezana sa oksidativnim stresom. Pokazano je da ROS inhibira aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze na plazma membrani mišićne ćelije, i to glutationilacijom β_1 subjedinice (White i sar., 2009). Međutim, pojedine studije su pokazale da HF ishrana dovodi do povećanja ekspresije gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze, kao i povećanja aktivnosti samog enzima u jetri (Ruiz-Montasell i sar., 1994; Ferrer-Martinez i sar., 1996; Wang i sar., 2015). Povećana aktivnost može biti jedan od mehanizama prilagođavanja na povećane metaboličke potrebe organizma koje su u vezi sa Na^+ -zavisnim transportom biomolekula, kao i hipertrofije jetre (Ruiz-Montasell i sar., 1994). U literaturi nema mnogo podataka o regulaciji ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih ženki i mužjaka

pacova. S obzirom da Na^+/K^+ -ATPaza učestvuje u regulaciji različitih procesa u jetri, a da je njena ekspresija i aktivnost smanjena u gojaznosti i IR, to za posledicu može imati nastanak različitih morfoloških i funkcijskih poremećaja jetre.

1.5.3. Molekularni mehanizmi regulacije natrijum-kalijum adenozin trifosfataze

Brojni hormoni i drugi faktori regulišu funkciju Na^+/K^+ -ATPaze različitim mehanizmima, uključujući regulaciju ekspresije gena, unutarćelijske translokacije (premeštanja), aktivnosti i fosforilacije (Ewart i Klip 1995; Isenovic i sar., 2004; Efendiev i sar., 2007; Li i sar., 2011). Prvi mehanizam regulacije podrazumeva povećanje ili smanjenje transkripcije gena za Na^+/K^+ -ATPazu (Bonvalet, 1998; Therien i Blostein, 2000). Dostavljanje nosivih subjedinića iz unutarćelijskih depoa na plazma membranu, predstavlja drugi mehanizam regulacije (Hundal i sar., 1992; Al-Khalili i sar., 2003). Direktni uticaj na kinetičke karakteristike Na^+/K^+ -ATPaze, koja je već lokalizovana na plazma membrani predstavlja mehanizam regulacije njene aktivnosti (Bertorello i Katz, 1993; Li i sar., 1999; Therien i Blostein, 2000). Iako postoje dokazi da fosforilacija i defosforilacija α subjediniće Na^+/K^+ -ATPaze različitim kinazama dovodi do promene u kinetičkim odlikama enzima, ovaj mehanizam regulacije je i dalje kontroverzan (Bagatell i sar., 1994; Chibalin i sar., 1998; Chibalin i sar., 1999; Leinwand, 2003; Fuller i sar., 2004; Fuller i sar., 2013). Poznato je da estradiol reguliše ekspresiju Na^+/K^+ -ATPaze i da postoje polne razlike u njenoj ekspresiji u kardiovaskularnom sistemu (KVS) (Palacios i sar., 2004). Međutim, podaci koji ukazuju na polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih životinja nedostaju u literaturi. Najviše izučavani signalni putevi koji su uključeni u regulaciju ekspresije/aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze obuhvataju IRS/PI3K/Akt, AMPK i ERK1/2 (Al-Khalili i sar., 2003; Lecuona i sar., 2006; Tian i sar., 2009). Rezultati pojedinih studija takođe ukazuju na ulogu RhoA/ROCK signalnog puta u regulaciji ekspresije/aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u KVS (Uehata i sar., 1997; Dada i sar., 2007; Gayard i sar., 2011), ali podaci o ulozi ovog signalnog puta u jetri nedostaju u literaturi.

Uloga IRS/PI3K/Akt signalnog puta u regulaciji ekspresije/aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze pokazana je u brojnim eksperimentima (Simoncini i sar., 2000; Isenovic i sar., 2004; Tian i sar., 2009; Maturana-Teixeira i sar., 2015). Imajući u vidu da je Na^+/K^+ -

ATPaza regulisana IRS-1/PI3K/Akt signalnom kaskadom, može se pretpostaviti da estradiol smanjenjem aktivacije RhoA/ROCK signalnog puta pozitivno deluje na funkciju Na^+/K^+ -ATPaze (Sudar i sar., 2008; Obradovic i sar., 2015). Takođe, važnu ulogu u regulaciji Na^+/K^+ -ATPaze ima ERK1/2 (Al-Khalili i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Koricanac i sar., 2011). U brojnim ćelijama i tkivima, kratkotrajne promene aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze su direktno ili indirektno povezane sa ERK1/2 signalnim putem (Al-Khalili i sar., 2003; Khundmiri i sar., 2004; Shahidullah i sar., 2014). Al-Khalili i saradnici su pokazali da aktivacija ERK1/2 dovodi do fosforilacije α subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u citoplazmi i njene translokacije na plazma membranu ćelija (Al-Khalili i sar., 2003). Takođe, pokazano je da korišćenje inhibitora ERK1/2 (PD98059) blokira aktivaciju Na^+/K^+ -ATPaze (Isenovic i sar., 2004).

Poremećena regulacija AMPK, jednog od ključnih enzima uključenog u regulaciju metabolizma glukoze i lipida u jetri (Zhang i sar., 2012), može dovesti do smanjenja aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze. Pokazano je da aktivacija AMPK u fiziološkim uslovima direktno ili indirektno stimuliše protein fosfatazu 2A (Lecuona i sar., 2006), koja posledično defosforiliše α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze na Ser^{18} , sprečavajući na taj način endocitozu subjedinica Na^+/K^+ -ATPaze i povećavajući njenu aktivnost na plazma membrani (Benziane i sar., 2012). Dosadašnji eksperimenti usmereni na izučavanje polnih razlika u regulaciji ekspresije/aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze uglavnom su fokusirani na KVS, dok u literaturi nedostaju podaci koji se odnose na jetru.

2. Ciljevi i hipoteza istraživanja

2.1. Ciljevi

Molekulski mehanizami regulacije aktivnosti i ekspresije iNOS i Na⁺/K⁺-ATP-aze u jetri gojaznih pacova oba pola nisu u potpunosti razjašnjeni. Takođe, ne postoje literaturni podaci koji povezuju promene u regulaciji iNOS i Na⁺/K⁺-ATPaze sa promenama u ekspresiji i aktivnosti signalnih molekula PI3K, Akt, ERK1/2, AMPK, RhoA i ROCK u jetri u stanju gojaznosti.

Ciljevi ove doktorske disertacije su da se u jetri gojaznih pacova izuče polne razlike u:

1. metabolizmu glukoze i SMK, i ekspresiji njihovih transportera GLUT2 i FAT/CD36;
2. regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS;
3. učešću signalnih molekula IRS-1, PI3K, Akt i NFκB u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS
4. regulaciji ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze;
5. učešću signalnih molekula IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2, RhoA, ROCK i AMPK u regulaciji ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze.

2.2. Hipoteza

U postavci osnovne hipoteze pošlo se od činjenice da postoje polne razlike u ekspresiji iNOS u jetri i sinteze NO u gojaznosti, što rezultuje različitom aktivacijom PI3K/Akt, ERK1/2, AMPK i RhoA/ROCK signalnih puteva. Promene u regulaciji ovih signalnih kaskada dovode do poremećaja funkcije insulina koji se ogleda u otežanom preuzimanju glukoze i SMK posredstvom membranskih transportera, a samim tim i postepenog razvoja IR. Istovremeno dolazi i do poremećaja ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri koja je uključena u regulaciju membranskih transportnih sistema ćelija jetre, što za posledicu ima različite poremećaje funkcije jetre. Pretpostavka je da estradiol ispoljava protektivne efekte kod gojaznih ženki pacova i sprečava razvoj IR, dok kod gojaznih mužjaka ovaj efekat izostaje, što izražava značajne polne razlike.

3. Materijal i metode

3.1. Rad sa eksperimentalnim životinjama

Za eksperimente u okviru ove doktorske disertacije je korišćeno 28 adultnih ženki i mužjaka pacova, soja Wistar (*Rattus norvegicus*), starosti od 7 do 9 nedelja, mase tela od 160-240 g, iz odgajališta Instituta za nuklearne nauke “Vinča”, Beograd. Na početku eksperimenta, životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe:

1. Kontrolna grupa normalno uhranjenih ženki (KŽ)
2. Grupa gojaznih ženki (HFŽ)
3. Kontrolna grupa normalno uhranjenih mužjaka (KM)
4. Grupa gojaznih mužjaka (HFM)

Kontrolne grupe oba pola (KŽ i KM) su tokom 10 nedelja, koliko je trajao eksperiment, imale slobodan pristup (*ad libitum*) vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani koja je sadržala: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 0,9% lizina, 1% kalcijuma, 0,75% metionin+cistin, 0,5% fosfora, 0,15-0,25% natrijuma, mešavine minerala (u mg/kg: cink 100, gvožđe 100, magnezijum 30, bakar 20, jod 0,5, selen 0,1), mešavine vitamina (A 10000 IU/kg, D₃ 1600 IU/kg, E 25 mg/kg, B₁₂ 0,02 mg/kg), antioksidanata 100 mg/kg; digestibilna energija 11 MJ/kg (D.D. “Veterinarski zavod Subotica”, Subotica, R. Srbija). Eksperimentalne grupe (HFŽ i HFM) su tokom istog perioda imale *ad libitum* pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani obogaćenoj sa 42% masti (suncokretovo ulje).

Tokom trajanja eksperimenta životinje su držane po dve do tri jedinke u standardnim laboratorijskim kavezima od pleksiglasa sa poklopcem od nerđajuće čelične žice i podlogom od piljevine koja je menjana dva do tri puta nedeljno. Laboratorijski uslovi tokom eksperimenta ispunjavali su standardne zahteve:

temperatura ambijenta 21-24 °C; relativna vlažnost vazduha 60-70%; režim osvetljenja 12 sati svetla/12 sati mraka, čime je omogućen dnevno/noćni ritam.

Životinje su žrtvovane nakon deset nedelja. U eksperimentalnu salu su donošeni pacovi u kavezima pojedinačno, kako bi se nivo stresa kod narednih pacova, koji bi trebalo da se žrtvuju, sveo na minimum. U dubokoj anesteziji, izazvanoj etrom, životinje su žrtvovane iskrvarenjem. Krv je sakupljena i prebacivana u vakutajnere za izolovanje seruma i plazme. Jetre su ekstrahovane, merene i trenutno zamrzavane u tečnom azotu, a zatim čuvane na -70 °C do daljeg rada. Delovi tkiva jetre su sečeni i odvajani za izolaciju proteina ćelijskih membrana, ukupnih proteina ćelijskih lizata, kao i za izolaciju ribonukleinske kiseline (RNK).

Sve eksperimentalne i hirurške procedure u okviru ove doktorske disertacije bile su u skladu sa etičkim principima o radu na eksperimentalnim životinjama, po preporukama Etičkog komiteta Instituta „Vinča“ koje su sadržane u protokolu o brizi i upotrebi laboratorijskih životinja SLASA (Serbian Laboratory Animal Science Association) Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2. Izolovanje seruma i plazme iz krvi pacova

Iz jedne polovine svakog uzorka sakupljene krvi izolovani su serumi, inkubiranjem krvi u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi (bez antikoagulansa), a zatim centrifugiranjem 15 minuta na 3500 rpm. Dobijeni serumi čuvani su na -20 °C za dalje merenje nivoa glukoze, insulina i holesterola.

Iz druge polovine svakog uzorka sakupljene krvi izolovane su plazme, inkubiranjem krvi 60 minuta na ledu (sa antikoagulansom - EDTA), a potom centrifugiranjem 15 minuta na 4000 rpm. Dobijeni supernatanti (plazme) su alikvotirani na manje zapremine i čuvani na -20 °C za dalje merenje nivoa nitrita (NO_2^-) /nitrata (NO_3^-) i SMK.

3.3. Određivanje koncentracije glukoze u serumu i lizatu jetre pacova

Koncentracija glukoze u serumu i lizatu jetre pacova je merena standardizovanom GLUC-PAP metodom (Randox, Crumlin, Velika Britanija) u Rx Daytona automatskom biohemijском analizatoru (Randox, Velika Britanija). Princip metode zasniva se na oksidaciji glukoze u glukonsku kiselinu i vodonik peroksid (H_2O_2) u prisustvu enzima

glukozo oksidaze. Oslobođeni H_2O_2 reaguje sa 4-aminofenazonom i fenolom, u prisustvu enzima peroksidaze, gradeći iminohinon i vodu, pri čemu dolazi do promene boje reakcione smeše. Merenjem apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 505 nm određivan je intenzitet nastale iminohinonske boje, što je direktno proporcionalno koncentraciji glukoze u uzorku. Koncentracija glukoze izražavana je u mmol/l.

3.4. Određivanje koncentracije insulina u serumu pacova

Koncentracija insulina u serumu pacova je merena radioimunološkom (RIA; *engl. Radioimmunoassay*) metodom uz korišćenje RIA INS (PEG) komercijalnog kompleta (INEP, Zemun, R.Srbija). Princip metode se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka ili standarda i radioaktivno obeleženog insulina (J^{125} -insulin) za određeni broj epitopa na specifičnim anti-insulin antitelima, pri čemu nastaju radioaktivno obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Ukoliko ima više insulina u uzorku, utoliko se manje obeleženog kompleksa formira. Nastali kompleksi se talože uz pomoć imunoabsorbenta (30 minuta na sobnoj temperaturi), koji predstavlja kompleks vezan za sekundarno antitelo, polietilenglikola, dok slobodni insulin (obeleženi i neobeleženi), kao i slobodna antitela zaostaju u tečnoj fazi. Radioaktivnost taloga meri se u gama-scintilacionom brojaču.

Postupak je izvođen tako što je u 50 μ l seruma krvi dodavano 50 μ l J^{125} -insulina i 50 μ l anti-insulin-antiseruma uz mešanje. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tokom 20 sati, dodavano je 250 μ l imunoabsorbenta, uz mešanje, i potom inkubirano na sobnoj temperaturi 30 minuta. Dobijeni sadržaj je centrifugiran 25 minuta na $3000 \times g$, supernatant je uklanjan, a u talogu merena radioaktivnost na gama-scintilacionom brojaču 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter (LKB, Belgija). Istovremeno su tretirani i standardi poznate koncentracije insulina, koji su služili za konstrukciju standardne krive na osnovu koje je određivana koncentracija insulina u uzorcima seruma. Koncentracija insulina izražavana je u mIU/l seruma.

3.5. Određivanje indeksa rezistencije na insulin i indeksa sekrecije insulina

HOMA (*engl. Homeostasis Model Assessment Index*) je matematički metod koji se koristi za određivanje IR, kao i kapacitet sekrecije β -ćelija pankreasa (Matthews i sar., 1985). Na osnovu vrednosti glukoze i insulina određivan je indeks IR (HOMA-IR),

kao i funkcionalni kapacitet sekrecije β -ćelija pankreasa, izračunavanjem indeksa sekrecije insulina (HOMA- β).

HOMA-IR indeks je izračunavan prema formuli:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glu (mmol/l)} \times \text{INS } (\mu\text{U/ml})}{22,5}$$

HOMA- β indeks izračunavan je prema formuli:

$$\text{HOMA-}\beta = \frac{20 \times \text{INS } (\mu\text{U/ml})}{\text{Glu (mmol/l)} - 3,5}$$

3.6. Određivanje koncentracije ukupnog holesterola u serumu i lizatu jetre pacova

Koncentracija ukupnog holesterola (HOL) u serumu i lizatu jetre pacova određivana je standardizovanom metodom enzimskog bojenja (*engl. enzymatic colour test*), korišćenjem komercijalnih kitova za holesterol (*engl. cholesterol oxidase-peroxidase*) u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA), prema uputstvu proizvođača. Koncentracija holesterola je izražavana u mmol/l.

3.7. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u serumu i lizatu jetre pacova

Koncentracija SMK u serumu i lizatu jetre pacova određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Dunkombu (Duncombe, 1964). Princip metode bazira se na ekstrakciji lipida organskim rastvorom, pri čemu se eliminišu interferirajuća jedinjenja kao što su fosfolipidi. Hloroformski rastvor SMK reaguje sa reagensom koji sadrži bakar i formira soli bakra, koje zatim stvaraju kompleks sa dietilditiokarbamatom (DDC), žute boje sa maksimumom apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 463 nm.

Postupak je izvođen tako što je u 45 μ l uzorka (seruma ili lizata tkiva) dodavano po 225 μ l trietanolaminskog pufera (TEA) pH 7,8 (rastvor $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u H_2O uz postepeno dodavanje 7,5 M TEA) i kratko mešano, a zatim je dodavano 1125 μ l

hloroforma i snažno mućkano 20 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je u trajanju od 10 minuta vršeno centrifugiranje na 3000 rpm na kliničkoj centrifugi. Uz pomoć vakuuma, u potpunosti je uklanjan gornji plavozeleni sloj proteina, a iz preostalog hlороformskog sloja, prenošeno je po 450 μl uzorka u zasebne epruvete i dodavano je po 45 μl 0,2% DDC. Nakon snažnog mešanja uzorci su inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet boje dobijenog produkta reakcije meren je očitavanjem apsorbance na 463 nm, što je direktno proporcionalno koncentraciji SMK u uzorku.

Koncentracija SMK u uzorcima je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju rastvora palmitinske kiseline poznate koncentracije. Koncentracija ukupnih SMK izražavana je u mmol/l u serumu, odnosno u mmol/mg tkiva u homogenatu tkiva.

3.8. Određivanje nivoa nitrita i nitrata u plazmi pacova

Nivo NO u serumu pacova određivana je indirektno, određivanjem koncentracije nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-) kao krajnjih produkata NO. Merenje je vršeno korišćenjem $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001) prema upustu proizvođača. Određivanje koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ rađeno je u dva koraka: reakcijom nitrat reduktaze i Griess-ovom reakcijom (Hevel i Marletta, 1994). U prvom koraku korišćenjem nitrat reduktaze, NO_3^- se konvertuju u NO_2^- , dok u drugom koraku dodatkom Griess-ovog reagensa dobijeni NO_2^- gradi azo jedinjenje tamno ljubičaste boje sa maximumom apsorpcije na 540 nm. Merenjem apsorbance nastalog azo jedinjenja određivana je koncentracija NO_2^- .

Esej je rađen u mikrotitarskoj polistirenskoj ploči sa 96 bunarića. Nakon nanošenja serije standarda NO_3^- poznate koncentracije i uzoraka seruma u mikrotitar ploču u volumenu od 80 μl , u svaki bunarić pipetirano je po 10 μl kofaktora enzima, a potom po 10 μl nitrat reduktaze. Nakon 3 sata inkubacije na sobnoj temperaturi u svaki bunarić dodavano je 50 μl Griess-ovog reagensa 1, a odmah potom i 50 μl Griess-ovog reagensa 2. Nakon inkubacije od 10 minuta, očitavana je apsorbance na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Perkin Elmer, Wallac 1420 Victor) na 540 nm. Koncentracija NO_3^- je određivana korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju rastvora standarda NO_3^- poznate koncentracije i izražavana je u μmol .

3.9. Izolacija ukupnih proteina jetre pacova

Ukupni proteini jetre pacova su izolovani homogenizovanjem 300-350 mg tkiva jetre u 1,4 ml pufera za izolovanje proteina, na +4 °C, korišćenjem T10 Basic Ultra-Turrax homogenizera (IKA.Werke, Nemačka). Pufer za izolovanje proteina, (pH 7,4) je sadržao 150 mM NaCl (natrijum hlorid), 20 mM Tris (hidroksimetil) aminometan (TRIS), 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1% nejonskog deterdženta Triton X-100, 10% glicerola, koktel inhibitora proteaza (Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack), koktel inhibitora fosfataza (PhosSTOP) i 2 mM Na-ortovanadata, inhibitora tirozinskih proteinskih fosfataza. Nakon homogenizovanja, uzorci su sonifikovani dva puta po 5 sekundi, a zatim su lizirani inkubiranjem na +4 °C uz rotaciju u trajanju od sat vremena. Lizirani uzorci su potom centrifugirani 30 minuta na 18500 rpm na +4 °C. Supernatant je prebacivan u ohlađene epruvete i čuvan na -70 °C do daljih analiza.

3.10. Izolacija proteina plazma membrana iz jetre pacova

Proteini plazma membrana jetre pacova su izolovani prema protokolu Luikena i sar. (Luiken i sar., 2002). Tkiva jetre pacova, količine oko 200 mg, inkubirana su u 1 ml preinkubacionog pufera (pH 7,4) koji je sadržao 2 M NaCl, 20 mM HEPES i 5 mM NaN₃, 30 minuta na +4 °C. Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta na 1000 × g u centrifugi (Beckman, J21), a dobijeni talog je resuspendovan i homogenizovan u 1 ml TES pufera za izolovanje proteina (pH 7,4) koji je sadržao 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoze, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka), uz dodatak 1 mM natrijum-ortovanadata, inhibitora tirozinskih proteinskih fosfataza, pomoću homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax, IKA.Werke, Nemačka). Rezultujući homogenat je centrifugiran 5 minuta na 1000 × g, a nakon toga dobijeni talog je homogenizovan u 1 ml TES pufera. Dobijeni homogenat je spajan sa supernatantom iz prethodnog centrifugiranja i centrifugiran 10 minuta na 100 × g. Supernatanti su pipetirani a potom centrifugirani 10 minuta na 5000 × g. Dobijeni talog u kome se nalazi frakcija proteina plazma membrana je resuspendovan u 300 µl TES pufera i ostavljan na -70 °C.

3.11. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana spektrofotometrijskom metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na merenju apsorpcije svetlosti talasne dužine 750 nm, od strane dva obojena kompleksa: biuretskog, koji se formira između jona bakra i azota peptidnih veza u baznoj sredini i redukovano fosfomolibdenskog i fosfovolframovog kompleksa. Fosfomolibdenska i fosfovolframova so formiraju Folin-Chialteau-ov reagens, koji je u oksidovanom stanju žute boje, a pri redukciji aminokiselinama tirozinom, triptofanom i cisteinom, menja boju u plavo, te je intenzitet boje proporcionalan broju peptidnih veza i koncentraciji redukujućih grupa.

Homogenat jetre (5 μ l) je razblaživan dejonizovanom H₂O u odnosu 1:99 (v/v), a zatim je 25 μ l razblaženja dodatno razblaženo još četiri puta. U epruvete sa 100 μ l razblaženog homogenata dodavano je 100 μ l rastvora 2% natrijum dodecil sulfata (SDS, *engl. Sodium Dodecyl Sulfate*), a nakon mešanja na vorteksu dodavano je po 1 ml 1% rastvora Na-K tartarata u 0,5 % CuSO₄ x 5H₂O, koji je prethodno 25 puta razblažen u 2% rastvoru Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH. Sadržaj epruveta je ponovo mešan na vorteksu, a zatim inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon dodavanja 100 μ l Folin-Chicalteau reagensa (1:2), sadržaj epruveta je ponovo mešan na vorteksu i inkubiran u mraku 20 minuta, posle čega je merena apsorbanca na 750 nm na spektrofotometru (Ultrospec 2000, Pharmacia, Biotech).

Koncentracija proteina je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanca očitanih za seriju rastvora albumina goveđeg seruma (BSA, *engl. Bovine Serum Albumin*) poznatih kocentracija: 10, 25, 50, 75, 100, 200, 400 i 800 mg/ml. Intenzitet dobijene boje je proporcionalan koncentraciji proteina i izražavan je u μ g/ μ l.

3.12. Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u lizatu jetre pacova

Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u membranskoj frakciji proteina jetre pacova rađeno je modifikovanom spektrofotometrijskom metodom (Katz i Epstein, 1967). Princip metode zasniva se na određivanju razlika u količini fosfata (P_i) u uzorcima koji sadrže totalnu inkubacionu smešu bez uabaina (specifičnog inhibitora Na⁺/K⁺-ATPaze) i uzoraka koji sadrže totalnu inkubacionu smešu sa uabainom, što

predstavlja relativnu aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze. Oslobođeni P_i reaguju sa amonijum molibdatom u kiseljoj sredini i formiraju fosfomolibdensku kiselinu. U prisustvu kalaja, nastaje kalaj molibdofosforna kiselina, jedinjenje plave boje, čiji se maksimum apsorpcije očitava na 690 nm (Taras i sar., 1971).

Postupak je izvođen u dva seta epruveta, sa i bez prisustva uabaina. U prvi set je dodavano po 50 μl totalne inkubacione smeše koja je sadržala 200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 400 mM NaCl, 80 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 25 μl uzorka proteina koncentracije 1 mg/ml i 105 μl dejonizovane H_2O . U drugi set epruveta je dodavano 50 μl totalne inkubacione smeše, 25 μl uzorka proteina koncentracije 1 mg/ml, 20 μl 20 mM uabaina i 85 μl dejonizovane H_2O . Reakcija je pokretana inkubacijom uzoraka 15 minuta na +37 °C sa 20 μl 20 mM ATP, a zaustavljena dodavanjem 22 μl 3 M perhlorne kiseline i hlađenjem uzoraka na ledu. Nakon toga dodavano je 200 μl 0,02 M amonijum molibdata u 30% H_2SO_4 i jedne kapi kalaj hlorida rastvorenog u glicerinu. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, očitavane su vrednosti apsorbanca na 690 nm na spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer). Koncentracija fosfata je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanca očitavanih za seriju rastvora natrijum fosfata poznate koncentracije. Relativna aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze izražavana je u mmolPi/min/mg proteina.

3.13. Određivanje aktivnosti Rho proteina u lizatu jetre pacova

Rho proteini pripadaju familiji malih GTP vezujućih proteina koji su aktivne kada vezuju GTP, a neaktivni kada vezuju GDP. Sposobnost aktiviranog Rho da asocira sa Rho-vezujućim domenom (RBD, *engl. Rho-binding domain*) rotekina (mamac protein) omogućava merenje njegove aktivnosti pomoću komercijalnog kita (Active Rho Pull-Down and Detection Kit, Thermofisher Scientific, SAD). Za određivanje aktivnosti Rho inkubirano je 500 μg ukupnih proteina sa 400 μg rotekin-RBD proteina imobilisanom na afinitetnom ligandu (agarozne kuglice) na +4 °C uz rotaciju u trajanju od sat vremena. Sadržaj epruveta je nakon toga centrifugiran 1 minut na 6000 \times g, i supernatant je uklonjen. Nakon ispiranja kompleksa centrifugiranjem, uzorci su pripremljeni za natrijum dodecil sulfat elektroforezu na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, *engl. SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) na gradijentnom gelu: 4% gel

za koncentrovanje i 12% gel za razdvajanje. Membrane su nakon transfera i blokiranja inkubirane sa primarnim Anti-Rho antitelom (1:600) i sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP; *engl. Horseradish peroxidase*) antitelom (1:500). Analizirani proteini u uzorku su vizualizovani i kvantifikovani na način koji je detaljno objašnjen u sledećem poglavlju 3.14.

3.14. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Kao prvi korak u imunoblot proceduri (Western blot) primenjena je diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS, koja omogućava razdvajanje proteinskih frakcija u uzorku na osnovu njihove molekulske mase (Laemmli, 1970).

Da bi se postigla visoka rezolucija u razdvajanju proteinskih frakcija korišćen je sistem gradijentnog gela: 4% gel za koncentrovanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O) i 10% gel za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O) kao i dva različita puferska sistema: pufer za uzorkovanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2-β-mercaptoetanol, 0,1% bromfenol plavo) i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H₂O). Elektroforetska separacija proteinskih frakcija izvedena je u sistemu za vertikalnu elektroforezu, Bio-Rad Mini Protean 3 Cell electrophoresis (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD).

Uzorci su nanošeni u bunariće gela u volumenu od 20 μl (50 μg ukupnih proteina) i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom prvo 15 minuta pri naponu od 100V, a zatim 90 minuta pri naponu od 150V. Na svaki gel su nanošeni i proteini poznatih molekulskih masa (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa)-marker PageRegularTMPrestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Vilnius, Litvanija) kako bi se lokalizovali ispitivani proteini po završetku elektroforeze, prema molekulskoj masi.

3.15. Western blot

Neposredno nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE elektroforezom na gelu, rađena je Western blot analiza za detekciju specifičnih proteina u frakciji plazma

membrane i lizatima jetre pacova. Identifikacija ispitivanih proteina u uzorcima je vršena na osnovu reakcije antigen-antitelo.

Elektrotransfer razdvojenih proteinskih frakcija sa gelova vršen je na poliviniliden fluorid (PVDF, *engl. Polyvinylidene Difluoride*) membranama, tokom sat vremena pri struji intenziteta 350 mA na +4 °C, u sistemu za transfer, Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD). Pufer za transfer proteina sadržao je 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol i H₂O, a efikasnost transfera proteina proveravana je bojenjem membrana sa 0,5% rastvorom PonsoS tokom jednog minuta. Po vizuelizaciji proteinskih traka, membrane su ispirane destilovanom H₂O i TBS-T puferom (0,05% Tween 20 u TBS puferu (*engl. Tris-Buffered Saline*)), a zatim inkubirane tokom sat vremena na sobnoj temperaturi, u puferu za blokiranje (5% BSA/TBS-T) kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za PVDF membranu.

Nakon blokiranja, membrane su ispirane TBS-T puferom, a potom inkubirane preko noći na +4 °C sa primarnim antitelima određene specifičnosti, razblaživanim do odgovarajućih koncentracija u 5% BSA/TBS-T. Membrane su inkubirane sa sledećim primarnim antitelima: zečjim anti-fosfo-Akt Ser⁴⁷³, anti-fosfo-Akt Thr³⁰⁸ i anti-Akt, zečjim anti-fosfo-AMPK α Thr¹⁷² i anti- AMPK α , zečjim anti-fosfo-ERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i anti-ERK1/2, zečjim anti-IRS-1, zečjim anti-fosfo-mTOR Ser²⁴⁴⁸ i anti-mTOR, zečjim anti-fosfo-PDK1 Ser²⁴¹ i anti-PDK1, zečjim anti-ROCK2, zečjim anti-ROCK1, zečjim anti-PI3K-p110 (Cell Signaling, Beverly, MA, SAD), zečjim anti-iNOS/ NOS tip II, zečjim anti-NF κ B-p65, zečjim anti-FAT/CD36, zečjim anti-GLUT2, zečjim anti-ER α , zečjim anti-ER β , zečjim anti-RhoA (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD), zečjim anti- α_1 Na⁺/K⁺-ATPaza, zečjim anti-PI3K-p85 (Abcam, Cambridge, UK) antitelima, kao i mišjim anti-aktin antitelima (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD).

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 5 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom, a zatim inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom (ALP, *engl. Alkaline Phosphatase*): kozjim anti-zečjim IgG-ALP i kozjim anti-mišjim IgG-ALP, ili sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP, *engl. Horseradish peroxidase*): kozjim anti-zečjim IgG-HRP i kozjim anti-mišjim IgG-HRP antitelima (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD).

Sekundarno antitelo razblaživano je do odgovarajuće koncentracije u 5% nemasnom mleku ili BSA u TBS-T puferu, a potom su membrane ispirane 3 puta po 5 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom.

Analizirani proteini u uzorku su vizualizovani na autoradiografskom filmu pomoću metode u kojoj se koristi supstrat za peroksidazu rena, ECL (*engl. Enhanced Chemiluminescence*, Amersham Biotech, Pittsburgh, PA, SAD) i koja se zasniva na brzom i osetljivoj reakciji luminiscencije. U prisustvu H_2O_2 , peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola. Nastali intermedijarni produkt prelazi u stabilnu formu uz emisiju svetlosti koja osvetljava film. Detekcija se vrši u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Membrana je postavljena između dve providne folije u kaseti za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD), a preko membrane je stavljan film. Ekspozicija filma je trajala nekoliko sekundi do nekoliko minuta (zavisno od intenziteta dobijenog signala). Otisci dobijeni na filmu odgovaraju proteinima, koji se nalaze na membrani i za koje su vezana odgovarajuća primarna i sekundarna antitela sa peroksidazom rena.

Ukoliko su sekundarna antitela bila konjugovana sa ALP, na membrane je dodavan supstrat za delovanje ALP - BCIP/NBT (BCIP/NBT, *engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Chloride*; sc-2498, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD). Membrane su inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, do razvijanja boje. Pufer u kome su membrane inkubirane sadržao je 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M $MgCl_2$ u koji je dodavano 200 μ l reagensa BCIB/NBT. Nakon pojavljivanja signala na membranama, u vidu plavo-ljubičastih traka koje odgovaraju analiziranim proteinima, membrane su ispirane vodom, sušene, a potom je intenzitet signala kvantifikovan.

Intenzitet signala, odnosno nivo ispitivanog proteina, određivan je denzitometrijski i u odnosu na β -aktin koji je konstitutivno eksprimirani protein. Membrane su skenirane, a optička gustina detektovanih proteinskih traka kvantifikovana je pomoću računarskog program Image J 1.37 V. Software (<http://rsb.info.nih.gov>). Prosečan broj piksela po otisku dobijenog signala kontrolnih životinja definisan je kao jedna arbitrarna jedinica (AJ)/ μ g proteina, a vrednosti dobijene za gojazne životinje su poređene sa kontrolom i takođe izražavane u AJ/ μ g proteina.

3.16. Koimunoprecipitacija

Koimunoprecipitacija je metoda detekcije i prečišćavanja proteina korišćenjem nerastvorne smole (agaroza ili sefaroza) za koju je vezan protein A ili G, koji „hvata“ i precipitira imunokomplekse nastale inkubacijom uzorka sa specifičnim antitelom. Koimunoprecipitacija omogućava detekciju protein-protein interakcija, indirektnim „hvatanjem“ proteina koji su u kompleksu sa specifičnim ciljnim proteinom. Korišćenjem specifičnog antitela se prečisti ciljni protein koji sa sobom „ponese“ i sve proteine sa kojima je u kompleksu, zatim se ovi imunokompleksi elektroforetski razdvoje i elektrotransferom prenesu na membranu, gde se dalje detektuju drugi proteini iz kompleksa klasičnom Western blot metodom.

Lizati jetre su inkubirani preko noći sa 1 μ g zečjeg anti-IRS-1 antitela. Imunokompleksi su apsorbovani sa protein A Sefarozom 2 sata na +4 °C, centrifugirani, ispirani i razdvajani na SDS-PAGE gelu, a zatim prenošeni na PVDF membranu. Membrane su inkubirane sa zečijim anti-p85 antitelom. Za detekciju su korišćena sekundarna anti-zečja IgG-ALP antitela (razblaženje 1:2000 u TBS-T puferu) i BCIP/NBT supstrat.

3.17. Određivanje relativne ekspresije gena

3.17.1. Izolacija ukupne RNK iz jetre pacova

Izolacija ukupne RNK iz ćelija jetre pacova urađena je upotrebom trizol reagensa. Trizol je jednofazni rastvor fenola i guanidin izotiocianata kojim se solubilizuje biološki materijal i denaturišu proteini. Tkivo jetre pacova je homogenizovano ručnim homogenizerom u mililitru Trizola (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija). Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 10 minuta, na 15000 rpm na +4 °C. Faza razdvajanja započinjana je dodavanjem hloroforma u supernatant (1/5 volumena Trizola, odnosno 200 μ l, -20 °C) nakon mešanja i inkubacije 15 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani 15 minuta na 15000 rpm i na 4 °C. Iz tuba je sakupljan gornji trizolski sloj i dodavanjem rashlađenog 500 μ l izopropil alkohola, na -20 °C, vršena je precipitacija RNK. Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirani 8 minuta na 15000 rpm i +4 °C. Talog iz tuba je ispiran dva puta sa po mililitar 75% etanola, potom sušen 5 minuta na sobnoj temperaturi. Rastvaranje taloga vršeno je u

H₂O sa dietilpirokarbonatom (DEPC). Koncentracija i prečišćenost RNK određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260/280 nm, na aparatu Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, SAD). Analiza degradiranosti izolovane RNK vršena je 1,2% agaroznom nedenaturišućom elektroforezom.

3.17.2. Prepis RNK u cDNK - reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT reakcija) predstavlja proces u kome se jednolančana RNK prepisuje u komplementarnu DNK (cDNA, *engl. Complementary DNA*), uz pomoć kita za sintezu cDNK, prema uputstvu proizvođača: RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, SAD).

3.17.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qRT-PCR)

Metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (PCR, *engl. Polymerase Chain Reaction*) u realnom vremenu (qRT-PCR, *engl. Quantitative Real Time-PCR*) kvantifikovana je ekspresija gena za iNOS i α_1 subjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze.

qRT-PCR je standardna metoda za identifikaciju, amplifikaciju i kvantifikaciju ciljnih nukleinskih kiselina. U osnovi metode je ciklična replikacija molekula DNK, kao i ciklične promene temperature, odnosno naizmenično zagrevanje i hlađenje inkubacione smeše u prisustvu fluorofora koje omogućuju kvantifikaciju svake pojedinačne amplifikacije. qRT-PCR reakcija započinje denaturacijom DNK, nakon čega sledi hibridizacija prajmera. U trećoj fazi Taq DNK polimeraza, uz prisustvo slobodnih dezoksinukleozid-trifosfata (dNTP) i jona Mg²⁺ pravi kopije željene sekvence. Tokom procesa amplifikacije razlikuju se dve faze, eksponencijalna faza, u kojoj se količina PCR produkta eksponencijalno povećava u svakom ciklusu, i ne-eksponencijalna plato faza. Tokom PCR reakcije nivo detektovane fluorescencije odgovara količini ciljnog produkta.

C_T (*engl. Threshold Cycle*) je broj ciklusa nakon kojeg vrednosti fluorescentnog signala reakcije pređu prag. C_T se koristi za izračunavanje inicijalnog broja kopija DNK, zato što su C_T vrednosti inverzno proporcionalne polaznoj količini kopija sekvenci od interesa. Kako se ciklusi odvijaju reakcija se usporava, zbog trošenja komponenti reakcione smeše i proces ulazi u plato fazu (28-40 ciklusa). Za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije vrednosti se normalizuju na nivo ekspresije endogenih

kontrola kao što je β -aktin. Interne/endogene kontrole pripadaju *housekeeping* genima i u odnosu na ukupnu RNK su konstantne i procentualno najzastupljenije. Odnos normalizovane vrednosti ciljne sekvence i vrednosti normalizovanog kalibratora daju vrednosti za relativnu ekspresiju gena (Pfaffl, 2001). Konačan rezultat, relativna ekspresija ciljnih gena za iNOS i α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze, izražavan je u relativnim jedinicama.

Reakcija qRT-PCR je izvođena u Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemu (Thermofisher Scientific, SAD) u 96-komornim pločama (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, SAD). Po komori, volumen od 20 μl reakcione smeše sadržao je uzorak, razblažen u odnosu 1:10 u dejonizovanoj H_2O , reakcionu mešavinu Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mixes with low ROX (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) i parove prajmera („forward“ i „reverse“) za iNOS (Metabion, Martinsried, Nemačka), α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze (Invitrogen, Thermofisher Scientific, SAD) ili za β -aktin (Sigma Aldrich Corporation, SAD). Finalne koncentracije prajmera „forward“ (5'→3') i „reverse“ (3'→5') bile su: 450 nM za iNOS, 500 nM za Na^+/K^+ -ATPazu i 150 nM za β -aktin. Ploča je prelepljivana optičkim adhezivnim filmom (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD) i centrifugirana minut na $3000 \times g$, a zatim smeštana u qRT-PCR aparat. Temperaturni profil reakcije u qRT-PCR aparatu bio je: 4 minuta na $+95 \text{ }^\circ\text{C}$, zatim 40 ciklusa u trajanju od po 15 sekundi na $+95 \text{ }^\circ\text{C}$ i po minut na $+62 \text{ }^\circ\text{C}$. Zatim su podešavani uslovi za izvođenje krive topljenja PCR produkta, u cilju određivanja specifičnosti i identiteta PCR produkta: 15 sekundi na $+95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 sekundi na $+60 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 minuta temperaturnog rasta (δ), te 15 sekundi na $+95 \text{ }^\circ\text{C}$. Esej je rađen u duplikatu.

3.18. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata

Rezultati u okviru ove doktorske disertacije su prikazivani kao aritmetička srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Značajnost razlika ispitivanih parametara između svih grupa životinja određivana je pomoću Student-ovog *t*-testa primenom Excel PC programa. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05 ($p < 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Regulacija metabolizma glukoze i lipida u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola

Jedan od postavljenih ciljeva u okviru ove doktorske disertacije bio je izučavanje polnih razlika u masi tela i jetre, kao i metabolizmu glukoze i SMK u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Prikazani su rezultati eksperimenata u kojima su određivani nivo glukoze i SMK i ekspresija njihovih transportera GLUT2 i FAT/CD36 u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.

4.1.1. Mase tela i metabolički parametri u plazmi i serumu pacova

U **Tabeli 1.** su sumirani rezultati merenja mase tela kontrolnih i životinja koje su bile na HF ishrani, i to na početku eksperimenta (inicijalna masa tela) i pred samo žrtvovanje (finalna masa tela), kao i dobijena razlika između finalnih i inicijalnih masa tela. Takođe, **Tabela 1.** prikazuje rezultate merenja koncentracije insulina, glukoze, holesterola, indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) i indeksa sekrecije β -ćelija pankreasa (HOMA- β) u serumu, kao i koncentracije SMK u plazmi kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.

Eksperimentalne grupe	KŽ	HFŽ	M	HM
Inicijalna masa tela [g]	202 ± 8	190 ± 8	200 ± 3	198 ± 3
Finalna masa tela [g]	260 ± 12	275 ± 12	371 ± 12	396 ± 12
Razlika finalne i inicijalne mase tela [g]	58 ± 6	85 ± 8*	171 ± 10	198 ± 10*
Insulin [mIU/l]	79 ± 19	85 ± 8	70 ± 4	165 ± 28*
Glukoza [mM]	11,6 ± 0,5	10,2 ± 0,4*	9,5 ± 0,3	10,7 ± 0,4*
HOMA-β	209 ± 48	281 ± 22	235 ± 25	435 ± 62*
HOMA-IR	34 ± 10	36 ± 4	30 ± 1	82 ± 15*
Holesterol [mM]	2,07 ± 0,11	1,77 ± 0,09	1,49 ± 0,08	1,72 ± 0,04*
SMK [mM]	0,70 ± 0,08	0,81 ± 0,11	0,54 ± 0,04	1,47 ± 0,08***

Tabela 1. Mase tela i metabolički parametri u plazmi i serumu kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Masa tela – razlika finalne i inicijalne mase tela. HOMA-IR – indeks rezistencije na insulin; HOMA-β – indeks sekrecije insulina. Rezultati dobijeni za HOMA-IR i HOMA-β su dobijeni korišćenjem formula datih u poglavlju Materijal i metode. Mase tela su izražene u g. Koncentracija insulina u serumu pacova je izražena u mIU/l. Koncentracije glukoze i holesterola u serumu, i koncentracija SMK u plazmi, izražene su u mM. Vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n = 4-7); (*p<0,05; ***p<0,001) (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015).

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 1.** uočava se da je HF ishrana dovela do povećanja telesne mase pacova oba pola (*p < 0,05). Međutim, koncentracija glukoze u serumu je smanjena u grupi gojaznih ženki, a povećana u grupi gojaznih mužjaka pacova (*p < 0,05). Koncentracije insulina i holesterola u serumu gojaznih mužjaka su povećane, dok su u serumu gojaznih ženki nepromenjene. Rezultati merenja koncentracije SMK u plazmi, kao i HOMA-IR i HOMA-β indeksa, pokazuju da nema promene nabrojanih parametara između gojaznih i kontrolnih ženki pacova, dok su ovi

parametri povećani u grupi gojaznih mužjaka u odnosu na kontrolne pacove (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015).

4.1.2. Masa jetre, koncentracija glukoze, holesterola i SMK u lizatu jetre pacova

U **Tabeli 2.** su prikazani rezultati merenja morfoloških i metaboličkih parametara jetre.

Eksperimentalna grupa	KŽ	HFŽ	KM	HFM
Masa jetre [g]	10,6 ± 0,1	10,3 ± 0,09	11,4 ± 0,2	14 ± 0,2**
Jetra / telo odnos	0,0405 ± 0,0007	0,0407 ± 0,0013	0,0321 ± 0,001	0,0352 ± 0,0001*
Glukoza [mM/mg tkiva]	12,66 ± 0,8	21,12 ± 1,5**	10,86 ± 0,3	19,74 ± 1,3**
Holesterol [mM/mg tkiva]	1,60 ± 0,10	2,58 ± 0,13***	1,54 ± 0,09	1,96 ± 0,14*
SMK [mM/mg tkiva]	0,43 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,38 ± 0,03*

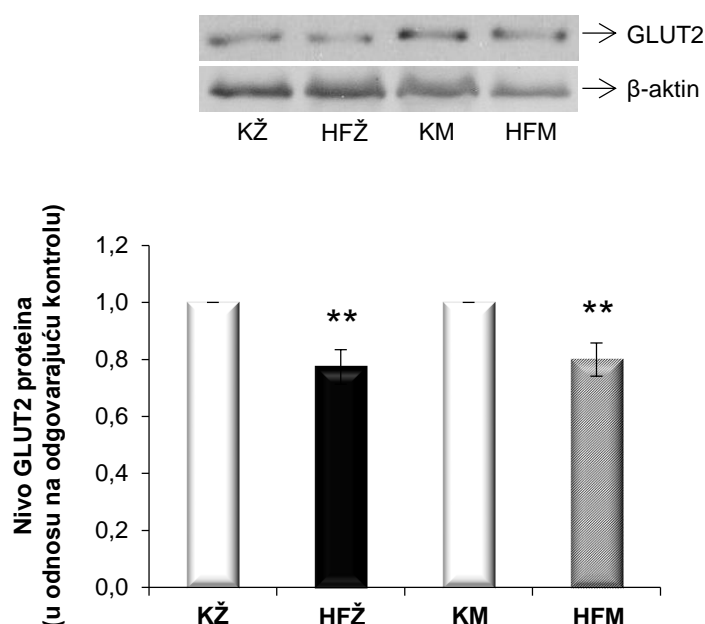
Tabela 2. Mase jetre, koncentracije glukoze, holesterola i SMK u lizatu jetre kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Mase jetre su izražene u g. Koncentracije glukoze, holesterola i SMK u lizatu jetre izražene su u mM/mg tkiva. Vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n = 3-6); (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Tabeli 2. pokazuje da je samo u grupi gojaznih mužjaka došlo do povećanja mase jetre u odnosu na kontrolne (**p < 0,01), dok se kod gojaznih ženki masa jetre nije menjala. Takođe, uočena je razlika (*p < 0,05) u odnosu mase jetre i mase tela samo kod gojaznih mužjaka pacova u poređenju sa kontrolnim. HF ishrana dovela je do povećanja koncentracija glukoze u lizatu jetre gojaznih pacova oba pola (**p < 0,01) u poređenju sa kontrolnim pacovima. Merenjem koncentracije holesterola u lizatu jetre pacova, pokazano je da su njegove vrednosti povećane za 61% kod gojaznih u odnosu na kontrolne ženke (***p < 0,001). Takođe je i koncentracija holesterola u lizatu jetre bila povećana kod oba pola (*p < 0,05), ali je to povećanje bilo značajnije kod ženki. U

grupi gojaznih mužjaka uočeno je povećanje (* $p < 0,05$) koncentracije SMK u poređenju sa koncentracijom SMK u lizatu jetre kontrolnih mužjaka, dok kod ženki pacova nisu uočene promene.

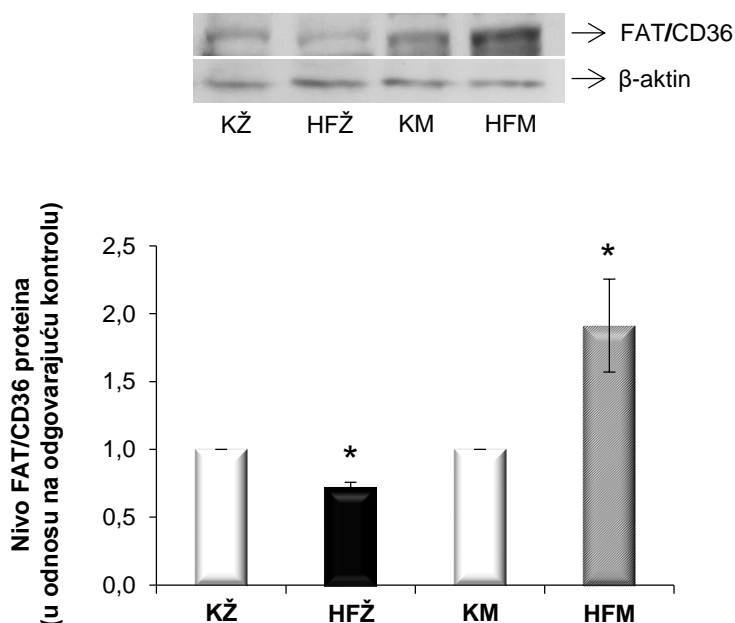
4.1.3. Nivo GLUT2 i FAT/CD36 proteina u jetri pacova

U daljim eksperimentima analiziran je uticaj HF ishrane na nivo transportera glukoze i SMK u frakciji proteina plazma membrane, u jetri pacova oba pola. Rezultati Western blot analize prikazani na **Slici 1.** pokazuju da je nivo GLUT2 proteina smanjen u grupi gojaznih mužjaka (** $p < 0,01$) i gojaznih ženki (** $p < 0,01$) u odnosu na njihove kontrole (KŽ = 1; HFŽ = $0,77 \pm 0,06$; KM = 1; HFM = $0,80 \pm 0,06$).



Slika 1. Nivo GLUT2 proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za GLUT2 protein. Rezultati dobijeni za nivo GLUT2 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 4-5); (** $p < 0,01$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

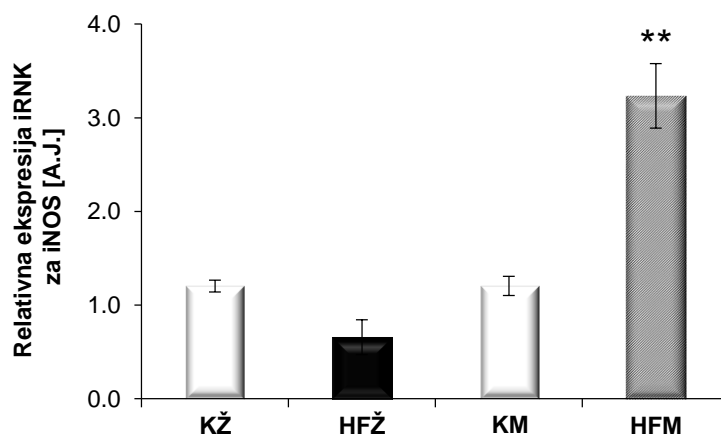
Nivo FAT/CD36 proteina (**Slika 2**) je smanjen (* $p < 0,05$) u membranskim frakcijama ćelija jetre gojaznih ženki (KŽ = 1; HFŽ = $0,72 \pm 0,03$), dok je kod gojaznih mužjaka povećan (* $p < 0,05$) u odnosu na njihove kontrole (KM = 1; HFM = $1,91 \pm 0,34$).



Slika 2. Nivo FAT/CD36 proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za FAT/CD36 protein. Rezultati dobijeni za nivo FAT/CD36 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 3-4); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

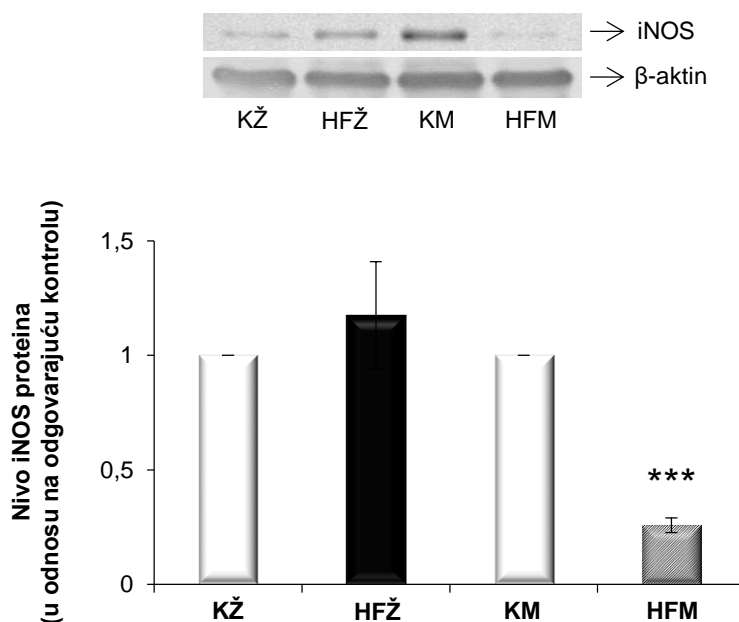
4.2. Ekspresija gena za iNOS i nivo proteina u jetri i koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi gojaznih pacova oba pola

Izučavanja sinteze NO su pokazala da postoje značajne polne razlike u brojnim organima, uključujući i jetru (Ding i sar., 1997; Hassouna i sar., 2014). Da bi se ustanovilo postojanje polnih razlika u ekspresiji iNOS i sintezi NO, u daljim eksperimentima merena je relativna ekspresija gena za iNOS i nivo proteina u jetri, kao i koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.



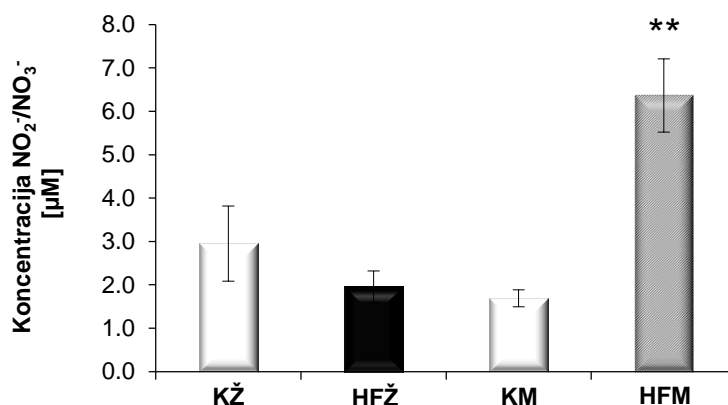
Slika 3. Nivo iRNK za iNOS u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Relativna ekspresija gena za iNOS dobijeni primenom qRT-PCR metode, rezultati su izraženi kao relativna količina iRNK, kao A.J. i predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 5-7$); (** $p < 0,01$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

Relativna ekspresija gena za iNOS je povećana (** $p < 0,01$) samo kod gojaznih mužjaka u odnosu na kontrolne (KM = $1,20 \pm 0,10$; HFM = $3,23 \pm 0,34$) (**Slika 3**). Međutim, nivo iNOS proteina je nepromenjen u jetri gojaznih ženki u odnosu na kontrolne, ali je smanjen (** $p < 0,001$) u jetri gojaznih mužjaka u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne mužjake (KM = 1; HFM = $0,26 \pm 0,03$; **Slika 4**).



Slika 4. Nivo iNOS proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za iNOS protein. Rezultati dobijeni za nivo iNOS proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 5$); (** $p < 0,001$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

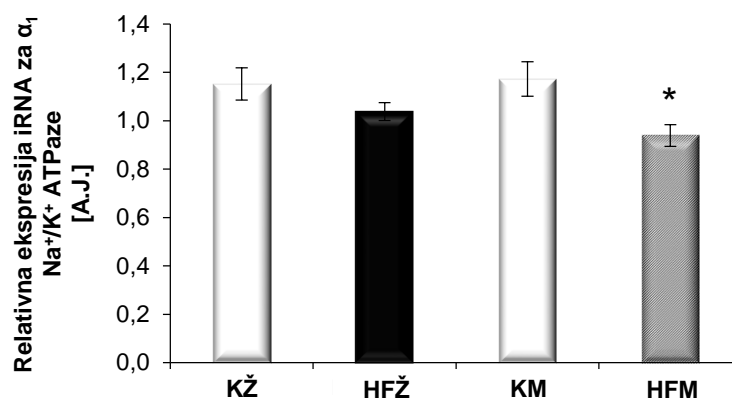
Na **Slici 5.** prikazani su rezultati merenja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, kao krajnjih produkata NO, u plazmi kontrolnih i gojaznih ženki i mužjaka pacova. Rezultati pokazuju da je HF ishrana dovela do povećanja (** $p < 0,01$) koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ samo u plazmi gojaznih mužjaka (KM = $1,69 \pm 0,19$; HFM = $6,36 \pm 0,84 \mu\text{M}$).



Slika 5. Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi izražena je u μM i predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 4-5$); (** $p < 0,01$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

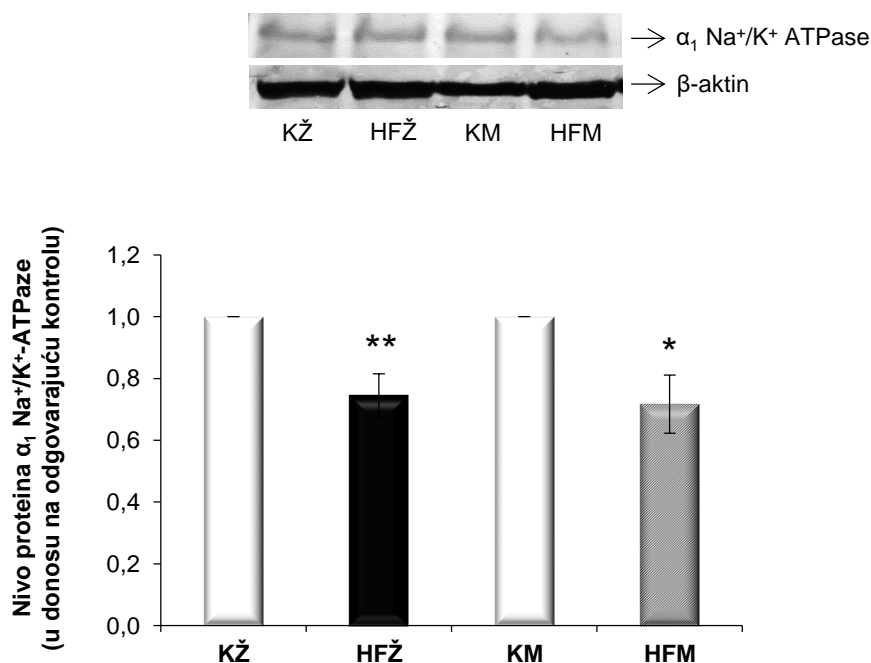
4.3. Ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola

Ranije studije su pokazale da gojaznost negativno utiče na aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i da postoje polne razlike u njenoj regulaciji (Bray i Yukimura, 1978; Iannello i sar., 1994; Palacios i sar., 2004). U daljim eksperimentima izučavane su polne razlike u ekspresiji gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova oba pola.

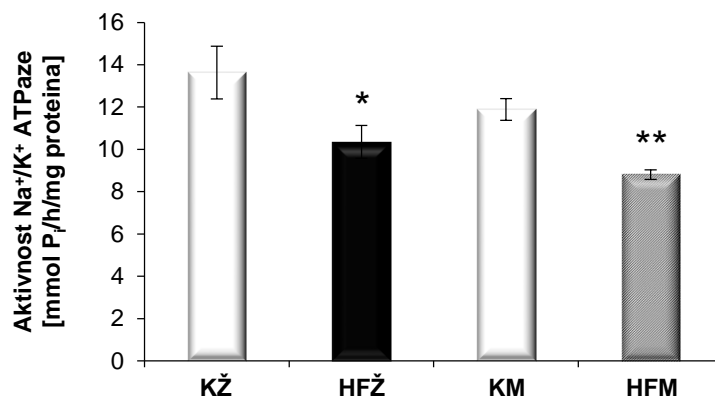


Slika 6. Nivo iRNK za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Relativna ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze dobijeni primenom qRT-PCR metode, rezultati su izraženi preko relativne količine iRNK, kao A.J. i predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 5-6); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

Naši prethodni rezultati, kao i rezultati drugih autora pokazuju da je nivo katalitičke α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze smanjena u gojaznosti (Iannello i sar., 2007; Obradovic i sar., 2015). Stoga su u daljem radu ispitivane polne razlike u nivou iRNK za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze, kao i nivo proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova. Rezultati prikazani na **Slici 6.** pokazuju da je relativna ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze smanjena za 47% (* $p < 0,05$) u jetri gojaznih mužjaka (KM = $1,17 \pm 0,07$; HFM = $0,94 \pm 0,04$), dok se ne menja u grupi gojaznih ženki u odnosu na odgovarajuće kontrole. Međutim, nivo proteina α_1 subjedinice smanjen je kod gojaznih pacova oba pola u poređenju sa njihovim kontrolama (KŽ = 1; HFŽ = $0,74 \pm 0,07$; ** $p < 0,01$; KM = 1; HFM = $0,72 \pm 0,09$; * $p < 0,05$; **Slika 7**), kao i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze (**Slika 8**). Rezultati prikazani na **Slici 8.** pokazuju da je aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze smanjena za 24% u jetri gojaznih ženki (* $p < 0,05$), a za 26% u jetri gojaznih mužjaka (** $p < 0,01$), u poređenju sa izmerenom aktivnošću kontrolnih životinja (KŽ = $13,63 \pm 1,25$; HFŽ = $10,35 \pm 0,78$ mmol $\text{P}_i/\text{h}/\text{mg}$ proteina; KM = $11,89 \pm 0,52$; HFM = $8,81 \pm 0,22$ mmol $\text{P}_i/\text{h}/\text{mg}$ proteina).



Slika 7. Nivo proteina α_1 subjedinice Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za α_1 subjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze. Rezultati dobijeni za nivo proteina α_1 Na⁺/K⁺-ATPaze predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 5-6); (*p<0,05; **p<0,01 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).



Slika 8. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze izražena je u mmol P_i/h/mg proteina i rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 6-8); (*p<0,05; **p<0,01 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

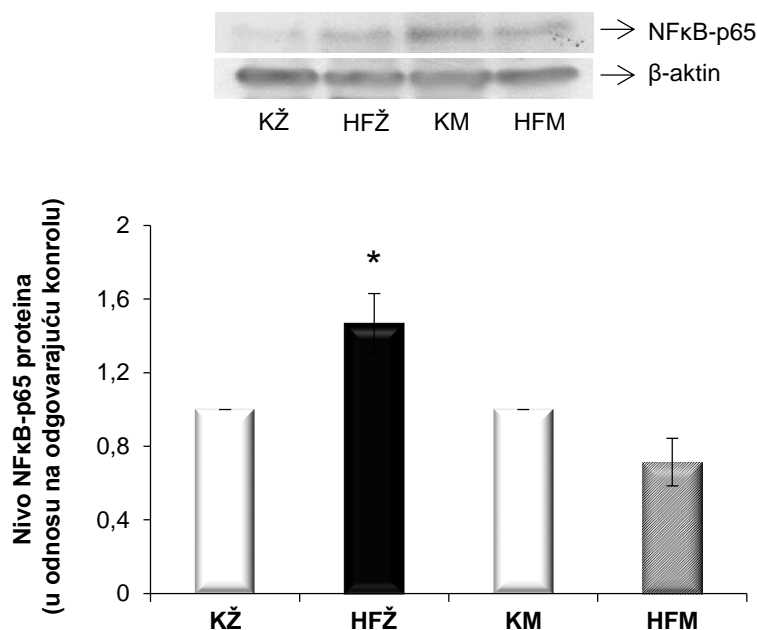
4.4. Signalni molekuli uključeni u regulaciju iNOS i Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola

Dosadašnja istraživanja su pokazala da su NF κ B, IRS-1, PI3K, Akt, RhoA, ROCK, AMPK α i ERK1/2 molekuli uključeni u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS

i Na^+/K^+ -ATPaze u KVS (Simoncini i sar., 2000; Dos Santos i sar., 2002; Lecuona i sar., 2006; Dan i sar., 2008; Gayard i sar., 2011). Međutim, malo je literaturnih podataka o polnim razlikama u regulaciji ekspresije i aktivnosti ovih molekula u jetri u fiziološkim i patofiziološkim stanjima, kao što su gojaznost i IR. Stoga su primenom Western blot metode i eseja za aktivnost proteina ispitivane polne razlike u nivou proteina gore pomenutih signalnih molekula u jetri kontrolnih i gojaznih pacova.

4.4.1. Nivo subjedinice p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri pacova

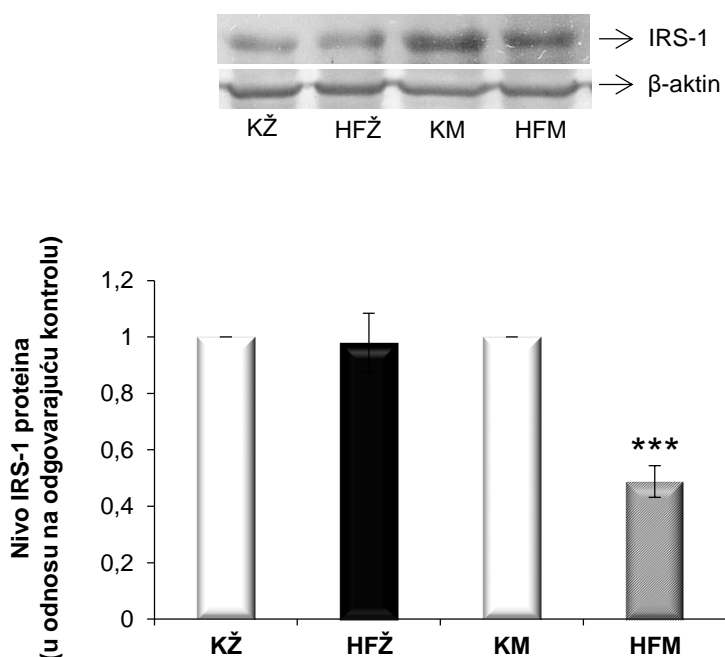
Polazeći od toga da je za regulaciju transkripcije gena za iNOS neophodna aktivacija transkripcionog faktora NFκB (Adams i sar., 2002), u daljem radu su analizirane polne razlike u nivou proteina p65 subjedinice NFκB u jetri pacova. Rezultati Western blot analize prikazani na **Slici 9**. pokazuju da je nivo p65 subjedinice NFκB povećan (* $p < 0,05$) samo u jetri gojaznih ženki u poređenju sa kontrolnim (KŽ = 1; HFŽ = $1,47 \pm 0,16$).



Slika 9. Nivo subjedinice p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za NFκB-p65 protein. Rezultati dobijeni za nivo NFκB-p65 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 3-4$); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

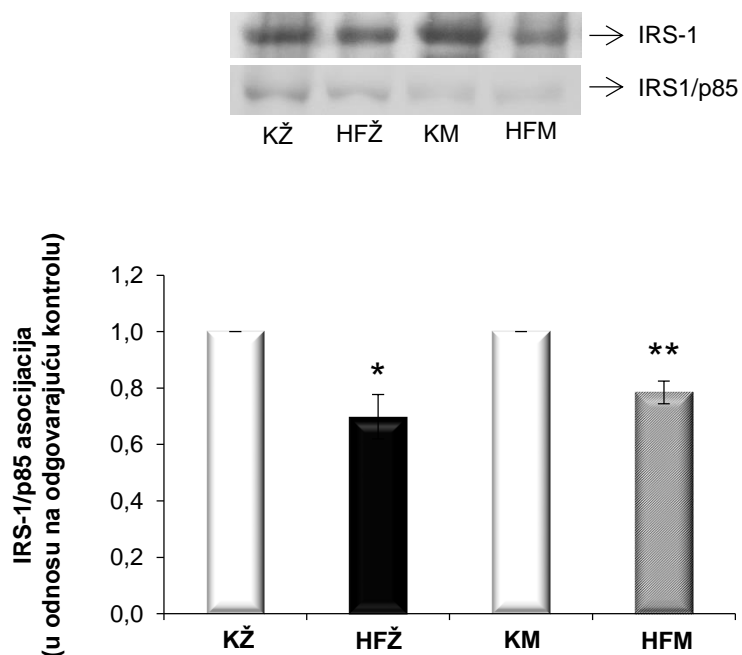
4.4.2. Nivo IRS-1 proteina i njegova asocijacija sa regulatornom subjedinicom p85 PI3K u jetri pacova

U narednim eksperimentima smo ispitivali nivo IRS-1 proteina, kao i asocijaciju IRS-1 i p85 subjedinice PI3K u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Rezultati pokazuju da je nivo IRS-1 proteina (**Slika 10.**) nepromenjen u jetri gojaznih ženki, ali je smanjen (***p* < 0,001) u jetri gojaznih mužjaka u odnosu na odgovarajuće kontrole (KM = 1; HFM = 0,49 ± 0,06).



Slika 10. Nivo IRS-1 proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za IRS-1 protein. Rezultati dobijeni za nivo IRS-1 proteina predstavljaju srednju vrednost ± SEM (n = 5); (***p* < 0,001 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

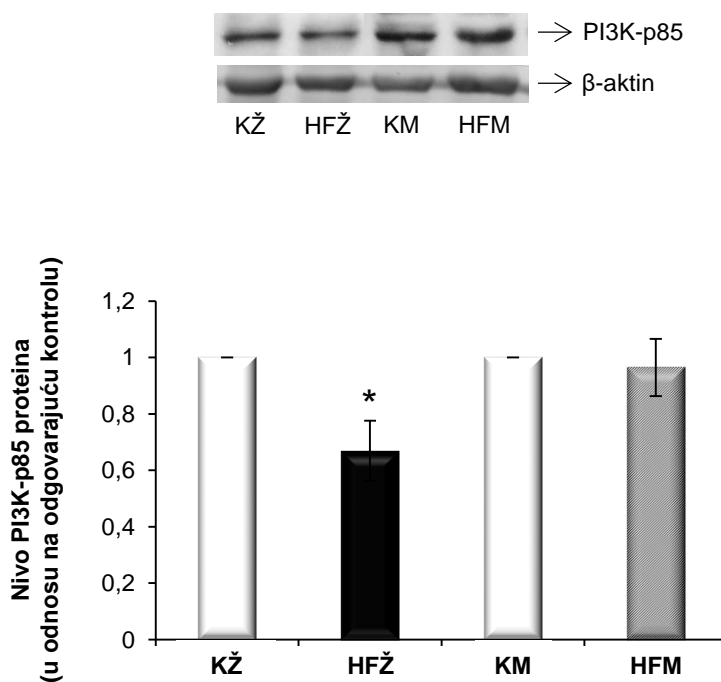
Izučavanjem aktivacije IRS-1 pokazano je smanjenje asocijacije IRS-1 i PI3K-p85 proteina (**Slika 11**) u jetri gojaznih ženki (KŽ = 1; HFŽ = 0,70 ± 0,08; **p* < 0,05) i mužjaka (KM = 1; HFM = 0,78 ± 0,04; ***p* < 0,01) u odnosu na vrednosti izmerene u jetri kontrolnih životinja.



Slika 11. Asocijacija IRS-1 proteina i PI3K-p85 u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za IRS-1/p85 koimunoprecipitaciju. Rezultati dobijeni za IRS-1/p85 koimunoprecipitaciju predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 3$); (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

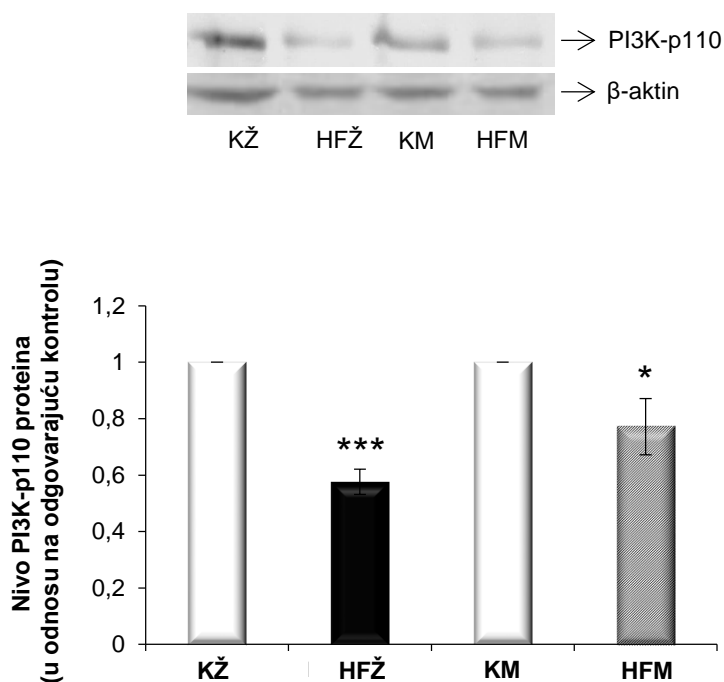
4.4.3. Nivo proteina subjedinica PI3K – p85 i p110 u jetri pacova

Jedna od značajnijih kinaza u signalnom putu insulina je molekul PI3K, te je u daljem radu praćen nivo regulatorne p85 i katalitičke p110 subjedinica PI3K u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Na **Slici 12.** prikazani su rezultati ekspresije proteina p85 koji pokazuju smanjenje (* $p < 0,05$) u jetri gojaznih ženki u odnosu na kontrolne (KŽ = 1; HFŽ = $0,67 \pm 0,11$), dok kod mužjaka nije došlo do promene.



Slika 12. Nivo proteina PI3K-p85 u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za PI3K-p85 protein. Rezultati dobijeni za nivo PI3K-p85 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 4$); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

Na **Slici 13.** su prikazani rezultati merenja nivoa PI3K-p110 koji pokazuju da je nivo ovog proteina smanjen kod gojaznih ženki (** $p < 0,001$) i mužjaka (* $p < 0,05$) u odnosu na odgovarajuće kontrole (KŽ = 1; HFŽ = $0,58 \pm 0,04$; KM = 1; HFM = $0,77 \pm 0,10$).

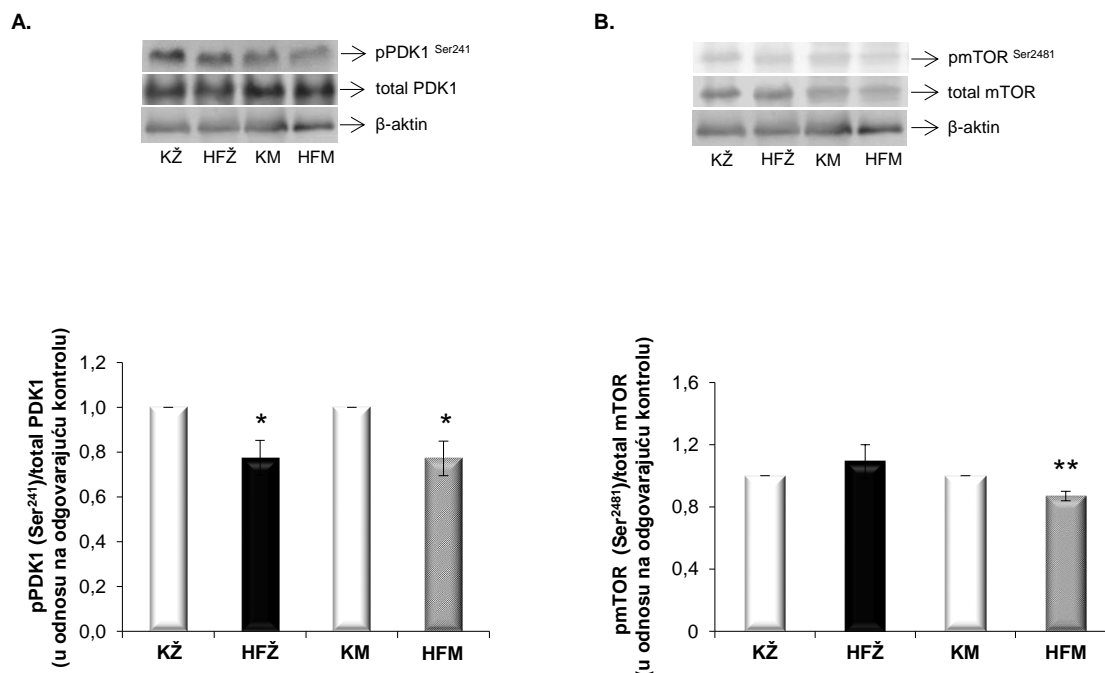


Slika 13. Nivo proteina PI3K-p110 u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za PI3K-p110 protein. Rezultati dobijeni za nivo PI3K-p110 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 5-6); (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

4.4.4. Fosforilacija i nivo proteina PDK1, mTOR i Akt u jetri pacova

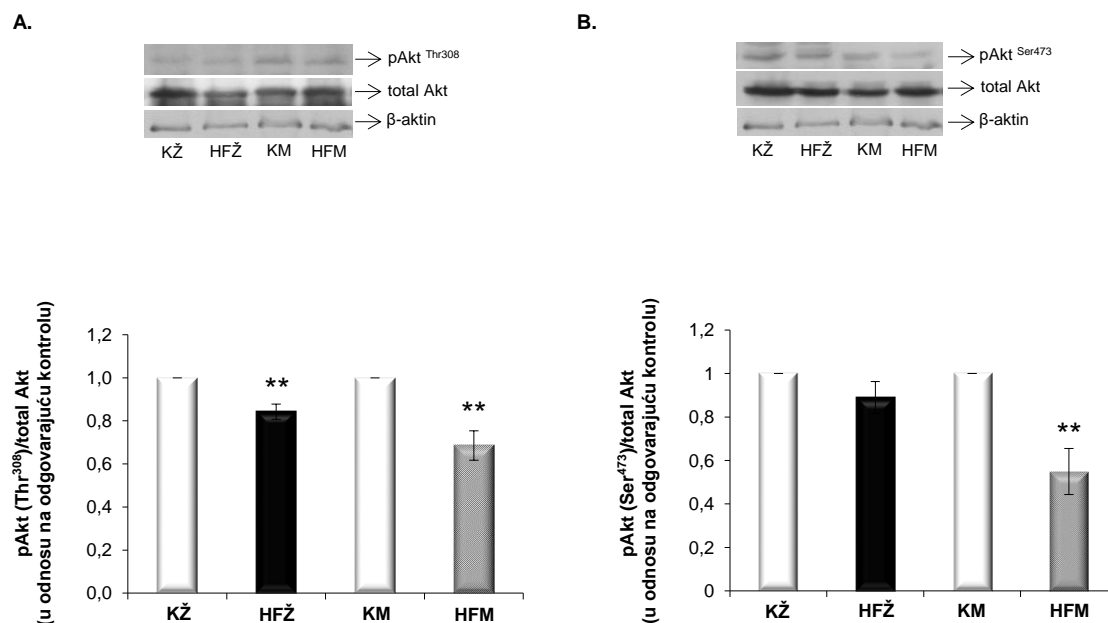
Aktivacija Akt proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola analizirana je određivanjem nivoa fosforilacije Akt na aminokiselinama Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³, koje su posredovane aktivacijom ushodnih kinaza mTOR i PDK1.

Rezultati pokazuju smanjenje nivoa fosforilacije proteina PDK1 na aminokiselini Ser²⁴¹ (KM = 1; HFM = $0,77 \pm 0,08$; * $p < 0,05$; **Slika 14. B**) i mTOR na aminokiselini Ser²⁴⁸¹ (KM = 1; HFM = $0,87 \pm 0,03$; ** $p < 0,01$; **Slika 14. A**) u jetri gojaznih mužjaka u poređenju sa kontrolnim, dok je u jetri gojaznih ženki uočeno samo smanjenje nivoa fosforilacije PDK1 proteina na aminokiselini Ser²⁴¹ (KŽ = 1; HFŽ = $0,77 \pm 0,08$; * $p < 0,05$; **Slika 14. B**), bez promena nivoa fosforilacije mTOR na aminokiselini Ser²⁴⁸¹ (**Slika 14. A**).



Slika 14. Nivo fosforilacije PDK1 i mTOR proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. A. Reprezentativni Western blot za fosforilaciju PDK1 na Ser²⁴¹. Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme PDK1 na Ser²⁴¹ i ukupne forme PDK1 predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 4); (*p < 0,05 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole). B. Reprezentativni Western blot za fosforilaciju mTOR na Ser²⁴⁸¹. Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme mTOR na Ser²⁴⁸¹ i ukupne forme mTOR predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 5-6); (**p < 0,01 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

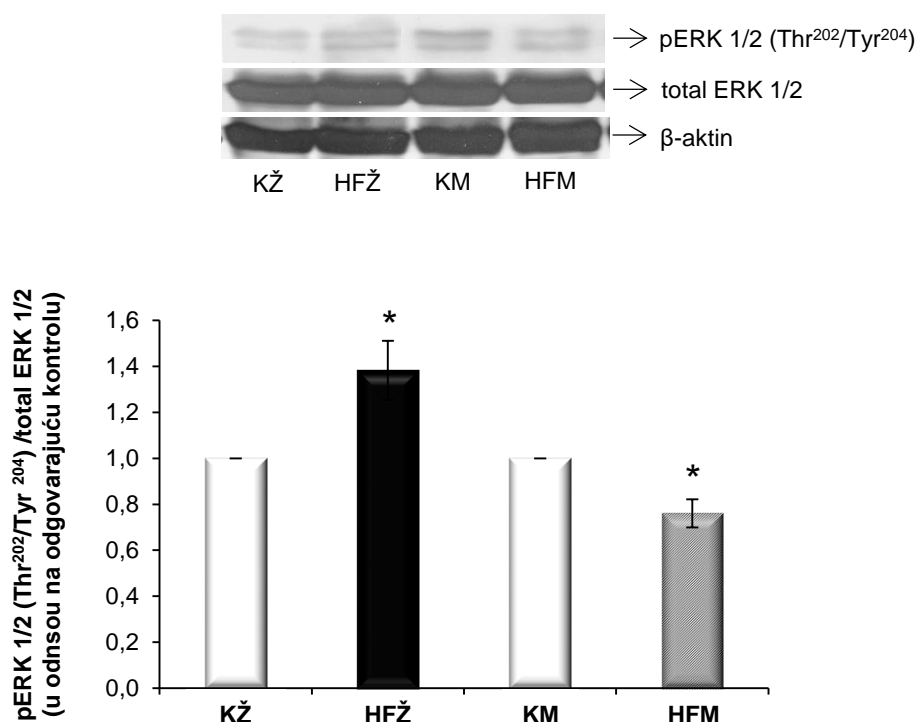
Rezultati dobijeni izračunavanjem odnosa fosforilisane forme Akt na Thr³⁰⁸ i ukupnog Akt (**Slika 15. A**), pokazuju da je došlo do smanjenja ovog odnosa u jetri gojaznih ženki (**p < 0,01) i mužjaka (**p < 0,01) u poređenju sa odgovarajućim kontrolama (KŽ = 1; HFŽ = 0,84 \pm 0,03; KM = 1; HFM = 0,69 \pm 0,07). Rezultati prikazani na **Slici 15. B** pokazuju da je samo u jetri gojaznih mužjaka došlo do smanjenja (**p < 0,01) nivoa fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ u odnosu na kontrolne mužjake (KM = 1; HFM = 0,55 \pm 0,11).



Slika 15. Nivo fosforilacije Akt proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. A. Reprezentativni Western blotovi za nivo fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸. Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme Akt na Thr³⁰⁸ i ukupne forme Akt predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 4$). B. Reprezentativni Western blotovi za nivo fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³. Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme Akt na Ser⁴⁷³ i ukupne forme Akt predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 3-4$); (** $p < 0,01$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

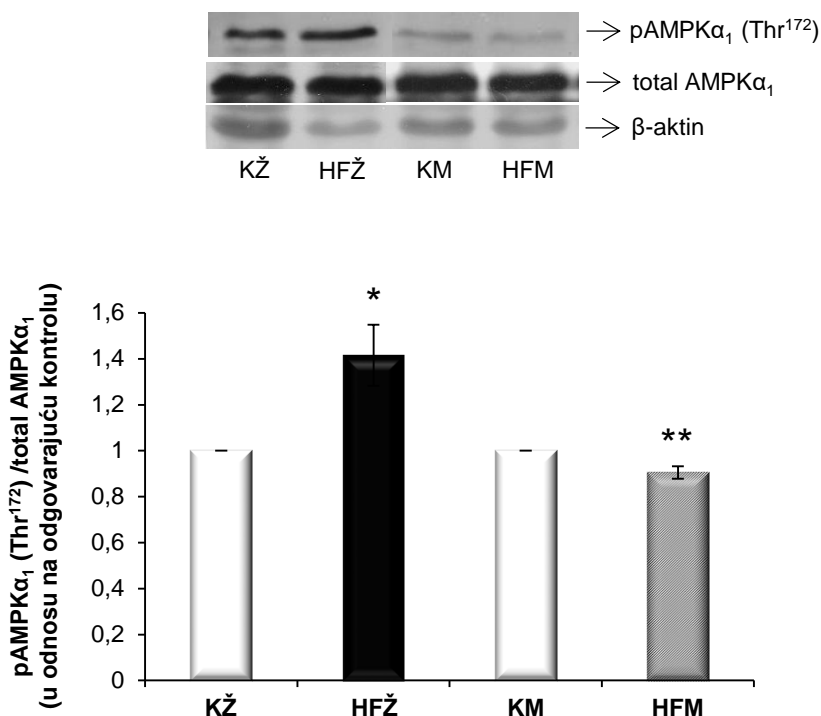
4.4.5. Fosforilacija i nivo proteina ERK1/2 i α_1 subjedinice AMPK u jetri pacova

Smatra se da ERK1/2 i AMPK mogu imati ključnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida u jetri u gojaznosti (Zhang i sar., 2012; Khan i sar., 2017). Za aktivaciju ERK1/2 neophodna je fosforilacija na Tyr^{204/187}, a zatim na Thr^{202/185} koje katalizuje MEK1/2. Polne razlike u aktivaciji ERK1/2 i α_1 subjedinice AMPK u jetri ispitivane su određivanjem nivoa fosforilacije na aminokiselinama Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i Thr¹⁷². Rezultati nivoa fosforilacije ERK1/2 proteina pokazuju povećanje ($*p < 0,05$) u jetri gojaznih ženki u odnosu na kontrolne ženke (KŽ = 1; HFŽ = $1,38 \pm 0,13$), dok je u jetri gojaznih mužjaka nivo fosforilacije ERK1/2 smanjen ($*p < 0,05$) u odnosu na kontrolne mužjake (KM = 1; HFM = $0,76 \pm 0,06$; **Slika 16.**).



Slika 16. Nivo fosforilacije ERK1/2 proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za ERK1/2 fosforilaciju na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴. Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i ukupne forme ERK1/2 predstavljaju srednju vrednost ± SEM (n = 5-6); (*p<0,05 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

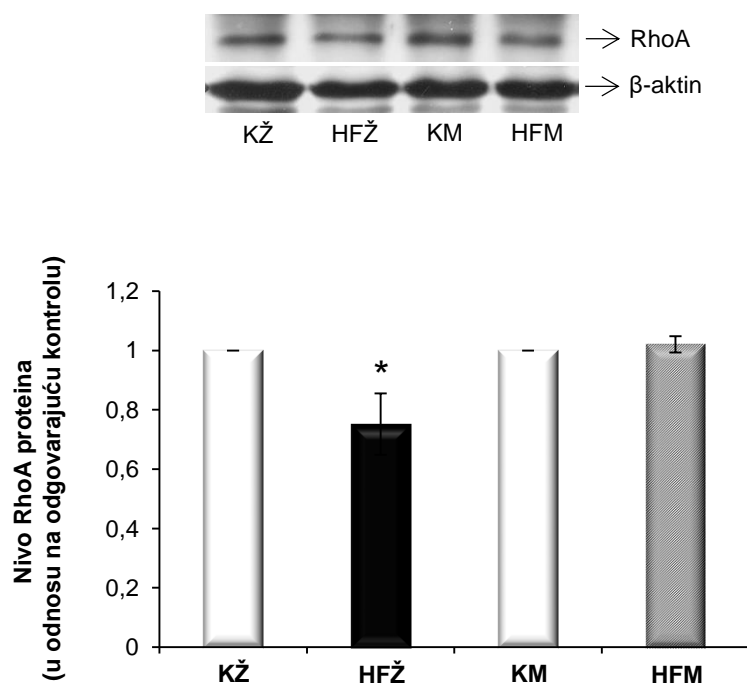
Nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK na Thr¹⁷² je povećan u jetri gojaznih ženki u odnosu na kontrolne (KŽ = 1; HFŽ = 1,41 ± 0,13; *p < 0,05), za razliku od gojaznih mužjaka kod kojih je nivo fosforilacije α subjedinice AMPK na Thr¹⁷² smanjen u poređenju sa jetrom kontrolnih mužjaka (KM = 1; HFM = 0,90 ± 0,03; **p < 0,01; Slika 17.).



Slika 17. Nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za fosforilaciju α_1 subjedinice AMPK na Thr¹⁷². Rezultati dobijeni za odnos fosforilisane forme α_1 subjedinice AMPK na Thr¹⁷² i ukupne forme α_1 subjedinice AMPK predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 6); (*p<0,05; **p<0,01 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

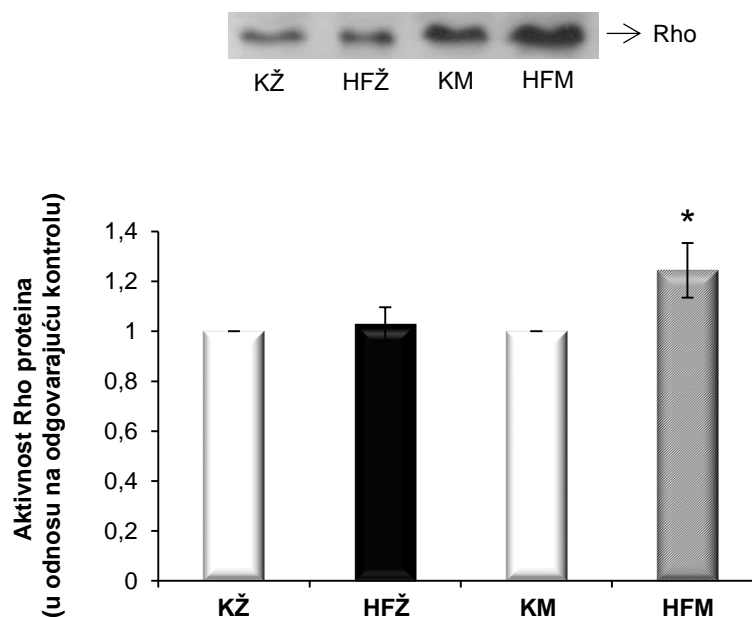
4.4.6. Nivo RhoA, ROCK1 i ROCK2 i aktivnost Rho proteina u jetri pacova

U daljem radu ispitivan je nivo RhoA i aktivnost ukupnih Rho proteina, kao i nivoi ROCK1 i ROCK2 proteina u jetri gojaznih pacova oba pola. Nivo RhoA proteina je smanjen (*p < 0,05) kod gojaznih ženki u odnosu na kontrolne (KŽ = 1; HFŽ = 0,75 \pm 0,10), dok je u jetri gojaznih mužjaka nivo ovog proteina ostao nepromenjen (Slika 18.).



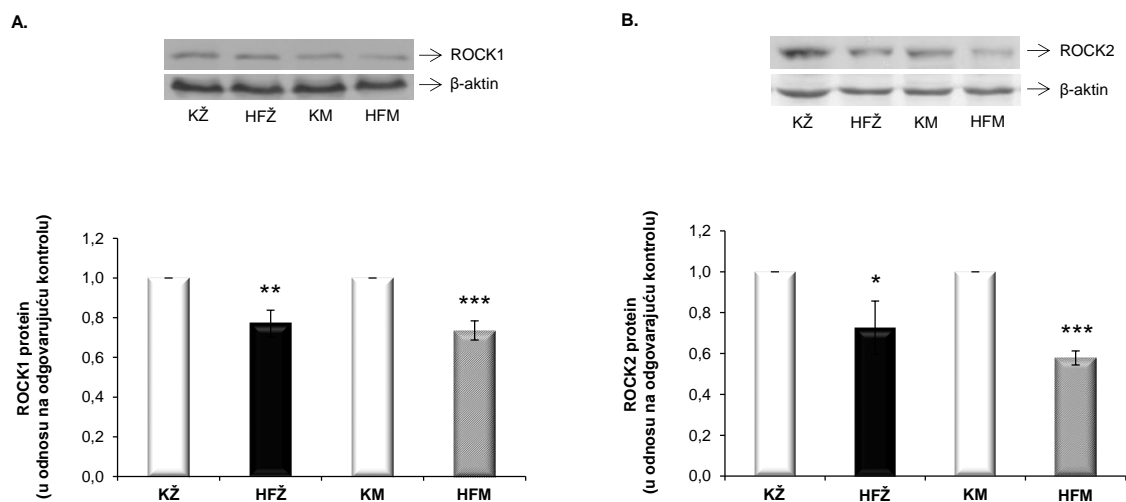
Slika 18. Nivo RhoA proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za RhoA protein. Rezultati dobijeni za nivo RhoA proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n = 5$); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

Rezultati merenja aktivnosti Rho proteina tj. sposobnosti Rho proteina da se vežu za Rho-vezujuću domen rotokina u jetri pacova, prikazani su na **Slici 19**. Aktivnost Rho proteina se nije menjala u jetri gojaznih ženki u odnosu na kontrolne, ali se povećala (* $p < 0,05$) u jetri gojaznih mužjaka u odnosu na kontrolne (KM = 1; HFM = $1,24 \pm 0,11$).



Slika 19. Aktivnost Rho proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Reprezentativni Western blot za aktivnost Rho proteina. Rezultati dobijeni za aktivnost Rho proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 3-4); (* $p < 0,05$ gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

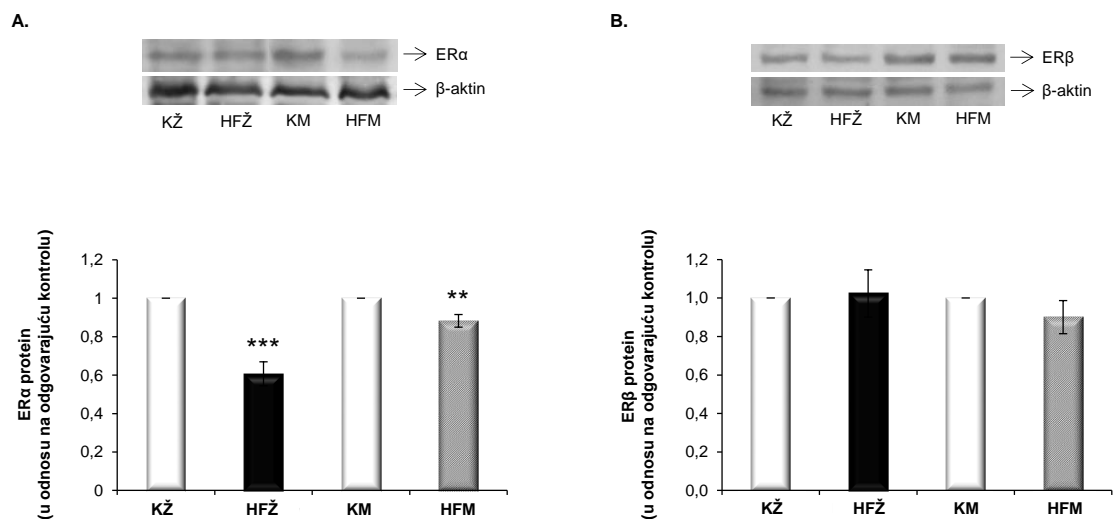
Nivo ROCK1 (**Slika 20. A**) i ROCK2 (**Slika 20. B**) proteina smanjen je u jetri gojaznih pacova oba pola u odnosu na kontrolne životinje (KŽ = 1; HFŽ = $0,77 \pm 0,07$; ** $p < 0,01$; KŽ = 1; HFŽ = $0,73 \pm 0,13$; * $p < 0,05$; KM = 1; HFM = $0,67 \pm 0,05$; *** $p < 0,001$; KM = 1; HFM = $0,58 \pm 0,03$; *** $p < 0,001$).



Slika 20. Nivo ROCK1 i ROCK proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. A. Reprezentativni Western blot za ROCK1 protein. Rezultati dobijeni za nivo ROCK1 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 5-6); (**p<0,01; ***p<0,001 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole). B. Reprezentativni Western blot za ROCK2 protein. Rezultati dobijeni za nivo ROCK2 proteina predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n = 4-5); (*p<0,05; ***p<0,001 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole).

4.4.7. Nivo receptora za estrogene – ER α i ER β u jetri pacova

Rezultati nivoa ER α i ER β proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola prikazani su na **Slici 21**. Nivo ER α proteina smanjen je kako u jetri gojaznih ženki (***) (KŽ = 1; HFŽ = 0,61 \pm 0,06), tako i u jetri gojaznih mužjaka (**p < 0,01) (KM = 1; HFM = 0,88 \pm 0,03) u odnosu na odgovarajuće kontrole (**Slika 21. A**). Rezultati dalje pokazuju da je nivo ER β proteina nepromenjen u jetri svih ispitivanih životinja (**Slika 21. B**).



Slika 21. Nivo ERα i ERβ proteina u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola.
 A. Reprezentativni Western blot za ERα protein. Rezultati dobijeni za nivo ERα proteina predstavljaju srednju vrednost ± SEM (n = 5-6); (**p<0,01; ***p<0,001 gojazni pacovi u odnosu na odgovarajuće kontrole). B. Reprezentativni Western blot za ERβ protein. Rezultati dobijeni za nivo ERβ proteina predstavljaju srednju vrednost ± SEM (n = 4-5).

5. Diskusija

Predmet ove doktorske disertacije je bio da se identifikuju molekularni mehanizmi polnih razlika u regulaciji iNOS i Na⁺/K⁺-ATP-aze za koje je pokazano da su uključene u razvoj IR u gojaznosti. Gojaznost i posleđično poremećen metabolizam lipida i glukoze u jetri su glavni faktori rizika za razvoj bolesti jetre, uključujući IR (Carmiel-Haggai i sar., 2005; Nazarian i sar., 2011). Ključnu ulogu u patogenezi IR u gojaznosti ima poremećen metabolizam lipida i glukoze u jetri koji posleđično može dovesti do inflamatornih procesa i aktivacije različitih medijatora uključujući iNOS (Perreault i Marette, 2001). Poznato je da iNOS ima važnu ulogu u imunitetu, ali prekomerna ekspresija iNOS i sinteza NO u gojaznosti mogu imati štetne efekte na regulaciju molekula signalnog puta insulina i na taj način dovesti do razvoja IR u jetri (Taylor i sar., 1998). Poremećaj u regulaciji ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aze, ključnog molekula u održavanju ćelijske homeostaze, je takođe karakteristika patologije IR (Sodhi i sar., 2015). Studije su pokazale da pol i reproduktivni status imaju važnu ulogu u patologiji gojaznosti i bolesti jetre, ali mehanizmi koji su u osnovi ovih polnih razlika nisu do danas dovoljno izučeni (Wang i sar., 2014; Zhu i sar., 2015; Motamed i sar., 2016; Fattahi i sar., 2016; Ballestri i sar., 2017). Do sada su u literaturi dostupni podaci o izučavanju efekata iNOS i NO na razvoj IR u jetri, kao i promeni aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aze u jetri gojaznih miševa, dok su uloga iNOS u razvoju IR kao i promene ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aze u jetri gojaznih pacova u polno specifičnom pogledu, nedovoljno dokumentovani u literaturi. Takođe, ne postoje literaturni podaci koji povezuju promene u regulaciji iNOS i Na⁺/K⁺-ATPaze sa promenama u regulaciji signalnih molekula PI3K, Akt, ERK1/2, AMPK, RhoA i ROCK u jetri u stanju gojaznosti.

Razvoj gojaznosti izazvan HF ishranom prvi put je zapažen 1959. godine od strane Masek-a i Fabry-ja u eksperimentu sa Albino pacovima (Mašek i Fábry, 1959).

Kasnije, na osnovu rezultata izučavanja efekata HF ishrane na razvoj gojaznosti i funkciju jetre, kao i na signalni put insulina, opšte je prihvaćeno mišljenje da se HF ishrana može koristiti za generisanje validnog animalnog modela gojaznosti i IR (Ikemoto i sar., 1995; Oakes i sar., 1997; Ahren i sar., 1999; Woods i sar., 2003). Pokazano je da HF ishrana tokom dužeg vremenskog perioda dovodi do povećanja mase tela pacova u opsegu od 10 do 20% u poređenju sa kontrolnim životinjama (Lei i sar., 2007; Buettner i sar., 2007; Sutherland i sar., 2008; Richardson i sar., 2014). Tako su Yaqoob i sar. (1995) pokazali da HF ishrana dovodi do povećanja mase tela pacova u poređenju sa standardnom ishranom uprkos približno istoj količini unosa hrane. Povećanje mase tela tokom perioda HF ishrane je postepen proces, sa prvim naznakama nakon 2 nedelje, dok je fenotip gojaznosti merljiv (merenje mase tela, određivanje indeksa mase tela, merenje mase masnog tkiva) nakon više od 4 nedelje HF ishrane (Hill i sar., 1992; Buettner i sar., 2007). Prethodni rezultati naše grupe pokazuju da HF ishrana kod mužjaka pacova dovodi do povećanja mase tela (**Tabela 2.**) (Obradovic 2013), što je u saglasnosti sa našim ranijim rezultatima (Sudar 2011). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da primena HF ishrane dovodi do povećanja mase tela i kod ženki pacova (**Tabela 1.**). Međutim, pojedini podaci iz literature pokazuju da HF ishrana ne dovodi do povećanja mase tela ženki i mužjaka pacova, što se dovodi u vezu sa smanjenim unosom hrane i nivoom hormona leptina (efekat sitosti) (Catala-Niell i sar., 2008). Smatra se da odnos nutrijenata u ishrani može regulisati unos hrane i promenu mase tela (Petzke i sar., 2007), čime se može objasniti različito vreme potrebno za razvoj gojaznosti ili odsustvo razvoja gojaznosti u pojedinim studijama (Boozer i sar., 1995; Jéquier 2002; Lionetti i sar., 2007). Prikazani rezultati koji se odnose na masu tela su u saglasnosti sa većinom podataka iz literature koji pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja mase tela pacova oba pola (Sutherland i sar., 2008; Nadal-Casellas i sar., 2011). Nagomilavanje lipida u jetri dovodi do strukturnih i funkcijskih poremećaja jetre, a vremenom i do hipertrofije jetre (Need i sar., 2005). Međutim, povećanje mase jetre pokazano je samo kod gojaznih mužjaka pacova što je u saglasnosti sa podacima iz literature i može se dovesti u vezu sa povećanim sadržajem lipida (triglicerida, holesterola) u jetri (Yaqoob i sar., 1995; Nadal-Casellas i sar., 2010; Souza-Mello i sar., 2010; Zhou i sar., 2014; Qin i sar., 2017). Studija Nadal-Casellas i sar. (2010) takođe pokazuje da HF ishrana ne dovodi do promena u masi jetre gojaznih

ženki pacova u poređenju sa kontrolnim, usled značajno manjeg nagomilavanja lipida u jetri.

Polazeći od brojnih podataka iz literature koji pokazuju da HF ishrana dovodi do razvoja gojaznosti, poremećenog metabolizma glukoze i lipida, te sledstvenog razvoja IR (Kraegen i sar., 1991; Ikemoto i sar., 1995; Han i sar., 1997; Bhuvanewari i Anuradha, 2012), kao i da postoje polne razlike u stepenu razvoja IR (Hevener i sar., 2002; Estrany i sar., 2013), dalji eksperimenti u okviru ove doktorske disertacije bili su usmereni ka određivanju koncentracija insulina, glukoze i holesterola u serumu i SMK u plazmi, kao i određivanju HOMA-IR i HOMA- β indeksa ženki pacova. Prethodni rezultati naše grupe pokazuju da HF ishrana kod mužjaka pacova dovodi do povećanja koncentracije glukoze i insulina u serumu, kao i HOMA-IR i HOMA- β indeksa, koji predstavljaju pokazatelje IR (**Tabela 2.**) (Obradovic, 2013), što je u skladu i sa rezultatima drugih autora (Winzell i Ahren 2004; Schrauwen, 2007; Souza-Mello i sar., 2010; Tinkov i sar., 2015). Za razliku od rezultata koji ukazuju na razvoj IR kod mužjaka pacova, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da HF ishrana kod ženki pacova ne dovodi do promena u koncentraciji insulina u serumu i vrednosti HOMA indeksa, i da je koncentracija glukoze u serumu ovih životinja smanjena (**Tabela 1.**). I druge studije su pokazale da HF ishrana, uprkos razvoju gojaznosti, ne dovodi obavezno do razvoja IR kod ženki pacova (Li i sar., 2000; Hevener i sar., 2002; Estrany i sar., 2013). Takođe, u brojnim studijama u okviru kojih su izučavane polne razlike u metabolizmu insulina i glukoze pokazano je da su ženke pacova osetljivije na dejstvo insulina u odnosu na mužjake u fiziološkim uslovima (standardna ishrana), što je takođe pokazano u gojaznosti (Zierath i sar., 1997; Corsetti i sar., 2000). Povećana koncentracija lipida u cirkulaciji (infuzija lipida) dovodi do razvoja IR kod mužjaka pacova, ali ne i kod ženki (Hevener i sar., 2002). U saglasnosti sa rezultatima navedenih studija na pacovima su i rezultati brojnih studija koje pokazuju da se osobe ženskog i muškog pola značajno razlikuju u pogledu stepena razvoja visceralne gojaznosti i IR (Fujioka i sar., 1987; Kissebah i Krakower, 1994; Kotani i sar., 1994; Chan i sar., 1994; Carey i sar., 1997; Wang i sar., 2005; Geer i Shen, 2009). U brojnim animalnim i humanim studijama je pokazano da estrogeni imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze glukoze i metabolizma supstrata (Rincon i sar., 1996; Carter i sar., 2001; Louet i sar., 2004). Smanjenje osetljivosti na insulin tokom menopauze i znatno

poboljšanje nakon tretmana estrogenima, ukazuju na važnu ulogu estrogena u regulaciji osetljivosti na insulin kod žena (D'Eon i sar., 2005; Moran i sar., 2008). Međutim, u literaturi postoje i suprotni rezultati koji jasno pokazuju da HF ishrana dovodi do razvoja IR kod ženki pacova (Zierath i sar., 1997; Corsetti i sar., 2000; Tinkov i sar., 2015; Pratchayasakul i sar., 2015). S obzirom da se u navedenim studijama starost životinja, sastav hrane i metode određivanja osetljivosti na insulin značajno razlikuju, moguće je da su neujednačeni uslovi uzrok različitih rezultata. Takođe, potpuni izostanak sinteze ili aktivnosti estrogena dovodi se u vezu sa razvojem IR (Jones i sar., 2000; Herrmann i sar., 2002). Uzimajući u obzir protektivne efekte estrogena na regulaciju metabolizma insulina i glukoze, raspodele masnog tkiva i metabolizma lipida, možemo pretpostaviti da su endogeni estrogeni odgovorni za polne razlike u koncentraciji glukoze i inuslina, kao i vrednostima HOMA-IR i $-\beta$ indeksa gojaznih pacova u našoj studiji.

S obzirom da je poznato da poremećen metabolizam lipida u gojaznosti dovodi do povećanja koncentracije SMK u cirkulaciji i razvoja IR (Boden, 2008), u daljem radu izučavan je uticaj polnih razlika na koncentraciju SMK i holesterola u cirkulaciji. Povećana lipolitička aktivnost u visceralnom masnom tkivu, kao i njegoa direktna veza sa jetrom, dovodi do povećanja koncentracije SMK u portnoj i sistemske cirkulaciji (Bergman i Ader, 2000). Sve je više dokaza koji ukazuju na značajnost veze između metabolizma SMK i razvoja IR i drugih metaboličkih poremećaja u gojaznosti. Povećana koncentracija SMK u cirkulaciji dovodi do povećane glukoneogeneze hiperglikemije i hiperinsulinemije (Franckhauser i sar., 2006), kao i do pojave inflamacije što dalje doprinosi razvoju IR (Boden i sar., 1994; Boden 1997; Griffin i sar., 1999; Dresner i sar., 1999). Takođe, povećana koncentracija SMK u jetri može imati citotoksičan efekat i indukovati lipoapoptozu hepatocita, a dalje i razvoj steatoze jetre i NAFLD (Malhi i sar., 2006). Naši raniji rezultati pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja koncentracije SMK u plazmi mužjaka pacova (Obradovic, 2013), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija (Wanyonyi i sar., 2017; Li i sar., 2017). Međutim, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da nema promena u koncentraciji SMK u plazmi gojaznih ženki pacova. Poznato je da se kod žena veća količina SMK iz cirkulacije skladišti u subkutano masno tkivo, dok je kod muškarca favorizovano skladištenje u visceralnom masnom tkivu (Shadid i sar., 2007; Koutsari i sar., 2011).

Takođe je pokazano da visceralno masno tkivo gojaznih muškaraca više oslobađa SMK u portnu cirkulaciju u poređenju sa gojaznim ženama (Lonnqvist i sar., 1997) što ukazuje na mogući mehanizam zaštite od štetnih efekata gojaznosti kod žena pre menopauze. Nepromenjena koncentracija SMK u plazmi gojaznih ženki pacova u našoj studiji može objasniti pozitivan efekat endogenih estrogena, koji povećavaju lipolitičku aktivnost masnog tkiva i posledično smanjuju lipogenezu, dovodeći do smanjenja lipida u cirkulaciji (Hewitt i sar., 2004). U prilog tome, rezultati studije Kamei i sar. (Kamei i sar., 2005) pokazuju da je ekspresija gena za enzime uključene u procese potrošnje energije i lipogeneze smanjena u masnom tkivu ovarijektomisanih miševa.

Dislipidemija u gojaznosti se karakteriše poremećenim balansom ukupnog holesterola, smanjenom koncentracijom HDL-C i povećanom koncentracijom LDL-C i triglicerida u cirkulaciji. Jetra je glavni organ *de novo* sinteze holesterola posredovane enzimom 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzima A (HMG-CoA) reduktazom (Angelin i sar., 1982). Odavno je poznato da gojaznost povećava koncentraciju VLDL i/ili LDL-C u cirkulaciji, dok je smanjenje mase tela direktno povezano sa normalizacijom koncentracije holesterola (Miettinen, 1971; Nestel i sar., 1973). Naši raniji rezultati pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja koncentracije holesterola u serumu mužjaka pacova (Obradovic, 2013). Međutim, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da nema značajnih promena u koncentraciji holesterola u serumu gojaznih ženki pacova, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Thomas-Moya i sar., 2008). Pokazano je da postoje polne razlike u koncentraciji lipida u cirkulaciji u gojaznosti, pri čemu je kod žena pre menopauze zapažena manja koncentracija ukupnog holesterola u odnosu na muškarce istih godina (Pellegrini i sar., 2014). U studiji De Marinis i sar. (2008) je pokazano da je ekspresija HMG-CoA reduktaze manja kod ženki u poređenju sa mužjacima pacova, ukazujući na postojanje polnih razlika u sintezi holesterola. Koncentracija ukupnog holesterola u serumu (Jones i sar., 2000) je povećana kod miševa kojima je uklonjen gen za aromatazu i ovarijektomisanih pacova, a tretman estrogenima dovodi do smanjenja i normalizacije koncentracije holesterola (Jones i sar., 2000; Nigro i sar., 2014). U humanim studijama je pokazano da je koncentracija ukupnog holesterola u serumu povećana kod muškaraca koji imaju mutaciju gena za aromatazu, dok je tretman estradiolom u periodu od 6 meseci normalizovao koncentraciju holesterola (Carani i sar., 1997; Bilezikian i sar., 1998). Takođe, Darabi i

sar. (2011) su pokazali da suplementacija estrogenima kod žena nakon menopauze dovodi do smanjenja holesterola u cirkulaciji. Rezultati ove doktorske disertacije koji pokazuju povećanu koncentraciju holesterola kod gojaznih mužjaka pacova, ali ne i kod ženki, mogu se objasniti pozitivnim efektom endogenog estradiola na metabolizam holesterola (Hewitt i sar., 2004).

S obzirom da prethodno diskutovani rezultati ukazuju na polne razlike u metabolizmu glukoze i lipida, u daljem radu izučavani su efekti HF ishrane na koncentraciju glukoze i lipida u lizatu jetre, kao i nivoe GLUT2 i FAT/CD36 membranskih proteina. U gojaznosti, zbog postojanja neravnoteže između dostavljanja lipida poreklom iz hrane ili rezervi masnog tkiva u jetru i njihovog sekretovanja u vidu VLDL iz jetre, trigliceridi se nagomilavaju u jetri (Seppala-Lindroos i sar., 2002). U odgovoru na povećanu koncentraciju insulina u stanju IR, smanjuje se transport glukoze posredstvom GLUT2, koji se internalizuje zajedno sa receptorom za insulin (Eisenberg i sar., 2005; Leturque i sar., 2009). Osnovna uloga GLUT2 u hepatocitima jeste da reguliše oslobađanje glukoze iz jetre u cirkulaciju pod dejstvom insulina. Translokacija unutarćelijskih vezikula koje sadrže GLUT proteine na plazma membranu počinje aktivacijom Akt koji je pod direktnom kontrolom insulina (Holman i Kasuga 1997; Manning i Cantley 2007; Bertrand i sar., 2008). Tokom gojaznosti i IR dolazi do poremećaja u signalnoj kaskadi PI3K/Akt (Kahn i sar., 2006; Ren i sar., 2015; Gao i sar., 2015), što dovodi do poremećaja u translokaciji GLUT na plazma membranu (Gandhi i sar., 2013). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je koncentracija glukoze u lizatu jetre povećana, dok je nivo GLUT2 proteina smanjen u membranskoj frakciji proteina jetre pacova oba pola, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da HF ishrana dovodi do smanjenja nivoa GLUT2 proteina u jetri mužjaka miševa (Souza-Mello i sar., 2010; Ho i sar., 2013). Prikazani rezultati ukazuju na poremećen metabolizam glukoze gojaznih životinja ili pak mogu biti posledica postprandijalnog povećanja koncentracije glukoze u jetri. S obzirom da je HF ishrana dovela do razvoja IR kod mužjaka, ali ne i kod ženki pacova, povećana koncentracija glukoze i smanjen nivo GLUT2 proteina u jetri pacova oba pola može se objasniti povećanom koncentracijom lipida u cirkulaciji i jetri. Tačnije, povećana koncentracija SMK inhibira dejstvo insulina na taj način što smanjuje preuzimanje glukoze iz cirkulacije i inhibira sintezu glikogena u jetri (Boden i sar., 1994).

Jedan od glavnih mehanizama transporta SMK u jetri je olakšana difuzija posredstvom FAT/CD36 proteina. U stanju gojaznosti, povećana translokacija FAT/CD36 proteina na plazma membranu hepatocita je najčešće povezana sa razvojem IR (Koonen i sar., 2007; Kennedy i sar., 2011). U transgenim životinjama prekomerna ekspresija FAT/CD36 proteina u jetri dovodi do steatoze i dalje doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja (Zhou i sar., 2008). Međutim, direktna veza između ekspresije FAT/CD36 u jetri i razvoja IR u gojaznosti još nije u potpunosti razjašnjena. Rezultati ove doktorske disertacije jasno pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja koncentracije holesterola u lizatima jetre pacova oba pola, dok je koncentracija SMK povećana samo u jetri gojaznih mužjaka pacova. Takođe, nivo FAT/CD36 proteina na plazma membranama ćelija jetre je povećan samo kod mužjaka, dok je kod ženki pacova smanjen. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije Sudeep i sar. (2016) koji pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja koncentracije holesterola i SMK u jetri gojaznih mužjaka pacova. Takođe, Zouh i sar. (2014) su pokazali da HF ishrana dovodi do nagomilavanja SMK u jetri i posledično izaziva poremećaj u metabolizmu lipida i smanjen HOMA- β indeks što ukazuje na razvoj IR. S obzirom da je pokazano da tretman ovarijektomisanih miševa estrogenima sprečava nagomilavanje lipida u jetri i povećava osetljivost ćelija na insulin u gojaznosti (Zhu i sar., 2013), može se pretpostaviti da endogeni estrogeni kod gojaznih ženki pacova u našoj studiji pozitivno deluju na koncentraciju lipida u jetri. Prikazani rezultati koji se odnose na nivo FAT/CD36 proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova su u saglasnosti sa rezultatima studije Koonen i sar. (2007) koji pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja nivoa FAT/CD36 proteina u jetri, što je u korelaciji sa povećanim nagomilavanjem lipida u jetri gojaznih miševa. U istoj studiji autori su pokazali da povećana ekspresija FAT/CD36 proteina u gojaznosti doprinosi povećanom preuzimanju SMK u jetri i razvoju IR (Koonen i sar., 2007). Suprotno tome, prekomerna ekspresija FAT/CD36 u transgenim miševima koji su bili na HF ishrani ublažava simptome steatoze jetre i povećava osetljivost na insulin (Garbacz i sar., 2016). Polazeći od podataka iz literature koji pokazuju da estradiol utiče na regulaciju FAT/CD36 proteina u jetri (Tepavcevic i sar., 2011), kao i da nedostatak estrogena usled ovarijektomije kod glodara dovodi do smanjenja oksidacije lipida i nagomilavanja lipida u jetri (Stubbins i sar., 2012), nepromenjena koncentracija SMK u jetri gojaznih

ženki pacova u našoj studiji može se objasniti povećanom lipolitičkom aktivnošću masnog tkiva i smanjenom lipogenezom koje su posredovane estradiolom (Hewitt i sar., 2004).

Visceralno masno tkivo ima direktan uticaj na jetru i predstavlja izvor bioaktivnih medijatora, uključujući SMK i druge adipocitokine, koji dovode do zapaljenskih procesa i aktivacije iNOS (Reddy i Rao, 2006; Nozaki i sar., 2015). Da bi se istražili molekularni mehanizmi različitog odgovora na HF ishranu i razvoj IR kod ženki i mužjaka pacova, u daljem radu je ispitivana uloga iNOS. Pored protektivne uloge koju iNOS ima u jetri tokom različitih patofizioloških procesa (sepsa i ishemija) (Taylor i sar., 1998), poremećaj ovog enzima može biti uključen u razvoj IR u gojznosti (Shimabukuro i sar., 1997; Fujimoto i sar., 2005; Shinozaki i sar., 2011; Kanuri i sar., 2017). Rezultati brojnih studija pokazuju da poremećen metabolizam lipida u gojznosti dovodi do povećanja ekspresije iNOS u jetri, a sledstveno povećanje produkcije NO dovodi do razvoja IR u različitim tkivima, uključujući jetru (Wan i sar., 2000; Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010; Ha i Chae, 2010). Štetni efekti NO dovode se u vezu sa poremećajima u regulaciji signalnog puta insulina usled nekontrolisane nitrozilacije ostataka Tyr na receptoru za insulin i Akt (Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010). Međutim, ranije studije su pokazale da se nivo iNOS proteina u jetri razlikuje u različitim modelima gojznosti i IR (Perreault i Marette, 2001; Dallaire i sar., 2008). Perreault i Marette (2001) su pokazali da HF ishrana dovodi do razvoja IR usled povećanja nivoa iNOS proteina u skeletnim mišićima i masnom tkivu, ali ne i u jetri. Isti autori su pokazali da delecija gena za iNOS u skeletnim mišićima gojznih miševa ublažava simptome IR (Perreault i Marette, 2001). Međutim, malo je podataka u literaturi koji ukazuju na polne razlike u regulaciji iNOS u jetri, dok studije koje izučavaju polne razlike u regulaciji iNOS u jetri u gojznosti nedostaju u literaturi. Naši rezultati pokazuju da HF ishrana kod mužjaka dovodi do povećanja nivoa iRNK za iNOS i smanjenja nivoa iNOS proteina u jetri, i povećanja koncentracije nitrita/nitrata u plazmi, dok kod gojznih ženki nisu uočene promene ovih parametara. Imajući u vidu podatke iz literature koji nedvosmisleno ukazuju da HF ishrana ne dovodi do promena u nivou eNOS i nNOS proteina u jetri, povećana koncentracija nitrita/nitrata u plazmi gojznih mužjaka u našoj studiji može biti posledica povećanog nivoa iNOS proteina u drugim tkivima, kao što su skeletni mišići (Perreault i Marette,

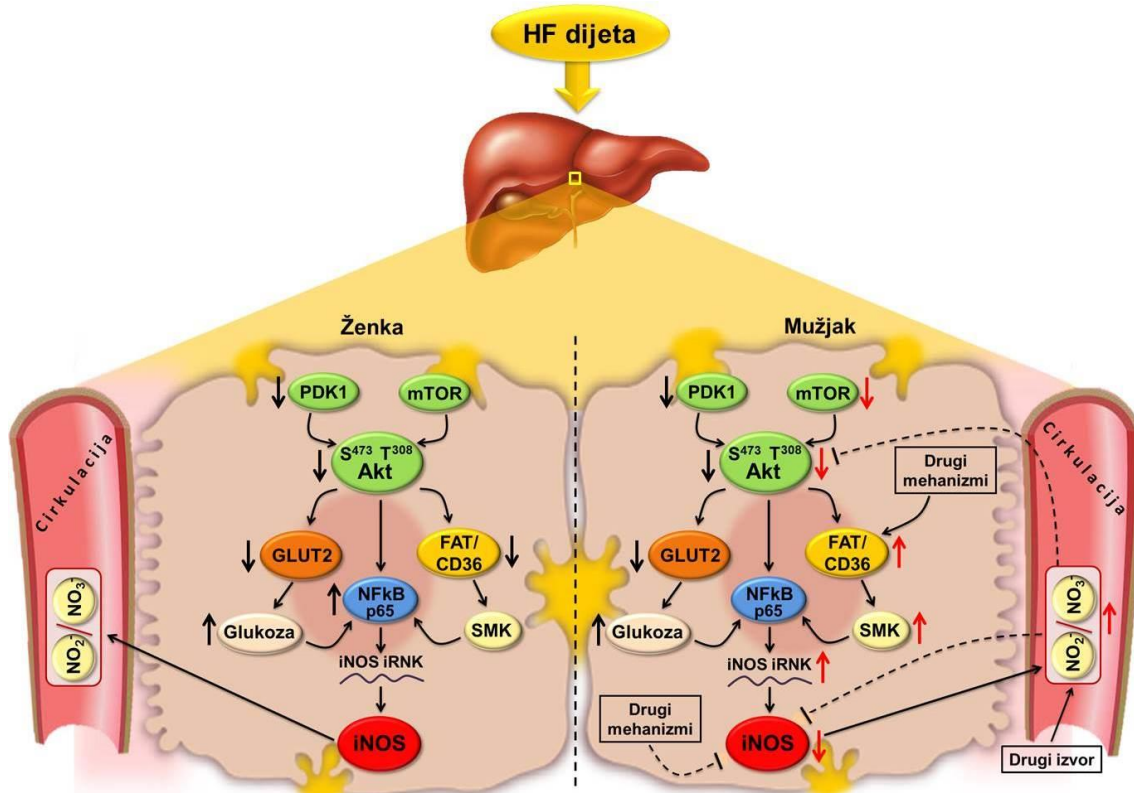
2001). Pokazano je da NO može inhibirati sintezu iNOS na različitim nivoima, uključujući transkripciju, translaciju i post-translacione modifikacije (Griscavage i sar., 1993; Taylor i sar., 1997). S obzirom da je NO lipofilni molekul koji brzo difunduje u ćelije, može se pretpostaviti da povećana sinteza NO u drugim tkivima inhibira translaciju iNOS proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova. Nepromenjena ekspresija gena za iNOS u jetri i koncentracija nitrita/nitrata u plazmi gojaznih ženki može se objasniti anti-inflamatornim dejstvom endogenog estrogena koji ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije iNOS (Pettersson i sar., 2012). U prilog tome idu rezultati studije Yeh i sar. (2011) koji pokazuju da tretman estradiolom (2-metoksiestradiolom) miševa u septičnom stanju značajno smanjuje nivo interleukina, faktora nekroze tumora α i NO u serumu. Takođe, rezultati studije Inaba i sar. (2005) pokazuju da je nivo ekspresije gena za iNOS i sinteza NO nakon infuzije lipida (lipopolisaharida) povećan u jetri mužjaka i ovarijektomisanih ženki pacova u poređenju sa kontrolnim ženkama.

Uzimajući u obzir prethodno diskutovane rezultate koji ukazuju na polne razlike u regulaciji ekspresije iNOS i sinteze NO, u nastavku će biti diskutovane polne razlike u molekulskom mehanizmu regulacije iNOS. Dalji eksperimenti u okviru ove doktorske disertacije su bili usmereni ka ispitivanju uloge PDK1 i mTOR u aktivaciji Akt kinaze i transkripcionog faktora NF κ B u jetri kontrolnih i gojaznih pacova oba pola. Estrogeni ostvaruju efekte na ekspresiju i aktivnost iNOS aktivacijom složene mreže međuzavisnih signalnih puteva koji uključuju PI3K/Akt signalni put. Aktivacija Akt i NF κ B dovodi do povećanja ekspresije iNOS, što je potvrđeno u studiji Hossen i sar. (2016) koji su pokazali da je inhibicija Akt signalnog puta direktno povezana sa smanjenom translokacijom NF κ B u jedro i smanjenom ekspresijom iNOS. Međutim, prekomerna ekspresija iNOS kao i sinteza NO u gojaznosti smanjuju nivo ekspresije i fosforilacije receptora za insulin, IRS i Akt u jetri (Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Murette, 2010). Polne razlike u regulaciji ekspresije iNOS posredstvom signalnog puta PDK1/mTOR/Akt u jetri gojaznih pacova su oskudni u literaturi. Sarbassov i sar. (2005) su pokazali da je mTOR uključen u fosforilaciju Akt na Ser⁴⁷³, kao i da hronična inhibicija mTOR doprinosi razvoju periferne IR. Međutim, prekomerna aktivacija mTOR i nishodne S6 kinaze u gojaznosti inhibira asocijaciju IRS-1 sa PI3K i dalju aktivaciju PI3K/Akt signalnog puta (Shah i sar., 2004; Di Paolo i sar., 2006; Tzatsos i Kandror 2006). Za potpunu aktivaciju Akt neophodna je fosforilacija i na Thr³⁰⁸ koju

vrši PDK1. U prilog tome, kod nokaut miševa za PDK1 u jetri pokazana je smanjena fosforilacija Akt na Thr³⁰⁸ što se dovodi u vezu sa razvojem hiperglikemije i poremećaja u funkciji jetre (Mora i sar., 2005). Tan i sar. (2015) su pokazali *in vitro* da su ekspresija gena za iNOS i nivo iNOS proteina smanjeni u makrofagima sa delecijom gena za PDK1. Takođe, pokazano je da inhibicija PDK1/Akt signalnog puta smanjuje ekspresiju iNOS (Hossen i sar., 2016). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su nivoi fosforilacije PDK1 na Ser²⁴¹ i Akt na Thr³⁰⁸ smanjeni u jetri gojaznih pacova oba pola, dok su nivoi fosforilacije mTOR na Ser²⁴⁸¹ i Akt na Ser⁴⁷³ smanjeni samo u jetri gojaznih mužjaka pacova. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koji pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja ekspresije gena za iNOS, sinteze NO i razvoja IR kod mužjaka pacova što je u direktnoj vezi sa smanjenom aktivacijom PDK1, mTOR i Akt signalnih molekula (Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010). Takođe, naši rezultati pokazuju da su štetni efekti HF ishrane ublaženi u jetri gojaznih ženki, imajući u vidu da je fosforilacija Akt parcijalno smanjena, a da su ekspresija iNOS u jetri i koncentracija NO₂⁻/NO₃⁻ u plazmi nepromenjeni. Nagomilavanje lipida u jetri posledično dovodi do aktivacije inflamatornih citokina (Reddy i Rao, 2006), koji indukuju aktivaciju transkripcionog faktora NFκB i povećavaju ekspresiju iNOS (Curran i sar., 1990). Promotor *NOS2* gena za iNOS predstavlja mesto vezivanja brojnih transkripcionih faktora, uključujući NFκB (Nathan i Xie, 1994; Balligand i Cannon, 1997). Takođe, Yuan i sar. (2001) su pokazali da je NFκB jedan od medijatora IR i da kod nokaut životinja za IκKβ koje su bile na HF ishrani nije došlo do razvoja IR. Povećana koncentracija SMK u plazmi može aktivirati IκK i NFκB u jetri gojaznih pacova (Sinha i sar., 2004; Pereira i sar., 2015), što dovodi do povećane ekspresije iNOS i oštećenja jetre (Xie i sar., 1994; Aktan, 2004; Shinozaki i sar., 2011). Prikazani rezultati ukazuju na polne razlike u nivou p65 subjedinice NFκB, pri čemu je nivo NFκB-p65 povećan u jetri gojaznih ženki, a nepromenjen u jetri gojaznih mužjaka pacova. U studiji Hattori i sar. (2003) je pokazano da su procesi neophodni za aktivaciju NFκB (degradacija IκB, translokacija u jedro i vezivanje za DNK) smanjeni usled inhibicije Akt. S obzirom da je IκB supstrat Akt, smanjena fosforilacija Akt zapažena u jetri gojaznih mužjaka pacova u našoj studiji može inhibirati translokaciju NFκB u jedro. Iako rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je nivo iNOS proteina smanjen, nivo ekspresije gena za iNOS u jetri gojaznih

mužjaka pacova je povećan, što ukazuje na postojanje drugih mehanizama regulacije ekspresije iNOS, nezavisno od učešća NFκB (Morin i sar., 2001). Sa druge strane, povećan nivo p65 subjedinice NFκB, nepromenjen nivo ekspresije gena za iNOS kao i nivo iNOS proteina u lizatima jetre gojaznih ženki u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na polne razlike u regulaciji iNOS. U prilog tome idu rezultati studije Chung i sar. (Chung i sar., 2017) koji pokazuju da su nivoi NFκB-p65 i iNOS proteina povećani u srcu ovarijektomisanih pacova, dok je tretman estradiolom smanjio nivo ovih proteina. U nedostatku podataka iz literature, može se pretpostaviti da su endogeni estrogeni odgovorni za polne razlike u regulaciji ekspresije iNOS posredstvom NFκB-p65 i Akt kod gojaznih pacova u okviru ove doktorske disertacije.

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, predlaže se mogući mehanizam regulacije ekspresije iNOS u jetri gojaznih ženki i mužjaka pacova (**Slika 22**). HF ishrana dovodi do promena u regulaciji ekspresije iNOS, koncentraciji nitrita/nitrata i razvoja IR u polno specifičnom pogledu, što može biti posledica poremećaja aktivacije signalnog puta PDK1/mTOR/Akt. Takođe, smanjena aktivacija ove signalne kaskade kao posledica gojaznosti dovodi do poremećaja u regulaciji FAT/CD36 i GLUT2. Polne razlike u stepenu razvoja IR, indukcije iNOS i sinteze nitrita/nitrata mogu biti posledica dejstva estrogena kod gojaznih ženki pacova.



Slika 22. Mehanizam regulacije kojim HF ishrana dovodi do poremećaja metabolizma lipida i utiče na regulaciju ekspresije iNOS i sinteze nitrita/nitrata kod ženki i mužjaka pacova. Akt – protein kinaze B; FAT/CD36 – translokaza masnih kiselina; SMK – slobodne masne kiseline; GLUT2 – transporter glukoze 2; IR – rezistencija na insulin; p65 – p65 subjedinica NFkB; iNOS – inucibilna azot monoksid (NO) sintaza; mTOR – kompleksom ciljnog molekula za rapamicin 2; NO₂⁻/NO₃⁻ – nitriti/nitrati; PDK1 – fosfoinozolid-zavisna protein kinaza 1; Ser – serin; Thr – treonin, ↑ – povećana fosforilacija ili aktivnost; ↓ – smanjena fosforilacija ili aktivnost; crvene strelice ukazuju na polne razlike, isprekidane linije ukazuju na moguće mehanizme regulacije.

Na⁺/K⁺-ATPaza je jedan od ključnih enzima uključenih u brojne metaboličke procese u jetri. Poremećaj aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze dovodi se u vezu sa brojnim patofiziološkim procesima, uključujući gojaznost i IR (Iannello i sar., 2007). Samo mali broj ranijih studija se bazira na izučavanju aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri u gojaznosti (Bray i Yukimura, 1978; York i sar., 1978; Lin i sar., 1981), dok podaci koji se odnose na polne razlike u regulaciji ekspresije Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri u stanju gojaznosti nedostaju u literaturi. Imajući u vidu važnu ulogu Na⁺/K⁺-ATPaze u jetri, u daljem radu ispitivane su polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze gojaznih pacova. Regulacija ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze je složen proces u kojem učestvuju brojni faktori i hormoni, a jedan od važnijih regulatora je

hormon estradiol (Dzurba i sar., 1997; Palacios i sar., 2004; Liu i sar., 2007). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se smanjuje nivo proteina α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze, kao i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze u frakciji proteina plazma membrane u jetri gojaznih pacova oba pola. Međutim, nivo ekspresije gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze smanjen samo u jetri gojaznih mužjaka pacova. Rezultati koji se odnose na aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze su u saglasnosti sa rezultatima ranijih studija koji pokazuju da HF ishrana dovodi do smanjenja aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u jetri miševa (Bray i Yukimura, 1978; Lin i sar., 1981; Izpisua i sar., 1989). Pored toga, smanjena aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze je pokazana u jetri genetički gojaznih (ob/ob) ženki miševa (York i sar., 1978). Međutim, ova disertacija prvi put izučava polne razlike ekspresiji gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih pacova. Imajući u vidu poznate efekte estrogena na poremećaje u gojaznosti (Zhu i sar., 2014) i ulogu estrogena u regulaciji ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze (Dzurba i sar., 1997; Palacios i sar., 2004), a u odsustvu podataka iz literature, uočene polne razlike u ekspresiji gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih ženki pacova mogu se objasniti uticajem endogenih estrogena. U prilog tome idu i rezultati studije Palacios i sar. (2004) koji pokazuju da estradiol ima ključnu ulogu u polnim razlikama u regulaciji Na^+/K^+ -ATPaze u aorti pacova.

Poznato je da su estrogeni uključeni u regulaciju ekspresije/aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze (Dzurba i sar., 1997), ali molekularni mehanizmi ove regulacije nisu dovoljno izučeni. Estrogeni regulišu ekspresiju i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze aktivacijom brojnih signalnih puteva, uključujući IRS/PI3K/Akt, ERK1/2, RhoA/ROCK, AMPK α (Sudar i sar., 2008; Li i sar., 2011; Obradovic i sar., 2014). Estrogeni se vezuju za receptore ER α i ER β , i nakon formiranja kompleksa hormon-receptor se translociraju u jedro, gde regulišu ekspresiju ciljnih gena (Stossi i sar., 2004). Takođe, estradiol ostvaruje negenomske efekte vezivanjem za ER α ili ER β u citoplazmi i aktivacijom mreže međusobno zavisnih signalnih molekula (Ewart i Klip, 1995; Isenovic i sar., 2003; Kang i sar., 2010). U jetri je ER α dominantna izoforma ER (Gao i sar., 2008) preko koje estrogeni ispoljavaju protektivne efekte tokom inflamacije jetre (Evans i sar., 2002). Naši rezultati pokazuju da je nivo ER α proteina smanjen u jetri gojaznih pacova oba pola, dok je nivo ER β proteina nepromenjen. Oskudini su podaci u literaturi koji ukazuju na direktnu vezu između ER i regulacije Na^+/K^+ -ATPaze u različitim tkivima, a

kada je reč o jetri podataka nema. Jedno od retkih istraživanja je studija Li i sar. (2011) koja pokazuje da estradiol *in vitro* povećava nivo proteina β_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze posredstvom ER β . Isti autori su pokazali da formirani kompleks estradiol-ER β aktivira transkripciju gena za NDRG2 (*engl. N-myc downstream-regulated gene 2*) čiji proteinski produkt interaguje sa β_1 subjedinicom Na^+/K^+ -ATPaze u citoplazmi i inhibira njenu ubikvitinaciju. Interesantno je da je NDRG2 jedan od supstrata Akt (Burchfield i sar., 2004), što ukazuje na to da estrogenu mogu regulisati ekspresiju NDRG2 i Na^+/K^+ -ATPaze posredstvom Akt. Pored toga, razvoj IR i steatoze jetre među glavnim su karakteristikama miševa kojima je uklonjen gen za ER α , što je takođe uočeno i kod ovarijektomisanih miševa (Ribas i sar., 2010; Zhu i sar., 2013). Uprkos smanjenju nivoa ER α proteina u jetri u našoj studiji, koje može biti posledica povećane sinteze estrogenu u masnom tkivu gojaznih pacova oba pola (Liedtke i sar., 2012), pretpostavljamo da smanjen nivo ER α proteina ne utiče na aktivaciju nishodnih signalnih molekula, koji takođe mogu biti aktivirani i posredstvom drugih ER (Weigt i sar., 2013).

Rezultati brojnih studija pokazuju da smanjena aktivacija IRS-1 predstavlja kritičnu vezu između gojaznosti i razvoja IR, kao i smanjene aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze (Saad i sar., 1992; Kerouz i sar., 1997; Rojas i sar., 2003; Isenovic i sar., 2004). Povećanje aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze aktivacijom IRS/PI3K/Akt signalnog puta podrazumeva fosforilaciju Thr ostataka na IRS-1 i njegovu asocijaciju sa p85 subjedinicom PI3K (Isenovic i sar., 2003). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je nivo IRS-1 proteina smanjen u jetri gojaznih mužjaka i da je asocijacija IRS-1/PI3K-p85 smanjena u jetri pacova oba pola, što je u saglasnosti sa rezultatima brojnih studija u kojima je pokazano da su nivo ekspresije gena za IRS-1, nivo proteina IRS-1 i asocijacija IRS-1 sa p85 smanjeni u jetri gojaznih miševa (Saad i sar., 1992; Munoz i sar., 2006; Yang i sar., 2016). Smanjena fosforilacija IRS-1 na Thr (aktivirajući mehanizam), a povećana na Ser (inhibirajući mehanizam), dovodi do ubikvitinacije IRS-1 proteina i smanjenja njegove asocijacije sa p85 subjedinicom PI3K u jetri gojaznih miševa (Kerouz i sar., 1997; Sun i sar., 1999; Sykiotis i Papavassiliou, 2001; Rojas i sar., 2003; Liu i sar., 2004). Takođe, prikazani rezultati pokazuju smanjen nivo PI3K-p85 proteina u jetri gojaznih ženki, dok je nivo PI3K-p110 smanjen u jetri pacova oba pola. Smanjena aktivnost i ekspresija α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u jetri

gojaznih pacova oba pola može biti posledica smanjene aktivacije IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta, uočene u okviru ove doktorske disertacije.

Jedan od signalnih puteva uključenih u regulaciju ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze je ERK1/2 (Al-Khalili i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Koricanac i sar., 2011). Kratkoročne promene aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze u različitim ćelijama i tkivima su direktno ili indirektno povezane sa aktivacijom signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt (Al-Khalili i sar., 2003; Khundmiri i sar., 2004; Shahidullah i sar., 2014). Poznato je da aktivacija ERK1/2 dovodi do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze (Shahidullah i sar., 2017). Al-Khalili i sar. (2004) su pokazali da aktivacija ERK1/2 dovodi do fosforilacije α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u citoplazmi i njene translokacije na plazma membranu. U prilog tome idu rezultati studije Chen i sar. (2009) koji pokazuju da delecija gene za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze u jetri dovodi do povećanja aktivnosti ERK1/2. Raniji rezultati naše grupe pokazuju da estradiol dovodi do povećanja fosforilacije ERK1/2 na $\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$ u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Sudar i sar., 2008) i srcu pacova (Obradovic i sar., 2014), kao i da je ova fosforilacija u korelaciji sa povećanom ekspresijom α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je nivo fosforilacije ERK1/2 na $\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$ povećan kod gojaznih ženki, a smanjen u jetri gojaznih mužjaka pacova što je u saglasnosti sa rezultatima studije Wang i sar. (2015) koji takođe pokazuju smanjen nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri gojaznih mužjaka pacova. Pored toga što ERK1/2 aktivira brojne regulatorne proteine u citoplazmi, aktivirana ERK1/2 može brzo da se translocira u jedro i dalje fosforiliše transkripcione faktore neophodne za ekspresiju različitih gena (Plotnikov i sar., 2011). Na osnovu naših ranijih rezultata (Sudar i sar., 2008; Obradovic i sar., 2014), kao i rezultata drugih autora (Al-Khalili i sar., 2004), može se pretpostaviti da je nepromenjena ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze posledica uticaja endogenih estrogena na aktivaciju ERK1/2 u jetri gojaznih ženki pacova u okviru ove doktorske disertacije.

Podaci iz literature ukazuju na važnu ulogu AMPK u regulaciji Na^+/K^+ -ATPaze na plazma membrani ćelija (Benziane i sar., 2012). U fiziološkim uslovima aktivacija AMPK direktno ili indirektno stimuliše protein fosfatazu 2A (Lecuona i sar., 2006), koja posledično defosforiliše α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze na Ser^{18} , čime se inhibira endocitoza i time povećava nivo i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze na plazma membrani

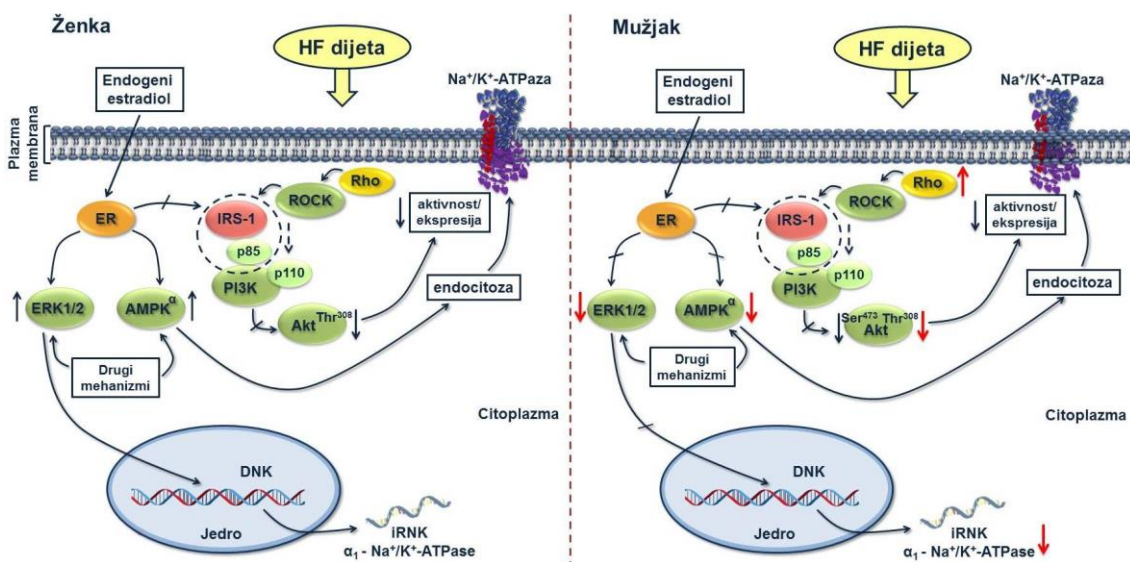
(Benziane i sar., 2012). Međutim, u patofiziološkim stanjima kao što su hipoksija i oksidativni stres, aktivacija AMPK inhibira aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze stimulacijom endocitoze Na^+/K^+ -ATPaze sa plazma membrane (Gusarova i sar., 2009; Gusarova i sar., 2011). Prikazani rezultati ukazuju da je fosforilacija AMPK α na Thr¹⁷² povećana u jetri gojaznih ženki, a smanjena u jetri gojaznih mužjaka pacova. Pokazano je da su estrogeni direktno uključeni u regulaciju aktivacije AMPK u različitim kulturama ćelija (D'Eon i sar., 2008; Rogers i sar., 2009; Kim i sar., 2010; Gayard i sar., 2011; Pedram i sar., 2013; Lipovka i sar., 2015). Lipovka i sar. (2015) su pokazali da estradiol direktno aktivira AMPK posredstvom ER α (negenomski put aktivacije) koji ostvaruje interakcije sa $\beta\gamma$ -vezujućim domenom AMPK α . Takođe, fosforilacija AMPK je smanjena u jetri miševa nakon ovarijektomije, dok kratkoročni tretman estrogenima dovodi do povećanja fosforilacije AMPK (Kim i sar., 2010). Na osnovu rezultata u okviru ove doktorske disertacije, kao i podataka iz literature (Gusarova i sar., 2009; Gusarova i sar., 2011), može se pretpostaviti da endogeni estrogeni aktiviraju AMPK α što može biti razlog smanjene aktivnosti i nivoa α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih ženki pacova. Suprotno, HF ishrana dovodi do smanjenja fosforilacije AMPK α u jetri gojaznih mužjaka pacova, tako da uticaj AMPK α na aktivnost i nivo α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze izostaje. Pored toga što utiče na regulaciju Na^+/K^+ -ATPaze, AMPK je jedan od ključnih molekula uključenih u regulaciju metabolizma lipida i glukoze u jetri (Fryer i Carling, 2005). Stoga, aktivacija AMPK α može biti jedan od razloga izostanka IR kod gojaznih ženki pacova u okviru ove doktorske disertacije. S obzirom da je u ovoj doktorskoj disertaciji pokazana nepromenjena koncentracija SMK, a samnjen nivo FAT/CD36 proteina u jetri gojaznih ženki, za razliku od gojaznih mužjaka kod kojih je uočen poremećaj u metabolizmu SMK i glukoze, i povećan nivo FAT/CD36 proteina u jetri, polne razlike u aktivaciji AMPK α mogu biti razlog veće predisponiranosti gojaznih mužjaka za razvoj IR (Qiang i sar., 2016).

Povećana aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta je uključena u razvoj IR u gojaznosti, ali tačna uloga ovog signalnog puta u regulaciji Na^+/K^+ -ATPaze u jetri još nije izučena. Aktivacijom RhoA dalje se aktivira niz nishodnih ciljnih molekula, uključujući ROCK, najznačajnijeg efektor RhoA. Sve je više dokaza o povećanoj aktivnosti RhoA/ROCK signalne kaskade u patofiziološkim procesima kod gojaznih glodara (Kanda i sar., 2006; Hara i sar., 2011; Lee i sar., 2014; Soliman i sar., 2015;

Soliman i sar., 2016). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja aktivnosti Rho proteina samo u jetri mužjaka pacova, dok je nivo RhoA proteina smanjen samo u jetri gojaznih ženki pacova. Takođe, prikazani rezultati pokazuju da su nivoi ROCK1 i ROCK2 proteina smanjeni u jetri pacova oba pola. Smanjen nivo p85- i p110-PI3K proteina, kao i smanjena asocijacija IRS-1/PI3K-p85 u jetri pacova oba pola, može biti u vezi sa povećanom aktivacijom RhoA/ROCK signalnog puta, imajući u vidu da parcijalna i globalna delecija gena za izoforme ROCK proteina i njihova inhibicija (korišćenjem fasudila) smanjuju fosforilaciju IRS-1 na Ser što dalje omogućava asocijaciju IRS-1/PI3K-p85, čime se sprečava razvoj IR kod ženki i mužjaka miševa (Lee i sar., 2009; Soliman i sar., 2015). S obzirom da je IRS/PI3K/Akt jedan od važnijih signalnih puteva koji su uključeni u regulaciju aktivnosti i ekspresije Na⁺/K⁺-ATP-aze (Al-Khalili i sar., 2003), a da aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta suprimira IRS/PI3K/Akt kaskadu (Lee i sar., 2009), u nedostatku podataka iz literature može se pretpostaviti da aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta negativno deluje na regulaciju aktivnosti i ekspresije Na⁺/K⁺-ATP-aze kod gojaznih mužjaka pacova. Studije koje izučavaju RhoA/ROCK signalni put su uglavnom usmerene na KVS, dok je mali broj studija koje izučavaju ovaj signalni put u jetri gojaznih životinja. Inhibicija RhoA/ROCK signalnog puta ublažava simptome fibroze jetre kod gojaznih dijabetičnih pacova, ukazujući na štetne efekte aktivacije RhoA/ROCK signalnog puta u jetri u gojaznosti (Zhou i sar., 2014). Poznato je da estrogenu učestvuju u regulaciji RhoA/ROCK u KVS (Gayard i sar., 2011), ali je malo studija koje su izučavale ulogu estrogena u regulaciji ovog signalnog puta u jetri (Zhang i sar., 2016). Rezultati studije Zhang i sar. (2016) pokazuju da je aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta povećana u jetri ovarijektomisanih pacova tretiranih ugljen tetrahloridom u cilju razvoja ciroze jetre, kao i da selektivni agonist ER β smanjuje aktivaciju RhoA/ROCK signalnog puta i ublažava simptome ciroze jetre ovarijektomisanih pacova. Gayard i sar. (2011) su pokazali da estradiol dovodi do inhibicije RhoA/ROCK signalnog puta fosforilacijom RhoA proteina na Ser¹⁸⁸. Takođe, u istoj studiji je pokazano da stimulacija ER aktivira AMPK α_1 koja posreduje u fosforilaciji RhoA na Ser¹⁸⁸ i inhibiciji nishodne kaskade. Stoga, prikazani rezultati koji pokazuju da je u jetri gojaznih ženki pacova povećana fosforilacija AMPK α_1 i smanjen nivo RhoA proteina, mogu se objasniti protektivnim efektima endogenih estrogena. U

nedostatku podataka iz literature, pretpostavka je da povećana aktivnost Rho proteina može biti razlog smanjene aktivacije IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta i posledično smanjene ekspresije i aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aze kod gojaznih mužjaka pacova.

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, predlažemo mogući mehanizam regulacije ekspresije Na^+/K^+ -ATP-aze u jetri ženki i mužjaka pacova u gojaznosti (**Slika 23**). Smanjena aktivacija IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta i posledično smanjena ekspresija i aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze mogu biti posledica povećane aktivnosti Rho proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova. Takođe, smanjena aktivacija ERK1/2 i $\text{AMPK}\alpha_1$ u jetri gojaznih mužjaka pacova doprinosi smanjenoj ekspresiji/aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aze. Estrogeni ublažavaju štetne efekte gojaznosti aktivacijom ERK1/2, AMPK i parcijalnom aktivacijom Akt signalnih puteva, što pozitivno utiče na regulaciju ekspresije Na^+/K^+ -ATPaze u jetri gojaznih ženki pacova.



Slika 23. Molekularni mehanizmi regulacije Na^+/K^+ -ATP-aze u jetri ženki i mužjaka pacova u gojaznosti. Akt – protein kinaza B; AMPK – AMP-aktivirajuća protein kinaza; ER – receptor za estrogen; ERK1/2 – kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima; HF ishrana – ishrana obogaćena mastima; IR – rezistencija na insulin; IRS – supstrat receptora za insulin; Na^+/K^+ -ATPaza – natrijum-kalijum adenozin trifosfataza; PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza; Rho – Rho familija GTPaza; ROCK – Rho-vezane protein kinaze; Ser – serin; Thr – treonin, \uparrow – povećana fosforilacija ili aktivnost; \downarrow – smanjena fosforilacija ili aktivnost; crvene strelice na slici ukazuju na polne razlike.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Masa tela je povećana kod gojaznih pacova oba pola, dok je masa jetre povećana samo kod gojaznih mužjaka pacova
2. Koncentracija glukoze, insulina, SMK i holesterola u serumu, kao i HOMA-IR i HOMA- β indeksi su povećani kod gojaznih mužjaka pacova, dok je kod gojaznih ženki pacova koncentracija glukoze u serumu smanjena, a ostali parametri nepromenjeni
3. Koncentracije glukoze je povećana, a nivo GLUT2 proteina je smanjen u jetri gojaznih pacova oba pola, dok su koncentracija SMK i nivo FAT/CD36 proteina povećani u jetri gojaznih mužjaka, za razliku od gojaznih ženki kod kojih je koncentracija SMK nepromenjena, a nivo FAT/CD36 proteina je smanjen
4. Relativna ekspresija gena za iNOS u jetri i koncentracija $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ u plazmi su povećani, a nivo iNOS proteina je smanjen u jetri gojaznih mužjaka, dok kod gojaznih ženki nisu uočene promene
5. Relativna ekspresija gena za α_1 subjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze smanjena je samo u jetri gojaznih mužjaka, dok su nivo proteina α_1 subjedinice Na^+/K^+ -ATPaze i aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze smanjeni u jetri gojaznih pacova oba pola
6. Nivo p65 subjedinice NF κ B je povećan u jetri gojaznih ženki, a nepromenjen u jetri gojaznih mužjaka
7. Nivo IRS-1 je smanjen samo u jetri gojaznih mužjaka, nivo PI3K-p85 je smanjen samo u jetri gojaznih ženki, dok je nivo PI3K-p110 proteina i asocijacija IRS-1 i PI3K-p85 proteina smanjena u jetri gojaznih pacova oba pola

8. Nivo fosforilacije PDK1 na Ser²⁴¹ i Akt na Thr³⁰⁸ je smanjen u jetri gojaznih pacova oba pola, dok je nivo fosforilacije mTOR na Ser²⁴⁸¹ i Akt na Ser⁴⁷³ smanjen samo u jetri gojaznih mužjaka pacova
9. Nivo fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ proteina je povećan u jetri gojaznih ženki, a smanjen u jetri gojaznih mužjaka, dok je nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK na Thr¹⁷² povećan u jetri gojaznih ženki, a smanjen u jetri gojaznih mužjaka pacova
10. Nivo RhoA proteina je smanjen samo u jetri gojaznih ženki, aktivnost Rho proteina je povećana samo u jetri gojaznih mužjaka, dok su nivoi ROCK1 i ROCK2 proteina smanjeni u jetri gojaznih pacova oba pola
11. Nivo ER α je smanjen, dok je nivo ER β proteina nepromenjen u jetri gojaznih ženki i mužjaka pacova.

Rezultati koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, a koji se odnose na na polne razlike u regulaciji aktivnosti i ekspresije iNOS i Na⁺/K⁺-ATP-aze, prvi put ukazuju na postojanje polnih razlika, verovatno posredovanih estradiolom, u regulaciji signalnih molekula mTOR, Akt, ERK1/2, AMPK α i RhoA u jetri gojaznih pacova. Naučni doprinos ove doktorske disertacije je u razumevanju razlika u molekulskim mehanizmima razvoja IR kod gojaznih ženki i mužjaka pacova, što može biti važno za definisanje adekvatnih preventivnih mera i razvoj novih terapijskih pristupa u lečenju komplikacija nastalih u gojaznosti.

7. Literatura

1. Adamian, L., Naveed, H. and Liang, J. (2011) Lipid-binding surfaces of membrane proteins: evidence from evolutionary and structural analysis. *Biochim Biophys Acta.* 4(102): 16.
2. Adams, V., Nehrhoff, B., Spate, U., Linke, A., et al. (2002) Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res.* 54(1): 95-104.
3. Adcock, I. M., Brown, C. R., Kwon, O. and Barnes, P. J. (1994) Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 199(3): 1518-1524.
4. Ahmed-Sorour, H. and Bailey, C. J. (1981) Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis, glycogen formation and gluconeogenesis. *Ann Nutr Metab.* 25(4): 208-212.
5. Ahren, B., Gudbjartsson, T., Al-Amin, A. N., Martensson, H., et al. (1999) Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas.* 18(1): 75-83.
6. Aktan, F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75(6): 639-653.
7. Al-Khalili, L., Kotova, O., Tsuchida, H., Ehren, I., et al. (2004) ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 279(24): 25211-25218.
8. Al-Khalili, L., Yu, M. and Chibalin, A. V. (2003) Na⁺,K⁺-ATPase trafficking in skeletal muscle: insulin stimulates translocation of both alpha 1- and alpha 2-subunit isoforms. *FEBS Lett.* 536(1-3): 198-202.
9. Alessi, D. R. and Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 8(1): 55-62.
10. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7(4): 261-269.
11. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., et al. (2008) Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One.* 3(4): 0002069.
12. Alvaro, D., Alpini, G., Onori, P., Perego, L., et al. (2000) Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats. *Gastroenterology.* 119(6): 1681-1691.
13. Andjelkovic, M., Maira, S. M., Cron, P., Parker, P. J., et al. (1999) Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-

- phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol Cell Biol.* 19(7): 5061-5072.
14. Angele, M. K. and Chaudry, I. H. (2005) Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg.* 390(4): 333-341.
 15. Angelin, B., Backman, L., Einarsson, K., Eriksson, L., et al. (1982) Hepatic cholesterol metabolism in obesity: activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res.* 23(5): 770-773.
 16. Arthur, M. J. (1988) Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J Hepatol.* 6(1): 125-131.
 17. Arystarkhova, E. and Sweadner, K. J. (1997) Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J Biol Chem.* 272(36): 22405-22408.
 18. Asarian, L. and Geary, N. (2002) Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 42(4): 461-471.
 19. Aschenbach, J. R., Steglich, K., Gabel, G. and Honscha, K. U. (2009) Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. *J Physiol Biochem.* 65(3): 251-266.
 20. Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., et al. (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res.* 56: 127-155.
 21. Baek, K. J., Thiel, B. A., Lucas, S. and Stuehr, D. J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem.* 268(28): 21120-21129.
 22. Bagatell, C. J., Knopp, R. H., Rivier, J. E. and Bremner, W. J. (1994) Physiological levels of estradiol stimulate plasma high density lipoprotein2 cholesterol levels in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 78(4): 855-861.
 23. Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., et al. (2017) NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Advances in Therapy.* 34(6): 1291-1326.
 24. Balligand, J. L. and Cannon, P. J. (1997) Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(10): 1846-1858.
 25. Barnes, P. J. and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 336(15): 1066-1071.
 26. Bays, H. E., Fox, K. M. and Grandy, S. (2010) Anthropometric measurements and diabetes mellitus: clues to the "pathogenic" and "protective" potential of adipose tissue. *Metab Syndr Relat Disord.* 8(4): 307-315.
 27. Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., et al. (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol.* 56(4): 952-964.
 28. Bedard, S., Marcotte, B. and Marette, A. (1997) Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J.* 325(Pt 2): 487-493.

29. Benoit, Y. D., Lussier, C., Ducharme, P. A., Sivret, S., et al. (2009) Integrin $\alpha 8 \beta 1$ regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell*. 101(12): 695-708.
30. Benziane, B., Bjornholm, M., Pirkmajer, S., Austin, R. L., et al. (2012) Activation of AMP-activated protein kinase stimulates Na^+, K^+ -ATPase activity in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 287(28): 23451-23463.
31. Bergman, R. N. and Ader, M. (2000) Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 11(9): 351-356.
32. Berk, P. D. and Stump, D. D. (1999) Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 192(1-2): 17-31.
33. Bertorello, A. M. and Katz, A. I. (1993) Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol*. 265(6 Pt 2): F743-755.
34. Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C. and Vanoverschelde, J. L. (2008) Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 79(2): 238-248.
35. Bhuvaneshwari, S. and Anuradha, C. V. (2012) Astaxanthin prevents loss of insulin signaling and improves glucose metabolism in liver of insulin resistant mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 90(11): 1544-1552.
36. Bilezikian, J. P., Morishima, A., Bell, J. and Grumbach, M. M. (1998) Increased Bone Mass as a Result of Estrogen Therapy in a Man with Aromatase Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 339(9): 599-603.
37. Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., West, M. A., et al. (1989) An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med*. 169(4): 1467-1472.
38. Bjorntorp, P. (1992) Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Ann Med*. 24(6): 465-468.
39. Bjorntorp, P. (1990) "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*. 10(4): 493-496.
40. Bjorntorp, P. (1996) The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 20(4): 291-302.
41. Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(13): 5889-5892.
42. Blumer, K. J. and Johnson, G. L. (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci*. 19(6): 236-240.
43. Boden, G. (1999) Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians*. 111(3): 241-248.
44. Boden, G. (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 37(3): 635-646, viii-ix.
45. Boden, G. (1997) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 46(1): 3-10.
46. Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J. V., et al. (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 93(6): 2438-2446.
47. Bonvalet, J. P. (1998) Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl*. 65: S49-56.
48. Boozer, C. N., Schoenbach, G. and Atkinson, R. L. (1995) Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *Am J Physiol*. 268(4 Pt 1): E546-550.

49. Bradbury, M. W. (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(2): G194-198.
50. Bray, G. A. and Yukimura, Y. (1978) Activity of (Na⁺ + K⁺)-ATPase in the liver of animals with experimental obesity. *Life Sci.* 22(18): 1637-1642.
51. Brazil, D. P. and Hemmings, B. A. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 26(11): 657-664.
52. Bril, F. and Cusi, K. (2016) Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The New Complication of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 45(4): 765-781.
53. Brown, P. J. and Konner, M. (1987) An anthropological perspective on obesity. *Ann N Y Acad Sci.* 499: 29-46.
54. Brummer, T., Schmitz-Peiffer, C. and Daly, R. J. (2010) Docking proteins. *FEBS J.* 277(21): 4356-4369.
55. Brussaard, H. E., Gevers Leuven, J. A., Frolich, M., Kluft, C., et al. (1997) Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia.* 40(7): 843-849.
56. Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J. R., et al. (2006) Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia.* 49(3): 588-597.
57. Buettner, R., Scholmerich, J. and Bollheimer, L. C. (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 15(4): 798-808.
58. Bugianesi, E., McCullough, A. J. and Marchesini, G. (2005) Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology.* 42(5): 987-1000.
59. Bulayeva, N. N., Gametchu, B. and Watson, C. S. (2004) Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids.* 69(3): 181-192.
60. Burcelin, R., del Carmen Munoz, M., Guillam, M. T. and Thorens, B. (2000) Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null hepatocytes. Further evidence for the existence of a membrane-based glucose release pathway. *J Biol Chem.* 275(15): 10930-10936.
61. Burcelin, R., Dolci, W. and Thorens, B. (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes.* 49(10): 1643-1648.
62. Burchfield, J. G., Lennard, A. J., Narasimhan, S., Hughes, W. E., et al. (2004) Akt mediates insulin-stimulated phosphorylation of Ndr2: evidence for cross-talk with protein kinase C theta. *J Biol Chem.* 279(18): 18623-18632.
63. Cano, E. and Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 20(3): 117-122.
64. Cantrell, D. A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* 114(Pt 8): 1439-1445.
65. Carani, C., Qin, K., Simoni, M., Faustini-Fustini, M., et al. (1997) Effect of Testosterone and Estradiol in a Man with Aromatase Deficiency. *New England Journal of Medicine.* 337(2): 91-95.

66. Carey, V. J., Walters, E. E., Colditz, G. A., Solomon, C. G., et al. (1997) Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 145(7): 614-619.
67. Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J. and Gamblin, S. J. (2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol.* 7(8): 512-518.
68. Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A. I. and Nieto, N. (2005) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 19(1): 136-138.
69. Carter, S. L., Rennie, C. and Tarnopolsky, M. A. (2001) Substrate utilization during endurance exercise in men and women after endurance training. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280(6): E898-907.
70. Carulli, L., Lonardo, A., Lombardini, S., Marchesini, G., et al. (2006) Gender, fatty liver and GGT. *44((1))*: 278-279.
71. Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., et al. (2005) S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes.* 54(4): 959-967.
72. Catala-Niell, A., Estrany, M. E., Proenza, A. M., Gianotti, M., et al. (2008) Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cell Physiol Biochem.* 22(1-4): 327-336.
73. Chambliss, K. L. and Shaul, P. W. (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 23(5): 665-686.
74. Chan, J. M., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., et al. (1994) Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care.* 17(9): 961-969.
75. Chan, T. O. and Tsichlis, P. N. (2001) PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE.* 2001(66): pe1.
76. Charbonneau, A. and Marette, A. (2010) Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes.* 59(4): 861-871.
77. Charron, M. J., Brosius, F. C., 3rd, Alper, S. L. and Lodish, H. F. (1989) A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(8): 2535-2539.
78. Chavalmane, A. K., Comeglio, P., Morelli, A., Filippi, S., et al. (2010) Sex steroid receptors in male human bladder: expression and biological function. *J Sex Med.* 7(8): 2698-2713.
79. Chen, Y., Cai, T., Wang, H., Li, Z., et al. (2009) Regulation of intracellular cholesterol distribution by Na/K-ATPase. *J Biol Chem.* 284(22): 14881-14890.
80. Chiang, J. Y. L. (2017) Linking Sex Differences in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease to Bile Acid Signaling, Gut Microbiota, and High Fat Diet. *Am J Pathol.* 187(8): 1658-1659.
81. Chibalin, A. V., Ogimoto, G., Pedemonte, C. H., Pressley, T. A., et al. (1999) Dopamine-induced endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem.* 274(4): 1920-1927.

82. Chibalin, A. V., Pedemonte, C. H., Katz, A. I., Feraille, E., et al. (1998) Phosphorylation of the catalytic alpha-subunit constitutes a triggering signal for Na⁺,K⁺-ATPase endocytosis. *J Biol Chem.* 273(15): 8814-8819.
83. Chung, B. H., Hennig, B., Cho, B. H. and Darnell, B. E. (1998) Effect of the fat composition of a single meal on the composition and cytotoxic potencies of lipolytically-releasable free fatty acids in postprandial plasma. *Atherosclerosis.* 141(2): 321-332.
84. Chung, M. T., Lee, Y. M., Shen, H. H., Cheng, P. Y., et al. (2017) Activation of autophagy is involved in the protective effect of 17beta-oestradiol on endotoxaemia-induced multiple organ dysfunction in ovariectomized rats. *J Cell Mol Med.* 21(12): 3705-3717.
85. Ciana, P., Brena, A., Sparaciari, P., Bonetti, E., et al. (2005) Estrogenic activities in rodent estrogen-free diets. *Endocrinology.* 146(12): 5144-5150.
86. Ciana, P., Raviscioni, M., Mussi, P., Vegeto, E., et al. (2003) In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nat Med.* 9(1): 82-86.
87. Clausen, T. (2013) Quantification of Na⁺,K⁺ pumps and their transport rate in skeletal muscle: functional significance. *J Gen Physiol.* 142(4): 327-345.
88. Cleary, M. P., Vasselli, J. R. and Greenwood, M. R. (1980) Development of obesity in Zucker obese (fafa) rat in absence of hyperphagia. *Am J Physiol.* 238(3): E284-292.
89. Corsetti, J. P., Sparks, J. D., Peterson, R. G., Smith, R. L., et al. (2000) Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis.* 148(2): 231-241.
90. Courtney, S., Talbot, S. and Manning, R. (1988) Early effects of oestrogen treatment on lipogenesis de novo and on biosynthesis of triacylglycerol from fatty acids in male chick liver. *Int J Biochem.* 20(1): 73-78.
91. Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S. and Parker, M. G. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 272(32): 19858-19862.
92. Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Ochoa, J. B., et al. (1990) Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg.* 212(4): 462-469; discussion 470-461.
93. D'Eon, T. M., Rogers, N. H., Stancheva, Z. S. and Greenberg, A. S. (2008) Estradiol and the estradiol metabolite, 2-hydroxyestradiol, activate AMP-activated protein kinase in C2C12 myotubes. *Obesity.* 16(6): 1284-1288.
94. D'Eon, T. M., Souza, S. C., Aronovitz, M., Obin, M. S., et al. (2005) Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem.* 280(43): 35983-35991.
95. Dada, L. A., Novoa, E., Lecuona, E., Sun, H., et al. (2007) Role of the small GTPase RhoA in the hypoxia-induced decrease of plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase in A549 cells. *J Cell Sci.* 120(Pt 13): 2214-2222.
96. Dahl, J. L. and Hokin, L. E. (1974) The sodium-potassium adenosinetriphosphatase. *Annu Rev Biochem.* 43(0): 327-356.
97. Dallaire, P., Bellmann, K., Laplante, M., Gelinas, S., et al. (2008) Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of

- peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes*. 57(8): 1999-2011.
98. Dan, H. C., Cooper, M. J., Cogswell, P. C., Duncan, J. A., et al. (2008) Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*. 22(11): 1490-1500.
 99. Darabi, M., Rabbani, M., Ani, M., Zarean, E., et al. (2011) Increased leukocyte ABCA1 gene expression in post-menopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol*. 27(9): 701-705.
 100. De Marinis, E., Martini, C., Trentalance, A. and Pallottini, V. (2008) Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis. *J Endocrinol*. 198(3): 635-643.
 101. Delrue, M. A. and Michaud, J. L. (2004) Fat chance: genetic syndromes with obesity. *Clin Genet*. 66(2): 83-93.
 102. Denzer, C., Thiere, D., Muche, R., Koenig, W., et al. (2009) Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 94(10): 3872-3881.
 103. Di Paolo, S., Teutonico, A., Leogrande, D., Capobianco, C., et al. (2006) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol*. 17(8): 2236-2244.
 104. Ding, M., Wong, J. L., Rogers, N. E., Ignarro, L. J., et al. (1997) Gender differences of inducible nitric oxide production in SJL/J mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 77(1): 99-106.
 105. Djordjic, V., Radisavljevic, S., Milanovic, I., Bozic, P., et al. (2016) WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative in Serbia: a prevalence of overweight and obesity among 6-9-year-old school children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 29(9): 1025-1030.
 106. Dos Santos, E. G., Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Le Moal, V., et al. (2002) Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology*. 143(3): 930-940.
 107. Downward, J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*. 10(2): 262-267.
 108. Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., et al. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 103(2): 253-259.
 109. Drewnowski, A. (2009) Obesity, diets, and social inequalities. *Nutr Rev*. 67(1): 1753-4887.
 110. Duncombe, W. G. (1964) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta*. 9: 122-125.
 111. Dzurba, A., Ziegelhoffer, A., Vrbjar, N., Styk, J., et al. (1997) Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem*. 176(1-2): 113-118.
 112. Eckhoff, D. E., Bilbao, G., Frenette, L., Thompson, J. A., et al. (2002) 17-Beta-estradiol protects the liver against warm ischemia/reperfusion injury and is associated with increased serum nitric oxide and decreased tumor necrosis factor-alpha. *Surgery*. 132(2): 302-309.

113. Efendiev, R., Das-Panja, K., Cinelli, A. R., Bertorello, A. M., et al. (2007) Localization of intracellular compartments that exchange Na,K-ATPase molecules with the plasma membrane in a hormone-dependent manner. *Br J Pharmacol.* 151(7): 1006-1013.
114. Eisenberg, M. L., Maker, A. V., Slezak, L. A., Nathan, J. D., et al. (2005) Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cell Physiol Biochem.* 15(1-4): 51-58.
115. Ellerbroek, S. M., Wennerberg, K. and Burridge, K. (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem.* 278(21): 19023-19031.
116. Ellerhorst, J. A., Ekmekcioglu, S., Johnson, M. K., Cooke, C. P., et al. (2006) Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Oncogene.* 25(28): 3956-3962.
117. Engeli, S., Janke, J., Gorzelniak, K., Bohnke, J., et al. (2004) Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 45(9): 1640-1648.
118. Enzi, G., Gasparo, M., Biondetti, P. R., Fiore, D., et al. (1986) Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am J Clin Nutr.* 44(6): 739-746.
119. Estrany, M. E., Proenza, A. M., Gianotti, M. and Llado, I. (2013) High-fat diet feeding induces sex-dependent changes in inflammatory and insulin sensitivity profiles of rat adipose tissue. *Cell Biochem Funct.* 31(6): 504-510.
120. Evans, M. J., Lai, K., Shaw, L. J., Harnish, D. C., et al. (2002) Estrogen receptor alpha inhibits IL-1beta induction of gene expression in the mouse liver. *Endocrinology.* 143(7): 2559-2570.
121. Ewart, H. S. and Klip, A. (1995) Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol.* 269(2 Pt 1): C295-311.
122. Exton, J. H., Corbin, J. G. and Park, C. R. (1969) Control of gluconeogenesis in liver. IV. Differential effects of fatty acids and glucagon on ketogenesis and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J Biol Chem.* 244(15): 4095-4102.
123. Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Magkos, F., Korenblat, K. M., et al. (2008) Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 134(2): 424-431.
124. Fafournoux, P., Remesy, C. and Demigne, C. (1982) Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high-protein diet. *Biochem J.* 206(1): 13-18.
125. Fattahi, M. R., Niknam, R., Safarpour, A., Sepehrimanesh, M., et al. (2016) The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. *Middle East J Dig Dis.* 8(2): 131-137.
126. Felipe, A., Remesar, X. and Pastor-Anglada, M. (1989) Na⁺-dependent alanine transport in plasma membrane vesicles from late-pregnant rat livers. *Pediatr Res.* 26(5): 448-451.
127. Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Casado, E. J. and Pastor-Anglada, M. (1996) Differential regulation of Na(+)-K(+)-ATPase in the obese Zucker rat. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2): R1123-1129.
128. Fibbi, B., Filippi, S., Morelli, A., Vignozzi, L., et al. (2009) Estrogens regulate humans and rabbit epididymal contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway. *J Sex Med.* 6(8): 2173-2186.

129. Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F. and Simpson, E. R. (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(12): 6965-6970.
130. Franckhauser, S., Munoz, S., Elias, I., Ferre, T., et al. (2006) Adipose overexpression of phosphoenolpyruvate carboxykinase leads to high susceptibility to diet-induced insulin resistance and obesity. *Diabetes.* 55(2): 273-280.
131. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 275(5300): 665-668.
132. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., et al. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 16(18): 1865-1870.
133. Fried, S. K., Bunkin, D. A. and Greenberg, A. S. (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(3): 847-850.
134. Fryer, L. G. and Carling, D. (2005) AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 2): 362-366.
135. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A., et al. (2005) A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 54(5): 1340-1348.
136. Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K. and Tarui, S. (1987) Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism.* 36(1): 54-59.
137. Fuller, W., Eaton, P., Bell, J. R. and Shattock, M. J. (2004) Ischemia-induced phosphorylation of phospholemman directly activates rat cardiac Na/K-ATPase. *FASEB J.* 18(1): 197-199.
138. Fuller, W., Tulloch, L. B., Shattock, M. J., Calaghan, S. C., et al. (2013) Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell Mol Life Sci.* 70(8): 1357-1380.
139. Furukawa, N., Ongusaha, P., Jahng, W. J., Araki, K., et al. (2005) Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metabolism.* 2(2): 119-129.
140. Gaestel, M. (2016) MAPK-Activated Protein Kinases (MKs): Novel Insights and Challenges. *Front Cell Dev Biol.* 3(88).
141. Gallagher, D., Kelley, D. E., Yim, J. E., Spence, N., et al. (2009) Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 89(3): 807-814.
142. Gandhi, G. R., Stalin, A., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., et al. (2013) Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1830(1): 2243-2255.
143. Gao, H., Falt, S., Sandelin, A., Gustafsson, J. A., et al. (2008) Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Mol Endocrinol.* 22(1): 10-22.
144. Gao, Y., Zhang, M., Wu, T., Xu, M., et al. (2015) Effects of D-Pinitol on Insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *J Agric Food Chem.* 63(26): 6019-6026.

145. Garabadu, D. and Krishnamurthy, S. (2017) Metformin attenuates hepatic insulin resistance in type-2 diabetic rats through PI3K/Akt/GLUT-4 signalling independent to bicuculline-sensitive GABAA receptor stimulation. *Pharm Biol.* 55(1): 722-728.
146. Garbacz, W. G., Lu, P., Miller, T. M., Poloyac, S. M., et al. (2016) Hepatic Overexpression of CD36 Improves Glycogen Homeostasis and Attenuates High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Mol Cell Biol.* 36(21): 2715-2727.
147. Garcia-Carrizo, F., Priego, T., Szostaczuk, N., Palou, A., et al. (2017) Sexual Dimorphism in the Age-Induced Insulin Resistance, Liver Steatosis, and Adipose Tissue Function in Rats. *Front Physiol.* 8(445).
148. Garcia-Monzon, C., Majano, P. L., Zubia, I., Sanz, P., et al. (2000) Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol.* 32(2): 331-338.
149. Garty, H. and Karlish, S. J. (2006) Role of FXYD proteins in ion transport. *Annu Rev Physiol.* 68: 431-459.
150. Gayard, M., Guilluy, C., Rousselle, A., Viollet, B., et al. (2011) AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(11): 2634-2642.
151. Geer, E. B. and Shen, W. (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med.* 6 Suppl 1: 60-75.
152. Geer, E. B. and Shen, W. (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med.* 1: 60-75.
153. Geller, D. A., de Vera, M. E., Russell, D. A., Shapiro, R. A., et al. (1995) A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J Immunol.* 155(10): 4890-4898.
154. Gowans, Graeme J., Hawley, Simon A., Ross, Fiona A. and Hardie, D. G. (2013) AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metabolism.* 18(4): 556-566.
155. Gowri, P. M., Sengupta, S., Bertera, S. and Katzenellenbogen, B. S. (2007) Lipin1 regulation by estrogen in uterus and liver: implications for diabetes and fertility. *Endocrinology.* 148(8): 3685-3693.
156. Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., et al. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 48(6): 1270-1274.
157. Griglio, S. and Malewiak, M. I. (1975) Hepatic triglyceride storage and ketonemia in rats fed high fat diets. *Nutr Metab.* 19(3-4): 131-144.
158. Griscavage, J. M., Rogers, N. E., Sherman, M. P. and Ignarro, L. J. (1993) Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol.* 151(11): 6329-6337.
159. Grobholz, R., Hacker, H. J., Thorens, B. and Bannasch, P. (1993) Reduction in the expression of glucose transporter protein GLUT 2 in preneoplastic and neoplastic hepatic lesions and reexpression of GLUT 1 in late stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 53(18): 4204-4211.

160. Grujic, V., Dragnic, N., Radic, I., Harhaji, S., et al. (2010) Overweight and obesity among adults in Serbia: results from the National Health Survey. *Eat Weight Disord.* 15(1-2): e34-42.
161. Gupta, D., Ahmad, F. and Suhail, M. (1991) In Vivo Alloxan Induced Alterations in the Rat Erythrocyte Membrane Bound Adenosine Triphosphatases. *Bioved.* 2(2): 141–146.
162. Gusarova, G. A., Dada, L. A., Kelly, A. M., Brodie, C., et al. (2009) Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Mol Cell Biol.* 29(13): 3455-3464.
163. Gusarova, G. A., Trejo, H. E., Dada, L. A., Briva, A., et al. (2011) Hypoxia leads to Na,K-ATPase downregulation via Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels and AMPK activation. *Mol Cell Biol.* 31(17): 3546-3556.
164. Gustavsson, C., Yassin, K., Wahlstrom, E., Cheung, L., et al. (2010) Sex-different hepatic glycogen content and glucose output in rats. *BMC Biochem.* 11(38): 1471-2091.
165. Ha, S. K. and Chae, C. (2010) Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. *Exp Anim.* 59(5): 595-604.
166. Habets, D. D. J., Coumans, W. A., El Hasnaoui, M., Zarrinashneh, E., et al. (2009) Crucial role for LKB1 to AMPK α 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1791(3): 212-219.
167. Hah, J., Jo, I., Chakrabarti, R. and Jung, C. Y. (1992) Demonstration of an insulin-insensitive storage pool of glucose transporters in rat hepatocytes and HepG2 cells. *J Cell Physiol.* 152(1): 56-63.
168. Halliwell, B. (1997) What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 411(2-3): 157-160.
169. Han, D. H., Hansen, P. A., Host, H. H. and Holloszy, J. O. (1997) Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes.* 46(11): 1761-1767.
170. Hara, Y., Wakino, S., Tanabe, Y., Saito, M., et al. (2011) Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Sci Signal.* 4(157): ra3.
171. Harada, H., Pavlick, K. P., Hines, I. N., Hoffman, J. M., et al. (1985) Selected contribution: Effects of gender on reduced-size liver ischemia and reperfusion injury. *J Appl Physiol.* 91(6): 2816-2822.
172. Hardie, D. G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10): 774-785.
173. Hardie, D. G. (2007) AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metabolism.* 6(5): 339-340.
174. Hardie, D. G. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 144(12): 5179-5183.
175. Hardie, D. G. (1992) Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 1123(3): 231-238.

176. Hasnain, M., Vieweg, W. V. and Hollett, B. (2012) Weight gain and glucose dysregulation with second-generation antipsychotics and antidepressants: a review for primary care physicians. *Postgrad Med.* 124(4): 154-167.
177. Hassouna, A., Obaia, E., Marzouk, S., Rateb, M., et al. (2014) The role of sex hormones in induced-systemic inflammation in female albino rats. *Acta Physiol Hung.* 101(1): 112-127.
178. Hattori, Y., Hattori, S. and Kasai, K. (2003) Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur J Pharmacol.* 481(2-3): 153-158.
179. Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B., et al. (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23): 12729-12734.
180. Herrmann, B. L., Saller, B., Janssen, O. E., Gocke, P., et al. (2002) Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(12): 5476-5484.
181. Hevel, J. M. and Marletta, M. A. (1994) Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* 233: 250-258.
182. Hevener, A., Reichart, D., Janez, A. and Olefsky, J. (2002) Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance. *Diabetes.* 51(6): 1907-1912.
183. Hewitt, K. N., Pratis, K., Jones, M. E. and Simpson, E. R. (2004) Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology.* 145(4): 1842-1848.
184. Hill, J. O., Lin, D., Yakubu, F. and Peters, J. C. (1992) Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 16(5): 321-333.
185. Hirsch, D., Stahl, A. and Lodish, H. F. (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(15): 8625-8629.
186. Ho, J. H., Lee, O. K., Fu, Y. J., Shih, H. T., et al. (2013) An iTRAQ proteomic study reveals an association between diet-induced enhanced fatty acid metabolism and the development of glucose intolerance in prediabetic mice. *J Proteome Res.* 12(3): 1120-1133.
187. Holman, G. D. and Kasuga, M. (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia.* 40(9): 991-1003.
188. Hooper, A. J., Adams, L. A. and Burnett, J. R. (2011) Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res.* 52(4): 593-617.
189. Hossain, P., Kavar, B. and El Nahas, M. (2007) Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med.* 356(3): 213-215.
190. Hossen, M. J., Cho, J. Y. and Kim, D. (2016) PDK1 in NF-kappaB signaling is a target of *Xanthium strumarium* methanolic extract-mediated anti-inflammatory activities. *J Ethnopharmacol.* 190: 251-260.
191. Hoyenga, K. B. and Hoyenga, K. T. (1982) Gender and energy balance: sex differences in adaptations for feast and famine. *Physiol Behav.* 28(3): 545-563.
192. Hresko, R. C., Murata, H. and Mueckler, M. (2003) Phosphoinositide-dependent kinase-2 is a distinct protein kinase enriched in a novel cytoskeletal fraction

- associated with adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem.* 278(24): 21615-21622.
193. <http://rsb.info.nih.gov>. from <http://rsb.info.nih.gov>.
194. Huang, H., Kong, D., Byun, K. H., Ye, C., et al. Rho-kinase Regulates Energy Balance by Targeting Hypothalamic Leptin Receptor Signaling, *Nat Neurosci.* 2012 Oct;15(10):1391-8. Epub 2012 Sep 2 doi:10.1038/nn.3207.
195. Hundal, H. S., Marette, A., Mitumoto, Y., Ramlal, T., et al. (1992) Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem.* 267(8): 5040-5043.
196. Hunter, S. J. and Garvey, W. T. (1998) Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 105(4): 331-345.
197. Iannello, S., Campione, R., Volpicelli, G., Prestipino, M., et al. (1994). Na,K-Adenosine triphosphatase in mouse and human obesity and diabetes, as related to insulin, NEFA and hypertension. *Diabetologia.* Catania, Italy. 37: A133.
198. Iannello, S., Milazzo, P. and Belfiore, F. (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev.* 8(3): 231-251.
199. Iannello, S., Milazzo, P. and Belfiore, F. (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am J Med Sci.* 333(1): 1-9.
200. Iavarone, M., Lampertico, P., Seletti, C., Francesca Donato, M., et al. (2003) The clinical and pathogenetic significance of estrogen receptor-beta expression in chronic liver diseases and liver carcinoma. *Cancer.* 98(3): 529-534.
201. Ibrahimi, A. and Abumrad, N. A. (2002) Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5(2): 139-145.
202. Ikemoto, S., Thompson, K. S., Takahashi, M., Itakura, H., et al. (1995) High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(8): 3096-3099.
203. Inaba, K., Suzuki, S., Ihara, H., Sakaguchi, T., et al. (2005) Sexual dimorphism in endotoxin susceptibility after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol.* 42(5): 719-727.
204. Isenovic, E. R., Divald, A., Milivojevic, N., Grgurevic, T., et al. (2003) Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells. *Metabolism.* 52(4): 482-487.
205. Isenovic, E. R., Jacobs, D. B., Kedeas, M. H., Sha, Q., et al. (2004) Angiotensin II regulation of the Na⁺ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 145(3): 1151-1160.
206. Isenovic, E. R., Meng, Y., Jamali, N., Milivojevic, N., et al. (2004) Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* 13(6): 915-922.

207. Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., et al. (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15(8): 1885-1893.
208. Izpisua, J. C., Barber, T., Cabo, J., Hrelia, S., et al. (1989) Lipid composition, fluidity and enzymatic activities of rat liver plasma and mitochondrial membranes in dietary obese rats. *Int J Obes.* 13(4): 531-542.
209. Jéquier, E. (2002) Pathways to obesity. *Int J Obes.* 26: S12.
210. Jones, M. E., Thorburn, A. W., Britt, K. L., Hewitt, K. N., et al. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23): 12735-12740.
211. Kabir, M., Catalano, K. J., Ananthnarayan, S., Kim, S. P., et al. (2005) Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(2): 2.
212. Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444(7121): 840-846.
213. Kamei, Y., Suzuki, M., Miyazaki, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2005) Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51(2): 110-117.
214. Kanda, T., Wakino, S., Homma, K., Yoshioka, K., et al. (2006) Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB J.* 20(1): 169-171.
215. Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., et al. (2010) Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol.* 24(4): 709-721.
216. Kanuri, B. N., Kanshana, J. S., Rebello, S. C., Pathak, P., et al. (2017) Altered glucose and lipid homeostasis in liver and adipose tissue pre-dispose inducible NOS knockout mice to insulin resistance. *Sci Rep.* 7(41009).
217. Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71: 511-535.
218. Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C. H., et al. (1997) Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes.* 46(11): 1691-1700.
219. Katz, A. I. and Epstein, F. H. (1967) The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. *J Clin Invest.* 46(12): 1999-2011.
220. Kehat, I. and Molkentin, J. D. (2010) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 1188: 96-102.
221. Kelley, C. E., Brown, A. J., Diehl, A. M. and Setji, T. L. (2014) Review of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol.* 20(39): 14172-14184.
222. Kelly, M. J. and Levin, E. R. (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 12(4): 152-156.
223. Kennedy, D. J., Kuchibhotla, S., Westfall, K. M., Silverstein, R. L., et al. (2011) A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res.* 89(3): 604-613.

224. Kerouz, N. J., Horsch, D., Pons, S. and Kahn, C. R. (1997) Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest.* 100(12): 3164-3172.
225. Khan, A. S., Subramaniam, S., Dramane, G., Khelifi, D., et al. (2017) ERK1 and ERK2 activation modulates diet-induced obesity in mice. *Biochimie.* 137: 78-87.
226. Khundmiri, S. J., Bertorello, A. M., Delamere, N. A. and Lederer, E. D. (2004) Clathrin-mediated endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase in response to parathyroid hormone requires ERK-dependent phosphorylation of Ser-11 within the alpha1-subunit. *J Biol Chem.* 279(17): 17418-17427.
227. Kim, J. Y., Jo, K. J., Kim, O. S., Kim, B. J., et al. (2010) Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci.* 87(11-12): 358-366.
228. Kissebah, A. H. and Krakower, G. R. (1994) Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev.* 74(4): 761-811.
229. Koonen, D. P., Jacobs, R. L., Febbraio, M., Young, M. E., et al. (2007) Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* 56(12): 2863-2871.
230. Koricanac, G., Tepavcevic, S., Zakula, Z., Milosavljevic, T., et al. (2011) Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase. *Eur J Pharmacol.* 655(1-3): 23-30.
231. Kotani, K., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kobatake, T., et al. (1994) Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 18(4): 207-202.
232. Koutsari, C., Ali, A. H., Mundi, M. S. and Jensen, M. D. (2011) Storage of circulating free fatty acid in adipose tissue of postabsorptive humans: quantitative measures and implications for body fat distribution. *Diabetes.* 60(8): 2032-2040.
233. Kowluru, R. A., Engerman, R. L. and Kern, T. S. (2000) Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res.* 32(1): 67-74.
234. Kraegen, E. W., Clark, P. W., Jenkins, A. B., Daley, E. A., et al. (1991) Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes.* 40(11): 1397-1403.
235. Kuhl, J., Hilding, A., Ostenson, C. G., Grill, V., et al. (2005) Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia.* 48(1): 35-40.
236. Kuo, P. C., Abe, K. Y. and Schroeder, R. A. (1997) Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 234(2): 289-292.
237. Kushlan, M. C., Gollan, J. L., Ma, W. L. and Ockner, R. K. (1981) Sex differences in hepatic uptake of long chain fatty acids in single-pass perfused rat liver. *J Lipid Res.* 22(3): 431-436.
238. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., et al. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature.* 358(6385): 417-421.

239. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
240. Lara-Castro, C. and Garvey, W. T. (2008) Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 37(4): 841-856.
241. Lax, E. R., Tamulevicius, P., Muller, A. and Schriefers, H. (1983) Hepatic nuclear estrogen receptor concentrations in the rat--influence of age, sex, gestation, lactation and estrous cycle. *J Steroid Biochem*. 19(2): 1083-1088.
242. Lazo, M. and Clark, J. M. (2008) The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*. 28(4): 339-350.
243. Lazo, M., Hernaez, R., Eberhardt, M. S., Bonekamp, S., et al. (2013) Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Epidemiol*. 178(1): 38-45.
244. Lecuona, E., Dada, L. A., Sun, H., Butti, M. L., et al. (2006) Na,K-ATPase alpha1-subunit dephosphorylation by protein phosphatase 2A is necessary for its recruitment to the plasma membrane. *FASEB J*. 20(14): 2618-2620.
245. Lee, D. H., Shi, J., Jeoung, N. H., Kim, M. S., et al. (2009) Targeted disruption of ROCK1 causes insulin resistance in vivo. *J Biol Chem*. 284(18): 11776-11780.
246. Lee, S. H., Huang, H., Choi, K., Lee, D. H., et al. (2014) ROCK1 isoform-specific deletion reveals a role for diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 306(3): E332-343.
247. Legato, M. J. (1997) Gender-specific aspects of obesity. *Int J Fertil Womens Med*. 42(3): 184-197.
248. Lei, F., Zhang, X. N., Wang, W., Xing, D. M., et al. (2007) Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes*. 31(6): 1023-1029.
249. Leinwand, L. A. (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*. 112(3): 302-307.
250. Leturque, A., Brot-Laroche, E. and Le Gall, M. (2009) GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296(5): 17.
251. Levin, E. R. (2001) Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol*. 91(4): 1860-1867.
252. Levin, E. R. (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 20(10): 477-482.
253. Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 74: 49-139.
254. Li, A. C., Brown, K. K., Silvestre, M. J., Willson, T. M., et al. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 106(4): 523-531.
255. Li, D., Sweeney, G., Wang, Q. and Klip, A. (1999) Participation of PI3K and atypical PKC in Na⁺-K⁺-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *Am J Physiol*. 276(6 Pt 2): H2109-2116.

256. Li, S., Zhu, W., Zhang, S. and Chen, J. D. Z. (2017) Chronic intestinal electrical stimulation improves glucose intolerance and insulin resistance in diet-induced obesity rats. *Obesity*. 25(6): 1061-1068.
257. Li, Y., Yang, J., Li, S., Zhang, J., et al. (2011) N-myc Downstream-regulated Gene 2, a Novel Estrogen-targeted Gene, Is Involved in the Regulation of Na(+)/K(+)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(37): 32289-32299.
258. Li, Y., Yang, J., Li, S., Zhang, J., et al. (2011) N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na+/K+-ATPase. *J Biol Chem*. 286(37): 32289-32299.
259. Li, Z., Zhang, Z., Xie, J. X., Li, X., et al. (2011) Na/K-ATPase mimetic pNaKtide peptide inhibits the growth of human cancer cells. *J Biol Chem*. 286(37): 32394-32403.
260. Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., et al. (2001) The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*. 21(21): 7460-7469.
261. Liedtke, S., Schmidt, M. E., Vrieling, A., Lukanova, A., et al. (2012) Postmenopausal sex hormones in relation to body fat distribution. *Obesity*. 20(5): 1088-1095.
262. Lin, M. H., Romsos, D. R., Akera, T. and Leveille, G. A. (1981) Functional correlates of Na+,K+-ATPase in lean and obese (ob/ob) mice. *Metabolism*. 30(5): 431-438.
263. Lionetti, L., Mollica, M. P., Crescenzo, R., D'Andrea, E., et al. (2007) Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int J Obes*. 31(10): 1596-1604.
264. Lipovka, Y., Chen, H., Vagner, J., Price T, J., et al. (2015) Oestrogen receptors interact with the α -catalytic subunit of AMP-activated protein kinase.
265. Liu, C. G., Xu, K. Q., Xu, X., Huang, J. J., et al. (2007) 17Beta-oestradiol regulates the expression of Na+/K+-ATPase beta1-subunit, sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase and carbonic anhydrase iv in H9C2 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 34(10): 998-1004.
266. Liu, Y. F., Herschkovitz, A., Boura-Halfon, S., Ronen, D., et al. (2004) Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol*. 24(21): 9668-9681.
267. Liu, Z., Patil, I. Y., Jiang, T., Sancheti, H., et al. (2015) High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. 10((5)): e0128274.
268. Lonnqvist, F., Thorne, A., Large, V. and Arner, P. (1997) Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(7): 1472-1480.
269. Louet, J. F., LeMay, C. and Mauvais-Jarvis, F. (2004) Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep*. 6(3): 180-185.
270. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1): 265-275.

271. Luiken, J. J., Koonen, D. P., Willems, J., Zorzano, A., et al. (2002) Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*. 51(10): 3113-3119.
272. Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W. and Gores, G. J. (2006) Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis. *J Biol Chem*. 281(17): 12093-12101.
273. Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129(7): 1261-1274.
274. Mao, Y., Wang, J., Yu, F., Li, Z., et al. (2016) Ghrelin protects against palmitic acid or lipopolysaccharide-induced hepatocyte apoptosis through inhibition of MAPKs/iNOS and restoration of Akt/eNOS pathways. *Biomed Pharmacother*. 84: 305-313.
275. Martínez de Morentin, Pablo B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., et al. (2014) Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*. 20(1): 41-53.
276. Mašek, J. and Fábry, P. (1959) High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia*. 15(11): 444-445.
277. Mathie, R. T., Ralevic, V., Alexander, B. and Burnstock, G. (1991) Nitric oxide is the mediator of ATP-induced dilatation of the rabbit hepatic arterial vascular bed. *Br J Pharmacol*. 103(2): 1602-1606.
278. Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28(7): 412-419.
279. Maturana-Teixeira, S., Braga, L. E., Carpi Santos, R., Calaza Kda, C., et al. (2015) The (Na(+)/K (+))-ATPase activity in the developing rat retina: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I). *Cell Mol Neurobiol*. 35(2): 243-254.
280. McFarlane, S. I., Banerji, M. and Sowers, J. R. (2001) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(2): 713-718.
281. McKenna, N. J., Lanz, R. B. and O'Malley, B. W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 20(3): 321-344.
282. Meoli, L., Isensee, J., Zazzu, V., Nabzdyk, C. S., et al. (2014) Sex- and age-dependent effects of Gpr30 genetic deletion on the metabolic and cardiovascular profiles of diet-induced obese mice. *Gene*. 540(2): 210-216.
283. Miceli, V., Cocciadiferro, L., Fregapane, M., Zarccone, M., et al. (2011) Expression of wild-type and variant estrogen receptor alpha in liver carcinogenesis and tumor progression. *Omics*. 15(5): 313-317.
284. Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. (1997) Liver regeneration. *Science*. 276(5309): 60-66.
285. Michea, L., Irribarra, V., Goecke, I. A. and Marusic, E. T. (2001) Reduced Na-K pump but increased Na-K-2Cl cotransporter in aorta of streptozotocin-induced diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(2): H851-858.
286. Miettinen, T. A. (1971) Cholesterol production in obesity. *Circulation*. 44(5): 842-850.
287. Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., et al. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 15(6): 1292-1300.

288. Mimura, M., Makino, H., Kanatsuka, A., Asai, T., et al. (1994) Reduction of erythrocyte (Na(+)-K+)ATPase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Horm Metab Res.* 26(1): 33-38.
289. Misra, A., Garg, A., Abate, N., Peshock, R. M., et al. (1997) Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes Res.* 5(2): 93-99.
290. Mlinar, B., Marc, J., Janez, A. and Pfeifer, M. (2007) Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta.* 375(1-2): 20-35.
291. Mohamed, M. K. and Abdel-Rahman, A. A. (2000) Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol.* 142(3): 307-314.
292. Moore, F., Da Silva, C., Wilde, J. I., Smarason, A., et al. (2000) Up-regulation of p21- and RhoA-activated protein kinases in human pregnant myometrium. *Biochem Biophys Res Commun.* 269(2): 322-326.
293. Mora, A., Lipina, C., Tronche, F., Sutherland, C., et al. (2005) Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochemical Journal.* 385(Pt 3): 639-648.
294. Moran, A., Jacobs, D. R., Jr., Steinberger, J., Steffen, L. M., et al. (2008) Changes in insulin resistance and cardiovascular risk during adolescence: establishment of differential risk in males and females. *Circulation.* 117(18): 2361-2368.
295. Morin, M. J., Karr, S. M., Faris, R. A. and Gruppuso, P. A. (2001) Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281(2): G552-559.
296. Motamed, N., Sohrabi, M., Ajdarkosh, H., Hemmasi, G., et al. (2016) Fatty liver index vs waist circumference for predicting non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 22(10): 3023-3030.
297. Munoz, M. C., Argentino, D. P., Dominici, F. P., Turyn, D., et al. (2006) Irbesartan restores the in-vivo insulin signaling pathway leading to Akt activation in obese Zucker rats. *J Hypertens.* 24(8): 1607-1617.
298. Murdolo, G. and Smith, U. (2006) The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16 Suppl 1: S35-38.
299. Musso, G., Gambino, R. and Cassader, M. (2009) Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research.* 48(1): 1-26.
300. Musunuru, K. (2010) Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids.* 45(10): 907-914.
301. Myers, M. G., Jr. (2004) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 59: 287-304.
302. Nadal-Casellas, A., Amengual-Cladera, E., Proenza, A. M., Llado, I., et al. (2010) Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cell Physiol Biochem.* 26(3): 291-302.
303. Nadal-Casellas, A., Proenza, A. M., Gianotti, M. and Llad, I. (2011) Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats. *Stress.* 14(2): 174-184.

304. Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., et al. (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 392(2): 189-193.
305. Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 269(19): 13725-13728.
306. Nazarian, S., St Peter, J. V., Boston, R. C., Jones, S. A., et al. (2011) Vitamin D3 supplementation improves insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Transl Res.* 158(5): 276-281.
307. Need, A. G., O'Loughlin, P. D., Horowitz, M. and Nordin, B. E. (2005) Relationship between fasting serum glucose, age, body mass index and serum 25 hydroxyvitamin D in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 62(6): 738-741.
308. Nestel, P. J., Schreiber, P. H. and Ahrens, E. H., Jr. (1973) Cholesterol metabolism in human obesity. *J Clin Invest.* 52(10): 2389-2397.
309. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., et al. (2014) Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 384(9945): 766-781.
310. Nigro, M., Santos, A. T., Barthem, C. S., Louzada, R. A., et al. (2014) A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. *Endocrinology.* 155(8): 2881-2891.
311. Nolan, J. J., Ludvik, B., Baloga, J., Reichart, D., et al. (1997) Mechanisms of the kinetic defect in insulin action in obesity and NIDDM. *Diabetes.* 46(6): 994-1000.
312. Nordlie, R. C., Foster, J. D. and Lange, A. J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* 19: 379-406.
313. Noronha, B. T., Li, J. M., Wheatcroft, S. B., Shah, A. M., et al. (2005) Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes.* 54(4): 1082-1089.
314. Nozaki, Y., Fujita, K., Wada, K., Yoneda, M., et al. (2015) Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *BMC Gastroenterol.* 15(42): 015-0269.
315. Nussler, A. K. and Billiar, T. R. (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 54(2): 171-178.
316. Nweze, I. C., Smith, J. W., Zhang, B., Klinge, C. M., et al. (2012) 17beta-Estradiol attenuates cytokine-induced nitric oxide production in rat hepatocyte. *J Trauma Acute Care Surg.* 73(2): 408-412.
317. Oakes, N. D., Cooney, G. J., Camilleri, S., Chisholm, D. J., et al. (1997) Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes.* 46(11): 1768-1774.
318. Obradovic, M. (2013). Efekti estradiola na regulaciju natrijum-kalijumove pumpe i morfologiju srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Belgrade, University of Belgrade.
319. Obradovic, M., Stewart, A. J., Pitt, S. J., Labudovic-Borovic, M., et al. (2014) In vivo effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase expression and activity in rat heart. *Mol Cell Endocrinol.* 388(1-2): 58-68.

320. Obradovic, M., Sudar, E., Zafirovic, S., Stanimirovic, J., et al. (2015) Estradiol in vivo induces changes in cardiomyocytes size in obese rats. *Angiology*. 66(1): 25-35.
321. Obradovic, M., Zafirovic, S., Jovanovic, A., Milovanovic, E. S., et al. (2015) Effects of 17beta-estradiol on cardiac Na/K-ATPase in high fat diet fed rats. *Mol Cell Endocrinol*.
322. Ohlson, L. O., Larsson, B., Svardsudd, K., Welin, L., et al. (1985) The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 34(10): 1055-1058.
323. Oviedo, P. J., Sobrino, A., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., et al. (2011) Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 335(2): 96-103.
324. Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18(49): 6853-6866.
325. Palacios, J., Marusic, E. T., Lopez, N. C., Gonzalez, M., et al. (2004) Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(5): H1793-1800.
326. Pannen, B. H. and Bauer, M. (1998) Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci*. 62(22): 2025-2033.
327. Parola, M. and Robino, G. (2001) Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*. 35(2): 297-306.
328. Pastor-Anglada, M., Remesar, X. and Bourdel, G. (1987) Alanine uptake by liver at midpregnancy in rats. *Am J Physiol*. 252(3 Pt 1): E408-413.
329. Pauta, M., Rotllan, N., Fernandez-Hernando, A., Langhi, C., et al. (2016) Akt-mediated foxo1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology*. 63(5): 1660-1674.
330. Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Harvey, H., et al. (2013) Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci Signal*. 6(276): 2004013.
331. Pelicci, G., Dente, L., De Giuseppe, A., Verducci-Galletti, B., et al. (1996) A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene*. 13(3): 633-641.
332. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Salcini, A. E., Romano, A., et al. (1995) Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene*. 11(5): 899-907.
333. Pellegrini, M., Pallottini, V., Marin, R. and Marino, M. (2014) Role of the sex hormone estrogen in the prevention of lipid disorder. *Curr Med Chem*. 21(24): 2734-2742.
334. Pereira, S., Park, E., Moore, J., Faubert, B., et al. (2015) Resveratrol prevents insulin resistance caused by short-term elevation of free fatty acids in vivo. *Appl Physiol Nutr Metab*. 40(11): 1129-1136.
335. Perreault, M. and Marette, A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*. 7(10): 1138-1143.

336. Petersen, K. F., Dufour, S., Feng, J., Befroy, D., et al. (2006) Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(48): 18273-18277.
337. Petersen, K. F. and Shulman, G. I. (2002) Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 90(5A): 11G-18G.
338. Pettersson, U. S., Walden, T. B., Carlsson, P. O., Jansson, L., et al. (2012) Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One.* 7(9): 25.
339. Petzke, K. J., Riese, C. and Klaus, S. (2007) Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats. *J Nutr Biochem.* 18(6): 400-407.
340. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9).
341. Pierre, S., Bats, A. S. and Coumoul, X. (2011) Understanding SOS (Son of Sevenless). *Biochem Pharmacol.* 82(9): 1049-1056.
342. Plotnikov, A., Chuderland, D., Karamansha, Y., Livnah, O., et al. (2011) Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol.* 31(17): 3515-3530.
343. Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., et al. (2006) Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 113(6): 898-918.
344. Polyzos, S. A., Kountouras, J., Tsatsoulis, A., Zafeiriadou, E., et al. (2013) Sex steroids and sex hormone-binding globulin in postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Hormones.* 12(3): 405-416.
345. Porter, S. A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., et al. (2009) Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care.* 32(6): 1068-1075.
346. Pratchayasakul, W., Sa-Nguanmoo, P., Sivasinprasasn, S., Pintana, H., et al. (2015) Obesity accelerates cognitive decline by aggravating mitochondrial dysfunction, insulin resistance and synaptic dysfunction under estrogen-deprived conditions. *Horm Behav.* 72: 68-77.
347. Qatanani, M. and Lazar, M. A. (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 21(12): 1443-1455.
348. Qiang, X., Xu, L., Zhang, M., Zhang, P., et al. (2016) Demethyleneberberine attenuates non-alcoholic fatty liver disease with activation of AMPK and inhibition of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 472(4): 603-609.
349. Qin, L., Zhao, Y., Zhang, B. and Li, Y. (2017) Amentoflavone improves cardiovascular dysfunction and metabolic abnormalities in high fructose and fat diet-fed rats. *Food Funct.* 23(10).
350. RDS (2012). Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji, Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut".
351. Reaven, G. (2001) Syndrome X. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 3(4): 323-332.
352. Reaven, G. M. (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37(12): 1595-1607.

353. Reaven, G. M., Lithell, H. and Landsberg, L. (1996) Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med.* 334(6): 374-381.
354. Reddy, J. K. and Rao, M. S. (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(5): G852-858.
355. Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E. and Weickert, M. O. (2006) Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol.* 95(3): 136-147.
356. Remesar, X., Arola, L., Palou, A. and Alemany, M. (1981) Body and organ size and composition during the breeding cycle of rats (*Rattus norvegicus*). *Lab Anim Sci.* 31(1): 67-70.
357. Ren, C., Zhang, Y., Cui, W., Lu, G., et al. (2015) A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin. *Int J Biol Macromol.* 72: 951-959.
358. Reue, K. (2017) Sex differences in obesity: X chromosome dosage as a risk factor for increased food intake, adiposity and co-morbidities. *Physiol Behav.* 176: 174-182.
359. Ribas, V., Nguyen, M. T., Henstridge, D. C., Nguyen, A. K., et al. (2010) Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(2): 17.
360. Richardson, J. R., Pipkin, J. A., O'Dell, L. E. and Nazarian, A. (2014) Insulin resistant rats display enhanced rewarding effects of nicotine. *Drug Alcohol Depend.* 140: 205-207.
361. Riley, M., Wu, X., Baker, P. N. and Taggart, M. J. (2005) Gestational-dependent changes in the expression of signal transduction and contractile filament-associated proteins in mouse myometrium. *J Soc Gynecol Investig.* 12(5): e33-43.
362. Rincon, J., Holmang, A., Wahlstrom, E. O., Lonroth, P., et al. (1996) Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment. *Diabetes.* 45(5): 615-621.
363. Rogers, N. H., Witczak, C. A., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., et al. (2009) Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(4): 646-650.
364. Rojas, F. A., Hirata, A. E. and Saad, M. J. (2003) Regulation of insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine.* 21(2): 115-122.
365. Rojas, J. M., Oliva, J. L. and Santos, E. (2011) Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes Cancer.* 2(3): 298-305.
366. Rolfe, D. F. and Brown, G. C. (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 77(3): 731-758.
367. Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., et al. (2005) Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-

- mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 96(11): 1152-1160.
368. Rolli-Derkinderen, M., Toumaniantz, G., Pacaud, P. and Loirand, G. (2010) RhoA phosphorylation induces Rac1 release from guanine dissociation inhibitor alpha and stimulation of vascular smooth muscle cell migration. *Mol Cell Biol.* 30(20): 4786-4796.
369. Rosta, K., Tulassay, E., Enzsoly, A., Ronai, K., et al. (2009) Insulin induced translocation of Na(+)/K(+)-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacologica Sinica.* 30(12): 1616-1624.
370. Ruiz-Montasell, B., Ferrer-Martinez, A., Casado, F. J., Felipe, A., et al. (1994) Coordinate induction of Na(+)-dependent transport systems and Na+,K(+)-ATPase in the liver of obese Zucker rats. *Biochim Biophys Acta.* 1196(1): 45-50.
371. Ruiz-Montasell, B., Martinez-Mas, J. V., Enrich, C., Casado, F. J., et al. (1993) Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett.* 316(1): 85-88.
372. Ruiz, B., Felipe, A., Casado, J. and Pastor-Anglada, M. (1991) Amino acid uptake by liver of genetically obese Zucker rats. *Biochem J.* 280(Pt 2): 367-372.
373. Rusai, K., Prokai, A., Szebeni, B., Meszaros, K., et al. (2011) Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem.* 27(6): 727-738.
374. Saad, M. J., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P. L., et al. (1992) Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 90(5): 1839-1849.
375. Sahai, E. and Marshall, C. J. (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 5(8): 711-719.
376. Sale, E. M. and Sale, G. J. (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci.* 65(1): 113-127.
377. Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414(6865): 799-806.
378. Sambandam, N. and Lopaschuk, G. D. (2003) AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Progress in Lipid Research.* 42(3): 238-256.
379. Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., et al. (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 279(31): 32345-32353.
380. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307(5712): 1098-1101.
381. Sass, G., Koerber, K., Bang, R., Guehring, H., et al. (2001) Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest.* 107(4): 439-447.
382. Satapati, S., Kucejova, B., Duarte, J. A. G., Fletcher, J. A., et al. (2015) Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest.* 125(12): 4447-4462.
383. Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., et al. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced

- Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 275(28): 21722-21729.
384. Scheid, M. P., Marignani, P. A. and Woodgett, J. R. (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol.* 22(17): 6247-6260.
385. Schrauwen, P. (2007) High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc.* 66((1)): 33-41.
386. Sener, G., Arbak, S., Kurtaran, P., Gedik, N., et al. (2005) Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats. *J Surg Res.* 128(1): 70-78.
387. Seppala-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Hakkinen, A. M., Goto, T., et al. (2002) Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7): 3023-3028.
388. Seyda Seydel, G., Kucukoglu, O., Altinbasv, A., Demir, O. O., et al. (2016) Economic growth leads to increase of obesity and associated hepatocellular carcinoma in developing countries. *Ann Hepatol.* 15(5): 662-672.
389. Shadid, S., Koutsari, C. and Jensen, M. D. (2007) Direct free fatty acid uptake into human adipocytes in vivo: relation to body fat distribution. *Diabetes.* 56(5): 1369-1375.
390. Shah, O. J., Wang, Z. and Hunter, T. (2004) Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol.* 14(18): 1650-1656.
391. Shahidullah, M., Mandal, A. and Delamere, N. A. (2017) Src Family Kinase Links Insulin Signaling to Short Term Regulation of Na,K-ATPase in Nonpigmented Ciliary Epithelium. *J Cell Physiol.* 232(6): 1489-1500.
392. Shahidullah, M., Mandal, A., Wei, G. and Delamere, N. A. (2014) Nitric oxide regulation of Na, K-ATPase activity in ocular ciliary epithelium involves Src family kinase. *J Cell Physiol.* 229(3): 343-352.
393. Shen, M., Kumar, S. P. and Shi, H. (2014) Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 17(2): 99-107.
394. Shen, M. and Shi, H. (2015) Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. *Int J Endocrinol.* 294278(10): 27.
395. Shi, H. and Clegg, D. J. (2009) Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav.* 97(2): 199-204.
396. Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y. and Unger, R. H. (1997) Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest.* 100(2): 290-295.
397. Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M. and Unger, R. H. (1998) Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(5): 2498-2502.
398. Shimizu, T., Yu, H. P., Suzuki, T., Szalay, L., et al. (2007) The role of estrogen receptor subtypes in ameliorating hepatic injury following trauma-hemorrhage. *J Hepatol.* 46(6): 1047-1054.
399. Shinozaki, S., Choi, C. S., Shimizu, N., Yamada, M., et al. (2011) Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J Biol Chem.* 286(40): 34959-34975.

400. Simon, F. R., Leffert, H. L., Ellisman, M., Iwahashi, M., et al. (1995) Hepatic Na(+)-K(+)-ATPase enzyme activity correlates with polarized beta-subunit expression. *Am J Physiol.* 269(1 Pt 1): C69-84.
401. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., et al. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 407(6803): 538-541.
402. Simoncini, T., Scorticati, C., Mannella, P., Fadiei, A., et al. (2006) Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol.* 20(8): 1756-1771.
403. Sinha, S., Perdomo, G., Brown, N. F. and O'Doherty, R. M. (2004) Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem.* 279(40): 41294-41301.
404. Siri, P. W. and Ginsberg, H. N. (2003) Ovariectomy leads to increased insulin resistance in human apolipoprotein B transgenic mice lacking brown adipose tissue. *Metabolism.* 52(6): 659-661.
405. Slomiany, B. L. and Slomiany, A. (2002) Nitric oxide as a modulator of gastric mucin synthesis: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *IUBMB Life.* 54(5): 267-273.
406. Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., et al. (2003) Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr.* 77(5): 1192-1197.
407. Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., et al. (2004) Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels: the Hoorn study. *Diabetes Care.* 27(2): 372-377.
408. Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Yudkin, J. S., et al. (2003) Larger thigh and hip circumferences are associated with better glucose tolerance: the Hoorn study. *Obes Res.* 11(1): 104-111.
409. Sodhi, K., Maxwell, K., Yan, Y., Liu, J., et al. (2015) pNaKtide inhibits Na/K-ATPase reactive oxygen species amplification and attenuates adipogenesis. *Sci Adv.* 1(9).
410. Soliman, H., Nyamandi, V., Garcia-Patino, M., Varela, J. N., et al. (2015) Partial deletion of ROCK2 protects mice from high-fat diet-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 309(1): H70-H81.
411. Soliman, H., Varela, J. N., Nyamandi, V., Garcia-Patino, M., et al. (2016) Attenuation of obesity-induced insulin resistance in mice with heterozygous deletion of ROCK2. *Int J Obes (Lond).* 40(9): 1435-1443.
412. Song, R. X., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., et al. (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 16(1): 116-127.
413. Souza-Mello, V., Gregorio, B. M., Cardoso-de-Lemos, F. S., de Carvalho, L., et al. (2010) Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci.* 119(6): 239-250.

414. Sowers, J. R., Sowers, P. S. and Peuler, J. D. (1994) Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis. *J Lab Clin Med.* 123(5): 647-652.
415. Stahlberg, N., Rico-Bautista, E., Fisher, R. M., Wu, X., et al. (2004) Female-predominant expression of fatty acid translocase/CD36 in rat and human liver. *Endocrinology.* 145(4): 1972-1979.
416. Stanley, J. C. (1981) The regulation of glucose production. The role of liver glycogen and gluconeogenesis in the liver and kidney cortex. *Br J Anaesth.* 53(2): 137-146.
417. Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M. D., et al. (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab.* 1(4): 245-258.
418. Stossi, F., Barnett, D. H., Frasor, J., Komm, B., et al. (2004) Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology.* 145(7): 3473-3486.
419. Stratakis, C. A. (2012) Cushing syndrome in pediatrics. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 41(4): 793-803.
420. Stubbins, R. E., Najjar, K., Holcomb, V. B., Hong, J., et al. (2012) Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* 14(1): 58-66.
421. Sudar, E. (2011). Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom, Univerzitet u Beogradu.
422. Sudar, E., Velebit, J., Gluovic, Z., Zakula, Z., et al. (2008) Hypothetical mechanism of sodium pump regulation by estradiol under primary hypertension. *J Theor Biol.* 251(4): 584-592.
423. Sudeep, H. V., Venkatakrisna, K., Patel, D. and Shyamprasad, K. (2016) Biomechanism of chlorogenic acid complex mediated plasma free fatty acid metabolism in rat liver. *BMC Complement Altern Med.* 16(274): 016-1258.
424. Sun, X. J., Goldberg, J. L., Qiao, L. Y. and Mitchell, J. J. (1999) Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes.* 48(7): 1359-1364.
425. Sunny, N. E., Parks, E. J., Browning, J. D. and Burgess, S. C. (2011) Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 14(6): 804-810.
426. Sutherland, L. N., Capozzi, L. C., Turchinsky, N. J., Bell, R. C., et al. (2008) Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(5): 9.
427. Sweadner, K. J. and Goldin, S. M. (1980) Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation. *N Engl J Med.* 302(14): 777-783.
428. Sweadner, K. J., Herrera, V. L., Amato, S., Moellmann, A., et al. (1994) Immunologic identification of Na⁺,K⁺-ATPase isoforms in myocardium. Isoform change in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Circ Res.* 74(4): 669-678.

429. Sweeney, G. and Klip, A. (2001) Mechanisms and consequences of Na⁺,K⁺-pump regulation by insulin and leptin. *Cell Mol Biol.* 47(2): 363-372.
430. Sykiotis, G. P. and Papavassiliou, A. G. (2001) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol.* 15(11): 1864-1869.
431. Szabo, C., Southan, G. J. and Thiemermann, C. (1994) Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26): 12472-12476.
432. SZO (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894).
433. Tan, Z., Xie, N., Cui, H., Moellering, D. R., et al. (2015) Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism. *J Immunol.* 194(12): 6082-6089.
434. Tanko, L. B., Bagger, Y. Z., Alexandersen, P., Larsen, P. J., et al. (2003) Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women. *Circulation.* 107(12): 1626-1631.
435. Taras, M. J., Greenberg, A. E., Hoak, R. D. and Rand, M. C. (1971). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington, DC American Public Health Association.
436. Taylor, B. S., Alarcon, L. H. and Billiar, T. R. (1998) Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry.* 63(7): 766-781.
437. Taylor, B. S., Kim, Y. M., Wang, Q., Shapiro, R. A., et al. (1997) Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg.* 132(11): 1177-1183.
438. Tepavcevic, S., Koricanac, G., Zakula, Z., Milosavljevic, T., et al. (2011) Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters. *Horm Metab Res.* 43(8): 524-530.
439. Therien, A. G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(3): C541-566.
440. Thomas-Moya, E., Gomez-Perez, Y., Fiol, M., Gianotti, M., et al. (2008) Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity.* 16(10): 2232-2238.
441. Tian, J., Li, X., Liang, M., Liu, L., et al. (2009) Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth. *J Biol Chem.* 284(22): 14921-14929.
442. Tinkov, A. A., Popova, E. V., Polyakova, V. S., Kwan, O. V., et al. (2015) Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol.* 29: 176-181.
443. Tolman, K. G., Fonseca, V., Dalpiaz, A. and Tan, M. H. (2007) Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care.* 30(3): 734-743.
444. Torres, S. H., De Sanctis, J. B., de, L. B. M., Hernandez, N., et al. (2004) Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol.* 181(3): 419-427.

445. Trapani, L., Segatto, M. and Pallottini, V. (2012) Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic "power station". *World J Hepatol.* 4(6): 184-190.
446. Tzatsos, A. and Kandror, K. V. (2006) Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 26(1): 63-76.
447. Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., et al. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 389(6654): 990-994.
448. Unger, R. H. (2004) The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell.* 117(2): 145-146.
449. Ursula, B., Margarete, H., Torsten, B., Horst, R., et al. (1989). Compartmentation of Hepatic Fatty-Acid-Binding Protein in Liver Cells and Its Effect on Microsomal Phosphatidic Acid Biosynthesis. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler.* 370: 229.
450. Vague, J. (1956) The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr.* 4(1): 20-34.
451. Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294(5545): 1299-1304.
452. Villa, A., Della Torre, S., Stell, A., Cook, J., et al. (2012) Tetradian oscillation of estrogen receptor alpha is necessary to prevent liver lipid deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(29): 11806-11811.
453. Vrbjar, N., Bernatova, I. and Pechanova, O. (1999) Functional alterations of cardiac (Na,K)-ATPase in L-NAME induced hypertension. *Gen Physiol Biophys.* 18 Suppl 1: 10-12.
454. Wan, G., Ohnami, S. and Kato, N. (2000) Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64(3): 555-561.
455. Wang, L., Xu, F., Zhang, X. J., Jin, R. M., et al. (2015) Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na(+)/K(+)-ATPase/Src/pERK signaling pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 35(4): 490-494.
456. Wang, Y., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C., et al. (2005) Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr.* 81(3): 555-563.
457. Wang, Z., Xu, M., Hu, Z., Hultstrom, M., et al. (2014) Sex-specific prevalence of fatty liver disease and associated metabolic factors in Wuhan, south central China. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 26(9): 1015-1021.
458. Wanyonyi, S., du Preez, R., Brown, L., Paul, N. A., et al. (2017) *Kappaphycus alvarezii* as a Food Supplement Prevents Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Nutrients.* 9(11).
459. Weigt, C., Hertrampf, T., Kluxen, F. M., Flenker, U., et al. (2013) Molecular effects of ER alpha- and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol.* 377(1-2): 147-158.
460. Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 118(Pt 5): 843-846.

461. White, C. N., Figtree, G. A., Liu, C. C., Garcia, A., et al. (2009) Angiotensin II inhibits the Na⁺-K⁺ pump via PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(4): 4.
462. Whiteman, E. L., Cho, H. and Birnbaum, M. J. (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 13(10): 444-451.
463. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79(1): 143-180.
464. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., et al. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27(5): 1047-1053.
465. Williamson, R. M., Price, J. F., Glancy, S., Perry, E., et al. (2011) Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes Care.* 34(5): 1139-1144.
466. Wilson, C. G., Tran, J. L., Erion, D. M., Vera, N. B., et al. (2016) Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology.* 157(2): 570-585.
467. Winter, Y., Sankowski, R. and Back, T. (2013) Genetic determinants of obesity and related vascular diseases. *Vitam Horm.* 91: 29-48.
468. Winzell, M. S. and Ahren, B. (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 53(3): S215-219.
469. Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., et al. (2003) A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 133(4): 1081-1087.
470. Wueest, S., Yang, X., Liu, J., Schoenle, E. J., et al. (2012) Inverse regulation of basal lipolysis in perigonadal and mesenteric fat depots in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302(1): 11.
471. Xiao, W. (2004) Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol.* 1(6): 425-435.
472. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 269(7): 4705-4708.
473. Xu, C. L., Yao, Y. M., Yao, F. H., Yu, Y., et al. (2005) [The mechanisms of extracellular-signal regulated protein kinase pathway in biopterin induction in rats with endotoxic shock]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 43(17): 1127-1131.
474. Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V. M., et al. (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell.* 9(6): 1227-1240.
475. Yang, W. M., Min, K. H. and Lee, W. (2016) Induction of miR-96 by Dietary Saturated Fatty Acids Exacerbates Hepatic Insulin Resistance through the Suppression of INSR and IRS-1. *PLoS One.* 11(12).
476. Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., et al. (2006) Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res.* 16(8): 995-1004.

477. Yaqoob, P., Sherrington, E. J., Jeffery, N. M., Sanderson, P., et al. (1995) Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(3): 297-310.
478. Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., et al. (2005) S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem.* 280(9): 7511-7518.
479. Yeh, C. H., Chou, W., Chu, C. C., So, E. C., et al. (2011) Anticancer agent 2-methoxyestradiol improves survival in septic mice by reducing the production of cytokines and nitric oxide. *Shock.* 36(5): 510-516.
480. Yki-Jarvinen, H. (2010) Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Dig Dis.* 28(1): 203-209.
481. York, D. A., Bray, G. A. and Yukimura, Y. (1978) An enzymatic defect in the obese (ob/ob) mouse: loss of thyroid-induced sodium- and potassium-dependent adenosinetriphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(1): 477-481.
482. Yu, X., McCorkle, S., Wang, M., Lee, Y., et al. (2004) Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia.* 47(11): 2012-2021.
483. Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., et al. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science.* 293(5535): 1673-1677.
484. Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., et al. (2006) Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* 55(8): 2180-2191.
485. Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., et al. (2004) AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem.* 279(46): 47898-47905.
486. Zhang, C. G., Zhang, B., Deng, W. S., Duan, M., et al. (2016) Role of estrogen receptor beta selective agonist in ameliorating portal hypertension in rats with CCl4-induced liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 22(18): 4484-4500.
487. Zhang, W., Wu, R., Zhang, F., Xu, Y., et al. (2012) Thiazolidinediones improve hepatic fibrosis in rats with non-alcoholic steatohepatitis by activating the adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 39(12): 1026-1033.
488. Zhao, Q. and Lee, F. S. (1999) Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem.* 274(13): 8355-8358.
489. Zhou, H., Fang, C., Zhang, L., Deng, Y., et al. (2014) Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, ameliorates hepatic fibrosis in rats with type 2 diabetes. *Chin Med J.* 127(2): 225-231.
490. Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., et al. (2008) Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 134(2): 556-567.
491. Zhou, X., Han, D., Xu, R., Li, S., et al. (2014) A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One.* 9(12).

492. Zhu, J. Z., Dai, Y. N., Wang, Y. M., Zhou, Q. Y., et al. (2015) Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Economy. *Dig Dis Sci.* 60(11): 3194-3202.
493. Zhu, L., Brown, W. C., Cai, Q., Krust, A., et al. (2013) Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes.* 62(2): 424-434.
494. Zhu, L., Martinez, M. N., Emfinger, C. H., Palmisano, B. T., et al. (2014) Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 306(10): 1.
495. Zierath, J. R., Houseknecht, K. L., Gnudi, L. and Kahn, B. B. (1997) High-Fat Feeding Impairs Insulin-Stimulated GLUT4 Recruitment via an Early Insulin-Signaling Defect. *Diabetes.* 46(2): 215-223.

8. Biografija

Julijana S. Stanimirović, rođena 30. jula 1988. godine u Zaječaru, Republika Srbija, završila je Biološki fakultet, smer molekularna biologija i fiziologija, Univerziteta u Beogradu, 2013. godine, odbranivši master rad pod nazivom “Regulacija insucibilne azot-monoksid-sintaze u jetri ženki i mužjaka”, sa ocenom 10.

Od 2013. godine pohađa doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Julijana Stanimirović je 1.5.2014. godine zaposlena u Institutu “Vinča” u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, department „Molekularna endokrinologija i bolesti metabolizma“, gde je kao istraživač saradnik, u potpunosti uradila eksperimentalni deo teze. Veće naučnih oblasti prirodnih nauka na sednici održanoj 22.12.2016. godine donelo je odluku o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Julijane Stanimirović pod nazivom “Polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-kalijumove pumpe u jetri gojaznih pacova”.

Trenutno je angažovana na projektu: „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja” (br. 173033), čiji je rukovodilac dr Esmā R. Isenović, Naučni savetnik. U svom dosadašnjem radu je saradnik na 13 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na 3 rada saopštena na skupu međunarodnog i domaćeg značaja. Glavna oblast njenog naučno-istraživačkog rada je: molekularna endokrinologija, dijabetes, gojaznost i kardiovaskularne bolesti.

9. Prilozi

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Јулијана Станимировић _____

Број индекса _____ Б3007/2013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полне разлике у регулацији експресије и активности индуцибилне азот-
моноксид-синтазе и натријум-калијумове пумпе у јетри гојазних пацова

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____ 14.05.2018 _____

J. Stanimirovic

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јулијана Станимировић

Број индекса Б3007/2013

Студијски програм Биологија

Наслов рада Полне разлике у регулацији експресије и активности

индуцибилне азот-моноксид-синтазе и натријум-калијумове

пумпе у јетри гојазних пацова

Ментор

1. др Есма Исеновић, научни саветник, Универзитет у Београду-
Институт за нуклеарне науке „Винча”
2. др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду-
Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 14.05.2018

J. Stanimirovic

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Полне разлике у регулацији експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе и натријум-калијумове пумпе у јетри гојазних пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

- ① Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ **14.05.2018** _____

