

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Snježana Đ. Romić

**Efekti estradiola u srcu pacova sa  
insulinskom rezistencijom izazvanom  
ishranom bogatom fruktozom**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Snježana Đ. Romić

**Effects of estradiol in the heart of rats  
with fructose-rich diet-induced insulin  
resistance**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**Mentor** Dr Goran Korićanac, naučni savetnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Mentor** Dr Nebojša Jasnić, docent,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu,  
Beograd, Srbija

**Član komisije** Dr Tijana Čulafić, naučni saradnik,  
Institut za nuklearne nauke „Vinča“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## **ZAHVALNICA**

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ pod neposrednim rukovodstvom dr Gorana Korićanca, na projektu 41009 kojim rukovodi prof. dr Gordana Matić.*

*Posebno se zahvaljujem članovima komisije*

*Dr Goranu Korićancu, na definisanju forme i sadržaja ove disertacije, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije, kao i na velikom strpljenju i uvođenju u svet nauke.*

*Dr Nebojši Jasniću, na korektnoj saradnji i korisnim sugestijama.*

*Dr Tijani Čulafić, na pomoći tokom eksperimentalnog rada i korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije, kao i na velikoj pomoći pri tehničkom sređivanju rada. Hvala na svakodnevnoj prijateljskoj podršci i savetima.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Zorici Žakuli, na pomoći i savetima tokom eksperimentalnog rada, i koleginicama dr Snežani Tepavčević i dr Mojci Stojiljković na velikoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela ovog rada i na korisnim sugestijama i savetima, kao i na neizmernoj prijateljskoj podršci. Hvala kolegama Jeleni, Milanu i Mariji na prijateljskoj podršci.*

*Hvala koleginicama dr Marijani Petković i dr Danijeli Vojnović-Milutinović na pomoći pri izradi jednaog dela eksperimentalnog rada.*

*Hvala svim kolegama iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ koji su na bilo koji način doprineli i pomogli u izradi ove doktorske disertacije*

*Hvala mojoj porodici na velikoj podršci tokom svih ovih godina.*

*Hvala Bojanu na velikom strpljenju i neizmernoj podršci.*

## **Efekti estradiola u srcu pacova sa insulinskom rezistencijom izazvanom ishranom bogatom fruktozom**

### **REZIME**

Fruktoza je prirodni šećer, čiji se unos poslednjih decenija dramatično povećao, najvećim delom zbog povećane upotrebe kukuruznog sirupa sa visokim sadržajem fruktoze. Povećan unos fruktoze vodi ka razvoju metaboličkog sindroma kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Pored promena u jetri, adipoznom tkivu i skeletnim mišićima, ishrana bogata fruktozom je praćena i razvojem insulinske rezistencije u srcu. Poznato je da insulin ostvaruje svoje efekte na ćelije srca i da u stanju insulinske rezistencije u srcu dolazi do poremećaja u signalnom putu Akt/eNOS i balansu korišćenja energetskih supstrata. Posledice povećanog unosa fruktoze su polno zavisne, pri čemu je protektivni efekat pripisan estrogenim hormonima. Fiziološke koncentracije estrogena poboljšavaju osetljivost na insulin i deluju kardioprotektivno. Takođe, estradiol utiče na specifično delovanje insulina u srcu.

Cilj ove studije bio je analiza efekta estradiola na procese u srcu regulisane insulinom u stanju insulinske rezistencije izazvane ishranom bogatom fruktozom. Ženke pacova su podvrgnute standardnoj ishrani ili ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze tokom 9 nedelja i ovarijektomisane 2 nedelje pre žrtvovanja, pri čemu je polovina životinja na fruktoznoj ishrani dan nakon ovarijektomije podvrgnuta tretmanu estradiolom. U cilju izučavanja efekata ishrane bogate fruktozom i estradiola na insulinom regulisanu fosforilaciju i unutarćelijsku lokalizaciju ispitivanih molekula, polovina životinja je tretirana insulinom 40 minuta pre žrtvovanja. Analizirani su molekuli iz insulinskog signalnog puta (IRS-1, Akt i ERK1/2), kao i efektorni molekuli čiju funkciju reguliše insulin, kao što su eNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza i molekuli uključeni u transport i metabolizam energetskih supstrata u srcu (GLUT1, GLUT4, CD36, lipin 1 i CPT1) i lipidni profil srca. Ispitivana je ekspresija ovih molekula na nivou proteina, kao i njihova fosforilacija ili unutarćelijska lokalizacija.

Ishrana bogata fruktozom je povećala unos tečnosti i smanjila unos hrane, dok je povećala ukupan kalorijski unos i koncentraciju leptina u plazmi. Estradiol je većim delom poništio štetne efekte ishrane na regulaciju apetita, verovatno preko povećanja

centralne osetljivosti na leptin. Životinje na fruktoznoj ishrani su imale povišene koncentracije triglicerida i insulina u plazmi i povećan HOMA indeks, smanjenu koncentraciju slobodnih masnih kiselina, dok je koncentracija glukoze bila nepromenjena. Estradiol je anulirao većinu efekata ishrane bogate frukozom na biohemijske parametre i tako povećao osetljivost na insulin, pri čemu je dodatno smanjio koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi.

Ni ishrana bogata fruktozom ni estradiolski tretman nisu imali efekta na ERK1/2. Međutim, fruktozna ishrana je smanjila fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>, i fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup>, dok je povećala fosforilaciju eNOS na Thr<sup>495</sup>, što ukazuje na selektivnu supresiju Akt/eNOS signalnog puta u srcu. Tretman estradiolom je anulirao efekte fruktozne ishrane na serinske fosforilacije u molekulima Akt i eNOS, dok uglavnom nije imao efekta na treoninske fosforilacije.

Ishrana bogata fruktozom je ispoljila pozitivne efekte na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-azu u srcu, tako što je povećala sadržaj  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  subjedinicu pumpe u plazma membranskoj frakciji srca, pogotovo u insulinom stimulisanim uslovima, dok je smanjila ukupan proteinski sadržaj  $\alpha 1$  subjedinicu. Estradiol nije uspeo da poništi efekte fruktozne ishrane na subjedinicu pumpe kod ovarijektomisanih ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom.

Životinje na ishrani bogatoj fruktozom su imale smanjen sadržaj GLUT4 u plazma membrani u insulinom stimulisanim uslovima i u mikrozomima niske gustine u bazalnim uslovima, kao i smanjen sadržaj GLUT1 u plazma membrani, što je bilo praćeno povećanim sadržajem ovog transportera u mikrozomima niske gustine samo u insulinom stimulisanim uslovima, kao i povećanjem ukupnog sadržaja transportera u srcu. Tretman životinja na fruktoznoj ishrani estradiolom je smanjio sadržaj GLUT4 u mikrozomima niske gustine, pri čemu je povećao sadržaj transportera u plazma membranskoj frakciji u insulinom stimulisanim uslovima. Estradiol nije uticao na efekte ishrane na sadržaj GLUT1 u plazma membrani, dok je sadržaj ovog transportera u frakciji mikrozoma niske gustine bio smanjen, čak ispod nivoa zabeleženog kod kontrolnih životinja u bazalnim uslovima. Ishrana bogata fruktozom je povećala sadržaj CD36 u plazma membranskoj frakciji i smanjila njegov sadržaj u mikrozomima niske gustine, dok je tretman estradiolom povećao sadržaj transportera u ovoj frakciji, kao i njegov ukupan sadržaj i dodatno povećao sadržaj transportera u plazma membrani. Ovi

rezultati sugerišu da ishrana bogata fruktozom stimuliše preuzimanje masnih kiselina u srcu, pri čemu estradiol potencira efekte fruktozne ishrane na preuzimanje masnih kiselina. Ishrana bogata fruktozom nije uticala na sastav lipida u srcu, dok je estradiolski tretman doveo do taloženja triglicerida različitog sastava.

Rezultati ove studije pokazuju da je estradiol uspeo da popravi neke od štetnih efekata ishrane bogate fruktozom u srcu, na određene efekte ishrane nije imao uticaja, dok je neke potencijalno štetne efekte ishrane čak i potencirao, što može da bude od velike važnosti u kliničkoj praksi prilikom primene supstitucione terapije estradiolom.

**Ključne reči:** estradiol, fruktoza, srce, insulinski signalni put, eNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza, GLUT4, GLUT1, CD36

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna endokrinologija

**UDK broj:** [577.175.6 : 613.263] : 591.412 : 577.175.72 (043.3)

## **Effects of estradiol in the heart of rats with fructose-rich diet-induced insulin resistance**

### **ABSTRACT**

Fructose is natural sugar whose intake has increased dramatically over the past decades, mostly due to increased consumption of high-fructose corn syrup. Increased intake of fructose initiates development of metabolic syndrome phenotype in humans and experimental animals. In addition to changes in liver, adipose tissue and skeletal muscle, fructose-rich diet is accompanied by cardiac insulin resistance. Cardiac muscle is a target of insulin. Insulin resistance is accompanied by disturbances in Akt/eNOS signalling and altered cardiac usage of energetic substrates. Consequences of enhanced fructose intake are shown to be sex-dependent and the protective effect is attributed to estrogens. Physiological concentrations of estrogens improve insulin sensitivity and they are cardioprotective. Also, estrogens affect specific cardiac insulin action.

The aim of the present study was to analyze effects of estradiol on insulin-regulated processes in the heart in insulin resistance state. Female rats were subjected to standard diet or diet containing 10% fructose in drinking water during 9 weeks. Two weeks before sacrifice, all animals were bilaterally ovariectomized and half of the fructose-fed animals were subjected to estradiol replacement treatment, day after ovariectomy. In order to study fructose-rich diet and estradiol effects on the insulin regulated phosphorylations and subcellular localization of analyzed molecules, half of the animals were treated with insulin, 40 min before killing. Insulin signaling molecules (IRS-1, Akt i ERK1/2) were analyzed, as well as insulin regulated effector molecules, such as eNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and molecules involved in the transport and metabolism of energetic substrates in the heart (GLUT1, GLUT4, CD36, lipin 1 i CPTI), as well as profile of cardiac lipids. We examined the protein expression of the molecules, as well as their phosphorylation or subcellular localization.

Fructose-rich diet increased liquid intake and decreased food intake, while it increased total caloric intake and plasma leptin concentration. Estradiol abolished most of the detrimental effects of diet on appetite regulation, probably through increase in central leptin sensitivity. The fructose-fed rats had increased plasma triglycerides and



insulin levels and increased HOMA index, decreased plasma free fatty acid level, while glucose concentration was unaltered. Estradiol annulated most of fructose-rich diet effects on biochemical parameters and thus increased insulin sensitivity, wherein it additionally decreased plasma free fatty acid level.

Neither the diet nor estradiol treatment had a effect on ERK1/2. However fructose diet decreased phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup>, and phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup>, while it increased phosphorylation of eNOS at Thr<sup>495</sup>, implying selective suppression of cardiac Akt/eNOS signalling. Estradiol treatment annulated effects of fructose diet on phosphorylation of serine residues in Akt and eNOS, but mostly had no effect on threonine phosphorylation of the molecules.

Fructose-rich diet exert positive effects on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by increasing level of pump  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 subunit in plasma membrane fraction of cardiac cells, especially in insulin-stimulated conditions, while it decreased total content of  $\alpha$ 1 protein. Estradiol failed to counteract fructose diet effects on subunits of pump in fructose-fed ovariectomized female rats.

Fructose-fed rats had decreased plasma membrane content of GLUT4 in insulin-stimulated conditions and low density microsomes content of GLUT4 in basal conditions, as well as decreased GLUT1 level in the plasma membrane compartment, which was accompanied by increased low density microsomes content of GLUT1 in insulin stimulated conditions and increased total cardiac cells GLUT1 level. Estradiol treatment decreased low density microsomes content of GLUT4, while it increased transporter level in the plasma membrane compartment in insulin-stimulated conditions. Estradiol did not affect the diet effects on GLUT1 plasma membrane content, but GLUT1 low density microsomes content was decreased, even below control value in basal conditions. Fructose-rich diet increased the plasma membranes content of CD36 and decreased its content in low density microsomes fraction, while estradiol treatment increased CD36 content in this compartment, total content of CD36 protein and additionally increased plasma membranes content of transporter. This suggests that fructose-rich diet stimulates fatty acid uptake in the heart, whereby estradiol potentiates the effects of fructose diet on fatty acid uptake. Fructose-rich diet had no effects on composition of cardiac lipids, while estradiol treatment caused accumulation of different triglycerides.

These results indicate that estradiol managed to abrogate some of the detrimental effects of fructose-rich diet in the heart, it had no influence on the specific effects of diet, while it promoted some of the potentially harmful effects of fructose. This could be of particular significance for clinical administration of estrogens.

**Key words:** estradiol, fructose, heart, insulin signaling, eNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, GLUT4, GLUT1, CD36

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Molecular endocrinology

**UDC number:** [577.175.6 : 613.263] : 591.412 : 577.175.72 (043.3)

## SKRAĆENICE

**acil-CoA:** engl. *acyl coenzyme A*

**AF-1:** aktivirajuća funkcija koja ne zavisi od liganda

**AF-2:** aktivirajuća funkcija koja zavisi od liganda

**AMPK:** proteinska kinaza koju aktivira AMP (engl. *AMP-activated protein kinase*)

**AP1:** engl. *activator protein-1*

**AS160:** Akt supstrat od 160kDa

**BCA:** bicinhoninična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*)

**BCIP/NBT:** engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium*

**cGK:** proteinska kinaza koja zavisi od cGMP

**cGMP:** ciklični GMP

**CNS:** centralni nervni sistem

**CPTI:** karnitin palmitoil transferaza I (engl. *carnitine palmitoyltransferase I*)

**DG:** digliceridi

**DHB:** 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina

**ECL:** pojačana hemiluminescencija (engl. *enhanced chemiluminescence*)

**EDTA:** etilendiamino tetrasirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

**eNOS:** endotelna sintaza azot monoksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)

**ER:** receptor za estrogene

**ERA:** engl. *estrogen replacement and atherosclerosis trial*

**ERE:** estrogen responsivni element

**ERK:** kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinases*)

**ERT:** supstituciona terapija estrogenom (engl. *estrogen replacement therapy*)

**FABP:** protein koji vezuje masne kiseline (engl. *fatty acid binding protein*)

**FABPpm:** plazmamembranski FABP

**FAT/CD36:** translokaza masnih kiselina (engl. *fatty acid translocase*)

**FATP:** transportni protein za masne kiseline (engl. *fatty acid transport protein*)

**FFA:** slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acid*)

**fld:** engl. *fatty liver dystrophy*

**GLUT:** transporter za glukozu (engl. *glucose transporter*)

**GRB2:** engl. *growth factor receptor-bound protein 2*

**HDL:** engl. *high-density lipoprotein*

**HERS:** engl. *heart and estrogen/progestin replacement study*

**HFCS:** kukuruzni sirup sa visokim sadržajem fruktoze (engl. *high fructose corn syrup*)

**HOMA:** engl. *homeostasis model assessment*

**HRP:** peroksidaza iz rena (engl. *horse-radish peroxidase*)

**HSP90:** protein toplotnog stresa 90 (engl. *heat shock protein 90*)

**I/R:** ishemija/reperfuzija

**IGF-1:** receptor za faktor rasta sličan insulinu 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*)

**iNOS:** inducibilna NOS

**IR:** receptor za insulin

**IRS:** supstrat receptora za insulin (engl. *insulin receptor substrate*)

**JNK:** c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-jun N-terminal kinases*)

**LDL:** engl. *low-density lipoprotein*

**LDM:** frakcija mikrozoma niske gustine

**LPL:** lipoprotein lipaza

**LVH:** hipertrofija leve komore (engl. *left ventricular hypertrophy*)

**MALDI-TOF:** engl. *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry*

**MAPK:** proteinska kinaza aktivirana mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

**MEK 1/2:** kinaze MAPK

**mTOR:** ciljni molekul za rapamicin kod sisara (engl. *mammalian target of rapamycin*)

**nNOS:** neuralna NOS

**NO:** azot monoksid

**PAP1:** fosfatidat fosfataza 1 (engl. *phosphatidate phosphatase-1*)

**PK1:** kinaza tipa 1 zavisna od PIP3 (engl. *PIP3-dependent kinase 1*)

**PFK:** fosfofruktokinaza

**PGC-1 $\alpha$ :** engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*

**PH domen:** engl. *pleckstrin homology domain*

**PHLPP:** engl. *PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase*

**PI3K:** fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

**PIP3:** fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat

**PKA:** proteinska kinaza A

**PKB/Akt:** proteinska kinaza B

**PKC:** proteinska kinaza C

**PM:** frakcija plazma membrana

**PMSF:** fenilmetilsulfonil fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

**PP2A:** proteinska fosfataza 2A (engl. *protein phosphatase 2A*)

**PPAR $\alpha$ :** engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*

**PTB domen:** domen koji vezuje fosfotirozine (engl. *phosphotyrosine-binding domain*)

**PVDF:** engl. *polyvinyl difluoride*

**Raf:** Ser/Thr specifična kinaza

**Ras:** mala GTP-aza

**SDS PAGE:** SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

**SDS:** natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

**Ser:** serin

**SH2 domen:** engl. *src-homology-2 domain*

**Shc:** protein koji sadrži domen 2 homolog Src (engl. *src homology 2 domain containing protein*)

**SOS:** engl. *son of sevenless*

**SREBP1c:** engl. *sterol regulatory element binding protein 1c*

**TG:** trigliceridi

**Thr:** treonin

**TNF $\alpha$ :** engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$*

**Tyr:** tirozin

**VLDL:** lipoproteini veoma niske gustine (engl. *very low density lipoprotein*)

**WHI-HRT:** engl. *womens health initiative hormone replacement trail*

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	FRUKTOZA.....	2
1.1.1	<i>Fruktoza u ishrani ljudi</i> .....	2
1.1.2	<i>Metabolički efekti ishrane obogaćene fruktozom</i> .....	3
1.1.2.1	<i>Metabolizam fruktoze u jetri</i> .....	3
1.2	INSULIN.....	4
1.2.1	<i>Receptor za insulin</i> .....	5
1.2.2	<i>Signalni put PI3K/Akt</i> .....	7
1.2.3	<i>Signalni put MAPK</i> .....	8
1.3	ENDOTELNA SINTAZA AZOT MONOKSIDA .....	9
1.4	NATRIJUM/KALIJUM-ATP-AZA.....	11
1.5	METABOLIZAM U SRCU U FIZIOLOŠKIM USLOVIMA.....	13
1.5.1	<i>Transport glukoze</i> .....	15
1.5.2	<i>Transport masnih kiselina</i> .....	16
1.5.3	<i>Lipin 1</i> .....	18
1.5.4	<i>Karnitin palmitoil transferaza I</i> .....	19
1.6	INSULINSKA REZISTENCIJA .....	20
1.6.1	<i>Mehanizam nastanka insulinske rezistencije</i> .....	21
1.6.2	<i>Uloga povećanog unosa fruktoze u nastanku insulinske rezistencije</i> .....	24
1.7	ESTRADIOL.....	25
1.7.1	<i>Genomski mehanizam delovanja estrogena</i> .....	26
1.7.1.1	<i>Klasični, ERE-zavisni mehanizam delovanja estrogena</i> .....	26
1.7.1.2	<i>Ligand-nezavisni mehanizam delovanja estrogena</i> .....	27
1.7.1.3	<i>ERE-nezavisni mehanizam delovanja estrogena</i> .....	27
1.7.2	<i>Negenomski mehanizam delovanja estrogena</i> .....	28
1.7.3	<i>Efekti estradiola na osetljivost na insulin</i> .....	28
1.7.4	<i>Efekti estradiola u srcu</i> .....	31
1.7.4.1	<i>Uloga estradiola u fiziologiji srca</i> .....	32
1.7.4.2	<i>Uloga estradiola u patologijama srca</i> .....	33
<b>2</b>	<b>CILJ</b> .....	<b>35</b>

<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>36</b>
3.1	MATERIJAL.....	36
3.1.1	<i>Hemikalije</i> .....	36
3.1.2	<i>Antitela</i> .....	37
3.1.3	<i>Eksperimentalne životinje</i> .....	37
3.2	METODE.....	39
3.2.1	<i>Određivanje biohemijskih parametara</i> .....	39
3.2.1.1	Određivanje koncentracije glukoze u krvi.....	39
3.2.1.2	Određivanje koncentracije triglicerida u krvi.....	39
3.2.1.3	Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi.....	39
3.2.1.4	Određivanje koncentracije insulina u plazmi.....	40
3.2.1.5	Određivanje koncentracije estradiola u plazmi.....	40
3.2.1.6	Određivanje koncentracije leptina u plazmi.....	41
3.2.2	<i>Priprema ćelijskog lizata srca</i> .....	41
3.2.3	<i>Izolovanje plazma membrana i mikrozoma niske gustine iz srca</i> .....	42
3.2.4	<i>Određivanje koncentracije proteina</i> .....	43
3.2.5	<i>SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu</i> .....	43
3.2.6	<i>Western blot</i> .....	44
3.2.7	<i>Izolacija lipida iz srca i MALDI-TOF MS</i> .....	45
3.2.8	<i>Statistička obrada rezultata</i> .....	46
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>47</b>
4.1	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA UNOS HRANE I TEČNOSTI I KALORIJSKI UNOS KOD OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA.....	47
4.2	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA FIZIČKE KARAKTERISTIKE OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA.....	47
4.3	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA.....	48
4.3.1	<i>Koncentracije glukoze i insulina i HOMA indeks</i> .....	48
4.3.2	<i>Koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina</i> .....	49



4.3.3	Koncentracija leptina .....	50
4.3.4	Koncentracija estradiola .....	50
4.4	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	52
4.4.1	Sadržaj proteina i fosforilacija IRS-1 na Ser <sup>307</sup> .....	52
4.4.2	Sadržaj proteina i fosforilacija Akt na Ser <sup>473</sup> i Thr <sup>308</sup> .....	53
4.4.3	Sadržaj proteina i fosforilacija ERK1/2 na Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> .....	55
4.5	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ I FOSFORILACIJU ENDOTELNE SINTAZE AZOT MONOKSIDA U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	57
4.6	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ ALFA 1 I ALFA 2 SUBJEDINICA NATRIJUM/KALIJUM-ATP-AZE U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	59
4.7	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ I UNUTARĆELIJSKU LOKALIZACIJU TRANSPORTERA ZA GLUKOZU I MASNE KISELINE U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	62
4.7.1	Sadržaj GLUT4 u plazma membranama, mikrozomima niske gustine i lizatu srca .....	62
4.7.2	Sadržaj GLUT1 u plazma membranama, mikrozomima niske gustine i lizatu srca .....	64
4.7.3	Sadržaj CD36 u plazma membranama, mikrozomima niske gustine i lizatu srca .....	66
4.8	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ LIPINA 1 I CPT1 U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	69
4.9	EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA LIPIDNI PROFIL SRCA OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA .....	70

<b>5</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>72</b>
5.1	EFEKTI ESTRADIOLA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE KOD PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM.....	75
5.2	EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM.....	78
5.3	EFEKTI ESTRADIOLA NA ENDOTELNU SINTAZU AZOT MONOKSIDA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM .....	82
5.4	EFEKTI ESTRADIOLA NA NATRIJUM/KALIJUM-ATP-AZU U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM.....	84
5.5	EFEKTI ESTRADIOLA NA TRANSPORT ENERGETSKIH SUPSTRATA I METABOLIZAM MASNIH KISELINA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM.....	86
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>96</b>

# 1 UVOD

Tehnološki napredak i povoljniji ekonomski status u zemljama zapadnog sveta tokom prošlog veka su rezultovali sedentarnim načinom života koji je praćen povećanim unosom kalorija, što je dovelo do povećane učestalosti metaboličkog sindroma, epidemije koja je zahvatila i zemlje u razvoju (Rutledge i Adeli, 2007). Metabolički sindrom predstavlja skup patologija, koje obuhvataju gojaznost u predelu stomaka, insulinsku rezistenciju, hiperinsulinemiju, dislipidemiju i hipertenziju i predstavlja rizik za razvoj dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti i bolesti bubrega (Ferder i sar., 2010).

U prvoj polovini 20. veka hipertenzija je bila retka pojava u svim delovima sveta, osim u Evropi (Engleska, Nemačka i Francuska) i SAD. Širenjem zapadne kulture i ishrane, došlo je do značajnih promena. Učestalost hipertenzije u svetu je povećana, pre svega kod grupa ljudi sa nižom socioekonomskom podrškom. Paralelno sa povećanjem učestalosti hipertenzije došlo je do povećanja učestalosti gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i bolesti bubrega. Ovo je bilo praćeno povećanjem broja pacijenata koji obolevaju od moždanog udara, srčane slabosti i infarkta miokarda. Početkom 20. veka bolest koronarnih arterija se javljala samo u Evropi i SAD, da bi 1960. godine Svetska Zdravstvena Organizacija proglasila epidemiju kardiovaskularnih bolesti u svetu (Johnson i sar., 2007).

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrti u svetu, i procenjuje se da će broj ljudi koji umiru od kardiovaskularnih bolesti, uglavnom bolesti srca i moždanog udara, dostići 23,3 miliona do 2030. godine. Preko 80% smrtnih slučajeva od ovih bolesti se dešava u nerazvijenim i srednje razvijenim zemljama i javlja se gotovo jednako kod muškaraca i žena. Glavni ponašajni faktori rizika za razvoj bolesti srca i moždanog udara su nezdrava ishrana, fizička neaktivnost, pušenje i prevelika konzumacija alkohola ([www.who.int](http://www.who.int)).

## 1.1 FRUKTOZA

Iako se namirnice koje sadrže šećer u današnje vreme konzumiraju gotovo u okviru svakog obroka, masovna upotreba šećera u svakodnevnoj ishrani nije počela tako davno. Nakon početka proizvodnje šećera iz šećerne trske (15. vek) i šećerne repe (18. vek) šećer je bio dostupan samo kraljevskim porodicama i bogatim slojevima stanovništva. Masovnija upotreba šećera je počela početkom 20. veka i to prvo u industrijski razvijenim zemljama. Ranih 1970-ih u SAD se pojavio novi zaslađivač, kukuruzni sirup sa visokim sadržajem fruktoze (HFCS, engl. *high fructose corn syrup*), koji je imao prednost u odnosu na konzumni šećer, pre svega po pitanju cene (Johnson i sar., 2007).

### 1.1.1 Fruktoza u ishrani ljudi

Fruktoza je prirodni šećer koji se nalazi u medu (>10% od ukupnog sadržaja šećera) i voću (5–10% od ukupnog sadržaja šećera), kao i u nekim vrstama povrća. Činjenica da mleko i meso, kao i većina povrća, ne sadrže fruktozu, ukazuje na to da su ljudi u maloj meri bili izloženi fruktozi kroz ishranu, pre masovne proizvodnje šećera (Bray, 2007). Fruktoza se takođe nalazi u hrani i kao konstituent disaharida saharoze, koji se sastoji od jednog molekula glukoze i jednog molekula fruktoze povezanih 1-4 glikozidnom vezom (Tran i sar., 2009). Unos fruktoze kod američke populacije se povećao za gotovo 30% u periodu između 1970. i 2000. godine, velikim delom zbog povećane upotrebe HFCS. HFCS nastaje industrijskom enzimskom izomerizacijom glukoze iz kukuruznog skroba u fruktozu. HFCS se intenzivno koristi kao zaslađivač u proizvodnji gaziranih i negaziranih pića, cerealija, hleba i drugih peciva, kandiranog voća, džemova, industrijskih slatkiša i drugih dezerata. Iako HFCS može da sadrži i do 90% fruktoze, HFCS koji se najviše koristi kao zaslađivač u bezalkoholnim pićima sadrži oko 55% fruktoze. Dve trećine od ukupne potrošnje HFCS u SAD potiče iz konzumacije zaslađenih bezalkoholnih pića. Unos kalorija putem konzumacije zaslađenih bezalkoholnih pića i 100% voćnih sokova se povećao sa 242 kcal/dan u periodu između 1977. i 1978. na 270 kcal/dan u periodu od 1999. do 2004 (Bray i sar., 2004; Ferder i sar., 2010).

### 1.1.2 *Metabolički efekti ishrane obogaćene fruktozom*

Prekomeran unos fruktoze, primarno u formi zaslađivača dodatih hrani, epidemiološki je povezan sa razvojem metaboličkog sindroma (Collino, 2011). Na osnovu brojnih podataka Bray i saradnici su zaključili da povećana konzumacija napitaka koji su zaslađeni sa HFCS i sadrže više od 50% slobodne fruktoze ima važnu ulogu u epidemiji gojaznosti (Bray i sar., 2004). Studija na odraslim gojaznim ljudima oba pola je pokazala da konzumacija fruktoze vodi ka dislipidemiji, smanjenoj osetljivosti na insulin i visceralnoj gojaznosti, dok ovi efekti nisu primećeni kod osoba koje su konzumirale glukozu (Stanhope i sar., 2009).

Na osnovu eksperimentalnih studija na različitim životinjskim vrstama, uočeno je da ishrana sa visokim sadržajem fruktoze uzrokuje većinu simptoma metaboličkog sindroma kod životinja, dok ove promene nisu zapažene u animalnim studijama sa ishranom obogaćenom drugim vrstama ugljenih hidrata (Elliott i sar., 2002; Miller i Adeli, 2008). Ishrana različitih vrsta glodara, pre svega pacova, hranom bogatom fruktozom vodi ka razvoju hipertenzije, insulinske rezistencije, poremećene glukozne homeostaze, dislipidemije, i drugih štetnih metaboličkih i kardiovaskularnih efekata, što ih čini pogodnim animalnim modelom metaboličkog sindroma i insulinske rezistencije (Panchal i Brown, 2011; Tran i sar., 2009).

Studije na pacovima hranjenim hranom obogaćenom fruktozom su pokazale da je stepen insulinske rezistencije veći kod mužjaka nego kod ženki (Galipeau i sar., 2002). Takođe, primećeno je da je stepen osetljivosti na ishranu bogatu fruktozom veći kod ovarijektomisanih ženki, pri čemu je protektivni efekat pripisan estrogenim hormonima (Galipeau i sar., 2002).

#### 1.1.2.1 *Metabolizam fruktoze u jetri*

Fruktoza se iz gastrointestinalnog trakta apsorbira preko transportera specifičnog za fruktozu GLUT5. Jedan deo fruktoze se direktno metaboliše u enterocitima, gde se konvertuje u laktat i glukozu. Apsorbovana fruktoza se gotovo u potpunosti metaboliše u jetri preko puta koji je različit od metabolizma glukoze. U jetri, visoko eksprimirani enzim specifičan za fruktozu, fruktokinaza, fosforiliše fruktozu do

fruktoza 1-fosfata, koji se dalje konvertuje do trioza fosfata: dihidroksiaceton fosfata, gliceraldehida i gliceraldehid 3-fosfata, delovanjem enzima aldolaze B i triokinaze. Regulatorni korak u metabolizmu glukoze predstavlja fosforilacija fruktoza 6-fosfata do fruktoza 1,6-difosfata koju katalizuje fosfofruktokinaza (PFK), koja je negativno inhibirana citratom i ATP. Pošto fruktoza zaobilazi enzim PFK, i pošto fruktokinaza i aldolaza B nisu inhibirane ATP i citratom, potencijalno sva fruktoza unesena putem hrane se brzo konvertuje u trioza fosfate u jetri. Ovi supstrati se sukcesivno oksiduju u jetri ili se konvertuju u glukozu i laktat, koji se oslobađaju u cirkulaciju ili se konvertuju u glikogen. Mali, ali značajan deo trioza fosfata se prevodi u alkoholnu komponentu triglicerida (TG), glicerol 3-fosfat, i kroz proces *de novo* lipogeneze, u masne kiseline dugih lanaca koje mogu da budu esterifikovane do TG (Tappy i sar., 2010; Tran i sar., 2009).

Fruktoza poseduje jedinstvenu osobinu, u poređenju sa drugim šećerima, da povećava nivo urične kiseline u plazmi. Zbog izostanka inhibicije fruktokinaze, sva fruktoza koja uđe u ćeliju se brzo fosforiliše, što rezultuje velikom potrošnjom ATP. Ovo vodi ka aktivaciji enzima iz metabolizma purina koji degradiraju adeninske nukleotide do urične kiseline (Collino, 2011; Ferder i sar., 2010).

Fruktoza akutno ne stimuliše oslobađanje insulina i leptina, dva hormona ključna za dugotrajnu regulaciju energetske homeosteze. Insulin i leptin regulišu telesnu masu tako što preko centralnog nervnog sistema (CNS) inhibiraju unos hrane i povećavaju potrošnju energije. Takođe, ishrana bogata fruktozom povećava koncentraciju grelina, hormona koji povećava apetit (Elliott i sar., 2002).

## 1.2 INSULIN

Insulin ima važnu ulogu u različitim aspektima kardiovaskularnog metabolizma i funkcije uključujući metabolizam glukoze i masnih kiselina dugih lanaca, translaciju proteina i vaskularni tonus (Bertrand i sar., 2008). Insulin stimuliše potrošnju glukoze u srcu i tako smanjuje potrošnju kiseonika (za oksidaciju glukoze je potrebno 12% manje kiseonika nego za oksidaciju masnih kiselina, da bi se proizvela ista količina ATP) i povećava srčanu efikasnost (Iliadis i sar., 2011). Takođe, insulin pojačava kontrakciju

kardiomiocita, dok povoljno utiče na relaksaciju srčanog mišića, povećava biogenezu ribozoma i sintezu proteina, stimuliše faktor rasta vaskularnog endotela i tako stimuliše angiogenezu, smanjuje apoptozu i stimuliše preživljavanje ćelija i na kraju poboljšava mikrocirkulaciju u srcu i rezistenciju koronarnih arterija, što vodi ka povećanoj prokrvljenosti srčanog mišića (Iliadis i sar., 2011).

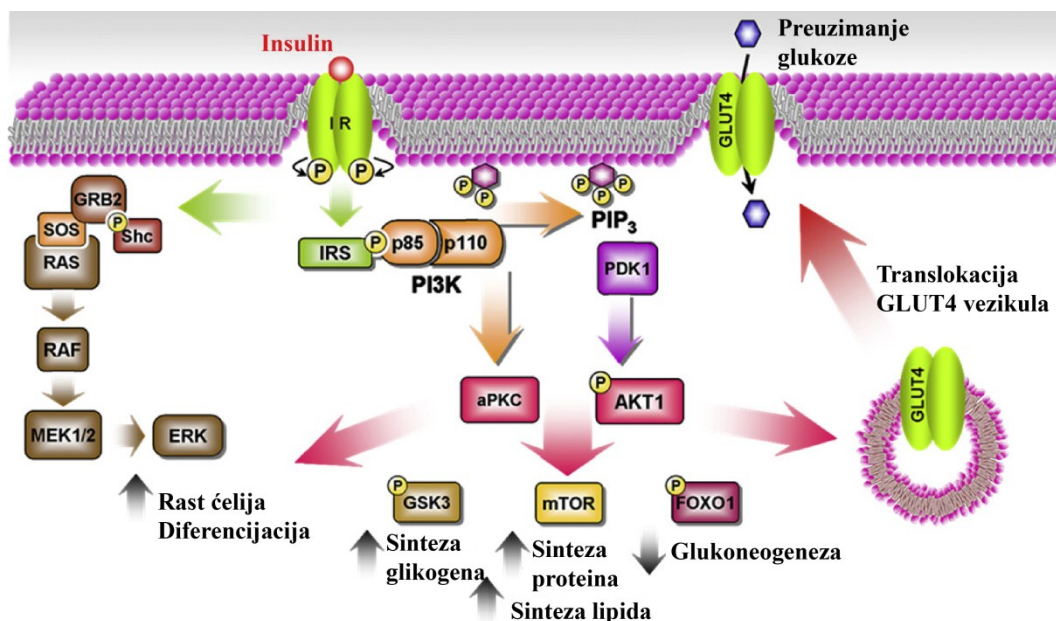
### 1.2.1 Receptor za insulin

Insulin ostvaruje većinu svojih poznatih efekata u srcu preko receptora za insulin (IR) (Slika 1) (Abel, 2004; Belke i sar., 2002). IR pripada superfamiliji transmembranskih receptora koji poseduju aktivnost tirozin (Tyr) kinaze. IR je heterotetramerni enzim koji se sastoji od dve alfa ( $\alpha$ ) (135kDa) i dve beta ( $\beta$ ) (95kDa) subjedinice, povezane disulfidnom vezom u  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  konfiguraciju. Alfa subjedinica je u potpunosti vanćelijska i za nju se vezuje ligand, dok  $\beta$  subjedinica sadrži vanćelijski deo, transmembranski domen i unutarćelijski deo u kome je smešten domen koji poseduje aktivnost proteinske kinaze (DeBosch i Muslin, 2008; Ottensmeyer i sar., 2000).

Insulin se asimetrično vezuje za dva različita, odvojena mesta na dimernom receptoru i tako umrežava monomere receptora (De Meyts, 2004). Vezivanje insulina za specifične regione na  $\alpha$  subjedinici indukuje brze konfiguracione promene u receptoru što vodi ka autofosforilaciji specifičnih Tyr ostataka u unutarćelijskom regionu  $\beta$  subjedinice putem mehanizma transfosforilacije. Autofosforilacija rezultuje aktivacijom Tyr kinazne aktivnosti receptora (Le Roith i Zick, 2001).

Specifično vezivanje insulina za odgovarajući receptor na površini ćelije aktivira kompleksnu mrežu signalnih puteva koji regulišu različite funkcije u ćeliji (Muniyappa i sar., 2007). Aktivirani IR se preko fosfotirozinskih ostataka vezuje za unutarćelijske supstrate, kao što su članovi familije supstrata receptora za insulin (IRS, engl. *insulin receptor substrate*) i protein koji sadrži domen 2 homolog Src (Shc, engl. *src homology 2 domain containing protein*) i fosforiliše ih. Regrutovanje i fosforilacija ovih supstrata aktivira dva glavna signalna puta, put fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*) (Slika 1). Put PI3K predstavlja glavni put u

metaboličkim delovanjima insulina, dok je put MAPK uključen u ćelijski rast i diferencijaciju (Bertrand i sar., 2008) (Slika 1).



**Slika 1. Mehanizam delovanja insulina.** Insulin se vezuje za sopstveni receptor (IR) što rezultuje kaskadom tirozinskih fosforilacija koje generišu nishodne signale. IR fosforiliše IRS i Shc. Fosforilacija IRS vodi aktivaciji signalnog puta PI3K, čiji nishodni članovi regulišu sintezu glikogena, proteina i lipida, glukoneogenezu i transport glukoze u ćeliji. Fosforilacija Shc aktivira signalni put MAPK koji aktivira serin/treonin kinaze odgovorne za ćelijski rast i diferencijaciju. IR: receptor za insulin; IRS: supstrat receptora za insulin; PI3K: fosfaditilinozitol 3-kinaza; PIP<sub>3</sub>: fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat; PDK1: kinaza tipa 1 zavisna od PIP<sub>3</sub>; aPKC: atipična proteinska kinaza C; AKT1: proteinska kinaza B1; GSK3: glikogen sintaza kinaza 3; mTOR: ciljani molekuli za rapamicin kod sisara; FOXO1: (engl. *forkhead box protein O1*); GLUT4: transporter za glukozu 4; Shc: protein koji sadrži domen 2 homolog Src; GRB2: (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*); SOS: (engl. *son of sevenless*); RAS: mala GTP-aza; RAF: serin/treonin specifična kinaza; MEK1/2: MAPK kinaze; ERK: kinaze regulisane vanćelijskim signalima (Tsatsoulis i sar., 2013).

Identifikovano je najmanje 11 unutarćelijskih supstrata IR i receptora za faktor rasta sličnog insulinu 1 (IGF-1 eng. *insulin-like growth factor 1*) od koji šest pripada familiji IRS proteina, koji su imenovani kao IRS 1-6. Svi IRS proteini poseduju konzerviran strukturni domen koji uključuje PH domen (engl. *pleckstrin homology domain*) i domen koji vezuje fosfotirozine (PTB domen, engl. *phosphotyrosine-binding domain*) u N-terminalnom delu, koji su neophodni za interakcije sa ćelijskom membranom i efikasno kuplovanje sa IR. Centralni i C-terminalni deo IRS proteina



sadrži do 20 potencijalnih mesta koja se nakon fosforilacije na Tyr ostacima delovanjem Tyr kinaze IR, vezuju za nishodne signalne molekule koji poseduju SH2 domen (engl. *src-homology-2 domain*) (Taniguchi i sar., 2006; Whitehead i sar., 2000).

Najmanje 4 člana IRS familije su prisutni u srcu (IRS 1–4), pri čemu se pretpostavlja da je IRS-1 najvažniji IRS protein uključen u ćelijski rast posredovan IR u srcu (DeBosch i Muslin, 2008).

Insulin fosforiliše IRS1 na Tyr ostacima, gde fosforilacija Tyr<sup>608</sup> i Tyr<sup>628</sup>, generiše glavno mesto za vezivanje PI3K (Gual i sar., 2005). IRS-1 podleže i fosforilaciji na serinskim (Ser) ostacima delovanjem citokina, slobodnih masnih kiselina (FFA, engl. *free fatty acid*) i insulina. Postoji 70 potencijalnih mesta fosforilacije Ser ostataka na IRS-1, pri čemu se smatra da serinska fosforilacija, kao što je ona na Ser<sup>307</sup> negativno reguliše insulinski signalni put (Taniguchi i sar., 2006).

### 1.2.2 Signalni put PI3K/Akt

Fosfatidilinozitol 3-kinaze su odgovorne za fosforilaciju fosfatidilinozitola na D3 poziciji i mogu da se podele u tri grupe (I, II i III) u zavisnosti od supstratne specifičnosti i načina aktivacije. Klasa I PI3K fosforiliše *in vivo* fosfatidilinozitol 4,5-difosfat do fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PIP3) i može dalje da se podeli u dve podgrupe (a i b) (Hirsch i sar., 2007). Klasa I PI3K je eksprimirana u srcu gde ima važnu ulogu u regulaciji rasta, preživljavanja i kontraktilne funkcije kardiomiocita (Ghigo i sar., 2011; Naga Prasad i sar., 2003). Podgrupa Ia PI3K su heterodimeri sastavljeni od p110 katalitičke subjedinice i p85 regulatorne subjedinice, koja je vezana za katalitičku subjedinicu i drži je u neaktivnom stanju (Hirsch i sar., 2007). p85 regulatorna subjedinica preko SH2 domena interaguje sa fosfotirozinskim ostacima na IRS-1 i na taj način dolazi do regrutacije PI3K do plazma membrane gde katalizuje produkciju PIP3 (Cohen, 2006). U srcu pacova odmah nakon stimulacije insulinom dolazi do autofosforilacije IR i sukcesivne fosforilacije IRS-1 i IRS-2, koji asociraju sa p85 subjedinicom PI3K, nakon čega dolazi do aktivacije p110 katalitičke subjedinice (Velloso i sar., 1998). Akumulirani PIP3 na ćelijskoj membrani indukuje regrutovanje kinaze tipa 1 zavisne od PIP3 (PDK1, engl. *PIP3-dependent kinase 1*) i proteinske kinaze B (PKB)/Akt do plazma membrane preko njihovih PH domena što vodi ka

aktivaciji Akt (Saltiel i Pessin, 2002). Delovanje insulina može da se blokira lipidnim fosfatazama koje defosforilišu PIP3(SHIP2 i PTEN) (Saltiel i Pessin, 2002).

PKB/Akt je solubilni citosolni protein molekulske mase 57 kDa, koji se kod sisara javlja u tri različite izoforme, poznate kao Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) i Akt3 (PKB $\gamma$ ). Akt1 je najviše zastupljena izoforma, sa posebno velikim stepenom ekspresije u mozgu, srcu i plućima. Sve izoforme poseduju tri konzervirana domena: PH domen u N-terminalnom kraju, centralni katalitički kinazni domen srodan proteinskim kinazama A i C (PKA i PKC), koji sadrži treonin (Thr) na poziciji 308 kod Akt1, i C-terminalni regulatorni domen (sadrži Ser<sup>473</sup> kod Akt1) (Matsui i Rosenzweig, 2005; Sale i Sale, 2008).

Vezivanje PIP3 za PH domen Akt indukuje konformacione promene u molekulu Akt što olakšava proces fosforilacije Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> delovanjem ushodnih kinaza (Sale i Sale, 2008). Iako fosforilacija Thr<sup>308</sup> delovanjem PDK1 delimično aktivira Akt, fosforilacija Ser<sup>473</sup> u C-terminalnom regulatornom domenu je neophodna za potpunu aktivnost Akt (Matsui i Rosenzweig, 2005). Pretpostavlja se da je proteinska kinaza koja fosforiliše Akt na Ser<sup>473</sup> specifična forma ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (mTOR, engl. *mammalian target of rapamycin*) vezana za regulatornu subjedinicu, poznatu kao RICTOR (Cohen, 2006).

Insulin stimuliše aktivnost Akt u srcu preko fosforilacije Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> (Soltys i sar., 2002). Akt je uključen u insulinom stimulisanu preuzimanje glukoze u srcu (DeBosch i sar., 2006) i ima važnu ulogu u regulaciji preživljavanja i funkcije kardiomiocita (Matsui i sar., 2001).

Aktivnost Akt reguliše nekoliko inhibitornih molekula, koji uključuju i enzime kao što su proteinska fosfataza 2A (PP2A, engl. *protein phosphatase 2A*) i PHLPP (engl. *PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) (Taniguchi i sar., 2006).

### 1.2.3 Signalni put MAPK

Signalni put MAPK prenosi vanćelijske i ponekad unutarćelijske signale koji vode do različitih bioloških efekata koji menjaju ili fino regulišu ćelijske procese i ekspresiju gena. Signalni put MAPK se sastoji od 3 nivoa kinaza koje čine mrežu umnožavanja signala baziranu na fosforilacijama. MAPK kaskade su generalno

klasifikovane u tri glavne grane, gde su završne kinaze u tročlanoj kaskadi ovih grana p38 kinaza, c-Jun N-terminalne kinaze (JNK, engl. *c-jun n-terminal kinases*) i kinaze regulisane vanćelijskim signalima (ERK, engl. *extracellular signal-regulated kinases*) (Kehat i Molкетин, 2010). U kardiomiocitima MAPK signalnu kaskadu mogu da aktiviraju faktori rasta, angiotenzin II, stres (Bueno i Molкетин, 2002), insulin i agonisti  $\alpha$ 1-adrenalinskog receptora (Wang i sar., 2001).

Adaptorni protein Shc se direktno vezuje za aktivirani IR, pri čemu dolazi do tirozinske fosforilacije Shc, koji se zatim preko fosfotirozinskih ostataka vezuje za SH2 domen GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*). GRB2 prethodno preko SH3 domena regrutuje iz citosola do plazma membrane faktor razmene guaninin nukleotida SOS (engl. *son of sevenless*). Vezivanje kompleksa GRB/SOS za Shc aktivira malu GTP-azu Ras, tako što ubrzava zamenu GDP za GTP (Brownsey i sar., 1997; McKay i Morrison, 2007). Aktivirana Ras se vezuje za NH2-terminalni region Ser/Thr specifične kinaze Raf, što vodi ka translokaciji Raf do plazma membrane. Ras-Raf interakcija uklanja 14-3-3 protein sa Raf kinaze, što omogućava njenu aktivaciju delovanjem Ser/Thr kinaza (Le Roith i Zick, 2001). Raf fosforiliše (i aktivira) dve izoforme kinaze MAPK (MEK1 i MEK2) na dva Ser ostatka. MEK1 ili MEK2 zatim fosforiliše Thr i Tyr ostatke u ERK 1 i 2, i tako aktivira ove vrste i u citoplazmi i u nukleusu (Sugden, 2003). ERK1 i ERK2 su 83% identične, i dele većinu signalnih aktivnosti, i kao posledica toga obično se pominju kao ERK1/2. Aktivirani ERK1/2 zatim može da fosforiliše nishodne molekule u citoplazmi i nukleusu, uključujući i mnoge transkripcione faktore. Put ERK1/2 je uključen u razvoj srca, preko njihove uloge u prenosu signala faktora rasta, a isto tako ima ulogu u raznim patologijama srca kao što su hipertrofija, remodelovanje srca i apoptoza (Rose i sar., 2010).

### 1.3 ENDOTELNA SINTAZA AZOT MONOKSIDA

Endotelna sintaza azot monoksida (eNOS, engl. *endothelial nitric oxide synthase*) je enzim iz familije azot monoksid (NO) sintaza, koje katalizuju oksidaciju L-arginina do L-citrulina i NO, u reakciji koja zahteva prisustvo velikog broja različitih kofaktora. NO je unutar- i interćelijski signalni molekul, koji reguliše različite

fiziološke i patološke procese, sa posebnom ulogom u regulaciji kardiovaskularne homeostaze (Fleming i Busse, 2003; Kukreja i Xi, 2007). Klonirane su tri izoforme NOS: neuralna NOS (nNOS), inducibilna NOS (iNOS) i eNOS. U srcu sisara su eksprimirane sve tri izoforme NOS u različitim tipovima ćelija, uključujući i kardiomiocite. U kardiomiocitima različite izoforme su eksprimirane u različitim subćelijskim kompartmanima (Massion i sar., 2005).

eNOS, kao i sve NOS sadrže dva funkcionalno različita domena, N-terminalni oksigenazni domen koji sadrži mesta za vezivanje hema, BH<sub>4</sub> i L-arginina i C-terminalni reduktazni domen, gde se nalaze mesta za vezivanje FAD, FMN i NADPH. Ova dva domena su povezana mestom za prepoznavanje kalmodulina. Takođe sve NOS forme funkcionišu u obliku dimera koji je stabilizovan pomoću hema, L-arginina, kao i BH<sub>4</sub> (Alderton i sar., 2001). eNOS je jedina izoforma NOS koja je dvojako acetilovana miristinском i palmitinском kiselinom. Ova dvojaka acetilacija je neophodna za uspešno vezivanje eNOS za invaginacije plazma membrane, kaveole (Feron i Balligand, 2006). eNOS u kaveolama interaguje sa kaveolinom-3 u kardiomiocitima (Knowles i sar., 2011) i kaveolinom-1 u endotelijalnim ćelijama, što obezbeđuje pravilno vezivanje za kaveole i održava eNOS u inhibiranom, neaktivnom stanju (Feron i Balligand, 2006). Povećanje unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup> jona dovodi do formiranja kompleksa Ca<sup>2+</sup> i kalmodulina, koji se zatim vezuje za eNOS, pri čemu dolazi do disocijacije eNOS od kaveolina i iniciranja njene katalitičke aktivnosti (Michel i sar., 1997a; Michel i sar., 1997b).

eNOS je takođe regulisana fosforilacijom na Ser, Thr i Tyr ostacima. Najznačajnija mesta fosforilacije su Ser<sup>1177</sup> (za humani eNOS) i Ser<sup>1179</sup> (za goveđi eNOS) u reduktaznom domenu i Thr<sup>495</sup> (za humani eNOS) i Thr<sup>497</sup> (za goveđi eNOS) u okviru kalmodulin vezujućeg domena (Fleming i Busse, 2003). Insulin stimuliše fosforilaciju Ser<sup>1177</sup> (Andreozzi i sar., 2007) odnosno Ser<sup>1179</sup> aktivacijom puta PI3K/Akt, mehanizom koji ne zavisi od Ca<sup>2+</sup> (Montagnani i sar., 2001). eNOS asocira sa proteinom toplotnog stresa 90 (HSP90, engl. *heat shock protein 90*), koji takođe asocira sa Akt sprečavajući njegovu defosforilaciju. Nastali kompleks ubrzava fosforilaciju i aktivaciju eNOS. HSP90 takođe ubrzava disocijaciju eNOS od kaveolina vezivanjem kalmodulina (Balligand, 2002; Fleming i Busse, 2003). Thr<sup>495</sup> je konstitutivno fosforilisan u endotelijalnim ćelijama, što uzrokuje smanjenje enzimske

aktivnosti eNOS, pri čemu insulin smanjuje fosforilaciju Thr<sup>495</sup> (Andreozzi i sar., 2007). Biohemijski put koji čine IR, IRS-1, PI3K i Akt ima važnu ulogu u vazodilatatornom delovanju insulina, tako što aktivira eNOS i stimuliše produkciju NO u vaskularnom endotelu (Montagnani i sar., 2002; Zeng i sar., 2000).

Signalni putevi koje aktivira NO imaju veoma važnu ulogu u održavanju kardiovaskularne homeostaze. U glatkim mišićnim ćelijama vaskulature NO stimuliše vazorelaksaciju, što rezultira smanjenjem krvnog pritiska. NO većinu efekata ostvaruje preko stimulacije proizvodnje unutarćelijskog cikličnog GMP (cGMP), koji zatim aktivira proteinsku kinazu koja zavisi od cGMP (cGK) (Feil i sar., 2003). Najveći deo endogenog NO u srcu potiče iz endotelijalnih ćelija koronarne vaskulature i ostvaruje parakrine efekte u srcu (Massion i sar., 2003). NO oslobođen iz koronarnog endotela najznačajnije efekte postiže delovanjem na relaksaciju kardiomiocita, preko fosforilacije troponina I dejstvom cGK, koja vodi ka smanjenju osetljivosti miofilamenata na Ca<sup>2+</sup> (Seddon i sar., 2007). eNOS je takođe eksprimirana u kardiomiocitima, gde preko autokrinih efekta NO doprinosi regulaciji kontrakcije srčanog mišića. (Seddon i sar., 2007).

NO ispoljava efekte i na druge funkcije kardiomiocita kao što su potrošnja kiseonika, metabolizam supstrata i ćelijski rast i preživljavanje (Massion i sar., 2005)

#### 1.4 NATRIJUM/KALIJUM-ATP-aza

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza održava elektrohemijski gradijent Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> jona i samim tim i membranski potencijal, koji nastaje kao posledica različite propustljivosti membrane za ove jone (Sweeney i Klip, 1998). Ova membranska pumpa posreduje u aktivnom transportu Na<sup>+</sup> jona iz ćelije i K<sup>+</sup> jona u ćeliju i identifikovana je u gotovo svim životinjskim tkivima, uključujući i humani srčani mišić (Schwinger i sar., 2003). Pumpa katalizuje transfer tri unutarćelijska Na<sup>+</sup> jona u zamenu za dva vanćelijska K<sup>+</sup> jona i pri tome koristi energiju koja nastaje hidrolizom jednog molekula ATP (Sweeney i Klip, 1998). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aza ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog volumena, pH citoplazme i nivoa jona Ca<sup>2+</sup> preko Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> i Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmenjivača, redom, kao i u

pokretanju procesa sekundarnog transporta, kao što su  $\text{Na}^+$ -zavisani transporti glukoze i aminoskiselina (Therien i Blostein, 2000).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aza je heterodimer sastavljen od dve subjedinice, katalitičke  $\alpha$  subjedinice koja pumpa  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jone i  $\beta$  subjedinice. Alfa subjedinica sadrži mesta za vezivanje  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP i kardijskih (*digitalis*) glikozida i njena transportna aktivnost zavisi od  $\beta$  subjedinice. Beta subjedinica je glikoprotein i uključena je u transport funkcionalnog enzima od endoplazmatičnog retikuluma (mesto sinteze) do plazma membrane. U nekim tkivima je eksprimirana i  $\gamma$  subjedinica, koja ima regulatornu ulogu (Clausen, 2003). Identifikovane su četiri izoforme  $\alpha$  subjedinice i tri izoforme  $\beta$  subjedinice, pri čemu su  $\alpha 1$ – $\alpha 3$  subjedinice eksprimirane u velikom broju tkiva, dok je  $\alpha 4$  subjedinica identifikovana jedino u testisima pacova (Bers i sar., 2003). U odraslom humanom srcu su eksprimirane sve tri izoforme  $\alpha$  subjedinice zajedno sa  $\beta 1$  (Shamraj i sar., 1991), za razliku od srca pacova gde je  $\alpha 3$  subjedinica predominantno fetalna izoforma, a  $\alpha 2$  adultna izoforma (Bers i sar., 2003). U skeletnim mišićima pumpa je smeštena u sarkolemi, t-tubulima kao i unutarćelijskim depoima, ali precizna identifikacija ovog pula nije u potpunosti poznata (Clausen, 2003).

Aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze je regulisana koncentracijom supstrata ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i ATP), asocijacijom sa membranskim komponentama (kao što su elementi citoskeleta), endogenim cirkulišućim inhibitorima, kao i različitim hormonima, kratkoročnom i dugoročnom regulacijom (Therien i Blostein, 2000). Kratkoročna regulacija se postiže mehanizmima kao što su povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  (kao posledica povećanog  $\text{Na}^+$  influksa), fosforilacija/defosforilacija, translokacija subjedinica do plazma membrane ili povećanje afiniteta za  $\text{Na}^+$  jone. Dugoročna regulacija uključuje promene u transkripciji gena, translaciji i degradaciji proteina (Sweeney i Klip, 1998).

Translokacija subjedinica pumpe iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane predstavlja glavni mehanizam regulacije aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze insulinom u skeletnim mišićima (Sweeney i Klip, 1998). Insulin stimuliše translokaciju  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  subjedinica do plazma membrane u skeletnim mišićima, mehanizmom koji uključuje aktivaciju PI3K puta i atipičnih PKC (Al-Khalili i sar., 2003) i ERK1/2 (Al-Khalili i sar., 2004) i to u većoj meri translokaciju  $\alpha 2$  subjedinice.

Regulacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze je posebno važna u srčanom mišiću, gde enzim deluje kao indirektni regulator kontrakcije (Therien i Blostein, 2000). Kardijski

glikozidi ispoljavaju pozitivni inotropni efekat zbog velikog afiniteta za vezivanje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze. To vodi ka inhibiciji enzima i povećanju koncentracije  $\text{Na}^+$  jona u ćeliji. Povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  jona smanjuje izbacivanje  $\text{Ca}^{2+}$  jona iz ćelije putem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjivača, što ima za posledicu akumuliranje kalcijuma u sarkoplazmatičnom retikulumu i pojačavanje kontrakcije (Schwinger i sar., 2003). Različite izoforme pumpe poseduju različitu osetljivost na kardiotoične glikozide i koncentraciju  $\text{Na}^+$  jona u ćeliji. Kod pacova  $\alpha 1$  je približno 100 puta rezistentnija na oubain nego  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  subjedinica (Bers i sar., 2003).

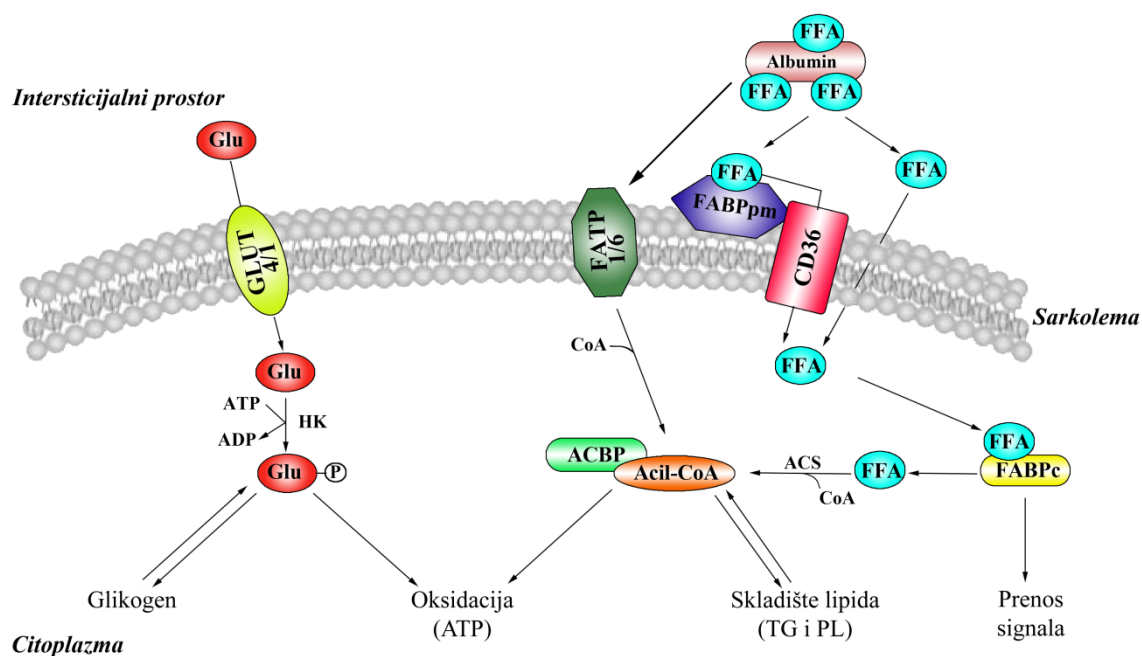
## 1.5 METABOLIZAM U SRCU U FIZIOLOŠKIM USLOVIMA

Srce je organ koji koristi energiju i zahteva konstantno snabdevanje energentima i kiseonikom da bi održao unutarćelijski nivo ATP, koji je neophodan za neometan ciklus kontrakcije/relaksacije srčanog mišića (Bertrand i sar., 2008). U fiziološkim uslovima proizvodnja ATP potiče iz mitohondrijalne oksidacije različitih supstrata, pre svega masnih kiselina dugih lanaca (60–70%) koje dominiraju nad glukozom (20%) i laktatom (10%) (Bertrand i sar., 2008).

Srce ima mali kapacitet za *de novo* sintezu masnih kiselina kao i njihovo skladištenje, i zbog toga uglavnom zavisi od snabdevanja masnim kiselinama iz cirkulacije. Glavni izvor masnih kiselina za srce su FFA vezane za albumin i TG smešteni u jezgru lipoproteina iz krvi (Kodde i sar., 2007). Nakon transporta kroz sarkolemu, masne kiseline se u citoplazmi vezuju za protein koji vezuje masne kiseline (FABP, engl. *fatty acid binding protein*) i zatim aktiviraju esterifikacijom do acil-CoA (engl. *acyl coenzyme A*) delovanjem enzima acil-CoA sintetaze. Nastali acil-CoA može da se esterifikuje do TG ili se konvertuje do acilkarnitina, nakon čega ulazi u mitohondrije i podleže procesu  $\beta$ -oksidacije (Slika 2) (Stanley i sar., 2005). U zdravom srcu 70–90% masnih kiselina koje uđu u ćeliju se konvertuju do acilkarnitina i trenutno oksiduju, a 10–30% se uskladišti u obliku unutarćelijskog pula TG (Stanley i sar., 2005).

Iako glukoza nije dominantan supstrat u srcu, konzumacija glukoze je ipak značajna u poređenju sa drugim tipovima ćelija i može kod ljudi da iznosi 25–50 g/dan (Brownsey i sar., 1997).

Glukoza potrebna za rad srca potiče iz cirkulacije ili iz unutarćelijskih depoa glikogena. Unutarćelijska glukoza se fosforiliše do glukoza 6-fosfata delovanjem heksokinaze i ovaj proces predstavlja prvi regulatorni korak koji usmerava glukoze u dalji metabolizam (Slika 2) (Depre i sar., 1999). Nakon ove aktivacije glukoza 6-fosfat može da uđe u tri različita metabolička puta: glikolizu (katabolički put), glikogenezu (i sintezu glukoznih derivata) ili u pentoza fosfatni put (Kodde i sar., 2007).



**Slika 2. Preuzimanje i metabolizam supstrata u srcu u fiziološkim uslovima.** Glu: glukoza; FFA: slobodne masne kiseline; CD36: translokaza masnih kiselina, FABPpm: plazmamembranski protein koji vezuje masne kiseline; FABPc: citoplazmatski protein koji vezuje masne kiseline; FATP1/6: transportni protein za masne kiseline 1 ili 6; ACBP: protein koji vezuje acil-CoA; GLUT4/1: transporter za glukoze 4 ili 1; HK: heksokinaza; ACS: acil-CoA sintetaza; TG: trigliceridi; PL: fosfolipidi (Coort i sar., 2007).

Preuzimanje i potrošnja ovih supstrata u srcu zavisi od njihove koncentracije u krvi. Povišena koncentracija masnih kiselina u krvi vodi ka povećanoj  $\beta$ -oksidaciji, što ima za posledicu smanjenje oksidacije glukoze i piruvata inhibicijom piruvat dehidrogenaze. Visok nivo  $\beta$ -oksidacije inhibira glikolizu i preko inhibicije PFK-1 i



PFK-2 citratom. Glukoza takođe može da inhibira oksidaciju masnih kiselina inhibicijom karnitin palmitoil transferaze I (CPTI, engl. *carnitine palmitoyltransferase I*) preko povećanja produkcije malonil-CoA dejstvom enzima acil-CoA karboksilaze. Ovaj ciklus „glukoza-masne kiseline“ predstavlja Randlov ciklus (Depre i sar., 1999; Stanley i sar., 2005).

Nezavisno od regulacije supstratne specifičnosti na nivou mitohondrijalne oksidacije (Randlov ciklus), korišćenje supstrata od strane srca je takođe regulisano na nivou sarkoplazmatične membrane, preko proteina transportera (Glatz i sar., 2006).

### 1.5.1 Transport glukoze

Zbog svoje hidrofilne prirode, glukoza ne može da prođe fosfolipidni dvosloj plazma membrane prostom difuzijom (Schwenk i sar., 2008). Stoga, preuzimanje glukoze je primarno proces posredovan proteinima, i odvija se delovanjem članova familije transportera za glukozu (GLUT, engl. *glucose transporter*) koji pripadaju mnogo većoj superfamiliji transportera koji poseduju 12 transmembranskih segmenata. Do sada je opisano dvanaest GLUT izoformi. Glavne izoforme prisutne u srcu i skeletnim mišićima su GLUT1 i GLUT4 (Slika 2) (Luiken i sar., 2004). Iako je GLUT4 najzastupljeniji transporter glukoze u srcu, nivo ekspresije GLUT1 je takođe značajan u ovom organu (Fischer i sar., 1997; Kraegen i sar., 1993). Insulin i kontrakcija su glavni fiziološki stimulatori transporta glukoze u srcu (Luiken i sar., 2004).

U bazalnim, nestimulisanim, uslovima većina GLUT4 u kardiomiocitima je smeštena u unutarćelijskim skladištima (Zorzano i sar., 1997). Insulin stimuliše translokaciju GLUT4 iz ovih skladišta do plazma membrane kardiomiocita (Becker i sar., 2001; Fischer i sar., 1997). *In vivo* stimulacija insulinom uzrokuje interakciju PI3K i vezikula koje sadrže GLUT4 u kardiomiocitima (Kessler i sar., 2001). Aktivnost PI3K u vezikulama ili u asocijaciji sa vezikulama koje sadrže GLUT4, može da služi kao okidač za pokretanje procesa translokacije (Kessler i sar., 2001). Aktivacija signalnog puta PI3K rezultuje aktivacijom PDK1, Akt i atipičnih PKC (He i sar., 2007). Atipična PKC $\zeta$  je uključena u insulinom stimulisanu translokaciju GLUT4 do plazma membrane i preuzimanje glukoze u kardiomiocitima (Luiken i sar., 2009). Aktivacija Akt, vodi ka fosforilaciji i inhibiciji Akt supstrata od 160 kDa (AS160), koji kao negativni regulator

translokacije zadržava GLUT4 u skladišnom kompartmanu u bazalnom stanju (Schwenk i sar., 2008).

U adipocitima je identifikovan i Cbl–CAP–CrkII–C3G–TC10 signalni put koji učestvuje u translokaciji GLUT4 nezavisno od PI3K puta. Ovaj put započinje u kaveolama ili lipidnim mikrodomenima u membrani, gde nakon fosforilacije Cbl i regrutacije CrkII–C3G kompleksa dolazi do aktivacije TC10, malog proteina iz Rho familije, koji vezuje GTP (He i sar., 2007; Luiken i sar., 2004).

Nasuprot GLUT4, koji je predominantno uskladišten u unutarćelijskim depoima, GLUT1 je većim delom smešten na sarkoplazmatičnoj membrani (Luiken i sar., 2004). Smatra se da GLUT1 može da ima važnu ulogu u transportu glukoze u srčanom mišiću u bazalnom metaboličkom stanju (Kraegen i sar., 1993). Međutim, pokazano je da insulin u srcu takođe redistribuira GLUT1 iz unutarćelijskih skladišta na površinu ćelije, ali u mnogo manjem obimu nego GLUT4 (Egert i sar., 1999; Fischer i sar., 1997). Mehanizam uključen u translokaciju GLUT1 delovanjem insulina je sličan mehanizmu uključenom u translokaciju GLUT4 i podrazumeva aktivaciju PI3K (Egert i sar., 1999).

GLUT4 je u srcu uskladišten u najmanje dva unutarćelijska vezikularna odeljka. Prvi odeljak predstavlja skladišni kompartman za GLUT4, koji omogućava translokaciju GLUT4 do plazma membrane u odgovoru na insulin. Drugi odeljak predstavlja reciklirajući endozom koji sadrži i GLUT4 i GLUT1, i osetljiv je na rotenon i insulin (Becker i sar., 2001; Fischer i sar., 1997). Rotenon regrutuje GLUT4 i GLUT1, dok insulin regrutuje samo GLUT1 iz ovog odeljka (Becker i sar., 2001). Luiken i saradnici sugerišu postojanje i trećeg odeljka za GLUT4 u kardiomiocitima, koji je osetljiv na kontrakciju (Luiken i sar., 2004). Takođe Fischer i saradnici sugerišu postojanje dodatnog pula za GLUT1, koji se razlikuje od gore navedenih skladišta (Fischer i sar., 1997).

### *1.5.2 Transport masnih kiselina*

Zbog svojih biofizičkih karakteristika masne kiseline mogu da prođu kroz lipidni dvosloj plazma membrane pasivnom difuzijom, ali ovaj proces doprinosi samo u malom stepenu preuzimanju masnih kiselina u srcu. Kinetičke studije i studije inhibicije su pokazale da je proces preuzimanja masnih kiselina u velikoj meri posredovan

proteinima (Schwenk i sar., 2008). U srcu, ovi membranski proteini obuhvataju plazmamembranski FABP (FABPpm) molekulske mase 40 kDa, translokazu masnih kiselina (FAT/CD36, engl. *fatty acid translocase*) molekulske mase 88 kDa, i dva člana familije transportnih proteina za masne kiseline (FATP, engl. *fatty acid transport protein*), FATP1 i FATP6, koji poseduju aktivnost acil-CoA sintetaze (Slika 2) (Glatz i sar., 2006). CD36 i FABP ne funkcionišu kao klasične pore/kanali, već posreduju u preuzimanju masnih kiselina tako što ubrzavaju disocijaciju masnih kiselina od albumina. CD36 dodatno katališe integraciju protonizovanih masnih kiselina u spoljašnji sloj fosfolipidnog dvosloja. Nakon toga akumulacija masnih kiselina u ovom sloju stvara difuzioni gradijent kroz plazma membranu i na taj način ubrzava *flip-flop* masnih kiselina u unutrašnji sloj membrane (Koonen i sar., 2005).

Preuzimanje palmitata u velikim sarkoplazmatičnim vezikulama u srcu je 8 puta veće nego u istim vezikulama skeletnih mišića, što je posledica veće zastupljenosti FAT/CD36 i FABPpm, koji verovatno deluju kao dve komponente jedinstvenog sistema za translokaciju masnih kiselina kroz sarkolemu (Luiken i sar., 1999).

Pronađeno je da je FAT/CD36 jednako zastupljen u plazma membrani i mikrozomalnoj frakciji (endozomalnom odeljku), pri čemu nije pronađena kolo-kalizacija između FAT/CD36 i većine unutarćelijski uskladištenog GLUT4 (Muller i sar., 2002). Studija Luikena i saradnika ukazuje da postoje dva funkcionalno nezavisna unutarćelijska skladišta za FAT/CD36, od kojih jedan regrutuje kontrakcija, a drugi insulin (Luiken i sar., 2002).

Insulin stimuliše preuzimanje masnih kiselina u ćelijama srčanog mišića, tako što indukuje translokaciju FAT/CD36 iz unutarćelijskih depoa na plazma membranu (Chabowski i sar., 2005; Luiken i sar., 2002). Insulin indukuje translokaciju FAT/CD36 putem aktivacije signalnog puta PI3K (Luiken i sar., 2002)

CD36 je odgovoran za veći deo povećanog preuzimanja masnih kiselina u kardiomiocitima tokom povećane mehaničke aktivnosti (Luiken i sar., 2001b). Povećano preuzimanje masnih kiselina u kardiomiocitima izazvano kontrakcijom je posredovano aktivacijom proteinske kinaze koju aktivira AMP (AMPK, engl. *AMP-activated protein kinase*), što rezultira translokacijom CD36 iz unutarćelijskog skladišta na sarkolemu (Luiken i sar., 2003). Luiken i saradnici sugerišu da je isti mehanizam

odgovoran i za povećano preuzimanje glukoze u kontrahovanim kardiomiocitima (Luiken i sar., 2003)

### 1.5.3 Lipin 1

Kod eukariota TG se sintetišu preko dva glavna puta, glicerol fosfatnog puta i monoacilglicerolnog puta. Glicerol fosfatni put je odgovoran za sintezu TG u većini ćelija, i odvija se kroz proces sukcesivnog dodavanja acil grupa na glicerol 3-fosfat, gde je svaki korak katalizovan različitim enzimom (Takeuchi i Reue, 2009). Enzim koji konvertuje fosfatidat do diglicerida (DG), poznat kao fosfatidat fosfataza 1 (PAP1, engl. *phosphatidate phosphatase-1*), obezbeđuje DG, koji je neophodan prekursor za sintezu TG, kao i fosfatidilholina i fosfatidiletanolamina (Reue i Brindley, 2008).

Kod sisara, enzimi koji ispoljavaju PAP1 aktivnost pripadaju familiji proteina lipina, koju čine tri člana: lipin 1, lipin 2 i lipin 3, sa različitim obrascem tkivno specifične ekspresije (Donkor i sar., 2007). Aktivnost enzima lipina zahteva prisustvo  $Mg^{2+}$  jona i inhibirana je N-etilmaleimidom (Donkor i sar., 2007).

Lipin 1 je visoko eksprimiran u srcu *wild type* miševa (Mitra i sar., 2011), pri čemu odsustvo lipina 1 značajno smanjuje aktivnost PAP u srcu *fld* (engl. *fatty liver dystrophy*) miševa. Lipin 2 i lipin 3 doprinose samo sa 15-20% normalnoj aktivnosti PAP u srcu (Kok i sar., 2012).

Lipin 1 može da bude lokalizovan u nekoliko različitih kompartmana. Izoforme lipina su smeštene u citosolu i translociraju se do membrane endoplazmatskog retikuluma, koja predstavlja glavno mesto produkcije fosfatidata, da bi izvršili svoju PAP1 aktivnost (Reue i Brindley, 2008). Pored toga, izoforme lipina mogu biti lokalizovane i u nukleusu. Uloga lipina 1 u nukleusu se dovodi u vezu sa njegovom funkcijom transkripcionog koaktivatora (Reue i Dwyer, 2009). Lipin 1 aktivira oksidativni metabolizam masnih kiselina u jetri preko indukcije ekspresije PPAR $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ) i preko direktne fizičke interakcije sa PPAR $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$* ) (Finck i sar., 2006). Nivo ekspresije lipina 1 u adipoznom tkivu zdravih ljudi i miševa je u korelaciji sa ekspresijom gena za oksidaciju masnih kiselina, pri čemu Donkor i saradnici sugerišu da indukcija PPAR $\alpha$  i njegovih ciljnih gena

uključenih u oksidaciju masnih kiselina može da predstavlja mehanizam kojim nivo lipina 1 utiče na osetljivost na insulin (Donkor i sar., 2008).

Funkcija lipina 1 je regulisana na nekoliko nivoa, koji uključuju transkripciju iRNK, *splicing* iRNK, fosforilaciju proteina i subćelijsku lokalizaciju (Takeuchi i Reue, 2009). Gladovanje, glukokortikoidi i insulinska deficijencija stimulišu ekspresiju lipina 1 mehanizmom koji zavisi od PGC-1 $\alpha$  (Finck i sar., 2006). Masne kiseline i njihovi estri stimulišu translokaciju fosfatidat fosfohidrolaze iz citosola do mikrozomalne frakcije u jetri pacova (Martin-Sanz i sar., 1984). Insulin smanjuje ispoljavanje PAP1 aktivnosti u 3T3-L1 adipocitima, tako što favorizuje citosolnu lokalizaciju lipina 1 putem njegove fosforilacije (Harris i sar., 2007) i stimulacije interakcije sa 14-3-3 (Peterfy i sar., 2010).

#### 1.5.4 Karnitin palmitoil transferaza I

Unutrašnja mitohondrijalna membrana nije permeabilna za acil-CoA dugih lanaca, te se stoga one transportuju iz citosola u matriks pomoću sistema CPT, koji uključuje dva transferna proteina i dva dodatna proteina. CPT I i II su odgovorni za transfer acil komponente, karnitin transporter plazma membrane obezbeđuje odgovarajući unutarćelijski nivo L-karnitina, dok karnitin acilkarnitin translokaza katalizuje transfer acilkarnitina i slobodnog karnitina između CPTI i CPTII (Kodde i sar., 2007).

CPTI pripada familji proteina koja obuhvata nekoliko drugih karnitin aciltransferaza, kao i aciltransferaza koje ne koriste karnitin kao sekundarni supstrat. Javlja se u tri izoforme CPTIA, CPTIB i CPTIC. Prva izoforma predstavlja hepatičnu ili L-izofornu, ali se nalazi i u mnogim drugim tkivima kao što su  $\beta$ -ćelije pankreasa i neuroni hipotalamusa. CPTIB, koja je prvo identifikovana u mitohondrijama u skeletnim mišićima i srčanom mišiću, takođe se javlja u drugim tkivima, posebno u onim koja imaju veliki kapacitet za oksidaciju masnih kiselina (Zammit, 2008). U srcu pacova su eksprimirane dve izoforme CPTI, hepatična i mišićna (Cook i sar., 2001; Distler i sar., 2009; Weis i sar., 1994). U srcu fetusa pacova, iRNK za obe izoforme CPTI su visoko eksprimirane, pri čemu iRNK za CPTIB ostaje konstantna tokom razvoja, dok se iRNK za CPTIA smanjuje (Cook i sar., 2001).

Aktivnost CPTI je regulisana kratkoročno, nivoom malonil-CoA, koji predstavlja intermedijer sinteze masnih kiselina, i dugoročno na nivou sinteze proteina (Brady i sar., 1993). CPTIA ispoljava veći afinitet za karnitin i niži afinitet za malonil-CoA, nego CPTIB (Zammit, 2008). Geni za CPT su regulisani ishranom i hormonima u tkivima sa velikim stepenom potrošnje masnih kiselina kao što su srce, mišići i jetra (Bonfont i sar., 2004). Sastav masnih kiselina u ishrani može da bude uključen u regulaciju aktivnosti CPTI u mitohondrijama u srcu i skeletnim mišićima, tako što menja njihovu senzitivnost za malonil-CoA (Power i Newsholme, 1997). Brandt i saradnici su pokazali da masne kiseline dugih lanaca regulišu ekspresiju gena mišićne izoforme CPTI u srcu pacova preko PPAR $\alpha$  (Brandt i sar., 1998).

Insulin reguliše CPTI na različitim nivoima, pri čemu su literaturni podaci o efektima insulina prilično nekonzistentni. Rezultati studije u kulturi ćelija (Hudson i sar., 1995) pokazuju da je insulin pozitivni regulator CPTI, dok rezultati *in vivo* studije na miševima (Liu i sar., 2007b) pokazuju da je insulin negativni regulator CPTI.

## 1.6 INSULINSKA REZISTENCIJA

Insulinska rezistencija se klasično definiše kao stanje umanjenog odgovora ciljnih tkiva na normalne koncentracije insulina u cirkulaciji i ima glavnu ulogu u razvoju dijabetesa tipa 2 (Sesti, 2006). Glavne karakteristike insulinske rezistencije su dezinhibicija lipolize u adipoznom tkivu, poremećaj u preuzimanju glukoze u mišićima i dezinhibicija glukoneogeneze (Mlinar i sar., 2007). Insulin snižava koncentraciju glukoze u krvi tako što stimuliše njeno preuzimanje uglavnom u skeletnim mišićima i masnom tkivu i tako što inhibira produkciju endogene glukoze u jetri. U stanjima insulinske rezistencije ovi organi ne reaguju odgovarajuće na delovanje insulina, što vodi ka hiperglikemiji i povećanju sekrecije insulina od strane  $\beta$ -ćelija pankreasa (Schinner i sar., 2005). Kompenzatorna hiperinsulinemija kao posledica povećane sekrecije u  $\beta$ -ćelijama pankreasa je stoga obavezna prateća osobina insulinske rezistencije (Mlinar i sar., 2007). Insulinska rezistencija je opisana u nekoliko bolesti koje povećavaju kardiovaskularni rizik i smrtnost, kao što su gojaznost, hipertenzija, metabolički sindrom i srčana slabost (Morisco i sar., 2006).

### 1.6.1 Mehanizam nastanka insulinske rezistencije

Postoji više mehanizama koji doprinose razvoju insulinske rezistencije, i koji uključuju lipotoksičnost, inflamaciju u masnom tkivu i jetri, mitohondrijalnu disfunkciju, oksidativni stres, stres endoplazmatičnog retikuluma i mnoge druge (Ye, 2013).

Insulinska rezistencija je usko povezana sa gojaznošću i identifikovano je nekoliko mehanizama koji posreduju u ovoj interakciji (Stumvoll i sar., 2005). Povećanje masnih naslaga u visceralnim i subkutanim depozitima je povezano sa smanjenjem osetljivosti na insulin, pri čemu je visceralno adipozno tkivo moćniji prediktor insulinske rezistencije nego subkutano masno tkivo (Kashyap i Defronzo, 2007). Poslednjih godina se tradicionalno „glukocentrično“ gledište insulinske rezistencije pomerilo ka „lipocentričnoj“ perspektivi (Sesti, 2006). Adipozno tkivo se smatra centrom insulinske rezistencije. Sa razvojem insulinske rezistencije dolazi do smanjenja supresije lipolize pod delovanjem insulina što vodi ka povećanju koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji i na kraju razvoju insulinske rezistencije u mišićima i jetri. Primećena je uska povezanost između povećanja koncentracije masnih kiselina u plazmi, akumulacije lipida u miocitima i insulinske rezistencije (Boden i Shulman, 2002). Naime, kada fluks masnih kiselina u perifernim ćelijama prevaziđe kapacitet puta  $\beta$ -oksidacije, dolazi do aktivacije puta sinteze TG i akumulacije lipidnih intermedijera koji mogu da deluju kao lipotoksini i tako remete delovanje insulina (Tsatsoulis i sar., 2013).

Hiperglikemija nakon gladovanja kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 je posledica povećane produkcije glukoze u jetri zbog insulinske rezistencije. Ovo je rezultat izostanka inhibicije dva ključna enzima glukoneogeneze, fosfoenolpiruvat karboksikinaze i katalitičke subjedinice glukoza 6-fosfataze (Saini, 2010). Takođe, regulacija lipida u cirkulaciji preko delovanja insulina u jetri je poremećena u insulinskoj rezistenciji i hiperinsulinemiji (Rask-Madsen i Kahn, 2012). Visceralno adipozno tkivo sekretuje svoje produkte u portalnu cirkulaciju i tako usmerava masne kiseline direktno u jetru gde one učestvuju u glukoneogenezi, sintezi lipoproteina veoma niske gustine (VLDL, engl. *very low density lipoprotein*), smanjenju preuzimanja glukoze i uzrokuju insulinsku rezistenciju (Mlinar i sar., 2007). Povišena

koncentracija masnih kiselina takođe utiče i na sekreciju insulina i klirens insulina u jetri, i na taj način utiče na endogenu produkciju glukoze (Boden i Shulman, 2002).

Skeletni mišići u najvećoj meri doprinose insulinskoj rezistenciji u dijabetesu tipa 2, pri čemu smanjena sinteza glikogena u mišićima predstavlja glavnu karakteristiku insulinske rezistencije u dijabetesu tipa 2 (Boden i Shulman, 2002). Sintaza glikogena je značajno smanjena u mišićima pacijenata sa dijabetesom tipa 2 i ovo smanjenje je posledica poremećaja u preuzimanju glukoze (Le Roith i Zick, 2001). *In vivo* studije su pokazale da je kod ljudi transport glukoze regulatorni (ograničavajući) korak u insulinskoj rezistenciji koju uzrokuju masne kiseline (Schinner i sar., 2005; Sesti, 2006).

U srcu, insulinska rezistencija uključuje poremećaje u insulinskom signalnom putu, transportu glukoze i skladištenju glikogena u kardiomiocitima, i u tom pogledu može da se uporedi sa insulinskom rezistencijom u skeletnim mišićima (Gray i Kim, 2011). Međutim, važno je napraviti razliku između efekata koji su posledica sistemskih poremećaja u stanju insulinske rezistencije (hiperinsulinemija, hiperglikemija i hiperlipidemija) i promena koje nastaju u insulinskom signalnom putu unutar srčanog tkiva (Abel i sar., 2012). U stanju gojaznosti i insulinske rezistencije, srce je izloženo povećanom snabdevanju nutrijentima (masne kiseline i glukoza) što utiče na metabolički kapacitet i efikasnost srca (Gray i Kim, 2011). Povećano snabdevanje masnim kiselinama može da dovede do akumulacije lipida u miokardu, gde kardijačna lipotoksičnost može da doprinese nastanku apoptoze, poremećaju u funkciji mitohondrija, što na kraju ima za posledicu poremećaj funkcije srca (Abel i sar., 2012).

Na molekularnom nivou, poremećaj u delovanju insulina je posledica mutacija ili posttranslacionih modifikacija samog IR ili nekog od njegovih nishodnih efektornih molekula (Le Roith i Zick, 2001).

Mnogi fenotipovi insulinske rezistencije mogu da se objasne promenama u ekspresiji, procesu vezivanja, stanju fosforilacije i kinaznoj aktivnosti IR, pri čemu defekti receptora nakon vezivanja insulina predstavljaju primarne događaje koji vode ka razvoju insulinske rezistencije (Pessin i Saltiel, 2000). Aktivnost Tyr kinaze IR kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 je značajno smanjena, što može da bude posledica povećane aktivnosti fosfataza specifičnih za Tyr ostatke ili povećane fosforilacije Ser i Thr ostataka na receptoru koje sprečavaju fosforilaciju Tyr ostataka (Le Roith i Zick,



2001). Masne kiseline preko formiranja lipidnih intermedijera aktiviraju nove PKC, od kojih PKC $\delta$  fosforiliše IR na Ser ostacima i PKC $\epsilon$  inhibira ekspresiju gena za IR, i na taj način stimulišu insulinsku rezistenciju (Saini, 2010).

Fosforilacija IRS-1 na Ser i Thr ostacima čini ga manje podložnim delovanju Tyr kinaze IR i inhibira njegovo kuplovanje sa glavnim nishodnim efektornim sistemima (Stumvoll i sar., 2005). FFA iz cirkulacije i adipokin TNF $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) mogu da povećaju serinsku fosforilaciju proteina IRS i na taj način uzrokuju poremećaj u prenosu insulinskog signala. Takođe, produžena stimulacija insulinom, što je obično slučaj kod dijabetičnih pacijenata sa hiperinsulinemijom, može da rezultira degradacijom IRS proteina (Schinner i sar., 2005). Kod nekoliko modela glodara sa insulinskom rezistencijom i kod insulin rezistentnih potomaka pacijenata sa dijabetesom tipa 2 primećena je hiper-serinska fosforilacija Ser<sup>302</sup>, Ser<sup>307</sup>, Ser<sup>612</sup>, i Ser<sup>632</sup> ostataka (Morisco i sar., 2006). Povećanje unutarćelijskih metabolita masnih kiselina, acil-CoA, DG i ceramida, aktivira PKC $\theta$  u skeletnim mišićima i PKC $\epsilon$  u jetri, koje fosforilišu Ser ostatke na IRS-1 i IRS-2, redom (Morino i sar., 2006).

Jedan od mehanizama koji mogu da vode razvoju insulinske rezistencije uključuje narušavanje balansa između subjedinica PI3K. Povećanje ekspresije p85 subjedinice utiče na asocijaciju p85-p110 heterodimera sa IRS-1, i na taj način redukuje PI3K put insulinskog delovanja (Saini, 2010).

Smanjena aktivnost PI3K može da vodi ka redukciji aktivnosti nishodne Akt. Smanjena aktivnosti Akt2 u jetri vodi ka aktivaciji transkripcije enzima uključenih u proces glukoneogeneze (Morino i sar., 2006). Smanjenje insulinom stimulisane fosforilacije AS160 u skeletnim mišićima može da ima važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije (Choi i Kim, 2010). Glikozilovani proteini, koji nastaju kao posledica hiperglikemije, takođe smanjuju aktivnost Akt (Mlinar i sar., 2007). Redukcija insulinom stimulisane aktivnosti i druge kinaze nishodno od PI3K, atipične PKC $\lambda/\zeta$ , takođe može da ima ulogu u razvoju insulinske rezistencije *in vivo* (Choi i Kim, 2010).

Pored poremećaja IR/IRS-1/PI3K/PKC $\lambda/\zeta$ /Akt puta, razvoju insulinske rezistencije u skeletnim mišićima doprinose i promene ekspresije proteina GLUT4 i oštećenje molekulske mašinerije koja je uključena u regrutaciju, vezivanje i fuziju vezikula koje sadrže GLUT4 sa plazma membranom (Sesti, 2006).

### 1.6.2 Uloga povećanog unosa fruktoze u nastanku insulinske rezistencije

Iako su štetni efekti fruktoze dobro poznati, mehanizmi koji dovode do razvoja insulinske rezistencije i drugih metaboličkih poremećaja su tek nedavno razjašnjeni. Jedan od mehanizama se fokusira na lipogenu prirodu šećera, jer konzumacija fruktoze stimuliše *de novo* lipogenezu u jetri. Konzumacija velike količine fruktoze rezultuje u povećanoj produkciji trioza fosfata u jetri, koji predstavljaju prekursore za sintezu masnih kiselina (Tran i sar., 2009). Takođe, fruktoza stimuliše lipogenezu tako što aktivira SREBP1c (engl. *sterol regulatory element binding protein 1c*) koji predstavlja glavni transkripcioni regulator lipogeneze (Samuel, 2011). Masne kiseline sintetisane u procesu *de novo* lipogeneze se esterifikuju do TG, koji se talože u unutarćelijskim skladištima u jetri, pakuju u VLDL i sekretuju u cirkulaciju (Stanhope i Havel, 2008; Tappy i Le, 2010). Rutlidge i Adeli sugerišu da TG iz VLDL u cirkulaciji mogu da budu hidrolizovani do masnih kiselina i monoacilglicerola delovanjem lipoprotein lipaze (LPL), pri čemu adipozno tkivo može da preuzme ove komponente i resintetizuje TG (Rutledge i Adeli, 2007). Takođe, konzumacija fruktoze može da vodi ka povećanju mase adipoznog tkiva zbog izostanka stimulacije sekrecije insulina i produkcije leptina (Elliott i sar., 2002). Kada se prevaziđe skladišni kapacitet masnog tkiva, dolazi do poremećaja signalnih puteva u adipocitima što vodi ka aktivaciji procesa lipolize i oslobađanja masnih kiselina u cirkulaciju. Ove masne kiseline može da preuzme jetra i uskladišti ih u obliku TG i drugih lipidnih intermedijera, što na kraju vodi ka poremećaju u insulinskom delovanju i dislipidemiji (Rutledge i Adeli, 2007; Stanhope i Havel, 2008). Povišene koncentracije TG i masnih kiselina u cirkulaciji vode ka povećanom preuzimanju masnih kiselina i u drugim tkivima, kao što su mišići, što može da uzrokuje taloženje lipidnih intermedijera u ovim tkivima i poremećaje u insulinskom delovanju (Stanhope i Havel, 2008; Tappy i Le, 2010).

Pokazano je da fruktoza ne dovodi samo do promena u metaboličkim tkivima, jetri, mišićima i adipoznom tkivu, već je ovaj način ishrane praćen i razvojem insulinske rezistencije u srcu (Deng i sar., 2007; Mellor i sar., 2011).

Takođe, Tappy i saradnici sugerišu da u razvoju metaboličkih poremećaja koji nastaju kao posledica ishrane bogate fruktozom, važnu ulogu imaju oksidativni stres i stres u endoplazmatičnom retikulumu (Tappy i sar., 2010).

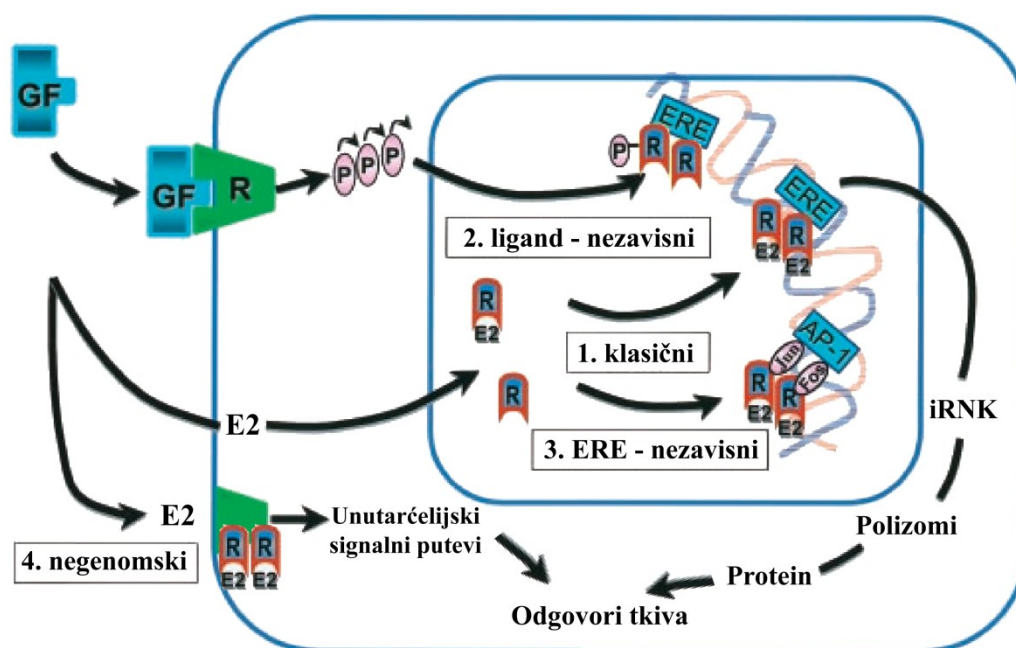
Hiperurikemija, koja nastaje kao posledica unosa fruktoze, smanjuje produkciju NO u endotelijumu, i na taj način smanjuje protok krvi u skeletnim mišićima, što ima za posledicu povećanje koncentracije insulina u krvi i razvoj periferne insulinske rezistencije (Johnson i sar., 2007).

## 1.7 ESTRADIOL

Osnovni estrogene kod ljudi su  $17\beta$ -estradiol (u daljem tekstu estradiol, pri čemu se često upotreba termina „estrogen“ implicitno odnosi na  $17\beta$ -estradiol), estron i estriol. Ovi hormoni se sintetišu iz prekursora steroidnih hormona, gde se estradiol generiše iz testosterona delovanjem aromataze (Czubryt i sar., 2006). Kod žena u periodu pre nastupanja menopauze, estradiol koji proizvode ovarijumi predstavlja glavni estrogen u cirkulaciji. Kod žena koncentracija estradiola u serumu se kreće od 100 pg/ml u folikularnoj fazi ciklusa do 600 pg/ml za vreme ovulacije, pri čemu može da dostigne vrednost od 20000 pg/ml tokom trudnoće (Mendelsohn i Karas, 1999). Nakon menopauze, koncentracije estradiola u serumu se smanjuju do vrednosti koje su slične ili niže nego kod muškaraca istog doba (5 do 20 pg/ml) (Mendelsohn i Karas, 1999).

Estrogeni ostvaruju biološke efekte preko dva receptora za estrogene (ER), ER $\alpha$  i ER $\beta$ , koji po strukturi pripadaju superfamiliji nuklearnih receptora za steroidne/tiroidne hormone. Ovi receptori su sastavljeni od tri nezavisna, ali interreagujuća funkcionalna domena N-terminalni ili A/B domen, C domen ili domen koji vezuje DNK i D/E/F domen ili domen koji vezuje ligand. N-terminalni domen, koji je najmanje konzerviran među nuklearnim receptorima, sadrži aktivirajuću funkciju koja ne zavisi od liganda (AF-1) i region receptora koji omogućava receptoru da interaguje sa članovima transkripcionog kompleksa. Domen koji vezuje DNK sadrži dve strukture *zink finger*, koje imaju važnu ulogu u dimerizaciji receptora i njegovom vezivanju za specifičnu DNK sekvencu. E/F je multifunkcionalni domen koji prepoznaje i vezuje ligand i uključen je u dimerizaciju receptora, translokaciju u nukleus i interakciju sa transkripcionim faktorima i kofaktorima, koju ostvaruje preko aktivirajuće funkcije koja zavisi od liganda (AF-2) (Nilsson i Gustafsson, 2002; Nilsson i sar., 2001).

ER su identifikovani u srcu u mišićnim ćelijama pretkomore i komore i u fibroblastima, pri čemu su ovi receptori funkcionalni kako u srcu mužjaka tako i ženki. Obe izoforme ER su prisutne u srcu ljudi, kao i glodara (Babiker i sar., 2002).



**Slika 3. Mehanizam delovanja estradiola i signalni put receptora za estrogene.** Biološki efekti estradiola se odvijaju preko četiri različita mehanizma: 1. klasični; 2. ligand nezavisni; 3. ERE-nezavisni i 4. nengenomski. R: receptor za E2 ili GF; E2: estradiol; GF: faktori rasta; ERE: estrogen responsivni element; AP-1: (engl. *activator protein-1*); Jun/Fos: transkripcioni faktori; P: fosforilacija (Hall i sar., 2001).

### 1.7.1 Genomski mehanizam delovanja estrogena

#### 1.7.1.1 Klasični, ERE-zavisni mehanizam delovanja estrogena

$ER\alpha$  i  $ER\beta$  mogu da formiraju homodimere i heterodimere i tako stimulišu nishodne ciljne gene, pri čemu je favorizovano formiranje  $ER\alpha$  homodimera i  $ER\alpha/ER\beta$  heterodimera u odnosu na  $ER\beta$  homodimere (Babiker i sar., 2002). U odsustvu hormona, receptor je zarobljen u multiproteinskom inhibitorom kompleksu u nukleusu ciljnih ćelija (Hall i sar., 2001). Vezivanje estrogena za AF-2 domen ER rezultira konformacionom promenom unutar ER što vodi ka njegovoj dimerizaciji i

vezivanju za specifično mesto u DNK nazvano estrogen responsivni element (ERE) (Slika 3). Zatim dolazi do regrutovanja koregulatora (koaktivatori i korepresori) što rezultira povećanjem ili smanjenjem ekspresije gena (Murphy, 2011). U ćelijama gde su ekspimirana oba tipa receptora, konačni odgovor na delovanje estrogena može da zavisi od odnosa ER $\alpha$ :ER $\beta$  (Hall i sar., 2001).

#### 1.7.1.2 Ligand-nezavisni mehanizam delovanja estrogena

Pored klasičnog aktiviranja ER prirodnim ili sintetičkim hormonima, opisani su i alternativni, indirektni putevi aktivacije receptora (barem izoforme  $\alpha$ ) u odsustvu liganda kao posledica aktivacije membranskih receptora kao što su receptori za IGF-1, faktor rasta epiderma, faktor rasta tumora i dopamin (Slika 3). Pokazano je da je puna aktivnost Ras, PKA i PKC esencijalna za ligand nezavisnu aktivaciju ER (Nilsson i Gustafsson, 2002). Modifikacija fosforilisanog stanja ER delovanjem ćelijskih kinaza može da predstavlja važan mehanizam za ligand-nezavisnu aktivaciju. Takođe fosforilacija koaktivatora delovanjem faktora rasta može da bude važna za ovu vrstu aktivacije transkripcije (Hall i sar., 2001).

#### 1.7.1.3 ERE-nezavisni mehanizam delovanja estrogena

Oko trećina gena kod ljudi koji su regulisani ER ne sadrže ERE sličnu sekvencu. ER mogu da regulišu ekspresiju ciljnih gena bez direktnog vezivanja za DNK, tako što se preko protein–protein interakcija vežu sa kompleksom transkripcionog faktora koji je u kontaktu sa DNK (Slika 3) (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). ER mogu da se vežu za DNK indirektno preko transkripcionih faktora kao što su AP1 (engl. *activator protein-1*) i Sp1 (Murphy, 2011). Iako intaktna aktivnost vezivanja DNK sama po sebi nije neophodna, domen koji vezuje DNK može da bude neophodan za odgovarajuće protein–protein interakcije ili može biti uključen u regrutovanje dodatnih koregulatornih proteina u promotorski region (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).

### 1.7.2 Negenomski mehanizam delovanja estrogena

Veliki broj odgovora ćelije na fiziološke koncentracije estrogena se javlja brzo, u okviru nekoliko sekundi ili minuta, što ne može da bude posredovano transkripcijom i sintezom proteina. Ovi brzi efekti posredovani estrogenima se prenose preko enzimskih puteva i jonskih kanala, putem aktivacije ER asociраних sa membranom, i označeni su kao negenomski efekti (Slika 3) (Meyer i sar., 2009). Iako podaci reaktivnosti antitela sugerišu prisustvo ektodomena u receptoru, što implicira da ER mogu da egzistiraju kao transmembranski molekuli, prevladava mišljenje da su ovi receptori asociрани sa membranom, usidreni pomoću *scaffold* proteina. Pored ovih proteina, lipidna modifikacija ER je uključena u vezivanje ER za membranu, gde je posebno važna palmitoilacija na cisteinu 447 (Moriarty i sar., 2006). ER $\alpha$  pravi komplekse sa kaveolinom-1, c-Src, Akt, PI3K, HSP90 i eNOS u kaveolama u plazma membrani (Knowlton i Lee, 2012). Membranski ER egzistiraju kao funkcionalni dimer kada su aktivirani estrogenima i interakcija ovih receptora sa raznim *scaffold* ili signalnim molekulima pojačava njihovu aktivnost (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Estrogeni pokreću veliki broj unutarćelijskih signalnih puteva. Tu su uključeni aktivacija MAPK i PI3K/Akt puteva, indukcija flukseva kroz jonske kanale, produkcija sekundarnih glasnika posredstvom receptora koji su kuplovani sa G proteinom (cAMP i kalcijum), kao i stimulacija receptora za faktore rasta (Moriarty i sar., 2006). Estradiol ispoljava potentne negenomske efekte na aktivaciju eNOS, koji su posredovani subpopulacijom ER $\alpha$  receptora koji su lokalizovani u kaveolama u endotelijalnim ćelijama, gde su kuplovani sa eNOS u funkcionalni signalni kompleks (Chambliss i Shaul, 2002).

### 1.7.3 Efekti estradiola na osetljivost na insulin

U patogenezi metaboličkog sindroma učestvuje veliki broj faktora, ali hormoni imaju važnu ulogu u njegovom razvoju i progresiji (Barros i Gustafsson, 2011). Postoji uska povezanost između pola/reprodukcije i energetskeg metabolizma, pri čemu su neki osnovni aspekti energetskeg metabolizma različito regulisani kod mužjaka i ženki. Cirkulišući polni hormoni, posebno androgeni i estrogeni, kontrolišu ove polne razlike u

balansu energije, u periodu između nastupanja puberteta i menopauze (Mauvais-Jarvis, 2011).

Eksperimentalni i klinički podaci pokazuju da postoji interakcija između polnih hormona i insulina prilikom delovanja na tkiva. Polni hormoni mogu da utiču na osetljivost na insulin, tako što je povećavaju ili smanjuju, zavisno od situacije (Livingstone i Collison, 2002). Povećanje nivoa polnih hormona u plazmi povezano sa pubertetom, gestacijom i lutealnom fazom menstrualnog ciklusa je verovatno uzrok smanjene osetljivosti na insulin tokom ovih stanja (Alonso i Gonzalez, 2008). Supstituciona terapija fiziološkom dozom estrogena je povezana sa oporavkom od efekata koji nastaju kao posledica ovarijektomije ili menopauze, dok je višak estrogena, kao što je slučaj kod terapije oralnim kontraceptivima, supstitucione terapije hormonima ili kod visokih doza prirodnih estrogena, povezan sa poremećajem glukoze tolerancije i insulinskom rezistencijom (Godsland, 2005).

Izostanak polnih hormona kod ženki pacova nakon ovarijektomije dovodi do smanjenja osetljivosti na insulin, dok tretman estradiolom poboljšava osetljivost na insulin kod ovih životinja (Alonso i sar., 2006; Gonzalez i sar., 2000; Liu i sar., 2004). Moguće je da je estradiol odgovoran za povećanje osetljivosti na insulin tokom rane trudnoće kada je koncentracija estradiola i progesterona niska, dok tokom kasne trudnoće, kada je koncentracija estradiola i progesterona visoka, estradiol verovatno antagonizuje efekat progesterona i smanjuje osetljivost na insulin (Gonzalez i sar., 2000). Takođe estradiol u fiziološkim koncentracijama značajno popravljaja poremećaj glukoze homeostaze i osetljivosti na insulin koji nastaju kao posledica starenja (Alonso i sar., 2006; Alonso i sar., 2010). Međutim, suprafiziološke (farmakološke) doze estradiola smanjuju osetljivost na insulin u istoj ili čak većoj meri nego gubitak hormona ovarijuma (Gonzalez i sar., 2002a).

Fiziološke koncentracije estradiola povećavaju transport glukoze, aktivnost enzima katabolizma glukoze i glikogeneze u insulin rezistentnim HepG2 ćelijama, i na taj način smanjuju insulinsku rezistenciju (Xie i sar., 2003).

Kod žena, sekrecija insulina nakon menopauze se ne razlikuje od iste u periodu pre nastupanja menopauze. Međutim, test tolerancije na glukozu je pokazao da u periodu nakon menopauze, dolazi do smanjenja sekrecije insulina, kao i smanjenja njegove eliminacije. Krajnji efekat je održavanje nivoa insulina, sličnog onom kod žena

u premenopauzi (Barros i Gustafsson, 2011). Estradiol stimuliše sekreciju insulina kod pacova, verovatno preko delovanja na  $\beta$  ćelije pankreasa (Gonzalez i sar., 2000). Takođe nedostatak ženskih polnih hormona kod pacova smanjuje brzinu klirensa insulina, dok tretman estradiolom popravlja ovaj efekat (Gonzalez i sar., 2002a) i tako čuva organizam od hiperinsulinemije koja nastaje kao posledica ovarijektomije (Alonso i sar., 2010).

Nedostatak polnih hormona uzrokuje povećanje mase tela kod ovarijektomisnih pacova, pri čemu tretman estradiolom može da umanja ovaj efekat, što potvrđuje da poremećaj u statusu estrogena može da bude povezan sa razvojem gojaznosti (Gonzalez i sar., 2003; Liu i sar., 2004). Kod ljudi se javlja polni diformizam u distribuciji masnog tkiva, zato što žene generalno akumuliraju subkutano masno tkivo u glutealnim i femoralnim regionima, dok muškarci razvijaju androidni tip distribucije masnog tkiva sa povećanjem mase tela. Muškarci imaju dva puta više visceralnog adipoznog tkiva nego žene u premenopauzi sa istim vrednostima indeksa telesne mase (Turgeon i sar., 2006).

Sposobnost estradiola da kontroliše unos hrane, energetske balans i gojaznost može da bude posredovana njegovom interakcijom sa oreksigenim i anoreksigenim hormonima u CNS (Butera, 2010). Tretman pacova farmakološkim dozama estrogena uzrokuje smanjenje aktivnosti LPL u adipoznom tkivu i povećanje aktivnosti u srcu i dijafragmi, što sugerira da velike doze egzogenih estrogena pomeraju fluks TG iz skladištenja u adipoznom tkivu ka korišćenju u skeletnim mišićima. Efekti estradiola na metabolizam lipida su suprotni efektima insulina, koji favorizuju skladištenje energije (Livingstone i Collison, 2002). Estradiol povećava ekspresiju iRNK (Campbell i sar., 2003) i maksimalnu aktivnost (Campbell i Febbraio, 2001) nekoliko ključnih enzima koji učestvuju u putu oksidacije lipida u skeletnim mišićima.

Molekulski mehanizam koji je odgovoran za uticaj estradiola na osetljivost na insulin može da uključuje efekte estradiola na molekule iz insulinskog signalnog puta. Niske koncentracije estradiola, slične onima u ranoj trudnoći mogu biti odgovorne za povećanje insulinske senzitivnosti tako što povećavaju nivo proteina IR u perifernim tkivima (mišići i adipozno tkivo) (Gonzalez i sar., 2002b). Visoke (suprafiziološke) doze estradiola narušavaju insulinsku senzitivnost u perifernim tkivima tako što smanjuju broj IR, što je posledica smanjenja ekspresije gena za IR (Gonzalez i sar.,



2002a). Koncentracije estradiola slične onima u ranoj trudnoći vode i ka povećanju nivoa proteina IRS-1 u perifernim tkivima i tako povećavaju osetljivost na insulin (Gonzalez i sar., 2001). Fiziološke koncentracije estradiola povećavaju ekspresiju iRNK za IRS-1 i IRS-2 kod insulin rezistentnih HepG2 ćelija (Xie i sar., 2003).

#### 1.7.4 Efekti estradiola u srcu

Veza između pola i kardiovaskularnih bolesti je dobro proučena i utvrđeno je da su žene pre nastupanja menopauze u određenoj meri zaštićene od kardiovaskularnih bolesti u poređenju sa muškarcima. Ova protekcija se većim delom pripisuje delovanju ženskih polnih hormona kao što je estradiol, koji utiče na različite procese u srcu i vaskulaturi i tako smanjuje rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Czubryt i sar., 2006). U periodu pre nastupanja menopauze žene imaju niži stepen učestalosti koronarne bolesti srca, koja se povećava brzo nakon menopauze i približava se stepenu učestalosti koji je zabeležen kod muškaraca (Gray i sar., 2001). Epidemiološke studije su pokazale da kod žena u postmenopauzi nakon supstitucione terapije estrogenom (ERT, engl. *estrogen replacement therapy*) dolazi do smanjenja koronarne bolesti srca za 50%. Međutim, tri velike placebo kontrolisane studije: HERS studija (engl. *heart and estrogen/progestin replacement study*), ERA studija (eng. *estrogen replacement and atherosclerosis trail*) i WHI-HRT studija (engl. *womens health initiative hormone replacement trail*) sugerišu da ERT nije kardioprotektivna kod žena u postmenopauzi sa kardiovaskularnom bolešću i može čak da poveća tromboembolizam i kardiovaskularne poremećaje (Subbiah, 2002). Prve dve studije mogu da budu kritikovane na bazi toga da su uključile starije pacijente sa utvrđenom koronarnom bolesti srca koji su možda imali povećanu podložnost trombogenim efektima estrogena, i da su kombinovale estrogen sa androgenim progestinom, koji može da modifikuje delovanje estrogena (Gray i sar., 2001).

Estrogeni u fiziološkim koncentracijama proizvode različite efekte na kardiomiocite i fibroblaste, koronarnu vaskulaturu i sprovodna vlakna u srcu. Ovi efekti mogu da se pridodaju i drugim vaskularnim i lipidnim odgovorima na estrogene, pri čemu se smatra da je 25% kardioprotekcije delovanjem estrogena posledica promene lipidnog profila (Brown i sar., 2000). Estrogen utiče na koncentraciju lipida u serumu,

koagulaciju i fibrinolitički sistem, sistem antioksidativne zaštite i produkciju vazoaktivnih molekula, kao što su NO i prostaglandini, pri čemu svi navedeni faktori mogu da utiču na razvoj vaskularne bolesti (Mendelsohn i Karas, 1999).

Supstituciona terapija hormonima kod žena u postmenopauzi menja lipidni profil ka antiaterogenim karakteristikama, uglavnom tako što smanjuje LDL (engl. *low-density lipoprotein*) holesterol i povećava HDL (engl. *high-density lipoprotein*) holesterol i TG (Erberich i sar., 2002). Estrogeni povećavaju nivo apolipoproteina A1 i povećavaju receptore za LDL na površini ćelija jetre kod žena u postmenopauzi (Nilsson i Gustafsson, 2002).

#### 1.7.4.1 Uloga estradiola u fiziologiji srca

Postoje značajne polne razlike u osnovnim kardiovaskularnim funkcijama. Zdrave žene imaju veće indekse ejakcione faze u poređenju sa zdravim muškarcima iste dobi. Žene u periodu pre nastupanja menopauze imaju veći odnos pritisak–zapremina, ejakcionu frakciju i ejakcionu brzinu u odnosu na žene u postmenopauzi. Žene imaju i veću elastičnost arterija nego muškarci do 50. godine, nakon čega se krutost arterija povećava (Babiker i sar., 2002).

U koronarnim krvnim sudovima žena u postmenopauzi fiziološke koncentracije estradiola povećavaju koronarni protok stimulisan acetilholinom i smanjuju koronarnu rezistenciju tako što povećavaju dostupnost NO, što je u skladu sa podacima da je celokupna produkcija NO veća kod zdravih žena u periodu pre menopauze nego kod muškaraca (Brown i sar., 2000).

QT interval je duži kod žena nego kod muškaraca i žene su podložnije tahikardijama komora izazvanim lekovima, što je posledica produžetka ovog intervala (Turgeon i sar., 2006). Estradiol može da reguliše nivo i aktivnost jonskih kanala i moduliše repolarizaciju srca. Estrogen smanjuje iRNK za Kv4.3 i Kv1.5 komponente kanala za  $K^+$ , povećava ekspresiju  $Na^+/Ca^{2+}$  izmenjivača i smanjuje ekspresiju  $Ca^{2+}$  kanala L-tipa (Murphy, 2011). Estradiol moduliše jonske kanale i negenomskim mehanizmom preko puta koji zavisi od cGMP. Ovo uključuje NO stimulisanu blokadu  $Ca^{2+}$  kanala L-tipa i aktivaciju  $K^+$  kanala delovanjem cGK (Babiker i sar., 2002).

Tretman ovarijektomisanih pacova estradiolom vraća, u okviru normalnih vrednosti, bradikardiju koja nastaje aktivacijom barorefleksnog sistema, aktivnost eNOS, ekspresiju eNOS i asocijaciju eNOS sa kaveolinom-3 i kalmodulinom u srcu (Wang i Abdel-Rahman, 2002).

#### 1.7.4.2 Uloga estradiola u patologijama srca

Hipertrofija leve komore (LVH, engl. *left ventricular hypertrophy*) srca predstavlja nezavisni rizik za štetne kardiovaskularne ishode kao što su moždani udar i srčana slabost. Primećeno je da žene u premenopauzi imaju manju učestalost LVH nego muškarci istih godina, i da supstituciona terapija estradiolom smanjuje LVH kod žena u postmenopauzi (Kim i Levin, 2006).

Ovarijektomija kod pacova onemogućava srce da kompenzuje hipertrofiju koja nastaje kao posledica preopterećenja pritiskom, preko smanjenja aktivnosti eNOS i poremećaja u signalnom putu Akt, kao i smanjenja nivoa distrofina u srcu (Bhuiyan i sar., 2007). Tretman ovarijektomisanih pacova estradiolom popravlja poremećaje u funkciji srca nastale kao posledica hipertrofije indukovane velikim pritiskom, mehanizmom koji uključuje aktivaciju signalnog puta Akt/eNOS (Tagashira i sar., 2011). Supstituciona terapija estradiolom sprečava razvoj hipertrofije leve komore i kardiomiocita, preko ER, mehanizmom koji uključuje povećanje proteozomalne degradacije kalcineurina (Donaldson i sar., 2009).

Povreda koja nastaje kao posledica ishemije/reperfuzije (I/R) je usko povezana sa gubitkom kardiomiocita putem apoptoze, verovatno kao posledica kombinacije značajnog opterećenja ishemijom i oksidativnog stresa nakon reperfuzije (Kim i Levin, 2006). Estradiol smanjuje apoptozu i povećava preživljavanje kardiomiocita nakon simulirane I/R povrede, tako što smanjuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta preko aktivacije signalnog puta PI3K/Akt (Kim i sar., 2006).

Supstituciona terapija fiziološkim koncentracijama estradiola kod ovarijektomisanih ženki miševa redukuje apoptozu kardiomiocita nakon infarkta miokarda mehanizmom koji uključuje aktivaciju puta PI3K/Akt preko ER $\alpha$  (Patten i sar., 2004).

Administracija estradiola nakon krvarenja izazvanog traumom tkiva normalizuje funkciju srca i umanjuje povredu tkiva putem regulacije aktivnosti eNOS preko signalnog puta p38 MAPK (Kan i sar., 2008).

## 2 CILJ

Povećan unos fruktoze kod ljudi i eksperimentalnih životinja izaziva dramatične metaboličke poremećaje, kao što su insulinska rezistencija, dijabetes tipa 2 i metabolički sindrom. Promene koje izaziva ishrana obogaćena fruktozom su kompleksne i javljaju se u metaboličkim tkivima: jetri, adipoznom tkivu i skeletnim mišićima, ali je ovaj način ishrane praćen i razvojem insulinske rezistencije u srcu i kardiovaskularnih bolesti.

Srcu je ciljani organ za insulin i u stanju insulinske rezistencije dolazi do poremećaja u Akt/eNOS signalnom putu i balansu korišćenja energetskih supstrata u srcu.

Pokazano je da su posledice povećanog unosa fruktoze izraženije kod mužjaka nego kod ženki, pri čemu je protektivni efekat pripisan estrogenima. Estrogeni su od značaja za održavanje osetljivosti na insulin i imaju važnu ulogu u regulaciji funkcije srca, pri čemu su njihove fiziološke koncentracije kardioprotektivne.

Ova studija je imala za cilj proveru polazne hipoteze da estrogeni mogu delovati protektivno na srce u stanju insulinske rezistencije izazvane ishranom bogatom fruktozom, kao što deluju protektivno u drugim patologijama srca. Proučavani su efekti estradiola na procese u srcu regulisane insulinom kod ovarijsktomisanih ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Analizirani su molekuli iz insulinskog signalnog puta (IRS-1, Akt i ERK1/2), kao i efektorni molekuli čiju funkciju reguliše insulin, kao što su eNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza i molekuli uključeni u transport i metabolizam energetskih supstrata u srcu (GLUT1, GLUT4, CD36, Lipin 1 i CPT1), kao i lipidni profil srca.

### 3 MATERIJAL I METODE

#### 3.1 MATERIJAL

##### 3.1.1 Hemikalije

U eksperimentima su korišćene hemikalije p.a. stepena čistoće. Od firme Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis MO, USA) nabavljeni su: fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*), saharoza, natrijum fluorid,  $\beta$ -merkaptoetanol, etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*), akrilamid, bisakrilamid, albumin govedeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*), natrijum dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*), insulin i  $17\beta$ -estradiol. Od firme SERVA electrophoresis (Heidelberg, Germany) nabavljene su sledeće hemikalije: Tween-20, Tris baza, glicin, aprotinin i N,N,N',N'-tetrametiletildiamin.

Komplet za esej bicinoninične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) je proizvod firme Pierce (Rockford, IL, USA). RIA kit za insulin je proizvod firme INEP (Zemun, Srbija). Enzimski imunoesej test za estradiol (BC-111) je proizvod firme BioCheck Inc. (Foster City, CA, USA). Pacovski ELISA kit za leptin je proizvod firme Merck Millipore (Billerica, MA, USA). 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (DHB), matrica za MALDI-TOF MS (engl. *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry*) i supstrati za pojačanu hemiluminiscentnu (ECL, engl. *enhanced chemiluminescence*) detekciju *Western blot* (luminol i p-kumarična kiselina) su proizvodi firme Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Supstrat za detekciju alkalnom fosfatazom, BCIP/NBT (engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium*) je proizvod firme Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

Životinje su hranjene standardnom hranom za ishranu laboratorijskih pacova, koju proizvodi Veterinarski zavod „Subotica“ (Subotica, Srbija).

### 3.1.2 Antitela

Antitela korišćena u *Western blot* analizi su od sledećih proizvođača: zečija poliklonska anti-GLUT4 (sc-7938), anti-GLUT1 (sc-7903), anti-CD36 (sc-9154), anti-fosfo-Akt1/2/3 (Thr<sup>308</sup>) (sc-16646), anti-fosfo-Akt1/2/3 (Ser<sup>473</sup>) (sc-7985), anti-fosfo-eNOS (Thr<sup>495</sup>) (sc-19827), anti-CPTI (sc-98834), anti-lipin 1 (sc-98450) i anti-IRS-1 (sc-8038) antitelo, mišje monoklonsko anti- $\alpha$ 1 subjedinica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze (sc-21712), kozje poliklonsko anti- $\alpha$ 2 subjedinica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze (sc-16049) i anti-fosfo-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (sc-12972) antitelo su proizvodi firme Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Zečije poliklonsko anti-Akt1/2/3 (9272), anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (9101), anti-ERK1/2 (9102) i zečije monoklonsko anti-eNOS (9586) antitelo su proizvodi firme Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Zečije anti-fosfo-IRS-1 (Ser<sup>307</sup>) (07-247) antitelo je proizvod firme Upstate Biotechnology (NY, USA). Monoklonsko mišje anti- $\beta$ -aktin antitelo (A5316) je proizvod firme Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Sekundarna antitela obeležena peroksidazom iz rena (HRP, engl. *horse-radish peroxidase*) ili alkalnom fosfatazom su produkti firme Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

### 3.1.3 Eksperimentalne životinje

Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičke komisije za upotrebu eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke "Vinča".

U eksperimentima su korišćene ženke pacova soja *Wistar*. Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima (na konstantnoj temperaturi od 22°C, vlažnosti vazduha 55% i svetlosnom režimu 12 h svetlo/12 h mrak). Ženke starosti 21 dan su odvojene od majki i podeljene u dve glavne grupe prema režimu ishrane: životinje na standardnoj ishrani – kontrolne životinje (K) i životinje na ishrani bogatoj fruktozom (F). Kontrolna grupa životinja je imala slobodan pristup standardnoj laboratorijskoj hrani i česmenskoj vodi. Životinje na ishrani bogatoj fruktozom su takođe imale slobodan pristup standardnoj laboratorijskoj hrani, dok su umesto vode pile 10% rastvor fruktoze u česmenskoj vodi. Režim ishrane je trajao 9 nedelja. Telesna masa životinja u

K i F grupi se nije značajno razlikovala na početku eksperimenta. Unos tečnosti i hrane, kao i masa tela su mereni tokom tretmana.

Dve nedelje pre žrtvovanja sve životinje su ovarijektomisane pod anestezijom ketamin (40 mg/kg, intraperitonealno) – ksilazin (5 mg/kg, intraperitonealno), da bi se uklonili endogeni estrogene i izbegli njihovi efekti. Dan nakon ovarijektomije, polovina životinja na fruktoznoj ishrani je podvrgnuta tretmanu  $17\beta$ -estradiolom (40  $\mu$ g/kg u lanenom ulju, subkutano) (F+E2) na svaka dva dana sve do dan pre žrtvovanja. Ostale životinje na fruktoznoj ishrani su tretirane odgovarajućom zapreminom hormonskog rastvarača. Doza i način administracije estradiola su preuzeti iz literature kao supstitucionni protokol, da bi se postigle koncentracije bliske fiziološkim (Sales i sar., 2010).

U cilju izučavanja efekata ishrane bogate fruktozom i estradiola na insulinom regulisanu fosforilaciju i lokalizaciju ispitivanih molekula, sve eksperimentalne grupe su dodatno podeljene u dve podgrupe, od kojih je jedna tretirana insulinom (12 IU/kg u 0,015 M HCl, intraperitonealno) 40 minuta pre žrtvovanja. Preostale životinje su tretirane odgovarajućom zapreminom hormonskog rastvarača. Doza i vreme insulinskog tretmana su takođe procenjeni na osnovu literaturnih podataka (Carvalho i sar., 2003) i optimizovani da bi se uočili maksimalni efekti insulina na ispitivane molekule (Tepavcevic i sar., 2011).

Sumarno, ovarijektomisane ženke su podeljene u 6 eksperimentalnih grupa:

K – životinje na standardnoj ishrani

K+INS – životinje na standardnoj ishrani tretirane insulinom

F – životinje na ishrani bogatoj fruktozom

F+INS – životinje na ishrani bogatoj fruktozom tretirane insulinom

F+E2 – životinje na ishrani bogatoj fruktozom tretirane estradiolom

F+E2+INS – životinje na ishrani bogatoj fruktozom tretirane estradiolom i insulinom

Nakon 9 nedelja dijetetskog režima životinje su žrtvovane dekapitacijom. Izolovani su srce i visceralno masno tkivo i merena je njihova masa. Radi merenja biohemijskih parametara životinje su gladovale preko noći, pri čemu su umesto 10% rastvora fruktoze pile vodu. Krv je sakupljena u staklene epruvete u kojima se kao antikoagulans nalazila 6% EDTA. Koncentracija glukoze i TG je određivana u uzorku pune krvi, odmah nakon sakupljanja. Određivanje ostalih biohemijskih parametara je



vršeno u plazmi. Uzorci krvi su centrifugirani 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehnica LC-321). Nakon centrifugiranja, plazma je prebačena u plastične epruvete i korišćena odmah ili zamrzavana i čuvana na  $-20^{\circ}\text{C}$  do određivanja ostalih biohemijskih parametara.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 *Određivanje biohemijskih parametara*

#### 3.2.1.1 *Određivanje koncentracije glukoze u krvi*

Koncentracija glukoze je određivana u uzorku pune krvi pomoću automatskog Accutrend glukozometra (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

#### 3.2.1.2 *Određivanje koncentracije triglicerida u krvi*

Koncentracija TG je određivana u uzorku pune krvi pomoću aparata Multicare (Biochemical Systems International, Arezzo, Italy).

#### 3.2.1.3 *Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi*

Koncentracija FFA u plazmi je određivana modifikovanom metodom po Duncombe (Duncombe, 1964). Princip metode se zasniva na tome da FFA pri dodatku odgovarajućeg reagensa koji sadrži  $\text{Cu}^{2+}$  jone (trietanolaminski pufer i  $\text{Cu}(\text{NO})_3\text{X}3\text{H}_2\text{O}$ ), grade soli bakra koje se ekstrahuju u hloroformskoj fazi. Nastale soli u kontaktu sa dietilditiokarbamatom grade kompleksno jedinjenje žute boje, sa maksimumom apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm.

Uzorak plazme je inkubiran sa TEA puferom (trietanolamin, pH 7,8) i hloroformom 20 min na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana 10 min na 3000 rpm (Tehnica LC-321), nakon čega je uklonjen gornji vodeni sloj. Srednji hloroformski sloj je prebačen u nove epruvete, inkubiran 20 minuta

sa 0,2% dietilditiokarbamatom na sobnoj temperaturi i merena je apsorbancija na 436 nm (Ultrospec II, LKB). Koncentracija FFA je očitavana sa standardne krive koja je dobijena prema istom protokolu korišćenjem različitih koncentracija palmitinske kiseline (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 mM).

#### 3.2.1.4 Određivanje koncentracije insulina u plazmi

Određivanje koncentracije insulina u plazmi je vršeno pomoću RIA metode, upotrebom kita koji je testiran za određivanje insulina u plazmi pacova. Princip metode se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka i radioaktivno obeleženog insulina ( $^{125}\text{I}$ -insulin) za određeni broj epitopa na specifičnim anti-insulin antitelima, pri čemu nastaju obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Obeleženog kompleksa se formira utoliko manje ukoliko ima više insulina u uzorku. Nakon inkubacije uzoraka plazme sa obeleženim insulinom i antitelima tokom 20 h na sobnoj temperaturi, nastali kompleksi su taloženi imunoadsorbentom (inkubacija 30 min na sobnoj temperaturi) i centrifugirani 25 min na 3000 x g. Slobodni insulin i slobodna antitela zaostaju u tečnoj fazi, dok talog predstavlja kombinaciju sekundarnih antitela, polietilenglikola i vezanog insulina. Radioaktivnost taloga je merena u toku 1 minuta brojačem 1219 LKB. Koncentracija insulina je određena upoređivanjem sa standardnom krivom, koja je formirana tretiranjem standarda koji sadrže precizno definisane koncentracije insulina (0,3, 3, 10, 30, 100 i 300 mIU/l). Osetljivost eseja je 0.6 mIU/l, a unutrašnji koeficijent varijacije u eseju 5,24%.

#### 3.2.1.5 Određivanje koncentracije estradiola u plazmi

Određivanje koncentracije estradiola u plazmi je vršeno ELISA kitom prema instrukcijama proizvođača. Esej se zasniva na principu kompetitivnog vezivanja estradiola iz uzoraka i estradiola konjugovanog sa HRP za konstantnu količinu zečijeg anti-estradiolskog antitela. Nakon unošenja uzoraka plazme i standarda, estradiola konjugovanog sa HRP i zečijeg anti-estradiolskog antitela u bunarić na mikrotitar ploči koji je obložen anti-zečijim antitelom, smeša je inkubirana 90 min na sobnoj temperaturi. Što je koncentracija estradiola u uzorku veća, količina vezanog estradiol-

HRP konjugata je manja. Nevezani estradiol–HRP konjugat je zatim uklonjen ispiranjem bunarića. Nakon toga u bunariće je dodat supstrat za HRP, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta, pri čemu se razvila plava boja. Posle zaustavljanja reakcije dodatkom 1N HCl, apsorbance rastvora u bunariću je merena spektrofotometrijski na 450 nm (Wallac 1420 Victor 2, Perkin-Elmer, Boston, MA). Intenzitet boje je proporcionalan količini enzima i obrnuto proporcionalan količini nevezanog estradiola u uzorcima. Koncentracija estradiola je izračunata na osnovu standardne krive, koja je dobijena merenjem apsorbance standarda poznate koncentracije (0, 10, 30, 100, 300 i 1000 pg/ml).

### 3.2.1.6 Određivanje koncentracije leptina u plazmi

Koncentracija leptina u plazmi je određivana pomoću komercijalnog „sendvič“ ELISA eseja, prema instrukcijama proizvođača. Nakon nanošenja na mikrotitar ploču u duplikatu, standardi, kontrolni uzorci i razblaženi uzorci plazme su inkubirani sa anti-mišjim antitelom na leptin konjugovanim sa peroksidazom rena. Nakon ispiranja, u bunariće mikrotitar ploče je dodat hromogeni supstrat HRP, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin i reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi. Enzimaska reakcija je zatim prekinuta dodatkom 0,5 M HCl i merene su apsorbance na 450 nm i 590 nm (590 nm je korekciona apsorbance) korišćenjem automatskog ELISA čitača za mikrotitar ploče (Multiskan Spectrum, Thermo ELECTRON CORPORATION, Finska). Koncentracija leptina je izračunata korišćenjem 4PL krive (eng. *4-parameter logistic curve*) (Prism, GraphPad Software, Inc.).

### 3.2.2 Priprema ćelijskog lizata srca

Nakon žrtvovanja, srca su izolovana, isprana u fiziološkom rastvoru, osušena i izmerena. Zatim su iseckana i pulovana, da bi se dobila dovoljna količina za izolovanje potrebnih ćelijskih kompartmana. Jedna trećina svakog uzorka je korišćena za dobijanje ćelijskog lizata srca. Uzorci srca su homogenizovani na ledu Ultra-Turrax homogenizerom u puferu za liziranje (pH 7,4) koji je sadržao 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, proteazne inhibitore (2 mM

PMSF, 10 µg/ml leupeptin i 10 µg/ml aprotinin) i fosfatzne inhibitore (100 mM natrijum fluorid, 10 mM natrijum pirofosfat i 2 mM natrijum ortovanadat) u odnosu 1:7 (m:V) (Dupont i sar., 1998). Homogenati su zatim centrifugirani na 600 x g, na 4°C 20 minuta u Sorvall centrifugi. Dobijeni supernatanti su centrifugirani 60 min na 100000 x g (Beckman, Ti-50 rotor) i u nastalim supernatantima, koji predstavljaju ukupni ćelijski lizat, određivana je koncentracija proteina pomoću BCA metode. Nakon toga uzorci ćelijskog lizata su pripremljeni za *Western blot* analizu tako što su razblaživani do koncentracije 5 mg/ml odgovarajućim puferom i zatim do finalnih 2,5 mg/ml dodavanjem iste zapremine 2 x Laemmli pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM β-merkaptoetanol, 4% SDS, 0,2% bromfenol plavo i 20% glicerol), kuvani (5 min na 100 °C) i zamrznuti na -20 °C (Laemmli, 1970).

### 3.2.3 Izolovanje plazma membrana i mikrozoma niske gustine iz srca

Preostale 2/3 pulovanih srca su korišćene za izolaciju plazma membrana i mikrozoma niske gustine. Uzorci su inkubirani 30 min u hladnom rastvoru soli visoke koncentracije (2 M NaCl, 20 mM HEPES i 5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4). Nakon inkubacije nastala suspenzija je centrifugirana 5 min na 1000 x g (Beckman, J21) i dobijeni talog je homogenizovan Ultra-Turrax homogenizerom u TES puferu (20 mmol/l Tris, 250 mmol/l saharoza, 1 mmol/l EDTA, pH 7,4) kom su dodati proteazni inhibitori (10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 2 mM PMSF). Homogenati su zatim centrifugirani 5 min na 1000 x g, nakon čega su talozi rehomogenizovani u TES puferu u staklo-teflon homogenizeru i ponovo spajani sa supernatantima. Tako nastali homogenati su centrifugirani 10 min na 100 x g i dobijeni talozi (T1) su resuspendovani u TES puferu. Supernatanti su centrifugirani 10 min na 5000 x g i nastali talozi (T2) su resuspendovani u TES puferu. Odgovarajući supernatanti su centrifugirani 20 minuta na 20000 x g i dobijeni talozi (T3) su resuspendovani u TES puferu. Zatim su supernatanti centrifugirani 30 min na 48000 x g. Dobijeni talozi (T4) su resuspendovani u TES puferu, dok su supernatanti centrifugirani 80 min na 200000 x g. Izdvojeni talozi (T5) su resuspendovani u TES puferu. Na osnovu sugestija autora originalnog protokola (Luiken i sar., 2002) talog T2 je tretiran kao frakcija plazma membrana (PM), dok je talog T5 tretiran kao frakcija mikrozoma niske gustine (LDM). Nakon određivanja

koncentracije proteina BCA metodom, uzorci PM i LDM su pripremljeni za *Western blot* analizu, na isti način kao i uzorci ćelijskog lizata.

### 3.2.4 *Određivanje koncentracije proteina*

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana BCA metodom, korišćenjem komercijalnog kompleta (Smith i sar., 1985). BCA metoda predstavlja kombinaciju biuretske reakcije, koja podrazumeva redukciju  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  proteinima u alkalnoj sredini i visoko osetljive i selektivne kolorimetrijske detekcije bakarnih jona pomoću reagensa koji sadrži BCA. Kao rezultat helacije dva molekula BCA i jednog  $\text{Cu}^{1+}$  jona nastaje ljubičasto obojen produkt koji apsorbuje svetlost na 562 nm. Koncentracija proteina u uzorcima lizata, PM i LDM je određena pomoću BCA kita prema instrukcijama proizvođača. Koncentracija proteina je očitavana sa standardne krive koja je dobijena korišćenjem poznatih koncentracija BSA u rasponu 20  $\mu\text{g/ml}$  do 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.2.5 *SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu*

U cilju analize ukupnog proteinskog sadržaja, fosforilacije i unutarćelijske lokalizacije molekula signalnog puta insulina i nishodnih efektnih molekula, proteini iz uzoraka ukupnog ćelijskog lizata, kao i uzoraka PM i LDM su prvo razdvajani metodom SDS elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS PAGE).

SDS PAGE je tehnika za razdvajanje denaturisanih proteina na osnovu razlika u njihovoj relativnoj molekularnoj masi. Kako bi se razdvojili zavisno od njihove molekulske mase, proteini su pomoću kuvanja i SDS, anjonskog deterdženta, prevedeni u linearne polipeptidne lance, čime je narušena tercijarna struktura proteina i maskirano naelektrisanje koje potiče od aminokiselinskih ostataka. Uzorci ukupnog ćelijskog lizata, PM ili LDM (75  $\mu\text{g}$  proteina/bunariću) su nanošeni na 7,5% ili 10% SDS poliakrilamidni gel i razdvajani pomoću Mini Protean Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Elektroforeza se odvijala prvih 15 min na 150 V, a zatim još 1,5 h na 100 V. Kao marker molekularskih masa korišćen je proteinski marker koji sadrži proteine molekularskih masa 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa.

### 3.2.6 Western blot

*Western blot* je tehnika koja se koristi za detekciju i analizu proteina u kompleksnoj smeši različitih proteina, na osnovu njihove sposobnosti da se vežu za specifična antitela. To je semikvantitativna tehnika gde se nakon razdvajanja proteina pomoću SDS PAGE vrši elektrotransfer proteina na nitroceluloznu ili PVDF (engl. *polyvinyl difluoride*) membranu. Preneseni proteini se zatim detektuju pomoću primarnih i sekundarnih antitela kuplovanih sa enzimom koji u reakciji sa odgovarajućim supstratom daje obojeni ili hemiluminescentni produkt.

Nakon završetka SDS PAGE izvršen je transfer proteina sa gela na PVDF membranu (Hybond-P, membrana, veličine pora 0.45  $\mu\text{m}$ , Amersham). Transfer je rađen u puferu za SDS PAGE (0,0025 M Tris, 0,192 M glicin i 0,1% SDS, pH 8,3), sa dodatkom metanola (20%) preko noći na 4°C, pri konstantnoj jačini struje od 80 mA u aparatu za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio-Rad). Posle transfera proteina sa gela, membrane su inkubirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBST puferu, TBST pufer: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 8,0) 1,5 h na sobnoj temperaturi, da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu.

Nakon toga, membrane su inkubirane preko noći na 4°C sa primarnim antitelima na fosfo-IRS1 (Ser<sup>307</sup>), IRS-1, fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>, Thr<sup>308</sup>), Akt, fosfo-ERK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), ERK, fosfo-eNOS (Ser<sup>1177</sup>, Thr<sup>495</sup>), eNOS,  $\beta$ -aktin, GLUT4, GLUT1, CD36,  $\alpha$ 2 subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze,  $\alpha$ 1 subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, lipin 1 ili CPTI pri analizi ćelijskog lizata, kao i sa primarnim antitelima na GLUT4, GLUT1, CD36,  $\alpha$ 2 subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze ili  $\alpha$ 1 subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze, u slučaju PM i sa primarnim antitelima na GLUT4, GLUT1 i CD36 pri analizi LDM. Razblaženja primarnih antitela su pravljena u TBST puferu u odnosu 1:500 ili 1:1000. Posle inkubacije sa primarnim antitelima membrane su ispirane 5 x 5 min u TBST puferu. Nakon toga membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-zečijim, odnosno anti-mišjim ili anti-kozjim antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženje 1:10000, TBST) ili alkalnom fosfatazom (razblaženje 1:5000, TBST), 1,5 h na sobnoj temperaturi. Zatim su membrane ponovo ispirane 5 x 5 min u TBST puferu.

Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim supstratom radi detekcije traka koje potiču od ciljnog proteina. Ukoliko su sekundarna antitela bila

konjugovana sa HRP, membrane su inkubirane u mraku 3 min sa ECL supstratom koji nastaje mešanjem jednake količine rastvora koji sadrži luminol i rastvora koji sadrži vodonik perksid. Nakon toga membrane su u kaseti za razvijanje inkubirane 3 min sa rendgen filmom (ORTO CP-G-PLUS, AGFA), pri čemu intenzitet signala na filmu odgovara količini ciljnog proteina u analiziranim uzorcima. U slučaju alkalne fosfataze membrane su inkubirane u mraku 5 min sa BCIP/NBT, koji delovanjem enzima daje nerastvorljivi tamno-ljubičasti precipitat u vidu traka na membrani.

Posle određivanja sadržaja fosfo formi analiziranih molekula, membrane su inkubirane 30 min na 50°C u puferu za „stripovanje“ (100 mM  $\beta$ -merkaptotanol, 2% SDS i 62,5 mM Tris pH 6,7), radi uklanjanja prethodno vezanog primarnog antitela, sekundarnog antitela i supstrata. Nakon toga membrane su ispirane 2 x 10 min u TBST puferu i inkubirane u 5% BSA i reblotovane sa antitelima na IRS-1, Akt, ERK i eNOS. Radi kontrole jednakog unosa proteina u svim uzorcima ćelijskog lizata, korišćeno je anti- $\beta$ -aktin antitelo.

### 3.2.7 Izolacija lipida iz srca i MALDI-TOF MS

Ekstrakcija lipida iz srca je rađena prema modifikovanoj Folch metodi (Folch i sar., 1957). 100 mg tkiva je homogenizovano u 2,5 ml smeše hloroforma i metanola (1,5:1). U homogenat je zatim dodat vodeni rastvor 0,45 M HCl i smeša je snažno mućkana. Nastala ekstrakciona smeša je centrifugirana, nakon čega je gornji hloroformski sloj izdvojen za analizu lipida.

Sastav lipida u srcu je analiziran pomoću masenospektrometrijske metode koja koristi „meku“ jonizaciju uz pomoć matrice, koristeći uređaj Bruker Autoflex sa ultraljubičastim azotnim laserom koji emituje na 337 nm. 0,5  $\mu$ l hloroformskog ekstrakta lipida je nanošeno na ploču (čelik presvučen zlatom) za MALDI-TOF, pri čemu je rastvarač momentalno isparavan pod strujom toplog vazduha. Nakon toga je nanošena ista zapremina rastvora matrice (0,5 M DHB) u metanolu, koji je takođe isparavan. Nakon ozračivanja laserom (jonizacija uzorka), joni se ubrzavaju u polju visokog napona kako bi stigli do dela TOF analizatora koji se zasniva na vremenu preleta. Svi maseni spektri su dobijeni u uslovima gde se ubrzavajuća voltaža

primenjuje sa malim zakašnjenjem nakon laserskog pulsa (*delayed extraction mode*) u reflektornom modu.

### 3.2.8 Statistička obrada rezultata

Kvantifikacija rezultata dobijenih *Western blot* metodom je vršena denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Izmerene vrednosti za optičku gustinu (OD) signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražavane u arbitrarnim jedinicama (count).

Rezultati su izražavani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) od tri nezavisna eksperimenta vršena sa ukupno 9 životinja po grupi. Za procenu statističke značajnosti razlika između dve eksperimentalne grupe korišćena je jednofaktorska parametarska analiza varijanse – ANOVA (one-way ANOVA). Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.



## 4 REZULTATI

### 4.1 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA UNOS HRANE I TEČNOSTI I KALORIJSKI UNOS KOD OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

Unos hrane je bio smanjen kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom ( $P < 0,05$  vs. K), dok je unos tečnosti bio povećan ( $P < 0,001$  vs. K). Kalorijski unos je također bio povećan kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom ( $P < 0,05$  vs. K) (Tabela 1).

Tretman estradiolom životinja na ishrani bogatoj fruktozom je smanjio unos tečnosti ali je on još uvek bio povišen u odnosu na unos kod kontrolnih životinja ( $P < 0,05$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. F), dok je dodatno smanjio unos hrane ( $P < 0,001$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. F). Takođe estradiolski tretman je smanjio i kalorijski unos ( $P < 0,05$  vs. F) na nivo sličan onom koji je zabeležen kod kontrolnih životinja (Tabela 1).

### 4.2 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA FIZIČKE KARAKTERISTIKE OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

S obzirom da ishrana bogata fruktozom i estradiolski tretman mogu da utiču na masu tela, srca i visceralnog masnog tkiva, merene su ove karakteristike, pri čemu su masa srca i masa visceralnog masnog tkiva izražene kao apsolutna ili relativna vrednost u odnosu na masu tela.

Ni ishrana bogata fruktozom, ni estradiolski tretman nisu promenili masu tela i masu srca, kao ni odnos mase srca i mase tela (Tabela 1).

Sa druge strane, ishrana bogata fruktozom je dovela do povećanja apsolutne i relativne mase visceralnog masnog tkiva (Tabela 1). Međutim ovo povećanje nije statistički značajno, najverovatnije zbog velikih individualnih varijacija. Estradiolski

tretman je delovao u smeru smanjenja apsolutne i relativne mase visceralnog masnog tkiva, ali bez statističke značajnosti (Tabela 1).

**Tabela 1. Unos hrane, tečnosti i kalorija i fizičke karakteristike ovarijektomisanih ženki pacova.** Unosi hrane i tečnosti su mereni tokom trajanja režima ishrane za sve eksperimentalne grupe, dok je kalorijski unos izračunat kao zbir kalorija koje su unete kroz hranu i rastvor fruktoze. Masa tela, srca i visceralnog masnog tkiva su izmerene na dan žrtvovanja. Masa srca i masa visceralnog masnog tkiva su izražene kao apsolutna ili relativna vrednost u odnosu na masu tela. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. \* $P < 0,05$  vs. K, \*\*\* $P < 0,001$  vs. K, <sup>s</sup> $P < 0,05$  vs. F. K: kontrola; F: fruktoza; E2: estradiol.

	K	F	F+E2
<b>Unos hrane (g/dan/pacov)</b>	19,23 $\pm$ 1,85	16,31 $\pm$ 3,37*	14,46 $\pm$ 1,62*** <sup>s</sup>
<b>Unos tečnosti (ml/dan/pacov)</b>	28,51 $\pm$ 4,54	48,75 $\pm$ 14,81***	37,93 $\pm$ 11,49* <sup>s</sup>
<b>Kalorijski unos (kJ/dan/pacov)</b>	211,57 $\pm$ 20,31	263,26 $\pm$ 58,29*	224,31 $\pm$ 32,62 <sup>s</sup>
<b>Masa tela (g)</b>	293,15 $\pm$ 23,09	286,94 $\pm$ 26,64	279,54 $\pm$ 18,71
<b>Masa srca (g)</b>	0,92 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,08
<b>Masa srca/masa tela (x10<sup>3</sup>)</b>	2,97 $\pm$ 0,12	3,08 $\pm$ 0,09	3,01 $\pm$ 0,21
<b>Masa visceralnog masnog tkiva (g)</b>	3,41 $\pm$ 0,63	4,71 $\pm$ 2,09	3,65 $\pm$ 1,11
<b>Masa visceralnog masnog tkiva/Masa tela (x10<sup>2</sup>)</b>	1,10 $\pm$ 0,16	1,57 $\pm$ 0,60	1,29 $\pm$ 0,36

#### 4.3 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

##### 4.3.1 Koncentracije glukoze i insulina i HOMA indeks

Koncentracija glukoze u krvi, koncentracija insulina u plazmi i HOMA (engl. *homeostasis model assessment*) indeks su određivani ili računati kao parametri od važnosti za procenu insulinske rezistencije.

Tretman insulinom je smanjio koncentraciju glukoze u krvi ( $P < 0,001$  vs. K) i povećao koncentraciju insulina u plazmi ( $P < 0,001$  vs. K) kod životinja na standardnoj ishrani, što je i bilo očekivano (Tabela 2).

Ishrana bogata fruktozom nije dovela do značajnog povećanja koncentracije glukoze u krvi kod životinja sa ili bez insulinskog tretmana (Tabela 2). U bazalnim uslovima estradiolski tretman životinja na ishrani bogatoj fruktozom je smanjio koncentraciju glukoze u odnosu na životinje bez tretmana ( $P < 0,05$  vs. F), kao i u odnosu na životinje na standardnoj ishrani ( $P < 0,05$  vs. K). Međutim, u insulinom stimulisanim uslovima koncentracija glukoze kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol bila je značajno smanjena samo u odnosu na životinje na fruktoznoj ishrani bez estradiolskog tretmana ( $P < 0,05$  vs. F+INS) (Tabela 2).

Životinje na ishrani bogatoj fruktozom su imale povišenu koncentraciju insulina u plazmi u odnosu na kontrolne životinje ( $P < 0,05$  vs. K), pri čemu je tretman ovih životinja estradiolom anulirao efekte ishrane na koncentraciju insulina u plazmi ( $P < 0,05$  vs. F) (Tabela 2).

HOMA indeks, koji predstavlja indikator insulinske rezistencije, je računat iz podataka za koncentraciju glukoze i koncentraciju insulina prema formuli:  $\text{insulin (mU/l)} \times [\text{glukoza (mmol/l)} / 22,5]$ . HOMA indeks je bio povećan kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom ( $P < 0,001$  vs. K), ali je estradiolski tretman ovih životinja smanjio vrednost HOMA indeksa do nivoa zabeleženog kod životinja na standardnoj ishrani ( $P < 0,01$  vs. F) (Tabela 2).

#### 4.3.2 Koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina

Životinje na ishrani bogatoj fruktozom su imale značajno povišene koncentracije TG u krvi samo u bazalnim uslovima ( $P < 0,05$  vs. K). Životinje na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol su imale nižu koncentraciju TG u krvi, ali je ona i dalje bila povišena u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja ( $P < 0,05$  vs. K) (Tabela 2).

Ishrana bogata fruktozom je smanjila koncentraciju FFA u plazmi u bazalnim uslovima ( $P < 0,05$  vs. K), pri čemu je tretman estradiolom životinja na ishrani bogatoj

fruktozom uzrokovao dodatno smanjenje koncentracije FFA ( $P < 0,001$  vs. K;  $P < 0,01$  vs. F) (Tabela 2).

Insulinski tretman je, sam po sebi, smanjio koncentraciju TG i koncentraciju FFA u plazmi ( $P < 0,001$  vs. K za oba parametra) (Tabela 2). Ishrana bogata fruktozom je umanjila efekte insulina na koncentraciju TG ( $P < 0,01$  vs. F) i koncentraciju FFA ( $P < 0,05$  vs. F), dok je estradiolski tretman životinja na ishrani bogatoj fruktozom poboljšao efekte insulina na koncentraciju TG ( $P < 0,001$  vs. F+E2), ali ne i na koncentraciju FFA (Tabela 2).

#### 4.3.3 Koncentracija leptina

Koncentracija leptina u plazmi je bila povišena kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom ( $P < 0,05$  vs. K), dok je estradiolski tretman ovih životinja delovao u pravcu smanjenja koncentracije leptina, ali je ona i dalje bila značajno povišena u odnosu na koncentracije zabeležene kod pacova na standardnoj ishrani ( $P < 0,05$  vs. K) (Tabela 2).

#### 4.3.4 Koncentracija estradiola

Koncentracija estradiola u plazmi je merena u cilju potvrde ovarijektomije i estradiolskog tretmana. Koncentracije estradiola su bile niske kod svih eksperimentalnih grupa, uključujući i grupe tretirane estradiolom. Koncentracije estradiola različitih grupa se nisu značajno razlikovale, osim što su u insulinom stimulisanim uslovima životinje na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol imale povećanu koncentraciju estradiola u odnosu na životinje na standardnoj ishrani ( $P < 0,05$  vs. K+INS) (Tabela 2).

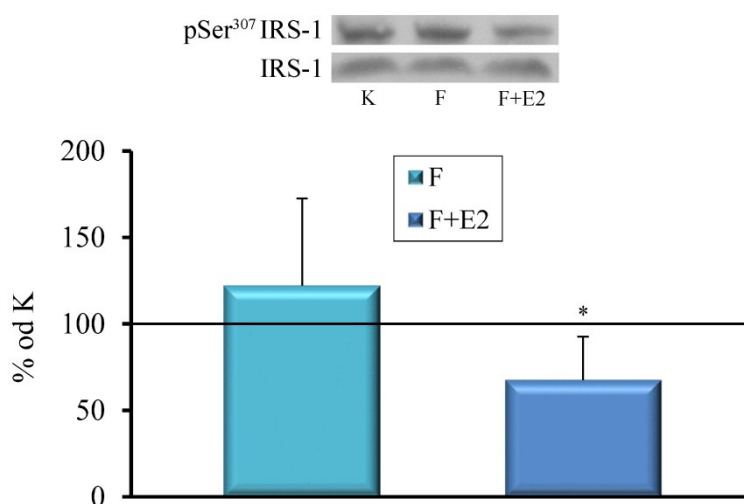
**Tabela 2. Biohemijski parametri ovarijektomisanih ženki pacova.** Koncentracije glukoze i TG su izmerene u punoj krvi na dan žrtvovanja, dok su koncentracije FFA i hormona određene u plazmi, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± S.D. \*P<0,05 vs. K, \*\*\*P<0,001 vs. K, \$P<0,05 vs. F, \$\$P<0,01 vs. F, #P<0,05 vs. K+INS, &P<0,05 vs. F+INS, ???P<0,001 vs. F+E2. TG: trigliceridi; FFA: slobodne masne kiseline; K: kontrola; F: fruktoza; E2: estradiol; INS: insulin.

	K	F	F+E2	K+INS	F+INS	F+E2+INS
<b>Glukoza (mmol/l)</b>	6,15 ± 0,98	6,74 ± 1,33	5,37 ± 0,30*\$	2,85 ± 1,29***	3,21 ± 0,41	2,82 ± 0,23&
<b>Insulin (mU/l)</b>	21,60 ± 16,13	47,48 ± 34,08*	13,08 ± 5,07\$	430,07 ± 74,13***	376,93 ± 71,88	361,99 ± 74,78
<b>HOMA indeks</b>	4,31 ± 2,41	13,63 ± 6,82***	3,17 ± 1,37\$\$	/	/	/
<b>TG (mmol/l)</b>	1,39 ± 0,22	2,19 ± 0,93*	1,73 ± 0,28*	0,97 ± 0,14***	1,14 ± 0,26\$\$	1,07 ± 0,05???
<b>FFA (mmol/l)</b>	0,657 ± 0,156	0,509 ± 0,141*	0,293 ± 0,058***\$\$	0,362 ± 0,139***	0,334 ± 0,142\$	0,227 ± 0,085
<b>Leptin (ng/ml)</b>	0,45 ± 0,27	2,17 ± 1,22*	1,40 ± 0,54*	/	/	/
<b>E2 (pg/ml)</b>	4,73 ± 1,17	4,08 ± 2,16	4,21 ± 1,69	3,25 ± 1,57	4,56 ± 1,12	5,58 ± 1,75#

#### 4.4 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

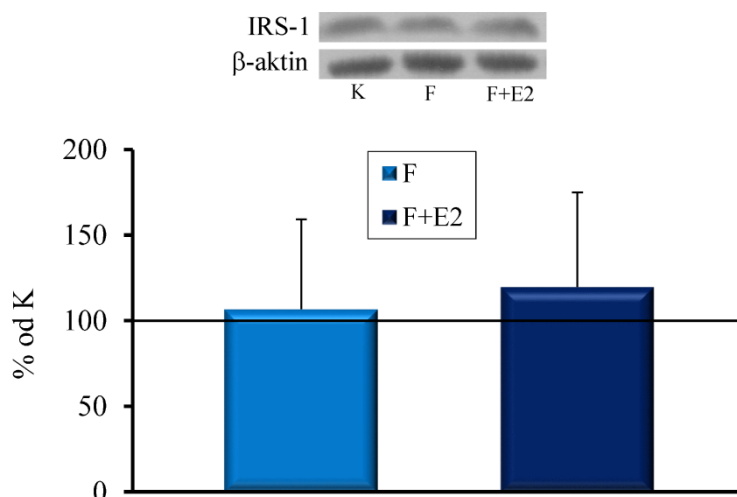
##### 4.4.1 Sadržaj proteina i fosforilacija IRS-1 na Ser<sup>307</sup>

Funkcija IRS-1 je negativno regulisana fosforilacijom Ser ostataka, kao što je Ser<sup>307</sup>. Stepenn fosforilacije IRS1 na Ser<sup>307</sup> se nije značajno povećao kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom, dok je estradiolski tretman ovih životinja smanjio fosforilaciju Ser ostatka u poređenju sa kontrolnim životinjama ( $P < 0,05$  vs. K) (Slika 4).



**Slika 4. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju IRS-1 na Ser<sup>307</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen *Western blot* metodom i prikazani su rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima. Sadržaj fosforilisane forme IRS-1 je normalizovan na ukupan sadržaj proteina IRS-1. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Na vrhu slike su prikazani i reprezentativni imunoblotovi. \* $P < 0,05$  vs. K. K: kontrola; F: fruktoza; E2: estradiol.

Ukupan proteinski sadržaj IRS-1 u ćelijskom lizatu srca se nije promenio kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom bez ili sa estradiolskim tretmanom (Slika 5).

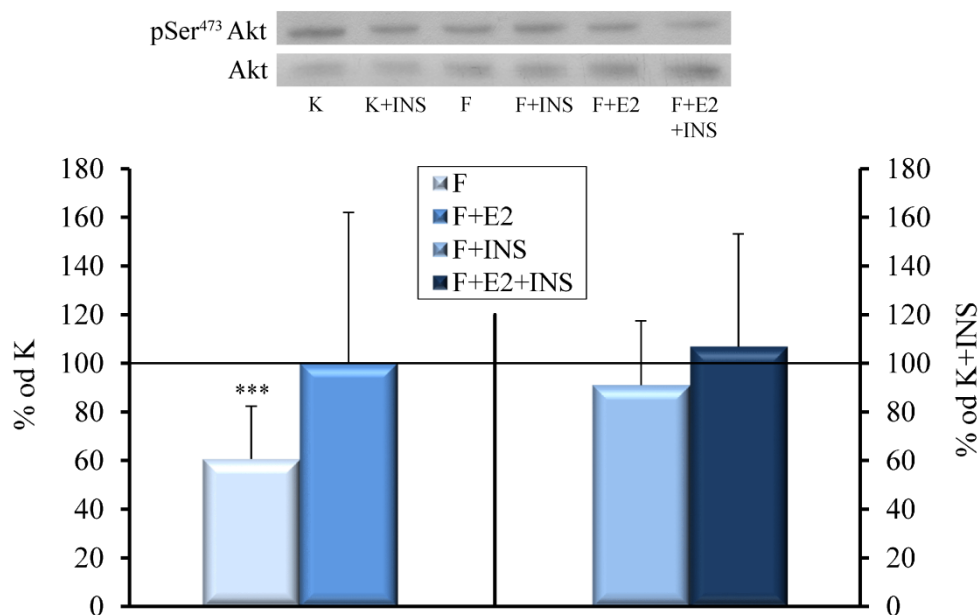


**Slika 5. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj proteina IRS-1 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj IRS-1 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

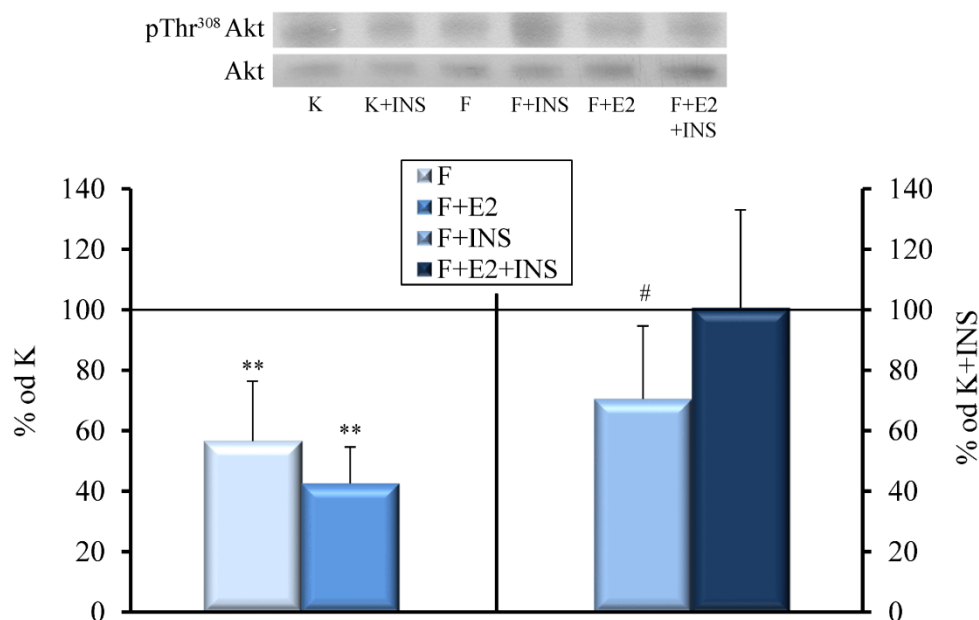
#### 4.4.2 Sadržaj proteina i fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>

Ishrana bogata fruktozom je dovela do smanjenja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> u bazalnim uslovima ( $P < 0,001$  vs. K), dok je tretman estradiolom životinja na ishrani bogatoj fruktozom anulirao efekte ishrane na fosforilaciju ovog aminokiselinskog ostatka (Slika 6).

Fosforilacija Akt na Thr<sup>308</sup> bila je značajno smanjena i u bazalnim ( $P < 0,01$  vs. K) i u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,05$  vs. K+INS) kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Slika 7). Tretman estradiolom kod ovih životinja je anulirao efekte ishrane na insulinom stimulisanu fosforilaciju Akt na Thr<sup>308</sup>, dok je u bazalnim uslovima ovaj efekat izostao ( $P < 0,01$  vs. K) (Slika 7).



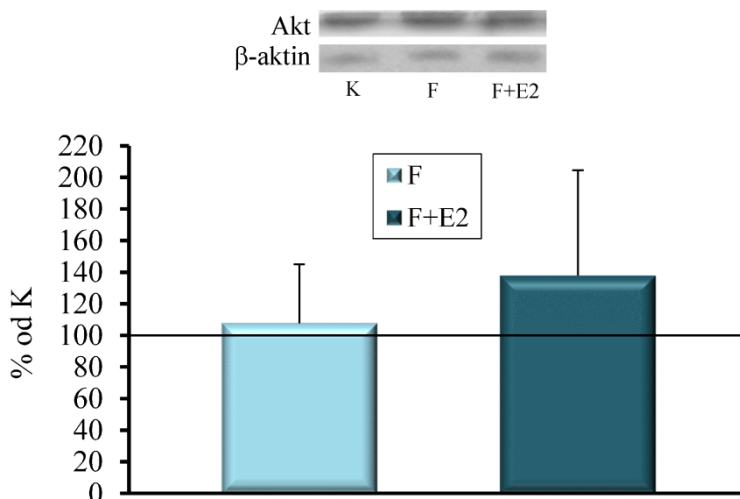
**Slika 6. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Sadržaj fosforilisane forme Akt je normalizovan na ukupan sadržaj proteina Akt. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Na vrhu slike su prikazani i reprezentativni imunoblotovi. \*\*\*P<0,001 vs. K. K: kontrola; F: fruktoza; E2: estradiol; INS: insulin.



**Slika 7. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju Akt na Thr<sup>308</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj fosforilisane forme Akt normalizovan na ukupan sadržaj proteina Akt, predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*P<0,01 vs. K, #P<0,05 vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.



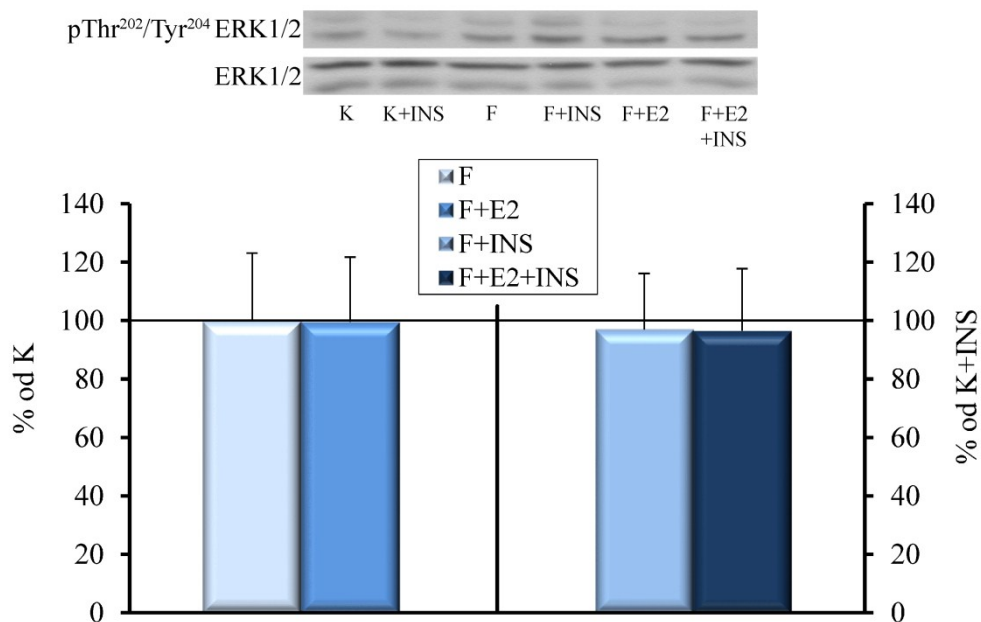
Ni ishrana bogata fruktozom, ni estradiolski tretman nisu promenili ukupan proteinski sadržaj Akt, koji je određen kao sadržaj Akt u ćelijskom lizatu srca (Slika 8).



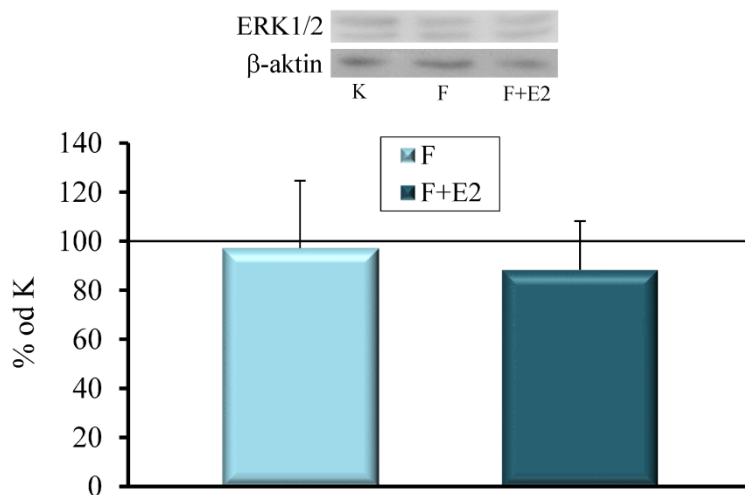
**Slika 8. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj proteina Akt u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj proteina Akt predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

#### 4.4.3 Sadržaj proteina i fosforilacija ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>

Efekti fruktozne ishrane i estradiolskog tretmana na mitogeni signalni put u srcu su izučavani preko ERK1/2 kinaze. Kao i u slučaju apsolutne i relativne mase srca, ni ishrana bogata fruktozom, ni estradiolski tretman nisu promenili stepen fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> (Slika 9), kao ni ukupan sadržaj ERK1/2 (Slika 10) u ćelijskom lizatu srca.



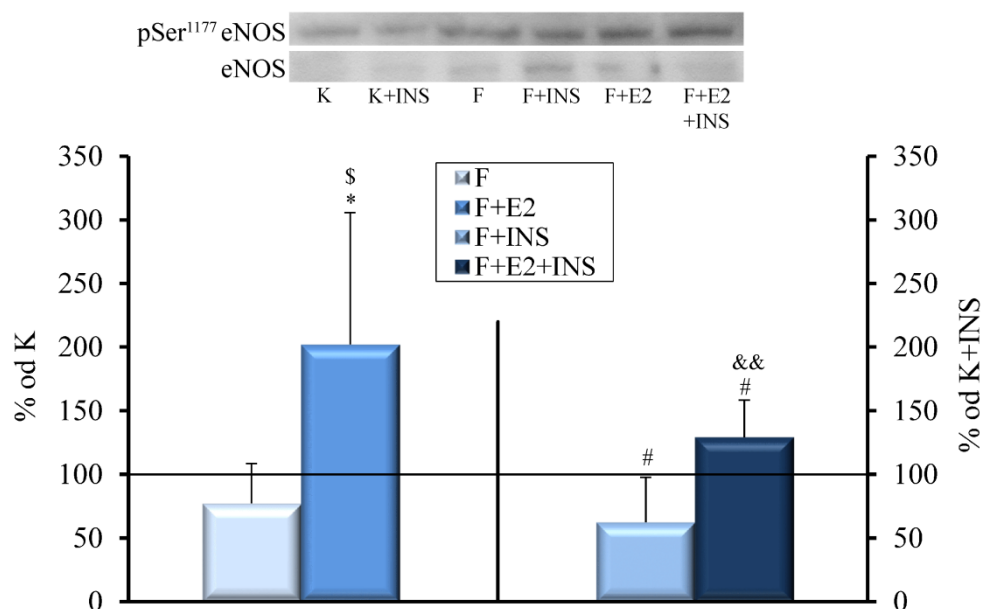
**Slika 9. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj fosforilisane forme ERK1/2 normalizovan na ukupan sadržaj proteina ERK1/2, predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.



**Slika 10. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj proteina ERK1/2 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj proteina ERK1/2 predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

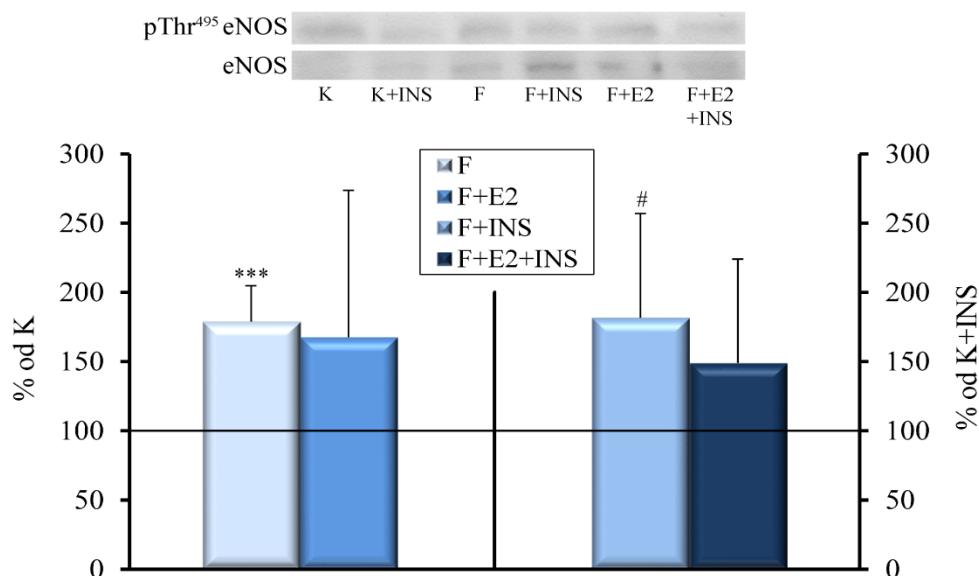
4.5 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ I FOSFORILACIJU ENDOTELNE SINTAZE AZOT MONOKSIDA U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

Ishrana bogata fruktozom je uzrokovala značajno smanjenje stepena aktivirajuće fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> u insulinom stimulisanim ulovima (P<0,05 vs. K+INS) (Slika 11). Tretman estradiolom životinja na ishrani bogatoj fruktozom je poništio negativne efekte ishrane i povećao stepen fosforilacije serinskog ostatka iznad nivoa zabeleženog kod kontrolnih životinja, kako u insulinom stimulisanim (P<0,05 vs. K+INS; P<0,01 vs. F+INS), tako i u bazalnim uslovima (P<0,05 vs. K; P<0,05 vs. F) (Slika 11).



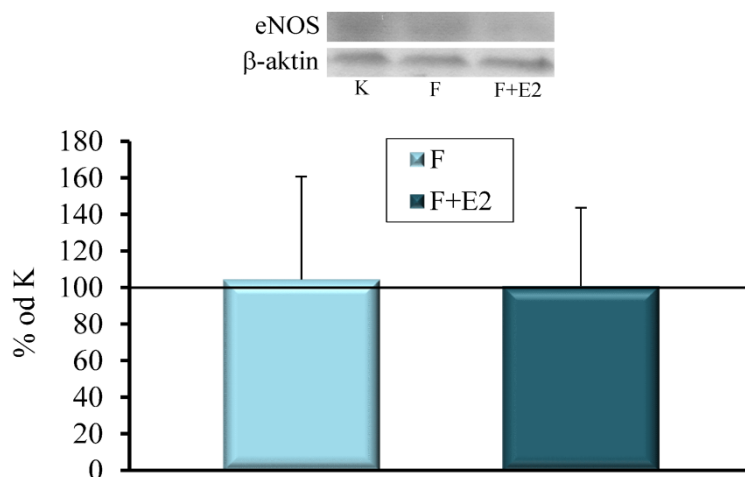
**Slika 11. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup>.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblottovi i sadržaj fosforilisane forme eNOS normalizovan na ukupan sadržaj proteina eNOS, predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*P<0,05 vs. K, <sup>s</sup>P<0,05 vs. F, <sup>#</sup>P<0,05 vs. K+INS, <sup>&&</sup>P<0,01 vs. F+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

Ishrana bogata fruktozom je povećala stepen inhibitorne fosforilacije eNOS na Thr<sup>495</sup> u bazalnim (P<0,001 vs. K) i insulinom stimulisanim uslovima (P<0,05 vs. K+INS) (Slika 12). Estradiolski tretman nije imao uticaja na fosforilaciju treoninskog ostatka (Slika 12).



**Slika 12. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na fosforilaciju eNOS na Thr<sup>495</sup>.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj fosforilisane forme eNOS normalizovan na ukupan sadržaj proteina eNOS, predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*\*P<0,001 vs. K, #P<0,05 vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

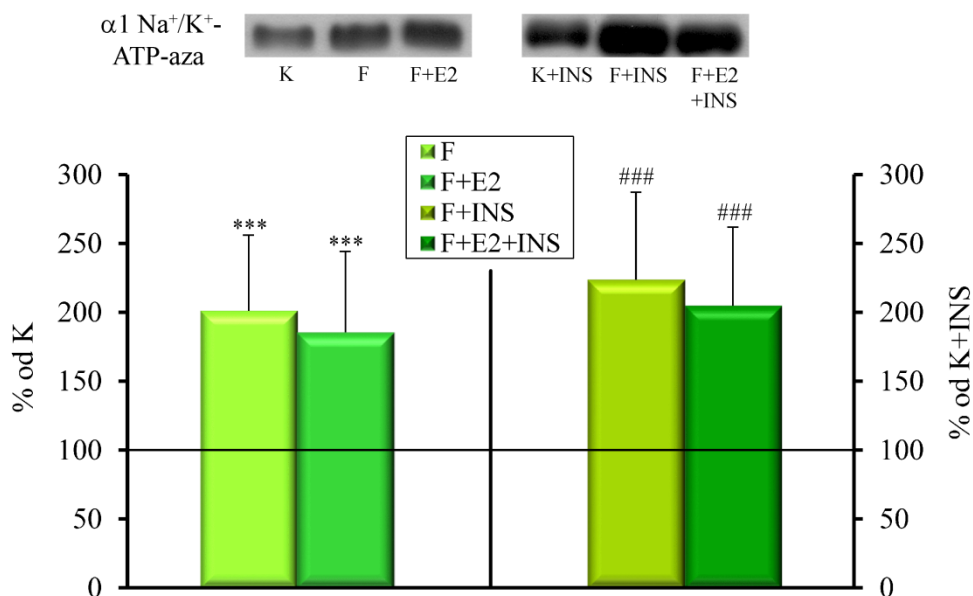
Ukupan proteinski sadržaj eNOS u ćelijskom lizatu srca se nije promenio nakon ishrane bogate fruktozom, kao ni pod estradiolskim tretmanom (Slika 13).



**Slika 13. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj proteina eNOS u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj eNOS predstavljen kao srednja vrednost ± S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. β-aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

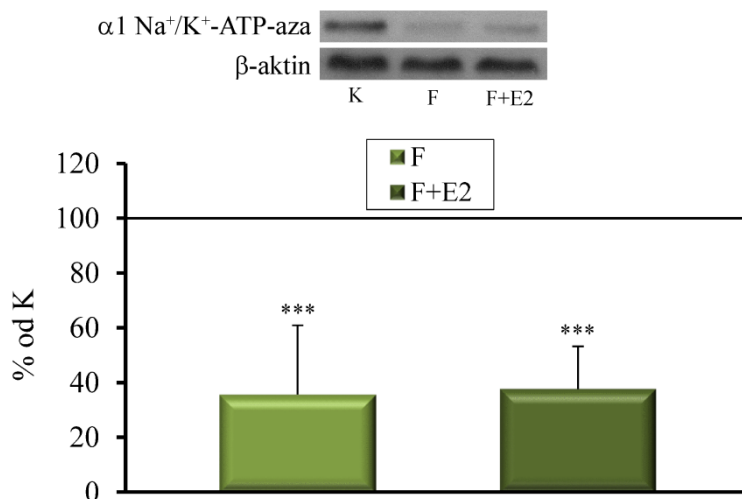
#### 4.6 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ ALFA 1 I ALFA 2 SUBJEDINICA NATRIJUM/KALIJUM-ATP-aze U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

$\alpha 1$  i  $\alpha 2$  su glavne izoforme katalitičke subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze u srcu odraslog pacova. Iako se  $\alpha 1$  subjedinica smatra *housekeeping* molekulom i često se koristi kao kontrola za PM kompartman, ishrana bogata fruktozom je značajno promenila sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice u PM u ćelijama srca ovarijektomisanih ženki pacova. Proteinski sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice pumpe u PM je bio značajno povećan kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom, kako u bazalnim ( $P < 0,001$  vs. K), tako i u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,001$  vs. K+INS) (Slika 14). Estradiolski tretman ovih životinja nije imao efekta na promene nastale kao posledica ishrane bogate fruktozom ( $P < 0,001$  vs. K;  $P < 0,001$  vs. K+INS) (Slika 14).



**Slika 14. Sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze u PM.** Sadržaj proteina u PM je određen *Western blot* metodom i prikazani su rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Na vrhu slike su prikazani i reprezentativni imunoblotovi. \*\*\* $P < 0,001$  vs. K, ### $P < 0,001$  vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

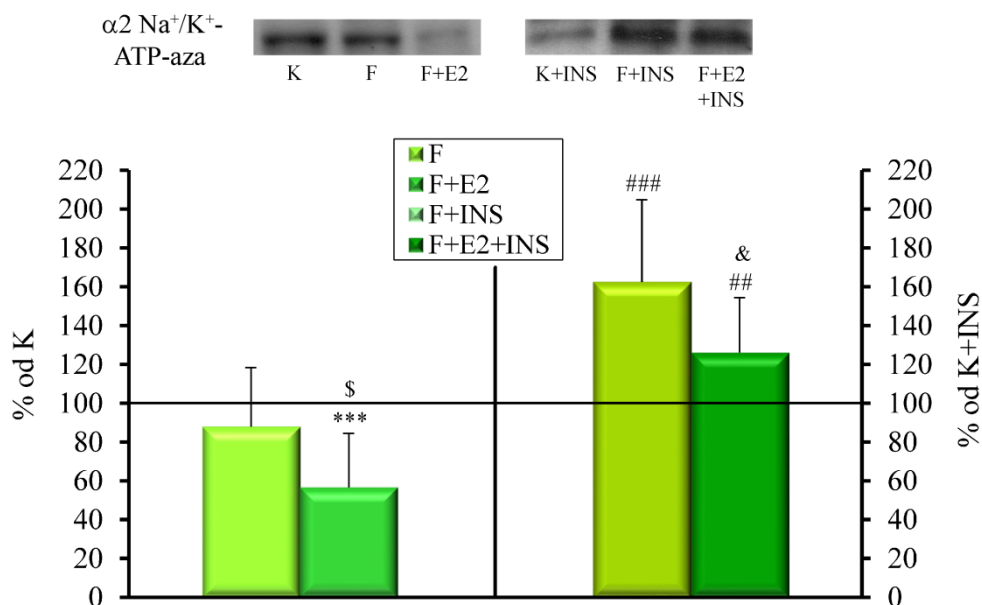
Međutim, ishrana bogata fruktozom je smanjila ukupan proteinski sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice u srcu ( $P < 0,001$  vs. K), pri čemu je on bio smanjen i u prisustvu estradiola ( $P < 0,001$  vs. K) (Slika 15).



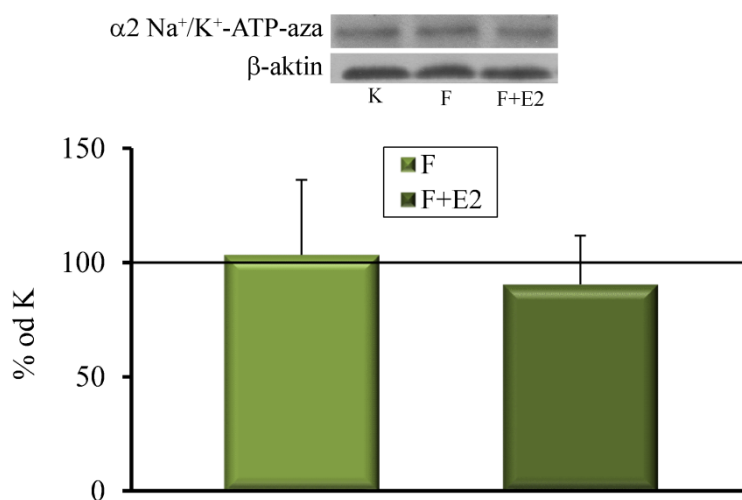
**Slika 15. Sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze u lizatu.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. \*\*\* $P < 0,001$  vs. K. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

Ishrana bogata fruktozom nije značajno promenila sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u PM u bazalnim uslovima, dok je u insulinom stimulisanim uslovima povećala sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u ovoj frakciji ( $P < 0,001$  vs. K+INS) (Slika 16). Tretman estradiolom pacova na ishrani bogatoj fruktozom je smanjio sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u PM u bazalnim uslovima ( $P < 0,001$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. F), dok je kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom tretiranih insulinom estradiolski tretman umanjio efekte ishrane ( $P < 0,05$  vs. F+INS), ali je sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u PM bio i dalje povišen u odnosu na sadržaj kod životinja na standardnoj ishrani ( $P < 0,01$  vs. K+INS) (Slika 16).

Ni ishrana bogata fruktozom ni estradiolski tretman nisu promenili sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u ćelijskom lizatu srca (Slika 17).



**Slika 16. Sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze u PM.** Sadržaj proteina je određen kao što je opisano uz sliku 14. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*\*P<0,001 vs. K, \$P<0,05 vs. F, ###P<0,01 vs. K+INS, ###P<0,001 vs. K+INS, &P<0,05 vs. F+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

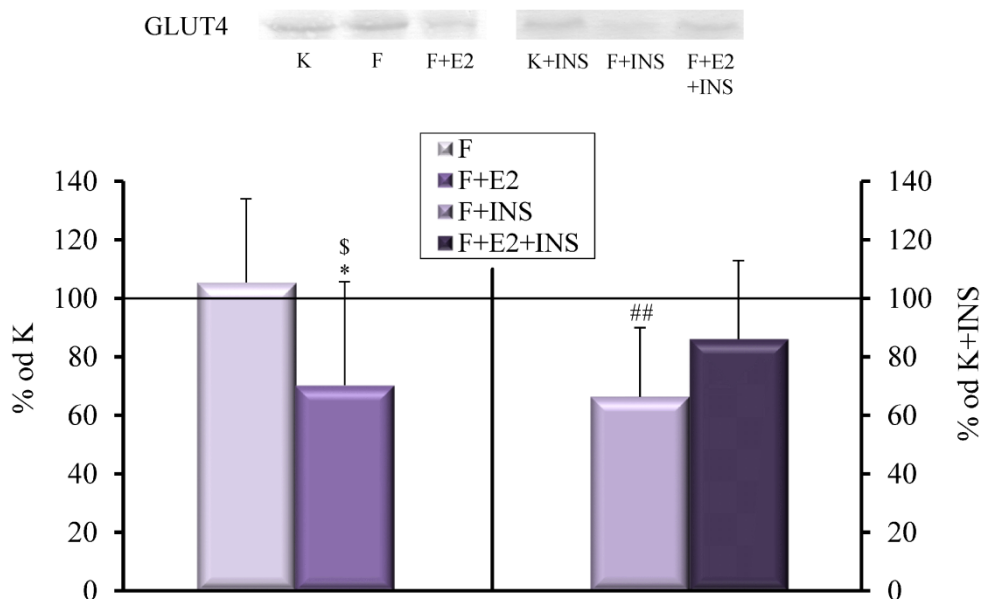


**Slika 17. Sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze u lizatu.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

4.7 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ I UNUTARĆELIJSKU LOKALIZACIJU TRANSPORTERA ZA GLUKOZU I MASNE KISELINE U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

4.7.1 Sadržaj GLUT4 u plazma membranama, mikrozomima niske gustine i lizatu srca

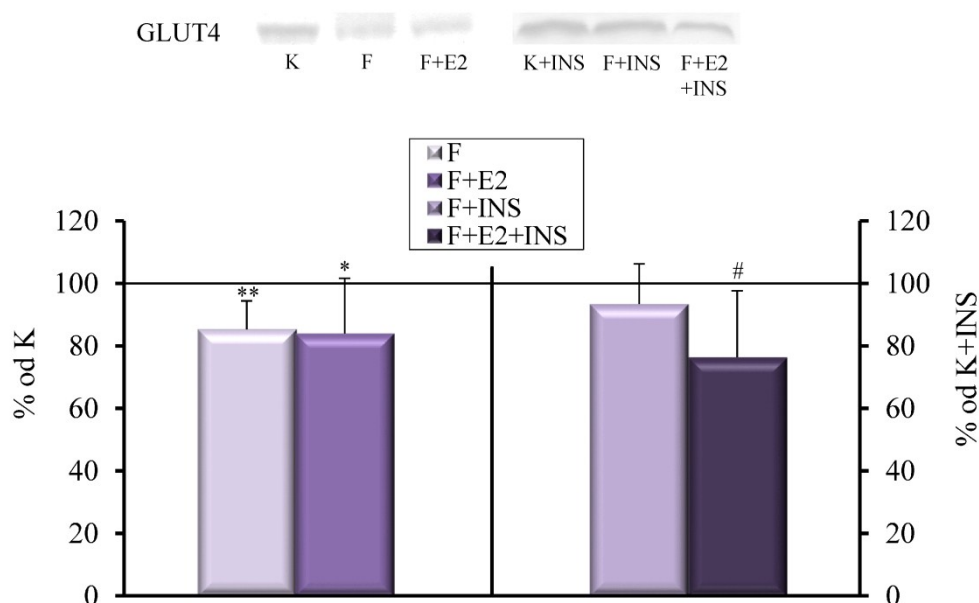
GLUT4 je glavni insulinom regulisani transporter glukoze u srcu. Sadržaj GLUT4 u PM srca se nije promenio kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u bazalnim uslovima, dok je sadržaj transportera u PM bio smanjen u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,01$  vs. K+INS) (Slika 18). Estradiolski tretman je uzrokovao smanjenje sadržaja GLUT4 u PM kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom u bazalnim uslovima ( $P < 0,05$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. F), dok je u insulinom stimulisanim uslovima anulirao efekte ishrane na promene sadržaja transportera u PM (Slika 18).



**Slika 18. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT4 u PM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 14. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj GLUT4 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $P < 0,005$  vs. K, <sup>\$</sup> $P < 0,05$  vs. F, <sup>##</sup> $P < 0,01$  vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

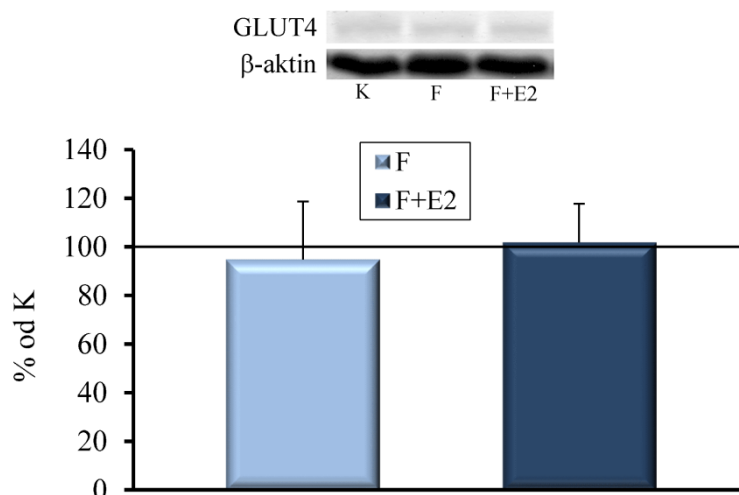


Ishrana bogata fruktozom je smanjila sadržaj GLUT4 u LDM kod pacova bez insulinskog tretmana ( $P < 0,01$  vs. K), ali nije imala efekta na sadržaj GLUT4 u LDM u insulinom stimulisanim uslovima (Slika 19). Međutim, tretman estradiolom pacova na ishrani bogatoj fruktozom je smanjio sadržaj GLUT4 u LDM u odnosu na životinje na standardnoj ishrani, kako u bazalnim tako i uslovima nakon stimulacije insulinom ( $P < 0,05$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. K+INS) (Slika 19).



**Slika 19. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT4 u LDM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina u LDM je određen *Western blot* metodom i prikazani su rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Na vrhu slike su prikazani i reprezentativni imunoblotovi. \* $P < 0,05$  vs. K, \*\* $P < 0,01$  vs. K, # $P < 0,05$  vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

Proteinski sadržaj GLUT4 u lizatu srca se nije promenio kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom sa ili bez estradiolskog tretmana (Slika 20).

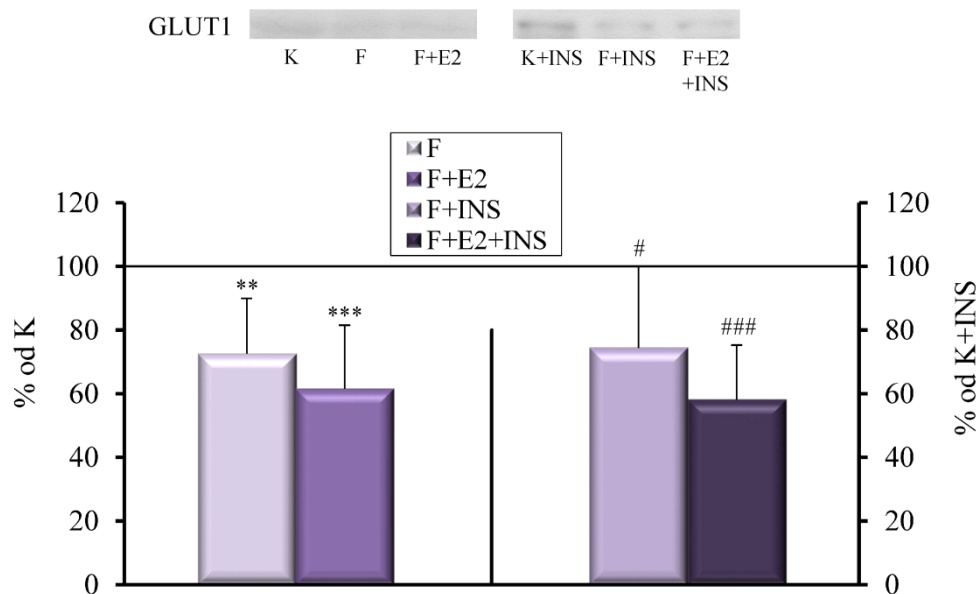


**Slika 20. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT4 u lizatu srca ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj GLUT4 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

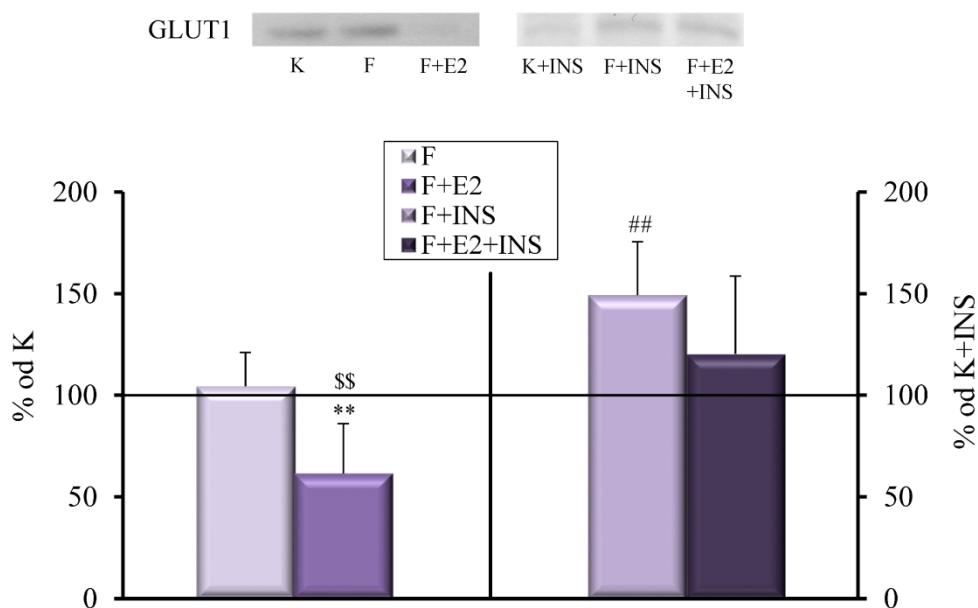
#### 4.7.2 Sadržaj GLUT1 u plazma membranama, mikrozomima niske gustine i lizatu srca

GLUT1 je transporter glukoze odgovoran za transport glukoze u bazalnom metaboličkom stanju u srcu, ali je u određenoj meri osetljiv i na delovanje insulina. Ishrana bogata fruktozom je smanjila sadržaj GLUT1 u PM i u bazalnim i u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,01$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. K+INS) (Slika 21). Sadržaj GLUT1 u PM je bio smanjen i kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol u odnosu na životinje na standardnoj ishrani, kako u bazalnim, tako i u uslovima nakon stimulacije insulinom ( $P < 0,001$  vs. K;  $P < 0,001$  vs. K+INS) (Slika 21).

Smanjenje sadržaja GLUT1 u PM je bilo praćeno povećanjem sadržaja transportera u LDM samo kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom koji su primili insulin ( $P < 0,01$  vs. K+INS) (Slika 22). Estradiolski tretman je smanjio sadržaj GLUT1 u LDM kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u bazalnim uslovima ( $P < 0,01$  vs. K;  $P < 0,01$  vs. F), dok je kod životinja koje su primile insulin anulirao efekte fruktozne ishrane (Slika 22).

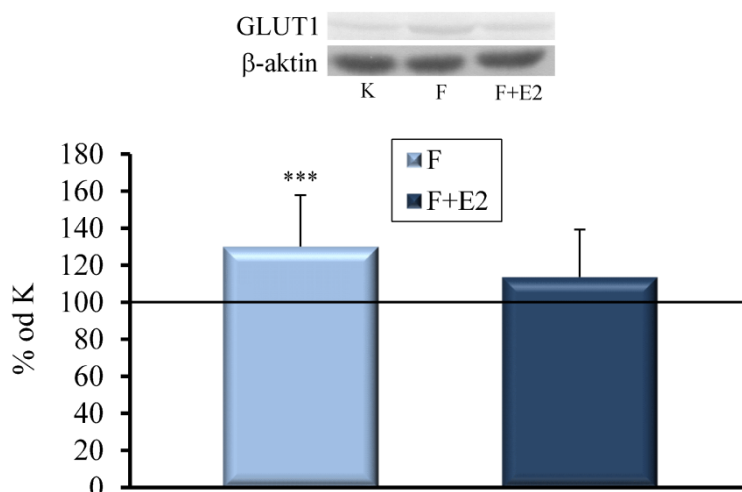


**Slika 21. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT1 u PM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 14. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj GLUT1 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\* $P < 0,01$  vs. K, \*\*\* $P < 0,001$  vs. K, # $P < 0,05$  vs. K+INS, ### $P < 0,001$  vs. K+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.



**Slika 22. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT1 u LDM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 19. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj GLUT1 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\* $P < 0,01$  vs. K, \$\$ $P < 0,01$  vs. F, ### $P < 0,01$  vs. K+INS, Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

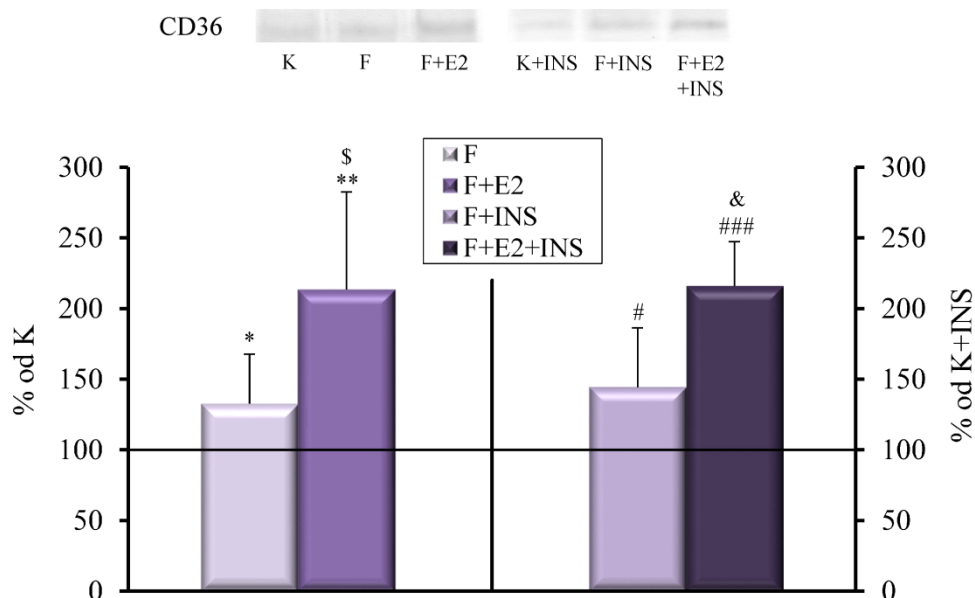
Ishrana bogata fruktozom je značajno povećala ukupan proteinski sadržaj GLUT1 u srcu ( $P < 0,001$  vs K), dok je kod pacova na fruktoznoj ishrani koje su primale estradiol sadržaj proteina GLUT1 bio na nivou zabeleženom kod kontrolnih životinja (Slika 23).



**Slika 23. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj GLUT1 u lizatu u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj GLUT1 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. \*\*\* $P < 0,001$  vs. K. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

#### 4.7.3 Sadržaj CD36 u plazma membranama, mikrozmima niske gustine i lizatu srca

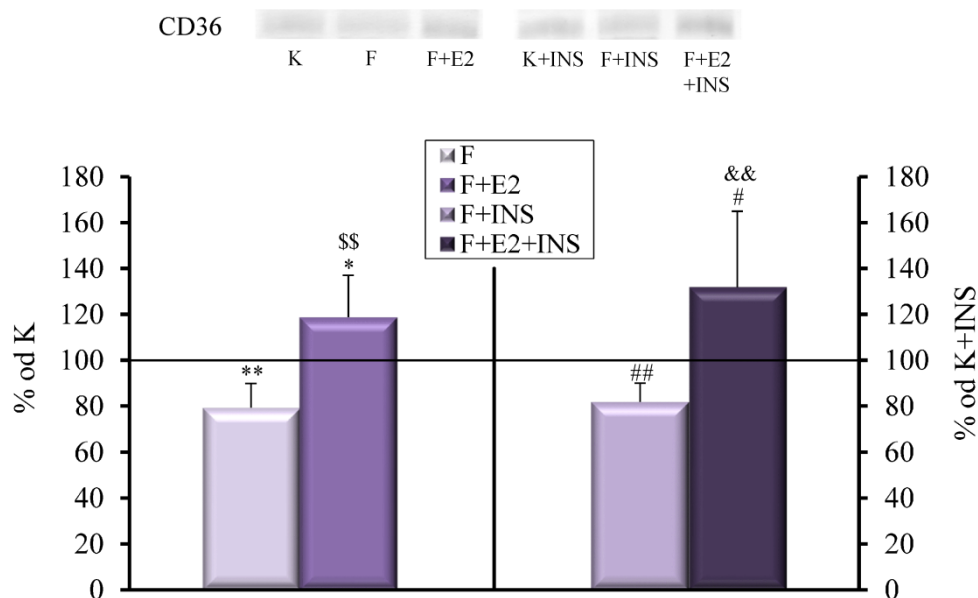
CD36 je glavni transporter za masne kiseline u srcu, koji ciklira između unutarćelijskih skladišta i plazma membrane, gde učestvuje u preuzimanju masnih kiselina. Ishrana bogata fruktozom je povećala sadržaj CD36 u PM u bazalnim i u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,05$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. K+INS) (Slika 24). Tretman estradiolom životinja na ishrani bogatoj fruktozom dodatno je povećao sadržaj CD36 u PM kako u bazalnim ( $P < 0,01$  vs. K;  $P < 0,05$  vs. F), tako i u insulinom stimulisanim uslovima ( $P < 0,001$  vs. K+INS;  $P < 0,05$  vs. F+INS) (Slika 24).



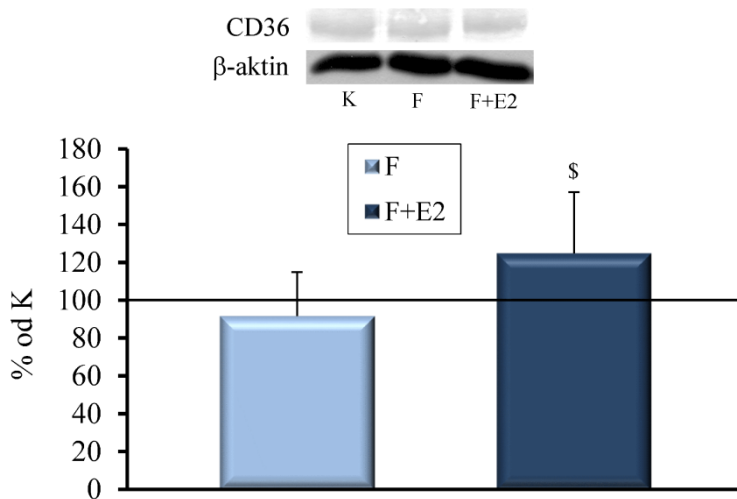
**Slika 24. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj CD36 u PM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 14. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj CD36 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $P < 0,05$  vs. K, \*\* $P < 0,01$  vs. K,  $^{\$}P < 0,05$  vs. F,  $^{\#}P < 0,05$  vs. K+INS,  $^{\#\#\#}P < 0,001$  vs. K+INS,  $^{\&}P < 0,05$  vs. F+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.

Povećanje sadržaja CD36 u PM u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom bez estradiolskog tretmana je bilo praćeno smanjenjem sadržaja transportera u LDM kompartmanu ( $P < 0,01$  vs. K;  $P < 0,01$  vs. K+INS), što ukazuje na translokaciju CD36 iz unutarćelijskih kompartmana na plazma membranu (Slika 25). Međutim, estradiolski tretman je značajno povećao i sadržaj transportera u LDM srca kod životinja bez ( $P < 0,05$  vs. K;  $P < 0,01$  vs. F) i sa insulinskim tretmanom ( $P < 0,05$  vs. K+INS;  $P < 0,01$  vs. F+INS) (Slika 25).

Ukupan ćelijski sadržaj CD36 u srcu se nije promenio kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom, dok je tretman estradiolom ovih životinja doveo do povećanja sadržaja CD36 u lizatu srca u odnosu na životinje bez tretmana, što je u skladu sa povećanjem sadržaja ovog molekula u PM i LDM ( $P < 0,05$  vs. F) (Slika 26).



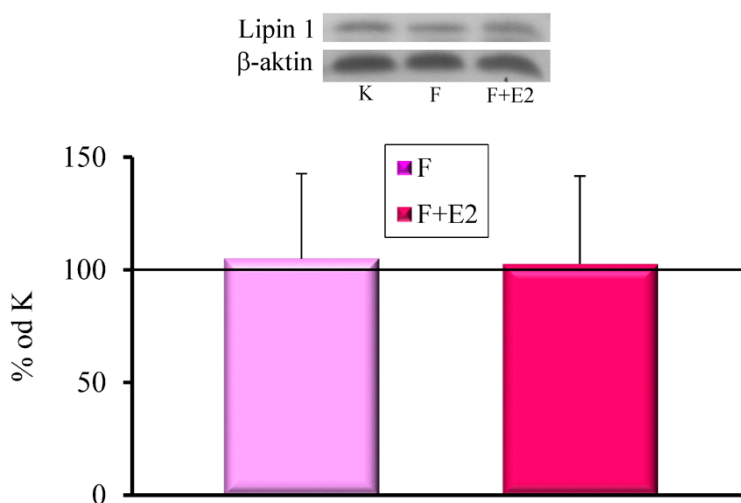
**Slika 25. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj CD36 u LDM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 19. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj CD36 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $P < 0,05$  vs. K, \*\* $P < 0,01$  vs. K, \$\$ $P < 0,01$  vs. F, # $P < 0,05$  vs. K+INS, ## $P < 0,01$  vs. K+INS, && $P < 0,01$  vs. F+INS. Skraćenice su date u opisu uz sliku 6.



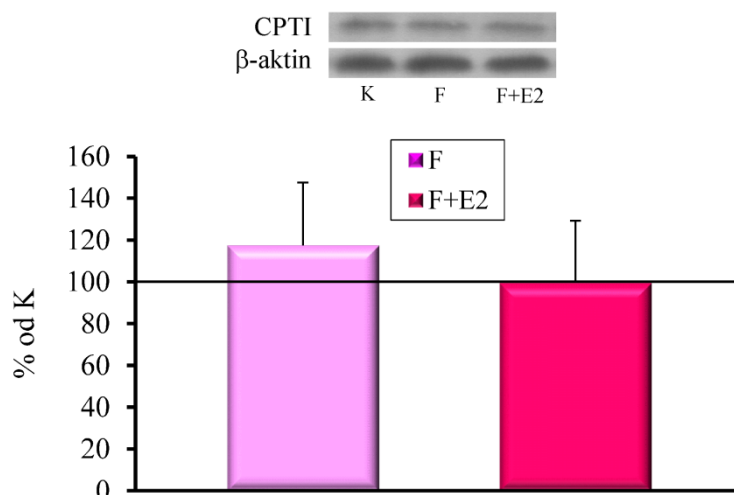
**Slika 26. Efekti ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom na sadržaj CD36 u lizatu srca ovarijektomisanih ženki pacova.** Sadržaj proteina je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj CD36 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. \$ $P < 0,05$  vs. F. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

4.8 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA SADRŽAJ LIPINA 1 I CPTI U SRCU OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

Lipin 1 i CPTI imaju važnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina nakon njihovog ulaska u ćeliju. Međutim, ni ishrana bogata fruktozom ni estradiolski tretman nisu promenili proteinski sadržaj lipina 1 i CPTI, koji su određeni kao ukupan sadržaj ispitivanih molekula u ćelijskom lizatu srca (Slika 27 i Slika 28).



**Slika 27. Sadržaj lipina 1 u lizatu.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj lipina 1 predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.



**Slika 28. Sadržaj CPTI u lizatu.** Sadržaj proteina u ćelijskom lizatu je određen kao što je dato u opisu uz sliku 4. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i sadržaj CPTI predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražen kao procenat od odgovarajuće kontrole.  $\beta$ -aktin je korišćen kao *loading* kontrola. Skraćenice su date u opisu uz sliku 4.

#### 4.9 EFEKTI ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM I ESTRADIOLSKOG TRETMANA NA LIPIDNI PROFIL SRCA OVARIJEKTOMISANIH ŽENKI PACOVA

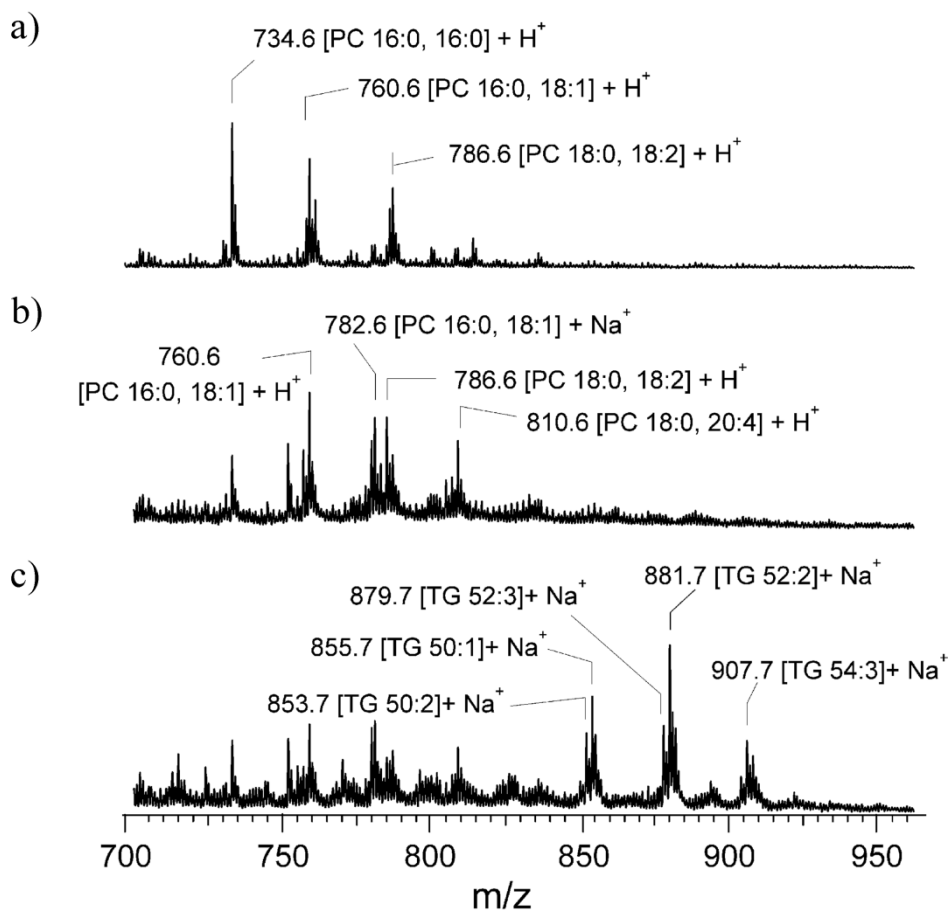
Povećan sadržaj CD36 u PM srca kao posledica ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom, ukazuje na povećan ulazak masnih kiselina u ćeliju i promene u metabolizmu i taloženju lipida u srcu. Sastav lipida u srcu je određen pomoću MALDI-TOF MS metode, pri čemu su na reprezentativnim spektrima prikazani glavni ćelijski fosfolipidi i TG, gde su signali koji potiču od fosfatidilholina i TG određeni na osnovu odnosa masa/naelektrisanje.

Nisu uočene značajne razlike u sastavu lipida izolovanih iz srca pacova na standardnoj ishrani i srca pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Slika 29a i b). Signali u oblasti TG nisu detektovani, najverovatnije kao posledica njihove niske koncentracije i supresije pikova u prisustvu fosfatidilholina (Petkovic i sar., 2001).

Kod ovarijektomisanih ženki na ishrani bogatoj fruktozom koje su bile tretirane estradiolom detektovano je povećanje intenziteta signala koji potiču od TG, što ukazuje na povećan sadržaj ovih lipida u srcu (Slika 29c). Detektovani su sledeći trigliceridi: TG (50:2), TG (50:1), TG (52:3), TG (52:2), i TG (54:3). Prvi broj ukazuje na ukupan broj



ugljenikovih atoma u ostacima masnih kiselina, dok drugi broj ukazuje na ukupan broj dvostrukih veza, s obzirom da tačnu poziciju ostatka masne kiseline u molekulu TG i poziciju dvostruke veze u masnoj kiselini nije moguće odrediti ovom metodom. U svim slučajevima, mogli su biti detektovani samo Na-adukti TG u MALDI-TOF masenom spektru, što je u skladu sa njihovim ponašanjem tokom masene spektrometrije.



**Slika 29. Pozitivni MALDI-TOF maseni spektri lipida izolovanih iz srca ovarijektomisanih ženki pacova na a) standardnoj ishrani, b) ishrani bogatoj fruktozom i c) ishrani bogatoj fruktozom koje su bile tretirane estradiolom.** Spektri su dobijeni u reflektornom modu sa DHB kao matricom pod uslovima *delayed extraction mode*. Prikazani su reprezentativni spektri 4 nezavisna merenja. Signali na spektrima su određeni na osnovu odnosa  $m/z$  i prikazan je njihov identitet. m: masa, z: naelektrisanje; TG: trigliceridi; PC: fosfatidilholin.

## 5 DISKUSIJA

Brojne epidemiološke studije su pokazale da je povećan unos fruktoze poslednjih decenija, pretežno kroz sokove i druge napitke zaslađene HFCS, povezan sa razvojem metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih poremećaja. Ovi efekti su primećeni i kod dece koja konzumiraju sokove uz obroke, posebno uz one koji se spremaju u lancima brze hrane (Basciano i sar., 2005; Khitan i Kim, 2013). Analizom komercijalnih zaslađenih napitaka, prisutnih na američkom tržištu, pokazano je da se ukupan sadržaj šećera u ovim napicima kreće između 5,5% i 12,7%, pri čemu u nekim sokovima sadržaj fruktoze prelazi 7% (Ventura i sar., 2011). Administracija jednog takvog napitka pacovima u trajanju od 8 nedelja je dovela do promena u lipidnom profilu životinja (Botezelli i sar., 2010). Takođe, studija Stanhope i saradnika sugeriše da konzumacija napitaka zaslađenih fruktozom kod muškaraca u većoj meri vodi ka razvoju metaboličkih poremećaja, nego kod žena (Stanhope i sar., 2009).

U ovoj studiji su izučavani efekti estradiola kao potencijalnog protektora insulinskog signalnog puta i procesa regulisanih insulinom, kao što su produkcija NO, transport jona i metabolizam energetskih supstrata, u srcu pacova sa insulinskom rezistencijom izazvanom ishranom bogatom fruktozom. U cilju izučavanja ovih efekata ovarijektomisane ženke pacova su podvrgnute režimu ishrane sa 10% rastvorom fruktoze u vodi sa ili bez tretmana fiziološkim dozama estradiola, pri čemu je polovina životinja bila tretirana insulinom.

Koncentracija estradiola u plazmi je bila niska kod svih grupa životinja (Tabela 2), što je u skladu sa činjenicom da su životinje bilateralno ovarijektomisane 2 nedelje pre žrtvovanja. Međutim, i grupe koje su bile tretirane estradiolom takođe su imale niske koncentracije estradiola u plazmi, što je bilo neočekivano. Ovo je verovatno posledica kratkog poluživota estradiola (Schulster i sar., 1976) i činjenice da je poslednja injekcija hormona aplicirana dan pre žrtvovanja.

Kao i što je bilo očekivano, ishrana bogata fruktozom je povećala unos tečnosti i smanjila unos čvrste hrane kod pacova u ovoj studiji, pri čemu je ukupan kalorijski unos bio takođe povećan, verovatno kao posledica povećanog unosa rastvora fruktoze (Tabela 1). Međutim, povećan kalorijski unos nije uticao na masu tela pacova. Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim na pacovima koji su pili 10% rastvor fruktoze (Xi i sar., 2007) i pacovima koji su pili komercijalni napitak sa visokim sadržajem fruktoze (Botezelli i sar., 2010) tokom 8 nedelja.

Poznato je da fruktoza akutno ne stimuliše sekreciju insulina, što može da ima za posledicu smanjenu produkciju leptina, koji učestvuje u regulaciji apetita i energetske homeostaze (Sanchez-Lozada i sar., 2008). Međutim, konzumacija rastvora fruktoze u ovoj studiji je povećala koncentraciju leptina u plazmi ovarijektomisanih ženki pacova (Tabela 2), što je verovatno posledica povećane koncentracije insulina u plazmi ovih životinja (Huang i sar., 2004). Povećana koncentracija leptina u plazmi životinja na ishrani bogatoj fruktozom može da ukazuje na prisustvo leptinske rezistencije, jer kao i u studiji Lindqvist i saradnika, povećan nivo leptina nije uspeo da smanji kalorijski unos (Lindqvist i sar., 2008). Bursac i saradnici su pokazali prisustvo leptinske rezistencije u hipotalamusu mužjaka pacova na ishrani obogaćenoj 60% rastvorom fruktoze (Bursac i sar., 2014).

Stanhope i saradnici su pokazali da konzumacija fruktoze specifično vodi ka povećanju naslaga TG u visceralnom masnom tkivu, dok konzumacija glukoze favorizuje taloženje lipida u subkutanom masnom tkivu (Stanhope i sar., 2009). Visceralno masno tkivo je metabolički aktivnije od subkutanog, mnogo lakše podleže lipolizi, oslobađajući velike količine masnih kiselina u cirkulaciju (Tsatsoulis i sar., 2013). Za razliku od studije Xi i saradnika (Xi i sar., 2007), ishrana bogata fruktozom u ovoj studiji nije dovela do statistički značajne promene mase visceralnog masnog tkiva, ali se primećuje tendencija povećanja (Tabela 1).

Poznato je da polni hormoni potentno kontrolišu unos hrane i masu tela, pri čemu estradiol može da smanji unos hrane putem uticaja na oreksigene i anoreksigene hormone i utiče na distribuciju masnog tkiva u organizmu (favorizujući taloženje u subkutanim depoima), tako što povećava centralnu osetljivost na leptin (Brown i Clegg, 2010). Takođe, Guerra i saradnici su pokazali da je koncentracija leptina u plazmi veća

kod žena, nego kod muškaraca, nezavisno od razlike u masi adipoznog tkiva (Guerra i sar., 2008).

U ovoj studiji životinje na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol su imale povišenu koncentraciju leptina u plazmi u odnosu na životinje na standardnoj ishrani (Tabela 2). Međutim, estradiolski tretman je smanjio unos tečnosti i čvrste hrane, kao i ukupan kalorijski unos kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom (Tabela 1). Kako su Matyskova i saradnici u svojim eksperimentima pokazali da suplementacija estradiola kod ovarijektomisanih miševa na ishrani bogatoj mastima poboljšava centralnu osetljivost na leptin (Matyskova i sar., 2010), smanjenje ukupnog kalorijskog unosa kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom tretiranih estradiolom je verovatno posledica povećane centralne osetljivosti na leptin.

Estradiolski tretman pacova na ishrani bogatoj fruktozom nije imao uticaja na masu tela, dok je delovao u pravcu smanjenja mase visceralnog masnog tkiva, ali ova promena nije bila statistički značajna (Tabela 1).

Literaturni podaci pokazuju da ishrana obogaćena fruktozom uzrokuje povećanje mase srca i razvoj LVH (Al-Awwadi i sar., 2005; Thirunavukkarasu i sar., 2004). Ishrana bogata fruktozom nije dovela do promene mase srca kod pacova u ovoj studiji (Tabela 1), što može da se pripiše trajanju režima ishrane i/ili procentu fruktoze u ishrani.

Takođe, tretman pacova na ishrani bogatoj fruktozom estradiolom nije uticao na masu srca (Tabela 1). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za mitogeni ERK1/2 signalni put, gde takođe nisu zapaženi efekti ishrane i hormonskog tretmana (Slika 9 i 10).

**Na osnovu gore navedenih rezultata može se zaključiti da je ishrana bogata fruktozom dovela do poremećaja u regulaciji apetita kod ovarijektomisanih ženki pacova, verovatno preko poremećaja u centralnoj osetljivosti na leptin, dok je estradiol većim delom poništio efekte ishrane. Takođe, uočava se da promene u regulaciji apetita nisu u velikoj meri uticale na pojavu gojaznosti.**

## 5.1 EFEKTI ESTRADIOLA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE KOD PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM

Konzumacija fruktoze kod ljudi je povezana sa svim odlikama metaboličkog sindroma, koje uključuju dislipidemiju, visceralnu gojaznost, insulinsku rezistenciju i povišen krvni pritisak (Dekker i sar., 2010). Isto tako, ishrana pacova čvrstom hranom koja sadrži 60% fruktoze tokom 12 nedelja (Liao i sar., 2010) ili samo tokom 2 nedelje (Vikrant i sar., 2001) je dovela do razvoja insulinske rezistencije i dislipidemije. Fruktoza se smatra šećerom koji u najvećoj meri dovodi do hipertrigliceridemije, jer zbog specifičnog metabolizma, velike količine fruktoze stimulišu sintezu TG i produkciju VLDL u jetri (Fried i Rao, 2003). Takođe, smatra se da povećanoj koncentraciji TG u plazmi nakon konzumacije fruktoze, doprinosi i smanjena brzina hidrolize i klirensa lipoproteina bogatih TG (Dekker i sar., 2010). Prekomerna produkcija VLDL-TG čestica može brzo da dovede do prevelike akumulacije masti u adipocitima, što zatim stimuliše kaskadu događaja, koji uključuju i oslobađanje masnih kiselina i drugih lipida iz adipocita i poremećaj u sekreciji adipokina (Rutledge i Adeli, 2007).

U skladu sa rezultatima preliminarne studije naše grupe (Zakula i sar., 2011), ovarijektomisane ženke pacova na ishrani obogaćenju 10% rastvorom fruktoze u vodi, su imale povišene koncentracije insulina i TG u plazmi u odnosu na životinje na standardnoj ishrani, što je bilo praćeno razvojem insulinske rezistencije (povećan HOMA indeks) (Tabela 2). Sličan obrazac promene biohemijskih parametara, koji nastaje kao posledica ishrane bogate fruktozom, je primećen i od strane drugih autora (Vazquez-Prieto i sar., 2010a; Yadav i sar., 2007). S obzirom da fruktoza ne stimuliše sekreciju insulina, hiperinsulinemija kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji je verovatno posledica insulinske rezistencije. Hyakukoku i saradnici su u svojim eksperimentima pokazali da je signalni put PI3K selektivno poremećen u skeletnim mišićima kod pacova na ishrani obogaćenju fruktozom (Hyakukoku i sar., 2003). Ovi autori sugerišu da poremećaj ovog puta može da uzrokuje hiperinsulinemiju (Hyakukoku i sar., 2003).

Za razliku od studija Vazquez-Prieto i saradnika (Vazquez-Prieto i sar., 2010a) i Yadav i saradnika (Yadav i sar., 2007), kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji nije primećeno značajno povećanje koncentracije glukoze u krvi (Tabela 2). Izostanak hiperglikemije je verovatno posledica hiperinsulinemije koja održava koncentraciju glukoze u okviru normalnih vrednosti.

Literaturni podaci koji se tiču efekata ishrane obogaćene fruktozom na koncentraciju FFA u plazmi su kontroverzni. Neki autori su ustanovili da ishrana obogaćena fruktozom povećava koncentraciju FFA u plazmi (Xi i sar., 2007; Yadav i sar., 2007), dok drugi autori nisu uočili promene u koncentraciji FFA (Morel i sar., 2003). U ovoj studiji je ishrana bogata fruktozom smanjila koncentraciju FFA u plazmi životinja (Tabela 2), što je u skladu sa rezultatom dobijenim u studiji sa pacovima koji su podvrgnuti ishrani sa visokim sadržajem masti i fruktoze i tretirani malom dozom streptozotocina (HFHFS) (Menard i sar., 2010). Prema Menard i saradnicima, visoka koncentracija insulina kod pacova na HFHFS je verovatno doprinela smanjenoj koncentraciji FFA u plazmi i smanjenom preuzimanju masnih kiselina u srcu ovih životinja, preko supresije lipolize u adipoznom tkivu (Menard i sar., 2010).

Fiziološki i genetički dokazi ukazuju na to da estradiol i ER $\alpha$  favorizuju osetljivost na insulin kod glodara i ljudi oba pola kada se koncentracije estradiola kreću u uskom fiziološkom „prozoru“, dok visoke koncentracije estrogena izazivaju rezistenciju na insulin (Mauvais-Jarvis, 2011). Supstitucionna terapija estradiolom kod žena u menopauzi je povezana sa unapređenom supresijom lipolize delovanjem insulina, što sugeriše da povećana lipoliza i oslobađanje masnih kiselina iz adipoznog tkiva kod žena sa nedostatkom estradiola može da doprinese razvoju insulinske rezistencije (Louet i sar., 2004). Takođe, estradiol sprečava razvoj insulinske rezistencije kod ovarijektomisanih ženki pacova tako što favorizuje oksidaciju glukoze u skeletnim mišićima, preko povećanja ekspresije molekula iz insulinskog signalnog puta (Narasimhan i sar., 2013). Tretman ob/ob miševa estradiolom je popravio osetljivost na insulin, što je najverovatnije posledica poboljšanog odgovora jetre na delovanje insulina, jer dolazi do smanjenja ekspresije gena koji učestvuju u sintezi lipida i smanjenog taloženja TG u jetri (Gao i sar., 2006).

U ovoj studiji, estradiolski tretman je smanjio koncentraciju glukoze i insulina u plazmi i vrednost HOMA indeksa, koji predstavlja meru insulinske rezistencije, kod

pacova na ishrani obogaćenoj fruktozom, pri čemu je koncentracija glukoze bila niža od one zabeležene kod životinja na standardnoj ishrani (Tabela 2). Vasudevan i saradnici su takođe primetili poboljšanje osetljivosti na insulin kod intaktnih i gonadektomisanih mužjaka pacova na ishrani bogatoj fruktozom koji su bili tretirani estradiolom (Vasudevan i sar., 2005). Povećana osetljivost na insulin kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol, verovatno je posledica povećanog odgovora perifernih tkiva na delovanje insulina. Naime, u eksperimentima na miševima na ishrani bogatoj mastima, Bryzgalova i saradnici su pokazali da je povećanje osetljivosti na insulin nakon tretmana estradiolom povezano sa smanjenom ekspresijom lipogenih gena u jetri i adipoznom tkivu, kao i supresijom ekspresije hepatične glukoza 6-fosfataze (Bryzgalova i sar., 2008). Takođe, estradiolski tretman je smanjio stepen insulinske rezistencije kod ovarijektomisanih miševa na ishrani obogaćenoj mastima, pri čemu je u isto vreme poboljšao fosforilaciju Akt stimulisanu insulinom u skeletnim mišićima (Riant i sar., 2009).

Kao i u studiji Vasudevan i saradnika (Vasudevan i sar., 2005), estradiol nije značajno smanjio koncentraciju TG u plazmi pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Tabela 2). Iako nije statistički značajno, ovo smanjenje nije ni bilo očekivano, jer neki autori sugerišu da je upravo povećanje nivoa TG u plazmi glavni problem primene ERT kod žena u postmenopauzi (Erberich i sar., 2002; Stevenson, 2009).

Takođe, estradiol je smanjio koncentraciju FFA u plazmi pacova na fruktoznoj ishrani (Tabela 2), što je u skladu sa nalazima Jensena i saradnika (Jensen i sar., 1994). Naime, oni su pokazali da je oslobađanje palmitata iz masnog tkiva žena u postmenopauzi mnogo manje nakon primene ERT (Jensen i sar., 1994).

**Evidentno je da je ishrana obogaćena fruktozom u ovoj studiji dovela do razvoja insulinske rezistencije, sa izrazitom hipertrigliceridemijom, koja je verovatno posledica specifičnog metabolizma fruktoze u jetri. Iako tretman estradiolom nije sprečio razvoj hipertrigliceridemije, uspeo je da prevenira pojavu hiperinsulinemije i razvoj insulinske rezistencije.**

## 5.2 EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM

Na ćelijskom nivou izraz „insulinska rezistencija“ se definiše kao neadekvatno prenošenje insulinskog signala nishodno od receptora do krajnjih supstrata delovanja insulina, koji su uključeni u različite metaboličke i mitogene aspekte ćelijske funkcije (Saini, 2010). Poremećaj u delovanju insulina u srčanom mišiću može direktno da doprinese nekim od metaboličkih poremećaja koji su primećeni u srcima ljudi i životinja sa gojaznošću, insulinskom rezistencijom i dijabetesom (Abel, 2005). Epidemioške studije sugerišu da su gojaznost, hiperinsulinemija i dijabetes tipa 2 nezavisno povezani sa razvojem LVH, što je povezano sa poremećajima sistole i dijastole (Abel, 2005). Studije na animalnim modelima gojaznosti i dijabetesa su pokazale prisustvo LVH kod ovih stanja (Abel, 2005). Carvalheira i saradnici su pokazali da je kod gojaznih Zucker pacova rezistentnih na insulin, delovanje insulina preko PI3K/Akt puta u srcu bilo selektivno inhibirano dok je signalni put MAPK ostao funkcionalan, i oni sugerišu da upravo disbalans između ova dva puta može da ima ulogu u razvoju kardiovaskularnih poremećaja (Carvalheira i sar., 2003).

Korićanac i saradnici sugerišu da postoji veoma kompleksna interakcija između pozitivnih i negativnih efekata estradiola, uključujući kako genomske, tako i negenomske efekte, na regulaciju insulinskog delovanja u srcu (Koricnac i sar., 2009). Estradiol ispoljava kardioprotektivne efekte, tako što podstiče preživljavanje kardiomiocita aktivacijom signalnog puta PI3K/Akt, brzim negenomskim efektima (Patten i Karas, 2006). Takođe, estradiol sprečava razvoj hipertrofije srca nakon stimulacije angiotenzinom II, mehanizmom koji uključuje inhibiciju aktivacije ERK (Pedram i sar., 2008).

Fosforilacija IRS-1 i IRS-2 na Tyr ostacima predstavlja prvi korak, nakon aktivacije tirozin kinaze IR, kojim otpočinje prenos insulinskog signala unutar ćelije (Thirone i sar., 2006). Fosforilacija IRS-1 na Ser<sup>307</sup> rezultuje disocijacijom od IR i pokreće njegovu degradaciju delovanjem proteaznih enzima, što uzrokuje poremećaj u insulinskom signalnom putu (Morisco i sar., 2006). TNF $\alpha$ , masne kiseline, insulin i



ćelijski stres mogu da aktiviraju proteinske kinaze specifične za Ser ostatke, koje zatim fosforilišu IRS-1 na Ser<sup>307</sup> (Gual i sar., 2005).

U studiji Hyakukoku i saradnika ishrana obogaćena fruktozom nije promenila nivo IRS-1 proteina u skeletnim mišićima (Hyakukoku i sar., 2003). Takođe, u eksperimentima na svinjama ishrana obogaćena mastima i fruktozom nije uticala na nivo proteina IRS-1 u srcu, ali je povećala stepen fosforilacije IRS-1 na Ser<sup>307</sup> (Lee i sar., 2010). Ova studija potvrđuje rezultate studija na skeletnim mišićima i srcu o odsustvu efekata ishrane obogaćene fruktozom na ukupan proteinski sadržaj IRS-1 (Slika 5). Međutim, ishrana bogata fruktozom nije značajno povećala nivo fosforilacije IRS-1 na Ser<sup>307</sup> (Slika 4), što može da se dovede u vezu sa izostankom promene lipidnog profila srca ovarijektomisanih pacova na ishrani bogatoj fruktozom u odnosu na životinje na standardnoj ishrani (Slika 29a i b), koji sugerise da nije došlo do nagomilavanja štetnih lipidnih intermedijera u srcu. Naime TG, DG i ceramidi aktiviraju kinaze koje fosforilišu IRS-1 na serinskim ostacima (Zhang i sar., 2010).

Ne postoje literaturni podaci koji se tiču efekata estradiola na IRS-1 u srcu u uslovima povećanog unosa fruktoze ili kod drugih animalnih modela insulinske rezistencije. Međutim, hronični tretman estradiolom ovarijektomisanih ženki miševa na ishrani bogatoj mastima je povećao sadržaj proteina IRS-1 u skeletnim mišićima (Riant i sar., 2009). Takođe, akutni tretman estradiolom nije uticao na nivo proteina za IRS-1 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova na standardnoj ishrani (Koricanac i sar., 2009). Kao i u studiji sa akutnim tretmanom, u ovoj studiji hronični tretman estradiolom ovarijektomisanih ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom nije promenio ukupan proteinski sadržaj IRS-1 u srcu (Slika 5), dok je smanjio stepen fosforilacije IRS-1 na Ser<sup>307</sup>, ispod nivoa zabeleženog kod životinja na standardnoj ishrani (Slika 4), što može da bude posledica izostanka akumulacije štetnih lipidnih intermedijera u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Naime, iako lipidni profil srca ovih životinja (Slika 29c) ukazuje na taloženje TG, ne mora da znači da je došlo do taloženja i drugih lipidnih intermedijera, kao što su ceramidi i DG, za koje se smatra da su mnogo toksičniji za srce nego akumulacija neutralnih TG (Bayeva i sar., 2013).

Signalni put PI3K/Akt ima važnu ulogu u srcu i ispoljava kardioprotektivne efekte, tako što reguliše rast, preživljavanje, funkciju i metabolizam kardiomiocita

(Matsui i sar., 2003). Akt može da bude regulisan procesom fosforilacije, pri čemu se fosforilacija Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> smatraju ključnim za aktivnost Akt (Latronico i sar., 2004).

U skeletnim mišićima pacova, ishrana bogata fruktozom nije promenila ukupan sadržaj Akt, međutim insulinom stimulirana fosforilacija Akt je bila smanjena (Li i sar., 2008). U studiji Qin i saradnika fruktozna ishrana nije promenila ekspresiju iRNK za Akt u srcu pacova (Qin i sar., 2010). U ovoj studiji, nivo proteina Akt u srcu ovarijektomisanih ženki se nije promenio u uslovima povećanog unosa fruktoze (Slika 8). U studiji Prakash i saradnika, stepen fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> je bio značajno smanjen u srcu pacova na ishrani obogaćenju fruktozom (Prakash i sar., 2011). Rezultati ove studije koji se tiču poremećaja u fosforilaciji aminokiselinskih ostataka u molekulu Akt, su uglavnom u skladu sa literaturnim podacima i sa rezultatima naše preliminarne studije (Zakula i sar., 2011). Ishrana bogata fruktozom je smanjila fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Slika 6 i 7), pri čemu je smanjenje fosforilacije na Ser<sup>473</sup> bilo značajno samo u bazalnim uslovima. Slične promene su zapazili i Deng i saradnici u eksperimentima na pacovima na ishrani bogatoj holesterolom i fruktozom (Deng i sar., 2007). Naime, u studiji Deng i saradnika insulin je stimulirao fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i kod kontrolnih i kod pacova na obogaćenju ishrani, dok je insulinom stimulirana fosforilacija Akt na Thr<sup>308</sup> bila gotovo potpuno blokirana kod životinja na ishrani obogaćenju holesterolom i fruktozom (Deng i sar., 2007). Ove razlike u fosforilaciji Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> u bazalnim i insulinom stimuliranim uslovima, mogu da ukazuju na različitu ulogu fosforilacije ovih aminokiselinskih ostataka u delovanju insulina u srcu.

Camper-Kirby i saradnici sugerišu da razlika u stepenu rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod polova može da se pripíše povećanoj aktivaciji Akt u srcu žena, usled delovanja estrogena (Camper-Kirby i sar., 2001). Akutni tretman estradiolom je stimulirao fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i na Thr<sup>308</sup> (Koricanac i sar., 2011) u srcu ovarijektomisanih ženki pacova. U sličnoj studiji, količina proteina Akt je bila nepromenjena, dok je insulinom stimulirana fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> bila povećana u srcu 6 h nakon tretmana estradiolom (Koricanac i sar., 2009). U eksperimentima na ovarijektomisanim ženkama miševa na ishrani obogaćenju mastima estradiolski tretman je u insulinom stimuliranim uslovima povećao fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> u

skeletnim mišićima (Riant i sar., 2009). U ovoj studiji, hronični tretman estradiolom nije promenio sadržaj proteina Akt u srcu ovarijektomisanih ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Slika 8), ali je većim delom sprečio štetne efekte ishrane bogate fruktozom na fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> (Slika 6 i 7).

*Različiti efekti fruktoze i estradiola na fosforilaciju aminokiselinskih ostataka u molekulu Akt mogu da budu posledica različitih efekata na kinaze/fosfataze odgovorne za njihovu fosforilaciju/defosforilaciju, gde fruktoza verovatno smanjuje aktivnost PDK1 i RICTOR-mTOR kinaze, dok ih estradiol aktivira.*

Kliničke studije i studije na životinjama sugerišu da je signalni put ERK1/2 uključen u patofiziološki razvoj hipertrofije srca, preko indukcije aktivnosti raznih transkripcionih faktora (Asrih i sar., 2013). Takođe, brojni literaturni podaci ukazuju na to da je povećan unos fruktoze kod glodara povezan sa razvojem hipertrofije srca, koja je praćena poremećajem funkcionalnih parametara leve komore (Chess i sar., 2007; Panchal i sar., 2011). Na osnovu ovoga može se zaključiti da bi aktivacija mitogenog ERK1/2 puta, mogla biti odgovorna za razvoj hipertrofije srca kod životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom.

Međutim, u ovoj studiji ishrana bogata fruktozom nije promenila ukupan ćelijski sadržaj i stepen fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Slika 9 i 10). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatom studije Mellor i saradnika, koji su pokazali da ne postoji značajna razlika u stepenu fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> u srcu između miševa na fruktoznoj ishrani i miševa na standardnoj ishrani (Mellor i sar., 2011).

Osim što sprečava razvoj hipertrofije srca, estradiol takođe može i da aktivira mitogeni signalni put ERK1/2. Naime, estradiol stimuliše transkripcioni faktor Egr-1 u izolovanim kardiomiocitima pacova, preko aktivacije ERK1/2 (de Jager i sar., 2001). Takođe, akutni tretman estradiolom povećava fosforilaciju ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Koricanac i sar., 2011). Međutim, u ovoj studiji estradiolski tretman životinja na ishrani bogatoj fruktozom nije promenio stepen fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, kao ni ukupan proteinski sadržaj ERK1/2 u srcu (Slika 9 i 10). Razlika između ove i studija na kardiomiocitima u kulturi i pri akutnom tretmanu, može da bude posledica načina aplikacije hormona, a isto tako može da

ukazuje i na poremećaje u aktivaciji ERK1/2 signalnog puta, koji nastaju kao posledica fruktozne ishrane.

**Rezultati ove studije sugerišu da je ishrana bogata fruktozom dovela do razvoja insulinske rezistencije u srcu ovarijektomisanih ženki pacova, pri čemu je selektivno uticala na insulinski signalni put, gde je uzrokovala značajnu supresiju metaboličkog signalnog puta Akt, dok je mitogeni signalni put ERK1/2 ostao netaknut. Estradiol je uspeo da poništi neke, ali ne sve, štetne efekte ishrane u bazalnim i insulinom stimulisanim uslovima.**

### 5.3 EFEKTI ESTRADIOLA NA ENDOTELNU SINTAZU AZOT MONOKSIDA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM

eNOS ima važnu ulogu u modulaciji procesa kontrakcije, relaksacije i brzine otkucaja srca (Massion i Balligand, 2003). NO, koji nastaje delovanjem eNOS, je veoma važan regulator kardiovaskularne homeostaze, jer kao endogeni vazodilatatorni gas, konstantno reguliše dijametar krvnih sudova i održava antiproliferativno i antiapoptotičko okruženje u zidu sudova (Sessa, 2004). Insulin ispoljava kardioprotektivne efekte, koji se ogledaju u antiapoptoskom delovanju nakon I/R povrede srca, tako što stimuliše produkciju NO, putem aktivacije signalnog puta PI3K/Akt/eNOS u srcu (Gao i sar., 2002). Aktivnost eNOS je između ostalog regulisana i fosforilacijom aminokiselinskih ostataka, pozitivno na Ser<sup>1177</sup> i negativno na Thr<sup>495</sup> (Mount i sar., 2007)

Veliki broj literaturnih podataka pokazuje da ishrana obogaćena fruktozom smanjuje aktivnost eNOS u srcu (Miatello i sar., 2001; Miatello i sar., 2005; Vazquez-Prieto i sar., 2010b; Vazquez-Prieto i sar., 2011) i aorti (Miatello i sar., 2001; Miatello i sar., 2005) pacova. Ove studije su u skladu sa studijom Nyby i saradnika koji su pokazali da je ekspresija iRNK i proteina za eNOS smanjena u srcu i aorti kod pacova na fruktoznoj ishrani (Nyby i sar., 2005). Takođe, u studiji Prakash i saradnika količina proteina eNOS, kao i stepen fosforilacije na Ser<sup>1177</sup> su bili značajno smanjeni u srcu

pacova na ishrani obogaćenoj fruktozom (Prakash i sar., 2011). Međutim, u ovoj studiji, ishrana bogata fruktozom nije promenila sadržaj proteina eNOS u srcu (Slika 13), što može da bude posledica različitog procenta fruktoze u ishrani. Naime, Prakash i saradnici su u svojim eksperimentima koristili 25% rastvor fruktoze u vodi i čvrstu hranu koja sadrži 35% fruktoze (Prakash i sar., 2011).

U skladu sa literaturnim podacima, i u ovoj studiji ishrana bogata fruktozom je smanjila fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup> u srcu pacova, pogotovo u insulinom stimulisanim uslovima (Slika 11). S obzirom da je pokazano da Akt aktivira eNOS, tako što ga fosforiliše na Ser<sup>1177</sup> (Michell i sar., 1999), smanjena fosforilacija eNOS na Ser<sup>1177</sup> u srcu životinja na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji verovatno je posledica smanjene aktivacije Akt.

Povećan unos fruktoze u ovoj studiji je stimulisao inhibitornu fosforilaciju eNOS na Thr<sup>495</sup> u srcu pacova (Slika 12), što je takođe u skladu sa literaturnim podacima u vezi sa aktivnošću eNOS u srcu pacova na ishrani obogaćenoj fruktozom. Povećanje fosforilacije eNOS na Thr<sup>495</sup> ukazuje na promene u aktivnosti kinaza/fosfataza, koje su odgovorne za fosforilaciju/defosforilaciju ovog ostatka. Andreozzi i saradnici sugerišu da je protein fosfataza 1 odgovorna za insulinom indukovanu defosforilaciju Thr<sup>495</sup> u molekulu eNOS (Andreozzi i sar., 2007), dok je za proces fosforilacije ovog ostatka odgovorna PKC (Fleming i sar., 2001).

Estrogeni ostvaruju kardioprotektivne efekte i preko regulacije ekspresije i aktivnosti eNOS, uzimajući u obzir različite efekte koje ostvaruje NO u ćeliji (Murphy i Steenbergen, 2007). Estradiol stimuliše ekspresiju iNOS i eNOS u kardiomiocitima, što ukazuje na potencijalni mehanizam kako estrogeni mogu da modulišu ekspresiju NOS i formiranje NO u srcu (Nuedling i sar., 1999). Estradiol stimuliše oslobađanje NO u endotelijalnim ćelijama i brzim efektima preko membranskih ER putem aktivacije signalnog puta PI3K/Akt (Haynes i sar., 2000).

Do sada nisu izučavani efekti estradiola na eNOS u srcu u animalnim modelima insulinske rezistencije. Kod zdravih ovarijektomisanih ženki pacova, 30 minuta nakon aplikacije, estradiol stimuliše fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup> u srcu (Koricanac i sar., 2011). Takođe, hronični tretman estradiolom u trajanju od 14 dana je povećao nivo proteina eNOS i fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup> u srcu ovarijektomisanih pacova (Ricchiuti i sar., 2009). U ovoj studiji, estradiol nije imao efekta na ukupan sadržaj

eNOS u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Slika 13), dok je povećao nivo fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> čak iznad nivoa zabeleženog kod životinja na standardnoj ishrani (Slika 11). Stimulatorni efekat estradiola na fosforilaciju Ser ostatka u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom je verovatno posledica aktivacije Akt, koja fosforiliše eNOS na ovoj poziciji. Međutim tretman ovarijektomisanih ženki na ishrani bogatoj fruktozom estradiolom nije imao efekta na inhibitornu fosforilaciju eNOS na Thr<sup>495</sup> u srcu (Slika 12). Izostanak efekata na ovu fosforilaciju ukazuje na to da estradiol nema efekta na protein fosfatazu 1, koja je odgovorna za defosforilaciju eNOS na Thr<sup>495</sup>.

**Uočene promene u fosforilaciji molekula eNOS kod ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom ukazuju na moguće smanjenje enzimske aktivnosti, što može da ima za posledicu smanjenu produkciju NO i poremećaj u regulaciji funkcije srca. Rezultati ove studije sugerišu i to da estradiol verovatno može da prevenira štetne efekte ishrane na nivo produkcije NO, ali u određenoj meri, s obzirom da je estradiolski tretman ispoljio značajne efekte samo na nivou aktivirajuće fosforilacije u eNOS molekulu.**

#### 5.4 EFEKTI ESTRADIOLA NA NATRIJUM/KALIJUM-ATP-azu U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM

Regulacija aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze je posebno važna u srcu, gde enzim indirektno kontroliše kontrakciju srčanog mišića (Fuller i sar., 2013). Zheng i saradnici su pokazali da aktivacija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze specifičnim antitelom u srcu pacova može da proizvede i pozitivnu inotropiju i kardioprotektivne efekte, preko aktivacije signalnih puteva ERK1/2 i PI3K/Akt (Zheng i sar., 2011).

Iako postoje neslaganja u literaturnim podacima o aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze u različitim tkivima u gojaznosti i dijabetesu, većina studija je zabeležila smanjenu aktivnost pumpe u ovim stanjima (Iannello i sar., 2007). U studiji Galuska i saradnika ishrana obogaćena mastima je smanjila aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze u skeletnim

mišićima ženki pacova, gde je ekspresija proteina za  $\alpha 2$  subjedincu takođe bila smanjena, a za  $\alpha 1$  povećana (Galuska i sar., 2009).

U ovoj studiji ishrana bogata fruktozom je smanjila ukupan sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Slika 15), dok je sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice bio nepromenjen (Slika 17). S obzirom da su aktivnost i ekspresija pumpe regulisani različitim hormonima i drugim nehormonskim regulatorima (Clausen, 2003; Therien i Blostein, 2000), mehanizam kojim fruktoza reguliše aktivnost pumpe mogao bi da uključuje neke od ovih regulatora. Kod pacova u ovoj studiji ishrana obogaćena fruktozom je povećala sadržaj subjedinica pumpe u PM frakciji srca, pogotovo u insulinom stimulisanim uslovima (Slika 14 i 16). Pored toga što imaju važnu ulogu u regulaciji osetljivosti na insulin, insulin i masne kiseline su uključeni i u regulaciju funkcije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze. Naime, u studiji Koricanca i saradnika insulin je stimulisao translokaciju  $\alpha 2$  subjedinice do PM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Koricanac i sar., 2011), dok su masne kiseline prikazane kao inhibitori aktivnosti pumpe (Iannello i sar., 2007; Kelly i sar., 1986). Tako, povećana koncentracija insulina i smanjena koncentracija FFA kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji predstavljaju povoljne uslove za funkciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze, što može da bude potencijalno objašnjenje za povećan sadržaj subjedinica u PM srca. Slične pozitivne efekte ishrane obogaćene fruktozom, koji su posredovani hiperinsulinemijom, su zapazili i Berger i saradnici u vaskularnom tkivu pacova (Berger i sar., 1998).

U svojim eksperimentima Dzurba i saradnici su pokazali da estradiol stimuliše aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze u sarkoplazmatičnoj membrani srca tako što stimuliše aktivaciju enzima kalijumom (Dzurba i sar., 1997). Takođe pokazano je da estradiol može da poveća aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze i stimuliše ekspresiju  $\beta 1$  subjedinice pumpe u embrionalnim ćelijama srca pacova (Liu i sar., 2007a). Estradiolski tretman mužjaka pacova je posle 24 h povećao aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze u srcu, kao i sadržaj  $\alpha 1$  subjedinice u PM srca (Obradovic i sar., 2014). Međutim, akutni tretman estradiolom nije uticao na sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice pumpe u plazma membrani srca ovarijektomisanih ženki pacova (Koricanac i sar., 2011).

Estradiolski tretman životinja na ishrani bogatoj fruktozom je delimično smanjio sadržaj  $\alpha 2$  subjedinice u PM u insulinom stimulisanim uslovima, dok je u bazalnim uslovima bio ispod nivoa zabeleženog kod životinja na standardnoj ishrani (slika 16).

Iako ženke na ishrani bogatoj fruktozom koje su primale estradiol u ovoj studiji nisu bile hiperinsulinemične, estradiolski tretman je kod njih dodatno smanjio koncentraciju FFA u plazmi (Tabela 2). Stoga niske koncentracije FFA u plazmi ovih životinja mogu da budu uzrok povećanog sadržaja subjedinića pumpe u PM srca.

**Ishrana obogaćena frukozom u ovoj studiji je ispoljila pozitivne efekte na subjediniće  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze, pre svega na nivou njihove ćelijske lokalizacije, što je bilo iznenađujuće, pri čemu su efekti ishrane bili posebno izraženi kod  $\alpha 1$  subjediniće. Rezultati James i saradnika sugerišu da u srcu miša  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  subjedinića imaju različitu fiziološku funkciju, gde  $\alpha 2$  subjedinića ima specifičnu ulogu u regulaciji unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona i posreduje u pozitivnom inotropnom odgovoru kardiotoničnih glikozida (James i sar., 1999). Rezultati ove studije pokazuju da estradiol nije uspeo da poništi većinu efekata ishrane bogate fruktozom na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-azu u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom.**

#### 5.5 EFEKTI ESTRADIOLA NA TRANSPORT ENERGETSKIH SUPSTRATA I METABOLIZAM MASNIH KISELINA U SRCU PACOVA SA INSULINSKOM REZISTENCIJOM IZAZVANOM ISHRANOM BOGATOM FRUKTOZOM

Pacijenti koju boluju od dijabetesa su izloženi povećanom riziku za razvoj različitih kardiovaskularnih komplikacija, kao što su povećana ateroskleroza u velikim arterijama i povećana koronarna ateroskleroza, koja povećava rizik za infarkt miokarda, moždani udar i gubitak udova. Dijabetes takođe može da utiče na strukturu i funkciju srca u odsustvu promena u krvnom pritisku i bolesti koronarnih arterija, u stanju koje se naziva dijabetična kardiomiopatija (Boudina i Abel, 2007). Dijabetična kardiomiopatija kod ljudi se karakteriše poremećajem dijastole, koja je često praćena razvojem disfunkcije sistole (Bayeva i sar., 2013). Insulinska rezistencija predstavlja faktor rizika za razvoj disfunkcije leve komore i prestanak rada srca i jedna je od karakteristika dijabetesa tipa 2 (Dirkx i sar., 2011).



U patogenezi dijabetične kardiomiopatije učestvuje više faktora, gde se poremećaj u metabolizmu supstrata i energetskom metabolizmu u srcu pokazao kao važan kontributor (Boudina i Abel, 2007). U dijabetičnom srcu dolazi do dramatične promene koja se ogleda u smanjenom korišćenju glukoze i gotovo potpunom oslanjanju na masne kiseline kao izvor energije, što rezultuje gubitkom metaboličke fleksibilnosti (Bayeva i sar., 2013). U eksperimentima na dijabetičnim Zucker pacovima, koristeći ehokardiografiju i PET (engl. *positron emission tomography*) tehniku, van den Brom i saradnici su pokazali da se u ranoj dijabetičnoj kardiomiopatiji, koja je bila povezana sa poremećajima dijastole i sistole, javlja povećana oksidacija masnih kiselina u srcu, sa pratećim smanjenjem insulinom posredovane potrošnje glukoze (van den Brom i sar., 2009). Rezultati eksperimenta Coort i saradnika na gojaznim Zucker pacovima rezistentnim na insulin, sugerišu da tokom postepenog razvoja od gojaznosti do dijabetesa tipa 2, poremećaj u preuzimanju masnih kiselina u srcu prethodi poremećaju u preuzimanju glukoze (Coort i sar., 2004).

Ustanovljeno je da kod gojaznih i pacijenata sa dijabetesom tipa 2, kao i kod modela glodara sa insulinom rezistencijom, gojaznošću i dijabetesom tipa 2, dolazi do akumulacije lipida u srcu (Coort i sar., 2007). Atkinson i saradnici su pokazali da je kod JCR:LA-cp pacova rezistentnih na insulin, akumulacija lipida u srcu posledica povećanog snabdevanja srca masnim kiselinama, pre nego smanjene oksidacije istih (Atkinson i sar., 2003). Boudina i saradnici sugerišu da uprkos povećanom korišćenju masnih kiselina u dijabetičnom srcu, povećano preuzimanje masnih kiselina verovatno prevazilazi brzinu oksidacije u srcu, što rezultuje akumulacijom lipida u srčanom mišiću, koji mogu da uzrokuju lipotoksičnost (Boudina i Abel, 2007). Asrih i saradnici su pokazali da izlaganje kardiomiocita masnim kiselinama uzrokuje poremećaj u insulinom signalnom putu i smanjenje insulinom stimulisano transporta glukoze u srcu (Asrih i sar., 2012).

Postoji ograničen broj literaturnih podataka o efektima estrogena na metabolizam u srcu, koji su kompleksni i mogu da obuhvataju efekte estrogena na ekspresiju gena uključenih u metabolizam, kao i indirektne efekte estrogena na metabolizam preko modulacije produkcije NO (Murphy i Steenbergen, 2007). U eksperimentima na PPAR $\alpha$ -/- miševima, Djoudi i saradnici su pokazali da su nakon inhibicije CPTI, hipoglikemija, akumulacija lipida u jetri i srcu i stepen smrtnosti bili

mного veći kod mužjaka nego kod ženki, pri čemu je estradiolski tretman mužjaka u velikoj meri prevenirao ove efekte (Djouadi i sar., 1998). Ovi rezultati sugerišu da delovanje estrogena ima važnu ulogu u lipidnoj homeostazi u srcu i jetri preko regulacije puta iskorišćavanja masnih kiselina (Djouadi i sar., 1998). Studija Herero i saradnika je pokazala da su estrogeni uključeni u selekciju supstrata u srcu (Herrero i sar., 2005). Naime, potrošnja masnih kiselina u srcu je bila veća kod žena u postmenopauzi koje su uzimale estrogen u poređenju sa muškarcima, i imala je tendenciju povećanja u poređenju sa ženama koje nisu primale hormonsku terapiju (Herrero i sar., 2005).

Članovi GLUT familije, GLUT4 i GLUT1 su odgovorni za preuzimanje glukoze u kardiomiocitima, gde je GLUT1 uglavnom uključen u bazalno preuzimanje glukoze, dok GLUT4 povećava preuzimanje glukoze pri delovanju vanćelijskih stimulusa, kao što su insulin ili kontrakcija (Steinbusch i sar., 2011). Kod spontano dijabetičnih Goto-Kakizaki pacova, bazalno preuzimanje glukoze u srcu je bilo nepromenjeno u odnosu na kontrolne pacove istog pola, dok je insulinom stimulirano preuzimanje glukoze bilo smanjeno (Desrois i sar., 2004). Ovo je bilo praćeno smanjenim sadržajem proteina GLUT4 u srcu dijabetičnih pacova, dok je sadržaj proteina GLUT1 ostao isti (Desrois i sar., 2004).

U svojim eksperimentima Qin i saradnici su uočili da je sadržaj iRNK za GLUT4 i GLUT1 bio smanjen u srcu pacova na ishrani obogaćenoj fruktozom u odnosu na životinje na standardnoj ishrani (Qin i sar., 2010). Međutim, u studiji Mellor i saradnika ishrana obogaćena fruktozom nije promenila ekspresiju iRNK i proteina za GLUT4 u srcu miša (Mellor i sar., 2011). U skladu sa rezultatima studije na miševima, ni u ovoj studiji ishrana bogata fruktozom nije uticala na nivo proteina GLUT4 u srcu (Slika 20), dok je sadržaj proteina GLUT1 bio povećan u odnosu na životinje na standardnoj ishrani (Slika 23). Laybutt i saradnici su pokazali da insulin selektivno reguliše ekspresiju GLUT1 u srčanom mišiću *in vivo*, pri čemu dostupnost supstrata moduliše ovaj efekat. Naime, tokom gladovanja hiperinsulinemija dovodi do značajne overekspresije GLUT1, dok prisustvo visoke koncentracije glukoze ili FFA, blokira ovo povećanje (Laybutt i sar., 1997). Povećan sadržaj GLUT1 u srcu životinja na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji, može da bude posledica prisustva visokih

koncentracija insulina i niskih koncentracija FFA u plazmi ovih životinja, kao i u slučaju subjedinica pumpe.

Rezultati ove studije su pokazali da je sadržaj GLUT4 u PM srca životinja na fruktoznoj ishrani bio smanjen samo u insulinom stimulisanim uslovima (Slika 18), što nije bilo praćeno promenom sadržaja GLUT4 u LDM (Slika 19). Međutim ishrana bogata fruktozom je dovela do translokacije GLUT1 iz PM do LDM u insulinom stimulisanim uslovima, dok u bazalnim uslovima smanjenje GLUT1 u PM nije bilo praćeno povećanim sadržajem transportera u LDM frakciji srca (Slika 21 i 22). U eksperimentima na pacovima na ishrani bogatoj holesterolom i fruktozom, Deng i saradnici su uočili smanjen nivo proteina GLUT4 u PM u srcu ovih životinja samo u insulinom stimulisanim uslovima, što nije bilo praćeno promenom sadržaja proteina u citosolnoj frakciji, dok se sadržaj GLUT1 nije menjao ni u bazalnim ni u insulinom stimulisanim uslovima (Deng i sar., 2007). Oni sugerišu da je smanjen sadržaj GLUT4 u PM posledica poremećaja u insulinskom signalnom putu u srcu, koji se ogleda u smanjenoj insulinom stimulisanom fosforilaciji Akt (Deng i sar., 2007). U skladu sa tim, i u ovoj studiji smanjenje nivoa GLUT4, kao i proteina GLUT1 u PM, može da bude posledica uočene smanjene aktivacije Akt u srcu delovanjem insulina. Slične efekte su zapazili Li i saradnici u studiji na skeletnim mišićima. Ishrana obogaćena fruktozom nije promenila ukupan sadržaj GLUT4, ali je smanjila insulinom stimulisanu translokaciju GLUT4 na plazma membranu i smanjila aktivaciju Akt i PKC $\zeta$  u skeletnim mišićima (Li i sar., 2008).

*Smanjen sadržaj transportera u PM, ukazuje na potencijalno smanjeno preuzimanje glukoze u srcu ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Očigledno je da je ishrana imala izraženije efekte na GLUT1, što može da ima važnu ulogu u preuzimanju i iskorišćavanju glukoze u bazalnim uslovima.*

Studija na C57BL/6JO miševima je pokazala da je sistemska aktivacija ER $\alpha$  dovoljna i da je njegova ekspresija neophodna za održavanje preuzimanja glukoze u fiziološkim uslovima u srcu, što verovatno doprinosi kardioprotektivnim efektima estrogena (Arias-Loza i sar., 2012). U literaturi postoje samo podaci koji se odnose na estradiolsku regulaciju ekspresije glukoznih transportera u drugim tkivima. Studija na ovarijektomisanim pacovima je pokazala da suprafiziološke doze estradiola mogu da suprimiraju ekspresiju iRNK za GLUT4 u adipoznom tkivu, dok je u skeletnim

mišićima ovaj efekat izostao (Sugaya i sar., 1999). Nasuprot tome, injekcija estradiola je dovela do povećanja sadržaja iRNK i proteina za GLUT1 u uterusu pacova nakon 4-8 h (Welch i Gorski, 1999).

Kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u ovoj studiji, estradiolski tretman nije uticao na ukupan sadržaj GLUT4 u srcu, dok je sprečio povećanje GLUT1 proteina (Slika 20 i 23). Takođe, tretman estradiolom je smanjio sadržaj GLUT4 u PM srca u bazalnim uslovima, dok je vratio nivo GLUT4 u PM na nivo zabeležen kod kontrolnih životinja u insulinom stimulisanim uslovima, što je bilo praćeno smanjenjem sadržaja transportera u LDM frakciji (Slika 18 i 19). Rezultati studije Tepavcevic i saradnika su pokazali da je u srcu ovarijektomisanih ženki pacova injekcija estradiola dovela do translokacije GLUT4 iz LDM na PM 20-40 minuta nakon tretmana (Tepavcevic i sar., 2011). Bez obzira na različit način aplikacije hormona ili različit stepen osetljivosti na insulin kod pacova u ove dve studije, zapažaju se pozitivni efekti estradiola na GLUT4 kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom, barem u insulinom stimulisanim uslovima. Pozitivni efekti estradiola na GLUT4 mogu da budu posledica pozitivnog efekta estradiola na aktivaciju Akt u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom.

Međutim, u ovoj studiji estradiol je potencirao efekte fruktoze na sadržaj GLUT1 u PM srca. Naime, kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom koji su primali estradiol, sadržaj GLUT1 u PM je bio takođe smanjen kako u bazalnim, tako i u insulinom stimulisanim uslovima, dok je sadržaj ovog transportera u LDM frakciji bio smanjen, čak ispod nivoa zabeleženog kod kontrolnih životinja u bazalnim uslovima (Slika 21 i 22). Smanjen sadržaj GLUT1 u obe frakcije srca kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom koji su primali estradiol je verovatno posledica smanjenja ukupnog sadržaja proteina delovanjem estradiola.

*Ovi rezultati pokazuju da je estradiol poništio efekte ishrane na transportere za glukozu samo delimično na nivou lokalizacije GLUT4 transportera, što sugeriše da estradiolski tretman možda nema velikog uticaja na preuzimanje glukoze u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom.*

Prema Glatz i saradnicima, CD36 značajno doprinosi regulaciji oksidacije i esterifikacije masnih kiselina u srcu i skeletnim mišićima, posebno tokom metaboličkih izazova (Glatz i sar., 2010). Studija Luikena i saradnika je pokazala da je preuzimanje

masnih kiselina u vezikulama povećano u srcu gojaznih Zucker pacova, kao posledica povećanog sadržaja transportera masnih kiselina, CD36 i FABPpm, u plazma membrani, a ne promene ukupne količine transportera (Luiken i sar., 2001a). Takođe, rezultati eksperimenta Coort i saradnika sugerišu da je permanentna relokacija CD36 iz unutarćelijskog kompartmana do sarkoleme odgovorna za povećano preuzimanje masnih kiselina u srcu gojaznih Zucker pacova (Coort i sar., 2004).

U skeletnim mišićima C57BL/J6 miševa ishrana obogaćena fruktozom je povećala nivo CD36 proteina (Song i sar., 2012). Takođe, u studiji Qin saradnika ishrana bogata fruktozom je povećala nivo iRNK za CD36, kao i samog proteina u srcu pacova (Qin i sar., 2010). U ovoj studiji ishrana bogata fruktozom nije promenila nivo proteina za CD36 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Slika 26), dok je uzrokovala translokaciju CD36 iz LDM frakcije do PM u bazalnim i insulinom stimulisanim uslovima (Slika 24 i 25). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studija na drugim animalnim modelima insulinske rezistencije, kao što su gojazni Zucker pacovi (Coort i sar., 2004; Luiken i sar., 2001a) i sugeriše povećano preuzimanje masnih kiselina u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Povećana dostupnost masnih kiselina srcu u našoj studiji, verovatno potiče od TG iz cirkulacije, a ne od FFA iz cirkulacije (Menard i sar., 2010). Naime, u studiji na *knock-out* miševima Bharadwaj i saradnici su pokazali da je lipoliza delovanjem LPL iz srca uključena u preuzimanje lipida iz lipoproteina bogatih TG, pri čemu je CD36 odgovoran za preuzimanje masnih kiselina u srcu koje potiču iz VLDL-TG čestica (Bharadwaj i sar., 2010).

Kao i u slučaju transportera za glukozu, iako postoje rezultati koji ukazuju na ulogu estradiola u regulaciji ekspresije CD36 u drugim tkivima, kao što je jetra (Cheung i sar., 2007), literaturni podaci koji se tiču efekata estradiola na CD36 u srcu su retki. Pokazano je da administracija estradiola kod mužjaka pacova nakon krvarenja izazvanog traumom tkiva povećava nivo proteina CD36 u srcu (Hsieh i sar., 2006). I u ovoj studiji estradiolski tretman je povećao ukupan sadržaj proteina za CD36 u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Slika 26), kao i sadržaj transportera u LDM frakciji srca ovih životinja (Slika 25). Takođe estradiolski tretman pacova na ishrani bogatoj fruktozom je dodatno povećao sadržaj CD36 u PM (Slika 24), što jednim delom može da se pripiše i translokaciji transportera iz unutarćelijskog kompartmana putem aktivacije signalnog puta Akt delovanjem estradiola (Tepavcevic i sar., 2011).

Tepavčević i saradnici su u svojoj studiji zabeležili da injekcija estradiola vodi ka brzom povećanju CD36 u PM u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Tepavcevic i sar., 2011), što je u skladu sa rezultatom naše studije.

*Ovi rezultati sugerišu da estradiolski tretman ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom može dodatno da stimuliše preuzimanje i korišćenje masnih kiselina u srcu, što može da vodi ka razvoju patologije srca.*

U gotovo svim tkivima, nakon ulaska u ćeliju, masne kiseline ulaze u tri glavna metabolička puta: mogu da budu konvertovane do glicerololipida, uključujući TG, DG i glavne membranske fosfolipide; mogu da se konvertuju u sfingolipide, uključujući sfingomijelin i ceramide i mogu da budu oksidovane u cilju proizvodnje energije (Chavez i Summers, 2010).

U studiji Holloway i saradnika, povećan transport masnih kiselina i sadržaj CD36 i FABPpm u plazma membrani su bili praćeni povećanom brzinom esterifikacije do TG i povećanim sadržajem TG u srčanom mišiću gojaznih Zucker pacova, dok su brzina oksidacije masnih kiselina, kao i aktivnost CPTI bili nepromenjeni (Holloway i sar., 2011). Takođe, u srcu pacova na ishrani bogatoj mastima, relokacija CD36 do plazma membrane je povećala preuzimanje masnih kiselina, pri čemu je i esterifikacija masnih kiselina do TG i fosfolipida takođe bila povećana u srcu ovih životinja (Ouwens i sar., 2007). Ovo je bilo povezano sa povećanim sadržajem TG u srčanom mišiću, pri čemu je apsolutna brzina oksidacije masnih kiselina bila ista kod pacova na standardnoj ishrani i pacova na ishrani bogatoj mastima (Ouwens i sar., 2007).

Kod pacova na ishrani obogaćenoj fruktozom, koja je činila više od 60% kalorijske vrednosti hrane, nakon 20 dana je došlo do povećanja sadržaja holesterola, TG, FFA i smanjenja sadržaja fosfolipida u srcu (Thirunavukkarasu i sar., 2004). U ovoj studiji ishrana ovarijektomisanih ženki pacova sa 10% rastvorom fruktoze tokom 9 nedelja nije dovela do promene lipidnog profila srca (Slika 29a i b), što može da ukazuje na izostanak akumulacije TG i drugih lipidnih intermedijera u srcu ovih životinja. Takođe, kod svinja ishrana obogaćena mastima i fruktozom nije promenila ukupan nivo TG i DG u srcu životinja, ali je njihov sastav bio značajno promenjen, gde je pul TG, kao i DG bio obogaćen ostacima zasićenih masnih kiselina, dok je sadržaj ostataka polinezasićenih masnih kiselina bio smanjen (Lee i sar., 2010).

U našoj nedavnoj studiji ishrana mužjaka pacova hranom obogaćenom 10% rastvorom fruktoze tokom 9 nedelja je dovela do promene lipidnog profila srca, koja se ogledala u pojavi TG različitog sastava (Romic i sar., 2014). Ovo je bilo praćeno i povećanjem nivoa proteina lipina 1 (Romic i sar., 2014), enzima iz familije lipina koji katalizuju preposlednji korak u glicerol fosfatnom putu sinteze TG (Csaki i sar., 2013).

U ovoj studiji, ishrana bogata fruktozom nije promenila sadržaj proteina za lipin 1 (Slika 27) u srcu ovarijektomisnih ženki pacova, što je u skladu sa rezultatom o lipidnom profilu srca ovih životinja, koji je takođe bio nepromenjen.

U srcu ovarijektomisanih ženki pacova ishrana bogata fruktozom nije promenila ni ukupan sadržaj CPTI proteina (Slika 28). Kako CPTI predstavlja mesto regulacije  $\beta$ -oksidacije u mitohondrijama ćelija srca i skeletnih mišića *in vivo* (Eaton i sar., 2001), izostanak promene ekspresije ovog molekula, može da ukazuje na to da kod životinja na ishrani bogatoj fruktozom nije došlo do povećanog ulaska masnih kiselina u mitohondrije i promene brzine  $\beta$ -oksidacije u srcu.

Literaturni podaci koji se odnose na efekte estradiola na akumulaciju lipida u perifernim organima su različiti, i verovatno zavise od ispitivanog organa i patološkog/fiziološkog stanja. Naime, estradiol je smanjio stepen akumulacije lipida u kardiomiocitima nakon krvarenja izazvanog traumom tkiva (Hsieh i sar., 2006), dok nije imao uticaja na sadržaj TG u jetri kod ovarijektomisanih miševa na ishrani bogatoj mastima (Riant i sar., 2009).

U ovoj studiji estradioski tretman pacova na ishrani bogatoj fruktozom je promenio lipidni profil srca, pri čemu su kod ovih životinja identifikovani TG različitog sastava, koji nisu bili prisutni u srcima kontrolnih životinja i životinja na ishrani bogatoj fruktozom bez estradiolskog tretmana (Slika 29c). Na osnovu prethodnih studija, može se zaključiti da estradiol primarno usmerava masne kiseline u  $\beta$ -oksidaciju, i tako proizvodi energiju za funkcionisanje srčanog mišića (Maher i sar., 2010; Tarnopolsky, 2000). Rezultati ove studije sugerišu da u kombinaciji, estradiol i ishrana bogata fruktozom, mogu da ubrzaju potrošnju oksidativnog kapaciteta mitohondrija, što preusmerava masne kiseline u proces sinteze TG i potencijalno drugih lipida.

Estradiol nije promenio sadržaj proteina lipina 1 u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Međutim, kako su lipin proteini smešteni u citosolu i asociraju sa membranom endoplazmatskog retikuluma tokom obavljanja svoje aktivnosti (Csaki i

sar., 2013), estradiol možda stimuliše sintezu TG u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom tako što stimuliše translokaciju lipina 1 do endoplazmatičnog retikuluma.

Takođe, estradiolski tretman ženki pacova na ishrani bogatoj fruktozom nije promenio ni sadržaj CPTI proteina u srcu ovih životinja. Međutim, ovo ne mora da znači da nije došlo do povećanog ulaska masnih kiselina u mitohondrije, s obzirom da na aktivnost CPTI, putem promene senzitivnosti za malonil-CoA, može da utiče i vrsta masnih kiselina (Power i Newsholme, 1997), koje možda u većoj meri ulaze u srce kod životinja tretiranih estradiolom.

**Rezultati ove studije sugerišu da ishrana obogaćena fruktozom vodi ka smanjenom preuzimanju glukoze i povećanom preuzimanju masnih kiselina u srcu ovarijektomisanih ženki pacova, uglavnom preko uticaja na translokaciju transportera za ove supstrate do plazma membrane, što može da vodi povećanoj potrošnji masnih kiselina i patologiji srca. Estradiolski tretman životinja na ishrani bogatoj fruktozom je u maloj meri prevenirao efekte ishrane na preuzimanje glukoze, dok je potencirao efekte ishrane na preuzimanje masnih kiselina, što je rezultiralo nakupljanjem TG u srcu. Ovo ukazuje da na nivou preuzimanja supstrata u srcu, estradiol pojačava štetne efekte fruktoze, što može da ima fatalne posledice za srce.**



## 6 ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije pokazuju da je ishrana obogaćena fruktozom dovela do poremećaja u regulaciji apetita, do pojave dislipidemije i razvoja insulinske rezistencije, kao i supresije Akt/eNOS signalnog puta u srcu, dok je ispoljila neočekivane pozitivne efekte na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-azu u srcu. Takođe fruktozna ishrana je dovela do premećaja u preuzimanju energetskih supstrata u srcu, na nivou translokacije transportera za glukozu i masne kiseline do plazma membrane.

Estradiol je uspeo da spreči većinu štetnih efekata ishrane bogate fruktozom, pre svega na nivou biohemijskih parametara, fosforilacije serinskih ostataka u Akt/eNOS signalnom putu i lokalizacije GLUT4 u srcu, što potvrđuje njegove pozitivne efekte na osetljivost na insulin i u određenoj meri kardioprotektivne efekte. Međutim, estradiol nije uspeo da spreči efekte fruktozne ishrane na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-azu, fosforilaciju treoninskih ostataka u Akt/eNOS putu i lokalizaciju GLUT1. Takođe, estradiol je potencirao štetne efekte ishrane na metabolizam lipida u srcu, što može da ima fatalne posledice za srce.

Ova studija predstavlja originalni doprinos razumevanju efekata estrogenih hormona u kontekstu rezistencije na insulin u srcu, pri čemu dobijeni rezultati mogu da imaju posebno važnu ulogu u kliničkoj praksi prilikom primene hormonske terapije kod žena sa insulinskom rezistencijom i dijabetesom tipa 2.

## 7 LITERATURA

- Abel ED (2004) *Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models*. *Curr. Hypertens. Rep.* 6, 416-423.
- Abel ED (2005) *Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 5, 219-226.
- Abel ED, O'Shea KM, Ramasamy R (2012) *Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2068-2076.
- Al-Awwadi NA, Araiz C, Bornet A, Delbosc S, Cristol JP, Linck N et al. (2005) *Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 151-157.
- Al-Khalili L, Kotova O, Tsuchida H, Ehren I, Feraille E, Krook A, Chibalin AV (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, 25211-25218.
- Al-Khalili L, Yu M, Chibalin AV (2003) *Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase trafficking in skeletal muscle: insulin stimulates translocation of both alpha 1- and alpha 2-subunit isoforms*. *FEBS Lett.* 536, 198-202.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Gonzalez-Pardo H, Conejo NM et al. (2006) *Positive effects of 17beta-estradiol on insulin sensitivity in aged ovariectomized female rats*. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 419-426.
- Alonso A, Gonzalez-Pardo H, Garrido P, Conejo NM, Llana P, Diaz F et al. (2010) *Acute effects of 17 beta-estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats*. *Age* 32, 421-434.

- Alonso A, Gonzalez C (2008) *Relationship between non-genomic actions of estrogens and insulin resistance*. Infect. Disord.: Drug Targets 8, 48-51.
- Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, Hribal ML, Sciacqua A, Perticone M et al. (2007) *Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells*. Mol. Cell. Biol. 27, 2372-2383.
- Arias-Loza PA, Kreissl MC, Kneitz S, Kaiser FR, Israel I, Hu K et al. (2012) *The estrogen receptor-alpha is required and sufficient to maintain physiological glucose uptake in the mouse heart*. Hypertension 60, 1070-1077.
- Asrih M, Lerch R, Papageorgiou I, Pellieux C, Montessuit C (2012) *Differential regulation of stimulated glucose transport by free fatty acids and PPARalpha or -delta agonists in cardiac myocytes*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 302, E872-884.
- Asrih M, Mach F, Nencioni A, Dallegri F, Quercioli A, Montecucco F (2013) *Role of mitogen-activated protein kinase pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with metabolic syndrome*. Mediat. Inflamm. 2013, 367245.
- Atkinson LL, Kozak R, Kelly SE, Onay Besikci A, Russell JC, Lopaschuk GD (2003) *Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 284, E923-930.
- Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA (2002) *Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function*. Cardiovasc. Res. 53, 709-719.
- Balligand JL (2002) *Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: following the lead(er)?* Circ. Res. 90, 838-841.
- Barros RP, Gustafsson JA (2011) *Estrogen receptors and the metabolic network*. Cell Metab. 14, 289-299.
- Basciano H, Federico L, Adeli K (2005) *Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia*. Nutr Metab (Lond) 2, 5.

- Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H (2013) *Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy*. Journal of the American Heart Association 2, e000433.
- Becker C, Sevilla L, Tomas E, Palacin M, Zorzano A, Fischer Y (2001) *The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes*. Endocrinology 142, 5267-5276.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M et al. (2002) *Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression*. J. Clin. Investig. 109, 629-639.
- Berger ME, Ormsby BL, Bunnag P, Hori MT, Tuck ML, Golub MS (1998) *Increased functional Na(+)-K+ pump activity in the vasculature of fructose-fed hyperinsulinemic and hypertensive rats*. Hypertens. Res. 21, 73-80.
- Bers DM, Barry WH, Despa S (2003) *Intracellular Na+ regulation in cardiac myocytes*. Cardiovasc. Res. 57, 897-912.
- Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL (2008) *Insulin signalling in the heart*. Cardiovasc. Res. 79, 238-248.
- Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA et al. (2010) *Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake*. J. Biol. Chem. 285, 37976-37986.
- Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K (2007) *Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293, E1606-1614.
- Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol. Endocrinol. 19, 833-842.
- Boden G, Shulman GI (2002) *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur. J. Clin. Investig. 32 Suppl 3, 14-23.

- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J (2004) *Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects*. Mol. Asp. Med. 25, 495-520.
- Botezelli JD, Dalia RA, Reis IM, Barbieri RA, Rezende TM, Pelarigo JG et al. (2010) *Chronic consumption of fructose rich soft drinks alters tissue lipids of rats*. Diabetol. Metab. Syndr. 2, 43.
- Boudina S, Abel ED (2007) *Diabetic cardiomyopathy revisited*. Circulation 115, 3213-3223.
- Brady PS, Ramsay RR, Brady LJ (1993) *Regulation of the long-chain carnitine acyltransferases*. FASEB J. 7, 1039-1044.
- Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP (1998) *Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. J. Biol. Chem. 273, 23786-23792.
- Bray GA (2007) *How bad is fructose?* Am. J. Clin. Nutr. 86, 895-896.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM (2004) *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity*. Am. J. Clin. Nutr. 79, 537-543.
- Brown L, Hoong I, Doggrell SA (2000) *The heart as a target for oestrogens*. Heart, lung & circulation 9, 113-125.
- Brown LM, Clegg DJ (2010) *Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 122, 65-73.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF (1997) *Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms*. Cardiovasc. Res. 34, 3-24.
- Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K (2008) *Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295, E904-912.
- Bueno OF, Molkentin JD (2002) *Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death*. Circ. Res. 91, 776-781.
- Bursac BN, Vasiljevic AD, Nestorovic NM, Velickovic NA, Vojnovic Milutinovic DD, Matic GM, Djordjevic AD (2014) *High-fructose diet leads to visceral adiposity*

- and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role?* J. Nutr. Biochem. 25, 446-455.
- Butera PC (2010) *Estradiol and the control of food intake*. Physiol. Behav. 99, 175-180.
- Campbell SE, Febbraio MA (2001) *Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281, E803-808.
- Campbell SE, Mehan KA, Tunstall RJ, Febbraio MA, Cameron-Smith D (2003) *17beta-estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipid oxidative genes in skeletal muscle*. J. Mol. Endocrinol. 31, 37-45.
- Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E et al. (2001) *Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males*. Circ. Res. 88, 1020-1027.
- Carvalho JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz W, Jr., Guimaraes RB, Ribeiro EB et al. (2003) *The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance*. Endocrinology 144, 5604-5614.
- Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2005) *The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR*. FEBS Lett. 579, 2428-2432.
- Chambliss KL, Shaul PW (2002) *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase*. Endocr. Rev. 23, 665-686.
- Chavez JA, Summers SA (2010) *Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms*. Biochim. Biophys. Acta 1801, 252-265.
- Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC (2007) *Deleterious effects of sugar and protective effects of starch on cardiac remodeling, contractile dysfunction, and mortality in response to pressure overload*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 293, H1853-1860.
- Cheung L, Andersen M, Gustavsson C, Odeberg J, Fernandez-Perez L, Norstedt G, Tollet-Egnell P (2007) *Hormonal and nutritional regulation of alternative CD36*

- transcripts in rat liver--a role for growth hormone in alternative exon usage.* BMC Mol. Biol. 8, 60.
- Choi K, Kim YB (2010) *Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.* Korean J. Intern. Med. 25, 119-129.
- Clausen T (2003) *Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump regulation and skeletal muscle contractility.* Physiol. Rev. 83, 1269-1324.
- Cohen P (2006) *The twentieth century struggle to decipher insulin signalling.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 867-873.
- Collino M (2011) *High dietary fructose intake: Sweet or bitter life?* World journal of diabetes 2, 77-81.
- Cook GA, Edwards TL, Jansen MS, Bahouth SW, Wilcox HG, Park EA (2001) *Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart.* J. Mol. Cell. Cardiol. 33, 317-329.
- Coort SL, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ (2007) *Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters.* Mol. Cell. Biochem. 299, 5-18.
- Coort SL, Luiken JJ, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF (2004) *Increased FAT (fatty acid translocase)/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in cardiac myocytes from obese Zucker rats.* Biochem. Soc. Trans. 32, 83-85.
- Csaki LS, Dwyer JR, Fong LG, Tontonoz P, Young SG, Reue K (2013) *Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling.* Prog. Lipid Res. 52, 305-316.
- Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B (2006) *The role of sex in cardiac function and disease.* Can. J. Physiol. Pharmacol. 84, 93-109.
- de Jager T, Pelzer T, Muller-Botz S, Imam A, Muck J, Neyses L (2001) *Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements.* J. Biol. Chem. 276, 27873-27880.
- De Meyts P (2004) *Insulin and its receptor: structure, function and evolution.* BioEssays 26, 1351-1362.

- DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ (2006) *Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival*. J. Biol. Chem. 281, 32841-32851.
- DeBosch BJ, Muslin AJ (2008) *Insulin signaling pathways and cardiac growth*. J. Mol. Cell. Cardiol. 44, 855-864.
- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K (2010) *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 299, E685-694.
- Deng JY, Huang JP, Lu LS, Hung LM (2007) *Impairment of cardiac insulin signaling and myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 293, H978-987.
- Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H (1999) *Glucose for the heart*. Circulation 99, 578-588.
- Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK, Clarke K (2004) *Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart*. Cardiovasc. Res. 61, 288-296.
- Dirkx E, Schwenk RW, Glatz JF, Luiken JJ, van Eys GJ (2011) *High fat diet induced diabetic cardiomyopathy*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 85, 219-225.
- Distler AM, Kerner J, Hoppel CL (2009) *Mass spectrometric demonstration of the presence of liver carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) in heart mitochondria of adult rats*. Biochim. Biophys. Acta 1794, 431-437.
- Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP (1998) *A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice*. J. Clin. Investig. 102, 1083-1091.
- Donaldson C, Eder S, Baker C, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M et al. (2009) *Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation*. Circ. Res. 104, 265-275, 211p following 275.



- Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K (2007) *Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns*. J. Biol. Chem. 282, 3450-3457.
- Donkor J, Sparks LM, Xie H, Smith SR, Reue K (2008) *Adipose tissue lipin-1 expression is correlated with peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression and insulin sensitivity in healthy young men*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 233-239.
- Duncombe WG (1964) *The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma*. Clin. Chim. Acta 9, 122-125.
- Dupont J, Derouet M, Simon J, Taouis M (1998) *Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken*. Am. J. Physiol. 274, E309-316.
- Dzurba A, Ziegelhoffer A, Vrbjar N, Styk J, Slezak J (1997) *Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma*. Mol. Cell. Biochem. 176, 113-118.
- Eaton S, Bartlett K, Quant PA (2001) *Carnitine palmitoyl transferase I and the control of beta-oxidation in heart mitochondria*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285, 537-539.
- Egert S, Nguyen N, Schwaiger M (1999) *Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia*. J. Mol. Cell. Cardiol. 31, 1337-1344.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. Am. J. Clin. Nutr. 76, 911-922.
- Erberich LC, Alcantara VM, Picheth G, Scartezini M (2002) *Hormone replacement therapy in postmenopausal women and its effects on plasma lipid levels*. Clin. Chem. Lab. Med. 40, 446-451.
- Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F (2003) *Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice*. Circ. Res. 93, 907-916.
- Ferder L, Ferder MD, Inserra F (2010) *The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension*. Curr. Hypertens. Rep. 12, 105-112.
- Feron O, Balligand JL (2006) *Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart*. Cardiovasc. Res. 69, 788-797.

- Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE et al. (2006) *Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway*. Cell Metab. 4, 199-210.
- Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G et al. (1997) *Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations*. J. Biol. Chem. 272, 7085-7092.
- Fleming I, Busse R (2003) *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R1-12.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001) *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ. Res. 88, E68-75.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- Fried SK, Rao SP (2003) *Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease*. Am. J. Clin. Nutr. 78, 873S-880S.
- Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ (2013) *Regulation of the cardiac sodium pump*. Cell. Mol. Life Sci. 70, 1357-1380.
- Galipeau D, Verma S, McNeill JH (2002) *Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283, H2478-2484.
- Galuska D, Kotova O, Barres R, Chibalina D, Benziane B, Chibalin AV (2009) *Altered expression and insulin-induced trafficking of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297, E38-49.
- Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL (2002) *Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation*. Circulation 105, 1497-1502.
- Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, Khan A, Efendic S, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K (2006) *Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic*

- lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3*. Mol. Endocrinol. 20, 1287-1299.
- Ghigo A, Morello F, Perino A, Damilano F, Hirsch E (2011) *Specific PI3K isoform modulation in heart failure: lessons from transgenic mice*. Curr. Heart Fail. Rep. 8, 168-175.
- Glatz JF, Bonen A, Ouwens DM, Luiken JJ (2006) *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart*. Cardiovasc. Drugs Ther. 20, 471-476.
- Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2010) *Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease*. Physiol. Rev. 90, 367-417.
- Godsland IF (2005) *Oestrogens and insulin secretion*. Diabetologia 48, 2213-2220.
- Gonzalez C, Alonso A, Alvarez N, Diaz F, Martinez M, Fernandez S, Patterson AM (2000) *Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy*. J. Endocrinol. 166, 283-291.
- Gonzalez C, Alonso A, Diaz F, Patterson AM (2003) *Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1*. J. Endocrinol. 176, 367-379.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM, Fernandez S, Patterson AM (2001) *Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on insulin receptor substrate-1*. JOP 2, 140-149.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM, Fernandez S, Patterson AM (2002a) *Role of 17beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor*. Steroids 67, 993-1005.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Esteban MM, Fernandez S, Patterson AM (2002b) *Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on the insulin receptor*. Life Sci. 70, 1621-1630.
- Gray GA, Sharif I, Webb DJ, Seckl JR (2001) *Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling*. Trends Pharmacol. Sci. 22, 152-156.
- Gray S, Kim JK (2011) *New insights into insulin resistance in the diabetic heart*. Trends Endocrinol. Metab. 22, 394-403.

- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. *Biochimie* 87, 99-109.
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A et al. (2008) *Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity*. *PLoS One* 3, e3466.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. *J. Biol. Chem.* 276, 36869-36872.
- Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, Lawrence JC, Jr. (2007) *Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1*. *J. Biol. Chem.* 282, 277-286.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M et al. (2000) *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells*. *Circ. Res.* 87, 677-682.
- He A, Liu X, Liu L, Chang Y, Fang F (2007) *How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin?* *Cell. Signal.* 19, 1-7.
- Herrero P, Soto PF, Dence CS, Kisrieva-Ware Z, Delano DA, Peterson LR, Gropler RJ (2005) *Impact of hormone replacement on myocardial fatty acid metabolism: potential role of estrogen*. *J. Nucl. Cardiol.* 12, 574-581.
- Hirsch E, Costa C, Ciraolo E (2007) *Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling*. *J. Endocrinol.* 194, 243-256.
- Holloway GP, Snook LA, Harris RJ, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2011) *In obese Zucker rats, lipids accumulate in the heart despite normal mitochondrial content, morphology and long-chain fatty acid oxidation*. *J. Physiol.* 589, 169-180.
- Hsieh YC, Choudhry MA, Yu HP, Shimizu T, Yang S, Suzuki T et al. (2006) *Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage*. *FASEB J.* 20, 1109-1117.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W (2004) *The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats*. *Diabetes Obes. Metab.* 6, 120-126.

- Hudson EK, Liu MH, Buja LM, McMillin JB (1995) *Insulin-associated changes in carnitine palmitoyltransferase in cultured neonatal rat cardiac myocytes*. J. Mol. Cell. Cardiol. 27, 599-613.
- Hyakukoku M, Higashiura K, Ura N, Murakami H, Yamaguchi K, Wang L et al. (2003) *Tissue-specific impairment of insulin signaling in vasculature and skeletal muscle of fructose-fed rats*. Hypertens. Res. 26, 169-176.
- Iannello S, Milazzo P, 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, 231-251.
- Iliadis F, Kadoglou N, Didangelos T (2011) *Insulin and the heart*. Diabetes Res. Clin. Pract. 93 Suppl 1, S86-91.
- James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML et al. (1999) *Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart*. Mol. Cell 3, 555-563.
- Jensen MD, Martin ML, Cryer PE, Roust LR (1994) *Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans*. Am. J. Physiol. 266, E914-920.
- Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH et al. (2007) *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. Am. J. Clin. Nutr. 86, 899-906.
- Kan WH, Hsu JT, Ba ZF, Schwacha MG, Chen J, Choudhry MA et al. (2008) *p38 MAPK-dependent eNOS upregulation is critical for 17beta-estradiol-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 294, H2627-2636.
- Kashyap SR, Defronzo RA (2007) *The insulin resistance syndrome: physiological considerations*. Diab. Vasc. Dis. Res. 4, 13-19.
- Kehat I, Molkenin JD (2010) *Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1188, 96-102.
- Kelly RA, O'Hara DS, Mitch WE, Smith TW (1986) *Identification of NaK-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acids and lysophospholipids*. J. Biol. Chem. 261, 11704-11711.

- Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J (2001) *Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280, E65-74.
- Khitan Z, Kim DH (2013) *Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension*. Journal of nutrition and metabolism 2013, 682673.
- Kim JK, Levin ER (2006) *Estrogen signaling in the cardiovascular system*. Nuclear receptor signaling 4, e013.
- Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) *Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms*. J. Biol. Chem. 281, 6760-6767.
- Knowles CJ, Dionne M, Cebova M, Pinz IM (2011) *Palmitate-Induced Translocation of Caveolin-3 and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiomyocytes*. OnLine journal of biological sciences 11, 27-36.
- Knowlton AA, Lee AR (2012) *Estrogen and the cardiovascular system*. Pharmacol. Ther. 135, 54-70.
- Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW (2007) *Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 146, 26-39.
- Kok BP, Kienesberger PC, Dyck JR, Brindley DN (2012) *Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (fld) mice*. J. Lipid Res. 53, 105-118.
- Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, Luiken JJ (2005) *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta 1736, 163-180.
- Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Tepavcevic S, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER (2009) *Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart*. Cell Biochem. Funct. 27, 102-110.
- Koricanac G, Tepavcevic S, Zakula Z, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Isenovic ER (2011) *Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase*. Eur. J. Pharmacol. 655, 23-30.

- Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DE (1993) *Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4*. *Biochem. J.* 295 (Pt 1), 287-293.
- Kukreja RC, Xi L (2007) *eNOS phosphorylation: a pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection?* *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 280-282.
- Laemmli UK (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227, 680-685.
- Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G (2004) *Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015, 250-260.
- Laybutt DR, Thompson AL, Cooney GJ, Kraegen EW (1997) *Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo*. *Am. J. Physiol.* 273, H1309-1316.
- Le Roith D, Zick Y (2001) *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance*. *Diabetes Care* 24, 588-597.
- Lee J, Xu Y, Lu L, Bergman B, Leitner JW, Greyson C et al. (2010) *Multiple abnormalities of myocardial insulin signaling in a porcine model of diet-induced obesity*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H310-319.
- Li P, Koike T, Qin B, Kubota M, Kawata Y, Jia YJ, Oshida Y (2008) *A high-fructose diet impairs Akt and PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle*. *Horm. Metab. Res.* 40, 528-532.
- Liao Q, Shi DH, Zheng W, Xu XJ, Yu YH (2010) *Antiproliferation of cardamonin is involved in mTOR on aortic smooth muscle cells in high fructose-induced insulin resistance rats*. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 179-186.
- Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C (2008) *Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals*. *Regul. Pept.* 150, 26-32.
- Liu CG, Xu KQ, Xu X, Huang JJ, Xiao JC, Zhang JP, Song HP (2007a) *17Beta-oestradiol regulates the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beta1-subunit, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase iv in H9C2 cells*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 998-1004.

- Liu HY, Zheng G, Zhu H, Woldegiorgis G (2007b) *Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo*. Arch. Biochem. Biophys. 465, 437-442.
- Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP (2004) *Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function*. Int. J. Cardiol. 97, 485-493.
- Livingstone C, Collison M (2002) *Sex steroids and insulin resistance*. Clin. Sci. (Lond.) 102, 151-166.
- Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F (2004) *Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models*. Curr. Atheroscler. Rep. 6, 180-185.
- Luiken JJ, Arumugam Y, Dyck DJ, Bell RC, Pelsers MM, Turcotte LP et al. (2001a) *Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats*. J. Biol. Chem. 276, 40567-40573.
- Luiken JJ, Coort SL, Koonen DP, van der Horst DJ, Bonen A, Zorzano A, Glatz JF (2004) *Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters*. Pflugers Arch. 448, 1-15.
- Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF (2003) *Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling*. Diabetes 52, 1627-1634.
- Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y et al. (2002) *Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36*. Diabetes 51, 3113-3119.
- Luiken JJ, Ouwens DM, Habets DD, van der Zon GC, Coumans WA, Schwenk RW et al. (2009) *Permissive action of protein kinase C-zeta in insulin-induced CD36- and GLUT4 translocation in cardiac myocytes*. J. Endocrinol. 201, 199-209.
- Luiken JJ, Turcotte LP, Bonen A (1999) *Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles*. J. Lipid Res. 40, 1007-1016.
- Luiken JJ, Willems J, van der Vusse GJ, Glatz JF (2001b) *Electrostimulation enhances FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake by isolated rat cardiac myocytes*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281, E704-712.



- Maher AC, Akhtar M, Tarnopolsky MA (2010) *Men supplemented with 17beta-estradiol have increased beta-oxidation capacity in skeletal muscle*. *Physiol. Genomics* 42, 342-347.
- Martin-Sanz P, Hopewell R, Brindley DN (1984) *Long-chain fatty acids and their acyl-CoA esters cause the translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosolic to the microsomal fraction of rat liver*. *FEBS Lett.* 175, 284-288.
- Massion PB, Balligand JL (2003) *Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice*. *J. Physiol.* 546, 63-75.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL (2003) *Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing*. *Circ. Res.* 93, 388-398.
- Massion PB, Pelat M, Belge C, Balligand JL (2005) *Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 142, 144-150.
- Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A (2003) *Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival*. *Cell Cycle* 2, 220-223.
- Matsui T, Rosenzweig A (2005) *Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 63-71.
- Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M et al. (2001) *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo*. *Circulation* 104, 330-335.
- Matyskova R, Zelezna B, Maixnerova J, Koutova D, Haluzik M, Maletinska L (2010) *Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet*. *Horm. Metab. Res.* 42, 182-186.
- Mauvais-Jarvis F (2011) *Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity*. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 24-33.
- McKay MM, Morrison DK (2007) *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. *Oncogene* 26, 3113-3121.

- Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LM (2011) *Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice*. J. Mol. Cell. Cardiol. 50, 1035-1043.
- Menard SL, Croteau E, Sarrhini O, Gelinas R, Brassard P, Ouellet R et al. (2010) *Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298, E1049-1057.
- Mendelsohn ME, Karas RH (1999) *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N. Engl. J. Med. 340, 1801-1811.
- Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M (2009) *Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen*. Mol. Cell. Endocrinol. 308, 9-16.
- Miatello R, Risler N, Castro C, Gonzalez S, Ruttler M, Cruzado M (2001) *Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats*. Am. J. Hypertens. 14, 1135-1141.
- Miatello R, Vazquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino AP, Risler N (2005) *Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats*. Am. J. Hypertens. 18, 864-870.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997a) *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin*. J. Biol. Chem. 272, 15583-15586.
- Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T (1997b) *Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem. 272, 25907-25912.
- Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S et al. (1999) *The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase*. Curr. Biol. 9, 845-848.
- Miller A, Adeli K (2008) *Dietary fructose and the metabolic syndrome*. Curr. Opin. Gastroenterol. 24, 204-209.
- Mitra MS, Schilling JD, Wang X, Jay PY, Huss JM, Su X, Finck BN (2011) *Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha/estrogen related receptor axis*. J. Mol. Cell. Cardiol. 51, 120-128.

- Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M (2007) *Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases*. Clin. Chim. Acta 375, 20-35.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ (2001) *Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179)*. J. Biol. Chem. 276, 30392-30398.
- Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ (2002) *Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells*. Mol. Endocrinol. 16, 1931-1942.
- Morel S, Berthonneche C, Tanguy S, Toufektsian MC, Foulon T, de Lorgeril M et al. (2003) *Insulin resistance modifies plasma fatty acid distribution and decreases cardiac tolerance to in vivo ischaemia/reperfusion in rats*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 30, 446-451.
- Moriarty K, Kim KH, Bender JR (2006) *Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling*. Endocrinology 147, 5557-5563.
- Morino K, Petersen KF, Shulman GI (2006) *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes 55 Suppl 2, S9-S15.
- Morisco C, Lembo G, Trimarco B (2006) *Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology*. Trends Cardiovasc. Med. 16, 183-188.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA (2007) *Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation*. J. Mol. Cell. Cardiol. 42, 271-279.
- Muller H, Deckers K, Eckel J (2002) *The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 665-669.
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2007) *Cardiovascular actions of insulin*. Endocr. Rev. 28, 463-491.
- Murphy E (2011) *Estrogen signaling and cardiovascular disease*. Circ. Res. 109, 687-696.

- Murphy E, Steenbergen C (2007) *Cardioprotection in females: a role for nitric oxide and altered gene expression*. Heart Fail. Rev. 12, 293-300.
- Naga Prasad SV, Perrino C, Rockman HA (2003) *Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure*. Trends Cardiovasc. Med. 13, 206-212.
- Narasimhan A, Sampath S, Jayaraman S, Karundevi B (2013) *Estradiol favors glucose oxidation in gastrocnemius muscle through modulation of insulin signaling molecules in adult female rats*. Endocr. Res. 38, 251-262.
- Nilsson S, Gustafsson JA (2002) *Biological role of estrogen and estrogen receptors*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 37, 1-28.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G et al. (2001) *Mechanisms of estrogen action*. Physiol. Rev. 81, 1535-1565.
- Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohe C (1999) *17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo*. Cardiovasc. Res. 43, 666-674.
- Nyby MD, Matsumoto K, Yamamoto K, Abedi K, Eslami P, Hernandez G et al. (2005) *Dietary fish oil prevents vascular dysfunction and oxidative stress in hyperinsulinemic rats*. Am. J. Hypertens. 18, 213-219.
- Obradovic M, Stewart AJ, Pitt SJ, Labudovic-Borovic M, Sudar E, Petrovic V et al. (2014) *In vivo effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase expression and activity in rat heart*. Mol. Cell. Endocrinol. 388, 58-68.
- Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC (2000) *Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor*. Biochemistry 39, 12103-12112.
- Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DD, Pelsers MM, El Hasnaoui M et al. (2007) *Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification*. Diabetologia 50, 1938-1948.
- Panchal SK, Brown L (2011) *Rodent models for metabolic syndrome research*. J. Biomed. Biotechnol. 2011, 351982.
- Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam MA, Diwan V et al. (2011) *High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 57, 611-624.

- Patten RD, Karas RH (2006) *Estrogen replacement and cardiomyocyte protection*. Trends Cardiovasc. Med. 16, 69-75.
- Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X et al. (2004) *17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling*. Circ. Res. 95, 692-699.
- Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, Vannan M, Levin ER (2008) *Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin*. Endocrinology 149, 3361-3369.
- Pessin JE, Saltiel AR (2000) *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J. Clin. Investig. 106, 165-169.
- Peterfy M, Harris TE, Fujita N, Reue K (2010) *Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes*. J. Biol. Chem. 285, 3857-3864.
- Petkovic M, Schiller J, Muller M, Benard S, Reichl S, Arnold K, Arnhold J (2001) *Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species*. Anal. Biochem. 289, 202-216.
- Power GW, Newsholme EA (1997) *Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle*. J. Nutr. 127, 2142-2150.
- Prakash P, Khanna V, Singh V, Jyoti A, Jain M, Keshari RS et al. (2011) *Atorvastatin protects against ischemia-reperfusion injury in fructose-induced insulin resistant rats*. Cardiovasc. Drugs Ther. 25, 285-297.
- Qin B, Polansky MM, Harry D, Anderson RA (2010) *Green tea polyphenols improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-resistant rats*. Mol. Nutr. Food Res. 54 Suppl 1, S14-23.
- Rask-Madsen C, Kahn CR (2012) *Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32, 2052-2059.

- Reue K, Brindley DN (2008) *Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism*. J. Lipid Res. 49, 2493-2503.
- Reue K, Dwyer JR (2009) *Lipin proteins and metabolic homeostasis*. J. Lipid Res. 50 Suppl, S109-114.
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P (2009) *Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice*. Endocrinology 150, 2109-2117.
- Ricchiuti V, Lian CG, Oestreicher EM, Tran L, Stone JR, Yao T et al. (2009) *Estradiol increases angiotensin II type 1 receptor in hearts of ovariectomized rats*. J. Endocrinol. 200, 75-84.
- Romic S, Tepavcevic S, Zakula Z, Milosavljevic T, Kostic M, Petkovic M, Koricanac G (2014) *Gender differences in the expression and cellular localization of lipin 1 in the hearts of fructose-fed rats*. Lipids 49, 655-663.
- Rose BA, Force T, Wang Y (2010) *Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale*. Physiol. Rev. 90, 1507-1546.
- Rutledge AC, Adeli K (2007) *Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms*. Nutr. Rev. 65, S13-23.
- Saini V (2010) *Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus*. World journal of diabetes 1, 68-75.
- Sale EM, Sale GJ (2008) *Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting*. Cell. Mol. Life Sci. 65, 113-127.
- Sales S, Ureshino RP, Pereira RT, Luna MS, Pires de Oliveira M, Yamanouye N et al. (2010) *Effects of 17beta-estradiol replacement on the apoptotic effects caused by ovariectomy in the rat hippocampus*. Life Sci. 86, 832-838.
- Saltiel AR, Pessin JE (2002) *Insulin signaling pathways in time and space*. Trends Cell Biol. 12, 65-71.
- Samuel VT (2011) *Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance*. Trends Endocrinol. Metab. 22, 60-65.
- Sanchez-Lozada LG, Le M, Segal M, Johnson RJ (2008) *How safe is fructose for persons with or without diabetes?* Am. J. Clin. Nutr. 88, 1189-1190.

- Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A (2005) *Molecular mechanisms of insulin resistance*. Diabet. Med. 22, 674-682.
- Schulster D, Burstein S, Cooke BA, 1976. *Mode of Action of Steroid Hormones*, Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones. John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 245-292.
- Schwenk RW, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF (2008) *Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease*. Cardiovasc. Res. 79, 249-258.
- Schwinger RH, Bundgaard H, Muller-Ehmsen J, Kjeldsen K (2003) *The Na, K-ATPase in the failing human heart*. Cardiovasc. Res. 57, 913-920.
- Seddon M, Shah AM, Casadei B (2007) *Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling*. Cardiovasc. Res. 75, 315-326.
- Sessa WC (2004) *eNOS at a glance*. J. Cell Sci. 117, 2427-2429.
- Sesti G (2006) *Pathophysiology of insulin resistance*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 665-679.
- Shamraj OI, Melvin D, Lingrel JB (1991) *Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1434-1440.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem. 150, 76-85.
- Soltys CL, Buchholz L, Gandhi M, Clanachan AS, Walsh K, Dyck JR (2002) *Phosphorylation of cardiac protein kinase B is regulated by palmitate*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283, H1056-1064.
- Song GY, Ren LP, Chen SC, Wang C, Liu N, Wei LM et al. (2012) *Similar changes in muscle lipid metabolism are induced by chronic high-fructose feeding and high-fat feeding in C57BL/J6 mice*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 39, 1011-1018.
- Stanhope KL, Havel PJ (2008) *Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance*. Curr. Opin. Lipidol. 19, 16-24.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL et al. (2009) *Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans*. J. Clin. Investig. 119, 1322-1334.

- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD (2005) *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. *Physiol. Rev.* 85, 1093-1129.
- Steinbusch LK, Schwenk RW, Ouwens DM, Diamant M, Glatz JF, Luiken JJ (2011) *Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes*. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2525-2538.
- Stevenson JC (2009) *Type and route of estrogen administration*. *Climacteric* 12 Suppl 1, 86-90.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet* 365, 1333-1346.
- Subbiah MT (2002) *Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 271-276.
- Sugaya A, Sugiyama T, Yanase S, Terada Y, Toyoda N (1999) *Glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA abundance in the adipose tissue and skeletal-muscle tissue of ovariectomized rats treated with 17 beta-estradiol or progesterone*. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 25, 9-14.
- Sugden PH (2003) *Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte*. *Circ. Res.* 93, 1179-1192.
- Sweeney G, Klip A (1998) *Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by insulin: why and how?* *Mol. Cell. Biochem.* 182, 121-133.
- Tagashira H, Bhuiyan S, Shioda N, Fukunaga K (2011) *Distinct cardioprotective effects of 17beta-estradiol and dehydroepiandrosterone on pressure overload-induced hypertrophy in ovariectomized female rats*. *Menopause* 18, 1317-1326.
- Takeuchi K, Reue K (2009) *Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1195-1209.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85-96.
- Tappy L, Le KA (2010) *Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity*. *Physiol. Rev.* 90, 23-46.
- Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N (2010) *Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions*. *Nutrition* 26, 1044-1049.



- Tarnopolsky MA (2000) *Gender differences in substrate metabolism during endurance exercise*. Can. J. Appl. Physiol. 25, 312-327.
- Tepavcevic S, Koricanac G, Zakula Z, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Isenovic ER (2011) *Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters*. Horm. Metab. Res. 43, 524-530.
- Therien AG, Blostein R (2000) *Mechanisms of sodium pump regulation*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 279, C541-566.
- Thirone AC, Huang C, Klip A (2006) *Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport*. Trends Endocrinol. Metab. 17, 72-78.
- Thirunavukkarasu V, Anitha Nandhini AT, Anuradha CV (2004) *Cardiac lipids and antioxidant status in high fructose rats and the effect of alpha-lipoic acid*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 14, 351-357.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH (2009) *The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension*. Mol. Cell. Biochem. 332, 145-159.
- Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M (2013) *Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective*. Metabolism. 62, 622-633.
- Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM (2006) *Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies*. Endocr. Rev. 27, 575-605.
- van den Brom CE, Huisman MC, Vlasblom R, Boontje NM, Duijst S, Lubberink M et al. (2009) *Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography*. Cardiovasc. Diabetol. 8, 39.
- Vasudevan H, Xiang H, McNeill JH (2005) *Differential regulation of insulin resistance and hypertension by sex hormones in fructose-fed male rats*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289, H1335-1342.
- Vazquez-Prieto MA, Gonzalez RE, Renna NF, Galmarini CR, Miatello RM (2010a) *Aqueous garlic extracts prevent oxidative stress and vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome*. J. Agric. Food Chem. 58, 6630-6635.

- Vazquez-Prieto MA, Renna NF, Lembo C, Diez ER, Miatello RM (2010b) *Dealcoholized red wine reverse vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome: role of NAD(P)H oxidase and eNOS activity*. Food & function 1, 124-129.
- Vazquez-Prieto MA, Rodriguez Lanzi C, Lembo C, Galmarini CR, Miatello RM (2011) *Garlic and onion attenuates vascular inflammation and oxidative stress in fructose-fed rats*. Journal of nutrition and metabolism 2011, 475216.
- Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ (1998) *Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway*. Cardiovasc. Res. 40, 96-102.
- Ventura EE, Davis JN, Goran MI (2011) *Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content*. Obesity (Silver Spring) 19, 868-874.
- Vikrant V, Grover JK, Tandon N, Rathi SS, Gupta N (2001) *Treatment with extracts of Momordica charantia and Eugenia jambolana prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats*. J. Ethnopharmacol. 76, 139-143.
- Wang L, Gout I, Proud CG (2001) *Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes*. J. Biol. Chem. 276, 32670-32677.
- Wang X, Abdel-Rahman AA (2002) *Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 282, H2309-2315.
- Weis BC, Esser V, Foster DW, McGarry JD (1994) *Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme*. J. Biol. Chem. 269, 18712-18715.
- Welch RD, Gorski J (1999) *Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus*. Endocrinology 140, 3602-3608.
- Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE (2000) *Signalling through the insulin receptor*. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 222-228.

- Xi L, Qian Z, Xu G, Zheng S, Sun S, Wen N et al. (2007) *Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose-fed rats*. J. Nutr. Biochem. 18, 64-72.
- Xie P, Liu ML, Gu YP, Lu J, Xu X, Zeng WM, Song HP (2003) *Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 30, 643-648.
- Yadav H, Jain S, Prasad GB, Yadav M (2007) *Preventive effect of diabegon, a polyherbal preparation, during progression of diabetes induced by high-fructose feeding in rats*. J. Pharmacol. Sci. 105, 12-21.
- Ye J (2013) *Mechanisms of insulin resistance in obesity*. Frontiers of medicine 7, 14-24.
- Zakula Z, Koricanac G, Tepavcevic S, Stojiljkovic M, Milosavljevic T, Isenovic ER (2011) *Impairment of cardiac insulin signaling in fructose-fed ovariectomized female Wistar rats*. Eur. J. Nutr. 50, 543-551.
- Zammit VA (2008) *Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function*. IUBMB Life 60, 347-354.
- Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ (2000) *Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells*. Circulation 101, 1539-1545.
- Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, Wang W, Lopaschuk GD (2010) *Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta 1801, 1-22.
- Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS (2011) *Cardioprotection induced by Na(+)/K(+)-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway*. Cardiovasc. Res. 89, 51-59.
- Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H et al. (1997) *Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes*. Am. J. Cardiol. 80, 65A-76A.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Snježana Đ. Romić rođena je 18. novembra 1984. godine u Bihaću, Bosna i Hercegovina. Nakon završetka osnovnog i srednjeg obrazovanja, školske 2003/2004. upisala je studije na smeru za Diplomiranog hemičara – Biohemičara, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Diplomirala je 2008. godine, odbranom diplomskog rada pod naslovom “Sinteza mono- i diketo derivata deoksiholne kiseline i ispitivanje njihovog hidrofilno–hidrofobnog balansa,,. Prosečna ocena tokom studija bila je 9,37, a ocena na diplomskom ispitu 10. Školske 2010/2011. godine upisala je doktorske studije na smeru Animalna i humana fiziologija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Od 1. septembra 2010. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ i od tada je uključena u istraživanja koja su fokusirana na oblast interakcija insulina i estrogenih hormona na nivou molekula signalnih puteva uključenih u regulaciju ćelijskih procesa. Trenutno je angažovana na projektu „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“ (Br. 41009), koji je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Matić. U zvanje isatrživač–saradnik izabrana je 2012. godine.

Do sada je publikovala 6 radova u međunarodnim naučnim časopisima, poglavlje u međunarodnoj monografiji i 2 saopštenja u zbornicima sa međunarodnih naučnih skupova. U periodu april–jul 2014. godine boravila je na Institutu za eksperimentalnu endokrinologiju u Bratislavi, Slovačka, kao stipendista *The National Scholarship Programme of the Slovak Republic*.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Сњежана Ђ. Ромић

број индекса Б3062/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Ефекти естрадиола у срцу пацова са инсулинском резистенцијом  
изазваном исхраном богатом фруктозом“**

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.03.2015.

Ромић Сњежана

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сњежана Ђ. Ромић

Број индекса Б3062/2010

Студијски програм Биологија – Анимална и хумана физиологија

Наслов рада "Ефекти естрадиола у срцу пацова са инсулинском резистенцијом  
изазваном исхраном богатом фруктозом"

Ментор др Горан Корићанац, научни саветник, Институт за нуклеарне науке  
„Винча“, Универзитет у Београду

Др Небојша Јаснић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у  
Београду

Потписани/а Сњежана Ђ. Ромић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 30.03.2015.

Romic' Snjezana

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

**„Ефекти естрадиола у срцу пацова са инсулинском резистенцијом изазваном исхраном богатом фруктозом“**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 30.03.2015.

*Romica Stjepan*

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.