

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Mojca D. Stojiljković

**Efekat eksperimentalnog  
dijabetesa tipa 1 i supstitucione terapije  
na molekule regulisane insulinom u  
srcu pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

mr Mojca D. Stojiljković

**The effect of experimentally induced  
Type 1 diabetes and insulin replacement  
therapy on insulin signalling pathways  
in the rat heart**

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

**Mentori:**

**Dr Zorica Žakula**, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Dr Jelena Đorđević**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u  
Beogradu, Beograd, Srbija

**Članovi komisije:**

**Dr Zorica Žakula**, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Dr Jelena Đorđević**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u  
Beogradu, Beograd, Srbija

**Dr Snežana Tepavčević**, naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

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

**Mentors:**

**Dr Zorica Žakula**, Senior Research Associate, Institute for Nuclear Science „Vinča“, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**Dr Jelena Đorđević**, Full Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**Committee members:**

**Dr Zorica Žakula**, Senior Research Associate, Institute for Nuclear Science „Vinča“, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**Dr Jelena Đorđević**, Full Profesor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**Dr Snežana Tepavčević**, Research Associate, Institute for Nuclear Science „Vinča“, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Defense date: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” pod neposrednim rukovodstvom dr Zorice Žakula u okviru projekta „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije” koji je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Želela bih da izrazim svoju zahvalnost svima koji su na bilo koji način, posredno ili neposredno, doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem članovima komisije:

Mentoru **dr Zorici Žakula**, na definisanju sadržaja i forme ove doktorske disertacije, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom eksperimentalnog rada i tokom pisanja disertacije. Hvala za pruženo znanje, požrtvovanost i strpljenje tokom našeg zajedničkog rada.

Mentoru **dr Jeleni Đorđević**, na korektnoj saradnji, na sugestijama i pomoći u diskusiji rezultata ove disertacije.

**Dr Snežani Tepavčević**, na velikoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela ovog rada i tokom pisanja doktorske disertacije. Hvala na korisnim sugestijama, prijateljskim savetima i podršci koju mi je pružila od početka našeg zajedničkog rada. Hvala na svemu.

**Dr Esmi Isenović**, koja je rukovođila projektom 143030 na kome je i započeta izrada ove disertacije, zahvaljujem se na stručnoj pomoći i savetima tokom eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem kolegi **dr Goranu Korićancu**, na neprocenjivoj pomoći u eksperimentalnom radu i na dragocenim sugestijama u diskusiji rezultata ove disertacije. Koleginici **dr Tijani Čulafić**, zahvaljujem se na pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela ovog rada i tehničkoj pomoći prilikom finalizacije disertacije. Hvala na podršci i prijateljsvu u trenucima kada je to bilo potrebno, kao i na prijatnoj atmosferi tokom svih ovih godina. Koleginici **Snježani Romić** zahvaljujem se na prijateljskoj pomoći i savetima.

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.

Veliko hvala suprugu Aleksandru i ćerki Zorici na razumevanju, podršci i ljubavi. Bez tebe i Zoi bi sve bilo teže.

Hvala mojim roditeljima, Dragoslavu i Mariji-Magdaleni, i bratu Milošu na podršci svih ovih godina.

Beograd, mart 2014.

## Efekat eksperimentalnog dijabetesa tipa 1 i supstitucione terapije na molekule regulisane insulinom u srcu pacova

### REZIME

Insulinska deficijencija i hiperglikemija, koje predstavljaju osnovne karakteristike dijabetesa tipa 1, povezane su sa brojnim endokrinim i metaboličkim promenama, a jedna od najčešćih komplikacija je povećana učestalost nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Zbog toga je rana i adekvatna primena terapije insulinom neophodna, kako za kontrolu bolesti, tako i za prevenciju potencijalnih komplikacija.

Polazna hipoteza istraživanja čiji su rezultati obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom je bila da u stanju hipoinsulinemije i hiperglikemije može doći do promena u signalnom putu insulina u srcu, što može da se odrazi na produkciju azot-monoksida i iskorišćavanje energetske supstrate, a da bi supstitucija insulinom trebala da koriguje nastale promene.

Za uspostavljanje eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 1, mužjaci pacova soja *Wistar* tretirani su streptozotocinom (60 mg/kg). Poznato je da se akutni dijabetes javlja između osmog dana i tri nedelje, a hronični 3 nedelje nakon tretmana streptozotocinom. Životinje sa dijabetesom su ili bile netretirane 2 nedelje ili podvrgnute subhroničnom tretmanu insulinom (3 IU) u trajanju od 7 dana. Za analizu su selektirani signalni molekuli Akt i ERK koji predstavljaju medijatore gotovo svih efekata insulina u srcu. Osim toga analizirani su i efektni molekuli regulisani preko aktivacije signalnih puteva Akt i ERK, kao što su eNOS i iNOS, uključeni u sintezu azot-monoksida, kao i transporteri glukoze GLUT1 i GLUT4 i transporter masnih kiselina CD36. Ispitivana je ekspresija ovih molekula na nivou gena i proteina i/ili fosforilacija, kao i unutarćelijska lokalizacija transportera za glukozu i masne kiseline u srcu.

Poznato je da je kompeticija između arginaze i NOS za zajednički supstrat L-arginin, ograničavajući faktor za proizvodnju azot-monoksida. U

akutnoj fazi streptozotocinom izazvanog dijabetesa u srcu pacova zapaženo je povećanje aktivnosti enzima arginaze što je praćeno smanjenjem koncentracije L-arginina. Supstitucija insulinom je smanjila aktivnost arginaze i povećala koncentraciju L-arginina, što ukazuje na značajan regulatorni efekat insulina na aktivnost arginaze. Tretman streptozotocinom je doveo do smanjenja fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup>, i povećanja nivoa iRNK i proteina iNOS u srcu pacova. Supstitucija insulinom je vratila nivo fosforilacije eNOS i nivo proteina iNOS na kontrolni. Iz ovih rezultata proizilazi da je u stanju dijabetesa pomeren ravnoteža ka korišćenju L-arginina od strane arginaze, a da je tretman insulinom uspostavio normalnu aktivnost NOS.

Kod pacova sa dijabetesom došlo je do smanjenja nivoa iRNK za Akt i fosforilacije na Ser<sup>473</sup>, kao i fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>. Supstitucija insulinom je vratila nivo iRNK za Akt i fosforilaciju na nivo kontrole, međutim nije imala efekta na kinaznu aktivnost ERK1/2. Može se zaključiti da u stanju dijabetesa dolazi do promena u oba signalna puta, a da je tretman insulinom bio uspešan samo u ispravljanju promena u PI3K/ Akt putu.

Insulin je uključen u regulaciju metabolizma ugljenih hidrata i lipida u srcu. U dijabetesu dolazi do metaboličkih odstupanja u korišćenju energetskih supstrata, što rezultira u smanjenom preuzimanju glukoze i povećanom korišćenju masnih kiselina. Ekspresija gena i nivo proteina GLUT4 i GLUT1 su bili smanjeni u srcu pacova sa dijabetesom, a tretman insulinom je uglavnom vratio njihovu ekspresiju na nivo kontrole. Tretman streptozotocinom je smanjio nivo proteina GLUT4 i GLUT1 u frakciji plazma membrana, bez promene u citoplazmatskoj frakciji. Supstitucija insulinom povećala je nivo proteina oba transportera za glukozu u citoplazmatskoj frakciji, ali nije uticala na smanjen nivo u frakciji plazma membrana. Analiza transportera za masne kiseline je pokazala da je ekspresija gena za CD36 bila povećana u srcu pacova sa dijabetesom kao i nivo proteina u frakciji plazma membrana, što je praćeno smanjenjem nivoa ovog transportera u citoplazmatskoj frakciji. Tretman hormonom je vratio nivo iRNK za CD36 na nivo kontrole, kao i nivo proteina u



citoplazmatskoj frakciji, ali nije uticao na povećan nivo u frakciji plazma membrana. Sumirano, rezultati ukazuju da se u stanju dijabetesa srce skoro u potpunosti oslonilo na korišćenje masnih kiselina, dok je preuzimanje glukoze smanjeno. Tretman insulinom je uspeo da normalizuje ekspresiju, ali ne i nivo transportera na plazma membrani.

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, može se zaključiti da u stanju akutnog dijabetesa tipa 1 dolazi do promena u signalnom putu insulina na nivou ekspresije i/ili aktivnosti kinaza PKB/Akt i ERK1/2, što se odrazilo i na nishodne efektorne molekule u srcu. Iako supstitucija insulinom ispravlja većinu promena u aktivaciji i/ili ekspresiji ispitivanih molekula u srcu nastalih nakon izazivanja dijabetesa (Akt, NOS, GLUT4, GLUT1 i CD36), uočene promene u nivou transportnih proteina za glukozu i masne kiseline u plazma membrani nisu u potpunosti ispravljene.

S obzirom da je insulinska terapija primarna terapijska strategija u lečenju dijabetesa tipa 1, naši rezultati ukazuju da insulin sam po sebi nije dovoljan da ispravi sve metaboličke promene koje su nastale u srcu. Stoga membranski proteini koji učestvuju u transportu glukoze i masnih kiselina mogu predstavljati potencijalna mesta za primenu dodatnih terapeutika u lečenju dijabetesa, u pravcu uspostavljanja metaboličke homeostaze u srcu.

**Ključne reči:** dijabetes tipa 1; insulin; srce; Akt; ERK1/2; arginaza; NOS; GLUT4; GLUT1; CD36

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna endokrinologija

**UDK broj:** 616.379-008.64:[577.175.72: [591.412:636.028]](043.3)

## **The effect of experimentally induced Type 1 diabetes and insulin replacement therapy on insulin signalling pathways in the rat heart**

### **ABSTRACT**

Insulin deficiency and hyperglycemia, which are the main features of Type 1 diabetes are associated with a number of endocrine and metabolic disorders and one of the most common complications is the increased incidence of cardiovascular diseases. Therefore, appropriate insulin replacement therapy is necessary in order to control the disease, as well as for the prevention of potential complications.

We hypothesized that insulin deficiency and hyperglycemia may lead to changes in cardiac insulin signalling pathway which consequently may result in changes in nitric oxide production and utilization of energy substrates, and that insulin replacement is required to correct the changes.

To induce experimental Type 1 diabetes, male *Wistar* rats were injected intraperitoneally with streptozotocin (65 mg/kg). Acute diabetes was reported to occur between 8 days and 3 weeks, and chronic diabetes within 3 weeks after streptozotocin administration. Diabetic animals were either maintained untreated, or treated with insulin (3 IU) daily for a week. For analysis, intracellular signaling molecules Akt and ERK1/2 were selected, which are important intermediary of almost all effects of insulin in the heart. Furthermore we analyzed effector molecules which are regulated through activation of Akt and ERK signaling pathways, such as eNOS and iNOS, involved in the synthesis of nitric oxide, as well as glucose transporter GLUT1 and GLUT4 and transporter of fatty acids CD36. In the present study we examined the expression and/or phosphorylation of the molecules, as well as the subcellular localization of the transporters for glucose and fatty acid in the heart.

It is known that the competition between arginase and NOS for a common substrate L-arginine is a limiting factor for the production of nitric

oxide. In acute phase of streptozotocin induced diabetes we observed decreased L-Arg concentration at the time when cardiac arginase activity was markedly augmented. Insulin treatment reduced the elevated arginase activity, as well as increased L-arginin concentration, indicating an important regulatory effect of insulin on arginase enzymatic activity. Streptozotocin treatment decreased cardiac eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> and increased iNOS protein and mRNA expression, that were restored to control level after subchronic insulin replacement. It follows that in acute phase of Type 1 diabetes there is a shift towards metabolism of L-arginin and insulin treatment restored NOS activity. Akt mRNA expression and phosphorylation at Ser<sup>473</sup> as well as ERK1/2 protein phosphorylation were decreased in diabetic rats. Insulin replacement restored Akt mRNA expression and phosphorylation to control level but had no effects on ERK1/2 protein phosphorylation. It can be concluded that in diabetic heart both signalling pathways are changed, but insulin treatment successful restore only PI3K/Akt.

Insulin is involved in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism in the heart. In diabetes, the metabolic changes occur in the use of energy substrates, which results in a reduced glucose uptake and increased fatty acids utilization. Diabetes has effects on redistribution of transporters from intracellular vesicles to the plasma membrane. GLUT4 and GLUT1 protein/mRNA expression were decreased in diabetic rat hearts and insulin treatment restored GLUT1 expression and GLUT4 protein level. Streptozotocin treatment decreased GLUT4 and GLUT1 protein level on plasma membranes without changes in cytosol fraction. Insulin replacement augmented glucose transporters in cytoplasm but the protein level on plasma membrane remained decreased. The mRNA expression of fatty acid transporter CD36 was increased as well as protein level on plasma membrane, which is accompanied by the protein reduction in cytosol. Insulin treatment restored CD36 mRNA expression and protein level in cytosol but the CD36 protein level on plasma membrane remained increased. Results indicate that diabetic heart

completely depends on fatty acid utilization while glucose uptake was reduced and hormone replacement was able to normalize the expression, but not the level of the transporters on plasma membrane.

In conclusion, these results indicate that PKB/Akt and ERK1/2 expression and/or activity as well as downstream target molecules are altered during streptozotocin-induced diabetes in the heart. However, although insulin replacement corrected most of the alterations induced by diabetes in the rat heart (Akt, NOS, GLU4, GLUT1 and CD36), the levels of glucose and fatty acid transporters on plasma membrane were incompletely restored. Since, insulin therapy is the primary therapeutic strategy in the treatment of Type 1 diabetes, the results also suggest that insulin alone is not sufficient to correct all metabolic changes in the heart. Thus, membrane proteins participating in the transport of glucose and fatty acids may represent a potential targets for additional therapeutic in the treatment of diabetes, to restore cardiac metabolic homeostasis.

**Key words:** Type 1 diabetes; insulin; heart; Akt; ERK1/2; arginase; NOS; GLUT4; GLUT1; CD36

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Molecular endocrinology

**UDC number:** 616.379-008.64:[577.175.72: [591.412:636.028]](043.3)

## SKRAĆENICE

AMPK	protein kinaza aktivirana AMP-om (engl. <i>AMP-activated protein kinase</i> )
AP-1	aktivirajući protein 1 (engl. <i>activator protein 1</i> )
APS	adapterni protein sa domenima homologim plekstrinu i Src
AS160	Akt supstrat 160 (engl. <i>Akt substrate of 160 kDa</i> )
ATP	adenozin-trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterin
cAMP	ciklični adenzin-monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CAP	protein asociran sa Cbl (engl. <i>Cbl associated protein</i> )
cGMP	ciklični guanozin-monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CL	kardiolipin (engl. <i>cardiolipin</i> )
DAG	diacil-glicerol
eNOS	endotelna sintaza azot monoksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ERK	kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima (engl. <i>extracellular signal-regulated protein kinases</i> )
FABP	protein plazma membrane koji vezuje masne kiseline (engl. <i>fatty-acid-binding protein</i> )
FAD	flavin adenin dinukleotid
FAT/CD36	translokaza masnih kiselina (engl. <i>fatty acid translocase</i> )
FATP	familija transportnih proteina za masne kiseline (engl. <i>fatty-acid transport protein</i> )
FFA	slobodne masne kiseline (engl. <i>free fatty acid</i> )
FMN	flavin mononukleotid
GLUT	familija transportera za glukozu (engl. <i>glucose transporters</i> )
GLUT1	transporter za glukozu tipa 1 (engl. <i>glucose transporter type 1</i> )
GLUT4	transporter za glukozu tipa 4 (engl. <i>glucose transporter 4</i> )

Grb2	protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta (engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> )
GSK-3	kinaza glikogen sintaze 3 (engl. <i>glycogen synthase kinase 3</i> )
GTP-aza	guanozin-trifosfataza (engl. <i>guanosine triphosphatase</i> )
Hsp90	protein toplotnog stresa 90 (engl. <i>heat shock protein 90</i> )
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$ (engl. <i>interferon gamma</i> )
iNOS	inducibilna sintaza azot monoksida (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
IR	receptor za insulin (engl. <i>insulin receptor</i> )
IRS	familija supstrata receptora za insulin (engl. <i>insulin receptor substrate</i> )
Jak/Stat	put Janus kinaze i signalnog prenosioca i aktivatora transkripcije (engl. <i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i> )
JNK	c-Jun N-terminalne kinaze (engl. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> )
LPL	lipoproteinska lipaza (engl. <i>lipoprotein lipase</i> )
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MEK	MAPK kinaza (engl. <i>MAPK kinase</i> )
mTOR	ciljni molekul za rapamicin kod sisara (engl. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF $\kappa$ B	nuklearni faktor- $\kappa$ B (engl. <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> )
nNOS	neuralna sintaza azot monoksida (engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NO	azot-monoksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
p38	protein kinaze aktivirane mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
PDK1	kinaza tipa 1 zavisna od PIP3 (engl. <i>PIP3-dependent kinase 1</i> )
PH	plekstrinski homologni domen (engl. <i>pleckstrin homology domain</i> )
PI	fosfatidilinozitol
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PIP3	fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat

PKA	protein kinaza A (engl. <i>protein kinase A</i> )
PKB	protein kinaza B (engl. <i>protein kinase B</i> )
PKC	protein kinaza C (engl. <i>protein kinase C</i> )
PKG	protein kinaza G (engl. <i>protein kinase G</i> )
PM	frakcija plazma membrana
PPAR- $\alpha$	$\alpha$ receptor koji aktivira proliferaciju peroksizoma (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> )
Raf	serin/treonin-specifična kinaza
Ras	mala guanozin trifosfataza
ROS	reaktivne vrste kiseonika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
Ser	serin
Shc	protein koji sadrži SH2-domen homolog Src (engl. <i>Src homology 2 domain containing protein</i> )
TG	trigliceridi
Thr	treonin
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora- $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor a</i> ),
Tyr	tirozin
VSMC	vaskularne glatke mišićne ćelije (engl. <i>vascular smooth muscle cells</i> )

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Molekularni mehanizam delovanja insulina .....</b>	<b>4</b>
1.1.1.	Receptor za insulin .....	5
1.1.2.	Signalni put PI3K/AKT .....	7
1.1.3.	Signalni put MAPK .....	9
<b>1.2.</b>	<b>Uloga signalnog puta insulina u regulaciji ćelijskih procesa u srcu ..</b>	<b>10</b>
1.2.1.	Azot-monoksid i uloga eNOS i iNOS u srcu .....	11
1.2.2.	Uloga arginaze u regulaciji NOS.....	18
1.2.3.	Transport energetske supstrate u srcu.....	20
1.2.3.1.	Metabolizam u srcu u fiziološkim uslovima .....	20
1.2.3.2.	Uloga insulina u transportu glukoze i masnih kiselina .....	22
1.2.3.3.	Transport glukoze.....	23
1.2.3.4.	Transport masnih kiselina .....	26
1.2.3.5.	Unutarćelijski depoi transportera za glukozu i masne kiseline	30
1.2.3.6.	Promene metabolizma u srcu tokom dijabetesa .....	31
<b>2.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>35</b>
3.1.	Hemikalije .....	35
3.2.	Eksperimentalne životinje .....	37
3.3.	Određivanje koncentracije glukoze u krvi .....	39
3.4.	Određivanje koncentracije insulina u plazmi.....	39
3.5.	Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi .....	40



3.6.	Određivanje koncentracije nitrita i nitrata kao indikatora stvaranja NO u plazmi .....	40
3.7.	Određivanje koncentracije L-arginina .....	41
3.8.	Određivanje aktivnosti arginaze.....	42
3.9.	Određivanje koncentracije proteina.....	43
3.10.	Priprema ćelijskog lizata srca .....	44
3.11.	Izolovanje citoplazmatske i membranske proteinske frakcije iz tkiva srca .....	44
3.12.	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) .....	45
3.13.	„Western blot“ analiza .....	46
3.14.	RT-PCR.....	48
3.14.1.	Izolacija RNK.....	48
3.14.2.	Reverzna transkripcija .....	49
3.14.3.	Semi-kvantitativan PCR.....	49
3.15.	Statistička obrada rezultata .....	51
4.	REZULTATI .....	52
4.1.	Mase tela i srca pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom .....	52
4.2.	Koncentracija glukoze, insulina i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji .....	53
4.3.	Koncentracija ukupnog NO u plazmi pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom .....	55
4.4.	Koncentracija L-arginina i aktivnost enzima arginaze u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom .....	56

4.5.	Ekspresija eNOS i iNOS u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom .....	58
4.6.	Ekspresija i fosforilacija Akt u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom .....	62
4.7.	Nivo proteina i fosforilacije ERK1/2 u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom.....	65
4.8.	Ekspresija i lokalizacija transportera GLUT4 i GLUT1 u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom.....	67
4.9.	Ekspresija i lokalizacija transportera CD36 u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom .....	73
5.	DISKUSIJA.....	76
5.1.	Regulacija sinteze azot-monoksida u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom.....	79
5.2.	Regulacija molekula signalog puta insulina u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom .....	87
5.3.	Ekspresija i translokacija transportera za glukozu i masne kiseline u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom.....	92
6.	ZAKLJUČCI .....	103
7.	LITERATURA.....	106

## PRILOZI

## 1. UVOD

Dijabetes melitus (*Diabetes mellitus*) je grupa metaboličkih oboljenja koje karakteriše hiperglikemija, a rezultat je defekta u insulinskoj sekreciji, insulinskom delovanju ili oba (American Diabetes Association, 2012). Hronična hiperglikemija u dijabetesu je povezana sa dugoročnim oštećenjima, disfunkcijom i propadanjem različitih organa, posebno očiju, bubrega, nerava, srca i krvnih sudova (American Diabetes Association, 2012). Najveći broj slučajeva dijabetesa može da se podeli u dve kategorije. Dijabetes tipa 1, nastaje usled potpunog deficita sekrecije insulina. Uzrok mnogo češćeg dijabetesa tipa 2, je kombinacija rezistencije na delovanje insulina i neadekvatan kompenzatorni odgovor sinteze insulina (American Diabetes Association, 2012). Dijabetes se smatra jednom od najvećih pretnji za svetsko zdravlje, koja počinje da dobija proporcije epidemije u industrijalizovanim zemljama. Procenjuje se da dijabetes melitus pogađa 6% populacije a od svih registrovanih slučajeva dijabetesa, 10% je dijabetes tipa 1 sa velikim razlikama u incidenci ovog oboljenja (Severson, 2004). Skoro 40% pacijenata sa dijabetesom razvija sekundarne komplikacije, koje prvenstveno nastaju zbog stalne hiperglikemije (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; United Kingdom Prospective Diabetes Study, 1995)

Dijabetes tipa 1 (insulin-zavisan dijabetes) je bolest uzrokovana autoimunskim razaranjem  $\beta$  ćelija pankreasa, koje proizvode insulin, usled čega dolazi do pojave insulinske deficijencije. Radi se o metaboličkom poremećaju kod koga je cirkulišući insulin praktično odsutan, glukagon povišen, a  $\beta$ -ćelije pankreasa ne mogu da odgovore ni na jedan stimulus. U odsustvu insulina glavna ciljna tkiva ovog hormona (jetra, mišići i masno tkivo) ne samo da ne

mogu da apsorbuju hranljive sastojke, već iz svojih depoa oslobađaju glukozu, aminokiseline i masne kiseline u krvotok. Nivo glukoze u krvi postaje prekomerno visok i nastaje hiperglikemija. Ovakvo stanje može biti prekinuto samo davanjem insulina, odnosno zahteva doživotnu hormonsku terapiju.

Postoje teorije da dijabetes tipa 1 može nastati kao posledica infektivnih ili toksičnih faktora spoljašnje sredine, koje kod genetski predisponirane osobe aktiviraju imunski sistem koji uništava  $\beta$ -ćelije pankreasa. Faktori spoljašnje sredine uključuju viruse (zauške, rubeole, koksaki B virus) (Fairweather i Rose, 2002), toksične hemijske agense i citotoksine, kao što je hidrogen-cijanid.

Dijabetes tipa 1 se može pojaviti u bilo kojoj dobi, ali najčešće u doba detinjstva i adolescencije pa se često naziva i juvenilnim i mladalačkim dijabetesom. Najveća učestalost dijabetesa tip 1 je od jedanaeste do trinaeste godine života, što se povezuje sa povećanim lučenjem hormona rasta i polnih hormona u navedenom periodu, a poznato je da oni imaju dejstvo suprotno insulinu. Proces propadanja  $\beta$  ćelija koje proizvode insulin može biti dugotrajan i asimptomski. Međutim, kada se proizvodnja insulina smanji na minimum, dijabetes tipa 1 se obično naglo pojavi i brzo napreduje. Klasični simptomi su: poliurija (prekomerno lučenje mokraće), nokturija (učestalo noćno mokrenje), polidipsija (pojačana žeđ), a kod dece se može pojaviti enureza (nevoljno mokrenje), pomućenje vida, polifagija (pojačan apetit), gubitak težine (uprkos normalnom ili povećanom apetitu), umor, slabost, ortostatska (posturalna) hipotenzija i dr. Dijabetes tipa 1 je uzrok brojnih komplikacija koje dovode do invaliditeta, kao i do povećanog morbiditeta i mortaliteta. Najčešće komplikacije koje se javljaju u dijabetesu su:

- dijabetesna nefropatija, oboljenje bubrega koje se uvek javlja obostrano i može da dovede do oštećenja bubrežne funkcije, uremije tj. povećane koncentracije uree u krvi, i nekada do uremijske kome;

- dijabetesna neuropatija, oštećenje perifernih nerava, koje utiče na rad unutrašnjih organa kao i na smanjen ili izgubljen osećaj za dodir i bol, naročito u rukama i nogama;

- dijabetesna retinopatija, nastaje usled izražene mikroangiopatije (oštećenja kapilara) u mrežnjači i vremenom dovodi do oštećenja vida, a u najtežim slučajevima može da dođe i do slepila.

Bolesti srca i krvnih sudova, uključujući aterosklerozu, infarkt miokarda i srčanu insuficijenciju su česte komplikacije kod svih oblika dijabetesa. Među 3,8 miliona smrtnih slučajeva od kardiovaskularnih bolesti, 2/3 se mogu pripisati kardiovaskularnim komplikacijama koje se javljaju u dijabetesu (<http://www.eatlas.idf.org>). Dijabetes tipa 1 povećava rizik nastanka kardiovaskularnih oboljenja više od deset puta, u odnosu na opštu populaciju (Libby i sar., 2005). Ekperimentalne i kliničke studije su pokazale da dijabetes dovodi do specifične dijabetesne kardiomiopatije, nezavisne od vaskularnih komplikacija (Galderisi i sar., 1991; Severson, 2004). Ovu kardiomiopatiju karakterišu strukturna, metabolička i funkcionalna oštećenja srca, sa velikom incidencom nastanka srčanih disfunkcija i smrtnosti, kako kod dijabetesa tipa 1, tako i kod dijabetesa tipa 2. U dijabetesnoj kardiomiopatiji dolazi do povećane kontraktilnosti, dijastolične disfunkcije, smanjenog srčanog minutnog volumena, hipertrofije i fibroze. Kardiomiociti ispoljavaju tipične dijabetesom-indukovane biohemijske defekte, kao što je smanjenje iskorišćavanja glukoze tokom ishemije, smanjenje stimulacije sinteze glikogena insulinom, povećanje oksidacije masnih kiselina, promene ekspresije  $\alpha$  i  $\beta$  teških lanaca miozina (Laviola i sar., 2001).

Insulin ima važnu ulogu u regulaciji metaboličkih procesa u srcu: kontroliše transport glukoze, sintezu glikogena, glikolizu, oksidaciju masnih kiselina (Brownsey i sar., 1997), sintezu proteina, kontraktilnost, apoptozu. U ćelijama srca insulin utiče na transmembranski transport jona i ekspesiju gena koji su uključeni u ćelijski rast i diferencijaciju (Brownsey i sar., 1997). Promene i poremećaji u insulinskom delovanju, koje se javljaju u dijabetesu, imaju veoma izražene efekte na srčane funkcije.

Mnoge studije su pokazale da su promene u insulinskom signalnom putu u srcu povezane sa oslabljenim transportom glukoze (Marwick, 2006).

Zapravo, više od 64% pacijenata sa dijabetesom tipa 1 i 34% pacijenata sa dijabetesom tipa 2 ima neadekvatan transport glukoze u srce (Meyer i Schwaiger, 1997) i te promene doprinose razvoju bolesti miokarda u dijabetesu (Marwick, 2006).

### **1.1. Molekularni mehanizam delovanja insulina**

Insulin je peptidni hormon koji sintetišu i izlučuju  $\beta$  ćelije endokrinog pankreasa, i koji direktno ili indirektno utiče na funkciju većine tkiva. Insulin se luči u odgovoru na povećanu koncentraciju glukoze u cirkulaciji. Ovaj metabolički signal usmerava metabolizam glukoze do piruvata i detektuje se aktivnošću enzima heksokinaze, koja katalizuje produkciju glukozo-6-fosfata. Ovo inicira signal oslobađanja insulina egzocitozom, koji uključuje povećanje adenzin-trifosfata (ATP, engl. *adenosine triphosphate*), zatvaranje  $K^+$  kanala, depolarizaciju i otvaranje  $Ca^{2+}$  kanala. Proces je vrlo brz i sekrecija insulina se dešava u okviru jednog minuta nakon izlaganja glukozi (Nussey i Whitehead, 2001). U krvi se insulin nalazi u slobodnom obliku, odnosno ne postoje specifični proteini plazme za koje se vezuje, pa je zbog toga njegov poluživot kratak i iznosi 4–6 minuta (Duckworth, 1988; Duckworth i sar., 1998).

Insulin je najpotentniji fiziološki anabolički agens, koji podstiče skladištenje i sintezu lipida, proteina i ugljenih hidrata i inhibira njihovu razgradnju i oslobađanje u cirkulaciju (Chang i sar., 2004). Insulin primarno reguliše koncentraciju glukoze u krvi, tako što povećava ulazak glukoze u ćelije mišića i masnog tkiva, a inhibira produkciju glukoze u jetri (smanjenjem glukoneogeneze i glikogenolize) (Saltiel i Kahn, 2001). Takođe, insulin utiče na metabolizam lipida, povećava njihovu sintezu u jetri i adipocitima smanjujući oslobađanje masnih kiselina iz masnog tkiva (Sesti, 2006). Stimulišući lipogenezu, sintezu glikogena i proteina i inhibirajući lipolizu, glikogenolizu i razgradnju proteina, insulin stimuliše ćelijski rast i diferencijaciju, i podstiče

skladištenje supstrata u masnom tkivu, jetri i mišićima (Saltiel i Kahn, 2001). Insulin povećava ulazak glukoze u ćelije stimulirajući translokaciju transportera za glukozu tipa 4 (GLUT4, engl. *glucose transporter 4*) iz unutarćelijskih depoa do površine ćelije (Saltiel i Kahn, 2001).

Od otkrića insulina, 1921. godine (Banting i Best, 1922), do danas njegovi efekti se intenzivno istražuju, ali još uvek nisu u potpunosti identifikovani molekularni signalni događaji uključeni u sve aktivnosti ovog hormona. Tako je još 1949. god. pokazano da insulin stimuliše transport glukoze u ćeliju (Levine i sar., 1949), ali je glukozni transporter GLUT4, koga aktivira insulin, otkriven tek 1980. god. (Cushman i Wardzala, 1980). Tandem formiran od strane dva proteina: protein kinaze B (PKB, engl. *protein kinase B*)/Akt i Akt supstrata 160 (AS160, engl. *Akt substrate of 160 kDa*) otkriven je 2003. god. i pretpostavljalo se da je to karika koja nedostaje u transportu glukoze indukovanom insulinom (Sano i sar., 2003). Međutim, neki insulin-zavisni molekularni koraci tek treba da se identifikuju.

### **1.1.1. Receptor za insulin**

Insulin ostvaruje svoje delovanje vezivanjem za specifičan receptor (IR, engl. *insulin receptor*) koji se nalazi na plazma membrani velikog broja ćelija. Najveća koncentracija IR nalazi se na ćelijama jetre, mišića i masnog tkiva. Vezivanje insulina za receptor pokreće kaskadu fosforilacija i interakcija signalnih molekula, što dovodi do aktiviranja različitih signalnih puteva i modulacije različitih ćelijskih procesa.

Receptor za insulin je heterotetramerni glikoprotein, koga čine dve vanćelijske  $\alpha$ -subjedinice i dve transmembranske  $\beta$ -subjedinice (Ottensmeyer i sar., 2000). Subjedinice IR funkcionišu kao alosterički enzimi u kojima  $\alpha$  subjedinica inhibira tirozin (Tyr) kinaznu aktivnost  $\beta$ -subjedinice (Saltiel i Kahn, 2001). Alfa-subjedinica IR je regulatorna, ligand-vezujuća komponenta i

poseduje region bogat cisteinom, bitan za vezivanje insulina. Pri vezivanju liganda dolazi do konformacione promene  $\alpha$ -subjedinice, koja omogućava proces autofosforilacije  $\beta$ -subjedinice (Lee i sar., 1997).

Beta-subjedinica predstavlja katalitičku subjedinicu IR i ima tirozin kinaznu aktivnost. Vanćelijskim delom ova subjedinica ostvaruje interakciju sa  $\alpha$ -subjedinicom, transmembranski deo učvršćuje receptor u ćelijskoj membrani i učestvuje u njegovoj internalizaciji nakon vezivanja hormona, a unutarćelijski region uz membranu poseduje regulatornu funkciju, jer sadrži Tyr ostatak na položaju 960 koji se fosforiliše i bitan je za prepoznavanje ćelijskih supstrata. U regulatornom regionu  $\beta$ -subjedinice nalazi se i lizin na položaju 1018 koji učestvuje u vezivanju ATP kao i tri Tyr ostatka na položajima 1146, 1150, 1151, koji predstavljaju mesta autofosforilacije IR. Fosforilacija tirozina dovodi do konformacione promene koja omogućava pristup ATP-u i ćelijskim supstratima koje receptor fosforiliše. C-terminalni region  $\beta$ -subjedinice receptora sadrži dva Tyr ostatka (1316 i 1322) koje IR autofosforiliše i serin/treonin (Ser/Thr) ostatke (1293, 1294, 1334), čija defosforilacija aktivira kinaznu aktivnost receptora. Nakon autofosforilacije (bar šest tirozina),  $\beta$ -subjedinica je sposobna da fosforiliše i druge ćelijske supstrate (Kahn i White, 1988; Combettes-Souverain i Issad, 1998).

Jednom aktiviran i fosforilisan, IR se vezuje preko svojih fosfotirozinskih ostataka za molekule koji pripadaju familiji supstrata receptora za insulin (IRS, engl. *insulin receptor substrate*) ili protein koji sadrži SH2-domen homolog Src (Shc, engl. *Src homology 2 domain containing protein*) i fosforiliše ih, što posredno vodi daljoj kaskadnoj fosforilaciji nishodnih molekula (Avruch, 1998; Saltiel i Kahn, 2001; Thirone i sar., 2006; Muniyappa i sar., 2007). Dolazi do aktivacije dva glavna signalna puta: fosfatidilinozitol 3-kinazni (PI3K, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i put proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*). Ova dva puta, pod određenim okolnostima mogu da aktiviraju jedan drugog (Le Roith i Zick, 2001). Put PI3K (posebno klasa Ia) je povezan sa metaboličkim aktivnostima insulina, dok je put



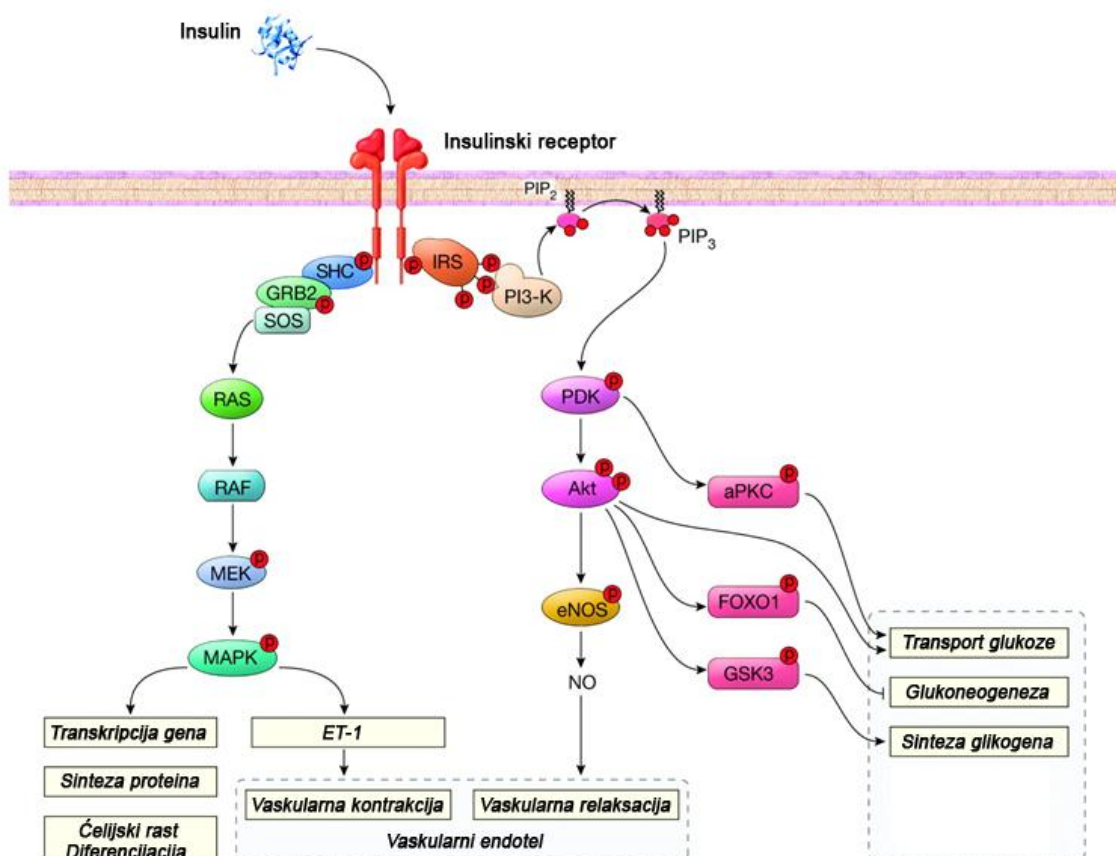
MAPK povezan sa njegovim mitogenim efektima, tj. preko ovog puta je insulin uključen u ćelijski rast i diferencijaciju.

### 1.1.2. Signalni put PI3K/AKT

Metabolički odgovor na insulin je primarno posredovan putem PI3K/Akt (Le Roith i Zick, 2001). Inhibitori PI3K ili transfekcija dominantno negativnim konstruktima blokira skoro sva metabolička delovanja insulina, uključujući stimulaciju transporta glukoze, sintezu lipida i diferencijaciju adipocita, što ukazuje na centralnu ulogu ovog enzima u delovanju insulina (Taniguchi i sar., 2006). PI3K je heterodimerni protein koga čine katalitička p110 i regulatorna p85 subjedinica. Regulatorna subjedinica sadrži SH2 domene, koji se vezuju za fosforilisane tirozinske ostatke IR ili IRS (Hirsch i sar., 2007). Insulinom indukovano vezivanje PI3K za plazma membranu omogućava njenu aktivaciju. PI3K je lipidna kinaza koja fosforiliše fosfatidilinozitol (PI) fosfate na poziciji 3, odnosno fosforiliše fosfatidilinozitol 4,5-difosfate pri čemu nastaju fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfati (PIP3) (Hirsch i sar., 2007), koji se vezuju za plekstrinske homologe domene (PH, engl. *pleckstrin homology domain*) različitih signalnih molekula čime menjaju njihovu aktivnost ili unutarćelijsku lokalizaciju (Saltiel i Kahn, 2001). Povećanje nivoa PIP3 na plazma membrani indukuje regrutovanje i kolokalizaciju kinaze tipa 1 zavisne od PIP3 (PDK1, engl. *PIP3-dependent kinase 1*) i PKB/Akt. Jednom regrutovana, PDK1 fosforiliše i aktivira PKB/Akt (**Slika 1**).

PKB/Akt je Ser/Thr kinaza sa PH domenom u svom amino terminalnom regionu. Katalitički domen koji ima veliki stepen homologije sa članovima familije protein kinaze C (PKC, engl. *protein kinase C*) i protein kinaze A (PKA, engl. *protein kinase A*) (Staal, 1987). Ove sličnosti objašnjavaju zašto se Akt naziva i protein kinaza B. Kod sisara postoje tri izoforme Akt/PKB: Akt1, Akt2, Akt3 i svaku kodira drugi gen (Taniguchi i sar., 2006). Međutim, podaci

pokazuju da su ove izoforme uključene u regulaciju različitih bioloških procesa (Taniguchi i sar., 2006).



**Slika 1. PI3K i MAPK putevi signalne transdukcije insulina.**

Insulinom stimulirani signalni put PI3K reguliše metabolizam glukoze (transport glukoze, glukoneogenezu i sintezu glikogena) u skeletnim mišićima, masnom tkivu i jetri, a preko stimulacije proizvodnje NO i vazodilataciju u vaskularnom endotelu. Insulinom stimulirani signalni put MAPK reguliše transkripciju gena, sintezu proteina, ćelijski rast i diferencijaciju, a preko sekrecije ET-1 u vaskularnom endotelu i vazokonstrikciju. IRS: supstrati receptora za insulin; PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinozitol (4,5)-bifosfat; PIP<sub>3</sub>: fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat; PDK: PIP<sub>3</sub>-zavisna protein kinaza; Akt: protein kinaza B; PKC: protein kinaza C; FOXO1: engl. forkhead box-containing protein O1; GSK: kinaza glikogen sintaze; NO: azot-monoksid; eNOS: endotelna sintaza NO; Shc: engl. Src homology domain containing protein; Grb2: protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta; SOS: engl. Son of sevenless; Ras: male guanozin trifosfataze; Raf: serin/treonin-specifična kinaza; MAPK: proteinske kinaze aktivirane mitogenima; MEK: MAPK kinaza; ET-1: endotelin-1 (Muniyappa i sar., 2007).

Zapravo, aktivacija PKB/Akt koju indukuje insulin je posledica fosforilacije ovog proteina na dva aminokiselinska ostatka, Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> (Cohen, 2006). Koordinisana fosforilacija na Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> je potrebna za punu aktivaciju Akt kinaze. Pokazano je da je za fosforilaciju Akt na Thr<sup>308</sup> odgovorna PDK1 (Alessi i sar., 1997). Protein kinaza koja fosforiliše Akt/PKB na Ser<sup>473</sup> je kasnije identifikovana i izgleda da je specifična forma ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (mTOR, engl. *mammalian target of rapamycin*) vezana za regulatornu subjedinicu poznatu kao RICTOR (Hresko i Mueckler, 2005; Sarbassov i sar., 2005). Tandem PDK1 i PKB/Akt je važan u metaboličkom delovanju insulina. Tako su PDK1 i PKB $\beta$ /Akt2 izoforma izgleda ključni za regulaciju transporta glukoze. (Mora i sar., 2005; DeBosch i sar., 2006; Dummler i Hemmings, 2007).

### 1.1.3. Signalni put MAPK

Klasična MAPK kaskada sastoji se od tri proteinske kinaze u nizu, koje se aktiviraju raznim mitogenima, uključujući faktore rasta, tromboksan A<sub>2</sub>, angiotenzin II i insulin. U osnovi signalnih puteva MAPK izdvajaju se tri kinaze: kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima, (ERK, engl. *extracellular signal-regulated protein kinases*); kaskada c-Jun N-terminalnih kinaza (JNK, engl. *c-Jun N-terminal kinases*) i kaskada protein kinaza aktiviranih mitogenima (p38, engl. *mitogen-activated protein kinases*). Svaka od nabrojanih grupa MAPK poseduje svoje izoenzime koji predstavljaju produkte različitih gena (Tomlinson, 1999).

Nakon vezivanja insulina za receptor dolazi do fosforilacije receptora, a zatim i do fosforilacije Shc koji aktivira protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta (Grb2, engl. *growth factor receptor-bound protein 2*), a koji potom aktivira Ras, guanozin-trifosfatazu (GTP-aza, engl. *guanosine triphosphatase*). Ras zatim aktivira serin/treonin-proteinsku kinazu Raf (Howe i sar., 1992;

Burgering i Bos, 1995; Avruch, 1998) koja potom fosforiliše i aktivira drugu proteinsku kinazu, nazvanu MEK (MAPK kinaza, engl. *MAPK kinase*). Ova kinaza aktivira članove familije MAPK tako što fosforiliše treoninske i tirozinske ostatke (Crews i sar., 1992) (**Slika 1**). Jednom aktivirane, p38, JNK i ERK, fosforilišu širok spektar unutarćelijskih ciljnih molekula koji uključuju transkripcijske faktore, koji na kraju dovode do ekspresije ranih gena (Davis, 1993). Tako dolazi do sinteze brojnih proteina. Većina aktivnosti ERK u velikom broju ćelijskih vrsta potiče od izoformi ERK1 (p42) i ERK2 (p44), koje imaju funkcionalnu raznolikost (Seger i Krebs, 1995). Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na dva mesta: treonin (Thr<sup>202</sup>) i tirozin (Tyr<sup>204</sup>). ERK1/2 mogu fosforilisati supstrate poput proteina citoplazme, proteinskih kinaza i fosfolipaza (Widmann i sar., 1999), a inaktiviraju se defosforilacijom različitim specifičnim fosfatazama (Cuschieri i Maier, 2005). Veliki broj molekula na koje može delovati ERK1/2 ukazuje na različite odgovore ćelije u kojima one učestvuju kao što su: proliferacija, regulacija rasta i diferencijacije, ćelijski ciklus, preživljavanje, ali i smrt ćelija (Widmann i sar., 1999).

## **1.2. Uloga signalnog puta insulina u regulaciji ćelijskih procesa u srcu**

Među procesima koji su pod uticajem insulina preko aktivacije signalnih puteva PI3K/Akt i ERK su regulacija aktivnosti endotelne i inducibilne sintaze azot-monoksida (NOS, engl. *nitric oxide synthase*) (Montagnani i sar., 2001), koje su uključene u sintezu azot-monoksida (NO, engl. *nitric oxide*), kao i transport glukoze i masnih kiselina, glavnih energetske supstrata u srcu (Bertrand i sar., 2008).

### 1.2.1. Azot-monoksid i uloga eNOS i iNOS u srcu

Azot-monoksid je važan signalni molekul koji je uključen u regulaciju velikog broja fizioloških procesa u organizmu, od mišićnih kontrakcija do ćelijskog preživljavanja i smrti (Zhang i sar., 2007). NO je bezbojni gas koji se slabo rastvara u vodi i lako prolazi kroz lipidne membrane. Ovaj molekul je dugo pominjan samo kao otrovni gas veoma neprijatnog mirisa, koji nastaje oksidacijom amonijaka. Međutim, osamdesetih godina prošlog veka, pravu senzaciju izazvalo je saznanje da NO predstavlja jedan od najvažnijih fizioloških regulatora koji kao sekundarni glasnik ima ključnu ulogu u signalnoj transdukciji i citotoksičnosti. Takođe je bilo iznenađujuće da je NO potpuno drugačiji od bilo kog do tada poznatog signalnog molekula jer je vrlo nestabilan molekul, koji može da se pretvori u nitrite i nitrate u roku od 10 sekundi.

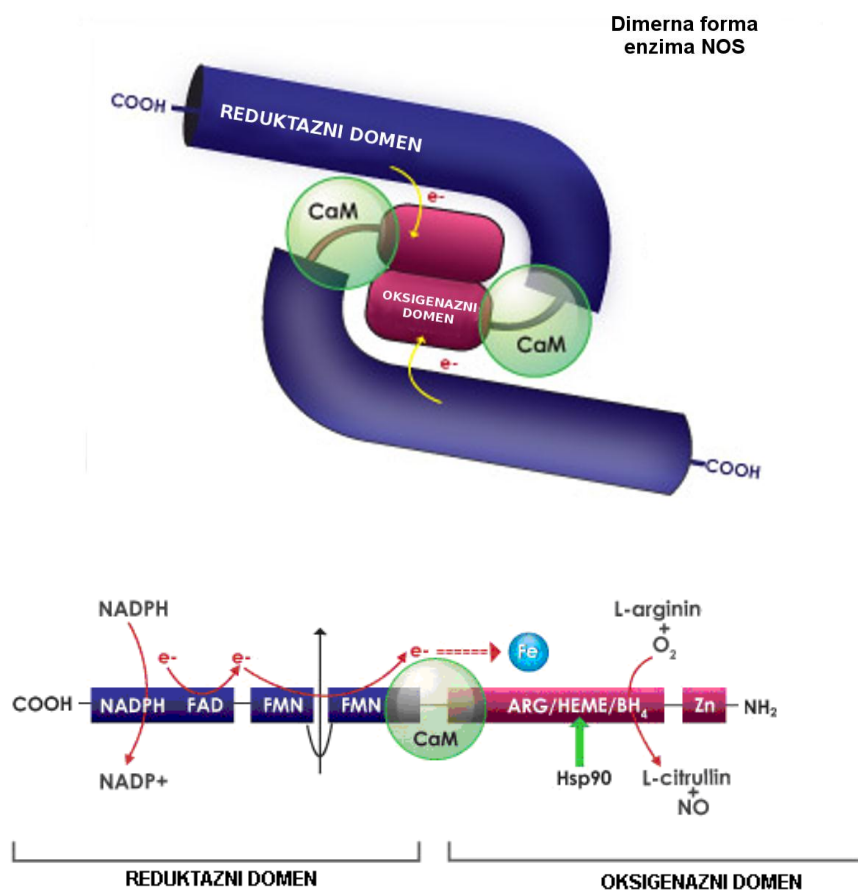
Koliko je važna uloga ovog molekula govori i to što su trojica istraživača Robert F Furchgott, Ferid Murad i Louis J Ignarro za rad o ulozi azot-monoksida u kardiovaskularnom sistemu, 1998. godine dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu. Brojna otkrića novijeg datuma opravdavaju činjenicu da se azot-monoksid smatra jednim od najvećih iznenađenja u biološkoj hemiji i da je i dalje izazov za istraživače širom sveta. Ovaj sveprisutni ćelijski glasnik je zbog revolucije koju je uneo u razumevanje mnogih procesa u organizmu proglašen 1992. za molekul godine, uprkos svojoj jednostavnoj, dvoatomskoj strukturi.

Azot-monoksid učestvuje u regulaciji krvnog pritiska budući da je potentan vazodilatator (Moncada i sar., 1991), značajan je u fiziologiji neurotransmisije i odbrane od patogena, ali kada je prekomerno generisan može dovesti do brojnih patoloških stanja (Pacher i sar., 2007). Visoka koncentracija NO karakteristična je za zapaljenske procese i neurodegenerativna oboljenja, dok se njegova snižena produkcija povezuje sa hipertenzijom, anginom pectoris i impotencijom (Moncada i sar., 1991).

Pretpostavlja se da ne postoji bolest koja preko nekog regulatornog puta nije povezana sa azot-monoksidom.

U različitim tkivima, NO nastaje delovanjem enzima NOS, koji katalizuje konverziju supstrata L-arginina (L-Arg) do L-citrulina i NO. Do sada su identifikovane tri izoforme NOS: endotelna (eNOS, engl. *endothelial NOS*), neuralna (nNOS, engl. *neuronal NOS*) i inducibilna (iNOS, engl. *inducible NOS*) (Forstermann i sar., 1994). Sve tri izoforme su eksprimirane u srcu, pri čemu su eNOS i nNOS konstitutivno eksprimirane. Endotelna NOS, lokalizovana u vaskularnim endotelnim ćelijama, i iNOS u kardiomiocitima (Kelly i sar., 1996; Buchwalow i sar., 2001) su glavne izoforme odgovorne za produkciju NO (Balligand i sar., 1995). Smatra se da je eNOS neophodna za bazalne fiziološke procese u srcu, ali je pokazano da može biti i regulisana različitim stimulusima (Li i Forstermann, 2000). Do indukcije ekspresije iNOS u srcu dolazi nakon stimulacije ili u patofiziološkim uslovima, što dovodi do stvaranja velike količine NO koji ima proinflamatorne i odbrambene efekte (Schulz i sar., 2005). Biološki efekti NO u srcu zavise od toga koja je izoforma NOS aktivirana.

Sve tri izoforme NOS sadrže dva funkcionalno različita domena: N-terminalni oksigenazni domen, za koji se vezuju hem (gvožđe protoporfirin IX), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) i L-arginin, kao i C-terminalni reduktazni domen, koji obuhvata vezujuća mesta za flavin mononukleotid/flavin adenin dinukleotid (FMN/FAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP). Ova dva domena su povezana kalmodulin-vezujućim mestom, za koje se vezuje Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin. Pretpostavlja se da BH<sub>4</sub> vrši alosteričku promenu kako bi stabilizovao aktivnu dimernu formu enzima NOS te da redukuje NOS pri stimulaciji i time dovodi do aktivacije enzima (Werner i sar., 1998) (**Slika 2**).



### Slika 2. Proteinska struktura NOS.

Funkcionalni NOS protein je dimer koga čine dve identične subjedinice od kojih svaka sadrži N-terminalni oksigenazni i C-terminalni reduktazni domen. Reduktazni domen koji sadrži FAD i FMN motive ima ulogu u prenosu elektrona na oksigenazni domen suprotne subjedinice dimera a ne na domen iste subjedinice. Vezivanje CaM je potrebno za aktivnost sve tri izoforme NOS i ovaj domen prepoznaje promene u nivou unutarćelijskog kalcijuma. Oksigenazni domen sadrži vezujuća mesta za BH<sub>4</sub>, hem i L-arginin i katalizuje konverziju L-arginina u citrulin i NO. NO: azot-monoksid; NOS: sintaza NO; NADP-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; FMN: flavin mononukleotid; FAD: flavin adenin dinukleotid; CaM: kalmodulin-vezujuće mesto; ARG: L-arginin; BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterin; e<sup>-</sup>: elektron; Fe: hem gvožđa; Zn<sup>2+</sup>: atom cinka

(<https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2159>).

Endotelna NOS je enzim pretežno vezan za ćelijsku membranu (Schulz i sar., 2005). Regulisanje aktivnosti eNOS obično podrazumeva mobilizaciju unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup>, uklanjanje kaveolina-1 iz kompleksa sa eNOS, koji

antagonizuje vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmomodulina i inhibira enzimsku aktivnost (Michel i sar., 1997a; Michel i sar., 1997b; Feron i sar., 1998; Gratton i sar., 2000). Budući da se aktivnost eNOS inhibira uklanjanjem kalcijuma ili inhibitorima kalmomodulina, ova izoforma se, zajedno sa nNOS, klasifikuje kao kalcijum-zavisna.

U fiziološkim uslovima glavni izvor NO u srcu je endotel koronarnih krvnih sudova. Dobro je poznato da NO sintetisan u endotelu difunduje u kardiomiocite i ostvaruje parakrine efekte, prvenstveno delujući na relaksaciju (Smith i sar., 1991). Takođe je dokazano da su sve tri izoforme NOS eksprimirane i u kardiomiocitima pretkomora i komora (Kelly i sar., 1996; Barouch i sar., 2002; Ziolo i sar., 2008). Značajno otkriće je da se eNOS i nNOS eksprimiraju u različitim unutarćelijskim odeljcima kardiomiocita, gde se dovode u vezu sa različitim efektornim molekulima i ostvaruju različite efekte (Feron i sar., 1996; Xu i sar., 1999). Uloga ovih izoformi u kardiomiocitima ostaje da se razjasni, ali se pretpostavlja da autokrini efekti eNOS mogu biti uključeni u inotropni odgovor tj. povećanje snage srčanog mišića (Seddon i sar., 2007).

Azot-monoksid, kada se proizvodi u niskim koncentracijama od strane izoforme eNOS, funkcioniše kao signalni molekul uključen u mnoge fiziološke procese, kao što su regulacija krvnog pritiska, remodelovanje vaskulature i angiogeneza (Massion i sar., 2003; Morbidelli i sar., 2003) kao i antihipertrofično delovanje, (Xia i sar., 1996; Kuzkaya i sar., 2003; Takimoto i sar., 2005). Pored navedenih uloga, eNOS ima ulogu i „endogenog beta blokatora“, koji uspostavlja simpato-vagalnu ravnotežu, suprotstavlja se prekomernoj hipertrofiji, a potpomaže vazodilataciju i neoangiogenezu što doprinosi oporavku tkiva (Massion i Balligand, 2007; Umar i van der Laarse, 2010).

Inducibilna NOS je predominantno lokalizovana u citosolu kardiomiocita (Schulz i sar., 2005). Za razliku od eNOS, aktivnost iNOS je nezavisna od koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  i zato se naziva i  $\text{Ca}^{2+}$ -nezavisna (Alderton i sar., 2001). Do ekspresije iNOS dolazi usled inflamacije posredovane različitim citokinima uključujući interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ , faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  engl. *tumor*



*necrosis factor*  $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  engl. *interferon-gamma*) i interleukin-6 (IL-6) (de Vera i sar., 1996) kao i citokinima-indukovanim faktorima transkripcije, kao npr. nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, engl. *nuclear factor- $\kappa$ B*) (Nathan, 1997). Inducibilna NOS može da sintetiše i do 1000 puta više NO nego eNOS (Singh i Evans, 1997), što može da ima štetne efekte na kardiovaskularni sistem. Kao veoma reaktivan slobodni radikal, NO u reakciji sa drugim reaktivnim vrstama kiseonika (ROS, engl. *reactive oxygen species*), kao što su superoksidni anjoni ( $O_2^-$ ) (Ceriello i sar., 2002), formira intermedijerne produkte - peroksinitrite (ONOO $^-$ ), koji se smatraju glavnim posrednicima citotoksičnih efekata NO (Ferdinandy i sar., 2000). Nitrotirozin, *in vivo* biomarker oksidativnog oštećenja, indukovano od strane peroksinitrita i drugih ROS, je identifikovan u srcu pacova sa dijabetesom tipa 1 (Cheng i Pang, 2004). Osim toga, visoke koncentracije NO indukuju oksidativni stres koji dovodi do razaranja  $\beta$  ćelija pankreasa, što ima takođe za posledicu razvoj insulin-zavisnog dijabetesa (Corbett i sar., 1993; Wierusz-Wysocka i sar., 1995). Pokazano je da u visokim dozama NO deluje negativno inotropno (Mohan i sar., 1995).

Azot-monoksid ostvaruje svoje efekte preko najmanje dva različita puta. Prvi put je zavisano od cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP, engl. *cyclic guanosine monophosphate*). NO u miocitima aktivira guanil-ciklazu, koja podiže nivo cGMP-a (Bertrand i sar., 2008). Ciklični GMP aktivira signalni put protein kinaze G tipa I (PKG, engl. *protein kinase G*), kao i fosfodiesteraze regulisane cGMP-om. Aktivacija NO/cGMP/PKG puta dovodi do smanjenja kontraktilnosti glatkih mišića tako što dolazi do smanjenja koncentracije unutarćelijskog kalcijuma. Kontraktilno stanje glatkih mišića je determinisano fosforilacijom i aktivnošću lakog lanca miozina, koga fosforiliše kinaza lakog lanca miozina što dovodi do mišićne kontrakcije (Kamm i Stull, 1985; Somlyo i Somlyo, 2003; Ding i sar., 2009), a defosforiliše ga fosfataza lakog lanca miozina, što omogućava relaksaciju. Ravnoteža između kinazne i fosfatazne aktivnosti je ključna za kontraktilni status glatkih mišića što je regulisano NO/cGMP/PKG signalnim putem (Wu i sar., 1996; Hofmann, 2005; Mizuno i sar., 2008). Povišen

nivo cGMP, dovodi i do sprečavanja agregacije trombocita i adhezije leukocita za endotel, ispoljavajući anti-inflamatorno dejstvo (Yan i sar., 1996). Drugi put je nezavisan od cGMP-a i obuhvata aktivaciju adenilat-ciklaze, što dovodi do povećanja nivoa cikličng adenozin-monofosfata (cAMP, engl. *cyclic adenosine monophosphate*) i kontrakcija miokarda (Vila-Petroff i sar., 1999).

Ekspresija i aktivacija eNOS, kao i iNOS, usko je povezana sa aktivacijom signalnog puta koji uključuje PI3K/PKB/Akt (Hisamoto i sar., 2001; Strijdom i sar., 2009). Endotelna NOS je posttranslaciono regulisana fosforilacijom na serinskim, a pod određenim uslovima i na tirozinskim i treoninskim ostacima. Insulin ili fizička aktivnost indukuju fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup> (za humani eNOS) ili 1179 (za goveđi eNOS) u kardiomiocitima preko PI3K/PKB/Akt signalnog puta (Petroff i sar., 2001). Protein kinaza B/Akt direktno fosforiliše eNOS, što dovodi do povećane aktivnosti enzima (Dimmeler i sar., 1999) i povećane proizvodnje NO (Zeng i Quon, 1996). Put PKB/Akt je kompletno različit i nezavisan od klasičnih kalcijum-zavisnih mehanizama regulacije eNOS koji koriste receptore spregnute sa proteinom G, kao što je acetilholinski receptor (Fleming i Busse, 2003). Međutim, aktivacija PKB/Akt, iako neophodna, nije dovoljna za aktivaciju eNOS. Insulin stimuliše vezivanje kalmodulina za eNOS (Takahashi i Mendelsohn, 2003), za koju se prethodno vezuje protein toplotnog stresa 90 (Hsp90, engl. *heat shock protein 90*). Stvaranje kompleksa eNOS/Hsp90/PKB/Akt ubrzava fosforilaciju eNOS pomoću PKB/Akt (Fleming i Busse, 2003).

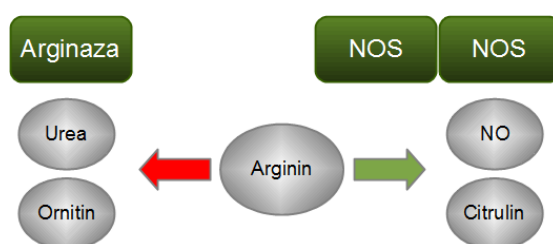
Među signalnim putevima za koje je pokazano da su uključeni u kontrolu ekspresije i aktivacije eNOS i iNOS, značajnu ulogu imaju signalni putevi koji uključuju MAPK (Zheng i sar., 1999; Bernier i sar., 2000). Studije su pokazale da je gen za iNOS regulisan na više nivoa: transkripcionom, posttranskripcionom i translacionom (Bhat i sar., 1998). Uloga MAPK puta u ekspresiji iNOS nije u potpunosti definisana, ali podaci iz literature ukazuju da su ERK1/2 i p38 MAPK uključene u kontrolu ekspresije i aktivacije iNOS u kardiovaskularnom sistemu (LaPointe i Isenovic, 1999; Rao, 2000). Wang i

Brecher (Wang i Brecher, 1999) su pokazali da aktivacija ERK1/2 i p38 MAPK može biti neophodna za indukciju ekspresije iNOS u odgovoru na IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  u ćelijama fibroblasta srca. Indukcija iNOS od strane p38 MAPK može se objasniti ulogom nekoliko transkripcijskih faktora: preko aktivirajućeg proteina 1 (AP-1, engl. *activator protein 1*), jer je potvrđena p38 MAPK posredovana ekspresija *c-jun* i *c-fos* (Hazzalin i sar., 1997) i preko NF- $\kappa$ B (Wesselborg i sar., 1997).

Različite promene u NO putu su zapažene u stanju dijabetesa tipa 1, kako kod ljudi, tako i u animalnim modelima (De Vriese i sar., 2000), i nije jasno da li je uzrok različitog trenda u bazalnoj ili stimuliranoj sintezi NO, raspoloživosti NO ili reagovanju na NO, ili možda zajedno. Takođe, na osnovu dobijenih i objavljenih rezultata pokazano je da su eNOS i iNOS važni u razvoju kardiovaskularnih komplikacija u dijabetesu (Li i Forstermann, 2000; Santilli i sar., 2004; Farhangkhoei i sar., 2006b), pri čemu su do sada publikovani rezultati, koji se odnose na promene u njihovoj ekspresiji u srcu u stanju dijabetesa, protivrečni (Felaco i sar., 2001; El-Omar i sar., 2003; Cheng i sar., 2004; Farhangkhoei i sar., 2006b; Jesmin i sar., 2006; Nagareddy i sar., 2009). Ekspresija iNOS je promenjena u nekim kardiovaskularnim stanjima, kao što je dilatativna kardiomiopatija (Kelly i sar., 1996), srčana aritmija (Xia i sar., 2006a), endotoksični šok (Shah i MacCarthy, 2000) i ishemija/reperfuzija. Iako primarni uzrok koji dovodi do promena u kardiovaskularnom sistemu u akutnoj fazi dijabetesa nije jasan, podaci pokazuju da je iNOS aktivirana kod pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom. Povećanje nivoa iNOS je detektovano u mezenteričnoj arteriji pacova 12-14 nedelja nakon tretmana (Bardell i MacLeod, 2001), u kardiomiocitima pacova nakon 8 nedelja od injekcije streptozotocina (Smith i sar., 1997), kao i trombocitima pacijenata sa dijabetesom tipa 1 i dijabetesom tipa 2 (Tannous i sar., 1999).

### 1.2.2. Uloga arginaze u regulaciji NOS

Drugi značajan put metabolizma L-arginina je preko enzima arginaze, hidrolitičkog enzima koji je odgovoran za razlaganje L-arginina u ureu i L-ornitin, prekursore u sintezi poliamina (spermin i spermidin) i L-prolina (Wu i Morris, 1998; Mori i Gotoh, 2000; Hallemeesch i sar., 2002). S obzirom da je L-arginin supstrat za NOS i arginazu, tokom protekle decenije postalo je očigledno da kompeticija između NOS i arginaze za L-arginin ograničava proizvodnju NO (Slika 3). Disbalans između ovih signalnih puteva može da doprinese poremećajima u radu srca, posebno u dijabetesu.



**Slika 3. Kompeticija arginaze i NOS za zajednički supstrat L-arginin.**

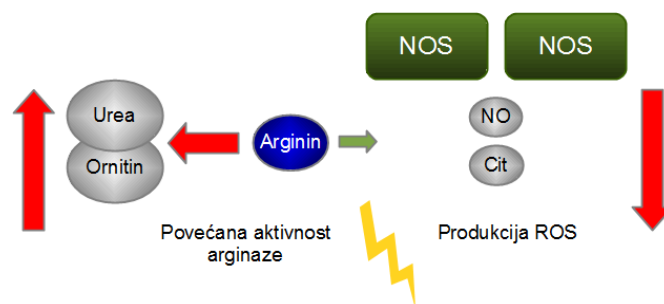
Arginaza katalizuje prevođenje L-arginina u L-ornitin i ureu. L-arginin je takođe i supstrat za NOS koja katalizuje konverziju supstrata u L-citrulin i NO. NO je esencijalan za normalno funkcionisanje endotela. NO: azot-monoksid; NOS: sintaza NO.

U sisarskim ćelijama identifikovane su dve izoforme arginaze, arginaza I i II. Svaka je kodirana od strane različitog gena i imaju 60% homologije u aminokiselinskoj sekvenci (Dizikes i sar., 1986; Vockley i sar., 1996). Arginaza I i II se međusobno razlikuju po tkivnoj distribuciji, unutarćelijskoj lokalizaciji i imunskoj reaktivnosti (Jenkinson i sar., 1996). Arginaza I se nalazi u citoplazmi i u velikim količinama je eksprimirana u jetri kao deo ciklusa uree. Najveći deo ukupne aktivnosti arginaze vezan je za ovu izoformu. Nasuprot tome, arginaza II je protein koji se nalazi u mitohondrijama i najviše je eksprimiran u bubrezima i prostati (Vockley i sar., 1996; Morris i sar., 1997). Arginaza I i II su

takođe eksprimirane u srcu, kao i u krvnim sudovima, uključujući aortu, karotidne i plućne arterije (Durante i sar., 2000; Jung i sar., 2006; Steppan i sar., 2006; Belik i sar., 2008). Malo se zna o signalnim putevima koji učestvuju u regulaciji arginaze, međutim podaci iz literature ukazuju da put Janus kinaze i signalnog prenosioca i aktivatora transkripcije (Jak/Stat, engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) i cAMP imaju ulogu u indukciji arginaze I u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (VSMC, engl. *vascular smooth muscle cells*) (Durante i sar., 2000).

Arginaza recipročno reguliše aktivnost NOS, i ovaj fenomen je zapažen kako za konstitutivnu (Cox i sar., 1999; Berkowitz i sar., 2003; Steppan i sar., 2006), tako i za inducibilnu (Morris i sar., 1997) izoformu NOS. Povećana aktivnost arginaze može ograničiti sintezu NO, smanjujući dostupnost L-arginina za NOS (Ishii i sar., 2004) i obrnuto supresija aktivnosti arginaze može povećati dostupnost L-arginina za NOS i time povećati sintezu NO.

Fiziološka uloga arginaze i zastupljenost ukazuju na njenu ulogu i u mnogim poremećajima i bolestima. Pokazano je da povećana ekspresija i aktivnost arginaze doprinosi razvoju patofizioloških procesa kod bolesti u kojima dolazi do promene u regulaciji signalnog puta NO (**Slika 4**), kao što su disfunkcija endotela tokom starenja (Berkowitz i sar., 2003), ateroskleroza (Ming i sar., 2004; Ryoo i sar., 2008), ishemija miokarda (Durante i sar., 2007), dijabetes (Bivalacqua i sar., 2001; Kashyap i sar., 2008) i bolesti disajnih puteva u astmi (Meurs i sar., 2003; Kocyigit i sar., 2004). Kaesemeyer i saradnici (Kaesemeyer i sar., 2000) su pokazali da disfunkcija endotela u dijabetesu usled povećane aktivnosti arginaze ima za posledicu smanjenje sinteze NO i povećanje produkcije superoksida od strane eNOS.



**Slika 4. Povećana aktivnost arginaze u patofiziološkim stanjima.**

U uslovima kada je povećana aktivnost enzima arginaze metabolizam L-arginina je predominantno usmeren ka povećanoj produkciji L-ornitina i prolina, kao i monomerizaciji NOS, što ima za posledicu smanjenu produkciju NO i povećanu produkciju ROS. NO: azot-monoksid; NOS: sintaza NO; Cit: L-citrulin; ROS: reaktivne vrste kiseonika.

Akutno davanje suplemenata L-arginina sprečava endotelnu disfunkciju i obnavlja endotel-zavisnu vazodilataciju u stanju dijabetesa, hipertenzije i slabosti srčanog mišića (Pieper i Peltier, 1995; Angulo i sar., 1998). U eksperimentalnom modelu streptozotocinom indukovano dijabetesa kod miševa, Romero i saradnici (Romero i sar., 2008) su potvrdili smanjenu endotel-zavisnu vazodilataciju, povećanje ROS, kao i aktivnosti i ekspresije arginaze u aorti i jetri. Osim toga, akutni tretman inhibitorom arginaze pacijenata sa dijabetesom ponovo uspostavlja endotel-zavisnu relaksaciju koronarnih arterija u odgovoru na acetilholin, što potvrđuje da ovaj enzim smanjuje dostupnost supstrata za eNOS i doprinosi disfunkciji endotela u ovom modelu dijabetesa.

### 1.2.3. Transport energetskih supstrata u srcu

#### 1.2.3.1. Metabolizam u srcu u fiziološkim uslovima

Srce je organ koji intenzivno koristi energiju i potrebno mu je konstantno snabdevanje energentima i kiseonikom da bi održao svoj unutarćelijski nivo ATP, neophodan za neprekidan ciklus kontrakcije i relaksacije. Proizvodnja

ATP u fiziološkim uslovima potiče iz oksidacije različitih energetskih supstrata u mitohondrijama (Bertrand i sar., 2008). Slobodne masne kiseline (FFA, engl. *free fatty acid*) i glukoza su glavni energenti za proizvodnju energije u srcu. U fiziološkim uslovima, udeo masnih kiselina u proizvodnji energije neophodne za rad srca je oko 60–70%, glukoze oko 30–40%, a laktata 10% (Lopaschuk i sar., 2010). Metabolizam glukoze je regulisan u više koraka, koji obuhvataju transport, glikolizu i dekarboksilaciju piruvata. Srce ima ograničen kapacitet za sintezu i skladištenje masnih kiselina, pa se stoga oslanja na egzogeno snabdevanje. Srce se snabdeva masnim kiselinama vezanim za albumin i iz lipoproteina bogatih trigliceridima (TG), pri čemu je molarna koncentracija masnih kiselina u TG približno deset puta veća nego masnih kiselina vezanih za albumin (Merkel i sar., 2002). Lipoproteinska lipaza (LPL, engl. *lipoprotein lipase*) je glavni enzim koji hidrolizuje TG iz lipoproteina do masnih kiselina, što znači da su lipoproteini glavni izvor masnih kiselina koje snabdevaju srce (Augustus i sar., 2003; Teusink i sar., 2003). U fiziološkim uslovima se 70–90% masnih kiselina koje ulaze u kardiomiocyte oksidacijom prevodi u ATP, a 10–30% se pretvara u TG (Stanley i sar., 2005). Pri tome je unutarćelijski nivo TG konstantan, što ukazuje na balans lipogeneze i lipolize (Saddik i Lopaschuk, 1991).

Postoji složeno uzajamno dejstvo među različitim supstratima u zavisnosti od energetske potrebe i njihove dostupnosti. Glavni faktor koji definiše prioritet i nivo iskorišćenosti supstrata je njihova relativna koncentracija. Alosterična regulacija enzimske aktivnosti i kaskade proteinske fosforilacije, koje su delimično kontrolisane hormonima, kao što je insulin, menja efekat koncentracije, obezbeđujući na taj način kratkoročno prilagođavanje energetskeg metabolizma u srcu (Kodde i sar., 2007). Takođe, može doći do ubrzane promene izbora korišćenja energetskeg supstrata, kako bi se srce prilagodilo različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima koja mogu nastati usled promene nivoa hormona, dostupnosti supstrata ili opterećenja tj. povećanom potražnjom za energijom (An i Rodrigues, 2006).

Akutno ili hronično, ova regulacija se ostvaruje preko različitih mehanizama. Iako je promena energetskeg supstrata neophodna da se obezbedi stalna proizvodnja ATP za funkcionisanje srca, te promene mogu dovesti do štetnih posledica (Atkinson i sar., 2002; Young i sar., 2002).

Unos supstrata je posredovan prisustvom i aktivnošću membranskih proteina koji deluju kao supstratni transporteri glukoze ili kao vezujući proteini koji ubrzavaju transmembransko kretanje FFA. Regulacija transporta oba supstrata u ćeliju odvija se translokacijom transportera iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane, što olakšava transport kroz ćelijsku membranu (Glatz i sar., 2002). Oba procesa su regulisana istim fiziološkim stimulusima (Luiken i sar., 2004a).

#### 1.2.3.2. *Uloga insulina u transportu glukoze i masnih kiselina*

Srce je insulin-responsivni organ. Za razliku od skeletnih mišića, u kojima insulinski signalni put ima važnu ulogu u regulaciji deponovanja glukoze, srce mora da održi svoju sposobnost da koristi glukoze i druge metaboličke supstrate nezavisno od dnevnih ili postprandijalnih promena u koncentraciji insulina (Abel, 2004). Činjenica da funkcija srca mora da traje neometano diktira neprekidno visoki bazalni nivo kontraktilne efektivnosti, a samim tim i energetskeg metabolizma (Brownsey i sar., 1997).

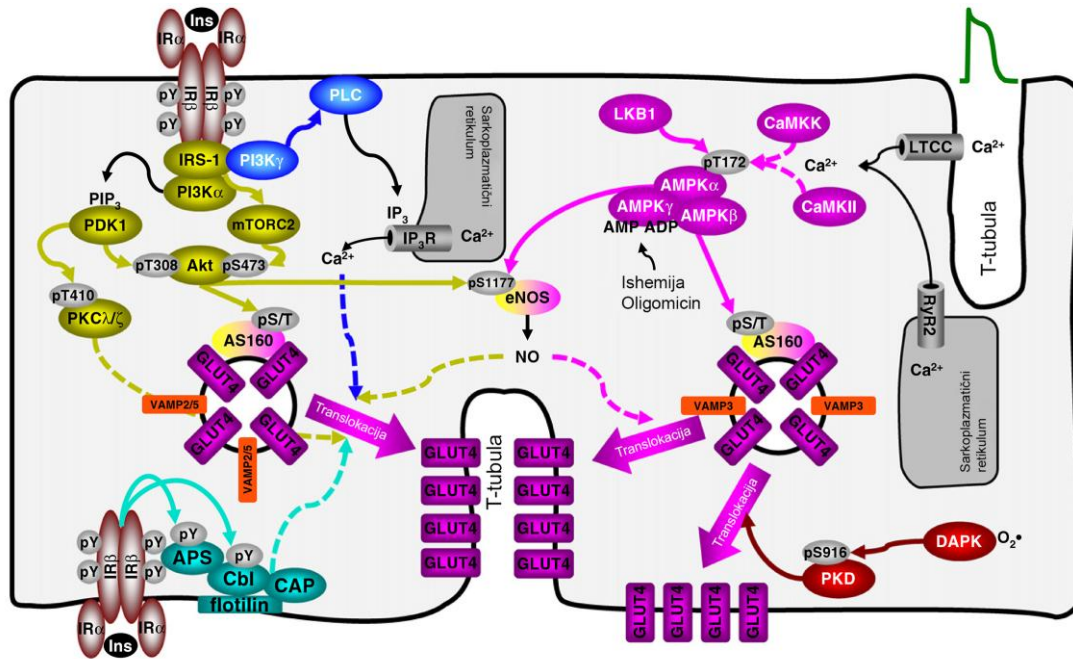
Insulin podstiče sintezu i čuvanje ugljenih hidrata i lipida, i inhibira njihovu degradaciju i oslobađanje u cirkulaciju. Shodno tome, ovaj hormon smanjuje koncentraciju glukoze i FFA u plazmi i raspoloživost ovih supstrata u srcu. Stoga, osnovna uloga insulina u srcu u fiziološkim uslovima je regulacija supstratnog iskorišćavanja. Insulin podstiče transport glukoze i njeno anaerobno razlaganje (Zorzano i sar., 1997), a učestvuje i u regulaciji transporta masnih kiselina (Chabowski i sar., 2004), uglavnom preko PI3K/Akt signalnog puta (Bertrand i sar., 2008).



U izolovanom srcu, insulin povećava translokaciju glukoznog transportera, glikolitički fluks i nivo oksidacije glukoze (Abel, 2004). Takođe, insulin suprimira  $\beta$  oksidaciju masnih kiselina u srcu (Belke i sar., 2002). Pored direktnih efekata u srcu, insulin ima važnu ulogu u regulaciji balansa metaboličkih goriva, koja dolaze do miokarda, prvenstveno kroz delovanje na masno tkivo, skeletne mišiće i jetru (Belke i sar., 2002). Drugim rečima, mnogi *in vivo* efekti insulina na metabolizam i funkciju srca su u vezi sa njegovim sistemskim efektima, pa je teško odvojiti direktne od sistemskih efekata insulina na kardiomiocite (Belke i sar., 2002). Na primer, antilipolitičko delovanje insulina dovodi do smanjenja dostupnosti FFA srcu, što zajedno sa povećanim unutarćelijskim nivoem malonil koenzima A dovodi do redukcije nivoa oksidacije masnih kiselina (Awan i Saggerson, 1993). Insulin takođe može da poveća kontraktilnost srca (Ren i sar., 2000) i može imati antiapoptotski efekat u kardiomiocitima (Aikawa i sar., 2000).

#### 1.2.3.3. *Transport glukoze*

Glukoza je hidrofilni molekul koji nije u stanju da prođe kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, zbog čega je njen transport u ćeliju regulisan količinom i aktivnošću transportera. Transport je posredovan članovima familije transportera za glukozu (GLUT, engl. *glucose transporters*) (Luiken i sar., 2004a), a do sada je opisano 12 GLUT izoformi (Joost i sar., 2002; Wood i Trayhurn, 2003). Iako su sličnih struktura, svaki član familije GLUT je specifično distribuiran po tkivima i podložan specifičnim regulatornim mehanizmima, da bi se zadovoljile potrebe različitih tkiva (Ryder i sar., 2001). Glavne izoforme prisutne u srcu su glukozni transporter tipa 1 (GLUT1, engl. *glucose transporter type 1*) i glukozni transporter tipa 4 (GLUT4, engl. *glucose transporter type 4*). Glukozni transporteri su prisutni u u unutarćelijskim depovima i plazma membrani kardiomiocita (Luiken i sar., 2004a).



**Slika 5. Signalni putevi koji učestvuju u stimulaciji translokacije GLUT4 u kardiomiocitima.**

Levo: signalni putevi koji su uključeni u odgovoru na insulin; desno: signalni putevi koji su uključeni u odgovoru na ishemijsku ili kontraktilnu aktivnost indukovanu metaboličkim stresom. Pune linije pokazuju dobro poznate signalne puteve; isprekidane linije pokazuju kontroverzne ili delimično proučene puteve. ADP: adenzin difosfat; AMP: adenzin monofosfat; AMPK $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ :  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinice protein kinaze aktivirane AMP; APS: adaptivni protein sa domenima homologim plekstrinu i Src; AS160: supstrat Akt od 160kDa; Ca<sup>2+</sup>: kalcijum; CaMKII: protein kinaza II zavisna od kalmodulina; CaMKK: kinaza protein kinaze zavisne od kalmodulina; CAP: Cbl vezujući protein; DAPK: protein kinaza aktivirana programiranom ćelijskom smrću ; eNOS: endotelna sintaza azot-monoksida; GLUT4: glukozni transporter tipa 4; Ins: insulin; IP3: inozitol 1,4,5-trifosfat; IP3 R: receptor inozitol trifosfata; IR $\alpha$ ,  $\beta$ :  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica insulinskog receptora ; LKB1: kinaza B1 u jetri; LTCC: L-tip kalcijumovog kanala; mTORC2: kompleks 2 sisarskog ciljnog molekula rapamicina; NO: azot-monoksid; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: reaktivne vrste kiseonika; PDK1: protein kinaza 1 zavisna od fosfoinozitida; PI3K $\alpha$ ,  $\gamma$ :  $\alpha$  i  $\gamma$  subjedinica fosfatidilinozitol 3-kinaze; PIP : fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat; PKC $\lambda$ ,  $\zeta$ :  $\lambda$  i  $\zeta$  izoforma protein kinaze C; PKD: protein kinaza D; PLC: fosfolipaza C; Ryr2: rianodin receptor 2; VAMP: membranski protein vezan za vezikulu (Montessuit i Lerch, 2013).

Glukoзни transporter 1 je dominantni miokardni izotip tokom fetusnog života, a posle rođenja dolazi do njegove regresije. Suprotno se dešava sa ekspresijom GLUT4 (Santalucia i sar., 1992). U srcu adulta, GLUT4 je dominantnija miokardna izoforma od GLUT1 i ima ga tri puta više (Fischer i sar., 1997). Translokacija GLUT4 je do sada najintenzivnije istraživana, a posebno u odgovoru na insulin (Luiken i sar., 2004a).

U nestimulisanim kardiomiocitima većina GLUT4 je uskladištena unutar ćelije (Slot i sar., 1991; Zorzano i sar., 1997). Kontraksije i hormoni, a naročito insulin su dva glavna fiziološka stimulusa transporta glukoze u kardiomiocitima (Luiken i sar., 2004a), jer indukuju reverzibilnu translokaciju transportera do plazma membrane, u koju se inkorporiraju vezikule koje sadrže GLUT4 (Slot i sar., 1991; Uphues i sar., 1994) i povećavaju stepen transporta glukoze (Zorzano i sar., 1997). Sled unutarćelijskih događaja je tema intenzivnih istraživanja i poznato je da insulinom indukovana translokacija GLUT4 uključuje različite signalne puteve i obuhvata aktivaciju insulinskog receptora i IRS na tirozinu, što je praćeno njegovim vezivanjem za PI3K (**Slika 5**). To dovodi do aktivacije ove kinaze i proizvodnje PIP3. Nishodno od PI3K, transdukcija signala nedovoljno je poznata, ali se zna da su PKB/Akt i atipične PKC uključene u regulaciju lokalizacije GLUT4 u masnom tkivu i skeletnim mišićima (Watson i Pessin, 2001; Farese, 2002). Iako precizna uloga Akt/PKB u translokaciji GLUT4 ostaje da se utvrdi, istraživanja pokazuju da fosforilacija Akt ima ključnu ulogu u insulin stimulisanoj translokaciji GLUT4. Pokazano je da u izolovanim kardiomiocitima, nakon tretmana insulinom dolazi do stimulacije interakcije PKB/Akt i vezikula koje sadrže GLUT4 (Kessler i sar., 2001), kao što je pokazano i na adipocitima (Heller-Harrison i sar., 1996; Calera i sar., 1998; Ducluzeau i sar., 2002). Ovo sugerije da PKB/Akt fosforiliše proteinske komponente vezikula koje sadrže GLUT4 u odgovoru na insulin (Kupriyanova i Kandror, 1999). Novija istraživanja su pokazala da Akt fosforiliše AS160 protein (engl. *Akt substrate of 160 kDa*) i tako favorizuje translokaciju GLUT4 u adipocitima i miocitima (Kramer i sar., 2006b; Ginion i

sar., 2011; Montessuit i Lerch, 2013). Treba imati u vidu da transport glukoze posredovan GLUT može da bude stimulisan i preko insulin nezavisnih mehanizama. Na primer, protein kinaza aktivirana AMP-om (AMPK, engl. *AMP-activated protein kinase*) takođe dovodi do preraspodele GLUT na plazma membrani (Li i sar., 2004a; Yang i Holman, 2005) (Slika 5).

Distribucija GLUT1 je uglavnom ograničena na ekstrahepatična tkiva osetljiva na insulin. U poređenju sa drugim tkivima, u srcu se eksprimira relativno velika količina GLUT1 (Fischer i sar., 1997). Za razliku od GLUT4, koji je uskladišten pretežno unutarćelijski, GLUT1 je uglavnom lokalizovan u plazma membrani i smatra se da posreduje u održavanju bazalnog transporta glukoze. Međutim, sve je više podataka koji ukazuju da insulin podstiče translokaciju unutarćelijskog GLUT1 do plazma membrane kardiomiocita (Fischer i sar., 1997; Becker i sar., 2001), ali znatno umerenije u poređenju sa njegovim efektom na GLUT4 (Rett i sar., 1996; Fischer i sar., 1997; Egert i sar., 1999). Signalni mehanizmi uključeni u translokaciju GLUT1 slični su onima za GLUT4, u kojima je PI3K odgovorna za insulinom indukovanu translokaciju GLUT (Egert i sar., 1999).

#### 1.2.3.4. *Transport masnih kiselina*

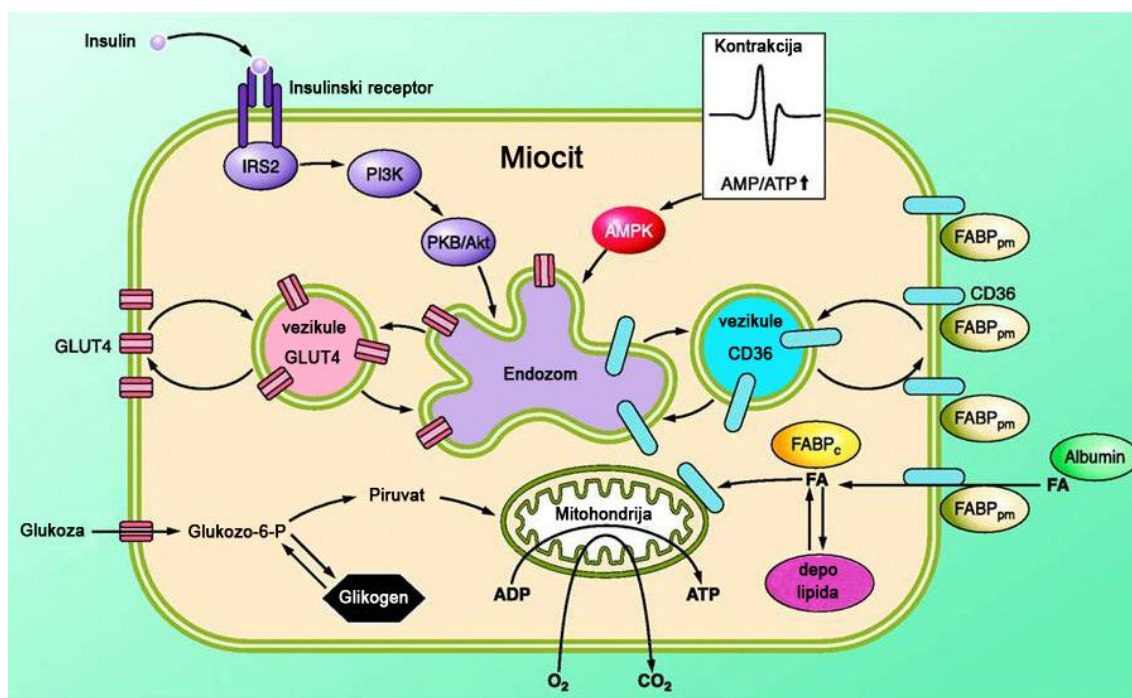
Mehanizam transporta FFA u ćeliju nije još uvek kompletno utvrđen, ali postoje dokazi da one ulaze u kardiomiocite pomoću transmembranskog transporta posredovanog proteinima, koji verovatno koegzistira sa njihovom pasivnom difuzijom kroz fosfolipidni matriks (Glatz i sar., 1997; Glatz i sar., 2002). Prema tome, ulazak masnih kiselina u srce zavisi kako od koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji, tako i od regulacije transportera (Bonen i sar., 2007; Kampf i Kleinfeld, 2007). Membranski asocirani proteini su: protein plazma membrane koji vezuje masne kiseline (FABP, engl. *fatty-acid-binding protein*), translokaza masnih kiselina (FAT/CD36, engl. *fatty acid translocase*) i

dve izoforme familije transportnih proteina za masne kiseline (FATP, engl. *fatty-acid transport protein*) FATP1 i FATP6. Svi ovi transporteri su detektovani u srcu na nivou RNK i proteina (Luiken i sar., 1997; Van Nieuwenhoven i sar., 1999).

Tretman insulinom i eksperimentalno stimulisane mišićne kontrakcije povećavaju transport FFA u izolovanim kardiomiocitima pacova (Glatz i sar., 2006). Ovi stimuli indukuju transport energetskih supstrata korišćenjem različitih signalnih puteva (Luiken i sar., 2004a; Koonen i sar., 2005). Insulin aktivira put PI3K, a kontrakcije aktiviraju signalni put proteinske kinaze aktivirane AMP-om i oba puta deluju na transport glukoze, posredstvom GLUT4 i transport FFA, posredstvom CD36. Pri tome je insulinom-indukovan transport glukoze i FFA kumulativan na kontrakcijama indukovani transport supstrata. Još nije jasno da li se nishodno od PI3K i AMPK signalni putevi mogu granati da bi dozvolili odvojenu mobilizaciju CD36 i GLUT4 (Luiken i sar., 2003; Luiken i sar., 2004a) (**Slika 6**).

CD36 i FABP su funkcionalno važni transporteri FFA jer je u miocitima oko 80% transporta FFA posredovano kooperativnim dejstvom ova dva transportera. FABP je konstitutivno prisutan na ćelijskoj površini, dok CD36 reciklira između unutarćelijskih depoa i plazma membrane (Luiken i sar., 2004a). Postoji direktna interakcija između transmembranskog proteina CD36 i perifernog membranskog proteina FABP na nivou plazma membrane (Luiken i sar., 1999; Luiken i sar., 2004b). Insulin ne menja samo sadržaj proteina, već povećava i redistribuciju supstratnog transportera CD36 ka plazma membrani, što rezultuje u povećanju stepena transporta FFA u ćeliju (Luiken i sar., 2002c; Bonen i sar., 2003). Ovaj koncept regulacije se razlikuje od klasičnog po kome je iskorišćavanje supstrata u srcu primarno regulisano enzimima intermedijarnog metabolizma (Randle i sar., 1963). Pokazano je da se i FABP translocira do plazma membrane pri izlaganju miocita kontrakciji, dok insulin nema uticaja na njegovu distribuciju u ćeliji (Luiken i sar., 2004b; Chabowski i sar., 2005). Da li je

FATP1 i/ili 6 takođe supstrat recikliranja između unutarćelijskih depoa i plazma membrane još uvek nije jasno (Glatz i sar., 2006).

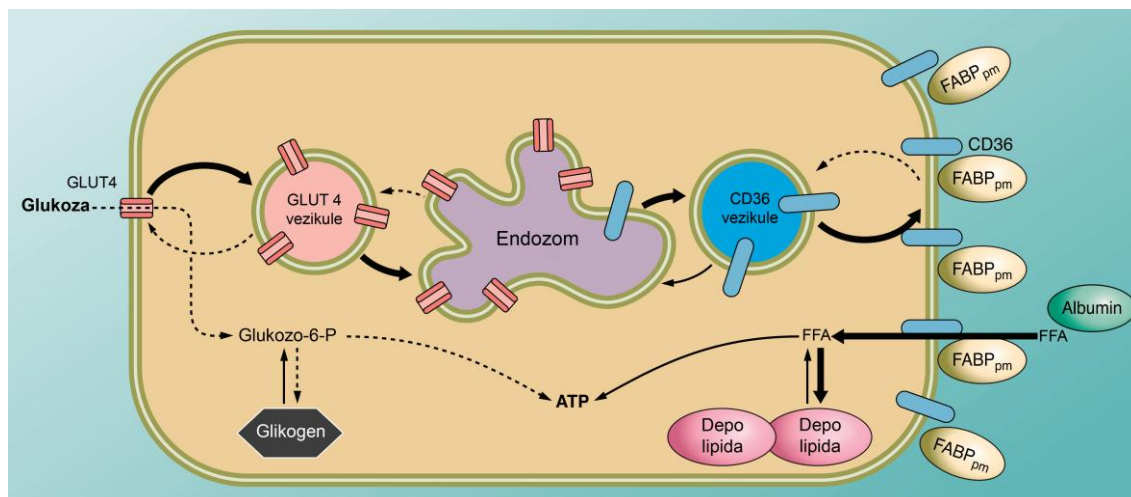


**Slika 6. Transport glukoze i masnih kiselina u srcu.**

Transport glukoze i masnih kiselina u ćelijama srca je povećan nakon translokacije specifičnih proteina- transportera (prikazani su CD36 i GLUT4) do plazma membrane u odgovoru na stimulaciju insulinom ili tokom pojačane kontraktilne aktivnosti. CD36 i GLUT4 mogu biti mobilisani iz različitih depoa u endozomskim odeljcima. IRS2: supstrat receptora za insulin tipa 2; PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza; PKB/ Akt: protein kinaza B; glukoza-6-P: glukoza-6-fosfat; AMP: adenzin-monofosfat; ATP: adenzin-trifosfat; AMPK: protein kinaza aktivirana AMP-om; ADP: adenzin-difosfat; FFA: slobodne masne kiseline; FABPpm: protein plazma membrane koji vezuje masne kiseline; CD36: translokaza masnih kiselina; GLUT4: glukozni transporter tipa 4 (Glatz i sar., 2010).

Međutim, transport FFA posredstvom CD36 i FABP nije kumulativan, kao što je to slučaj sa transportom glukoze u masno i mišićno tkivo, koji je suma delovanja GLUT1 i GLUT4 (Mueckler, 1994). Stoga, ova dva transportera FFA imaju različite međusobne odnose u poređenju sa glukoznim transporterima u srcu. Dva glukozna transportera GLUT1 i GLUT4 srca, iako se transportuju do plazma membrane istim stimulusima, deluju paralelno i nezavisno jedan od

drugog. Za razliku od njih, FFA transporteri, CD36 i FABP, najverovatnije deluju kao dve komponente pojedinačnog transportnog sistema, i tako su pozicionirani u seriji (Luiken i sar., 2004a).



**Slika 7. Translokacija transportera za glukoze i slobodne masne kiseline u miocitima u stanju dijabetesa.**

U stanju dijabetesa dolazi do povećane translokacije translokaze masnih kiselina CD36 iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane što dovodi do povećanog unosa FFA, skladištenja FFA u triacilglicerole, a zatim i inhibicije insulinskog signalinga pomoću metabolita FFA kao što su diacilglicerol i ceramidi. Translokacija GLUT4 iz endozoma do plazma membrane je inhibirana, što dovodi do smanjenog unosa glukoze i smanjene sinteze glikogena. FFA: slobodne masne kiseline; FABP<sub>pm</sub>: vezujući protein FFA; *glucose-6-P*: *glukoze-6-fosfat*; ATP: adenozin trifosfat; CD36: translokaza masnih kiselina; GLUT4: glukoze transporter tipa 4 (Glatz i sar., 2010).

Takođe je pokazano da u mnogim patofiziološkim stanjima dolazi do promene u translokaciji FAT/CD36 transportera. Luiken i saradnici (Luiken i sar., 2001) i Bonen i saradnici (Bonen i sar., 2004) su pokazali da kod gojaznih pacova i ljudi, kao i pacijenata sa dijabetesom tipa 2, dolazi do povećanog transporta masnih kiselina što je u vezi sa povećanom translokacijom transportera FAT/CD36 iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane (Slika 7).

### 1.2.3.5. Unutarćelijski depoi transportera za glukozu i masne kiseline

Pošto su isti signalni putevi uključeni u mobilizaciju GLUT4 i CD36 može se pretpostaviti da se oba transportera nalaze u sličnim unutarćelijskim depoima.

Identifikovana su dva različita unutarćelijska depoa za GLUT4 u srcu. Veliki ili preendozomni depoi sadrže GLUT4, ali ne i GLUT1, i omogućavaju translokaciju GLUT4 do plazma membrane u odgovoru na insulin. Sa druge strane, mali depoi ili endozomi koji sadrže i GLUT4 i GLUT1 su osetljivi na rotenon i insulin (Fischer i sar., 1997; Becker i sar., 2001). Dakle, rotenon utiče na translokaciju GLUT1 i GLUT4, dok insulin translocira jedino GLUT1 iz endozoma (Kessler i sar., 2000). Još nema dovoljno eksperimentalni dokaza ali pretpostavlja se da postoji treće skladište u kardiomiocitima za GLUT4, koje odgovara na kontrakcije. Do sada je pokazano postojanje takvih depoa na skeletnih mišića ali ne i srca. Dostupni podaci ukazuju da se 40-60% GLUT4 nalazi u takvim skladištima (Luiken i sar., 2004a).

Postoje dokazi da je CD36 prisutan u endozomnim vezikulama kardiomiocita i miocita. Pokazano je da preendozomi, koji sadrže samo GLUT4, ne sadrže i CD36, što je dokaz da se ova dva transportera različito skladište unutar ćelije. Postavlja se pitanje da li se GLUT4 i CD36 nalaze u okviru istog endozomnog odeljka, ili se skladište u različitim pododeljcima u okviru endozoma (Glatz i sar., 2010). Neočekivano, zapaženo je da se CD36 može nalaziti na mitohondrijama, gde izgleda doprinosi regulaciji oksidacije masnih kiselina (Glatz i sar., 2010). Translokaza masnih kiselina se skladišti zajedno sa Rab11, članom Rab familije malih GTP-vezujućih proteina, koji se pretežno nalazi u reciklirajućim endozomima (Muller i sar., 2002). Stoga se pretpostavlja da su endozomi, koji sadrže deo GLUT4 i kompletnu populaciju unutarćelijskog GLUT1, kandidati za skladištenje i CD36 u ćeliji.

Pošto je za oba supstrata, glukozu i FFA, transport kroz plazma membranu ograničavajući korak, pretpostavlja se da je supstratna prednost u



srcu određena uglavnom na nivou plazma membrane, pre nego kompeticijom za oksidaciju, kao što su predložili Randle i saradnici (Randle i sar., 1963). Prekomerna ekspresija transportera masnih kiselina, CD36 i FABP, povećava transport FFA (Isola i sar., 1995; Ibrahimi i sar., 1996), ali stepen transporta FFA zavisi i od dužine trajanja stimulacije. U srcu i skeletnim mišićima kratkotrajno izloženim insulinu (15 minuta) i stimulisanim mišićnim kontrakcijama, stepen transporta FFA je povećan zbog translokacije CD36 iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane (Bonen i sar., 2000; Luiken i sar., 2002b; Luiken i sar., 2002c). U streptozotocinom indukovanom modelu dijabetesa (Luiken i sar., 2002a) kao i prilikom višednevno stimulisane mišićne kontrakcije (Bonen i sar., 1999) ekspresija iRNK i proteina CD36 je povećana pri čemu je stepen promena transporta FFA u direktnoj vezi sa sadržajem CD36 na membrani (Bonen i sar., 1999; Steinberg i sar., 2002).

#### 1.2.3.6. *Promene metabolizma u srcu tokom dijabetesa*

Tokom dijabetesa i u stanju insulinske rezistencije dolazi do promene energetskog metabolizma u srcu, koje karakteriše smanjeno iskorišćenje glukoze, smanjena oksidacija laktata i povećano korišćenje masnih kiselina kao energetskog supstrata (Glatz i sar., 2006; Coort i sar., 2007). Sistemski deficit insulina ili insulinska rezistencija menja dostupnost supstrata srcu (Abel, 2004), što znači da su patološka stanja usko povezana sa narušavanjem balansa u korišćenju supstrata (Glatz i sar., 2006). Na primer, hipertrofija srca je povezana sa povećanim korišćenjem glukoze (Kagaya i sar., 1990; van der Vusse i sar., 2000), dok sa druge strane srce dijabetičara koristi više FFA (Rodrigues i sar., 1998; Shulman, 2000; Unger i Orci, 2001). Takođe, kod gojaznih *Zucker* pacova, transport FFA u srcu je povećan dva puta (Luiken i sar., 2001).

Glukoza i masti su glavni energetski supstrati koji su pogođeni tokom dijabetesa. Sa povećanjem unutarćelijskog sadržaja masnih kiselina, srčano

tkivo se brzo prilagođava za njihovo korišćenje. U srcu dijabetičnih ili gojaznih pacova, korišćenje glukoze je ugroženo na nekoliko nivoa. Kod životinja sa dijabetesom tipa 1, smanjenje ekspresije GLUT utiče na transport i oksidaciju glukoze u srcu (Camps i sar., 1992). Promena korišćenja energetskih supstrata u srcu, od ugljenih hidrata ka mastima, povećava unutarćelijski sadržaj glikogena, najverovatnije preko povećanja sinteze glikogena ili slabljenja glikogenolize, ili kombinacijom oba procesa (Shipp i Murthy, 1980; Montanari i sar., 2005).

U uslovima gde snabdevanje masnim kiselinama menja oksidativni kapacitet ćelija, kao što su dijabetes ili gojaznost, dolazi do nagomilavanja lipidnih metabolita kao što su acil CoA dugih lanaca, diacil-glicerol (DAG), ceramidi i/ili trigliceridi što dovodi do aktivacije različitih serin kinaza i negativne modulacije insulinskog delovanja (Hirosumi i sar., 2002; Itani i sar., 2002; Yu i sar., 2002; Morino i sar., 2006). Nagomilavanje lipidnih metabolita na kraju može dovesti do lipotoksičnosti (Zhou i sar., 2000; Unger, 2002).

Povećano preuzimanje masnih kiselina, kao i povećanje metabolizma ne samo da povećava nagomilavanje međuprodukata masnih kiselina i triglicerida u srcu, nego dovodi i do povećanja potreba za kiseonikom i stvaranja ROS, koji mogu da oksiduju visoko nezasićene lipide u mitohondrijama, kao što je kardiolipin (CL, engl. *cardiolipin*) i dovedu do oštećenja ćelija srca (An i Rodrigues, 2006; Han i sar., 2007). Odstupanje u metabolizmu masti koje postoji u dijabetičnom miokardu uključuje i nagomilavanje acil-karnitina što direktno utiče na disfunkciju mitohondrija, i predstavlja mogući mehanizam koji doprinosi izmenjenom metabolizmu i hemodinamskoj efikasnosti (Han i sar., 2007). Sve ove promene zajedno doprinose nagomilavanju toksičnih lipida u srčanom mišiću tokom dijabetesa što može ugroziti funkcijski integritet mnogih membranskih sistema (Han i sar., 2007).

Povećano preuzimanje masnih kiselina preko povećane aktivnosti i ekspresije kardijačne LPL (Yagyu i sar., 2003) ili transportnih proteina za masne kiseline, kao i povećanje oksidacije FFA preko  $\alpha$  receptora koji aktivira

proliferaciju peroksizoma (PPAR- $\alpha$  engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) (Finck i sar., 2002) ili dugih lanaca acil CoA sintaze (Chiu i sar., 2001), dovodi do stanja dijabetične kardiomiopatije. Obrnuto, normalizacija srčanog metabolizma kod dijabetičnih životinja dovodi do prestanka razvoja kardiomiopatije (Belke i sar., 2000; Zhou i sar., 2000).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Insulinska deficijencija i hiperglikemija, koje predstavljaju osnovne karakteristike dijabetesa tipa 1, povezane su sa brojnim endokrinim i metaboličkim promenama, a jedna od najčešćih komplikacija je povećana učestalost nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Zbog toga je rana i adekvatna primena terapije insulinom neophodna, kako za kontrolu bolesti, tako i za prevenciju potencijalnih komplikacija.

Polazna hipoteza istraživanja, čiji su rezultati obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom, bila je da u stanju hipoinsulinemije i hiperglikemije može doći do promena u signalnom putu insulina u srcu, što može da se odrazi na produkciju NO i iskorišćavanje energetskih supstrata, a da bi supstitucija insulinom trebala da koriguje nastale promene.

Cilj predložene doktorske disertacije je bio da se u srcu pacova sa streptozotocinom-indukovanim dijabetesom tipa 1 i nakon hormonske supstitucije ispita ekspresija i fosforilacija proteinskih kinaza PKB/Akt i ERK1/2 koje predstavljaju medijatore gotovo svih efekata insulina u srcu. Osim toga analizirani su i efektni molekuli regulisani ovim signalnim putevima, kao što su eNOS i iNOS, odgovorni za sintezu NO, kao i molekuli koji su uključeni u transport energetskih supstrata glukoze (GLUT4 i GLUT1) i masnih kiselina (CD36).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Hemikalije

Sve hemikalije korišćene u ovom radu su p.a. stepena čistoće.

Od firme Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA) su nabavljene sledeće hemikalije: streptozotocin, natrijum-citrat, nitrat-reduktaza (iz *Aspergillus niger*), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat ( $\beta$ -NADPH, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), L-glutamat dehidrogenaza, L-Arginin monohidrohlorid, ninhidrin,  $\beta$ -aktin, albumin goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*), leupeptin, natrijum dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*),  $\beta$ -merkaptotanol, fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*), triton X-100, akrilamid, bisakrilamid, Tween-20, agaroza. Od firme SERVA electrophoresis, Heidelberg, Germany, nabavljene su sledeće hemikalije: Tris baza, glicin, aprotinin i TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin). Za hemiluminiscentnu detekciju Western blot-a korišćen je ECL supstrat, proizvod firme Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). Za detekciju alkalnom fosfatazom korišćen je supstrat BCIP/NBT (engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium*), proizvod firme Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

Reagensi za esej bicinoninične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) su proizvodi firme Pierce, Rockford, IL, USA.

Za određivanje koncentracije insulina u plazmi korišćen je radioaktivnim izotopom obeleženi insulin (Ins- $I^{125}$  specifične radioaktivnosti

85kBq), RIA kit, proizvod firme INEP (Zemun, Srbija). Svinjski insulin je proizvod firme Galenika (Zemun, Srbija).

Antitela koja su korišćena u Western blot analizi su nabavljena od sledećih proizvođača: zečija poliklonska anti-iNOS (sc-650), anti-GLUT-4 (sc-7938), anti-GLUT-1 (sc-7903), anti-CD36 (sc-9154), anti-fosfo-pAkt1/2/3 (Ser<sup>473</sup>) (sc-7985) i kozje poliklonsko anti-fosfo-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (sc-12972) antitela su proizvodi firme Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Zečije poliklonsko anti-Akt1/2/3 (9272), anti- ERK1/2 (9102) i anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (9101) su proizvodi firme Cell Signaling Technologies, Inc. (Danvers, MA, USA). Zečije poliklonsko anti-eNOS (PA3-031) je proizvod firme Affinity Bioreagents Inc. (Golden, CO, USA). Monoklonsko mišje anti-β aktin antitelo (A5316) je proizvod firme Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Sekundarna antitela obeležena peroksidazom iz rena (HRP, eng. *horse-radish peroxidase*) ili alkalnom fosfatazom su proizvodi firme Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Za izolaciju RNK korišćen je Trizol reagens, proizvod firme Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Sve hemikalije korišćene za reverznu transkripciju i lančanu polimeraznu reakciju (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*), kao što su First Strand cDNA Synthesis Kit, rekombinantna Taq polimeraza, deoksiribonukleotid trifosfat (dNTP, engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*) i 10x PCR pufer su nabavljene od firme Fermentas (Vilnius, Lithuania). Svi "prajmeri" korišćeni za PCR su proizvodi firme Metabion (Martinsried, Germany).

Proteinski marker, ProteinPlus Prestained Ladder, kao i DNK marker, GeneRuler DNA Ladder su produkti firme Fermentas (Vilnius, Lithuania).

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

### 3.2. Eksperimentalne životinje

U svim eksperimentima korišćeni su mužjaci pacova soja *Wistar*, starosti 2–2,5 meseca, mase 200–250g. Životinje su odgajane u regulisanim laboratorijskim uslovima i režimu ishrane, pri konstantnoj temperaturi od 22 °C, vlažnosti 55% i svetlosnom režimu 12 h svetlost/12 h mrak, sa slobodnim pristupom hrani i vodi, u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“. Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od Etičkog komiteta za upotrebu eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Sve životinje su merene na početku i na kraju eksperimenta. Za uspostavljanje eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 1, životinje su tretirane streptozotocinom (engl. *N-(Methylnitrosocarbamoyl)- $\alpha$ -D-glucosamine*), koji svojim toksičnim delovanjem dovodi do selektivnog razaranja  $\beta$  ćelija pankreasa (Junod i sar., 1967; Rerup, 1970). Streptozotocin je u stanju da izazove kako blag oblik dijabetesa, tako i onaj sa ozbiljnim posledicama, što zavisi od doze koja se koristi (Junod i sar., 1967).

Metaboličke karakteristike ovog modela dijabetesa tipa 1 uključuju brz razvoj hiperglikemije (25–30 mmol/l), umerenu hipertrigliceridemiju (0,8–1,2 mmol/l), ketozu i značajno smanjenje koncentracije insulina u plazmi (<20 pmol/l) (Tahiliani i McNeill, 1986; Fang i sar., 2004). Kao takav, model je posebno koristan u ispitivanju efekata hiperglikemije, u odsustvu hiperinsulinemije.

Nakon gladovanja preko noći, životinje su injecirane intraperitonealno (*i.p.*) streptozotocinom u dozi od 60 mg/kg telesne težine. Odgovarajuća doza davanja streptozotocinske injekcije procenjena je na osnovu podataka dobijenih iz literature (Junod i sar., 1969; Wohaieb i Godin, 1987; Thulesen i sar., 1997; Balamurugan i sar., 2003). Kontrolne životinje su injecirane 0,1M natrijum-citratnim puferom pH 4,5, u kome je rastvaran streptozotocin. Pet dana nakon tretmana streptozotocinom, nakon gladovanja preko noći, životinjama je iz repne vene uziman uzorak krvi radi određivanja koncentracije glukoze.

Životinje kod kojih je koncentracija glukoze u krvi bila veća od 20 mmol/l su korišćene u eksperimentu i one su činile grupu životinja sa indukovanim dijabetesom. Poznato je da se akutni dijabetes javlja između osmog dana i tri nedelje, a hronični 3 nedelje nakon injekcije streptozotocina (Mulder i sar., 1996). Polovina životinja sa dijabetesom je podvrgnuta subhroničnom tretmanu insulinom u trajanju od 7 dana. Za ove eksperimente, životinje su injecirane subkutano (s.c) insulinom, dozom od 3 IU po životinji. Doza i vreme hormonskog tretmana su izabrani na osnovu podataka dobijenih iz literature (Haughton i sar., 1999; Soudamani i sar., 2005).

Životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe:

1. K kontrolne životinje
2. DM životinje kojima je streptozotocinom izazvan dijabetes
3. DM + INS životinje kojima je streptozotocinom izazvan dijabetes tretirane insulinom

Dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom životinje su žrtvovane dekapitacijom. Pre žrtvovanja, kako bi se izbegle promene u nivou analiziranih parametara, kao posledica unošenja hrane, životinje su gladovale preko noći. Krv je sakupljana u staklene epruvete u kojima se kao antikoagulans nalazio 6% EDTA i centrifugirana 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehnica LC-321). Nakon centrifugiranja, plazma je prebačena u plastične epruvete i čuvana na -20°C do upotrebe. Uzorci plazme su korišćeni za određivanje koncentracija insulina, slobodnih masnih kiselina i nitrita/nitrata.



### 3.3. Određivanje koncentracije glukoze u krvi

Koncentracija glukoze je određivana u uzorku pune krvi pomoću aparata Accutrend glucometar (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) i izražena u mmol/l.

### 3.4. Određivanje koncentracije insulina u plazmi

Koncentracija insulina u plazmi je određivana RIA metodom, korišćenjem standarda pacovskog insulina. Ova metoda se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka ili standarda i radioaktivno obeleženog insulina ( $^{125}\text{I}$ -insulin, aktivnosti oko 85kBq po bočici) za određene epitope na specifičnim anti-insulin antitelima, pri čemu nastaju radioaktivno obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Inkubacija traje 20 h na sobnoj temperaturi. Ukoliko ima više insulina u uzorku plazme, utoliko se formira manje obeleženog kompleksa. Po završenoj reakciji svi nastali kompleksi su taloženi imunoadsorbentom, 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su centrifugirani 25 min na 3000xg. U nastalom talogu se nalazio vezani insulin, dok su slobodni insulin (obeleženi i neobeleženi), kao i slobodna antitela zaostajala u tečnoj fazi. Radioaktivnost taloga je merena u toku 1 min u scintilacionom brojaču 1219 LKB. Istovremeno sa uzorcima plazme, tretirani su i standardi različitih, precizno definisanih koncentracija insulina (0,3, 3, 10, 30, 100 i 300 mIU/l), pomoću kojih je formirana standardna kriva. Koncentracija insulina u uzorcima plazme je određivana upoređivanjem sa standardnom krivom. Senzitivnost eseja je 0,6 mIU/l, a unutrašnji koeficijent varijacije u eseju 5,24 %.

### **3.5. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi**

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi je određena modifikovanom metodom po Duncombe-u (Duncombe, 1964). Ova kolorimetrijska metoda se zasniva na tome da masne kiseline u hloroformu uz prisustvo odgovarajućeg reagensa (trietanolaminski pufer i  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) grade soli bakra, koje u kontaktu sa dietilditiokarbamatom (DDC, engl. *diethyldithiocarbamate*) grade kompleksno jedinjenje žute boje, sa maksimumom apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm. Intenzitet boje je proporcionalan količini slobodnih masnih kiselina. Postupak je izvođen tako što je uzorak plazme inkubiran sa trietanolaminskim puferom (1 mol/l  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 1 mol/l TEA, 6.5%  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) i hloroformom, uz intenzivno mešanje 20 min na sobnoj temperaturi. Inkubaciona smeša je zatim centrifugirana 10 min/3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehtnica LC-231). Nakon centrifugiranja, gornji plavozeleni sloj sa proteinima je u potpunosti uklanjan pomoću vakum pumpe. Iz preostalog hloroformskog sloja sa ekstrahovanim masnim kiselinama, prenošeno je u nove epruvete po 1 ml uzorka u koje je dodavano 0,1 ml 0,2 % DDC. Smeša je inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi i merena je apsorbanca na 436 nm (Ultrospec II, LKB). Standardna kriva je dobijena korišćenjem različitih koncentracija palmitinske kiseline (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 mmol/l).

### **3.6. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata kao indikatora stvaranja NO u plazmi**

Koncentracija nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ), je određivana modifikovanom kolorimetrijskom metodom nitrit reduktaze i metode Grisove

reakcije (Hevel i Marletta, 1994). Njihov odnos je varijabilan i teško predvidljiv, te je najbolji pokazatelj totalne produkcije NO, suma nitrita i nitrata.

Nitrati se uz pomoć koenzima NADP ili NADPH zavisne nitrat reduktaze konvertuju u nitrite, koji se mogu kvantifikovati uz pomoć Grisovog reagensa. Ovaj reagens konvertuje nitrite u ljubičasto azo jedinjenje sa maksimalnom apsorpcijom na 570 nm. NADPH je neophodan kofaktor za nitrat reduktazu, ali u višku interferira sa Grisovim reagensom i utiče na osetljivost metode. Da bi se odstranio višak NADPH, neophodan je dodatni korak nakon redukcije nitrata, koji podrazumeva reakciju NADPH sa L-glutamat dehidrogenazom i  $\alpha$ -ketoglutaratom radi oksidacije NADPH u NADP.

Uzorci plazme su inkubirani 3h na 37 °C sa nitrat-reduktazom u prisustvu  $\beta$ -NADPH. Nitrati su redukovani do nitrita, a višak  $\beta$ -NADPH je uklanjan u reakciji oksidacije sa  $\alpha$ -ketoglutaratom i amonijum-sulfatom, dejstvom enzima L-glutamat dehidrogenaze, 30 min na 37 °C. Nakon redukcije, koncentracija nitrita je određivana dodavanjem istih zapremina uzorka i Grisovog reagensa (mešavina 1:1, 0,1% rastvor naftil etilendiamindihlorida u H<sub>2</sub>O i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i 95% H<sub>2</sub>O). Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 10 min i merena je apsorbanca na 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija nitrata je određena na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanca očitanih za seriju rastvora kalijum nitrata (KNO<sub>3</sub>) poznate koncentracije i izražavana u  $\mu$ mol/l.

### **3.7. Određivanje koncentracije L-arginina**

Koncentracija L-Arg u srcu pacova je određivana modifikovanom spektrofotometrijskom metodom po Kowalczuk (Kowalczuk i sar., 2007). Princip ove metode se zasniva na ninhidrinskoj reakciji, koja se najčešće koristi za kvantitativno određivanje aminokiselina. Reakcijom  $\alpha$ -aminokiseline i

ninhidrina, dolazi do redukcije ninhidrina do hidrindantina, a  $\alpha$ -aminokiselina oksiduje do  $\alpha$ -iminokiseline, koja hidrolizom imino grupe ( $\text{NH}^2$ ) prelazi u  $\alpha$ -keto kiselinu i stvara se amonijak. Nastala  $\alpha$ -keto kiselina, zagrevanjem, usled dekarboksilacije prelazi u odgovarajući aldehid. Oslobođeni amonijak, hidrindantin i višak ninhidrina formiraju plavo obojeno kondenzovano jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 404 nm.

U cilju određivanja koncentracije L-Arg, vršena je derivatizacija ninhidrinom, pri čemu je L-Arg deaminovan i pretvoren u aldehid. Postupak je izvođen tako što je homogenat srca pacova (koncentracija ukupnih proteina 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) razblaživan do zapremine od 2 ml dodavanjem 25 mmol/l Na-fosfatnog pufera, pH 9,0, i 1 ml 2% ninhidrinskog reagensa. Inkubaciona smeša je zagrevana u vodenom kupatilu na 80 °C, 15 min, što predstavlja optimalne uslove sa derivatizaciju. Posle hlađenja merena je absorbanca na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (WALLAC 1420-Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter, LKB). Koncentracija L-Arg je određivana prema standardnoj krivi konstruisanoj na osnovu vrednosti apsorbaneci očitavanih za seriju rastvora L-Arg poznate koncentracije. Intenzitet razvijene boje je direktno proporcionalan koncentraciji L-Arg na 404 nm. Koncentracija L-Arg je izražena u  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### **3.8. Određivanje aktivnosti arginaze**

Aktivnost enzima arginaze u tkivu srca pacova je određivana spektrofotometrijskom metodom po Koralizi (Corraliza i sar., 1994). Arginaza je enzim koji katalizuje prevođenje L-Arg u L-ornitin i ureu, te se ova metoda zasniva na merenju količine nastale uree u uzorku, koja je direktno proporcionalna aktivnosti enzima. Lizati tkiva srca pacova (4 mg/ml) su inkubirani sa 10 mmol/l  $\text{MnCl}_2$  u 25 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4 na temperaturi od 55 °C u trajanju od 10 min, da bi došlo do aktivacije enzima. Hidroliza L-Arg je izvedena dodavanjem 0,5 mmol/l L-Arg u 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /0,05%  $\text{NaHCO}_3$ , pH

9,7 u predhodno aktivirani uzorak, a zatim je smeša inkubirana na 37 °C, 60 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem smeše kiselina i vode ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ ) u odnosu 1:3:7. Nakon dodavanja 9%  $\alpha$ -izonitrozopropiofenona (ISPF) rastvaranog u 100% etanolu, uzorci su inkubirani na 100 °C u trajanju od 45 min. Posle 10 min hlađenja na sobnoj temperaturi u mraku (da bi se razvila boja), određivana je apsorbanca na 550 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Wallac, 1420-Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter, LKB). Aktivnost enzima arginaze je određivana iz standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbaneci očitavanih za seriju rastvora uree poznate koncentracije. Aktivnost arginaze je izražavana u nmol uree/min/mg proteina.

### 3.9. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana kolorimetrijskom metodom, korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kompleta BCA (Smith i sar., 1985). BCA u formi natrijumove soli je senzitivna, stabilna i visoko specifičan reagens za jone  $\text{Cu}^{1+}$ . BCA proteinski esej kombinuje biuretsku reakciju (protein redukuje  $\text{Cu}^{2+}$  jone do  $\text{Cu}^{1+}$  u alkalnoj sredini) sa jedinstvenim karakteristikama BCA. Ružičasti obojeni produkt ovog esej se formira helacijom dva molekula BCA sa jednim jonom  $\text{Cu}^{1+}$ , hidrosolubilan je i snažno apsorbuje svetlost talasne dužine 562 nm. Ovo omogućava spektrofotometrijsku kvantifikaciju proteina u rasponu koncentracija od 20 do 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Koncentracija ukupnih proteina je preračunavana sa standardne krive, konstruisane na osnovu izmerenih vrednosti apsorbaneci poznatih rastućih koncentracija BSA (0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2 mg/ml).

### 3.10. Priprema ćelijskog lizata srca

Nakon dekapitacije, izolovana srca su merena, seckana, pulovana i homogenizovana u 4 zapremine (m:V) hladnog pufera za liziranje (4 °C; pH 7,5) koji sadrži 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 10% glicerol i 1% Triton X-100, kome su neposredno pred rad dodavani proteazni inhibitori (1 mmol/l PMSF, 5 µg/ml leupeptin, i 2 µg/ml aprotinin) i fosfatazni inhibitor (100 mmol/l natrijum fluorid). Homogenizovanje je rađeno na ledu, korišćenjem Ultra-Turrax homogenizera. Homogenati tkiva srca su uz povremeno blago mešanje stajali 30 min na 4°C i nakon toga su centrifugirani 45 min na 17000 xg na 4 °C (Eppendorf 5417). U dobijenom supernatantu, koji predstavlja lizat ćelija srca, određivana je koncentracija proteina BCA metodom.

### 3.11. Izolovanje citoplazmatske i membranske proteinske frakcije iz tkiva srca

Za izolovanje citoplazmatske i membranske proteinske frakcije iz srca pacova, bez uzajamne kontaminacije, korišćen je ProteoJet Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas, Lithuania). Obe frakcije sadrže čiste, nedenaturisane proteine koji mogu biti direktno korišćeni u različitim aplikacijama.

Postupak je izvođen prema uputstvu proizvođača: 20–40 mg svežeg ili zamrznutog tkiva je prano sa 4 ml hladnog komercijalnog rastvora za ispiranje ćelija (*Cell Wash Solution*). Nakon toga, tkivo je seckano i homogenizovano sa 1 ml *Cell Permeabilization Buffer*, uz korišćenje staklo-staklo homogenizera kako bi se dobila homogena suspenzija. U homogenat je dodavano 1 ml hladnog *Cell Permeabilization Buffer* i suspenzija je prebacivana u mikrotube. Smeša je inkubirana 10 minuta na 4 °C uz kontinuirano mešanje, nakon čega je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 16000 xg na 4 °C (Eppendorf 5417). Supernatant,

koji predstavlja citoplazmatsku frakciju, je pažljivo uklanjan i prebacivan u mikrotube.

Čvrst talog koji se dobija nakon centrifugiranja je razbijan mešanjem, radi bolje ekstrakcije. Na talog je dodavano 0,5 ml pufera za ekstrakciju membranske proteinske frakcije (*Membrane Protein Extraction Buffer*). Smeša je inkubirana 30 minuta na 4 °C u termomikseru (Vallac100) uz snažno mućkanje na 1400rpm i nakon toga je centrifugirana 15 minuta na 16000 xg na 4 °C (Eppendorf 5417). Dobijeni supernatant predstavlja frakciju plazma membrana (PM).

U dobijenim frakcijama koncentracija proteina je određivana BCA metodom.

### **3.12. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)**

Proteini izolovani iz srca su razdvajani po molekulskoj masi SDS-elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, po metodi Laemmli (Laemmli, 1970). Denaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza se zasniva na disocijaciji i denaturaciji proteina u linearne polipeptidne lance uz pomoć anjonskog deterdženta SDS. Izolovani ćelijski lizati su razblaživani do koncentracije 5 mg/ml odgovarajućim puferom i zatim finalno do 2,5 mg/ml dodavanjem iste zapremine 2 x Lemli pufera (100 mmol/l Tris-HCl pH 6,8, 200 mmol/l β-merkaptoetanol, 4% SDS, 0,2% brom fenol plavo i 20% glicerol), kuvani 5 min na 100 °C, ohlađeni na sobnoj temperaturi i čuvani na -20 °C do korišćenja. Uzorci proteina (50 µg/bunariću) su nanošeni na 10% poliakrilamidni gel i u Tank puferu za elektroforezu (0,025 mol/l Tris-HCl pH 8,3, 0,192 mol/l glicin i 0,1% SDS) razdvajani po molekulskoj masi pomoću mini sistema za elektroforezu (Mini Protean Electrophoresis Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Kao proteinski marker za elektroforezu, korišćen je ProteinPlus Prestained

Ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania), koji sadrži 6 proteina različitih molekulskih masa (132 kDa, 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa i 23 kDa). Elektroforeza je trajala 1,5 h pri konstantnom naponu od 100 V. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu.

### 3.13. „Western blot“ analiza

„Western blot“ je semikvantitativna tehnika koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u uzorku. Nakon razdvajanja proteina SDS-PAG elektroforezom, proteini sa poliakrilamidnog gela se prenose na poliviniliden fluorid membranu (PVDF, Hybond-P, membrana, veličine pora 0.45  $\mu\text{m}$ , Amersham), na kojoj se specifični proteini detektuju korišćenjem primarnih antitela specifičnih za ciljni protein i sekundarnih antitela kuplovanih sa enzimom, čija se aktivnost detektuje prisustvom obojenog ili hemiluminiscentnog produkta. Elektroforetski transfer sa gela na membranu je rađen preko noći na 4 °C, pri konstantnoj jačini struje limitiranoj na 0,1 A u aparatu za mokri transfer (Trans Blott Cell, Bio-Rad). Za transfer je upotrebljavan Transfer pufer (0,025 mol/l Tris pH 8,3, 0,192 mol/l glicin i 20% metanol). Nakon završenog transfera, PVDF membrane su inkubirane 1-2 h na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje, u puferu za blokiranje (TBST pufer: 25 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0,1% Tween 20 pH 8,0 i 5% BSA ili 5% obrano mleko u prahu), kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za membranu.

Membrane su zatim inkubirane preko noći na 4 °C, sa primarnim antitelima na fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>), Akt, GLUT4, GLUT1, CD36, fosfo ERK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), ERK, peNOS (Ser<sup>1177</sup>), eNOS, iNOS ili  $\beta$ -aktin. Razblaženja primarnih antitela bila su 1:1000. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 5 x 5 min TBST puferom na sobnoj



temperaturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja membrane su inkubirane 1,5 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje sa sekundarnim anti-zečijim ili anti-kozjim antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženje 1:10000, TBST) ili alkalnom fosfatazom (razblaženje 1:5000, TBST). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima, membrane su ponovo ispirane 5 x 5 min u TBST puferu.

Radi vizualizacije traka, u slučaju kada su sekundarna antitela bila konjugovana sa HRP, na membrane je nanošen supstrat za hemiluminiscenciju (ECL, engl. *enhanced chemiluminescence*). Supstrat za ECL sadrži istu zapremina luminola i rastvora vodonik-peroksida, koji u prisustvu HRP enzima na sekundarnom antitelu dovodi do hemijske reakcije (oksidacije luminola) i do oslobađanja energije u obliku svetlosti. Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega se pristupilo razvijanju. Membrane su sušene, pokrivane tankom plastičnom folijom i postavljane u kasetu za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane je postavljan rentgen film (ORTO CP-G-PLUS, AGFA), pri čemu je dužina ekspozicije varirala od 5–10 min. Intenzitet signala na filmu odgovara količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Ako su sekundarna antitela bila vezana za alkalnu fosfatazu, na membrane je nanošen Tris pufer pH 9,5 (100 mmol/l Tris-HCl pH 9,5, 100 mmol/l NaCl i 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), koji sadrži supstrat za alkalnu fosfatazu (BCIP/NBT). Membrana je inkubirana uz blago mešanje u mraku do razvijanja plavo-ljubičaste boje, nakon čega je intenzivno spiran vodom i sušen pre kvantifikacije.

Posle analize fosforilisanih formi proteina (pAkt, peNOS i pERK), membrane su stripovane 30 min na 50 °C u puferu koji sadrži: 62,5 mmol/l TRIS pH 6,7, 2% SDS i 100 mmol/l β-merkaptetanol). Stripovanje membrane podrazumeva uklanjanje supstrata, primarnog i sekundarnog antitela i vraćanje membrane u isto stanje u kome se nalazila nakon skidanja sa transfera. Nakon ispiranja i blokiranja nespecifičnog vezivanja, membrane su ponovo inkubirane sa antitelima koja detektuju totalnu količinu Akt, eNOS i ERK. Da bi bili sigurni da je na gelove naneta jednaka količina proteina u svim uzorcima ćelijskog

lizata, korišćena su antitela na  $\beta$ -aktin, kao kontrola unosa uzoraka na gel tj. *loading* kontrola. Ovo antitelo je izabrano kao marker jer na njegovu količinu primenjeni tretman nema efekta.

Kvantifikacija rezultata dobijenih u Western blot-u vršena je 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).

### 3.14. RT-PCR

Za određivanje efekata tretmana na ekspresiju određenih gena u srcu, korišćena je metoda reverzne transkripcije PCR (RT-PCR). Ukupna RNK izolovana iz tkiva je prevođena u cDNK koja je zatim amplifikovana korišćenjem specifičnih "prajmera" za Akt, eNOS, iNOS, GLUT4, GLUT1, CD36 ili tzv. „housekeeping“ gen gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH).

#### 3.14.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana Trizol reagensom. Smrznuto, pulovano tkivo srca (100 mg) je homogenizovano u 1 ml Trizola, u staklo-staklo homogenizeru. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 12000 xg (Eppendorf 5417), talog je odbacivan, a u supernatant je dodavano 0,2 ml hloroforma na 1 ml supernatanta. Uzorci su inkubirani 5 min na 30 °C i ponovo cetrifugirani 10 min na 12000 xg (Eppendorf 5417). Vodena faza je pažljivo skupljana i dodavano je 3 mol/l natrijum acetata pH 5 u odnosu 1:10. Nakon mešanja dodavano je 2 volumena apsolutnog etanola i uzorak je ostavljan preko noći na -20 °C da se precipitira. Nakon precipitacije, uzorak je centrifugiran 10 min na 4 °C, na 12000 xg (Eppendorf 5417), odlivan je supernatant i talog je pran 75% etanolom.

Uzorak je centrifugiran 5 min na 12000 xg na 4 °C, a dobijeni talog ostavljan da se osuši 10–15 min na vazduhu. Osušeni talog je rastvaran u 100 µl DEPC vode.

*Određivanje koncentracije RNK:* Koncentracija RNK je određivana spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific) merenjem apsorpcije uzorka na 260 nm. Stepem prečišćenosti izolovane RNK je određivan poređenjem odnosa apsorpcije na 260 nm *vs.* 280 nm; odnos OD<sub>260</sub>: OD<sub>280</sub> = 2 ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku.

*RNK elektroforeza:* Za određivanje integriteta izolovane RNK rađena je horizontalna elektroforeza na 1,2% agaroznom gelu kome je dodavan etidijum bromid. Elektroforeza je trajala 30 min pri konstantnoj voltaži od 100 V.

### **3.14.2. Reverzna transkripcija**

Za sintezu cDNK iz RNK korišćen je First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, jednake količine ukupne RNK (2,5 µg) su denaturisane na 70 °C i reverzna transkripcija je izvedena inkubacijom sa 40 U enzima M–MuLV reverzne transkriptaze na 37 °C, u prisustvu 1 µl oligo(dT)<sub>16</sub> „prajmera“, 2 µl 10 mmol/l dNTP, 20U RiboLock ribonukleaznog inhibitora i 5x First Strand pufera. Ukupna zapremina reakcione smeše je bila 20 µl. Reakcija je prekinuta zagrevanjem na 70 °C 10 min. Dobijene cDNK su čuvane na -20 °C do upotrebe.

### **3.14.3. Semi-kvantitativan PCR**

Za semikvantitativni PCR, korišćeno je 3 µl cDNK što je ekvivalentno količini od 375 ng ukupne RNK. Uzorci cDNK su amplifikovani korišćenjem Hot Start Taq DNK polimeraze (Fermentas) u Mastercycler Personal System PCR aparatu Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Uzorak za PCR reakciju je sadržao: 375 ng cDNK, 1xTaq pufer, 10 mmol/l dNTP, 2 mmol/l

MgCl<sub>2</sub>, 0,25 μmol/l „prajmera“ za Akt, eNOS, iNOS, GLUT4, GLUT1, CD36, GAPDH i 2U Taq polimeraze. Ukupna zapremina reakcione smeše je bila 25 μl. Uslovi za amplifikaciju su bili sledeći: inicijalna denaturacija 5 min na 94 °C, denaturacija 45 s na 94 °C, vezivanje „prajmera“ 1 min na temperaturi optimalnoj za svaki par „prajmera“, ekstenzija 1 min na 72 °C i finalna ekstenzija 8 min na 72 °C. Broj ciklusa je optimizovan za svaki gen tako da se postigne amplifikacija u eksponencijalnoj fazi (Tabela 1).

**Tabela 1. Sekvence „prajmera“ i PCR uslovi**  
(temperatura vezivanja „prajmera“ i broj ciklusa)

Gen	Veličina produkta	Sekvenca „prajmera“	PCR uslovi
<b>Akt</b>	411 bp	5' TGCTGGAGGACAACGACTAT 3' 5' TGTCATCTTGATCAGGCGGT 3'	56 °C 30 ciklusa
<b>eNOS</b>	693 bp	5' TCCAGTAACACAGACAGTGCA 3' 5' CAGGAAGTAAGTGAGAGC 3'	60 °C 40 ciklusa
<b>iNOS</b>	576 bp	5' GTGTTCCACCAGGAGATGTTG 3' 5' CTCCTGCCCGCTGAGTTCGTC 3'	60 °C 40 ciklusa
<b>GLUT 4</b>	151 bp	5' GGGCTGTGAGTGAGTGCTTTC 3' 5' CAGCGAGGCAAGGCTAGA 3'	60 °C 35 ciklusa
<b>GLUT 1</b>	81 bp	5' CATCGTCGTTGGGATCCTTA 3' 5' GAGCAGTAGAGGCCACAAGTC 3'	58 °C 30 ciklusa
<b>CD 36</b>	269 bp	5' ACGGGCACCCTGTGTACAG 3' 5' GGTGCAGCTGCCACAGCCAG 3'	58 °C 30 ciklusa
<b>GAPDH</b>	308 bp	5' TCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3' 5' AGATCCACAACGGATACATT 3'	58 °C 30 ciklusa

Produkti PCR reakcije su razdvajani na 2% agaroznom gelu kome je dodavan etidijum-bromid (0,5 µg/ml), u aparatu Mini SubCell (BioRad). Kao molekularni marker korišćen je GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Lithuania). Elektroforeza je trajala 30 min, pri konstantnom naponu od 100 V. Gelovi su fotografisani pod UV svetlom u aparatu GelDoc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a za kvantifikaciju signala je korišćen program za analizu ImageJ (NIH, USA).

### 3.15. Statistička obrada rezultata

Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot i PCR metodama je izvršena denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Vrednosti su izražavane kao srednja vrednost  $\pm$  SD (standardna devijacija) od najmanje tri nezavisna eksperimenta vršena sa ukupno 6–8 životinja po grupi. Izmerene vrednosti za optičku gustinu (OD) signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražavane u arbitrarnim jedinicama (count). Rezultati dobijeni Western blot metodom su izražavani u odnosu na  $\beta$ -aktin sa istog blota, a PCR metodom u odnosu na GAPDH iz istih uzoraka. Svi rezultati su predstavljeni kao procenat od odgovarajuće kontrole.

Za statističku analizu rezultata korišćen je program SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). Za procenu statističke značajnosti razlika između dve eksperimentalne grupe korišćena je jednofaktorska parametarska analiza varijanse (engl. *one-way ANOVA*), sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Mase tela i srca pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom

Dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom, u svim eksperimentalnim grupama, opisanim u poglavlju Materijal i metode, merena je telesna masa životinja, a nakon žrtvovanja i masa izolovanih srca. Izmerene vrednosti su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Mase tela i srca kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).

Parametar	K (n = 15)	DM (n = 15)	DM+INS (n = 15)
Masa tela (g)	261,55 ± 13,56	200 ± 33,38***	236,66 ± 18,03** #
Masa srca (g)	0,87 ± 0,08	0,65 ± 0,08*	0,81 ± 0,09#
Masa srca u odnosu na masu tela (x1000)	3,32 ± 0,57	3,26 ± 0,42	3,42 ± 0,45

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. Statistički značajna razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \* $p < 0,05$ , DM vs K; \*\* $p < 0,01$ , DM+INS vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K; # $p < 0,05$ , DM+INS vs DM.

Uočava se da su mase tela pacova kojima je streptozotocinom indukovani dijabetes smanjene u poređenju sa masom tela životinja iz kontrolne grupe (\*\* $p < 0,001$ ). Nakon tretmana insulinom pacova sa dijabetesom mase tela su

povećane u odnosu na životinje sa dijabetesom ( $\#p<0,05$ ), ali ne do vrednosti zabeleženih kod kontrolne grupe ( $**p<0,01$ ).

Masa srca kod svih pacova sa dijabetesom značajno je smanjena u poređenju sa kontrolnim vrednostima ( $*p<0,05$ ), a tretman insulinom je povećao masu srca u poređenju sa masom srca kod životinja sa streptozotocinom izazvanim dijabetesom ( $\#p<0,05$ ) i vratio ih na nivo kontrolne grupe.

Merenjem odnosa mase srca i mase tela (relativna masa srca), pokazano je da eksperimentalno indukovani dijabetes u akutnoj fazi, kao i subhronični tretman insulinom u trajanju od 7 dana, nisu doveli do značajnih promena ovog parametra (**Tabela 2**). Ovi rezultati ukazuju na to da u ranoj fazi dijabetesa još uvek nema naznaka hipertrofije srca.

#### **4.2. Koncentracija glukoze, insulina i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji**

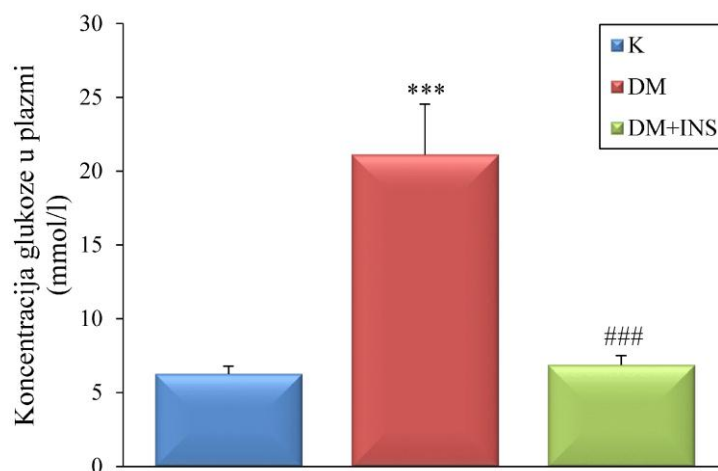
Kod svih eksperimentalnih grupa životinja određivana je koncentracija glukoze, insulina i slobodnih masnih kiselina u krvi.

Kao što je i očekivano, kod životinja sa dijabetesom je došlo do promene koncentracije glukoze i insulina u cirkulaciji.

Koncentracija glukoze je značajno povećana u krvi pacova kojima je streptozotocinom indukovani dijabetes u odnosu na životinje iz kontrolne grupe ( $***p<0,001$ ). Tretman insulinom pacova sa dijabetesom značajno je smanjio nivo glukoze u poređenju sa vrednostima dobijenim kod pacova sa dijabetesom koji nisu tretirani hormonom ( $###p<0,001$ ) i doveo je na kontrolnu vrednost (**Slika 8**).

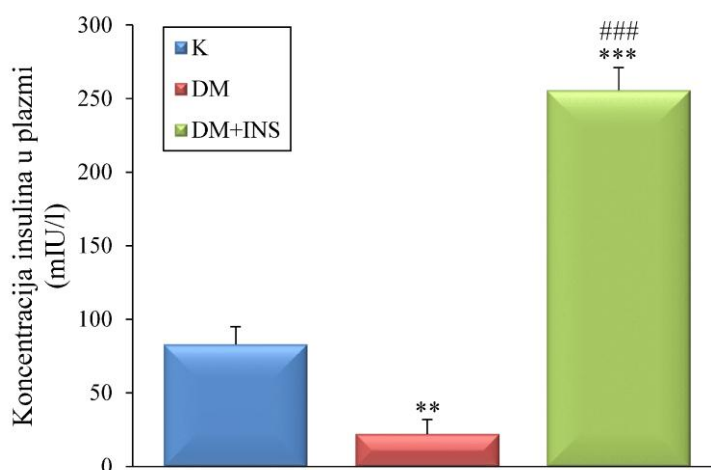
Koncentracija insulina u plazmi pacova sa akutno indukovanim dijabetesom je smanjena u poređenju sa kontrolnom grupom ( $**p<0,01$ ), a supstitucija insulinom je dovela do statistički značajnog povećanja ovog

hormona, kako u odnosu na kontrolnu (\*\* $p < 0,001$ ), tako i u odnosu na grupu životinja sa dijabetesom (### $p < 0,001$ ) (Slika 9).



**Slika 8. Koncentracija glukoze u cirkulaciji kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u mmol/l. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \*\* $p < 0,001$ , DM vs K; ### $p < 0,001$ , DM+INS vs DM.

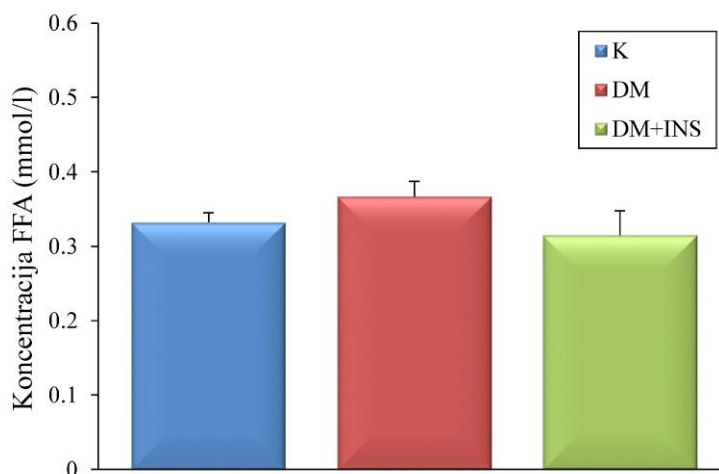


**Slika 9. Koncentracija insulina u plazmi kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u mIU/l. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \*\* $p < 0,01$ , DM vs K; \*\* $p < 0,001$ , DM +INS vs K; ### $p < 0,001$ , DM+INS vs DM.



Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi prikazani su na **Slici 10** i pokazuju da ni kod jedne od ispitivanih grupa životinja nije došlo do promene u koncentraciji FFA.

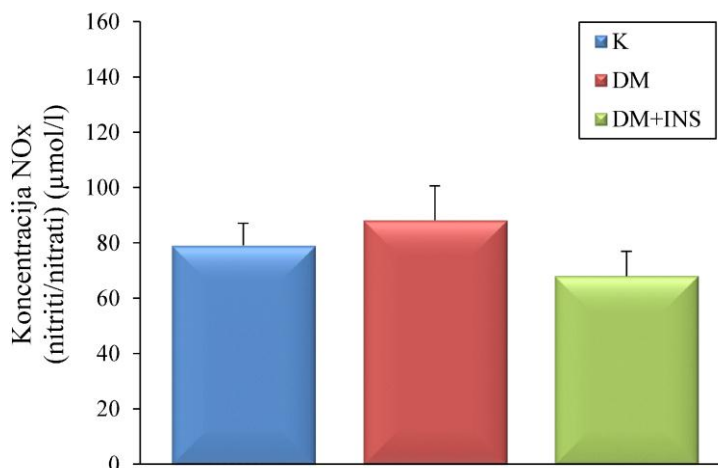


**Slika 10. Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u mmol/l. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

#### **4.3. Koncentracija ukupnog NO u plazmi pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom**

Poznato je da je NO jedan od najvažnijih regulatora srčanih funkcija. U fiziološkim uslovima NO se obično proizvodi u malim količinama i deluje parakrino u transdukciji ćelijskih signala (Kelly i sar., 1996; Shah i MacCarthy, 2000). S druge strane, publikovani rezultati pokazuju da u određenim patofiziološkim stanjima dolazi do promene u njegovoj produkciji. Zato je u našim istraživanjima bilo od interesa da se ispita kakav efekat imaju akutni dijabetes i hroničan insulinski tretman na količinu NO u cirkulaciji.

Kao marker produkcije NO merena je koncentracija nitrita/nitrata. Rezultati prikazani na **Slici 11** pokazuju da se koncentracija nitrita/nitrata, tj. ukupnog NO u plazmi nije promenila ni kod jedne od ispitivanih eksperimentalnih grupa.



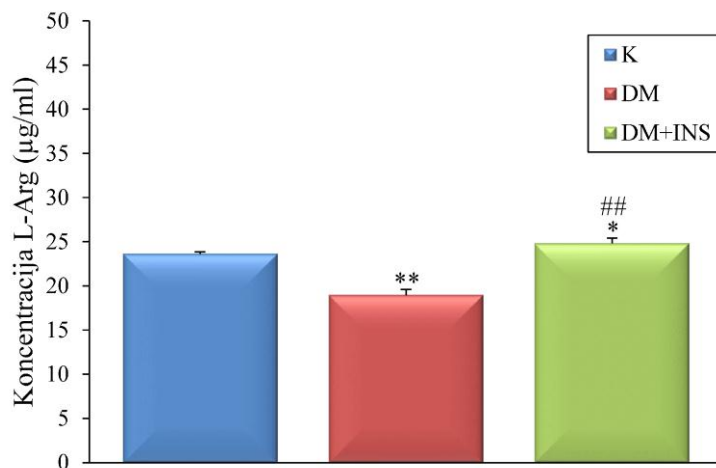
**Slika 11. Koncentracija nitrita/nitrata u plazmi kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u  $\mu\text{mol/l}$ . Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

#### **4.4. Koncentracija L-arginina i aktivnost enzima arginaze u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom**

S obzirom da smo pokazali da u plazmi pacova sa indukovanim dijabetesom, netretiranih ili tretiranih insulinom, nije došlo do značajnih promena ukupne količine sintetisanog NO (**Slika 11**), bilo je od značaja utvrditi da li ovi tretmani dovode do promene koncentracije L-Arg, supstrata u sintezi NO, od čijeg prisustva i količine zavisi sinteza NO u ćeliji.

Koncentracija L-Arg određivana je u lizatima srca svih eksperimentalnih grupa, a rezultati su prikazani na **Slici 12**. Koncentracija L-Arg je značajno smanjena u srcu streptozotocinom tretiranih pacova u odnosu na kontrolnu

grupu (\*\* $p < 0,01$ ). Sedmodnevni tretman insulinom, kod pacova sa dijabetesom doveo je do značajnog povećanja koncentracije L-Arg u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama (\* $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ).



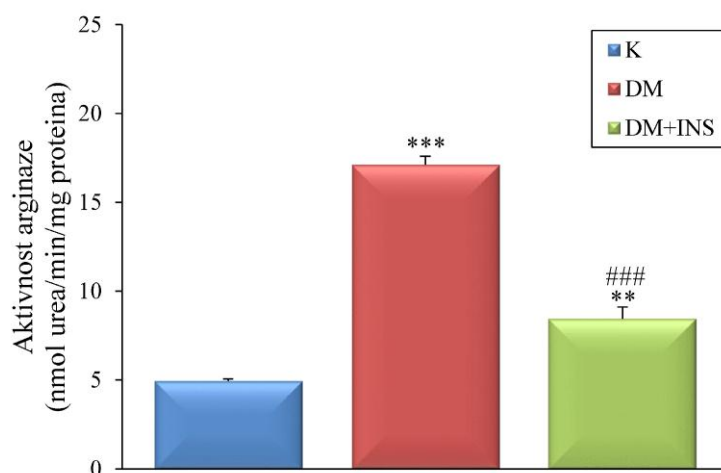
**Slika 12. Koncentracija L-arginina u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u  $\mu\text{g/ml}$ . Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \* $p < 0,05$ , DM+INS vs K; \*\* $p < 0,01$  DM vs K; ## $p < 0,01$  DM+INS vs DM.

Kako jedan od razloga smanjenja koncentracije L-Arg može biti i povećanje aktivnosti enzima arginaze, u daljim eksperimentima određivana je aktivnost ovog enzima u srcu pacova. Naime, promena aktivnosti arginaze može da menja unutarćelijski nivo L-Arg, jer je direktno u kompeticiji sa NOS za zajednički supstrat, što predstavlja ograničavajući faktor u sintezi NO (Mori i Gotoh, 2000). Povećana aktivnost arginaze može da smanji dostupnost supstrata za NOS. Prema tome, relativne promene u enzimskoj aktivnosti arginaze i NOS, predstavljaju glavnu determinantu za produkciju NO i poliamina u mnogim ćelijama (Li i sar., 2001; Wei i sar., 2001; Durante i sar., 2007).

Rezultati naših eksperimenata su pokazali da dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom, u stanju akutnog dijabetesa, dolazi do značajnog povećanja

aktivnosti enzima arginaze u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,001$ ) (Slika 13). Subhronični tretman insulinom pacova sa dijabetesom, značajno je smanjio aktivnost arginaze u srcu, u poređenju sa pacovima tretiranim streptozotocinom (### $p < 0,001$ ), ali je aktivnost enzima i dalje ostala povećana u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,01$ ) (Slika 13).

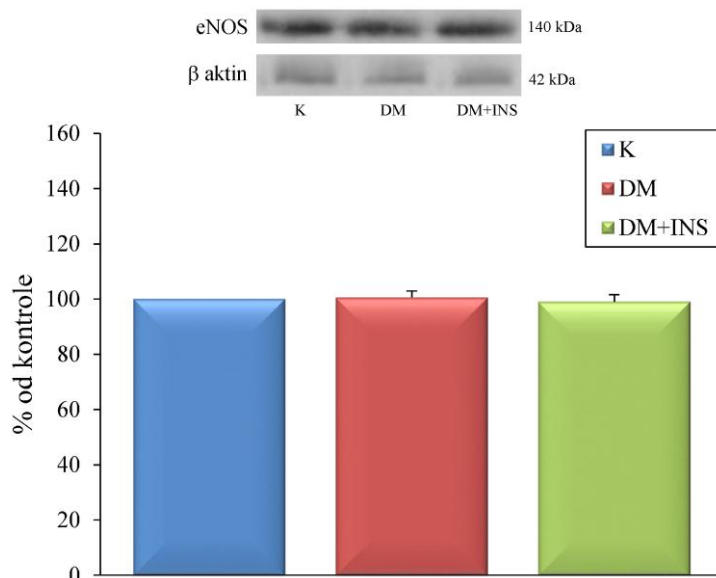


**Slika 13. Aktivnost arginaze u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Aktivnost arginaze je određivana u lizatu ćelija srca, merenjem količine nastale uree iz L-arginina, koja je direktno proporcionalna aktivnosti enzima. Dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na ukupnu količinu proteina u lizatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi u nmol uree/min/mg proteina. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \*\* $p < 0,01$  DM+INS vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K; ### $p < 0,001$ , DM+INS vs DM.

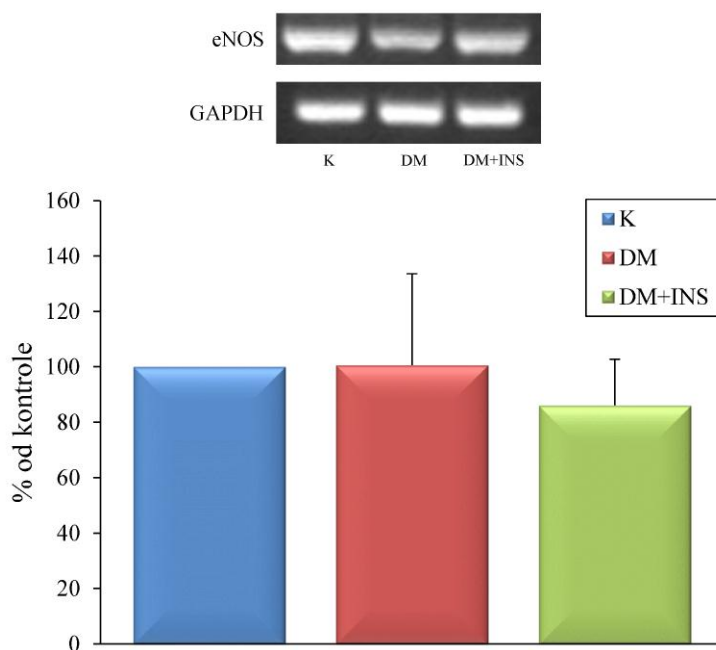
#### 4.5. Ekspresija eNOS i iNOS u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom

Promena u sintezi NO ima važnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih komplikacija u dijabetesu, što ukazuje na potrebu izučavanja aktivnosti i ekspresije eNOS i iNOS.



**Slika 14. Nivo proteina eNOS u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Nivo proteina eNOS je određivan Western blot analizom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, a kvantifikacija rezultata je predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.



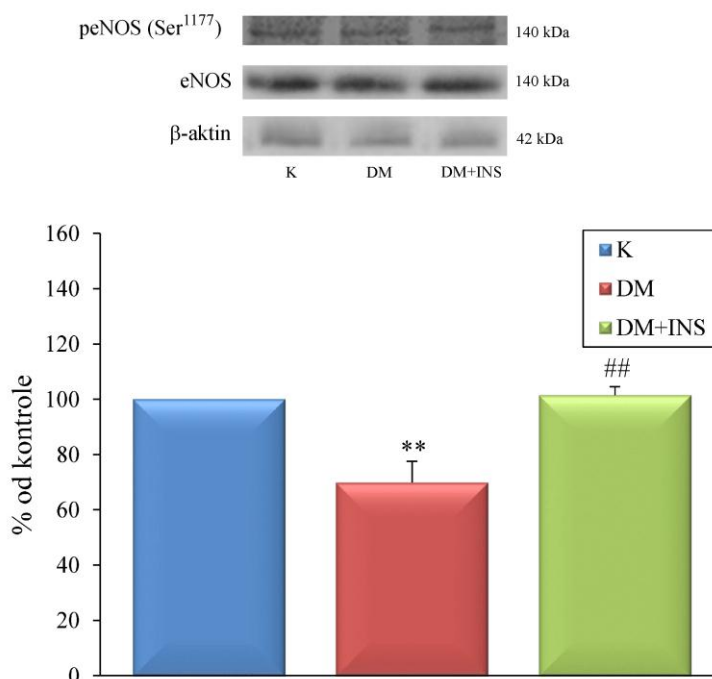
**Slika 15. Ekspresija gena za eNOS u kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Nivo iRNK za eNOS je određen RT-PCR metodom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Reprezentativni agarozni gelovi su prikazani u gornjem delu slike. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

Na **Slici 14** prikazani su rezultati analize nivoa proteina eNOS u lizatu srca pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom i nakon supstitucije insulinom, dobijeni metodom „Western blot“. U srcu netretiranih i insulinom tretiranih pacova sa dijabetesom nije došlo do promene nivoa eNOS.

U skladu sa rezultatima dobijenim određivanjem nivoa ukupnog proteina eNOS su i rezultati ekspresije gena za eNOS u srcu. Nivo iRNK za eNOS se nije promenio dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom, kao ni nakon subhroničnog tretmana insulinom (**Slika 15**).

Aktivnost eNOS je posttranslaciono regulisana fosforilacijom na serinskim i pod određenim uslovima na tirozinskim i treoninskim ostacima, i zato smo ispitivali aktivnost ovog enzima preko fosforilacije enzima na Ser<sup>1177</sup> u srcu pacova sve tri eksperimentalne grupe.

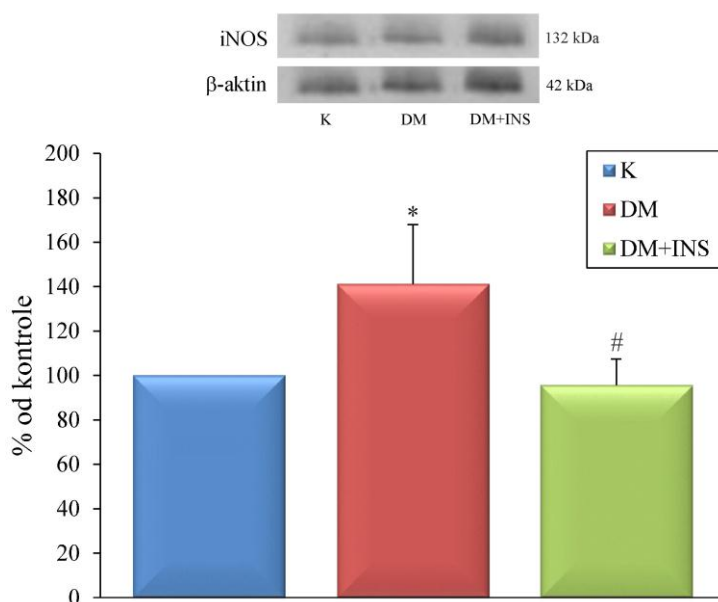


**Slika 16. Regulacija fosforilacije eNOS u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Na slici su prikazani reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> normalizovana u istim uzorcima prema vrednostima za eNOS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i predstavljeni kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \*\* $p < 0,01$ , DM vs K; ## $p < 0,01$ , DM+INS vs DM.

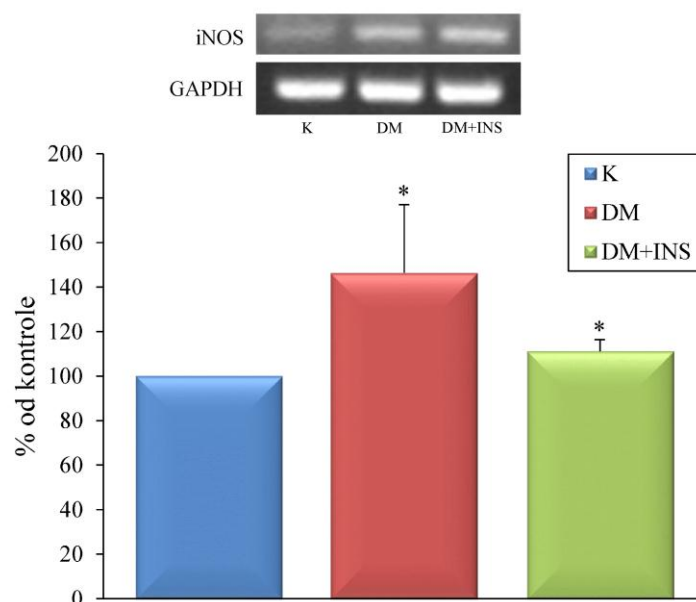
Dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom, došlo je do značajnog smanjenja fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup>, u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\*p<0,01). Tretman insulinom je značajno povećao fosforilaciju eNOS u poređenju sa vrednostima dobijenim kod pacova sa dijabetesom (##p<0,01) i vratio je na nivo kontrole (**Slika 16**).

Kako dve nedelje nakon injekcije streptozotocina nije došlo do promene u ekspresiji eNOS u srcu netretiranih i insulinom tretiranih pacova sa dijabetesom, zanimalo nas je da li je i u kojoj meri došlo do promene u ekspresiji iNOS. Nakon tretmana streptozotocinom došlo je do statistički značajnog povećanja nivoa iNOS proteina i ekspresije gena za iNOS u poređenju sa kontrolom (\*p<0,05) (**Slika 17 i 18**). Subhronični tretman insulinom tokom sedam dana je doveo do smanjenja nivoa iNOS u poređenju sa pacovima sa dijabetesom (#p<0,05) i vratio na nivo kontrolne grupe (**Slika 17**), dok je nivo iRNK za iNOS i dalje ostao povećan u poređenju sa kontrolnom grupom (\*p<0,05) (**Slika 18**).



**Slika 17. Nivo proteina iNOS u lizatu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Nivo proteina iNOS je određen Western blot analizom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, a kvantifikacija rezultata je predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*p<0,05, DM vs K; #p<0,05, DM+INS vs DM.



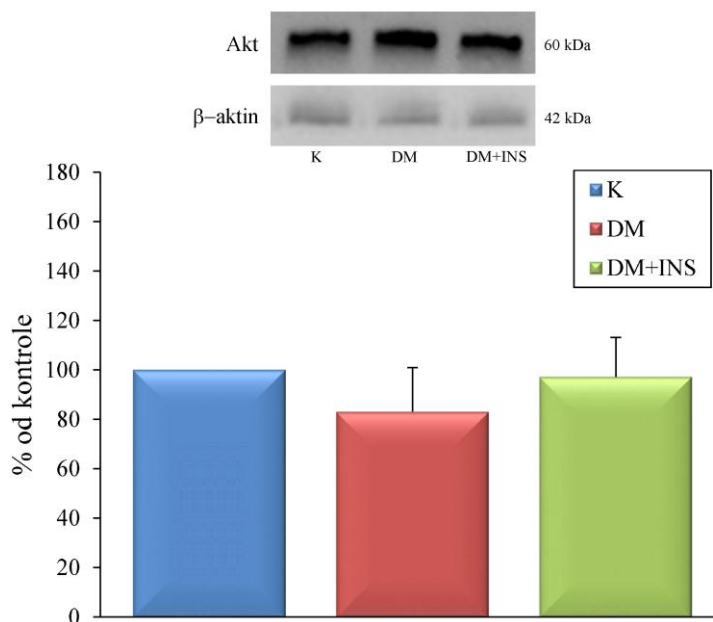
**Slika 18. Nivo iRNK za iNOS u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Nivo iRNK za iNOS je određivan semikvantitativnom metodom RT-PCR i normalizovan na housekeeping gen, GAPDH, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni agarozni gelovi a kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM vs K. \* $p < 0,05$ , DM+INS vs K.

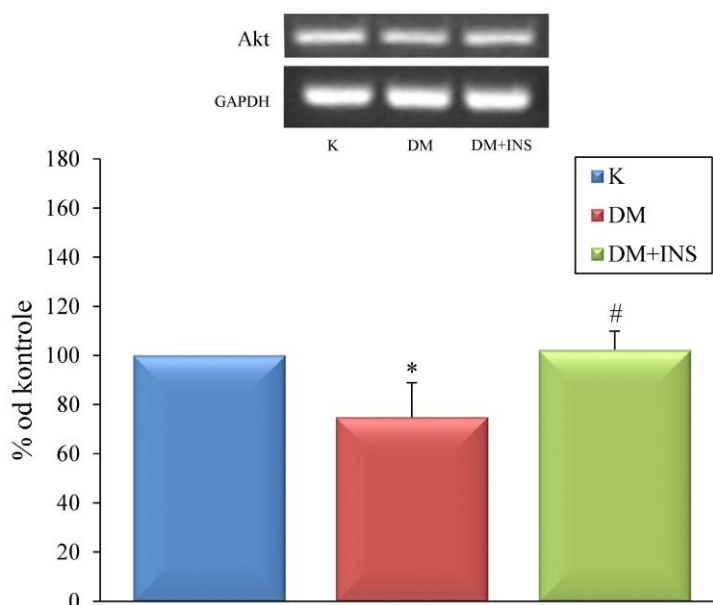
#### **4.6. Ekspresija i fosforilacija Akt u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon supstitucije insulinom**

Predhodna istraživanja i publikovani rezultati su pokazali da je regulacija ekspresije i aktivnosti eNOS i iNOS posredovana PI3K/Akt signalnim putem. S obzirom na važnost koju Akt ima u prenosu signala sa insulinskog receptora, ispitivana je ekspresija, kao i fosforilacija Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup> u srcu pacova kojima je eksperimentalno indukovao dijabetes i nakon supstitucije insulinom. Naime, pokazano je da postoji dobra korelacija između fosforilacije Akt i enzimske aktivnosti ovog molekula.



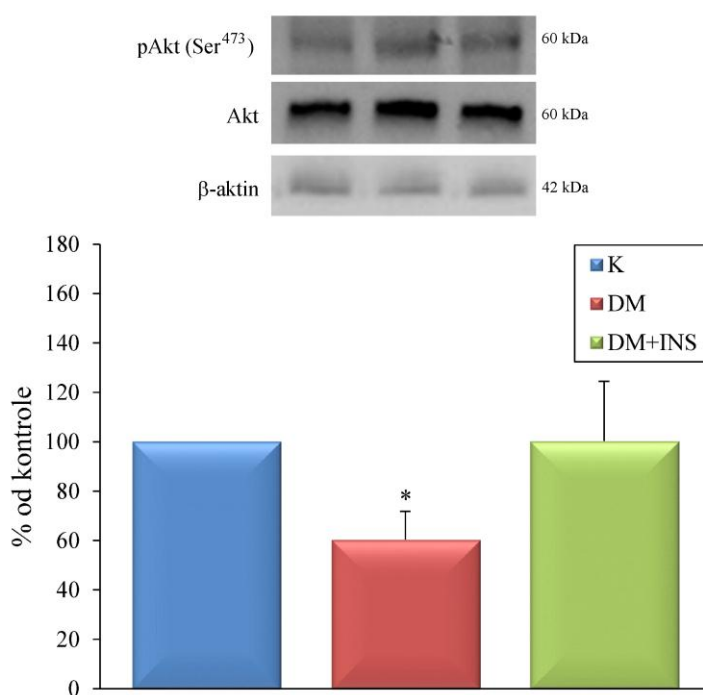


**Slika 19. Nivo proteina Akt u lizatu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**  
 Nivo proteina Akt je analiziran Western blot analizom kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Reprezentativni imunoblotovi su prikazani u gornjem delu slike. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.



**Slika 20. Nivo iRNK za Akt u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**  
 Reprezentativni agarozni gelovi su prikazani u gornjem delu slike. Nivo iRNK je određivan RT-PCR metodom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Vrednosti su date kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*p < 0,05, DM vs K; # p < 0,05, DM+INS vs DM.

Kao što je prikazano na **Slici 19**, tretman streptozotocinom, kao i supstitucija insulinom nisu uticali na nivo proteina Akt u lizatu srca, ali su zapažene promene u nivou iRNK za Akt. Nivo iRNK u srcu je statistički značajno smanjen u grupi pacova sa dijabetesom u poređenju sa kontrolnom grupom ( $*p < 0,05$ ), a tretman hormonom je značajno povećao nivo ekspresije iRNK u poređenju sa životinjama kojima je streptozotocinom izazvan dijabetes ( $\#p < 0,05$ ) i vratio na nivo kontrolne grupe (**Slika 20**).



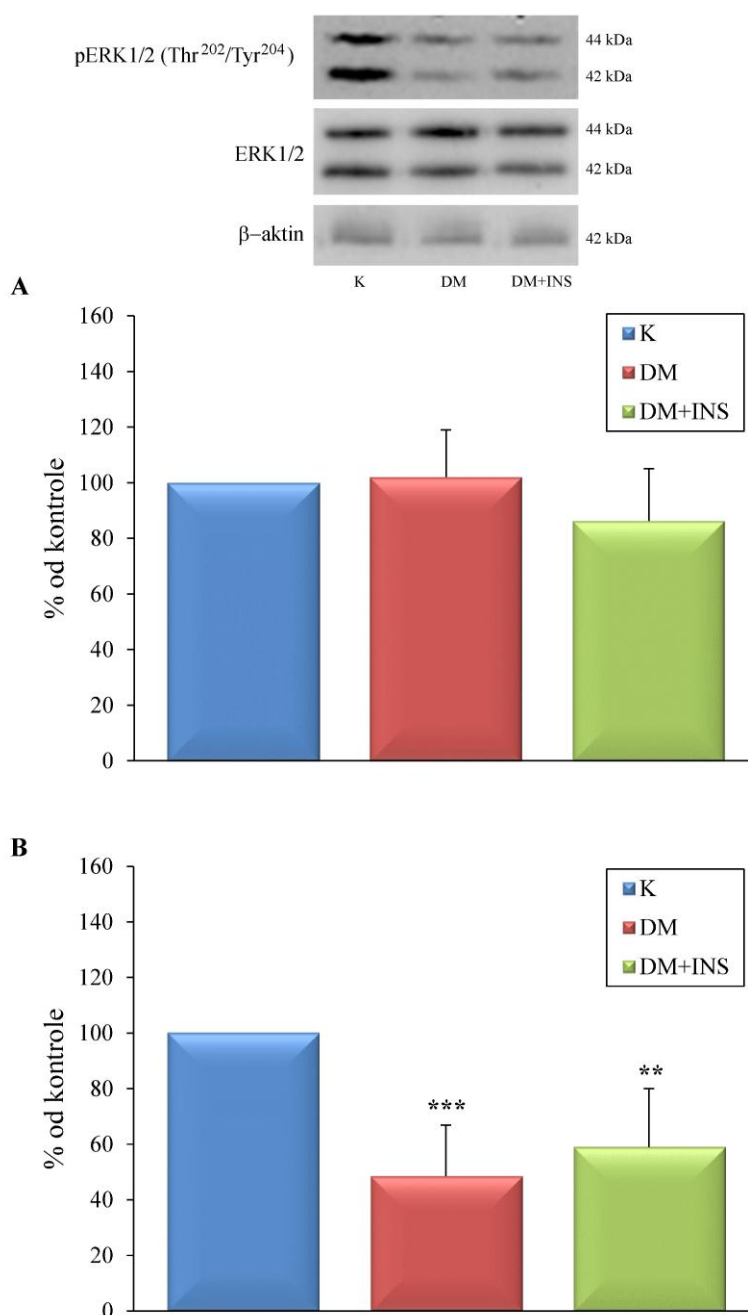
**Slika 21. Fosforilacija Akt na Ser473 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Na slici su prikazani reprezentativni imunoblotovi, a kvantifikacija nivoa fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> normalizovana je u istim uzorcima prema vrednostima za Akt. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.  $*p < 0,05$ , DM vs K.

Na **Slici 21** prikazani su rezultati fosforilacije Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup>, u lizatu srca pacova sve tri eksperimentalne grupe. Dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom došlo je do statistički značajnog smanjenja fosforilacije na Ser<sup>473</sup>, tj. smanjenja aktivnosti Akt u poređenju sa kontrolnom grupom (\* $p < 0,05$ ). Uprkos tome što je nakon tretmana insulinom životinja sa dijabetesom izostala statistički značajna promena nivoa fosforilacije Akt, uočen je trend povećanja u odnosu na životinje sa dijabetesom, tj. hormon je uspeo da vrati nivo fosforilacije na nivo kontrolne grupe.

#### **4.7. Nivo proteina i fosforilacije ERK1/2 u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom**

ERK1/2 je važna kinaza za koju se smatra da ima kardioprotektivnu ulogu. Fosforilacija kinaze ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> je neophodna za enzimsku aktivnost ERK1/2. Nivo proteina ERK1/2 u srcu pacova svih eksperimentalnih grupa se nije promenio (**Slika 22A**). Međutim, nivo fosforilacije ERK1/2, koja je i mera njegove kinazne aktivnosti, bio je značajno smanjen u srcu pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom (\*\* $p < 0,001$ ), kao i kod pacova sa dijabetesom nakon tretmana insulinom u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,01$ ) (**Slika 22B**).



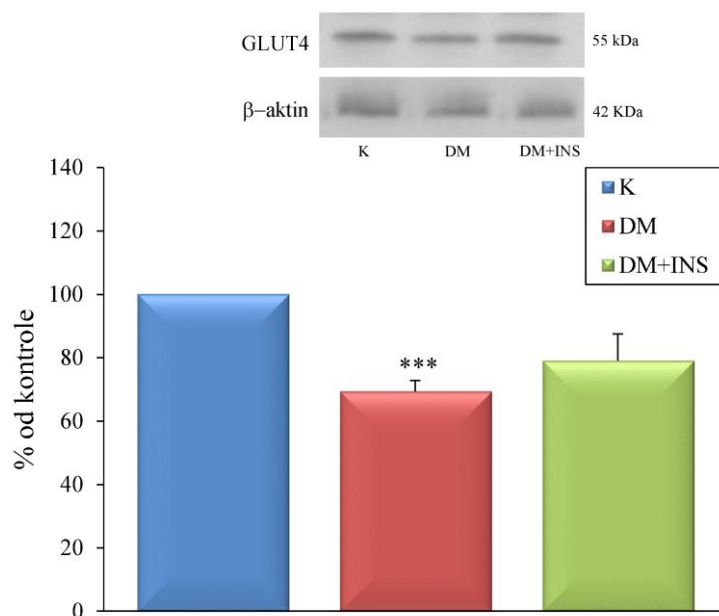
**Slika 22. Nivo proteina i fosforilacija ERK1/2 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Nivo ukupnog ERK1/2 proteina je određivan Western blot analizom kao što je opisano u odeljku Materijal i metode (A). Nivo fosforilacije je određivan iz odnosa fosforilisane i nefosforilisane forme ERK1/2 (B). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \*\* $p < 0,01$ , DM+INS vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K.

#### 4.8. Ekspresija i lokalizacija transportera GLUT4 i GLUT1 u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom

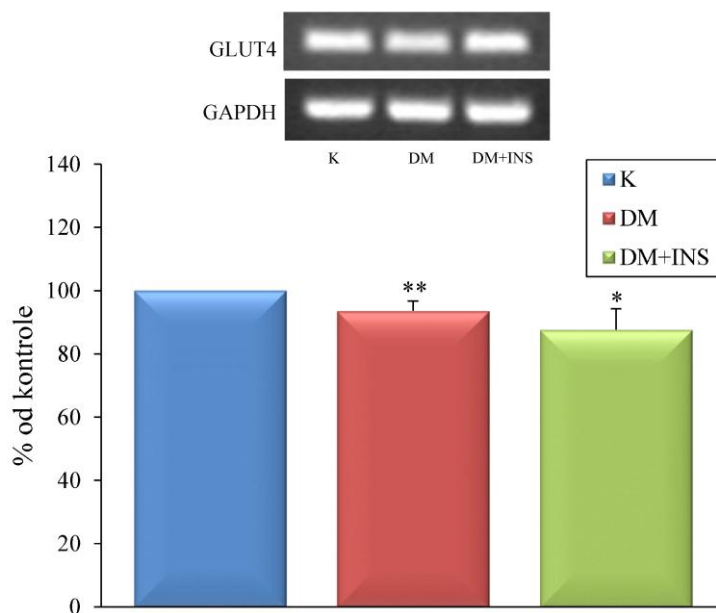
GLUT4 je najzastupljeniji glukoзни transporter u kardiomiocitima, koji se pod dejstvom insulina translocira iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane, što omogućava transport glukoze kroz ćelijsku membranu. Osim ovog na insulin najosetljivijeg glukoznog transportera, u ovoj studiji je određivan i sadržaj transportera GLUT1, koji ima važnu ulogu u održavanju bazalnog transporta glukoze. Prisustvo ovih transportera je analizirano kako u ukupnom ćelijskom lizatu, tako i u citoplazmatskoj i frakciji plazma membrana srca svih eksperimentalnih grupa životinja.

Rezultati analize nivoa proteina GLUT4 u lizatu srca su pokazali da je kod pacova sa dijabetesom došlo do značajnog smanjenja nivoa ovog proteina u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,001$ ) (**Slika 23**). Paralelno sa određivanjem nivoa GLUT4 proteina praćena je i ekspresija gena za GLUT4 korišćenjem RT-PCR metode. Nivo iRNK za GLUT4 je bio statistički značajno smanjen nakon tretmana streptozotocinom u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,01$ ) (**Slika 24**) što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za protein. Međutim, tretman insulinom kod pacova sa dijabetesom doveo je do vraćanja nivoa GLUT4 proteina na kontrolni nivo (**Slika 23**), dok je nivo iRNK za GLUT4 ostao i dalje smanjen (\* $p < 0,05$ ) (**Slika 24**).



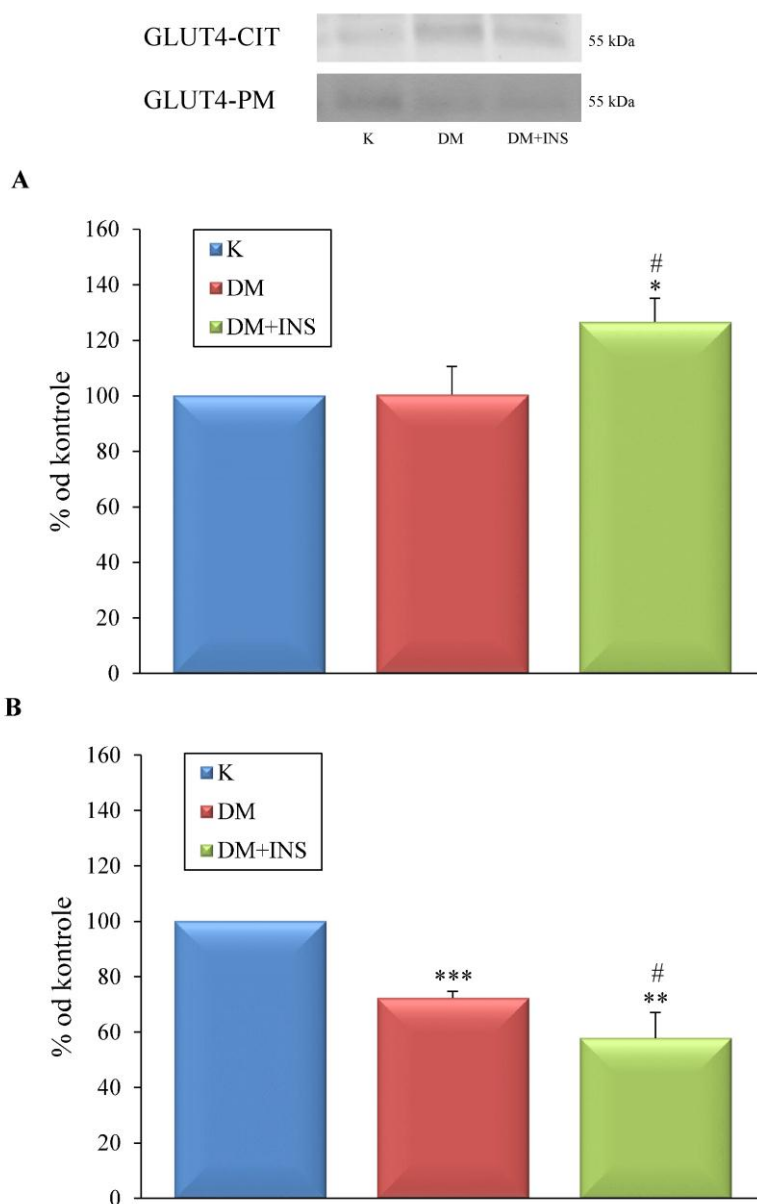
**Slika 23. Nivo proteina GLUT4 u lizatu srca kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Prikazani su reprezentativni imunoblotovi u gornjem delu slike, kao i kvantifikacija nivoa proteina GLUT4 u lizatu predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K



**Slika 24. Nivo iRNK za GLUT4 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Prikazani su reprezentativni agarozni gelovi, kao i kvantifikacija nivoa iRNK za GLUT4. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM+INS vs K; \*\* $p < 0,01$ , DM vs K.



**Slika 25. Ćelijska lokalizacija GLUT4 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

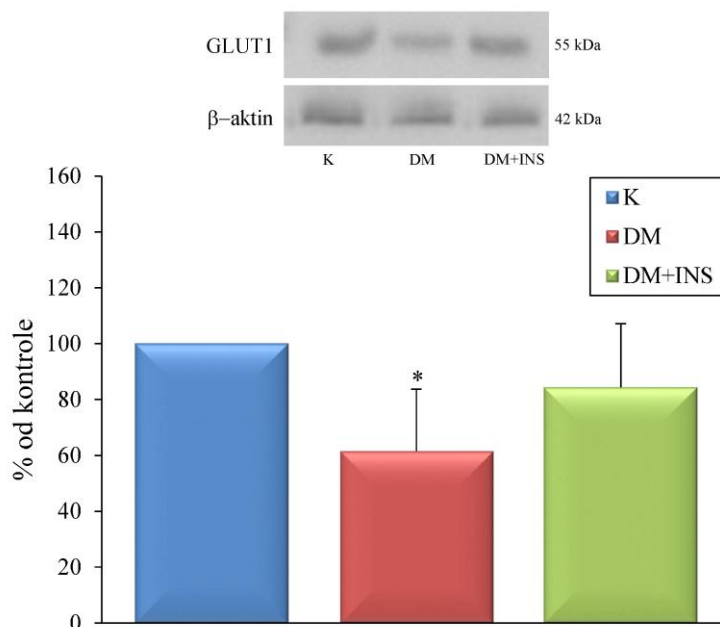
Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, kao i kvantifikacija nivoa proteina GLUT4 u citoplazmatskoj frakciji (CIT) (A) i frakciji plazma membrana (PM) (B.) Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM +INS vs K; \*\* $p < 0,01$ , DM+INS vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K; # $p < 0,05$ , DM+INS vs DM.

Analiza lokalizacije GLUT4 je pokazala da u citoplazmatskoj frakciji ćelija srca kod pacova tretiranih streptozotocinom nema promene nivoa ovog transportera (**Slika 25 A**), dok je u frakciji plazma membrana došlo do značajnog smanjenja nivoa GLUT4 u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,001$ ) (**Slika 25B**). Međutim, nakon tretmana insulinom, kod pacova sa dijabetesom nivo proteina GLUT4 u citoplazmatskoj frakciji je bio povećan u odnosu na odgovarajuće kontrole (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ ) (**Slika 25A**), dok je nivo ovog transportera u frakciji PM bio smanjen kako u odnosu na kontrolnu grupu životinja (\*\* $p < 0,01$ ) tako i u odnosu na grupu životinja tretiranih streptozotocinom (# $p < 0,05$ ) (**Slika 25B**).

Nivo proteina (**Slika 26**) i nivo iRNK za GLUT1 (**Slika 27**) je bio značajno smanjen u srcu pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom u poređenju sa kontrolnom grupom (\* $p < 0,05$ ). Subhronični tretman insulinom je kod pacova sa dijabetesom vratio nivo proteina GLUT1 kao i nivo iRNK na kontrolni (**Slika 26 i 27**).

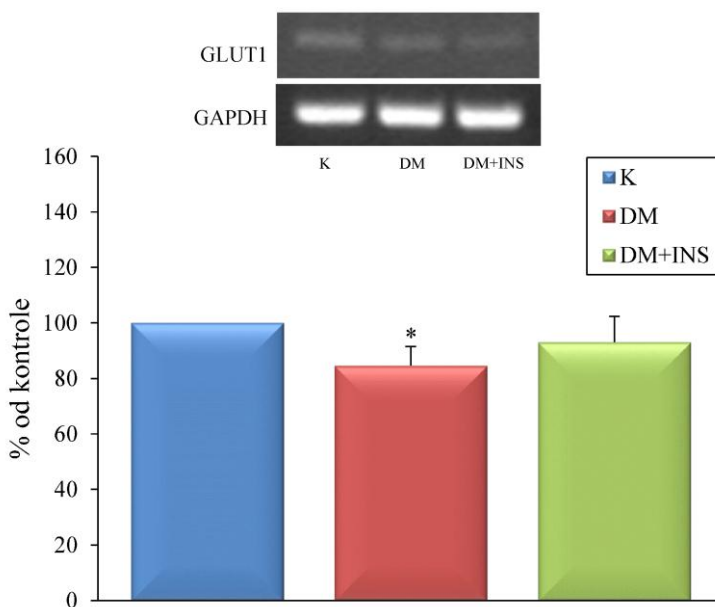
Analiza nivoa proteina GLUT1 u citoplazmatskoj i membranskoj frakciji ćelija srca pacova je prikazana na **Slici 28**. Dobijeni rezultati su pokazali da tretman streptozotocinom nije doveo do promene nivoa proteina GLUT1 u citoplazmatskoj frakciji ćelija srca (**Slika 28A**), dok je nivo ovog transportera bio značajno smanjen u frakciji PM u poređenju sa kontrolom (\* $p < 0,01$ ) (**Slika 28B**). Nakon tretmana insulinom kod pacova sa dijabetesom, nivo GLUT1 je ostao nepromenjen u citoplazmatskoj frakciji (**Slika 28A**), dok je nivo u frakciji PM bio značajno smanjen u poređenju sa kontrolom (\*\* $p < 0,01$ ) (**Slika 28B**).





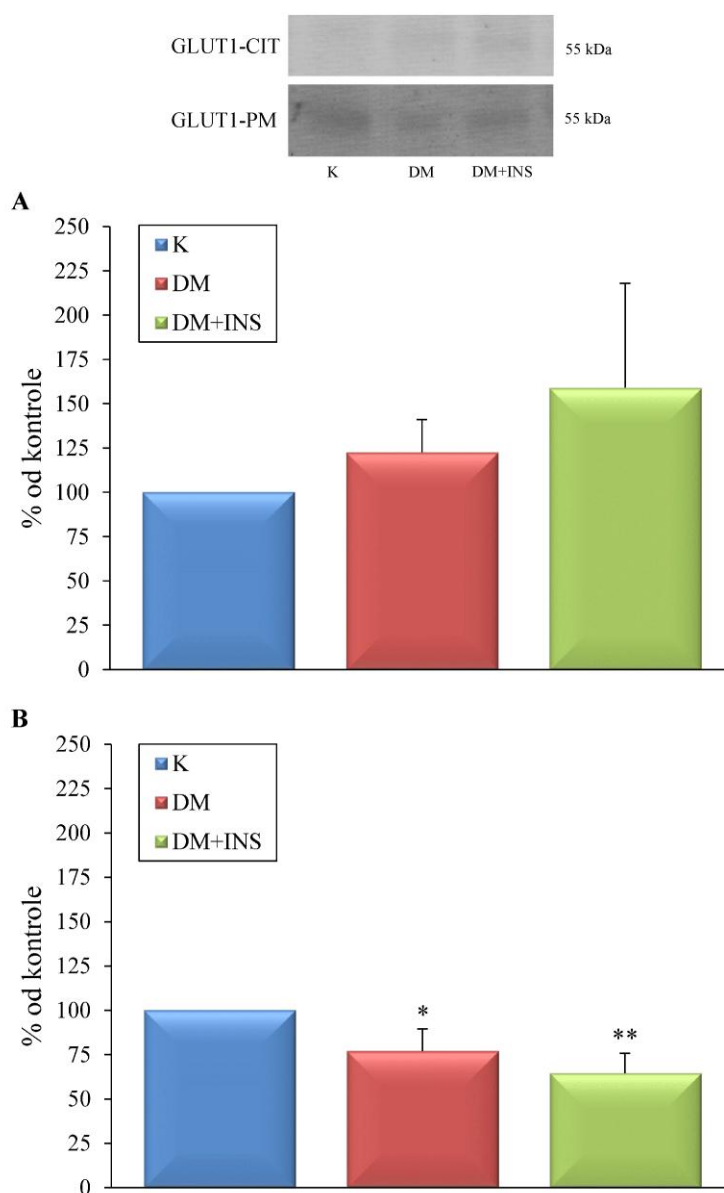
**Slika 26. Nivo proteina GLUT1 u lizatu srca kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Prikazani su reprezentativni imunoblotovi u gornjem delu slike, kao i kvantifikacija nivoa proteina GLUT1 u lizatu predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM vs K.



**Slika 27. Nivo iRNK za GLUT1 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

U gornjem delu slike prikazani su reprezentativni agarozni gelovi, kao i kvantifikacija nivoa iRNK za GLUT1. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM vs K.



**Slika 28. Ćelijska lokalizacija GLUT1 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija nivoa proteina GLUT1 u citoplazmatskoj frakciji (CIT) (A) i frakciji plazma membrana (PM) (B). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. tj. kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \* $p < 0,05$ , DM vs K; \*\* $p < 0,01$ , DM+INS vs K.

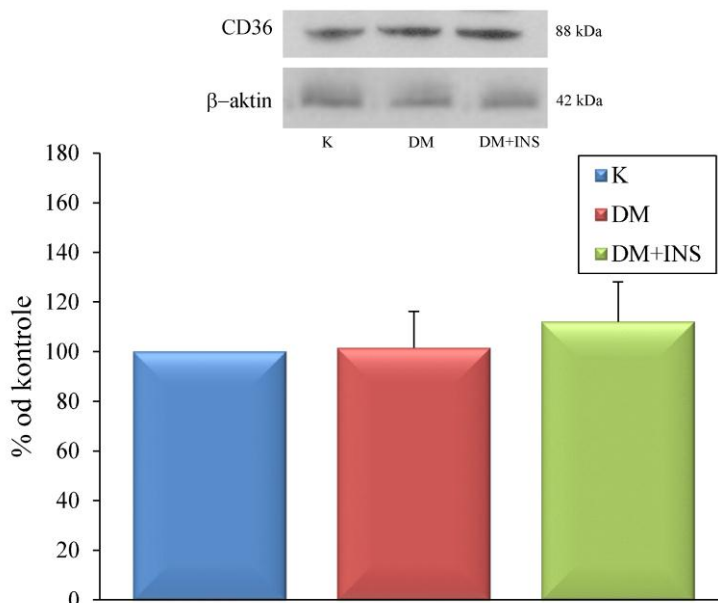
#### 4.9. Ekspresija i lokalizacija transportera CD36 u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom

CD36 je važan transporter masnih kiselina u srcu, i insulin stimuliše njegovu translokaciju iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane.

Rezultati analize ukupnog nivoa proteina CD36 u lizatu srca su pokazali da tretman streptozotocinom i tretman insulinom pacova sa dijabetesom nisu promenili nivo ovog transportera u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 29**).

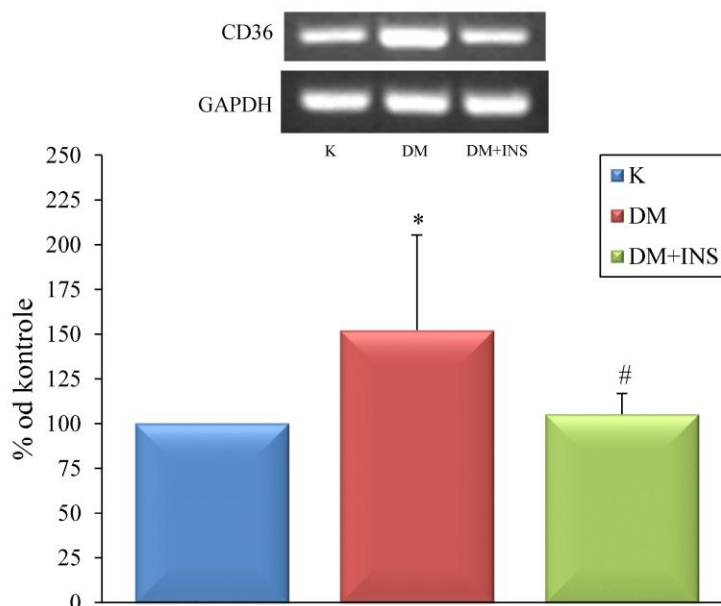
Međutim, iako nije bilo promene nivoa proteina CD36 u srcu pacova, nivo iRNK za CD36 u srcu pacova sa dijabetesom je bio značajno povećan u poređenju sa kontrolnim vrednostima (\* $p < 0,05$ ) (**Slika 30**). Nakon subhroničnog tretmana insulinom nivo iRNK za CD36 je bio smanjen kod pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom (# $p < 0,05$ ) i vraćen na nivo kontrole.

Rezultati dobijeni analizom lokalizacije CD36 u srcu pacova svih eksperimentalnih grupa su prikazani na **Slici 31**. Kod pacova kojima je streptozotocinom indukovao dijabetes nivo proteina CD36 je bio smanjen u citoplazmatskoj frakciji (\* $p < 0,05$ ) (**Slika 31A**), i povećan u frakciji PM u poređenju sa kontrolnom grupom (\*\* $p < 0,001$ ) (**Slika 31B**). Substitucija insulinom je vratila nivo transportera CD36 na nivo kontrole u citoplazmatskoj frakciji (**Slika 31A**), ali je njegov nivo u frakciji PM i dalje bio povećan u odnosu na kontrolnu grupu (\*\* $p < 0,001$ ) (**Slika 31B**).



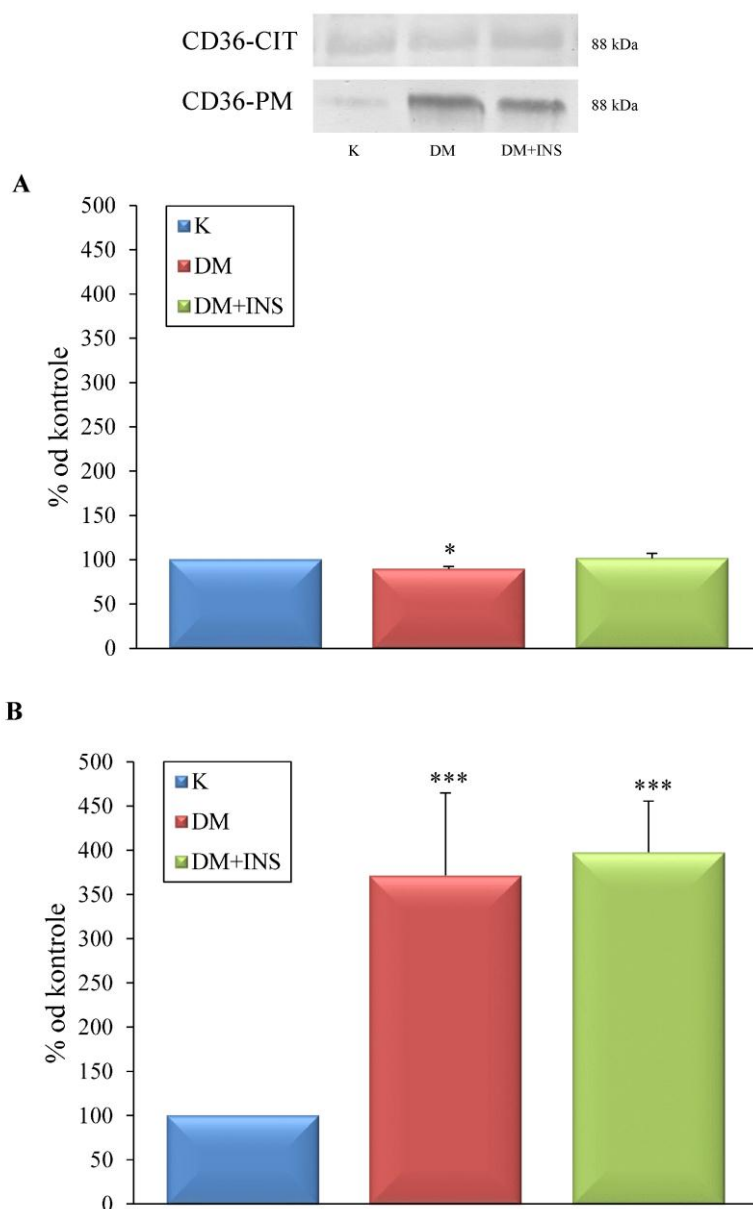
**Slika 29. Nivo proteina CD36 u lizatu srca kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Prikazani su reprezentivni imunoblotovi, kao i kvantifikacija nivoa proteina CD36 u lizatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole.



**Slika 30. Nivo iRNK za CD36 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Na slici su prikazani reprezentivni agarozni gelovi, kao i kvantifikacija nivoa iRNK za CD36. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD i izraženi kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , DM vs K; # $p < 0,05$  DM+INS vs DM.



**Slika 31. Lokalizaciju CD36 u srcu kontrolnih (K), pacova sa dijabetesom (DM) i pacova sa dijabetesom tretiranih insulinom (DM+INS).**

Na slici su prikazani reprezentativni imunoblotovi, kao i kvantifikacija nivoa proteina CD36 u citoplazmatskoj frakciji (CIT) (A) i frakciji plazma membrane (PM) (B). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim. \* $p < 0,05$ , DM vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM vs K; \*\*\* $p < 0,001$ , DM+INS vs K.

## 5. DISKUSIJA

Dijabetes je povezan sa velikom incidencom nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Kardiovaskularne komplikacije koje se javljaju kod pacijenata sa dijabetesom su česte i teške, nastaju u ranoj fazi bolesti, i stoga su često potcenjene i neadekvatno lečene. Iako se objavljeni radovi o dijabetesu i srcu uglavnom odnose na dijabetes tipa 2, dijabetes tipa 1 takođe predstavlja znatan rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Kod dijabetesa tipa 1, srce i krvni sudovi podležu različitim patološkim promenama, koje uključuju kardiomiopatiju, kongestivnu slabost srca, srčanu autonomnu neuropatiju i aterosklerozu (Retnakaran i Zinman, 2008). Oslabljena funkcija srca povezana je sa brojnim morfološkim, biohemijskim i funkcijskim promenama. Stoga su izučavanja promena u insulinskoj signalnoj transdukciji u srcu u stanju dijabetesa od posebnog značaja i daju osnovu za razvoj novih terapijskih agenasa koji će doprineti prevenciji i lečenju kardiovaskularnih bolesti i poremećaja.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji proistekli su iz izučavanja molekula signalnog puta insulina PI3K/Akt i ERK1/2 koji su uključeni u regulaciju ćelijskih procesa u srcu, kao što su produkcija azot-monoksida i transport energetskih supstrata (glukoze i masnih kiselina) nakon akutnog, eksperimentalno izazvanog dijabetesa tipa 1 i tretmana insulinom.

U našim istraživanjima za razvoj animalnog modela dijabetesa tipa 1 korišćen je streptozotocin. Streptozotocinom izazvan dijabetes kod eksperimentalnih životinja predstavlja dobro okarakterisani model dijabetesa, kod kojeg se mogu zapaziti mnoge patofiziološke karakteristike koje se javljaju i kod ljudi sa dijabetesom, kao što su hiperglikemija, hipoinsulinemija, povećan

nivo glukoze u urinu usled čega dolazi do poliurije, kao i gubitka telesne mase (Seemayer i sar., 1980; Schaan i sar., 1997). Takođe, kod eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 1 dolazi do mnogih promena u funkciji srca i krvnih sudova koje se javljaju i u kliničkom dijabetesu: ateroskleroza, hipertrofija srca, kardiomiopatija, kardiovaskularna disfunkcija i slabost srca (De Angelis i sar., 2002; Price i sar., 2003; Shiomi i sar., 2003; Bugger i Abel, 2009; Chang i sar., 2011).

Nakon streptozotocinom izazvanog dijabetesa i tretmana insulinom, neposredno pre žrtvovanja, životinjama svih eksperimentalnih grupa merena je telesna masa. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, pokazuju da je dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom u stanju akutnog dijabetesa došlo do statistički značajnog smanjenja telesne mase, dok je tretman insulinom doveo do povećanja telesne mase ovih životinja (**Tabela 2**).

Eksperimentalne i kliničke studije su pokazale da dijabetes dovodi do razvoja dijabetične kardiomiopatije nezavisne od vaskularnih komplikacija. Hipertrofija srca kod ljudi je važna odlika dijabetične kardiomiopatije, koja može dovesti do poremećaja u funkciji srca. Karakterišu je uvećanje mase srca usled zadebljanja mišića leve komore zajedno sa sistolnom i dijastolnom disfunkcijom i srčanom fibrozom (Meijs i sar., 2007). Međutim, u animalnom modelu streptozotocinom izazvane dijabetične kardiomiopatije, istraživanja pojedinih autora su pokazala da dolazi do atrofije srca nasuprot očekivanoj hipertrofiji (Dhalla i sar., 1985; Depre i sar., 2000), koju karakteriše smanjenje mase srca, relativne mase srca (masa srca u odnosu na masu tela), veličine srca, debljine zida leve komore, kao i veličine kardiomiocita (Bilim i sar., 2008). Stoga smo u daljem radu pratili da li u našim eksperimentalnim uslovima, dolazi do promene u masi srca, i pokazali da je u uslovima insulinske deficijencije, dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom, masa srca kod životinja sa dijabetesom bila statistički značajno smanjena. Nakon tretmana insulinom, masa srca je statistički značajno povećana u odnosu na životinje sa dijabetesom, i dovedena na nivo kontrolnih vrednosti (**Tabela 2**). Međutim, u našim

eksperimentalnim uslovima, u stanju akutnog dijabetesa nismo zapazili promene u relativnoj masi srca životinja, što ukazuje da u ranoj fazi dijabetesa još uvek nema naznaka hipertrofije srca. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u istraživanjima drugih autora (Kim i sar., 2010) koji su pokazali da je tri nedelje nakon tretmana streptozotocinom, kod pacova sa dijabetesom, došlo do značajnog smanjenja mase srca u odnosu na kontrolnu grupu, a da nema promena u relativnoj masi srca. Eksperimenti Huang i sar. (Huang i sar., 2009) su pokazali da je dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom, u grupi pacova sa dijabetesom, došlo do statistički značajnog smanjenja mase srca u poređenju sa kontrolom, a da je tretman insulinom u trajanju od pet dana doveo do povećanja mase srca u odnosu na masu srca kod životinja sa dijabetesom. Za razliku od mase srca, isti autori su pokazali, da je relativna masa bila statistički značajno povećana u grupi pacova sa dijabetesom u poređenju sa kontrolom (Huang i sar., 2009). Rezultati drugih autora su pokazali da je došlo do značajnih promena u relativnoj masi srca kod životinja sa dijabetesom, tek nakon 8 nedelja trajanja dijabetesa (Delbin i sar., 2012).

Biohemijske analize koncentracije glukoze, insulina i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji su pokazale, da je nakon injekcije streptozotocinom, došlo do povećanja koncentracije glukoze i smanjenja koncentracije insulina u plazmi (**Slika 8** i **Slika 9**). Povećan nivo hormona u cirkulaciji nakon insulinskog tretmana (**Slika 9**) je vratio nivo glukoze na kontrolni (**Slika 8**). Međutim, nismo registrovali promenu koncentracije FFA u plazmi pacova kojima je eksperimentalno indukovao dijabetes, bilo da su nakon toga tretirani insulinom ili ne (**Slika 10**). Luiken i saradnici (Luiken i sar., 2002a) su pokazali da tretman pacova sa niskim dozama streptozotocina (35 mg/kg) ne dovodi do promene u nivou FFA u cirkulaciji, za razliku od detektovanog povećanja koncentracije FFA pri višim dozama streptozotocina (55 mg/kg) u stanju dugotrajnog dijabetesa (12–13 nedelja).

Ranija istraživanja su pokazala da je hronična hiperglikemija nezavisan faktor rizika nastanka kardiovaskularnih oboljenja koji direktno izaziva srčana



oštećenja i dovodi do dijabetične kardiomiopatije (Cai i Kang, 2001; Sampson i sar., 2004). Opšte je prihvaćeno mišljenje da hiperglikemija dovodi do prekomerne produkcije ROS, što izaziva oksidativna oštećenja miokarda. Hiperglikemija dovodi do povećane oksidacije glukoze i prekomerne produkcije superoksida u mitohondrijama (Nishikawa i sar., 2000; Brownlee, 2001; Farhangkhoei i sar., 2003), što može da ima za posledicu oštećenja molekula DNK i aktivaciju poli (ADP-ribozo) polimeraze (PARP, engl. *Poly (ADP-ribose) polymerases*) kao enzima reparacije (Du i sar., 2003). Osim toga, hiperglikemija može da aktivira PKC, koja zauzvrat indukuje PKC-zavisani oksidativni stres u dijabetičnim vaskularnim tkivima što može dovesti do oštećenja srca i krvnih sudova (Inoguchi i sar., 1992; Inoguchi i sar., 2003; Kouroedov i sar., 2004). Eksperimenti drugih autora su pokazali da kod pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom, dolazi do aktivacije PKC $\beta$ 2 izoforme u srcu (Inoguchi i sar., 1992). Povećana ekspresija PKC $\beta$ 2 u srcu dovodi do kardiomiopatije koja je u vezi sa hipertrofijom leve komore i fibrozom miokarda (Wakasaki i sar., 1997; Way i sar., 2002; Lei i sar., 2013). Takođe, pokazano je da glukoza može ne samo da aktivira PKC $\beta$ 2, već i druge signalne molekule, kao što je p66shc protein u mitohondrijama, što povećava produkciju ROS u uslovima dijabetesa (Migliaccio i sar., 1999; Camici i sar., 2007). Poznato je da ROS aktivira transkripcione faktore kao što je NF $\kappa$ B koji učestvuje u regulaciji gena uključenih u inflamatorni odgovor (Luscher i Steffel, 2008). Ovi molekularni događaji mogu bar delimično objasniti kardiovaskularne promene, inflamaciju i bolesti povezane sa dijabetesom.

### **5.1. Regulacija sinteze azot-monoksida u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom**

Azot-monoksid je signalni molekul koji se sintetiše iz L-arginina posredstvom enzima NOS, i dostupnost arginina je jedan od ograničavajućih

faktora u ćelijskoj produkciji NO. Arginin nije samo supstrat za NOS nego i za arginazu i kompeticija između NOS i arginaze za zajednički supstrat ukazuje na učesće ovih enzima u regulaciji sinteze NO. Kako produkcija NO zavisi od dostupnosti L-arginina za NOS, katabolizam L-arginina preko arginaze može da deluje kao endogeni negativni kontrolni sistem koji reguliše ukupnu produkciju NO (Lee i sar., 2003). U skladu sa ovim, produkcija NO je u obrnutoj korelaciji sa aktivnošću arginaze u kardiovaskularnim tkivima, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima (Durante i sar., 2007). Stoga smo, pored koncentracije NO ispitivali i koncentraciju arginina kao i aktivnost arginaze u srcu pacova sa dijabetesom i nakon tretmana insulinom.

U našim eksperimentima pokazano je da ni akutni dijabetes ni tretman insulinom životinja sa dijabetesom, nisu uticali na koncentraciju nitrita i nitrata, markera produkcije NO, u krvnoj plazmi (**Slika 11**). Rezultati drugih autora su pokazali smanjenje koncentracije nitrita/nitrata u serumu pacova 4 (Sharma i sar., 2011), 6 (Arya i sar., 2011) ili 8 nedelja nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom (Xia i sar., 2006b). Međutim, Crespo i saradnici (Crespo i sar., 2008) su pokazali da 4 nedelje nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom dolazi do povećanja NO u plazmi. Farnhangkhoe i saradnici (Farhangkhoe i sar., 2003) su zapazili da u stanju hroničnog dijabetesa ne dolazi do promene koncentracije NO, mada je ekspresija iRNK za NOS bila povećana. Odsustvo promene nivoa NO, ovi autori objašnjavaju da rano povećanje NO može biti uklonjeno delovanjem superoksidnih anjona što kasnije može dovesti do oštećenja proteina /DNK i povećati oksidativni stres.

Dostupnost supstrata L-arginina može uticati na sintezu NO i može da predstavlja kritičan faktor u određivanju da li će proizvod enzimske aktivnosti NOS biti NO (adekvatan supstrat) ili superoksidi ( $O_2^-$ ) (molekul  $O_2$ , pre nego što L-arginin postaje supstrat za nevezani NOS monomer). Povećana količina superoksida zajedno sa NO, grade peroksinitrite ( $ONOO^-$ ), dovodeći dalje do smanjenja NO. Osim toga na dostupnost arginina mogu uticati i transporteri za arginin, enzimi uključeni u sintezu arginina (argininosukcinatna sintaza i

argininosukcinatna lijaza), kao i hidroliza u ureu i ornitin od strane arginaze (Mori i Gotoh, 2000; Hallemeesch i sar., 2002).

Rezultati ove disertacije su pokazali značajno povećanje aktivnosti enzima arginaze (**Slika 13**) što je praćeno značajnim smanjenjem koncentracije L-arginina u srcu pacova sa dijabetesom (**Slika 12**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora, koji su pokazali da u dijabetesu dolazi do povećane aktivnosti enzima arginaze (Kashyap i sar., 2008; Romero i sar., 2008; Toque i sar., 2011). Disfunkcija endotela u dijabetesu može nastati delimično smanjenjem raspoloživosti supstrata L-arginina za eNOS, što ima za posledicu smanjenje produkcije NO i povećanje produkcije superoksida od strane eNOS (Kaesemeyer i sar., 2000; Berkowitz i sar., 2003). U uslovima niske koncentracije arginina, nevezani monomer NOS stvara ROS, koji su marker oksidativnog stresa, umesto NO (Xia i sar., 1996). Takođe, arginaza može usmeriti metabolizam L-Arg ka L-ornitinu i stvaranju poliamina i L-prolina koji direktno mogu da utiču na funkciju miocita (Durante i sar., 2007). Rezultati drugih autora (Romero i sar., 2008) su potvrdili da je 4 ili 8 nedelja nakon indukcije dijabetesa, aktivnost kako vaskularne arginaze, tako i aktivnost arginaze u jetri veoma povećana. Različiti faktori mogu da doprinesu povećanoj aktivnosti arginaze tokom dijabetesa. Pored hiperglikemije, povećana aktivnost arginaze dovodi se u vezu i sa inflamatornim citokinima i ROS, koji su takođe povećani tokom dijabetesa (Hink i sar., 2001; Helmersson i sar., 2004; Chandra i sar., 2012). Smatra se da je oksidativni stres jedan od glavnih uzroka povećane aktivnosti arginaze. Rezultati drugih autora su pokazali da peroksidi ( $H_2O_2$ ) i peroksinitriti aktiviraju arginazu u endotelnim ćelijama (Thengchaisri i sar., 2006), što može biti sprečeno delovanjem antioksidanata ili FeTTPs (5,10,15,20-tetrakis-[4-sulfonatophenyl]-porphyrinato-iron[III]), katalizatora razlaganja peroksinitrita. Postoje jaki dokazi da oksidativni stres aktivira malu GTP-azu RhoA (Seko i sar., 2003; Jin i sar., 2006), što zauzvrat dovodi do aktivacije arginaze (Ming i sar., 2004; Horowitz i sar., 2007). U molekularni mehanizam glukozom-indukovanog povećanja aktivnosti arginaze, izgleda da su takođe

uključeni i mali G proteini, što je potvrđeno i rezultatima, gde inhibitor Rho kinaze Y-27632, kao i inhibitor HMG-koenzim A reduktaze (statin) smanjuju povećanu aktivnost enzima kao i produkciju ROS u datim uslovima (Luscher i Steffel, 2008). Ovi molekularni događaji mogu da daju objašnjenja vaskularne disfunkcije, inflamacije i drugih poremećaja koji se javlju u dijabetesu, a dalja istraživanja su potrebna da bi se utvrdili i drugi molekularni posrednici uključeni u ovaj signalni put.

Iako su rezultati pojedinih autora pokazali da davanje L-arginina u vidu suplementa sprečava endotelnu disfunkciju i vraća mogućnost širenja krvnih sudova tokom dijabetesa (Pieper i Peltier, 1995; Angulo i sar., 1998), određen broj istraživanja na ljudima i eksperimentalnim životinjama, je pokazao da hronično davanje L-arginina nema nikakav benefit, čak može imati štetne posledice (Jeremy i sar., 1996; Schulman i sar., 2006). Ovakav negativan ishod, može se dovesti u vezu sa sposobnošću L-arginina da aktivira i indukuje ekspresiju arginaze (Morris, 1992). Romero i saradnici su pokazali da oralno davanje L-citrulina ima bolje efekte na produkciju NO nego L-arginin (Romero i sar., 2006). L-citrulin, nusproizvod u stvaranju NO od strane NOS, se u mnogim tkivima reciklira u L-arginin i doprinosi da se nivo L-arginina održi za produkciju NO (Romero i sar., 2006). Arginaza može biti nov terapijski target u lečenju disfunkcije endotela u dijabetesu, a L-citrulin zbog svog efekta na ograničavanje aktivacije arginaze i oksidativnog stresa, može biti obećavajuća terapija u lečenju kardiovaskularnih komplikacija u dijabetesu.

U našim istraživanjima tretman insulinom životinja sa dijabetesom, primetno je smanjio aktivnost arginaze (**Slika 13**), i povećao koncentraciju L-Arg (**Slika 12**) u srcu, što ukazuje na značajan regulatorni efekat insulina na enzimsku aktivnost arginaze. Insulin verovatno nema direktan efekat na sintezu uree, ali je poznato da reprimira ekspresiju gena uključenih u put sinteze uree (Li i sar., 2004b). Tako, dijabetesom indukovano povećanje aktivnosti arginaze može da objasni smanjenje L-Arg koji se javlja, kako u plazmi dijabetičnih životinja i pacijenata (Hagenfeldt i sar., 1989; Pieper i

Dondlinger, 1997), tako i u vaskularnom tkivu pacova tretiranih streptozotocinom (Pieper i Dondlinger, 1997). Istraživanja na humanim endotelnim ćelijama su pokazala regulatorni efekat RhoA/ROCK puta (engl. *small GTPase RhoA/Rho-associated coiled-coil protein kinase pathway*) na povećanje aktivnosti arginaze. Kod apolipoprotein E-null miševa, povećana aktivnost arginaze II u aterosklerotičnim arterijama je u vezi sa povećanim nivoom RhoA proteina, što ukazuje na ulogu RhoA u povećanoj regulaciji aktivnosti arginaze. Podaci iz literature dozvoljavaju da se spekulira, da hiperglikemija direktno ili indirektno stimuliše RhoA/ROCK put, dovodeći do povećanja aktivnosti arginaze, a da insulin svojim delovanjem može da poboljša ovaj efekat na taj način što smanjuje aktivnost ovog enzima. Tako intenzivna kontrola hiperglikemije insulinom, treba da utiče na povećanje raspoloživosti arginina i smanjenje aktivnosti arginaze (Kashyap i sar., 2008).

Uzimajući u obzir dobro poznatu ulogu eNOS u endotelu krvnih sudova srca (Massion i Balligand, 2003), kao i prisustvo ovog enzima u kardiomiocitima (Kelly i sar., 1996; Barouch i sar., 2002; Ziolo i sar., 2008) od značaja je bilo izučavanje efekta akutnog dijabetesa i subhroničnog tretmana insulinom na ekspresiju eNOS u srcu pacova. Na osnovu podataka iz literature, koji se odnose na izučavanje ekspresije/aktivacije eNOS i iNOS u srcu tokom dijabetesa, može se zaključiti, da publikovani rezultati često nisu u saglasnosti. Farhangkhoe i saradnici (Farhangkhoe i sar., 2006a) su pokazali da je ekspresija iRNK za eNOS povećana 4 nedelje nakon tretmana streptozotocinom u srcu pacova sa dijabetesom. Takođe, rezultati Jesmin i saradnika (Jesmin i sar., 2006), su pokazali da je već sedam dana nakon streptozotocinskog tretmana, povećan sadržaj eNOS proteina u srcu pacova sa dijabetesom. Međutim, Felaco i saradnici (Felaco i sar., 2001) su pokazali da je u srcu pacova sa dijabetesom smanjen nivo iRNK i proteina eNOS.

Rezultati prikazani u ovoj studiji, su pokazali da dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom, nije došlo do značajnih promena, kako na nivou transkripcije, tako i na nivou translacije eNOS u srcu pacova sa dijabetesom

(Slika 14 i Slika 15), što je u skladu sa rezultatima El-Omar i saradnika (El-Omar i sar., 2003) i Cheng i saradnika (Cheng i sar., 2004) koji su pokazali da nije došlo do promene u nivou proteina eNOS u srcu pacova sa dijabetesom, kao i ekspresije gena za eNOS u srcu tri nedelje nakon tretmana streptozotocinom. Takođe, tretman insulinom nije doveo do promena ekspresije eNOS u srcu pacova sa dijabetesom (Slika 14 i Slika 15).

Regulacija aktivnosti eNOS u srcu ispitivana je preko određivanja enzimske fosforilacije na Ser<sup>1177</sup>, i pokazano je da je došlo do značajnog smanjenja nivoa fosforilacije u srcu pacova, dve nedelje nakon tretmana streptozotocinom. Smanjena aktivnost eNOS je u direktnoj vezi sa smanjenom fosforilacijom Akt na Ser<sup>473</sup> u srcu pacova sa dijabetesom, jer je poznato da je ova fosforilacija neophodna za aktivaciju eNOS. Takođe, rezultati drugih autora su pokazali da u dijabetesu, usled insulinske deficijencije, dolazi do smanjenja fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> (Cao i sar., 2012; Toque i sar., 2013). Tretman insulinom pacova sa dijabetesom je vratio nivo fosforilacije na kontrolni (Slika 16). Naime, poznato je da insulin pored metaboličkog ima i vazodilatatorni efekat, jer stimuliše aktivnost eNOS u endotelu krvnih sudova aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta (Zeng i sar., 2000). Protein kinaza B/Akt stimulirana insulinom direktno fosforiliše eNOS na Ser<sup>1177</sup> i ova aktivacija je nezavisna od Ca<sup>2+</sup>. Fosforilacija ne samo da aktivira eNOS, nego izgleda i povećava efikasnost aktivacije Ca<sup>2+</sup>/kalmodulinom (McCabe i sar., 2000). IRS1 i PDK1 imaju važnu ulogu u insulinskom signalnom putu koji dovodi do aktivacije eNOS (Montagnani i sar., 2002). Regulacija zavisna od fosforilacije i Ca<sup>2+</sup>-zavisna regulacija eNOS mogu biti odvojene i funkcionisati nezavisno (Montagnani i sar., 2001).

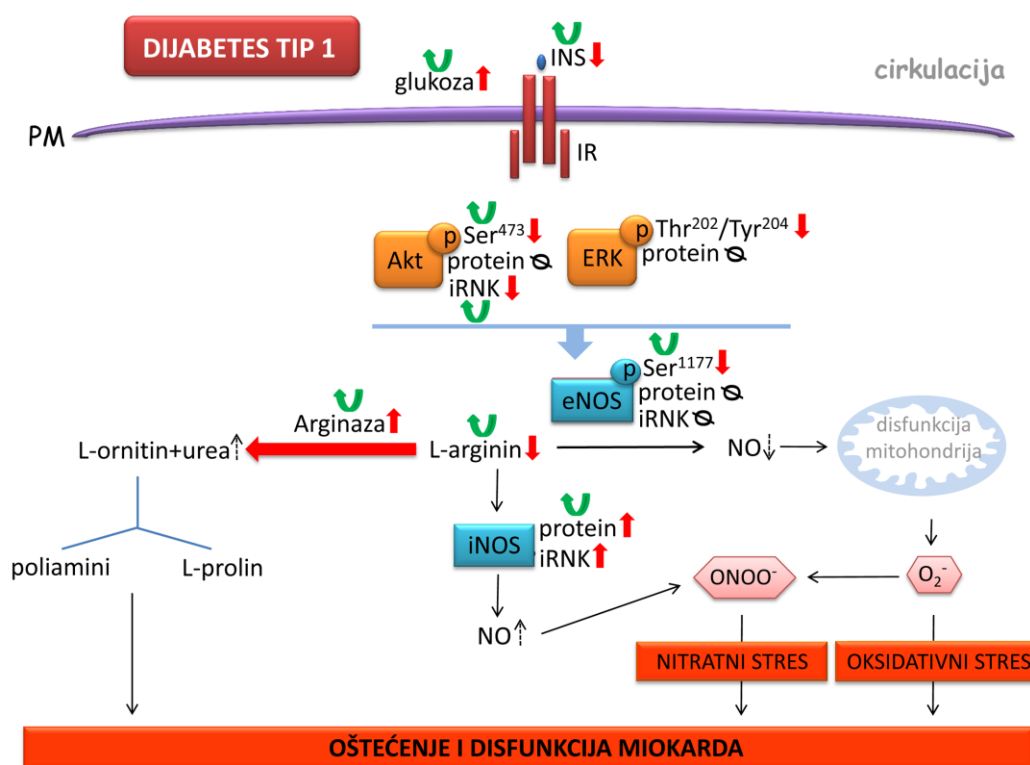
Ranija istraživanja su pokazala da je iNOS eksprimirana u srcu pacova nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom (Stockklauser-Farber i sar., 2000; Cheng i sar., 2004; Farhangkhoei i sar., 2006a; Jesmin i sar., 2006; Heusch i sar., 2010; Cao i sar., 2012), što ukazuje da ima važnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih poremećaja i bolesti. Rezultati prikazani u ovoj studiji, koji

se odnose na izučavanje akutnog dijabetesa na ekspresiju iNOS su u saglasnosti sa raspoloživim podacima u literaturi. U stanju akutnog dijabetesa, dve nedelje nakon streptozotocinskog tretmana, je došlo do značajnog povećanja nivoa proteina i ekspresije gena za iNOS u srcu pacova (**Slika 17** i **Slika 18**). Tretman insulinom je značajno smanjio nivo proteina iNOS u srcu pacova sa dijabetesom (**Slika 17**). Takođe, nivo iRNK za iNOS nakon tretmana insulinom pokazuje trend smanjenja ali ne do nivoa zabeleženih kod kontrole (**Slika 18**).

Poznato je da aktivacija iNOS izaziva produkciju velike količine NO, i naknadno formiranje velikih količina citotoksičnih produkata reaktivnih vrsta azota, superoksida i peroksinitrita, koji izazivaju slabljenje srčanih funkcija (Ferdinandy i sar., 2000; Cheng i sar., 2004). Inicijalni faktor koji može da dovede do indukcije iNOS može biti visok nivo glukoze. Eksperimenti Ceriello i saradnika (Ceriello i sar., 2002) su pokazali da perfuzija izolovanog srca sa rastvorom koji sadrži visoku koncentraciju glukoze za 2 sata povećava ekspresiju gena za iNOS kao i produkciju NO i superoksida, dovodeći do apoptoze ćelija srca. Takođe, eksperimenti drugih autora su pokazali da su velike količine NO koje stvara iNOS u kompeticiji sa superoksid dismutazom za superoksida u formiranju peroksinitrita koji dovode do oksidativnih oštećenja (Ferdinandy i Schulz, 2003). S druge strane, Heusch i saradnici (Heusch i sar., 2010) su zapazili da u stanju srčane insuficijencije dolazi do povećanja ekspresije kardijačne iNOS i arginaze II, što je praćeno smanjenjem koncentracije arginina u serumu, ali ne i nužnog povećanja koncentracije nitrita i nitrata.

Na osnovu podataka iz literature, većina rezultata koji se odnose na izučavanje promena aktivnosti/ekspresije NOS u dijabetesu, su dobijeni nakon dve i više nedelja od izazivanja dijabetesa. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Nagareddy i saradnika (Nagareddy i sar., 2005; Nagareddy i sar., 2009), koji su pokazali da ekspresija eNOS i iNOS u kardiovaskularnim tkivima zavisi od dužine trajanja dijabetesa. Rezultati istraživanja ove grupe su pokazali da u srcu pacova nema promene nivoa proteina eNOS od prve do treće nedelje

od indukcije dijabetesa, dok se statistički značajno povećanje nivoa iNOS javlja već nakon tri nedelje. Takođe, ova grupa autora je pokazala, da povećana ekspresija iNOS u srcu, aorti i mezenteričnom tkivu, može da utiče na smanjenu ekspresiju eNOS i moguću disfunkciji endotela 9 i 12 nedelja nakon indukcije dijabetesa. To ukazuje da je regulacija ekspresije eNOS i iNOS izoformi različita: produženo stanje dijabetesa dovodi do smanjenja ekspresije eNOS uz istovremeno povećanje ekspresije iNOS i stvaranja nitrotirozina, *in vivo* biomarkera oksidativnih oštećenja. Interakcija NO, nastalog od iNOS sa ROS i stvaranje peroksinitrita ili nitrotirozina mogu uticati na naknadni hemodinamski ishod u eksperimentalnom dijabetesu (Nagareddy i sar., 2005).



**Slika 32. Regulacija kompeticije za L-arginin između NOS i arginaze u srcu pacova sa dijabetesom i nakon supstitucije insulinom.**

Ins: insulin; IR: receptor za insulin; PM: plazma membrana; Akt: protein kinaza B; ERK: kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima; NO: azot-monoksid; eNOS: endotelna izoforma sintaze NO; iNOS: inducibilna izoforma sintaze NO; ONOO<sup>-</sup>: peroksinitriti; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoksidi. Crvene strelice: promene nastale nakon streptozotocinom izazvanog dijabetesa; lučne zelene strelice: supstitucija insulinom ostvarila efekat; ∅: izostanak promene; isprekidane strelice: potencijalne promene.



Na osnovu rezultata ove studije i prema podacima iz literature, konstatujemo da u akutnoj fazi dijabetesa dolazi do značajne indukcije enzima arginaze u srcu, a samim tim i smanjene koncentracije L-arginina, kao i da povećana aktivnost arginaze prethodi promenama u ekspresiji/aktivnosti NOS. U stanju akutnog dijabetesa, srce je verovatno minimalno pogođeno, ali molekularni mehanizmi dijabetesom izazvanih promena u srcu su već pokrenuti u ovoj fazi. Tretman insulinom nakon sedam dana kod pacova sa dijabetesom je uspeo da smanji aktivnost arginaze i poveća dostupnost L-arginina za NOS u srcu. Takođe, supstitucija hormonom je povećala nivo fosforilacije eNOS i smanjila ekspresiju iNOS u srcu pacova sa dijabetesom (Slika 32).

## **5.2. Regulacija molekula signalnog puta insulina u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom**

Insulin je najpotentniji anabolički hormon, a prenos insulinskog signala sa njegovog receptora uključuje kompleksnu i visoko integrisanu mrežu molekula koji kontrolišu različite procese. Tačni unutarćelijski događaji koji posreduju u delovanju insulina još uvek su nedovoljno poznati ali se smatra da ključnu ulogu ima regulacija fosforilacije signalnih proteina (Saltiel, 1994). Balans između signalnih puteva PI3K/Akt i Ras/MAPK insulina održava normalan ćelijski rast, metabolizam i funkcionisanje u fiziološkim uslovima. Pored niza štetnih efekata na ćelijski integritet i funkciju, poremećaj metabolizma u dijabetesu utiče na sve veći broj promena u signalnoj transdukciji. Da li specifični proteini nishodno u insulinskom signalnom putu, kao što su PKB/Akt i ERK, pokazuju promene u ekspresiji i/ili aktivaciji u dijabetesu, predmet su intenzivnih izučavanja. Velika pažnja koja se u istraživanjima posvećuje ovim mehanizmima nije iznenađujuća, s obzirom na

moguć terapeutski značaj specifičnih farmakoloških modulacija signalnih puteva (Ishii i sar., 1996).

Molekuli signalnog puta insulina PI3K/Akt, su važni modulatori metaboličkog iskorišćavanja supstrata i funkcije kardiomiocita (Matsui i sar., 2003). Akt se nalazi na raskrsnici brojnih signalnih puteva koji su usmereni na održavanje homeostaze u srcu (Miyamoto i sar., 2009; Sussman i sar., 2011). Glavni efekti aktivacije Akt u kardiomiocitima su povećanje veličine ćelija, sprečavanje apoptoze i regulisanje metabolizma glukoze (Latronico i sar., 2004).

Iako su promene u regulaciji insulin/PI3K/Akt signalnog puta u srcu kod dijabetesa tipa 1 (Wang i sar., 1999; Laviola i sar., 2001; Ekladous i sar., 2008; Kuo i sar., 2009; Yang i sar., 2009; Stojiljkovic i sar., 2012) i dijabetesa tipa 2 (Huisamen i sar., 2001; Huisamen, 2003; Desrois i sar., 2004; Darmellah i sar., 2007; Huisamen i sar., 2012) dobro izučene, objavljeni rezultati dobijeni uglavnom iz različitih animalnih modela dijabetesa su u suprotnosti. Neusaglašenost rezultata vezana je za ekspresiju i aktivnost Akt, kao i za molekule ushodno (IR, IRS, PI3K) i nishodno (GLUT4, GSK3, FOXO1, apoptotski molekuli) od Akt. Bez obzira, ipak svi se slažu da promene u regulaciji Akt kinaznog puta u srcu narušavaju regulaciju važnih srčanih funkcija od strane insulina i da su uključene u patogenezu dijabetične kardiomiopatije.

U patofiziološkim uslovima, kao što je dijabetes tipa 1, prenos signala sa insulinskog receptora u srcu, uključujući i put PI3-K/Akt, je narušen (Laviola i sar., 2001; Gross i sar., 2007; Ekladous i sar., 2008). Laviola i saradnici (Laviola i sar., 2001) su pokazali da u srcu pacova usled deficita insulina, u stanju hiperglikemije, dolazi do heterogenih promena različitih signalnih proteina, uključujući IR, IRS-2, Shc, PI3K, Akt i kinaze glikogen sintaze 3 (GSK-3, engl. *glycogen synthase kinase 3*), a da nakon transplanatacije pankreasnih ostrvaca pacovima sa dijabetesom dolazi do korekcije promena u ekspresiji i aktivnosti nekih, ali ne svih molekula insulinskog signalnog puta (Laviola i sar., 2001).

U okviru naših istraživanja ispitivana je ekspresija Akt i regulacija aktivnosti Akt preko fosforilacije na Ser<sup>473</sup> u srcu pacova sa dijabetesom, kao i nakon tretmana insulinom. Ranija istraživanja su pokazala da postoji dobra korelacija između fosforilacije Akt i njene enzimske aktivnosti (Ekladous i sar., 2008). Fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> je od izuzetnog značaja za njeno funkcionisanje (Latronico i sar., 2004), i to fosforilacija na Thr<sup>308</sup> za aktivaciju, a fosforilacija na Ser<sup>473</sup> za maksimalnu aktivnost Akt (Downward, 1998). PDK1 je kinaza koja fosforiliše Akt na Thr<sup>308</sup> (Stokoe i sar., 1997) ali je za fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> odgovorna druga kinaza, PDK2 (Alessi i sar., 1996).

U našim eksperimentima je pokazano da nema statistički značajne promene nivoa ukupnog Akt proteina u srcu pacova sa dijabetesom, kao i nakon tretmana insulinom (**Slika 19**). Nivo iRNK za Akt je značajno smanjena u srcu pacova sa dijabetesom, a hormonska supstitucija je vratila nivo iRNK na nivo zabeležen u srcu kontrolnih pacova (**Slika 20**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da nema promene nivoa proteina Akt u srcu pacova sa dijabetesom, kao i nakon tretmana insulinom (Laviola i sar., 2001; Gross i sar., 2007; Ekladous i sar., 2008).

Nasuprot izostanku promene na nivou ekspresije proteina, fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> je značajno smanjena u srcu pacova sa dijabetesom. Tretman insulinom je povećao nivo fosforilacije Akt i vratio je na nivo kontrole (**Slika 21**). Rezultati drugih autora su takođe pokazali da je fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> u srcu pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom smanjena (Laviola i sar., 2001; Gross i sar., 2007; Ekladous i sar., 2008; Huang i sar., 2009; Kuo i sar., 2009; Cao i sar., 2012), a da je tretman insulinom doveo do povećanja nivoa fosforilacije (Laviola i sar., 2001; Ekladous i sar., 2008; Huang i sar., 2009; Kuo i sar., 2009). Naime, postoji opšta saglasnost u literaturnim podacima da insulin stimuliše fosforilaciju Akt u srcu i kardiomiocitima u kulturi (Soltys i sar., 2002; Carvalheira i sar., 2003; Xing i sar., 2009). Pokazano je da insulin ima mnogo veći efekat na fosforilaciju na Thr<sup>308</sup> nego na Ser<sup>473</sup> (Laviola i sar., 2001; Huang i sar., 2009). Različite kinaze fosforilišu ove aminokiselinske ostatke koji mogu

biti regulisani individualno (Laviola i sar., 2001), što ukazuje na različitu ulogu ove dve fosforilacije za funkcionisanje Akt (Zdychova i Komers, 2005). Naime, insulin utiče na aktivaciju Akt, više nego na njenu maksimalnu aktivnost. Aktivirana Akt postaje sposobna da fosforiliše svoje nishodne ciljne molekule u različitim unutarćelijskim lokacijama uključujući i jedro (Zdychova i Komers, 2005). Akt se inaktivira defosforilacijom proteinskim fosfatazama, kao što je proteinska fosfataza A2, i ovaj korak je jako važan u regulaciji njene aktivnosti (Resjo i sar., 2002). Takođe je pokazano da ceramidi podstiču defosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup>, ali ne i Thr<sup>308</sup> (Schubert i sar., 2000). Istraživanja pojedinih autora su pokazala da je aktivnost PKC $\zeta$ , još jednog direktnog supstrata PDK1 (Liu i sar., 1999), takođe povećana u srcu tokom dijabetesa (Chou i sar., 1998), podržavajući ideju o PDK1 regulaciji.

Naruse i saradnici (Naruse i sar., 2006) su pokazali da prekomerna ekspresija PKC $\beta$  smanjuje insulinom-stimulisanu fosforilaciju Akt i eNOS, odnosno PKC negativno reguliše aktivnost Akt, tj. smanjuje njenu fosforilaciju na Ser<sup>473</sup>, kao i katalitičku aktivnost. Inhibicija prekomerne aktivacije PKC $\beta$ 2 ublažava smanjenje ekspresije kaveolina-3 i fosforilacije Akt/eNOS u kardiomiocitima izloženim visokom nivou glukoze (Lei i sar., 2013).

Za razliku od većina članova familije MAPK koji učestvuju u aktivaciji transkripcionih faktora, ERK ostvaruje svoje efekte fosforilišući proteine citoplazme koji učestvuju u odgovoru na ćelijski rast i proliferaciju, kao i apoptozu (Widmann i sar., 1999). Povećana bazalna aktivnost ERK1/2 izgleda doprinosi razvoju insulinske rezistencije putem pojačane fosforilacije na serinu molekula signalnog puta insulina. Sa druge strane p38 MAPK, povećava apsorpciju glukoze preko glukoznog transportera GLUT4 (Pirola i sar., 2004). Insulin utiče na aktivnost ERK1/2 prvenstveno preko aktivacije Ras/Raf puta (Crews i sar., 1992), ali i PI3K i PKC. Vortmanin, inhibitor PI3K, i GF109203K, inhibitor PKC, blokiraju insulinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 (Al-Khalili i sar., 2004). Iako se nespecifičan efekat ovih inhibitora na ERK1/2 ne može isključiti, ovaj nalaz je u saglasnosti sa sve većim brojem podataka koji ukazuju

na to da je PI3K, preko atipičnih PKC, uključena u aktivaciju ERK (Liu i sar., 2000; Chen i sar., 2002; Farese, 2002).

Publikovani rezultati dobijeni izučavanjem efekata insulina na aktivnost ERK1/2 u srcu su kontroverzni. Neki autori su ustanovili da tretman insulinom dovodi do povećanja fosforilacija ERK1/2 na Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (Wang i sar., 2001; Carvalheira i sar., 2003), dok su drugi (Laviola i sar., 2001; Soltys i sar., 2002; Koricanac i sar., 2011) pokazali odsustvo promene fosforilaciji ERK1/2 u srcu u odgovoru na insulin.

Rezultati ispitivanja aktivnosti ERK1/2 u srcu pacova kojima je streptozotocinom indukovano dijabetes su neusaglašeni. Tako su Gross i saradnici i Ekladous i saradnici (Gross i sar., 2007; Ekladous i sar., 2008) pokazali da tokom dijabetesa dolazi do smanjenja fosforilacije ERK1/2 u srcu, i da nivo fosforilacije može ostati smanjen i nakon subkutanog insulinskog implanta (Ekladous i sar., 2008). Drugi autori su pokazali da ne dolazi do promene fosforilacije ERK1/2 u srcu pacova sa dijabetesom (Laviola i sar., 2001; Kim i sar., 2010), čak i nakon transplantacije pankreasnih ostrvaca (Laviola i sar., 2001). Međutim, Naito i saradnici (Naito i sar., 2003) i Landau saradnici (Landau i sar., 2008) su pokazali da je nivo fosforilacije ERK1/2 u srcu pacova povećan 4 i 6 nedelja nakon tretmana streptozotocinom, i da je fosforilacija značajno smanjena tek nakon 20 nedelja od izazivanja dijabetesa (Naito i sar., 2003). Povećanje fosforilacije/aktivacije ERK1/2 u levoj komori srca pacova sa dijabetesom doprinosi hipertrofiji srca (Chang i sar., 2011).

Mi smo pokazali da u srcu pacova sa dijabetesom netretiranih ili tretiranih insulinom nema promene nivoa ukupnog ERK1/2 proteina (**Slika 22A**). Međutim, nivo fosforilacije ERK1/2, je bio značajno smanjen u grupi pacova sa streptozotocinom izazvanim dijabetesom, koja je ostala smanjena i nakon hormonske supstitucije (**Slika 22B**). Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ekladous i saradnika (Ekladous i sar., 2008) koji su pokazali da je fosforilacija ERK1/2 u srcu pacova sa akutno izazvanim dijabetesom smanjena,

i da nivo fosforilacije ostaje smanjen i nakon subkutane aplikacije insulinskog implanta.

Osim toga, Basu i saradnici (Basu i sar., 2009) su ukazali na vremenski-zavisnu promenu u signalnom putu ERK1/2 i Akt tokom insulinskog deficita. Naime, ovi autori su pokazali da postoji bimodalni odgovor ERK1/2 u srcu *Akita* (*Ins2<sup>WT/C96Y</sup>*) miševa (genetički model dijabetesa tipa 1). Kod miševa starosti 3 meseca fosforilacija ERK1/2 u srcu je bila smanjena, a fosforilacija Akt na na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> nepromenjena, za razliku od miševa starih 6 meseci kod kojih je fosforilacija ERK1/2 bila povećana, a fosforilacija Akt smanjena. Početno smanjenje fosforilacije ERK1/2 nastaje usled deficita insulina i/ili hiperglikemije, dok kasnije povećanje fosforilacije može nastati usled progresije bolesti kod ovih miševa, koju prati aktivacija neurohumoralnog sistema, dovodeći do povećane stimulacije G protein-vezanog receptora i/ili promene u biomehaničkom stresu, kao što je povećanje krvnog pritiska (Basu i sar., 2009). Kao što su pokazali i naši rezultati, smanjenja fosforilacija na ERK1/2 i Akt je verovatno posledica smanjene aktivacije insulinskog receptora usled deficita insulina. Izostanak smanjenja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup> kod 3 meseca starih *Akita* (*Ins2<sup>WT/C96Y</sup>*) miševa može se objasniti kompenzatornim promenama drugih agonista kao što su IGF-1 i/ili adiponektin za koje se takođe zna da aktiviraju Akt/PKB put (Leth i sar., 2008; Oudit i sar., 2008; Oudit i Penninger, 2009).

### **5.3. Ekspresija i translokacija transportera za glukozu i masne kiseline u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom**

Za normalno funkcionisanje srca potrebna je visoka efikasnost konverzije energije. Procesi koji se odvijaju u mitohondrijama i koji zavise od kiseonika prenose hemijsku energiju iz metaboličkih supstrata u ATP. Zdrav miokard

koristi masne kiseline kao glavni izvor energije, sa manjim doprinosom glukoze. Pored toga, laktat, ketonska tela, amino kiseline, ili čak acetat se mogu oksidovati pod određenim okolnostima. Korišćenje različitih supstrata zavisi od njihove dostupnosti, kao i potrebe za energijom. Relativna koncentracija supstrata je ključni faktor koji definiše izbor i stepen iskorišćenja (Kodde i sar., 2007).

Insulin je uključen u regulaciju metabolizma ugljenih hidrata i lipida u srcu. Regulacija alosterije enzima i fosforilacione kaskade proteina, koji su delimično pod kontrolom insulina, modulišu efekat koncentracije supstrata i zajedno obezbeđuju kratkoročne korekcije energetskeg metabolizma srca (Kodde i sar., 2007), ali još nije poznato koliki je udeo metaboličkih efekata u kardioprotektivnom delovanju insulina. Na molekularnom nivou insulinski signalni put je uključen u regulaciju funkcije transportera za glukozu i FFA (Bertrand i sar., 2008).

Insulin svoje metaboličke efekte ostvaruje preko PI3K/Akt puta. Akt je uključen u metabolizam glukoze na dva glavna nivoa. Nakon stimulacije insulinom i asocijacije Akt sa vezikulama koje sadrže GLUT4 (Calera i sar., 1998), transport glukoze je posredovan Akt-indukovanom translokacijom ovih vezikula iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane (Kohn i sar., 1996; Hajdich i sar., 1998). Aktivacija Akt povećava i ekspresiju GLUT4 u kardiomiocitima (Matsui i sar., 2001). Pokazano je da se insulinska rezistencija kod gojaznih Zucker pacova može objasniti smanjenom translokacijom GLUT4 na plazma membranu, odnosno da promene u insulinskoj signalnoj transdukciji dovode do smanjene aktivacije PI3K i Akt, kao i do promena atipičnih PKC, što ima za posledicu smanjenje proteinskog sadržaja i translokacije GLUT4 (Carvalho i sar., 2000; Tremblay i sar., 2001).

GLUT1 je eksprimiran na relativno visokom nivou u kardiomiocitima, za razliku od miocita skeletnih mišića (Kraegen i sar., 1993), što navodi na to da je esencijalan za održavanje glukoznog transporta u srcu nezavisno od fizioloških i patofizioloških stimulusa. Međutim, insulin deluje i na GLUT1 preko najmanje

dva mehanizma: povećanja njegove ekspresije, kao i translokacije iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane (Welch i Gorski, 1999).

U stanju dijabetesa i insulinske rezistencije, srce je u stanju da brzo prilagodi svoj energetskei metabolizam, smanjujući korišćenje glukoze i povećavajući potrošnju masnih kiselina. Preciznije, u dijabetesu, srce postaje gotovo isključivo zavisno od metabolizma masnih kiselina. Tada se povećava preuzimanje i oksidacije masnih kiselina, smanjuje oksidacija glukoze što dovodi do smanjenja produkcije ATP i prekomerne produkcije ROS (Vassort i Turan, 2010). Metabolička odstupanja u srcu tokom dijabetesa, kao primer metaboličke maladaptacije, su važan faktor koji doprinosi dijabetičnoj kardiomiopatiji (Lopaschuk, 2002; Taegtmeyer i sar., 2002; Young i sar., 2002). Tokom dijabetesa, promene u metabolizmu u srcu se javljaju rano i prethode razvoju kardiomiopatije. Na primer, u eksperimentalnom modelu streptozotocinom indukovano dijabetesa, promene u metabolizmu srca se primećuju već četvrtog dana nakon izazivanja dijabetesa, a dokaz o kardiomiopatiji je vidljiv tek nakon 4–6 nedelja (Ghosh i sar., 2004).

Rezultati ovog istraživanja, koji se odnose na izučavanje ekspresije transportera za glukozu u ćelijama srca pacova sa dijabetesom su pokazali da je nakon streptozotocinom izazvanog dijabetesa došlo do značajnog smanjenja nivoa proteina i ekspresije gena za GLUT4 (**Slika 23** i **Slika 24**) i GLUT1 (**Slika 26** i **Slika 27**). S obzirom da signalni put PI3K/Akt reguliše ekspresiju glukoznih transportera, smanjena aktivnost PKB/ Akt, koju smo konstatovali i u našoj studiji je u direktnoj vezi sa smanjenjem ekspresije GLUT4 i GLUT1 i na nivou gena i na nivou proteina. Hormonska supstitucija je u srcu pacova sa dijabetesom vratila nivo proteina GLUT4 na kontrolnu vrednost (**Slika 23**), međutim nivo iRNK za GLUT4 je i dalje ostao značajno smanjen u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 24**). Subhronična aplikacija insulina nije dovela do značajnih promena ekspresije GLUT1 u dijabetesu, ali rezultati ukazuju na trend povećanja ekspresije i vraćanje na nivo kontrole (**Slika 26** i **Slika 27**).



Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora (Guo i sar., 2007; Ekladous i sar., 2008) koji su pokazali da u streptozotocinom indukovanom dijabetesu dolazi do smanjenja sadržaja GLUT4 u srcu, koju insulinska suplementacija samo delimično normalizuje. Ekladous i saradnici (Ekladous i sar., 2008) su pokazali da se sadržaj GLUT1 nije menjao u srcu pacova sa dijabetesom netretiranim ili tretiranim insulinom. Promene u ekspresiji gena za GLUT4 su zapažene u uslovima promenjene glukoze homeostaze, i ona je uglavnom smanjena u uslovima insulinskog deficita, kao što je dijabetes indukovan streptozotocinom (Olson i Knight, 2003) Olson 2005. Rezultati istraživanja Depre i saradnika (Depre i sar., 2000) su pokazali da kako nakon sedam dana, tako i nakon 6 meseci od davanja streptozotocina, nivo iRNK za GLUT4 i GLUT1u srcu je smanjen 55–70%. Promene nivoa iRNK za GLUT mogle bi biti rezultat promena u količini sintetisane iRNK ili njene stabilnosti. Na osnovu naših rezultata može se zaključiti da je insulin nije uspeo da u potpunosti koriguje sve promene na nivou ekspresije glukočnih transportera u srcu, što je u saglasnosti sa rezultatima Xu i saradnika, koji su pokazali da je insulinski tretman samo delimično efikasan u ispravljanju promena na nivou glukočnih transportera u srcu pacova sa dijabetesom (Xu i sar., 2010).

Osim ekspresije GLUT4 i GLUT1 pratili smo translokaciju ovih transportera u srcu, preko određivanja unutarćelijske lokalizacije GLUT4 i GLUT1. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da nema promene nivoa proteina GLUT4 i GLUT1 u citoplazmatskoj frakciji (**Slika 25A** i **Slika 28A**) u odnosu na kontrole, dok je nivo ovih transportera značajno smanjen u plazma membranama ćelija srca kod pacova sa dijabetesom (**Slika 25B** i **Slika 28B**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (Norby i sar., 2002; Montanari i sar., 2005; Huang i sar., 2009) koja su pokazala da u srcu pacova sa dijabetesom dolazi do smanjenog nivoa proteina GLUT4 u PM. Huang i saradnici (Huang i sar., 2009) su pokazali da je dve nedelje nakon injekcije streptozotocinom, u citoplazmatskoj frakciji srca, došlo do smanjenja nivoa

proteina GLUT4 i GLUT1, bez promene nivoa GLUT1 u PM. Da li je dijabetesom indukovano smanjenje translokacije GLUT4 na plazma membranu jednostavno rezultat poremećaja u insulinskom signalnom putu, koji smo u našim istraživanjima zapazili na nivou smanjene fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> i/ili oslabljene kontrakcije koja posredno utiče na translokaciju GLUT4, još uvek treba da se razjasni, s obzirom da dijabetes takođe dovodi do smanjenja kontraktilnosti komora (Huang i sar., 2009).

Naši rezultati su pokazali da je tretman insulinom kod pacova sa dijabetesom povećao nivo proteina GLUT4 u citoplazmatskoj frakciji ćelija srca u odnosu na odgovarajuće kontrole (**Slika 25A**), ali je zato nivo proteina GLUT1 ostao nepromenjen (**Slika 28A**). Tretman insulinom je doveo do značajnog smanjenja nivoa oba transportna proteina u frakciji PM ćelija srca (**Slika 25B** i **Slika 28B**).

Literaturni podaci pokazuju da regulacija insulinom stimulisane translokacije glukočnih transportera iz specifičnih unutarćelijskih organela do plazma membrane uključuje složenu mrežu signalnih puteva. Najbolje ispitan je IR/PI3K/Akt put, kao što je prethodno pomenuto. Aktiviranje IR/PI3K/Akt puta u skeletnim mišićima se odvija oko 2 minuta po tretmanu insulinom, a kaveolin-3, koji se nalazi u kompleksu sa IR, stimuliše fosforilaciju IRS1 (Fecchi i sar., 2006). Nezavisna istraživanja drugih autora su pokazala da je AS160 negativni regulator bazalne egzocitoze GLUT4 (Kane i sar., 2002; Eguez i sar., 2005). Pokazano je da je AS160, supstrat za PKB/Akt, uključen u unutarćelijsko zadržavanje GLUT4 u bazalnim uslovima (Sano i sar., 2003; Eguez i sar., 2005). Insulin indukuje fosforilaciju AS160 (Coort i sar., 2007) i time ga inaktivira i tako favorizuje translokaciju GLUT4 u adipocitima i miocitima (Kramer i sar., 2006b). Insulin utiče i na fosforilaciju AS160 u kardiomiocitima (Ginion i sar., 2011). Međutim, novije studije na adipocitima i miotubulima, pokazuju da PKB/AS160 osa verovatno nije jedini mehanizam, kojim insulin reguliše translokaciju GLUT4. Zaista, TBC1D1, koji je takođe supstrat za PKB/Akt, mogao bi da ima ulogu paralelno AS160 (Roach i sar., 2007; Chen i sar., 2008).

Za druga dva supstrata PKB/Akt, fosfoinozitol 5-kinazu (engl. *PIKfive*) (Berwick i sar., 2004) i specifične transmembranske proteine SNARE (engl. *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) (Yamada i sar., 2005), se takođe pretpostavlja da učestvuju u translokaciji GLUT4.

Takođe je pokazano da je aktivacija atipičnih izoformi PKC  $\lambda$  i  $\zeta$ , preko fosforilacije PDK1 u odgovoru na insulin, neophodna za stimulisanje translokacije GLUT4 do površine ćelije, odnosno transporta glukoze u ćeliju (Farese i Sajan, 2010). U *in vitro* uslovima je pokazano da se PKC $\zeta$  ne aktivira insulinom, ali je njena aktivnost izgleda ipak potrebna za translokaciju GLUT4 (Luiken i sar., 2009). Prema tome uloga PKC $\zeta$  u insulinom stimulisanom transportu glukoze u kardiomiocite je permisivna, pre nego stimulatívna.

Depo insulinskih receptora koji su asocirani sa kaveolama, u stanju su da fosforilišu APS, Cbl-vezujući protein (engl. *Cbl-binding protein*) i Cbl (Ribon i Saltiel, 1997; Ahmed i sar., 1999). Cbl interaguje sa proteinom asociranim sa Cbl (CAP, engl. *Cbl associated protein*). Krajnji rezultat ovog kompleksnog puta je zamena guanozin difosfata vezanog za TC10 (protein familije Rho) sa GTP-om. Zatim, TC10 bi mogao da interaguje sa nekoliko unutarćelijskih proteina koji su još uvek nepoznati, što konačno dovodi do translokacije GLUT4 do plazma membrane (Ribon i Saltiel, 1997; Chiang i sar., 2001). APS/Cbl/CAP put, izgleda, funkcioniše paralelno sa IR/IRS1/PI3K putem (Fecchi i sar., 2006). Kaveole i kaveolin su uključeni u nekoliko aspekata biologije ćelije, uključujući vezikularni transport i transdukciju signala. Brojni molekuli se nalaze u kaveolama, uključujući Src tirozin kinaze, receptore spregnute sa proteinom G, elemente Ras/MAPK signalinog puta i NOS (Cohen i sar., 2003). Na efikasnost unutarćelijskih signalnih puteva može uticati lokalizacija signalnih molekula u kaveolama i njihova interakcija sa kaveolinima, stoga nije iznenađujuće da promenjena ekspresija kaveolina može doprinostiti različitim bolestima. Promene u ekspresiji izoformi kaveolina su ustanovljene u hipertrofiji srca, ali je još uvek nejasno da li su uzrok ili posledica hipertrofije. Promena u ekspresiji

kaveolina svakako menja sposobnost hipertrofiranog srca da odgovori na različite fiziološke i farmakološke agoniste (Patel i sar., 2008).

Insulin nije jedini okidač koji indukuje translokaciju GLUT4. Aktivacija AMPK sistema takođe izaziva translokaciju GLUT4, mehanizmima koji se samo delimično preklapaju sa insulinskim signalnim putem. Nedavna istraživanja su pokazala da je AS160 takođe ciljani protein i za aktiviranu AMPK u regulaciji translokacije GLUT4 (Kramer i sar., 2006a; Thong i sar., 2007).

Aktivacija transporta glukoze insulinom i AMPK se razlikuje i po mestu koje translocirani GLUT4 zauzima na plazma membrani kardiomiocita. Insulin uglavnom podstiče translokaciju GLUT4 na T-tubule, dok se u odgovor na aktivaciju AMPK, GLUT4 translocira i na T-tubule i na plazma membrane kardiomiocita (Davey i sar., 2007).

Postojanje ovako složene mreže signalnih puteva koja ne uključuje samo jedan linearni put aktiviran vezivanjem insulina za receptor, nego i druge grane i paralelne signalne puteve, ne dozvoljava nam jednostavan odgovor za objašnjenje nastalih promena u translokaciji transportera za glukozu u uslovima dijabetesa i nakon insulinske terapije.

U dijabetesu, srce se skoro u potpunosti oslanja na masne kiseline, pošto je preuzimanje i naknadno iskorišćenje glukoze smanjeno (Lopaschuk, 1996). Postoji nekoliko objašnjenja za ovu promenu u korišćenju supstrata u „dijabetičnom srcu”. Prvo, insulin-zavisno preuzimanje glukoze, preko GLUT4 je smanjeno, tako da je katabolizam glukoze smanjen. Drugo, oslobađanje FFA iz masnog tkiva je povećano. Uprkos povećanom korišćenju FFA u dijabetičnom srcu, verovatno je da preuzimanje FFA premašuje nivo njihove oksidacije što dovodi do akumulacije lipida u miocitama i lipotoksičnosti (Sharma i sar., 2004). Akumulacija lipidnih intermedijera kao što su TG, DAG i ceramidi dovodi do aktivacije kinaza uključenih u negativnu regulaciju delovanja insulina (Yu i sar., 2002; Bandyopadhyay i sar., 2006; Zhang i sar., 2010). Aktivacija JNK-AP-1, IKKNF- $\kappa$ B i PKC kaskade od strane lipidnih metabolita su dobro okarakterisani mehanizmi negativne povratne sprege u

regulaciji delovanja insulina, koje deluju preko fosforilacije na serinu IRS1 (Schenk i sar., 2008). Osim toga, lipidni metaboliti mogu podstaći apoptozu kardiomiocita i dovesti do disfunkcije srca.

Povećano snabdevanje srca masnim kiselinama u stanju dijabetesa i gojaznosti dovodi do povećane  $\beta$ -oksidacije. Na primer,  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina u srcu je povećana kod 4 nedelje starih *db/db* i *ob/ob* miševa pre značajne promene FFA u cirkulaciji (Buchanan i sar., 2005). Jedno od mogućih objašnjenja je povećana aktivnost LPL koja može potencijalno da doprinese povećanju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (Rodrigues i sar., 1997; Boivin i Deshaies, 2000).

Promene u preuzimanju masnih kiselina u dijabetesu zavise i od ekspresije i lokalizacije transportera za masne kiseline u srcu. Tokom dijabetesa i insulinske rezistencije, veći nivo preuzimanja FFA je olakšan transporterima za masne kiseline, što dovodi do povećanja oksidacije FFA i nagomilavanja TG. U streptozotocinom indukovanom dijabetesu, povećan unos FFA u srce je posledica povećane translokacije CD36 i FABPpm iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane, kao i povećane ekspresije ovih proteina (Luiken i sar., 2002a).

PPAR- $\alpha$  kao primarni regulator metabolizma masnih kiselina, ima važnu ulogu u kontroli oksidacije masnih kiselina u dijabetesu. Aktivacija PPAR- $\alpha$  PGC-1 signalnog puta u srcu je zapažena u skoro svim animalnim modelima dijabetesa i gojaznosti, uključujući i pacove sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom, ZDF pacove, i *ob/ob* i *db/db* miševe (Finck i sar., 2002; Sharma i sar., 2004; Buchanan i sar., 2005). Interesantno je da je kod hronično (6 nedelja), ali ne i akutno (4 dana) streptozotocinom indukovanog dijabetesa, zapažena aktivacija PPAR- $\alpha$  u srcu (An i Rodrigues, 2006). U akutnom, streptozotocinom indukovanom dijabetesu ili kod 4 nedelje starih *ob/ob* ili *db/db* miševa, zapaženo je povećanje oksidacije FA u odsustvu promene PPAR- $\alpha$  kao i njenih nishodnih molekula, što ukazuje da je oksidacije FFA nezavisna od PPAR- $\alpha$ .

Paralelno sa izučavanjem ekspresije i lokalizacije transportera za glukozu pratili smo ekspresiju i ćelijsku lokalizaciju CD36 transportera u srcu pacova sa dijabetesom pre i nakon tretmana insulinom. Dobijeni rezultati su pokazali da nema promene nivoa transportera CD36 u ukupnom ćelijskom lizatu srca svih eksperimentalnih grupa (**Slika 29**). Međutim, nivo ekspresije iRNK za CD36 u srcu pacova sa dijabetesom je značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu, dok tretman insulinom vraća nivo iRNK za CD36 na kontrolni (**Slika 30**).

Relativne promene i obim promena u transportu masnih kiselina i u ekspresiji i lokalizaciji njihovih transportera razlikuje se među tkivima i/ili zavisi od težine stanja dijabetesa. Na primer, transport masnih kiselina u srcu se povećava progresivno sa pogoršanjem dijabetesa. Promene u transportu masnih kiselina posledica su promena u ekspresiji proteina i sadržaju CD36 i FABP na plazma membrani. Promene u ekspresiji proteina nisu dosledno u vezi sa promenama iRNK ovih proteina (Glatz i sar., 2010).

Regulacija ekspresije transportnih proteina za masne kiseline se vrši različitim mehanizmima. Kod streptozotocinom indukovano dijabetesa, ekspresija CD36 i FABP u srcu je povećana (Luiken i sar., 2002c), ukazujući na modifikacije na nivou transkripcije. Mehanizmi koji dovode do ovih promena još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Mišićne kontrakcije ili akutni tretman insulinom ne menjaju protein već vrše redistribuciju CD36 iz unutarćelijskih odeljaka ka plazma membrani (Luiken i sar., 2002c; Luiken i sar., 2003), što ukazuje na posttranslacionu regulaciju ovih transportera.

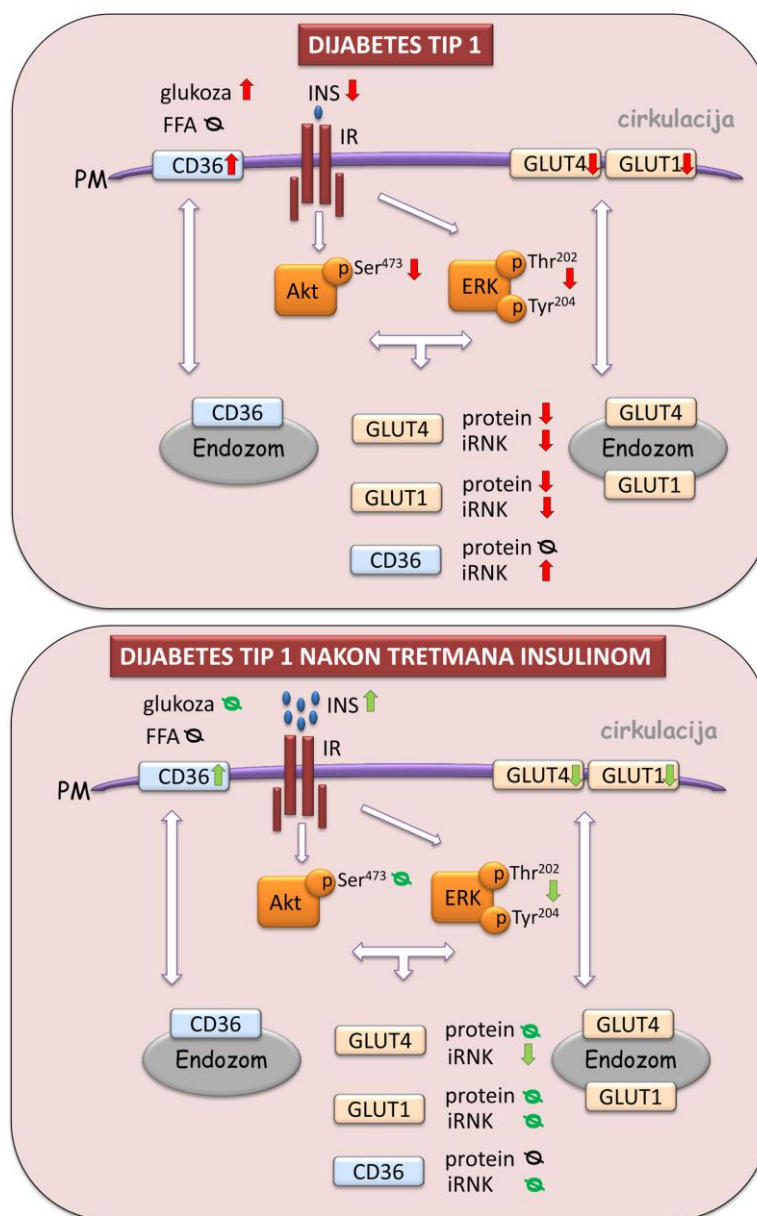
U ovom istraživanju je pokazano da je u stanju dijabetesa smanjen nivo proteina CD36 u citoplazmatskoj frakciji ćelija srca (**Slika 31A**), a višestruko povećan u frakciji PM (**Slika 31B**). Ranija istraživanja su pokazala da je velika količina CD36 lokalizovana u plazma membrani bez promena u ukupnom ćelijskom sadržaju proteina (Luiken i sar., 2001; Coort i sar., 2004). Tretman insulinom je vratio sadržaj CD36 u citoplazmatskoj frakciji na nivo kontrole (**Slika 31A**), pri čemu je njegov sadržaj u frakciji PM i dalje značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 31B**).

Disfunkcija transporta CD36 doprinosi poremećaju iskorišćenja masnih kiselina u srcu i dovodi do progresije bolesti. Pokazano je da je protein AS160 glavni regulator transporta vezikula, i njegova aktivnost je regulisana fosforilacijom. Istraživanja Samovskog i saradnika (Samovski i sar., 2012) su potvrdila da AS160 posreduje u insulinom ili AMPK-stimulisanoj translokaciji CD36 na površinu kardiomiocita i na taj način pokazali da AS160 direktno učestvuje u regulaciji transporta CD36.

Zanimljivo je da i kaveole sadrže CD36, što ukazuje da je CD36 uključen u kavalama-posredovanom preuzimanju masnih kiselina (Pohl i sar., 2004). Ranija istraživanja sa fotoreaktivnim analozima masnih kiselina su pokazala da je kaveolin-1 potencijalni transporter masnih kiselina (Trigatti i sar., 1999). Kasnija istraživanja su ukazala da kaveolin ima indirektnu ulogu u preuzimanju masnih kiselina (Ring i sar., 2006) tako što obezbeđuje mesta vezivanja CD36 na plazma membrani. Što se tiče kaveolina-3, koji je predominantna izoforma u srcu i mišićima, pronađeno je da je ovaj protein kolokalizovan sa CD36 na plazma membrani (Keizer i sar., 2004; Vistisen i sar., 2004). U mišićnom tkivu pokazano je da kaveolin-3 pomaže CD36 u preuzimanju masnih kiselina ali istraživanja na srcu kaveolin-3 „knockout“ miševa su pokazala da nema promena u preuzimanju masnih kiselina i njihovom metabolizmu (Augustus i sar., 2008). Stoga je uloga kaveolina u transportu masnih kiselina kontraverzna.

Bolje razumevanje razlika u regulaciji translokacije glukoznih transportera i transportera za masne kiseline u dijabetesu je od velikog značaja, jer može pomoći da se utvrde terapijske strategije koje će omogućiti selektivnu manipulaciju stimulacije egzocitoze supstratnih transportera u plazma membranu i/ili internalizaciju i stoga povratiti ravnotežu kardijačnih supstrata (**Slika 33**). Očekuje se da normalizacija korišćenja kardijačnih supstrata omogući poboljšanje funkcionisanja srca. Atraktivni terapijski cilj predstavlja endozomni prostor u kome se skladište i CD36 i GLUT. Ovi endozomi predstavljaju veoma organizovanu subćelijsku strukturu u kojoj je

mnoštvo procesa uključeno u sortiranje proteina ili drugih makromolekula, koji se sa različitim destinacija sprovode uz izuzetan stepen specifičnosti.



**Slika 33. Shematski prikaz transporta energetskih supstrata u srcu u stanju dijabetesa i nakon supstitucije insulinom.**

FFA: slobodne masne kiseline; Ins: insulin; IR: receptor za insulin; PM: plazma membrana; CD36: translokaza masnih kiselina; GLUT4: transporter za glukozu tipa 4; GLUT1: transporter za glukozu tipa 1; Akt: protein kinaza B; ERK: kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima. Crvene strelice: promene nastale nakon streptozotocinom izazvanog dijabetesa; zelene strelice: promene nakon supstitucije insulinom; ⊘: izostanak promene; ⊕: supstitucija insulinom vratila na nivo kontrole.



## 6. ZAKLJUČCI

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

### 1. U akutnoj fazi streptozotocinom izazvanog dijabetesa u srcu pacova došlo je do:

- smanjenja koncentracije L-arginina i povećanja aktivnosti enzima arginaze;
- smanjenja fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup>;
- povećanja kako ekspresije gena tako i nivoa proteina iNOS;
- smanjenja ekspresije gena za Akt i fosforilacije na Ser<sup>473</sup>;
- smanjenja fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, bez uticaja na nivo proteina;
- smanjenja kako ekspresije gena, tako i nivoa proteina GLUT4 i GLUT1;
- smanjenja nivoa proteina GLUT4 i GLUT1 u frakciji plazma membrana, bez promene u citoplazmatskoj frakciji;
- povećanja ekspresije gena za CD36, bez promene na nivou proteina;
- smanjenja nivoa proteina CD36 u citoplazmatskoj frakciji i povećanja u frakciji plazma membrana.

## 2. Supstitucija insulinom u srcu pacova sa dijabetesom je:

- povećala koncentraciju L-arginina i smanjila aktivnost enzima arginaze, ali ne do vrednosti dobijenih kod kontrolnih životinja;
- vratila nivo fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> na nivo kontrole;
- vratila nivo proteina iNOS na nivo vrednosti dobijenih kod životinja iz kontrolne grupe, pri čemu je ekspresija gena za iNOS i dalje bila povećana u odnosu na iste;
- vratila ekspresiju gena za Akt i fosforilaciju na Ser<sup>473</sup> na nivo kontrole;
- bez uticaja na fosforilaciju ERK1/2;
- vratila nivo proteina GLUT4 na nivo kontrole, bez uticaja na smanjenu ekspresiju gena za GLUT4;
- povećala nivo proteina GLUT4 u citoplazmatskoj frakciji, bez uticaja na smanjen nivo u frakciji plazma membrana;
- vratila nivo proteina i ekspresiju gena za GLUT1 na nivo kontrole, bez uticaja na smanjen nivo u frakciji plazma membrana;
- vratila nivo iRNK za CD36 na nivo kontrole, kao i nivo proteina u citoplazmatskoj frakciji, bez uticaja na povećan nivo u frakciji plazma membrana.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u stanju akutnog dijabetesa tipa 1 dolazi do promena u signalnom putu insulina na nivou ekspresije i/ili aktivnosti kinaza PKB/Akt i ERK1/2, što se odrazilo i na nishodne efektorne molekule u srcu. Iako supstitucija insulinom ispravlja većinu promena u aktivaciji i/ili ekspresiji ispitivanih molekula u srcu nastalih nakon izazivanja dijabetesa (Akt, NOS, GLUT4, GLUT1 i CD36), uočene promene u nivou transportnih proteina za glukozu i masne kiseline u plazma membrani nisu u potpunosti ispravljene.

S obzirom da je insulinska terapija primarna terapijska strategija u lečenju dijabetesa tipa 1, naši rezultati ukazuju da insulin sam po sebi nije dovoljan da ispravi sve metaboličke promene koje su nastale u srcu. Stoga membranski proteini koji učestvuju u transportu glukoze i masnih kiselina mogu predstavljati potencijalna mesta za primenu dodatnih terapeutika u lečenju dijabetesa tipa 1 i uspostavljanje metaboličke homeostaze u srcu

## 7. LITERATURA

- Abel ED (2004) Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep* 6, 416-423.
- Ahmed Z, Smith BJ, Kotani K, Wilden P, Pillay TS (1999) APS, an adapter protein with a PH and SH2 domain, is a substrate for the insulin receptor kinase. *Biochem J* 341 ( Pt 3), 665-668.
- Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T et al. (2000) Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102, 2873-2879.
- Al-Khalili L, Kotova O, Tsuchida H, Ehren I, Feraille E et al. (2004) ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 279, 25211-25218.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol* 7, 261-269.
- American Diabetes Association (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1, S64-71.

- An D, Rodrigues B (2006) Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1489-1506.
- Angulo J, Rodriguez-Manas L, Peiro C, Neira M, Marin J et al. (1998) Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358, 529-537.
- Arya A, Yadav HN, Sharma PL (2011) Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Mol Cell Biochem* 354, 57-66.
- Augustus AS, Buchanan J, Addya S, Rengo G, Pestell RG et al. (2008) Substrate uptake and metabolism are preserved in hypertrophic caveolin-3 knockout hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H657-666.
- Avruch J (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182, 31-48.
- Awan MM, Saggerson ED (1993) Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295 ( Pt 1), 61-66.
- Balamurugan AN, Gu Y, Miyamoto M, Wang W, Inoue K et al. (2003) Isolation, culture, and functional characteristics of diabetic islets [corrected]. *Pancreas* 26, 102-103.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L et al. (1995) Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270, 14582-14586.
- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM (2006) Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 55, 2277-2285.

- Banting F, Best C (1922) The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 7, 256-271.
- Bardell AL, MacLeod KM (2001) Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 252-259.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP et al. (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337-339.
- Basu R, Oudit GY, Wang X, Zhang L, Ussher JR et al. (2009) Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H2096-2108.
- Becker C, Sevilla L, Tomas E, Palacin M, Zorzano A et al. (2001) The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology* 142, 5267-5276.
- Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasemann H (2008) Developmental changes in arginase expression and activity in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L498-504.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME et al. (2002) Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109, 629-639.
- Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL (2000) Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1104-1113.
- Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A et al. (2003) Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 108, 2000-2006.

- Bernier SG, Haldar S, Michel T (2000) Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 275, 30707-30715.
- Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL (2008) Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 79, 238-248.
- Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I et al. (2004) Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 117, 5985-5993.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18, 1633-1641.
- Bilim O, Takeishi Y, Kitahara T, Arimoto T, Niizeki T et al. (2008) Diacylglycerol kinase zeta inhibits myocardial atrophy and restores cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 7, 2.
- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC (2001) Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 923-927.
- Boivin A, Deshaies Y (2000) Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity in the obese Zucker rat. *Metabolism* 49, 134-140.
- Bonen A, Benton CR, Campbell SE, Chabowski A, Clarke DC et al. (2003) Plasmalemmal fatty acid transport is regulated in heart and skeletal muscle by contraction, insulin and leptin, and in obesity and diabetes. *Acta Physiol Scand* 178, 347-356.
- Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, Glatz JF (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22, 15-29.

- Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A, Abumrad NA (1999) Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol* 276, E642-649.
- Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN (2000) Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 275, 14501-14508.
- Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN et al. (2004) Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J* 18, 1144-1146.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF (1997) Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34, 3-24.
- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW et al. (2005) Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146, 5341-5349.
- Buchwalow IB, Schulze W, Karczewski P, Kostic MM, Wallukat G et al. (2001) Inducible nitric oxide synthase in the myocardium. *Mol Cell Biochem* 217, 73-82.
- Bugger H, Abel ED (2009) Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2, 454-466.
- Burgering BM, Bos JL (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci* 20, 18-22.
- Cai L, Kang YJ (2001) Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 1, 181-193.



- Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ et al. (1998) Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 273, 7201-7204.
- Camici GG, Schiavoni M, Francia P, Bachschmid M, Martin-Padura I et al. (2007) Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5217-5222.
- Camps M, Castello A, Munoz P, Monfar M, Testar X et al. (1992) Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J* 282 ( Pt 3), 765-772.
- Cao J, Vecoli C, Neglia D, Tavazzi B, Lazzarino G et al. (2012) Cobalt-Protoporphyrin Improves Heart Function by Blunting Oxidative Stress and Restoring NO Synthase Equilibrium in an Animal Model of Experimental Diabetes. *Front Physiol* 3, 160.
- Carvalho JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz W, Jr., Guimaraes RB 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.
- Carvalho E, Rondinone C, Smith U (2000) Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats--evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4. *Mol Cell Biochem* 206, 7-16.
- Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R et al. (2002) Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51, 1076-1082.
- Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF et al. (2004) Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E781-789.

- Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF et al. (2005) The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Lett* 579, 2428-2432.
- Chandra S, Romero M, Shatanawi A, Alkilany A, Caldwell R et al. (2012) Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 165, 506-519.
- Chang L, Chiang SH, Saltiel AR (2004) Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10, 65-71.
- Chang SH, Liu CJ, Kuo CH, Chen H, Lin WY et al. (2011) Garlic Oil Alleviates MAPKs- and IL-6-mediated Diabetes-related Cardiac Hypertrophy in STZ-induced DM Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 950150.
- Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M et al. (2002) Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277, 23554-23562.
- Chen S, Murphy J, Toth R, Campbell DG, Morrice NA et al. (2008) Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem J* 409, 449-459.
- Cheng X, Cheng XS, Kuo KH, Pang CC (2004) Inhibition of iNOS augments cardiovascular action of noradrenaline in streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Res* 64, 298-307.
- Cheng X, Pang CC (2004) Increased vasoconstriction to noradrenaline by 1400W, inhibitor of iNOS, in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 484, 263-268.
- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT et al. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410, 944-948.
- Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R et al. (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 107, 813-822.

- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH et al. (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 8, 1069-1077.
- Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP (2003) Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1151-1160.
- Cohen P (2006) The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 867-873.
- Combettes-Souverain M, Issad T (1998) Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* 24, 477-489.
- 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, Hasselbaink DM, Koonen DP, Willems J, Coumans WA et al. (2004) Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes* 53, 1655-1663.
- Corbett JA, Wang JL, Misko TP, Zhao W, Hickey WF et al. (1993) Nitric oxide mediates IL-1 beta-induced islet dysfunction and destruction: prevention by dexamethasone. *Autoimmunity* 15, 145-153.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174, 231-235.
- Cox JD, Kim NN, Traish AM, Christianson DW (1999) Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol* 6, 1043-1047.
- Crespo M, Zalacaín J, Dunbar D, Cruz N, Arocho L (2008) Cardiac oxidative stress is elevated at the onset of dilated cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 13, 64-71.
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258, 478-480.

- Cuschieri J, Maier RV (2005) Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med* 33, S417-419.
- Cushman SW, Wardzala LJ (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255, 4758-4762.
- Darmellah A, Baetz D, Prunier F, Tamareille S, Rucker-Martin C et al. (2007) Enhanced activity of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger contributes to left ventricular hypertrophy in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes: critical role of Akt. *Diabetologia* 50, 1335-1344.
- Davey KA, Garlick PB, Warley A, Southworth R (2007) Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2009-2019.
- Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.
- De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichy RB et al. (2002) Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 35, 1091-1100.
- de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL et al. (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1054-1059.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130, 963-974.
- DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ (2006) Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem* 281, 32841-32851.
- Delbin MA, Davel AP, Couto GK, de Araujo GG, Rossoni LV et al. (2012) Interaction between advanced glycation end products formation and

- vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS One* 7, e53318.
- Depre C, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q et al. (2000) Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 32, 985-996.
- Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK et al. (2004) Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Res* 61, 288-296.
- Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE (1985) Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 1, 263-281.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Ding HL, Ryder JW, Stull JT, Kamm KE (2009) Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J Biol Chem* 284, 15541-15548.
- Dizikes GJ, Grody WW, Kern RM, Cederbaum SD (1986) Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. *Biochem Biophys Res Commun* 141, 53-59.
- Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z et al. (2003) Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112, 1049-1057.
- Duckworth WC (1988) Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev* 9, 319-345.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19, 608-624.

- Ducluzeau PH, Fletcher LM, Welsh GI, Tavaré JM (2002) Functional consequence of targeting protein kinase B/Akt to GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 115, 2857-2866.
- Dummler B, Hemmings BA (2007) Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans* 35, 231-235.
- Duncombe WG (1964) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta* 9, 122-125.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA (2007) Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 906-911.
- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI (2000) Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* 14, 1775-1783.
- Egert S, Nguyen N, Schwaiger M (1999) Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1337-1344.
- Eguez L, Lee A, Chavez JA, Miinea CP, Kane S et al. (2005) Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* 2, 263-272.
- Ekladous D, Mehdi MZ, Costa M, Srivastava AK, Chiasson JL et al. (2008) Tissue- and fibre-specific modifications of insulin-signalling molecules in cardiac and skeletal muscle of diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 971-978.
- El-Omar MM, Lord R, Draper NJ, Shah AM (2003) Role of nitric oxide in posthypoxic contractile dysfunction of diabetic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 5, 229-239.
- Fairweather D, Rose NR (2002) Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nat Immunol* 3, 338-340.
- Fang ZY, Prins JB, Marwick TH (2004) Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 25, 543-567.

- Farese RV (2002) Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1-11.
- Farese RV, Sajan MP (2010) Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good" and "bad" as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E385-394.
- Farhangkhoe H, Khan ZA, Chen S, Chakrabarti S (2006a) Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. *Nutr Metab (Lond)* 3, 27.
- Farhangkhoe H, Khan ZA, Kaur H, Xin X, Chen S et al. (2006b) Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: pathogenesis and potential treatment targets. *Pharmacol Ther* 111, 384-399.
- Farhangkhoe H, Khan ZA, Mukherjee S, Cukiernik M, Barbin YP et al. (2003) Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1439-1448.
- Fecchi K, Volonte D, Hezel MP, Schmeck K, Galbiati F (2006) Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB J* 20, 705-707.
- Felaco M, Grilli A, De Lutiis MA, Patrino A, Libertini N et al. (2001) Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and localization in healthy and diabetic rat hearts. *Ann Clin Lab Sci* 31, 179-186.
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R (2000) Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 87, 241-247.
- Ferdinandy P, Schulz R (2003) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138, 532-543.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA et al. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with

- caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 22810-22814.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T (1998) The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 273, 3125-3128.
- Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ et al. (2002) The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109, 121-130.
- Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C 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.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P et al. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.
- Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D (1991) Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 68, 85-89.
- Ghosh S, An D, Pulinilkunnil T, Qi D, Lau HC et al. (2004) Role of dietary fatty acids and acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. *Nutrition* 20, 916-923.
- Ginion A, Auquier J, Benton CR, Mouton C, Vanoverschelde JL et al. (2011) Inhibition of the mTOR/p70S6K pathway is not involved in the insulin-sensitizing effect of AMPK on cardiac glucose uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H469-477.
- Glatz JF, Bonen A, Luiken JJ (2002) Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 365-370.



- 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.
- Glatz JF, Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ (1997) Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57, 3-9.
- Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ et al. (2000) Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275, 22268-22272.
- Gross ER, Hsu AK, Gross GJ (2007) Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* 56, 127-136.
- Guo Z, Xia Z, Yuen VG, McNeill JH (2007) Cardiac expression of adiponectin and its receptors in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 56, 1363-1371.
- Hagenfeldt L, Dahlquist G, Persson B (1989) Plasma amino acids in relation to metabolic control in insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr Scand* 78, 278-282.
- Hajdуч E, Darakhshan F, Hundal HS (1998) Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 41, 821-828.
- Hallemeesch MM, Lamers WH, Deutz NE (2002) Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin Nutr* 21, 273-279.

- Han X, Yang J, Yang K, Zhao Z, Abendschein DR et al. (2007) Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study. *Biochemistry* 46, 6417-6428.
- Haughton CL, Dillehay DL, Phillips LS (1999) Insulin replacement therapy for the rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Lab Anim Sci* 49, 639-644.
- Hazzalin CA, Cuenda A, Cano E, Cohen P, Mahadevan LC (1997) Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli. *Oncogene* 15, 2321-2331.
- Heller-Harrison RA, Morin M, Guilherme A, Czech MP (1996) Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem* 271, 10200-10204.
- Helmersson J, Vessby B, Larsson A, Basu S (2004) Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 109, 1729-1734.
- Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, van de Sand A et al. (2010) Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H446-453.
- Hevel JM, Marletta MA (1994) Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* 233, 250-258.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E et al. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88, E14-22.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hirsch E, Costa C, Ciruolo E (2007) Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol* 194, 243-256.
- Hisamoto K, Ohmichi M, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y et al. (2001) Induction of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by the raloxifene

- analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 47642-47649.
- Hofmann F (2005) The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 280, 1-4.
- Horowitz S, Binion DG, Nelson VM, Kanaa Y, Javadi P et al. (2007) Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1323-1336.
- Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P et al. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 335-342.
- Hresko RC, Mueckler M (2005) mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280, 40406-40416.
- Huang JP, Huang SS, Deng JY, Hung LM (2009) Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic rats. *J Biomed Sci* 16, 77.
- Huisamen B (2003) Protein kinase B in the diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 249, 31-38.
- Huisamen B, Dietrich D, Bezuidenhout N, Lopes J, Flepisi B et al. (2012) Early cardiovascular changes occurring in diet-induced, obese insulin-resistant rats. *Mol Cell Biochem* 368, 37-45.
- Huisamen B, van Zyl M, Keyser A, Lochner A (2001) The effects of insulin and beta-adrenergic stimulation on glucose transport, glut 4 and PKB activation in the myocardium of lean and obese non-insulin dependent diabetes mellitus rats. *Mol Cell Biochem* 223, 15-25.
- Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P et al. (1996) Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2646-2651.
- Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W et al. (1992) Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and

- diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11059-11063.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M et al. (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14, S227-232.
- Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P et al. (1996) Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272, 728-731.
- Ishii N, Ikenaga H, Carmines P, Aoki Y, Ogawa Z et al. (2004) High glucose augments arginase activity and nitric oxide production in the renal cortex. *Metabolism* 53, 868-874.
- Isola LM, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Bradbury MW et al. (1995) 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9866-9870.
- Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G (2002) Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD (1996) Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114, 107-132.
- Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D (1996) Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. Response according to treatment duration, anatomic site, and sex. *Circulation* 94, 498-506.
- Jesmin S, Zaedi S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K et al. (2006) Effects of a selective endothelin a receptor antagonist on the expressions of iNOS and eNOS in the heart of early streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 925-931.

- Jin L, Ying Z, Hilgers RH, Yin J, Zhao X et al. (2006) Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 288-295.
- Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ et al. (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E974-976.
- Jung AS, Kubo H, Wilson R, Houser SR, Margulies KB (2006) Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1756-1762.
- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE et al. (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126, 201-205.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48, 2129-2139.
- Kaesemeyer WH, Ogonowski AA, Jin L, Caldwell RB, Caldwell RW (2000) Endothelial nitric oxide synthase is a site of superoxide synthesis in endothelial cells treated with glyceryl trinitrate. *Br J Pharmacol* 131, 1019-1023.
- Kagaya Y, Kanno Y, Takeyama D, Ishide N, Maruyama Y et al. (1990) Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats. A quantitative autoradiographic study. *Circulation* 81, 1353-1361.
- Kahn CR, White MF (1988) The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 82, 1151-1156.
- Kamm KE, Stull JT (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25, 593-620.
- Kampf JP, Kleinfeld AM (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid

- transport across the adipocyte plasma membrane. *Physiology (Bethesda)* 22, 7-14.
- Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS et al. (2002) A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem* 277, 22115-22118.
- Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA (2008) Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 31, 134-139.
- Keizer HA, Schaart G, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ (2004) Subcellular immunolocalisation of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in human type-1 and type-2 skeletal muscle fibres. *Histochem Cell Biol* 121, 101-107.
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79, 363-380.
- Kessler A, Tomas E, Immler D, Meyer HE, Zorzano A et al. (2000) Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia* 43, 1518-1527.
- 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.
- Kim HS, Cho JE, Hwang KC, Shim YH, Lee JH et al. (2010) Diabetes mellitus mitigates cardioprotective effects of remifentanyl preconditioning in ischemia-reperfused rat heart in association with anti-apoptotic pathways of survival. *Eur J Pharmacol* 628, 132-139.
- Kocyigit A, Zeyrek D, Keles H, Koylu A (2004) Relationship among manganese, arginase, and nitric oxide in childhood asthma. *Biol Trace Elem Res* 102, 11-18.
- 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.

- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271, 31372-31378.
- 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, Tepavcevic S, Zakula Z, Milosavljevic T, Stojiljkovic M et al. (2011) Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase. *Eur J Pharmacol* 655, 23-30.
- Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Luscher TF et al. (2004) Selective inhibition of protein kinase Cbeta2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 110, 91-96.
- Kowalczyk D, Pietras R, Baran J (2007) Spectrophotometric analysis of cefepime and L-arginine in the pharmaceutical preparation. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska* 20, 11.
- Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ et al. (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.
- Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB et al. (2006a) Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes* 55, 2067-2076.
- Kramer HF, Witczak CA, Taylor EB, Fujii N, Hirshman MF et al. (2006b) AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 281, 31478-31485.

- Kuo WW, Chung LC, Liu CT, Wu SP, Kuo CH et al. (2009) Effects of insulin replacement on cardiac apoptotic and survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 27, 479-487.
- Kupriyanova TA, Kandrор KV (1999) Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem* 274, 1458-1464.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278, 22546-22554.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landau D, Chayat C, Zucker N, Golomb E, Yagil C et al. (2008) Early blood pressure-independent cardiac changes in diabetic rats. *J Endocrinol* 197, 75-83.
- LaPointe MC, Isenovic E (1999) Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33, 276-282.
- 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.
- Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S et al. (2001) Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* 50, 2709-2720.
- Le Roith D, Zick Y (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24, 588-597.
- Lee J, Pilch PF, Shoelson SE, Scarlata SF (1997) Conformational changes of the insulin receptor upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36, 2701-2708.



- Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR (2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4843-4848.
- Lei S, Li H, Xu J, Liu Y, Gao X et al. (2013) Hyperglycemia-induced protein kinase C beta2 activation induces diastolic cardiac dysfunction in diabetic rats by impairing caveolin-3 expression and Akt/eNOS signaling. *Diabetes* 62, 2318-2328.
- Leth H, Andersen KK, Frystyk J, Tarnow L, Rossing P et al. (2008) Elevated levels of high-molecular-weight adiponectin in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3186-3191.
- Levine R, Goldstein M, et al. (1949) The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. *J Biol Chem* 179, 985.
- Li H, Forstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190, 244-254.
- Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Haynes TE, Kepka-Lenhart D et al. (2001) Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E75-82.
- Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR, 3rd, Cushman SW et al. (2004a) Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E834-841.
- Li Z, Yarmush ML, Chan C (2004b) Insulin concentration during preconditioning mediates the regulation of urea synthesis during exposure to amino acid-supplemented plasma. *Tissue Eng* 10, 1737-1746.
- Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE et al. (2005) Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 111, 3489-3493.

- Liu H, Kublaoui B, Pilch PF, Lee J (2000) Insulin activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase and Akt is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 845-851.
- Liu X, Wang J, Takeda N, Binaglia L, Panagia V et al. (1999) Changes in cardiac protein kinase C activities and isozymes in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol* 277, E798-804.
- Lopaschuk GD (1996) Abnormal mechanical function in diabetes: relationship to altered myocardial carbohydrate/lipid metabolism. *Coron Artery Dis* 7, 116-123.
- Lopaschuk GD (2002) Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 7, 149-159.
- Luiken JJ, Arumugam Y, Bell RC, Calles-Escandon J, Tandon NN et al. (2002a) Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E612-621.
- Luiken JJ, Arumugam Y, Dyck DJ, Bell RC, Pelsers MM et al. (2001) 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 et al. (2004a) 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 et al. (2004b) Dipyridamole alters cardiac substrate preference by inducing translocation of FAT/CD36, but not that of GLUT4. *Mol Pharmacol* 65, 639-645.
- Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A et al. (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, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y et al. (2002b) Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E491-495.
- Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C et al. (2002c) 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 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, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, Glatz JF (1997) Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res* 38, 745-758.
- Luscher TF, Steffel J (2008) Sweet and sour: unraveling diabetic vascular disease. *Circ Res* 102, 9-11.
- Marwick TH (2006) Diabetic heart disease. *Heart* 92, 296-300.
- Massion P, Balligand J (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, Balligand JL (2007) Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling. *Curr Heart Fail Rep* 4, 18-25.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93, 388-398.
- 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, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L et al. (2001) Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104, 330-335.

- McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 6123-6128.
- Meijs MF, Bots ML, Voncken EJ, Cramer MJ, Melman PG et al. (2007) Rationale and design of the SMART Heart study: A prediction model for left ventricular hypertrophy in hypertension. *Neth Heart J* 15, 295-298.
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J (2003) Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 24, 450-455.
- Meyer C, Schwaiger M (1997) Myocardial blood flow and glucose metabolism in diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 80, 94A-101A.
- 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.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P et al. (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402, 309-313.
- Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, Kwak BR, Mach F et al. (2004) Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 110, 3708-3714.
- Miyamoto S, Rubio M, Sussman MA (2009) Nuclear and mitochondrial signalling Akt in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 82, 272-285.
- Mizuno Y, Isotani E, Huang J, Ding H, Stull JT et al. (2008) Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C358-364.

- Mohan P, Sys SU, Brutsaert DL (1995) Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. *Int J Cardiol* 50, 233-237.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
- 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.
- Montanari D, Yin H, Dobrzynski E, Agata J, Yoshida H et al. (2005) Kallikrein gene delivery improves serum glucose and lipid profiles and cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 54, 1573-1580.
- Montessuit C, Lerch R (2013) Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta* 1833, 848-856.
- Mora A, Sakamoto K, McManus EJ, Alessi DR (2005) Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett* 579, 3632-3638.
- Morbidelli L, Donnini S, Ziche M (2003) Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9, 521-530.
- Mori M, Gotoh T (2000) Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 715-719.
- 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.
- Morris SM, Jr. (1992) Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 12, 81-101.
- Morris SM, Jr., Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D (1997) Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 193, 157-161.

- Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219, 713-725.
- Mulder H, Ahren B, Sundler F (1996) Islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin are differentially expressed in chronic diabetes induced by streptozotocin in rats. *Diabetologia* 39, 649-657.
- 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.
- Nagareddy PR, McNeill JH, MacLeod KM (2009) Chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cardiovascular abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 611, 53-59.
- Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM (2005) Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2144-2152.
- Naito Z, Takashi E, Xu G, Ishiwata T, Teduka K et al. (2003) Different influences of hyperglycemic duration on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in rat heart. *Exp Mol Pathol* 74, 23-32.
- Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K et al. (2006) Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 55, 691-698.
- Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100, 2417-2423.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T et al. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.

- Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK, Ren J (2002) IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E658-666.
- Nussey S, Whitehead S (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach*, Vol., Oxford.
- Olson AL, Knight JB (2003) Regulation of GLUT4 expression in vivo and in vitro. *Front Biosci* 8, s401-409.
- Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC (2000) Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 39, 12103-12112.
- Oudit G, Penninger J (2009) Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc Res* 82, 250-260.
- Oudit GY, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, Liu PP et al. (2008) Loss of PTEN attenuates the development of pathological hypertrophy and heart failure in response to biomechanical stress. *Cardiovasc Res* 78, 505-514.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424.
- Patel HH, Murray F, Insel PA (2008) Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 359-391.
- Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marban E et al. (2001) Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 3, 867-873.
- Pieper GM, Dondlinger LA (1997) Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 684-691.
- Pieper GM, Peltier BA (1995) Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 25, 397-403.

- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E (2004) Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47, 170-184.
- Pohl J, Ring A, Ehehalt R, Schulze-Bergkamen H, Schad A et al. (2004) Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry* 43, 4179-4187.
- Price J, Verma S, Li RK (2003) Diabetic heart dysfunction: is cell transplantation a potential therapy? *Heart Fail Rev* 8, 213-219.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.
- Rao KM (2000) Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3, 27-58.
- Ren J, Sowers JR, Walsh MF, Brown RA (2000) Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H1708-1714.
- Rerup CC (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22, 485-518.
- Resjo S, Goransson O, Harndahl L, Zolnierowicz S, Manganiello V et al. (2002) Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. *Cell Signal* 14, 231-238.
- Retnakaran R, Zinman B (2008) Type 1 diabetes, hyperglycaemia, and the heart. *Lancet* 371, 1790-1799.
- Rett K, Wicklmayr M, Dietze G, Häring H (1996) Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin. *Diabetes* 45 Suppl 1, S66-S69.
- Ribon V, Saltiel A (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 324, 839-845.
- Ring A, Le Lay S, Pohl J, Verkade P, Stremmel W (2006) Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the



- plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1761, 416-423.
- Roach WG, Chavez JA, Miinea CP, Lienhard GE (2007) Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem J* 403, 353-358.
- Rodrigues B, Cam MC, Jian K, Lim F, Sambandam N et al. (1997) Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on cardiac lipoprotein lipase activity. *Diabetes* 46, 1346-1353.
- Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH (1998) Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180, 53-57.
- Romero MJ, Platt DH, Caldwell RB, Caldwell RW (2006) Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* 24, 275-290.
- Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB et al. (2008) Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 102, 95-102.
- Ryder JW, Chibalin AV, Zierath JR (2001) Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 171, 249-257.
- Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A et al. (2008) Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res* 102, 923-932.
- Saltiel AR (1994) The paradoxical regulation of protein phosphorylation in insulin action. *FASEB J* 8, 1034-1040.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Samovski D, Su X, Xu Y, Abumrad NA, Stahl PD (2012) Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase. *J Lipid Res* 53, 709-717.

- Sampson M, Davies I, Gavrilovic J, Sussams B, Brown J et al. (2004) Plasma matrix metalloproteinases, low density lipoprotein oxidisability and soluble adhesion molecules after a glucose load in Type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 3, 7.
- Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM et al. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278, 14599-14602.
- Santalucia T, Camps M, Castello A, Munoz P, Nuel A et al. (1992) Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130, 837-846.
- Santilli F, Cipollone F, Mezzetti A, Chiarelli F (2004) The role of nitric oxide in the development of diabetic angiopathy. *Horm Metab Res* 36, 319-335.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Schaan BD, Maeda CY, Timm HB, Medeiros S, Moraes RS et al. (1997) Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res* 30, 1081-1086.
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118, 2992-3002.
- Schubert KM, Scheid MP, Duronio V (2000) Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* 275, 13330-13335.
- Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML et al. (2006) L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 295, 58-64.

- Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL (2005) Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 108, 225-256.
- Seddon M, Shah AM, Casadei B (2007) Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 75, 315-326.
- Seemayer TA, Oligny LL, Tannenbaum GS, Goldman H, Colle E (1980) Animal model of human disease. Diabetes mellitus. *Am J Pathol* 101, 485-488.
- Seeger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9, 726-735.
- Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N et al. (2003) Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 92, 411-418.
- Sesti G (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 665-679.
- Severson DL (2004) Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 82, 813-823.
- Shah AM, MacCarthy PA (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 86, 49-86.
- Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J et al. (2004) Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 18, 1692-1700.
- Sharma S, Singh M, Sharma PL (2011) Beneficial effect of insulin in hyperhomocysteinemia and diabetes mellitus-induced vascular endothelium dysfunction: role of phosphoinositide dependent kinase and protein kinase B. *Mol Cell Biochem* 348, 21-32.
- Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsusaka H, Hayashidani S et al. (2003) Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 42, 165-172.
- Shipp JC, Murthy VK (1980) The heart and diabetes. Vascular and metabolic aspects. *Adv Myocardiol* 2, 81-84.

- Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 171-176.
- Singh S, Evans TW (1997) Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 10, 699-707.
- Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE (1991) Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7815-7819.
- Smith JA, Shah AM, Lewis MJ (1991) Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol* 439, 1-14.
- Smith JM, Paulson DJ, Romano FD (1997) Inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME improves ventricular performance in streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2393-2402.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Soltys CL, Buchholz L, Gandhi M, Clanachan AS, Walsh K et al. (2002) Phosphorylation of cardiac protein kinase B is regulated by palmitate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1056-1064.
- Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83, 1325-1358.
- Soudamani S, Malini T, Balasubramanian K (2005) Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocr Res* 31, 81-98.
- Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, Tandon NN, Luiken JJ et al. (2002) Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 277, 8854-8860.
- Steppan J, Ryoo S, Schuleri KH, Gregg C, Hasan RK et al. (2006) Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4759-4764.

- Stockklauser-Farber K, Ballhausen T, Laufer A, Rosen P (2000) Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. *Biochim Biophys Acta* 1535, 10-20.
- Stojiljkovic M, Zakula Z, Koricanac G, Milosavljevic T, Tepavcevic S et al. (2012) Regulation of Cardiac Nitric Oxide Synthase in Acute Type I Diabetes: Modulation of L-Arginine Availability and Arginase Activity. *Adv Sci Lett* 5, 566-574.
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB et al. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.
- Strijdom H, Friedrich SO, Hattingh S, Chamane N, Lochner A (2009) Hypoxia-induced regulation of nitric oxide synthase in cardiac endothelial cells and myocytes and the role of the PI3-K/PKB pathway. *Mol Cell Biochem* 321, 23-35.
- Sussman MA, Volkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT et al. (2011) Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev* 91, 1023-1070.
- Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation* 105, 1727-1733.
- Tahiliani AG, McNeill JH (1986) Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life Sci* 38, 959-974.
- Takahashi S, Mendelsohn ME (2003) Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278, 30821-30827.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER et al. (2005) Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest* 115, 1221-1231.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 85-96.

- Tannous M, Rabini RA, Vignini A, Moretti N, Fumelli P et al. (1999) Evidence for iNOS-dependent peroxynitrite production in diabetic platelets. *Diabetologia* 42, 539-544.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *New England Journal of Medicine* 329, 977-986.
- Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z et al. (2006) Upregulation of arginase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2035-2042.
- 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.
- Thong FS, Bilan PJ, Klip A (2007) The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 56, 414-423.
- Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS (1997) Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology* 138, 62-68.
- Tomlinson DR (1999) Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 42, 1271-1281.
- Toque HA, Nunes KP, Yao L, Xu Z, Kondrikov D et al. (2013) Akita spontaneously type 1 diabetic mice exhibit elevated vascular arginase and impaired vascular endothelial and nitrenergic function. *PLoS One* 8, e72277.
- Toque HA, Tostes RC, Yao L, Xu Z, Webb RC et al. (2011) Arginase II deletion increases corpora cavernosa relaxation in diabetic mice. *J Sex Med* 8, 722-733.
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2001) Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes* 50, 1901-1910.

- Trigatti BL, Anderson RG, Gerber GE (1999) Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 34-39.
- Umar S, van der Laarse A (2010) Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* 333, 191-201.
- Unger RH (2002) Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53, 319-336.
- Unger RH, Orci L (2001) Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15, 312-321.
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (1995) *BMJ* 310, 83-88.
- Uphues I, Kolter T, Goud B, Eckel J (1994) Insulin-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle: studies on the role of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem J* 301 ( Pt 1), 177-182.
- van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF (2000) Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res* 45, 279-293.
- Van Nieuwenhoven FA, Willemsen PH, Van der Vusse GJ, Glatz JF (1999) Co-expression in rat heart and skeletal muscle of four genes coding for proteins implicated in long-chain fatty acid uptake. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 489-498.
- Vassort G, Turan B (2010) Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 10, 73-86.
- Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84, 1020-1031.
- Vistisen B, Roepstorff K, Roepstorff C, Bonen A, van Deurs B et al. (2004) Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. *J Lipid Res* 45, 603-609.

- Vockley JG, Jenkinson CP, Shukla H, Kern RM, Grody WW et al. (1996) Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* 38, 118-123.
- Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK et al. (1997) Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9320-9325.
- 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 PH, Almahfouz A, Giorgino F, McCowen KC, Smith RJ (1999) In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-Fos. *Endocrinology* 140, 1141-1150.
- Wang Z, Brecher P (1999) Salicylate inhibition of extracellular signal-regulated kinases and inducible nitric oxide synthase. *Hypertension* 34, 1259-1264.
- Watson RT, Pessin JE (2001) Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res* 271, 75-83.
- Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D et al. (2002) Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes* 51, 2709-2718.
- Wei LH, Wu G, Morris SM, Jr., Ignarro LJ (2001) Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9260-9264.
- Welch RD, Gorski J (1999) Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology* 140, 3602-3608.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Mayer B (1998) Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 219, 171-182.



- Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K (1997) Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 272, 12422-12429.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.
- Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Byks H, Zozulinska D, Wykretowicz A et al. (1995) Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 27, 193-197.
- Wohaieb SA, Godin DV (1987) Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 36, 1014-1018.
- Wood IS, Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.
- Wu G, Morris SM, Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 ( Pt 1), 1-17.
- Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 658-663.
- Xia HJ, Dai DZ, Dai Y (2006a) Up-regulated inflammatory factors endothelin, NFkappaB, TNFalpha and iNOS involved in exaggerated cardiac arrhythmias in l-thyroxine-induced cardiomyopathy are suppressed by darusentan in rats. *Life Sci* 79, 1812-1819.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6770-6774.
- Xia Z, Nagareddy PR, Guo Z, Zhang W, McNeill JH (2006b) Antioxidant N-acetylcysteine restores systemic nitric oxide availability and corrects

- depressions in arterial blood pressure and heart rate in diabetic rats. *Free Radic Res* 40, 175-184.
- Xing W, Yan W, Fu F, Jin Y, Ji L et al. (2009) Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function. *Apoptosis* 14, 1050-1060.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 657-662.
- Xu TJ, Yuan BX, Zou YM, Zang WJ (2010) The effect of insulin in combination with selenium on blood glucose and GLUT4 expression in the cardiac muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol* 24, 199-204.
- Yagyu H, Chen G, Yokoyama M, Hirata K, Augustus A et al. (2003) Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 111, 419-426.
- Yamada E, Okada S, Saito T, Ohshima K, Sato M et al. (2005) Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *J Cell Biol* 168, 921-928.
- Yan ZQ, Yokota T, Zhang W, Hansson GK (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. *Circ Res* 79, 38-44.
- Yang J, Holman GD (2005) Insulin and contraction stimulate exocytosis, but increased AMP-activated protein kinase activity resulting from oxidative metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 280, 4070-4078.
- Yang JY, Yeh HY, Lin K, Wang PH (2009) Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46, 919-926.

- Young ME, McNulty P, Taegtmeier H (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation* 105, 1861-1870.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H et al. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236.
- Zdychova J, Komers R (2005) Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res* 54, 1-16.
- Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M et al. (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.
- Zeng G, Quon MJ (1996) Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98, 894-898.
- 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.
- Zhang QJ, Li QX, Zhang HF, Zhang KR, Guo WY et al. (2007) Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. *Cardiovasc Res* 75, 369-380.
- Zheng J, Bird IM, Melsaether AN, Magness RR (1999) Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endocrinology* 140, 1399-1407.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M et al. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1784-1789.

Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H (2008) Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45, 625-632.

Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J 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.

<http://www.eatlas.idf.org>

<https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2159>

***PRILOZI***

## Biografija autora

**mr Mojca D. Stojiljković**, je rođena 22. marta 1967. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Školske 1986/87. godine, upisala je studije na grupi za Opštu biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 1993. godine, odbranom diplomskog rada pod naslovom: "Efekat bioantimutagena na intrahromozomalnu rekombinaciju kod RecA mutanata E.coli K12". Prosečna ocena tokom studija bila je 8,13, a ocena na diplomskom ispitu 10. Školske 1993/94. godine upisala je poslediplomske studije na smeru Molekularna biologija i biohemija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Poslediplomske studije je završila 1999. godine odbranom magistarske teze pod naslovom: "Uticaj starenja na glukokortikoidni receptor i enzime intermedijernog metabolizma u jetri pacova", na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od 01.03.1994. 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 steroidnih 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 dosadašnjem naučno-istraživačkom radu, mr Mojca Stojiljković je objavila 16 radova u vodećim međunarodnim časopisima, a 7 je štampano u domaćim časopisima sa naučnom recenzijom. 28 saopštenja sa naučnih skupova je štampano u vidu apstrakata, od kojih je 11 sa međunarodnih i 17 sa nacionalnih kongresa i simpozijuma.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ мр Мојца Д. Стојиљковић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Ефекат експерименталног дијабетеса типа 1 и супституционе терапије на молекуле регулисане инсулином у срцу пацова“**

- 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, 24.03.2014. године

Мојца Стојиљковић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Мојца Д. Стојиљковић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада „Ефекат експерименталног дијабетеса типа 1 и супституционе  
терапије на молекуле регулисане инсулином у срцу пацова“

Ментор др Зорица Жакула

Потписани/а мр Мојца Д. Стојиљковић

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, 24.03.2014. године

Мојца Стојиљковић



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**„Ефекат експерименталног дијабетеса типа 1 и супституционе терапије на молекуле регулисане инсулином у срцу пацова“**

која је моје ауторско дело.

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

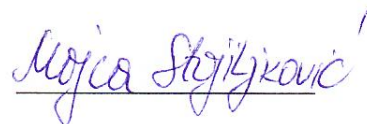
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 24.03.2014. године



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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 умножавања, 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.

# Regulation of Cardiac Nitric Oxide Synthase in Acute Type I Diabetes: Modulation of L-Arginine Availability and Arginase Activity

Mojca Stojiljkovic<sup>1</sup>, Zorica Zakula<sup>1,\*</sup>, Goran Koricanac<sup>1</sup>, Tijana Milosavljevic<sup>1</sup>, Snezana Tepavcevic<sup>1</sup>, Emina Sudar<sup>2</sup>, and Esmā R. Isenovic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology, Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

The aim of our study was to characterize the acute effects of streptozotocin-induced diabetes on the regulation of cardiac endothelial and inducible nitric oxide synthase and related signaling pathways. Over the past decade, it has become increasingly apparent that competition between the nitric oxide synthase and arginase pathways for L-arginine limits nitric oxide production. Imbalance between these pathways may contribute to heart dysfunction especially in diabetes. To evaluate the role of insulin in regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B and extracellular signaling-regulated kinase 1 and 2 signaling pathways, male Wistar rats were injected with streptozotocin (65 mg/kg i.p.). Diabetic animals were either maintained untreated for 2 weeks or treated with insulin (3 IU/animal s.c.) for seven days. The arginase activity in diabetic rat heart was augmented, followed by reduction of L-arginine. Insulin treatment significantly decreased arginase activity in heart but it still remained high compared to control rats. Diabetes and insulin treatment did not change endothelial nitric oxide synthase protein and mRNA expression in the heart. In contrast, phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase was decreased in diabetic rats and insulin restored it to the control level. Insulin treatment caused an increase in inducible nitric oxide synthase mRNA content. Protein and mRNA expression of cardiac protein kinase B were not altered in diabetic and insulin-treated rats, but protein kinase B phosphorylation was lower in diabetes and restored after insulin administration. In addition, insulin deficiency significantly decreases extracellular signaling-regulated kinase 1 and 2 phosphorylation in the heart and insulin treatment partially ameliorates this decline. These data suggest that in the early stage of diabetes arginase is markedly induced in heart and increased arginase activity preceded alterations of inducible nitric oxide synthase expression/activity.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Type I, Heart, L-arginine, Arginase, Nitric Oxide Synthase.

## 1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus is associated with multiple endocrine and metabolic disorders. Type 1 diabetes (T1D) is caused by the autoimmune destruction of pancreatic  $\beta$ -cells, producing insulin deficiency that requires hormone replacement therapy. Although published work on diabetes and the heart relates mainly to type 2 diabetes (T2D), T1D also imparts substantial risk for cardiovascular disease. In T1D, the heart is subject to a variety of pathological insults, including atherosclerosis, intrinsic cardiomyopathy, congestive heart failure and cardiac autonomic neuropathy.<sup>1,2</sup>

It is well established that nitric oxide (NO) is an important regulator of a variety of biological functions. In the heart NO is known to play key roles in physiological and pathological conditions, including diabetes. NO can be generated by NO synthases (NOS), which catalyze conversion of L-Arg to L-citrulline and NO. Three NOS isoforms have been identified: endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) and neuronal NOS (nNOS).<sup>3</sup> All three isoforms of NOS are expressed in the heart, but eNOS and iNOS, which are present in vascular endothelium and cardiac myocytes,<sup>4,5</sup> are principal isoenzymes that produce NO.<sup>6</sup> eNOS is calcium-dependent and constitutively expressed,<sup>7</sup> while iNOS is expressed when stimulated by inflammatory cytokines and can produce up to 1000-fold more NO than eNOS.<sup>8,9</sup> NO in

\*Author to whom correspondence should be addressed.

large quantities however, have adverse effects to the cardiovascular system, particularly when associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anions.<sup>10</sup> Both NO and superoxide anions are highly reactive and can rapidly form peroxynitrite, which is thought to be the major mediator of the cytotoxic effects of NO.<sup>11</sup> Various alterations in NO pathways have been reported in T1D in both humans and animal models.<sup>12</sup> However, the *in vivo* data are inconsistent, and it is not clear whether the defect is in basal or stimulated NO synthesis, NO bioavailability, responsiveness to NO, or perhaps all of these.<sup>13</sup>

A second major pathway of L-Arg metabolism is *via* arginase, a hydrolytic enzyme responsible for converting L-Arg to urea and L-ornithine.<sup>14</sup> Arginase exists in two isoforms, arginase I and arginase II, and it was confirmed that both arginases are expressed in heart.<sup>15,16</sup> The physiological role of arginase and its common occurrence indicate its engagement in many pathologies. Enhanced arginase activity has been implicated during myocardial ischaemia and also in various other cardiovascular pathological conditions such as atherosclerosis and diabetes<sup>17,18</sup> in which NO signaling is disrupted. A growing body of evidence clearly indicates that arginase reciprocally regulates NOS activity. This phenomenon has been demonstrated for both constitutive<sup>19</sup> and inducible<sup>20</sup> NOS isoforms, where arginase competes with NOS for the common substrate L-arginine and thus regulates NO production.<sup>21</sup>

Cardiac muscle is a target tissue for insulin action. Binding of insulin to its cell membrane receptor leading mainly to the activation of two signalling pathways: PI3-K-Protein kinase B (Akt)-eNOS-NO, which results in metabolic modulation and cardiovascular protection and Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK), which results in cell proliferation.<sup>22</sup> Members of the MAPK signaling cascade, particularly extracellular signaling-regulated kinase (ERK1 and ERK2) have been demonstrated to participate in hypertrophic and antiapoptotic response in the heart.<sup>23,24</sup> The role of the MAPK cascades in the control of iNOS expression has not been completely defined but literature data indicate that ERK1/2 and p38 MAPK are involved in the regulation of iNOS activity or expression in cardiovascular tissues.<sup>25</sup>

Many studies have shown that eNOS and iNOS are important players in the pathogenesis of diabetic cardiovascular complications,<sup>26</sup> but the correlation between cardiac dysfunction and NOS in the acute phase of diabetes, however, remains incomprehensible. Therefore, the objective of the present study was to elucidate the signaling pathways involved in the regulation of cardiac eNOS/iNOS expression in the early stage of STZ-induced diabetes as well as the balance of eNOS/iNOS and arginase that may implicate heart dysfunctions.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

The RIA Insulin kit was a product of INEP (Zemun, Serbia). Porcine insulin was purchased from Galenika (Zemun, Serbia). Streptozotocin, nitrate reductase (from *Aspergillus niger*),  $\beta$ -NADPH, L-glutamic dehydrogenase, L-Arginine monohydrochloride, ninhydrin and  $\beta$ -actin were purchased from Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). The polyclonal anti-phospho Akt (Ser<sup>473</sup>) (pAkt), anti-phospho eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (peNOS), anti iNOS and secondary horse radish peroxidase (HRP) antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology

Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal anti e-NOS antibody was a product of Affinity Bioreagents (Rockford, IL, USA). Polyclonal anti-Akt, anti-ERK 1/2, and antiphospho ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (pERK 1/2) antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies, Inc. (Danvers, MA, USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) kit was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). Reagents for the bicinchoninic acid (BCA) assay were purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). TRIZOL reagent was obtained from Invitrogen (Paisley, UK). M-MuL RT, Taq DNA Polymerase were obtained from Fermentas (Vilnius, Lithuania). Primers for eNOS and iNOS were obtained from Metabion (Martinsried, Germany).

### 2.2. Animals

All animal experiments were approved by the official Vinca Institute's Ethical Committee for Experimental Animals. Adult male *Wistar* rats (200–250 g) were used in the study. The rats were housed at 23 °C, with a 12 h dark/light cycle, and were fed standard rat chow and given free access to water. All animals were weighed at the beginning and at the end of this study. To induce experimental T1D, rats were fasted overnight and injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) (65 mg/kg b.w. in 0.1 M sodium citrate buffer pH 4.5). Normal control rats were age-matched and were injected with the same volume of citrate buffer. All animals were subsequently allowed free access to standard rat chow and water. Tail vein blood glucose was determined after 5 days and rats with nonfasting whole blood glucose >20 mmol/l was selected for further study. These diabetic animals were either maintained untreated, or treated subcutaneously with insulin 3 IU daily for a week. Two weeks after the injection of STZ, control (C), untreated diabetic (DM) and insulin-treated diabetic (DMI) rats were sacrificed.

### 2.3. Blood Glucose and Plasma Insulin Determination

For measurement of blood glucose and plasma insulin level animals were fasted overnight before blood samples were collected. The blood glucose level was measured using an Accutrend glucometer (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany). The plasma insulin level was determined by the RIA method, using rat insulin standards, with assay sensitivity of 0.6 mIU/l and an intra-assay coefficient of variation of 5.24%.

### 2.4. Determination of Nitrite/Nitrate (NOx) Plasma Concentration

Plasma nitrate and nitrite, as end products of NO, were measured using a modified nitrate reductase and Griess reaction method. Assay is performed in a standard flat-bottomed 96-well polystyrene microtitre plate. Briefly, plasma samples were incubated for 3 h at 37 °C with nitrate reductase in the presence of  $\beta$ -NADPH. Nitrate is reduced to nitrite and excess of  $\beta$ -NADPH is then oxidized with L-glutamic dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonium sulfate for 30 min at 37 °C. After reduction, nitrite concentration was determined by mixing an equal volume of samples and Griess reagent (a mixture at 1:1 of 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance at 570 nm was measured in an automated microplate reader. The nitrate concentration was calculated from a NaNO<sub>3</sub> standard curve and expressed as micromoles per liter.

## 2.5. Heart Lysate Preparation

After sacrifice, rat hearts were isolated, washed with cold saline, drained and measured. Tissue was homogenized on ice with an Ultra-turrax homogenizer in lysis buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, protease inhibitors (1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, and 2  $\mu$ g/ml aprotinin), and phosphatase inhibitor (10 mM sodium fluoride). Homogenates were gently mixed for 30 min at 4 °C and then centrifuged 17000  $\times$  g for 45 min at 4 °C. After centrifugation the supernatants were retained for subsequent analysis. Protein concentration of whole cell lysates was determined using the BCA method.

## 2.6. Measurement of L-arginine

L-Arg in heart tissue was measured according to the method described by Kowalczyk et al.<sup>27</sup> In order to determine L-arginine, the derivatization process was performed and L-Arg was deaminated and converted by ninhydrin into aldehyde. Samples were diluted to 2 ml with 25 mM Na-phosphate buffer, pH 9.0 and 1 ml aliquot of 2% ninhydrin reagent was added. The resulting mixtures were heated in a water bath at 80 °C for 15 min. After cooling, they were subjected to spectrophotometric analysis at 404 nm against the mixture of 2 ml of 25 mM Na-phosphate buffer, pH 9.0 and 1 ml of 2% ninhydrin reagent as a blank in a Wallac 1420 Victor 2 microplate reader. The L-Arg concentration was expressed as micrograms per milliliter.

## 2.7. Measurement of Arginase Activity

Arginase activity in heart tissue was determined according to the method described by Corraliza et al.<sup>28</sup> The tissue lysates (4 mg/ml) were incubated with equal volumes of 10 mM  $\text{MnCl}_2$  in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 55 °C for 10 min to activate the enzyme. Hydrolysis reaction of L-arginine by arginase was conducted by incubating the mixture containing activated arginase with 50  $\mu$ l of 0.5 M L-arginine, pH 9.7. Mixture was incubated at 37 °C in shaking water bath for 1 h and the reaction was stopped by adding 800  $\mu$ l of acid solution mixture comprised of sulfuric acid, phosphoric acid and water ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ) in a ratio of 1:3:7. After the addition of 50  $\mu$ l 9%  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone (ISPF), dissolved in 100% ethanol, the tubes were incubated in a boiling water bath for 45 min. The color was developed by keeping the tubes in the dark at room temperature for 10 min. Aliquots of 200  $\mu$ l were transferred to 96-well plate and the urea formed, as an outcome of the arginase action, was colorimetrically quantified at 550 nm using microplate reader (Wallac 1420 Victor 2, Perkin-Elmer, Boston, MA). The arginase activity was expressed as nanomoles of urea per minute per milligram of proteins.

## 2.8. SDS-PAGE and Western Blotting

Equal amounts of protein (50  $\mu$ g/lane) were separated on a 7.5% or 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Nonspecific binding sites on the membranes were blocked using 5% bovine serum albumin in TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 2 h. Membranes were then incubated overnight (4 °C) with primary antibodies against the proteins being investigated: anti-Akt, anti-pAkt (Ser<sup>473</sup>), eNOS, phospho-eNOS (Ser<sup>1177</sup>), iNOS,

phospho-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) and total ERK1/2. After washing, membranes were incubated for 2 h at room temperature with anti-rabbit or anti-goat (1:10000) IgG conjugated to HRP. Immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method. After analysis of phosphorylated molecules, membranes were stripped and reblotted with antibody detecting total content of molecule.  $\beta$ -actin was used as loading control. Blots were imaged and results quantified using ImageJ software (NIH, USA).

## 2.9. RNA Isolation

Total RNA from the heart tissue was isolated by TRIZOL reagent according to the procedure recommended by the manufacturer. Briefly, the tissue was homogenized in TRIZOL reagent (100 mg tissue/1 ml TRIZOL) and RNA was extracted with chloroform, precipitated with Na—acetate and washed with 75% (v/v) ethanol. The RNA pellet was dried and resolved in diethyl pyrocarbonate-treated water. The RNA concentration and purity were determined spectrophotometrically at 260 nm/280 nm. For control of degradation of RNA, samples (2.5 or 5  $\mu$ g of total RNA) were analyzed by 1.2% agarose electrophoresis.

## 2.10. Reverse Transcription and PCR Amplifications

cDNA synthesis was carried out with the First Strand cDNA Synthesis Kit from Fermentas. Equal amounts of total RNA (2.5  $\mu$ g) were heated-denatured and reverse-transcribed by incubation at 37 °C for 60 min in final volume of 20  $\mu$ g. The reactions were terminated by heating for 10 min at 70 °C and finally for 5 min at 4 °C.

For semiquantitative PCR, cDNA samples (equivalent to 375 ng total RNA input) were amplified using Taq DNA polymerase and appropriate pair of primers for eNOS (693 bp) forward: TCC AGT AAC ACA GAC AGT GCA reverse: CAG GAA GTA AGT GAG AGC; iNOS (576 bp) forward: GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG reverse: CTC CTG CCC GCT GAG TTC GTC; Akt (411 bp) forward: TGC TGG AGG ACA ACG ACT AT reverse: TGT CAT CTT GAT CAG GCG GT and GAPDH (308 bp) forward: TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA reverse: AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT. The PCRs are performed using following conditions: denaturation at 94 °C for 45 sec, annealing at 60 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min, for a total of 40 cycles, with a final extension for 10 min at 72 °C. The reverse transcription and PCR reaction were carried out in the Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The resulting PCR fragments were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel containing ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml) and product bands were visualized and photographed on Gel Doc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The amounts of Akt, eNOS and iNOS mRNA is expressed in relation to GAPDH mRNA.

## 2.11. Statistical Analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SD, from three independent experiments with total of 5–7 animals per group. The SPSS program for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. The results were evaluated by parametric statistics and the significance of differences between two groups being estimated by one-way ANOVA followed by the post-hoc Tukey test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant compared with the corresponding control unless otherwise specified.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Physical and Biochemical Characteristics of Experimental Rats

The body weight, heart weight, heart weight to body weight ratio as well as blood glucose and plasma insulin and NO concentration in all experimental groups are summarized in Table I. Diabetic rats exhibited significantly decreased body weight compare to non-diabetic control ( $p < 0.001$ ). Diabetic animals that received insulin replacement gain weight, but it remained decreased compared to control ( $p < 0.01$ ). The heart weight was lower in both diabetic and insulin treated diabetic rats compare to control while this decrease was significant ( $p < 0.05$ ) in diabetic rats that received insulin. Concerning heart to body weight ratio (relative weight of the heart), significant increase ( $p < 0.05$ ) was noticed in insulin-deficient rats.

As expected, diabetes altered fasting blood glucose and plasma insulin level (Table I). Blood glucose levels were significantly higher ( $p < 0.001$ ) in STZ-treated rats while insulin treatment restored blood glucose of diabetic rats to control level. Plasma insulin concentration was decreased ( $p < 0.01$ ) in diabetic group compared to control and it was significantly elevated ( $p < 0.001$ ) in insulin-treated diabetic rats compare to control as well as diabetic group. Neither two weeks of diabetes nor chronic insulin supplementation changed plasma nitrite/nitrate concentration.

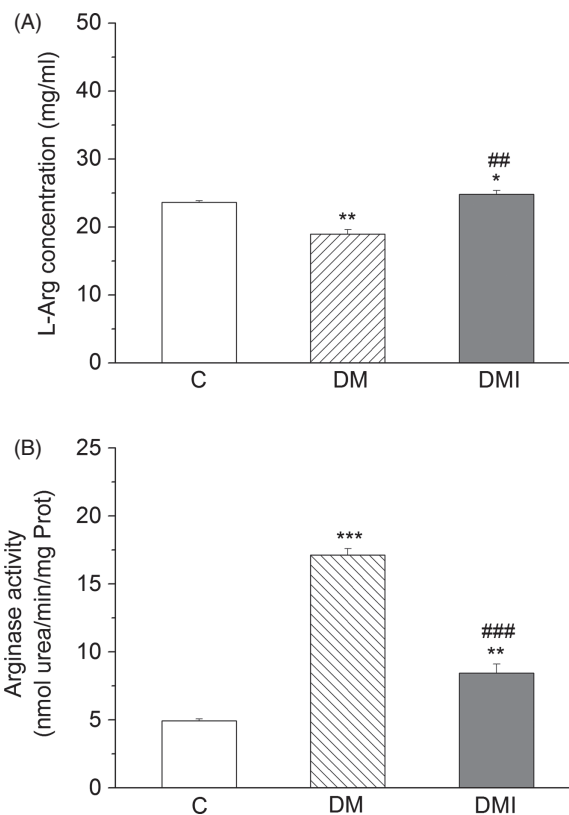
#### 3.2. Effect of STZ-Induced Diabetes and Insulin Replacement on Tissue L-Arg Concentration and Arginase Activity

Results presented in Figure 1(A) show that L-Arg concentration in heart of diabetic rats was significantly lower than in controls rats ( $p < 0.01$ ) and one week after chronic insulin treatment the L-Arg concentration was significantly increased compare to appropriate controls ( $p < 0.05$  vs. C;  $p < 0.01$  vs. DM).

After 2 weeks of diabetes, cardiac arginase activity in STZ-treated animals was significantly enhanced as compared to controls ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1(B)). Chronic insulin treatment of diabetic rats for a week, significantly decreased arginase activity in heart, compare to STZ- treated rats ( $p < 0.001$  vs. DM), but it still remained high compare to control rats ( $p < 0.01$ ).

#### 3.3. The Effect of Diabetes and Insulin Treatment on Regulation of Cardiac eNOS and iNOS

eNOS is one of the enzymes generating NO in the heart, and its activity is regulated by phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>. We did not observe any changes in total eNOS protein content, neither in the heart of diabetic rats nor in diabetic rats treated with insulin (Fig. 2). In agreement with results obtained at the protein level the expression of eNOS mRNA did not change in STZ



**Fig. 1.** Effects of acute diabetes on cardiac L-Arg concentration (A) and arginase activity (B) in control, STZ-diabetic and insulin-treated diabetic rats. (A) L-Arg concentration was determined colorimetrically in heart tissue. (B) Arginase activity was assayed in tissue by detecting urea production and normalized to the total amount of protein in the lysates. Values are presented as the means  $\pm$  SD of three independent experiments with 5–7 animals per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus C; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  versus DM. Control (C), diabetic rats (DM) and insulin-treated diabetic rats (DMI); L-arginine (L-Arg).

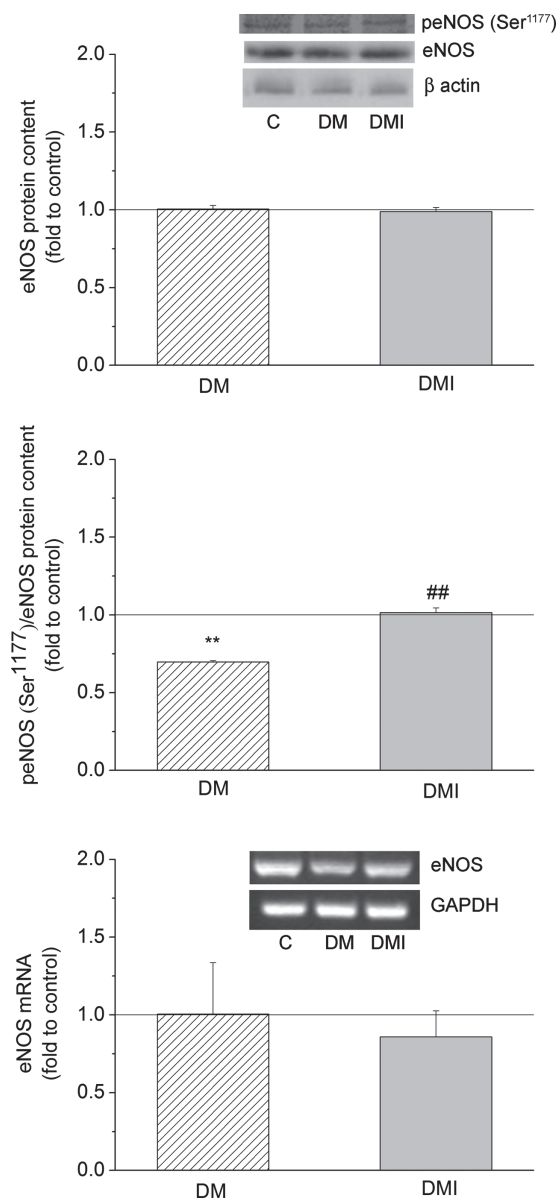
and insulin treated animals (Fig. 2). The level of phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> (expressed as a phospho eNOS/total eNOS ratio) was influenced by diabetes, and two weeks after STZ treatment, significant decrease ( $p < 0.01$ ) of eNOS phosphorylation was observed, compared to control. Insulin treatment significantly increased eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> ( $p < 0.01$ ) compare to STZ treated rats (Fig. 2).

Regarding the expression of iNOS, diabetes did not produce any significant changes in iNOS protein and mRNA content, but 2 weeks after STZ treatment we noticed slight increase in iNOS protein and mRNA expression in heart from insulin deficient rats compare to control (Fig. 3). Chronic, daily insulin treatment,

**Table I.** Physical and biochemical characteristics of control (C), diabetic (DM) and insulin-treated diabetic rats (DI) at the end of the experiment.

Parameter	C (n = 15)	DM (n = 15)	DMI (n = 15)
Body weight (g)	261.55 $\pm$ 13.56	200 $\pm$ 33.38 <sup>c</sup>	236.66 $\pm$ 18.03 <sup>b</sup>
Heart weight (g)	1.128 $\pm$ 0.19	1.058 $\pm$ 0.31	0.88 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Heart-to-body ratio ( $\times 1000$ )	4.4 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.4
Blood glucose (mmol/l)	6.254 $\pm$ 0.53	21.112 $\pm$ 3.42 <sup>c</sup>	6.85 $\pm$ 0.65 <sup>d</sup>
Insulin (mIU/l)	38.1895 $\pm$ 2.21	12.623 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>	255.545 $\pm$ 15.35 <sup>c,d</sup>
Nitrite/nitrate ( $\mu$ mol/l)	79.024 $\pm$ 8.12	88.09 $\pm$ 12.57	67.98 $\pm$ 9.003

Notes: Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three separate experiments with 5–7 rats per group. <sup>a</sup> $p < 0.05$  versus C. <sup>b</sup> $p < 0.01$  versus C. <sup>c</sup> $p < 0.001$  versus C. <sup>d</sup> $p < 0.001$  versus DM.



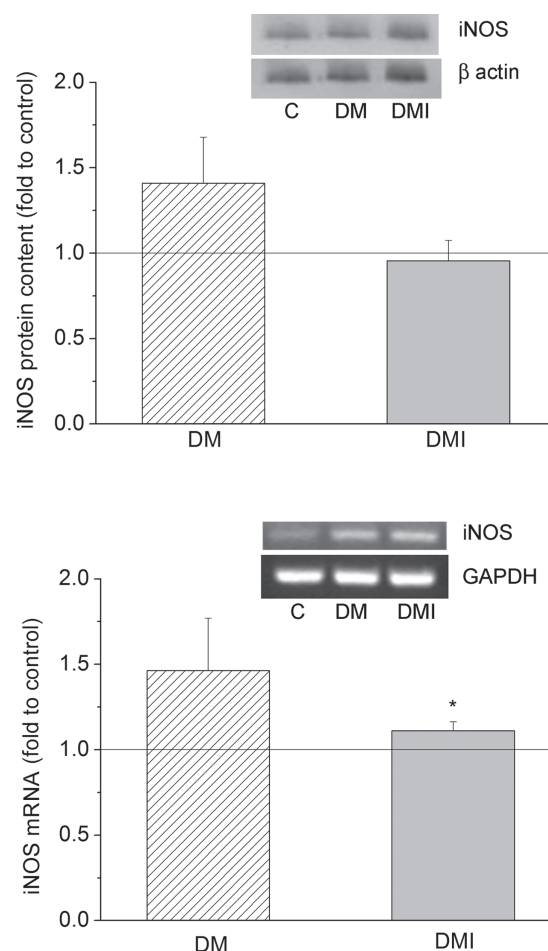
**Fig. 2.** Effects of acute diabetes and insulin treatment on eNOS expression and phosphorylation in the rat heart.

Representative Western blots for total eNOS and peNOS (Ser<sup>1177</sup>) and ethidium bromide-stained gel showing RT-PCR products of eNOS from control (C), diabetic rats (DM) and insulin-treated diabetic rats (DMI) are shown in the upper inserts. Bar graphs represent protein content of total eNOS and ratio of peNOS/eNOS. The relative amounts of eNOS mRNA were determined by semiquantitative RT-PCR in relation to the housekeeping gene, GAPDH, as described in section Materials and Methods. Values are given as means  $\pm$  SD of three independent experiments with 5–7 animals per group. \*\* $p < 0.01$  versus C, ## $p < 0.01$  versus DM; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; peNOS, phosphorylated endothelial nitric oxide synthase.

caused significant increase in mRNA content ( $p < 0.05$ ) in diabetic group compare to untreated control.

### 3.4. The Impact of STZ-Induced Diabetes and Insulin Treatment on Cardiac Akt and ERK1/2 Expression and Protein Phosphorylation

Since NO production is mediated via the PI3-K/Akt pathway, Akt (serine-threonine kinase downstream from PI3-K) may play

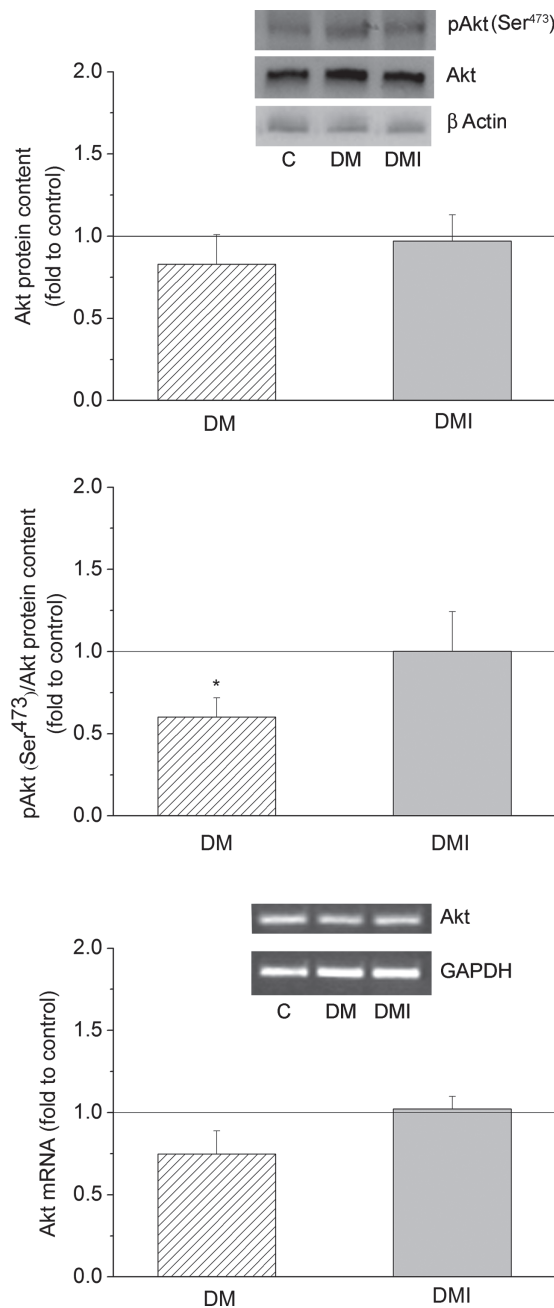


**Fig. 3.** Expression of iNOS in the heart of control (C), diabetic (DM), and diabetic rats with insulin replacement (DMI).

iNOS protein content and iNOS mRNA expression levels were analyzed by Western blot and RT-PCR as described in Materials and Methods. Upper panels show representative immunoblot and ethidium bromide-stained gel. Values are presented as the means  $\pm$  SD of three independent experiments with 5–7 animals per group. \* $p < 0.05$  versus C, iNOS, inducible nitric oxide synthase.

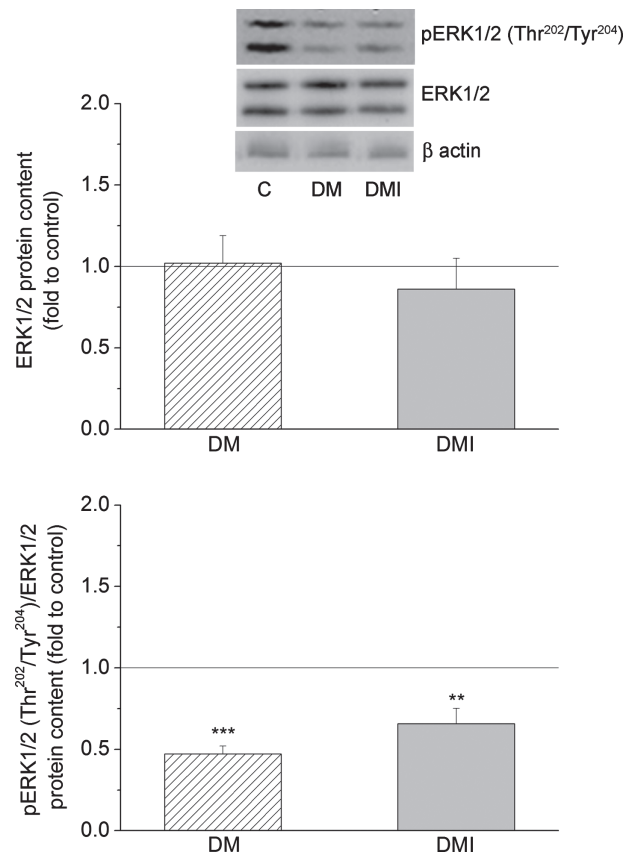
an important role in regulation of NO production. In order to analyze the effect of early diabetes on cardiac Akt activity, the phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> was determined in heart tissue. As shown in Figure 4, diabetes as well as insulin treatment, did not alter the level of Akt protein and mRNA expression. However, significant decrease in cardiac Ser<sup>473</sup> Akt phosphorylation (expressed as a phospho Akt/total Akt ratio) was observed ( $p < 0.05$ ) in diabetic animals compare to non diabetic control, and after a week of daily insulin injection, the level of Akt phosphorylation was restored to basal level.

Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is an important intracellular kinase associated with myocardial protection. Phosphorylation at both threonine 202 and tyrosine 204 residues is required for full enzymatic activation of ERK1/2. Furthermore, total and phosphorylated ERK1/2 protein content were measured by immunoblotting and data are shown in Figure 5. We did not observe changes of total ERK1/2 protein content in the heart of rats dependent on diabetes or insulin treatment. On the other hand, the expression level of phosphorylated ERK1/2



**Fig. 4.** The influence of acute diabetes and insulin treatment on cardiac Akt expression and protein phosphorylation. Equal amounts of proteins were resolved on 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) and anti-Akt antibodies, as described in Materials and Methods. Representative immunoblots and the quantification of total Akt and pAkt (Ser<sup>473</sup>) are presented. Bar graphs of total Akt protein content and the ratio of pAkt/Akt are given respectively. The relative amounts of Akt mRNA were determined by semiquantitative RT-PCR in relation to the housekeeping gene GAPDH. Values are given as means  $\pm$  SD of three independent experiments with 5–7 animals per group. \* $p < 0.05$  versus C. The abbreviations are the same as in Figure 1.

(the phospho-ERK1/2/ total ERK1/2 ratio) in the rat heart under hyperglycemia, 2 weeks after STZ treatment, was significantly decreased ( $p < 0.001$ ) compare to control and it was partially restored by chronic insulin treatment ( $p < 0.01$  vs. control).



**Fig. 5.** The expression and phosphorylation of ERK 1/2 in the heart of control (C), diabetic (DM) and diabetic rats treated with insulin (DMI). Protein content and phospho-ERK 1/2 per total ERK 1/2 ratio are presented and expressed as a fold of the appropriate control. Values are presented as the means  $\pm$  SD of three separate experiments with 5–7 animals per group. \*\*\* $p < 0.001$  versus C, ### $p < 0.001$  versus DM. ERK1/2, extracellular signaling-regulated kinase1/2; pERK1/2, phospho-ERK1/2.

#### 4. DISCUSSION

Diabetes mellitus is associated with a high incidence of cardiovascular disease. Impaired cardiac function is associated with a series of morphological, biochemical and functional abnormalities. The STZ-diabetic rats represent well-established experimental model of diabetes and have many of the pathophysiologic features as noted in humans such hypoinsulinemia, hyperglycemia, atherosclerosis, cardiac hypertrophy, cardiomyopathy, cardiovascular dysfunction and heart failure.<sup>29</sup>

In the present studies we examined the changes in cardiac eNOS/iNOS and related signaling pathways during the acute phase of STZ-induced diabetes. Acute diabetes was reported to occur between 8 days and 3 weeks, and chronic diabetes within 3 weeks after STZ administration.<sup>30</sup>

Two weeks after STZ administration we observed a significant decrease in body weight compare to control group, without effects on heart weight, but the relative heart weight was augmented, indicating the potential hypertrophy in later stage. Expectedly insulin deficiency caused high blood glucose level and insulin administration restored glucose homeostasis. In the current study we did not observe significant changes in plasma nitrite/nitrate concentration (Table I), as a marker of NO production.



Because arginase shares L-arginine as a common substrate with NOS, NO production depends on the availability of L-arginine to NOS. In this regard, the L-arginine catabolism via the arginase pathway can act as an endogenous negative control system to regulate overall NO production.<sup>31</sup> Our presented results indicate that L-Arg concentration was significantly decreased at a time when cardiac arginase activity was markedly augmented in heart tissue of diabetic rats (Fig. 1). These changes in arginase activity and arginine level probably correlate with decrease of NO production. Results from other authors<sup>32</sup> confirmed that after 4 or 8 weeks of diabetes, both vascular and hepatic arginase activity were substantially increased. Multiple factors are likely to contribute to elevated arginase activity during diabetes. Increased arginase activity seems to be associated with inflammatory cytokines and ROS, both of which are increased during diabetes.<sup>33</sup> Elevated levels of arginase can compete with NOS for available L-Arg, reducing NO and increasing superoxide ( $O_2^-$ ) production via NOS uncoupling. Elevated  $O_2^-$  combines with NO to form peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) further reducing NO. In addition, oxidative species increase arginase activity, through unknown mechanism(s).<sup>34</sup>

In our experiments insulin treatment markedly reduces the elevated arginase activity, as well as increases L-Arg concentration (Fig. 1), indicating an important regulatory effect of insulin on arginase enzymatic activity. It is known that insulin represses expression of genes for urea synthesis pathways and that insulin signaling is impaired in both T1D and T2D. Thus, diabetes-induced increases in arginase activity could explain the decreased L-Arg levels reported in plasma from diabetic animals and patients as well as in vascular tissue of STZ-diabetic rats.<sup>35</sup> It is tempting to speculate that hyperglycemia directly or indirectly stimulates this pathway to enhance arginase activity and that insulin may ameliorate this effect, so intensive control of hyperglycemia with insulin, should be assessed for their ability to increase arginine bioavailability and block arginase activity.<sup>18</sup>

According to literature data, inconsistent reports exist concerning the eNOS and iNOS expression in diabetic heart. eNOS expression has been reported to be increased,<sup>36,37</sup> decreased<sup>38</sup> or unaltered.<sup>9,39</sup> Our results suggest that acute diabetes did not have significant effects on transcription or translation of eNOS in rat heart tissue, but there was a significant decrease in eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>, that was restored to control level after chronic insulin treatment (Fig. 2).

Previous studies have already demonstrated iNOS expression in the hearts of STZ-diabetic rats.<sup>40</sup> The published data indicate that expression of iNOS was significantly higher<sup>36,37,39</sup> in diabetic rat heart, suggesting that it play an important role in the deterioration of the cardiovascular system. In heart failure, increases in myocardial iNOS and arginase expression, followed by decrease of serum arginine concentration, is not necessarily associated with increased myocardial nitrite or nitrate concentrations.<sup>41</sup> However, in our experiments tendency of the increase in cardiac iNOS protein/mRNA expression, 2 weeks after STZ treatment, was not significant (Fig. 3). Activation of iNOS is well-known to cause the production of excessive amounts of NO, and subsequent formation of large quantities of cytotoxic products of reactive nitrogen species, superoxide and peroxynitrite, that cause depression cardiac contractile function.<sup>11,39</sup>

Most of the published results are related to potential alteration in NOS expression after more than 2 weeks of diabetes

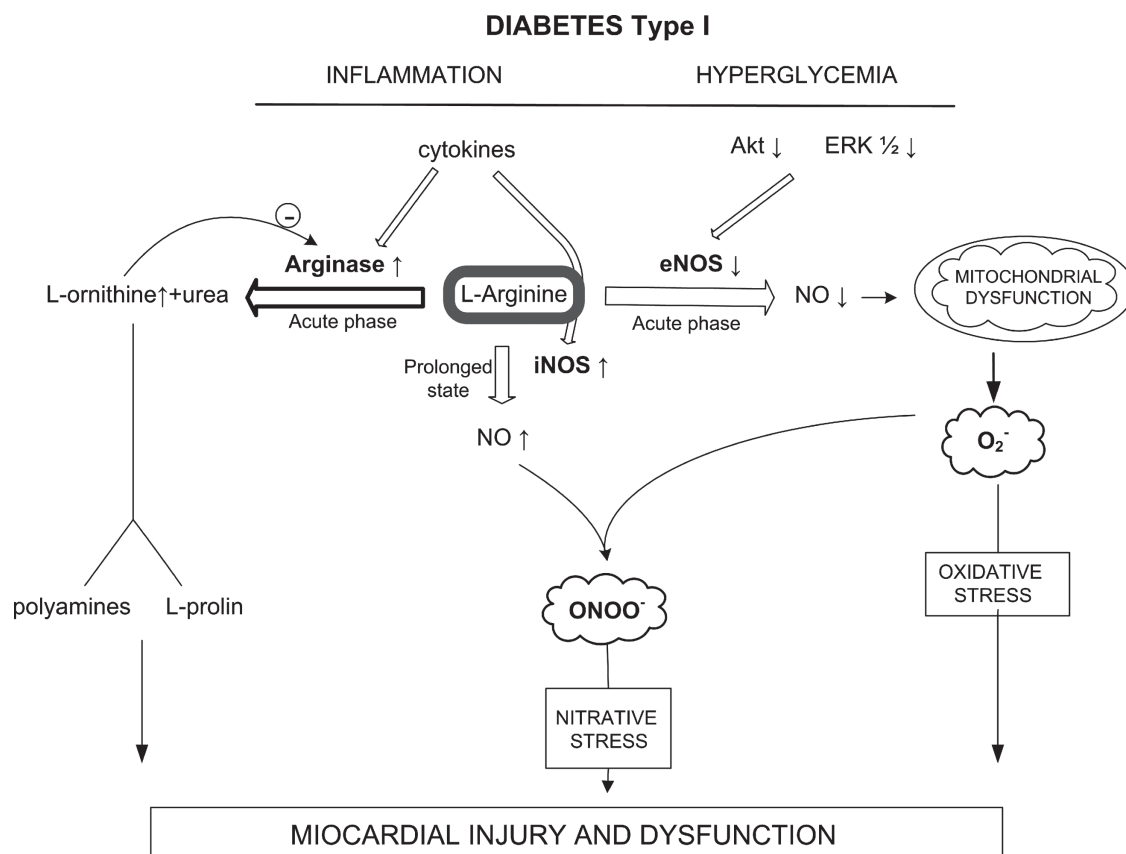
induction. Our results (Figs. 2 and 3) are in accordance with Nagareddy et al.<sup>42</sup> who indicate that expression of eNOS and iNOS in cardiovascular tissues is dependent on the duration of diabetes. The same authors reported that an increased expression of iNOS in the heart, aorta, and mesenteric tissue may contribute to the reduced eNOS expression and possibly to the endothelial dysfunction in 9- and 12-weeks diabetic rats. There is also a differential regulation of eNOS and iNOS isoforms, wherein a prolonged diabetic state leads to downregulation of eNOS with a concurrent upregulation of iNOS and nitrotyrosine. Interaction of iNOS-derived NO with oxidative free radicals and formation of peroxynitrite or nitrotyrosine may influence the subsequent hemodynamic outcomes in experimental diabetes.<sup>42</sup>

Under pathological conditions, like T1D, myocardial insulin signal transduction pathways, such as PI3-K/Akt signaling, are modified.<sup>43–45</sup> Akt represents an important intermediary in insulin signaling pathway and has been implicated in regulation of a number of cell functions including endothelial NO production. Previous studies have shown that there is a good correlation between phosphorylated Akt and enzyme activity.<sup>45</sup> In heart of T1D rats, Akt phosphorylation at Ser<sup>473</sup> was markedly reduced (Fig. 4). However, in present study Akt protein and mRNA expression did not change in heart of STZ- and insulin-treated rats. Alterations in PI3-K/Akt signaling, resulting in diminished eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>, implicate reduced endothelial NO bioavailability and generation of ROS and scavenging of NO.

Data concerning insulin's effect on cardiac ERK 1/2 is controversial. Some authors have found that insulin treatment leads to an increase in the dual phosphorylation of ERK 1/2,<sup>46</sup> while other studies<sup>47</sup> report no change in the phosphorylation states of ERK 1/2 in response to insulin. There are also controversies in published studies considering effects of STZ-induced diabetes on cardiac ERK 1/2. Ekladous et al.<sup>45</sup> observed that diabetes diminished ERK 1/2 phosphorylation in the heart and it was restored by insulin replacement. Other findings indicate no changes in myocardium ERK1/2 phosphorylation in diabetic rats and rats that had received islet transplant.<sup>44</sup> Naito et al.<sup>48</sup> determined that the level of phosphorylated ERK1/2 in the rat heart was increased 4 weeks after STZ treatment, while phosphorylation of ERK1/2 was markedly decreased after 20 weeks of diabetes. Chang et al.<sup>49</sup> detected the increase of phosphorylation/activation of ERK1/2 in the left ventricles of the diabetic rat hearts. These findings suggest that increase activity ERK1/2 together with p38 and JNK participates in the cardiac pathologic hypertrophy in diabetic rat heart.

We also analyzed the insulin-regulated cardiac signaling pathway of ERK 1/2 kinases, regularly connected with mitogenic action of insulin, and we observed significant decrease of ERK1/2 protein phosphorylation (Fig. 5) in diabetic rat hearts and this was not restored by insulin replacement. Our results are in agreement with Ekladous et al.<sup>45</sup> indicating that acute STZ-induced diabetes diminished ERK1/2 phosphorylation in the rat heart.

Based on our results and according to literature data, we assume that in the early stages of diabetes arginase is markedly induced in heart and increased arginase activity preceded alterations of NOS expression/activity. Multiple factors are likely to contribute to elevated arginase activity during diabetes: hyperglycemia, inflammatory cytokines and reactive oxygen species, all of them are increased during diabetes.<sup>21,32,33</sup> Under conditions of low arginine level, NOS is uncoupled producing ROS,



**Fig. 6.** Competitive regulation of L-arginin bioavailability between NOS and arginase in the heart of streptozotocin-diabetic rats. Abbreviations: eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; Akt, protein kinase B; ERK1/2, extracellular signaling-regulated kinase1/2;  $O_2^-$ , superoxide anion;  $ONOO^-$ , peroxynitrite.

marker of oxidative stress, in lieu of NO.<sup>50</sup> In addition, arginase can redirect the metabolism of L-Arg from NO to L-ornithine and formation of polyamines and L-proline that may have direct effect on myocyte function.<sup>17</sup> Induction of eNOS and iNOS in diabetic heart is dependent on the duration of diabetes. Prolonged diabetic state may lead to downregulation of eNOS with concomitant upregulation of iNOS and production of excessive amounts of NO.<sup>42</sup> Interaction of iNOS-derived NO with oxidative free radicals and subsequent formation of peroxynitrite or nitrotyrosine further could provoke heart damaging and dysfunction.<sup>11</sup> In the acute phase of diabetes the heart is probably affected minimally but the molecular mechanism of diabetes-related cardiac disorders has already been triggered in this phase as presented at Figure 6.

**Acknowledgments:** This study was supported by the Project grants No. 41009 and No. 173033 from the Ministr of Education and Science, Republic of Serbia.

## References and Notes

1. R. Retnakaran and B. Zinman, *Lancet* 371, 1790 (2008).
2. P. Zimmet, K. G. Alberti, and J. Shaw, *Nature* 414, 782 (2001).
3. U. Forstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert, *Hypertension* 23, 1121 (1994).
4. R. A. Kelly, J. L. Balligand, and T. W. Smith, *Circ. Res.* 79, 363 (1996).
5. I. B. Buchwalow, W. Schulze, P. Karczewski, M. M. Kostic, G. Wallukat, R. Morwinski, E. G. Krause, J. Muller, M. Paul, J. Slezak, F. C. Luft, and H. Haller, *Mol. Cell. Biochem.* 217, 73 (2001).
6. J. L. Balligand, L. Kobzik, X. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. O'Hara, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel, *J. Biol. Chem.* 270, 14582 (1995).
7. T. Michel and O. Feron, *J. Clin. Invest.* 100, 2146 (1997).
8. C. Nathan, *J. Clin. Invest.* 100, 2417 (1997).
9. M. M. El-Omar, R. Lord, N. J. Draper, and A. M. Shah, *Eur. J. Heart Fail.* 5, 229 (2003).
10. A. Ceriello, L. Quagliaro, M. D'Amico, C. Di Filippo, R. Marfella, F. Nappo, L. Berrino, F. Rossi, and D. Giugliano, *Diabetes* 51, 1076 (2002).
11. P. Ferdinandy, H. Dhanil, I. Ambrus, R. A. Rothery, and R. Schulz, *Circ. Res.* 87, 241 (2000).
12. A. S. De Vriese, T. J. Verbeuren, J. Van de Voorde, N. H. Lameire, and P. M. Vanhoute, *Br. J. Pharmacol.* 130, 963 (2000).
13. N. N. Chan, P. Vallance, and H. M. Colhoun, *Diabetologia* 43, 137 (2000).
14. M. Mori and T. Gotoh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 715 (2000).
15. A. S. Jung, H. Kubo, R. Wilson, S. R. Houser, and K. B. Margulies, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1756 (2006).
16. J. Steppan, S. Ryoo, K. H. Schuleri, C. Gregg, R. K. Hasan, A. R. White, L. J. Bugaj, M. Khan, L. Santhanam, D. Nyhan, A. A. Shoukas, J. M. Hare, and D. E. Berkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4759 (2006).
17. W. Durante, F. K. Johnson, and R. A. Johnson, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 906 (2007).
18. S. R. Kashyap, A. Lara, R. Zhang, Y. M. Park, and R. A. DeFronzo, *Diabetes Care* 31, 134 (2008).
19. D. E. Berkowitz, R. White, D. Li, K. M. Minhas, A. Cernetchi, S. Kim, S. Burke, A. A. Shoukas, D. Nyhan, H. C. Champion, and J. M. Hare, *Circulation* 108, 2000 (2003).
20. S. M. Morris, Jr., D. Kepka-Lenhart, and L. C. Chen, *Am. J. Physiol.* 275, E740 (1998).
21. N. Ishii, H. Ikenaga, P. K. Carmines, Y. Aoki, Z. Ogawa, T. Saruta, and T. Suga, *Metabolism* 53, 868 (2004).
22. Q. Yu, F. Gao, and X. L. Ma, *Cardiovasc. Res.* 89, 516 (2011).
23. J. Ren, J. Duan, K. K. Hintz, and B. H. Ren, *Cardiovasc. Res.* 57, 738 (2003).

24. Y. Wang, *Circulation* 116, 1413 (2007).
25. M. C. LaPointe and E. Isenovic, *Hypertension* 33, 276 (1999).
26. H. Farhangkhoe, Z. A. Khan, H. Kaur, X. Xin, S. Chen, and S. Chakrabarti, *Pharmacol. Ther.* 111, 384 (2005).
27. D. Kowalczyk, R. Pietras, and J. Baran, *Annales XX*, 83 (2007).
28. I. M. Corraliza, M. L. Campo, G. Soler, and M. Modolell, *J. Immunol. Methods* 174, 231 (1994).
29. K. De Angelis, B. D. Schaan, C. Y. Maeda, P. Dall'Ago, R. B. Wichi, and M. C. Irigoyen, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1091 (2002).
30. H. Mulder, B. Ahren, and F. Sundler, *Diabetologia* 39, 649 (1996).
31. J. Lee, H. Ryu, R. J. Ferrante, S. M. Morris, Jr., and R. R. Ratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4843 (2003).
32. M. J. Romero, D. H. Platt, H. E. Tawfik, M. Labazi, A. B. El-Remessy, M. Bartoli, R. B. Caldwell, and R. W. Caldwell, *Circ. Res.* 102, 95 (2008).
33. J. Helmersson, B. Vessby, A. Larsson, and S. Basu, *Circulation* 109, 1729 (2004).
34. S. Chandra, M. Romero, A. Shatanawi, A. Alkilany, and R. Caldwell, *Br. J. Pharmacol.* (2011).
35. G. M. Pieper and L. A. Dondlinger, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 684 (1997).
36. H. Farhangkhoe, Z. A. Khan, S. Chen, and S. Chakrabarti, *Nutr. Metab. (Lond)* 3, 27 (2006).
37. S. Jesmin, S. Zaedi, S. Maeda, I. Yamaguchi, K. Goto, and T. Miyauchi, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231, 925 (2006).
38. M. Felaco, A. Grilli, M. A. De Lutiis, A. Patruno, N. Libertini, A. A. Taccardi, P. Di Napoli, C. Di Giulio, R. Barbacane, and P. Conti, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31, 179 (2001).
39. X. Cheng, X. S. Cheng, K. H. Kuo, and C. C. Pang, *Cardiovasc. Res.* 64, 298 (2004).
40. K. Stockklauser-Farber, T. Ballhausen, A. Laufer, and P. Rosen, *Biochim. Biophys. Acta* 1535, 10 (2000).
41. P. Heusch, S. Aker, K. Boengler, E. Deindl, A. van de Sand, K. Klein, T. Rassaf, I. Konietzka, A. Sewell, S. Menazza, M. Canton, G. Heusch, F. Di Lisa, and R. Schulz, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H446 (2010).
42. P. R. Nagareddy, Z. Xia, J. H. McNeill, and K. M. MacLeod, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H2144 (2005).
43. E. R. Gross, A. K. Hsu, and G. J. Gross, *Diabetes* 56, 127 (2007).
44. L. Laviola, G. Belsanti, A. M. Davalli, R. Napoli, S. Perrini, G. C. Weir, R. Giorgino, and F. Giorgino, *Diabetes* 50, 2709 (2001).
45. D. Ekladous, M. Z. Mehdi, M. Costa, A. K. Srivastava, J. L. Chiasson, and L. Coderre, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 971 (2008).
46. J. B. Carvalheira, V. C. Calegari, H. G. Zecchin, W. Nadruz, Jr., R. B. Guimaraes, E. B. Ribeiro, K. G. Franchini, L. A. Velloso, and M. J. Saad, *Endocrinology* 144, 5604 (2003).
47. G. Koricanac, S. Tepavcevic, Z. Zakula, T. Milosavljevic, M. Stojiljkovic, and E. R. Isenovic, *Eur. J. Pharmacol.* 655, 23 (2011).
48. Z. Naito, E. Takashi, G. Xu, T. Ishiwata, K. Teduka, M. Yokoyama, N. Yamada, Y. Sugisaki, and G. Asano, *Exp. Mol. Pathol.* 74, 23 (2003).
49. S. H. Chang, C. J. Liu, C. H. Kuo, H. Chen, W. Y. Lin, K. Y. Teng, S. W. Chang, C. H. Tsai, F. J. Tsai, C. Y. Huang, B. S. Tzang, and W. W. Kuo, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011, 950150 (2011).
50. Y. Xia, V. L. Dawson, T. M. Dawson, S. H. Snyder, and J. L. Zweier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6770 (1996).

Received: 30 November 2011. Accepted: 21 December 2011.