

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Соња С. Зафировић

**Ефекат естрадиола на регулацију
ендотелне и индуцибилне
азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних
пацова**

докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sonja S. Zafirović

**Efekat estradiola na regulaciju endotelne i
inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu
gojaznih pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Sonja S. Zafirović

**Effect of estradiol on regulation of endothelial
and inducible nitric oxide synthase in the
heart of obese rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

dr Esmā R. Isenović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, Srbija

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

Članovi komisije:

dr Emina Sudar Milovanović, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, Srbija

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Beograd, Srbija

dr Milica Labudović-Borović, docent, Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

Datum i mesto javne odbrane:_____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u okviru projekta 173033 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Esme R. Isenović, naučnog savetnika.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Esmi R. Isenović na ukazanom poverenju i pruženoj šansi da postanem deo njenog naučno-istraživačkog tima, na bezgraničnom strpljenju, podršci i velikodušnoj stručnoj pomoći koju mi je pružala od samog početka izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Jeleni Đorđević na predusretljivosti, stručnoj pomoći, dobronamernim sugestijama i velikom trudu pri pregledu i oceni ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Emini Sudar Milovanović na prvom eksperimentalnim koracima, izuzetnoj stručnoj pomoći, dragocenim savetima, prijateljstvu i strpljenju (dok je radila sa mnom i za mene) koji su mi pomogli da istrajem.

Zahvaljujem se dr Nebojši Jasniću na vremenu koje je posvetio pregledu i oceni doktorske disertacije, kao i dragocenim sugestijama prilikom konačnog formiranja teksta ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Milici Labudović-Borović na konstrukcionim sugestijama i vremenu koje je posvetila pregledu i oceni doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem kolegi dr Milanu Obradoviću na podršci i pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije, kao i prijateljstvu koje je pružao od samog početka našeg zajedničkog rada. Najtoplije se zahvaljujem kolegama i saradnicima na projektu: dr Vladanu Bajiću, dr Sanji Soskić, dr Božidarki Zarić, MSc Aleksandri Jovanović, MSc Julijani Stanimirović, MSc Anastasiji Panić i MSc Ivani Resanović koji su svojom energijom, kolegijalnošću, optimizmom i vedrim duhom doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča” koji su doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se suprugu Radovanu na strpljenju, podršci i ljubavi koji su mi davali snage da istrajem.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojim dragim roditeljima, koji su uvek verovali u mene i omogućili mi da postignem sve što sam želela u životu. Ovu disertaciju posvećujem njima.

Sonja S. Zafirović

Efekat estradiola na regulaciju endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova

Sažetak

Estradiol ostvaruje pozitivan efekat na kardiovaskularni sistem (KVS), sprečavanjem nastanka ateroskleroze i endotelne i/ili vaskularne disfunkcije, a deluje i direktno na srce smanjujući njegovu hipertrofiju. Estradiol ostvaruje pozitivne efekte u KVS regulacijom azot-monoksid (NO)-sintaza (NOS), endotelne (eNOS) i inducibilne (iNOS) forme, koje su odgovorne za sintezu NO, aktivacijom složene mreže unutarćelijskih signalnih puteva, u koje su uključeni signalni molekuli supstrat receptora za insulin 1 (IRS-1), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) i protein kinaza B (Akt). Estradiol utiče na signalnu transdukciju angiotenzina II (Ang II), delujući na ekspresiju receptora za Ang II tipa 1 (AT1R) i tipa 2 (AT2R), kao i na nivo RhoA proteina. Estradiol utiče i na transport energetskih supstrata regulišući translokazu masnih kiselina (CD36) i transportere za glukozu tipa 1 (GLUT1) i tipa 4 (GLUT4).

Kontrolni i gojazni mužjaci pacova soja Wistar tretirani su estradiolom (40 μ g/kg) ili 1% etanolom 24 sata pre žrtvovanja. Spektrofotometrijskim metodama određivane su koncentracije NO u plazmi i koncentracije L-Arginina (L-Arg), NO i slobodnih masnih kiselina (SMK) u lizatu srca. Western blot metodom određivani su nivoi proteina eNOS, iNOS, NF- κ B-p65, pIRS-1/IRS-1, p85 i p110 subjedinice PI3K, pAkt/Akt, RhoA, AT1R, AT2R, GLUT1, GLUT4 i CD36 proteina, kao i asocijacija IRS-1 sa p85-PI3K proteinom u srcu pacova, dok je imunohistohemijskom metodom određivana ekspresija i lokalizacija eNOS i iNOS. Metodom qRT-PCR određivan je nivo iRNK za eNOS i iNOS u srcu pacova. Rezultati su analizirani korišćenjem Studentovog t-testa.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da tretman estradiolom kod kontrolnih pacova povećava nivo p85 subjedinice PI3K i

fosforilaciju Akt na Thr³⁰⁸, dok smanjuje ekspresiju gena za iNOS. Estradiol smanjuje ekspresiju AT1R i RhoA proteina i reguliše transport energetskih supstrata u srce kod kontrolnih životinja, povećavajući nivo GLUT4, a smanjujući nivo CD36 proteina na plazma membrani kardiomiocita.

Estradiol kod gojaznih životinja smanjuje ekspresiju gena za iNOS kao i fosforilaciju IRS-1 na Ser³⁰⁷. Sa druge strane estradiol povećava asocijaciju IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K, kao i nivoe p85, p110 i Akt proteina i dovodi do povećanja ekspresije gena za eNOS. Estradiol kod gojaznih životinja smanjuje nivo AT1R i AT2R na plazma membrani kardiomiocita, kao i nivo RhoA proteina u lizatu srca. Takođe, smanjenje nivoa CD36 i povećanje nivoa GLUT4 na plazma membrani kardiomiocita zabeleženo je kod gojaznih pacova nakon tretmana estradiolom.

Na osnovu dobijenih i prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije možemo zaključiti da estradiol učestvuje u regulaciji ekspresije eNOS i iNOS u srcu gojaznih pacova preko IRS-1/PI3K/Akt signalne kaskade. Pozitivni efekti estradiola u patologiji gojaznosti ogledaju se i u smanjenju nivoa lipida akumuliranih u srcu. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom su doprinela sagledavanju molekulskih mehanizama kojima estradiol utiče na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS, kao i na metabolizam energetskih supstrata u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova i predstavljaju značajan doprinos razumevanju mehanizama koji se nalaze u osnovi patologije gojaznosti.

Ključne reči: estradiol, srce, eNOS, iNOS, energetski supstrati

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

UDK broj: 577.175.6:[611.12:[616-055.1+616-056.25]](043.3)

Effect of estradiol on regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase in the heart of obese rats

Abstract

Estradiol has a positive effect on the cardiovascular system (CVS) by preventing the development of atherosclerosis and endothelial and/or vascular dysfunction. Estradiol exerts many of its effects on the CVS by regulation of nitric oxide synthase (NOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) forms that are responsible for the synthesis of nitric oxide (NO), through activation of the complex network of intercellular signal pathways that include signaling molecules: insulin receptor substrate 1 (IRS-1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt.) Estradiol also affects the signal transduction of angiotensin II (Ang II) by affecting the expression of Ang II receptors: type 1 (AT1R) and type 2 (AT2R), as well as the level of RhoA protein. Finally, estradiol indirectly regulates the transport of energy substrates in heart, by regulating transporters of free fatty acids (FFA) and glucose, CD36 and glucose transporters type 1 (GLUT1) and type 4 (GLUT4).

Control and obese male Wistar rats were treated with one dose of estradiol (40 µg/kg) or with the same amount of 1% ethanol in saline 24 hours before sacrificed. The concentration of NO was measured in the plasma and in lysates, while the concentrations of L-Arginine and FFA were determined in the lysates of the rats' hearts. The Western blot method was used to determine the level of eNOS, iNOS, NF-kB p65, IRS-1, p85 and p110 subunits of PI3K, Akt, AT1R, AT2R, RhoA, CD36, GLUT1 and GLUT4 in the rats' heart, as well as association of IRS-1 with p85 subunit of PI3K. Immunohistochemical analysis was used for localization and expression of eNOS and iNOS proteins in heart. qRT-PCR was used to determine the level of mRNA of eNOS and iNOS in rats' heart. Results were analyzed using Student's t test.

The results presented in this doctoral dissertation show that estradiol treatment in controls increased the level of the p85 subunit of PI3K and phosphorylation of Akt on Thr³⁰⁸ while reducing the expression of the iNOS gene. Also, estradiol reduces the AT1R expression and the level of RhoA protein in control rats. Estradiol regulates the transport of glucose to the heart by increasing the GLUT4 level on the plasma membranes of cardiomyocytes.

Estradiol in obese rats decreases the phosphorylation of IRS-1 on Ser³⁰⁷ while increasing the association of IRS-1 with the p85 subunit of PI3K, as well as levels of p85, p110, and Akt proteins. Estradiol increased the expression of the eNOS gene and decreased the expression of iNOS gene. Estradiol in obese animals decreased the AT1R and AT2R levels, as well as RhoA protein level. Also, a decrease of the CD36 and increase of GLUT4 on the plasma membranes of cardiomyocyte was noticed in obese rats after estradiol treatment.

Based on the findings of this doctoral dissertation, we can conclude that estradiol is involved in regulation of eNOS and iNOS expression in the heart of obese rats via IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway. Positive effects of estradiol in the pathology of obesity are also reflected in the reduction of lipids accumulated in the heart. The research findings included in this doctoral dissertation contributed to better overview of molecular mechanisms of estradiol regulation of eNOS and iNOS expression as well as the metabolism of energetic substrates in the hearts of control and obese rats. The results of this doctoral dissertation represent a significant contribution to better understanding of the mechanisms that underlie the pathology of obesity.

Key Words: estradiol, heart, eNOS, iNOS, metabolic substrates

Scientific Group: Biology

Specific Area within a Group: Molecular Endocrinology

UDK number: 577.175.6:[611.12:[616-055.1+616-056.25]](043.3)

SPISAK SKRAĆENICA

A.J.	arbitrarna jedinica (<i>engl. arbitrary unit</i>)
ACE	angiotenzin konvertujući enzim
acil CoA	acil koenzim A
AF-1	aktivator funkcije 1 koji ne zavisi od liganda
AF-2	aktivator funkcije 2 koji zavisi od liganda
Akt	protein kinaza B (<i>engl. protein kinase B</i>)
ALP	alkalna fosfataza (<i>engl. Alkaline Phosphatase</i>)
AMPK	adenozin monofosfat aktivirana protein kinaza
Ang II	Angiotenzin II
AP-1	protein aktivator-1 (<i>engl. Activator Protein-1</i>)
AT1R	receptor za angiotenzin II tipa 1
AT2R	receptor za angiotenzin II tipa 2
BCIP/NBT	reagens (<i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i>)
BH ₄	tetrahidrobiopterin (<i>engl. tetrahydrobiopterin</i>)
BSA	albumin goveđeg seruma (<i>engl. Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	jon kalcijuma
[Ca ²⁺] _i	unutarćelijska koncentracija Ca ²⁺
CaM	kalmodulin
cAMP	ciklični adenzin monofosfat (<i>engl. Cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGC	ciklična guanil ciklaza
cGMP	ciklični guanozin monofosfat (<i>engl. cyclic guanosine monophosphate</i>)
Ct	pražni ciklus (<i>engl. threshold cycle</i>)
DAG	diacilglicerol
DBD	DNK-vezujući domen (<i>engl. DNA binding domain</i>)
DDC	dietilditiokarbamat (<i>engl. Diethyl-dithiocarbamate</i>)

DMT2	dijabetes melitus tipa 2 (<i>engl. Diabetes Mellitus Type II</i>)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DS	Dahl pacovi (<i>engl. Dahl salt-sensitive</i>)
ECL	pojačana hemiluminiscencija (<i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDRF	faktor koji „relaksira“ krvni sud poreklom iz endotela (<i>engl. Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina
EGF	epidermalni faktor rasta (<i>engl. epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor EGF (EGFR, <i>engl. EGF receptors</i>)
eNOS	endotelna NOS (<i>engl. endothelial NOS</i>)
ER	receptor za estrogene
ERE	elementi odgovora za estrogene (<i>engl. Estrogen Responsive Elements</i>)
ER α	ER alfa
ER β	ER beta
ERK 1/2	kinaza regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2
FAD	flavin adenin dinukleotid
FAT/CD36	translokaza masnih kiselina (<i>engl. fatty acid translocase</i>)
FMN	flavin mononukleotid
GRB2	<i>engl. growth factor receptor-bound protein 2</i>
GLUT	familija transportera za glukozu (<i>engl. Glucose Transporters</i>)
GLUT1	GLUT tipa 1 (<i>engl. GLUT Type 1</i>)
GLUT4	GLUT tipa 4 (<i>engl. GLUT Type 4</i>)
GPER	receptor za estrogen spregnut sa proteinom G (<i>engl. G-Protein coupled Estrogen Receptor</i>)
HDL	lipoprotein velike gustine (<i>engl. High-Density Lipoprotein</i>)
hem	gvožđe protoporfirin IX
HOMA-IR	indeks rezistencije na insulin
HRP	peroksidaza rena (<i>engl. Horse Radish Peroxidase</i>)

IGF-1R	receptor za faktor rasta sličan insulinu 1
IKK	kinaza inhibitor NFκB
iNOS	inducibilna NOS (<i>engl. inducible NOS</i>)
InsR	receptor za insulin
IP3	inozitol-1,4,5-trisfosfat
IR	rezistencija na insulin (<i>engl. Insulin Resistance</i>)
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
IRS-1	supstrat receptora za insulin 1 (<i>engl. Insulin Receptor Substrate 1</i>)
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
K ⁺	jon kalijuma
KVB	kardiovaskularne bolesti
KVS	kardiovaskularni sistem
L-Arg	L-Arginin
LBD	domen za koji se vezuju ligandi (<i>engl. ligand-binding domain</i>)
LDL	lipoprotein male gustine (<i>engl. Low-Density Lipoprotein</i>)
LDM	mikrozomi male gustine (<i>engl. low-density microsome</i>)
MAPK	mitogenom-aktivirane protein kinase
MLC	laki lanac miozina (<i>engl. myosin light chain</i>)
MLCK	kinaza lakog lanca miozina (<i>engl. myosin light chain kinase</i>)
mtNOS	mitohondrijska NOS (<i>engl. mitochondrial NOS</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF-κB	nuklearni faktor-κB (<i>engl. Nuclear Factor-κB</i>)
nNOS	neuronalna NOS (<i>engl. neuronal NOS</i>)
NO	azot-monoksid (<i>engl. Nitric Oxide</i>)
NO ₂ ⁻	nitriti
NO ₃ ⁻	nitрати
NOS	azot-monoksid-sintaza (<i>engl. Nitric Oxide Synthase</i>)
O ₂ ⁻	superoksid anjon

PDGF	trombocitni faktora rasta (<i>engl. platelet-derived growth factor</i>)
PDK1	fosfoinozitud-zavisna protein kinaza 1 (<i>engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1</i>)
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza (<i>engl. phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PIP2	fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfat (<i>engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate</i>).
PIP3	fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat (<i>engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate</i>)
PKA	protein kinaza A (<i>engl. protein kinase A</i>)
PKC	protein kinaza C
PKG	protein kinaza G
PLA2	fosfolipaza A2
PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
PVDF	poliviniliden fluorid membrana (<i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i>)
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (<i>engl. Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>)
RAS	renin-angiotenzin sistem
Ras	mali GTP vezujući protein
Raf	Ser/Thr protein kinaza
RhoA	mali GTP vezujući protein (<i>engl. Ras homolog gene family, member A</i>)
ROCK	RhoA-asocirana protein kinaza (<i>engl. Rho-associated protein kinase</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (<i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS (<i>engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Ser	serin
SMK	slobodne masne kiseline (<i>engl. free fatty acid</i>)
Shc	protein koji sadrži domen 2 homolog Src
SOS	<i>engl. son of sevenless</i>
Sp-1	stimulišući protein 1 (<i>engl. Stimulating protein-1</i>)

TA	trans-aktivacioni domen (<i>engl. trans-activation domain</i>)
TC	ukupni holesterol (<i>engl. total cholesterol</i>)
Tg	trigliceridi (<i>engl. Triglycerides</i>)
Thr	treonin
Tyr	tirozin

Sadržaj:

1.	Uvod	1
1.1.	Estradiol–opšte osobine i funkcija estradiola u srcu	2
1.1.1.	Fiziološki efekti estradiola u srcu.....	3
1.1.2.	Receptori za estrogene	5
1.1.3.	Molekulski mehanizam delovanja estradiola.....	7
1.1.3.1.	<i>Genomski efekti delovanja estradiola</i>	7
1.1.3.2.	<i>Negenomski efekti delovanja estradiola</i>	9
1.1.3.3.	<i>Uloga IRS-1, PI3K, Akt i RhoA u molekulskim mehanizmima delovanja estradiola</i>	12
1.2.	Efekti estradiola u patofiziološkim stanjima	14
1.2.1.	Efekti estradiola u gojaznosti.....	15
1.2.2.	Estradiol i rezistencija na insulin	16
1.2.3.	Estradiol i renin-angiotenzin sistem	19
1.3.	Azot-monoksid i azot-monoksid sintaze	23
1.3.1.	Azot-monoksid: otkriće i uloga	23
1.3.1.1.	<i>Mehanizam delovanja azot-monoksida</i>	23
1.3.2.	Azot-monoksid sintaze.....	25
1.3.2.1.	<i>Endotelna azot-monoksid sintaza</i>	28
1.3.2.2.	<i>Inducibilna azot-monoksid sintaza</i>	31
2.	Ciljevi rada	33
3.	Materijal i metode	34
3.1.	Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta	34
3.2.	Izolovanje plazme iz krvi pacova.....	36
3.3.	Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva srca pacova.....	37
3.4.	Izolovanje proteina plazma membrane i mikrozoma male gustine iz tkiva srca pacova.....	37
3.5.	Određivanje koncentracije proteina.....	38
3.6.	Određivanje koncentracije nitrita i nitrata kao krajnjih produkata azot-monoksida u plazmi i lizatu srca pacova	39
3.7.	Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u lizatu srca pacova	41
3.8.	Određivanje koncentracije L-arginina u lizatu srca pacova	42
3.9.	Određivanje relativne ekspresije gena za eNOS i iNOS	43

3.9.1.	Izolacija ukupne RNK iz srca pacova	43
3.9.2.	Reverzna transkripcija	44
3.9.3.	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu eNOS i iNOS	44
3.10.	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	46
3.10.1.	Imunoprecipitacija.....	47
3.10.2.	Ko-imunoprecipitacija	48
3.11.	Western blot	49
3.12.	Imunohistohemijska analiza eNOS i iNOS.....	52
3.13.	Statistička obrada prikazanih rezultata.....	53
4.	Rezultati	54
4.1.	Efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih pacova	56
4.1.1.	Efekti estradiola na koncentraciju L-Arg u lizatu i $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca normalno uhranjenih pacova	56
4.1.2.	Uticaj estradiola na ekspresiju gena za eNOS u srcu normalno uhranjenih pacova.....	57
4.1.3.	Efekti estradiola na ekspresiju gena za iNOS u srcu normalno uhranjenih pacova.....	59
4.1.4.	Imunohistohemijska detekcija eNOS i iNOS proteina u srcu kontrolnih i estradiolom tretiranih normalno uhranjenih pacova	59
4.1.5.	Nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NF-kB u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom.....	61
4.1.6.	Efekti estradiola na nivo proteina IRS-1, PI3K i Akt u srcu normalno uhranjenih pacova	62
4.1.7.	Nivo RhoA proteina u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom.....	65
4.1.8.	Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu normalno uhranjenih pacova...	66
4.1.9.	Efekat estradiola na koncentraciju SMK i nivo CD36 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova	68
4.1.10.	<i>In vivo</i> efekat estradiola na nivo GLUT1 i GLUT4 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova	69
4.2.	<i>In vivo</i> efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu gojaznih pacova	71

4.2.1.	Efekat estradiola na koncentraciju L-Arg u lizatu i $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca gojaznih pacova	71
4.2.2.	Efekat estradiola na ekspresiju gena za eNOS u srcu gojaznih pacova.....	72
4.2.3	Ekspresija gena za iNOS u srcu gojaznih pacova tretiranih estradiolom	74
4.2.4.	Uticaj tretmana estradiolom na imunohistohemijsku detekciju eNOS i iNOS proteina u srcu gojaznih pacova.....	75
4.2.5.	Efekat tretmana estradiolom na nivo p65 subjediniice transkripcionog faktora NF-kB u srcu gojaznih pacova.....	77
4.2.6.	Efekti estradiola na nivo proteina IRS-1, PI3K i Akt u srcu gojaznih pacova..	78
4.2.7.	Nivo RhoA proteina u srcu gojaznih pacova tretiranih estradiolom.....	82
4.2.8.	Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu gojaznih pacova	82
4.2.9.	Efekat estradiola na koncentraciju SMK i nivo CD36 proteina u srcu gojaznih pacova	84
4.2.10.	<i>In vivo</i> efekti estradiola na nivo GLUT1 i GLUT4 proteina u srcu gojaznih pacova.....	86
5.	Diskusija	88
5.1.	<i>In vivo</i> efekat estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.....	90
5.2.	<i>In vivo</i> efekat estradiola na ulogu signalnih molekula IRS-1, PI3K i Akt u regulaciji eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova	100
5.3.	Interakcija estradiola i angiotenzina II, kao i uloga RhoA, u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova	104
5.4.	<i>In vivo</i> efekat estradiola na ćelijsku lokalizaciju transportera za slobodne masne kiseline i glukozu u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova	107
6.	Zaključci	116
7.	Literatura	118

1. Uvod

Hormon estradiol je važan regulatorni faktor širokog spektra fizioloških procesa (Nelson i Bulun, 2001; Lee i sar., 2012; Cui i sar., 2013). Osim uticaja na reprodukciju i razvoj, estradiol je uključen i u metaboličke procese u mnogim organima (Nelson i Bulun, 2001; Cui i sar., 2013). Estradiol ostvaruje pozitivan efekat na kardiovaskularni sistem (KVS), sprečavanjem nastanka ateroskleroze i endotelne ili vaskularne disfunkcije, a takođe deluje i direktno na srce, smanjujući njegovu hipertrofiju (Pinto i sar., 1997; Donaldson i sar., 2009). Estradiol svoje efekte ostvaruje genomskim i negenomskim mehanizmima, posredstvom specifičnih receptora za estrogene (ER, *engl. Estrogen Receptor*).

Molekulski mehanizmi kojima estradiol ostvaruje svoje pozitivne efekte u KVS uključeni su i u regulaciju azot-monoksid-sintaza (NOS), endotelne (eNOS) i inducibilne (iNOS) forme, koje su odgovorne za sintezu azot monoksida (NO) (Nuedling i sar., 1999; Ricchiuti i sar., 2009).

Osim direktnog efekta na srce, estradiol i posredno reguliše funkciju srca, delujući na metabolizam i transport glukoze i slobodnih masnih kiselina (SMK) (Luiken i sar., 2004), glavnih energetske supstrata srca u fiziološkim uslovima (Luiken i sar., 2004). Transport SMK i glukoze u ćelije srca zavisano je od translokaze masnih kiselina (FAT/CD36, *engl. fatty acid translocase*) i transportera za glukozu, tipa 1 (GLUT1) i 4 (GLUT4) (Santalucia i sar., 1992; Luiken i sar., 2004).

Estradiol deluje i na renin-angiotenzin sistem (RAS), koji ima važnu ulogu u kardiovaskularnoj fiziologiji, regulaciji vaskularnog tonusa i krvnog pritiska (Hoeg i sar., 1977). Glavna komponenta RAS je Angiotenzin II (Ang II),

koji svoje efekte ostvaruje posredstvom dva tipa receptora: receptora za Ang II tipa 1 (AT1R) i receptora za Ang II tipa 2 (AT2R) (Oelkers, 1996; Silva-Antonialli i sar., 2004).

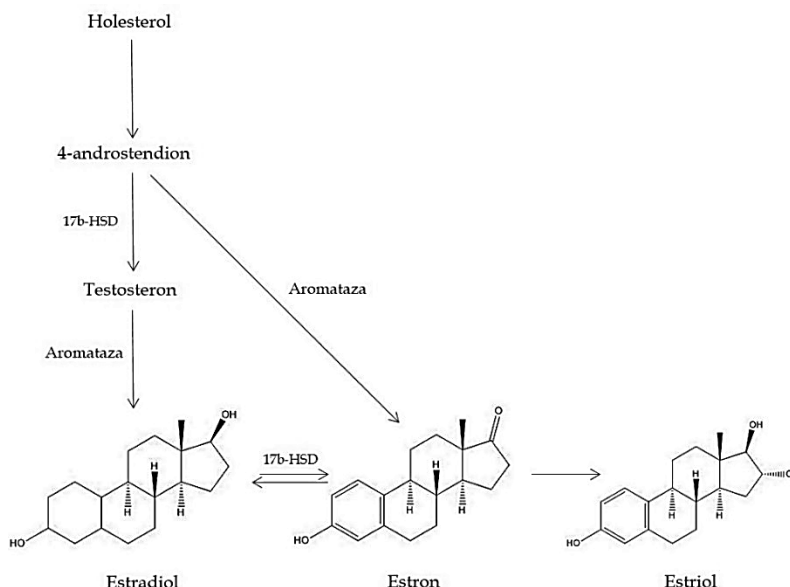
Razumevanje molekulskih mehanizama uključenih u razvoj gojaznosti i kardiovaskularnih bolesti (KVB), kao i efekata koje estradiol ima na molekulske mehanizme u KVS u stanjima gojaznosti je od izuzetne važnosti za razvoj novih strategija u lečenju gojaznosti i KVB.

1.1. Estradiol–opšte osobine i funkcija estradiola u srcu

Estrogeni su dominantni polni hormoni koji kod žena utiču na razvoj i funkciju reproduktivnog sistema (Ryan, 1982; Lee i sar., 2012; Lizcano i Guzman, 2014). Tri prirodno sintetisana estrogena kod žena su: estron, estradiol i estriol (Ryan, 1982; Lizcano i Guzman, 2014). Tokom trudnoće u organizmu žena je detektovan i četvrti tip estrogena, estetrol, koji se sintetiše u jetri fetusa (Holinka i sar., 2008). Estradiol predstavlja dominantnu formu estrogena kod žena tokom reproduktivnog perioda, dok se nakon menopauze ravnoteža među estrogenima menja u korist estrona (Barros i sar., 2006). Estradiol ima važnu fiziološku ulogu i kod muškaraca (Sudhir i Komesaroff, 1999).

Estrogeni pripadaju grupi steroidnih hormona koji se sintetišu prvenstveno u ovarijumima i placenti kod žena, dok se kod muškaraca proizvode u značajnim količinama u tkivu testisa, nadbubrežnih žlezda i mozgu (Tanabe i sar., 1983; Sudhir i Komesaroff, 1999; Lee i sar., 2012). Prekursor za sintezu estrogena je holesterol. Glavni put sinteze estradiola uključuje stvaranje 4-androstendiona, koji se delovanjem aromataze (CYP19A1, član citohrom P450 familije) pretvara u estron, a zatim delovanjem 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze u estradiol. Alternativni put sinteze estradiola uključuje nastanak testosterona iz 4-androstendiona, koji se zatim aromatizacijom prevodi u estradiol (**Slika 1.**). Poslednji korak u sintezi

estrogena iz androgena katalizuje aromataza (Simpson i sar., 2005). Prisustvo aromataze potvrđeno je u svim ćelijama osetljivim na dejstvo estrogena, uključujući srce i krvne sudove (Harada i sar., 1999).



Slika 1. Sinteza estrogena

17β-HSD-17β-hidroksisteroid dehidrogenaze. Preuzeto i modifikovano iz Monteiro i saradnici, 2014 (Monteiro i sar., 2014)

1.1.1. Fiziološki efekti estradiola u srcu

Estradiol u fiziološkim koncentracijama izaziva mnogobrojne pozitivne efekte na KVS i srce (Masood i sar., 2010). Svoje efekte estradiol ostvaruje regulacijom ekspresije i aktivnosti mnogih proteina, uključujući i NOS (Kauser i sar., 1998; Qiao i sar., 2008). Mnogobrojne studije su pokazale povoljan efekat koji estradiol ostvaruje posredstvom RAS (Higashi i sar., 1995; Ohashi i sar., 1998), dovodeći do širenja krvnih sudova i snižavanja krvnog protiska (Qiao i sar., 2008), ali i utičući i na metabolizam energetskih supstrata u srcu, u stanjima gojaznosti i rezistencije na insulin (IR) (Jensen i sar., 1994). U fiziološkim uslovima, estradiol reguliše funkciju jonskih kanala u srcu smanjujući ekspresiju kalcijumovih (Ca^{2+}) kanala L-tipa i povećavajući

ekspresiju membranskog proteina zaduženog za regulaciju homeostaze natrijuma (Na^+) i Ca^{2+} ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivač) (Vafiadaki i sar., 2009), a davan *in vivo* u patofiziološkim uslovima povećava aktivnost i ekspresiju Na^+/K^+ -ATPaze u srcu (Dzurba i sar., 1997; Obradovic i sar., 2014).

Postojanje razlika u učestalosti razvoja KVB kod muškaraca i žena pre menopauze, ukazuje na pozitivne efekte koje estradiol ostvaruje u srcu (Vina i sar., 2006). Takođe, pokazana je razlika u učestalosti razvoja KVB između žena pre i nakon menopauze (Mendelsohn, 2002). Studije su pokazale da žene pre menopauze imaju manje učestalu pojavu hipertrofije leve komore srca u poređenju sa muškarcima istih godina (Kim i Levin, 2006), kao i da tretman estradiolom žena nakon menopauze dovodi do smanjenja hipertrofije leve komore srca (Modena i sar., 1999). Krvni pritisak žena pre menopauze je značajno niži u poređenju sa krvnim pritiskom muškaraca istih godina, dok se vrednosti krvnog pritiska nakon menopauze izjednačavaju sa vrednostima krvnog pritiska izmerenim kod muškaraca (Yang i Reckelhoff, 2011). Istraživanja su pokazala da endogena proizvodnja estradiola kod muškaraca ima pozitivan efekat na KVS (Lew i sar., 2003), što otvara mogućnost primene estrogenske terapije kod muškaraca u cilju smanjenja incidence KVB. Kako je za proizvodnju estradiola kod zdravih muškaraca zadužen enzim aromataza, njegova inhibicija snižava nivo estradiola u plazmi i povezana je sa smanjenom dilatacijom brahijalne arterije (Lew i sar., 2003). Slična zapažanja su zabeležena i kod mužjaka miševa kod kojih je odstranjen (*engl. knockout*) gen za aromatazu, gde je pokazana smanjena funkcija endotela, koja se ogleda u smanjenom odgovoru endotela na dejstvo acetilholina i smanjenoj proizvodnji vazodilatatora, posebno NO (Kimura i sar., 2003).

Pored direktnog efekta koji estradiol ostvaruje na srce, pokazano je da i indirektnim putem utiče na KVS, promenama u koncentraciji lipida u serumu, odnosno povećanjem koncentracije lipoproteina velike gustine (HDL; *engl. High-Density Lipoprotein*) i apoproteina A i snižavanjem nivoa lipoproteina male gustine (LDL; *engl. Low-Density Lipoprotein*), apoproteina B i lipoproteina (a),

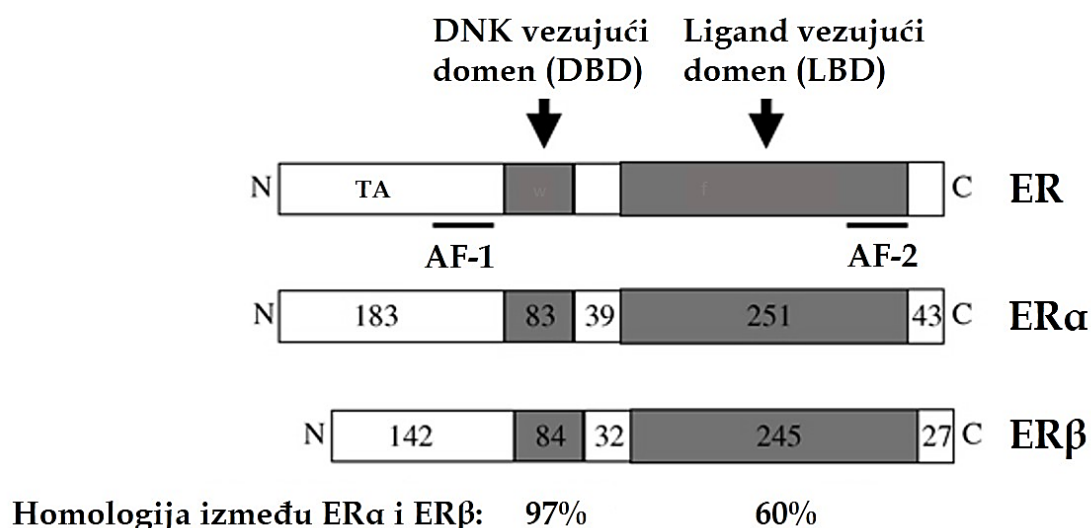
kao i smanjenjem oksidativnog stresa i proliferacije glatkih mišića vaskulature (Tolbert i Oparil, 2001; Luconi i sar., 2002).

1.1.2. Receptori za estrogene

Estradiol ostvaruje svoje efekte vezivanjem za specifične membranske ili unutarćelijske receptore (Handgraaf i sar., 2013). Istraživanja Jensena i Jacobsona (Jensen i Jacobson, 1960), kao i Tofta i Gorskog (Toft i Gorski, 1966) 60-tih godina prošlog veka su pokazala postojanje izoforme ER koju su nazvali alfa (ER α). Trideset godina kasnije Kuiper i saradnici (1996) su pokazali prisustvo još jedne izoforme, ER beta (ER β). Obe izoforme ER, α i β , eksprimirane su u srcu i pripadaju superfamiliji nuklearnih steroidnih receptora (Kim i Levin, 2006; Ling i sar., 2006). Pored ove dve izoforme ER, poslednjih godina otkriven je i treći tip receptora za estrogene, membranski receptor za estrogen spregnut sa proteinom G (GPER, *engl. G-Protein coupled Estrogen Receptor*) (Horard i Vanacker, 2003; Murphy, 2011; Nilsson i sar., 2011).

Svi članovi superfamilije nuklearnih receptora imaju tri nezavisna funkcijska domena koji međusobno interaguju (**Slika 2.**): centralni, DNK-vezujući, domen (DBD, *engl. DNA binding domain*) okružen N-terminalnim, trans-aktivacionim domenom (TA, *engl. trans-activation*) i C-terminalnim ligand vezujućim domenom (LBD, *engl. ligand-binding domain*) za koji se vezuju ligandi (Farooq, 2015). N-terminalni domen sadrži aktivator funkciju 1 (AF-1; *engl. Activator Function-1*) koja ne zavisi od vezivanja liganda. Najbolje je okarakterisan DBD, koji sadrži cinkane prste (*engl. zinc-finger*), strukturu koja ima ulogu u dimerizaciji receptora i vezivanju za specifične sekvence na DNK i LBD, koji prepoznaje i vezuje ligand, a takođe ima i ulogu u dimerizaciji receptora, kao i interakciji sa kofaktorima i transkripcionim faktorima uz učešće aktivator funkcije 2 (AF-2; *engl. Activator Function-2*) za čiju aktivaciju je neophodno vezivanje liganda (Hewitt i Korach, 2002). ER α i ER β mogu biti

lokalizovani u citoplazmi, jedru i na plazma membrani. Kada su lokalizovani u jedru posreduju u genomskim efektima estradiola, a manji broj ovih receptora, koji se nalazi na plazma membrani, posreduje u negenomskim efektima delovanja estradiola. Receptori koji se nalaze u citoplazmi mogu učestvovati i u genomskim i u negenomskim efektima estradiola.



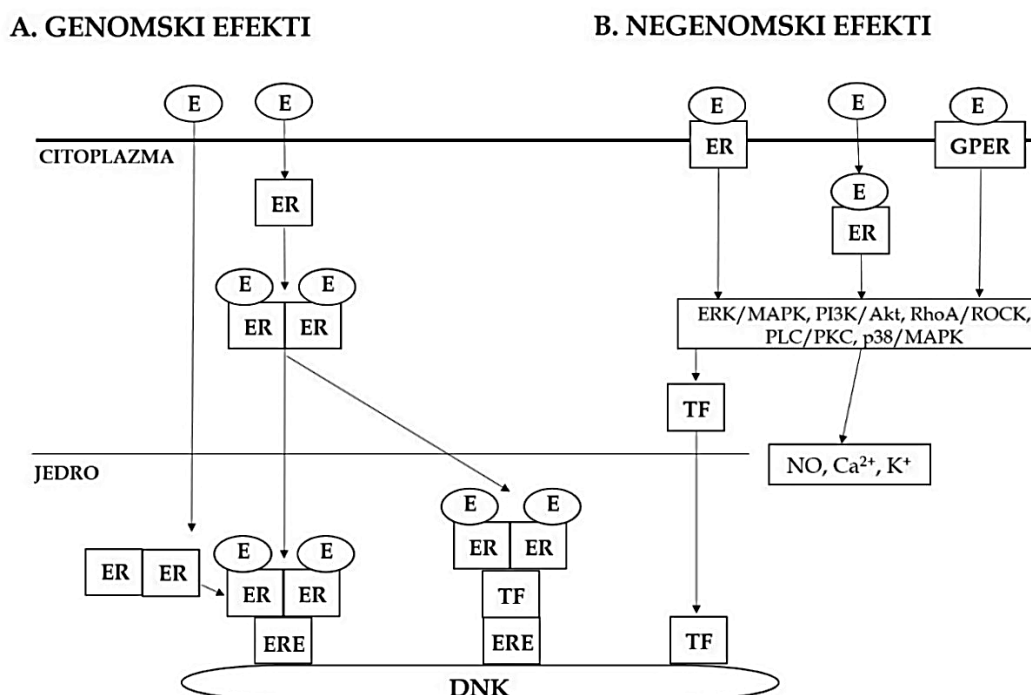
Slika 2. Shematski prikaz primarne proteinske strukture receptora za estrogene i homologija između ER α i ER β

ER-receptor za estrogene; N-N-terminalni domen; TA-trans-aktivacioni domen; DBD-DNK-vezujući domen; LBD-domen za koji se vezuju ligandi; AF- aktivator funkcije; C-C-terminalni domen. Preuzeto i modifikovano iz Hewitt i Korach, 2002 (Hewitt i Korach, 2002).

Treći tip receptora za estrogene su GPER koji su eksprimirani u plazma membrani i imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta (proliferacija i apoptoza) (Mendez-Luna i sar., 2015). GPER pripadaju familiji transmembranskih receptora, sa sedam transmembranskih domena. Kada je otkriven i identifikovan, GPER je svrstan u familiju receptora siročića (*engl. orphan receptor family*). Filardo i saradnici (2000) su 2000. godine prvi put identifikovali estradiol kao ligand koji se vezuje za ovaj receptor i nazvali ga GPR30. Aktivacija GPER ima ulogu u negenomskim efektima estradiola, kao i druga dva ER kada su lokalizovani na plazma membrani (Murphy, 2011).

1.1.3. Molekulski mehanizam delovanja estradiola

Efekti estradiola u KVS posredovani su kompleksnim genomskim i negenomskim delovanjem (**Slika 3.**) (Paech i sar., 1997; Simoncini i sar., 2004; Marino i sar., 2006; Monteiro i sar., 2014).



Slika 3. Genomski (A) i negenomski (B) mehanizam delovanja estradiola
E-estradiol; ER-receptor za estrogene; ERE-elementi odgovora za estrogene; TF-transkripcioni faktor; GPER-receptor za estrogene spregnut sa proteinom G; NO-azot monoksid; Ca²⁺-jon kalcijuma; K⁺-jon kalijuma. Preuzeto i modifikovano iz Monteiro i saradnici, 2014 (Monteiro i sar., 2014).

1.1.3.1. Genomski efekti delovanja estradiola

Vezivanjem estradiola za ER, lokalizovane u citoplazmi i jedru, aktivira se genomski signalni put (**Slika 3. A**). Genomski efekti estradiola na KVS deluju odloženo, u intervalu od nekoliko sati. Estradiol se nakon ulaska u ćeliju vezuje za AF-2 domene u okviru LBD na ER koji se nalazi u citoplazmi, nakon čega

receptor podleže konformacionim promenama, dimerizuje i translocira se u jedro, gde utiče na ekspresiju gena (Ling i sar., 2006). Takođe, estradiol može da utiče na regulaciju ekspresije gena i vezivanjem za ER lokalizovane u jedru. ER α i ER β mogu da formiraju kako homo, tako i hetero dimere, u cilju stimulacije transkripcije gena (Cowley i sar., 1997; Babiker i sar., 2002). Konformacione promene kojima ER podležu omogućavaju im direktnu interakciju sa elementima odgovora za estrogene (ERE; *engl. Estrogen Responsive Elements*) na molekulu DNK i na taj način vrše aktivaciju ili inhibiciju transkripcije ciljnih gena (Hewitt i Korach, 2002; Handgraaf i sar., 2013; Lizcano i Guzman, 2014). Pored direktne interakcije sa ERE sekvencama na DNK, ER može i indirektno da se veže za DNK, preko drugih transkripcionih faktora, koji su lokalizovani u jedru, kao što su protein stimulator-1 (Sp-1; *engl. Stimulating protein-1*) i protein aktivator-1 (AP-1; *engl. Activator Protein-1*) protein-protein interakcijama (Jakacka i sar., 2001). Estradiol genomskim mehanizmom delovanja u KVS utiče na smanjenje proliferacije glatkih mišićnih ćelija endotela, smanjuje apoptozu i stimuliše rast endotelnih ćelija (Tabela 1). Stimulacija rasta endotelnih ćelija nastaje kao posledica povećane ekspresije faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF, *engl. vascular endothelial growth factor*). Osim toga, genomski efekti estradiola uključuju povećanje ekspresije gena za prostaciklin sintazu i eNOS, kao i inhibiciju trombocitnog faktora rasta (PDGF, *engl. platelet-derived growth factor*) (Mendelsohn, 2002; Tostes i sar., 2003).

Tabela 1. Neki od genomskih i negenomskih efekata estradiola u KVS

EFEKTI ESTRADIOLA	
GENOMSKI	NEGENOMSKI
↓ Proliferacija glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova	↑ Vazodilatacija
↑ Rast endotelnih ćelija	Otvaranje Ca ²⁺ -aktiviranih K ⁺ kanala
↓ Apoptoza endotelnih ćelija	↓ Agregacija trombocita

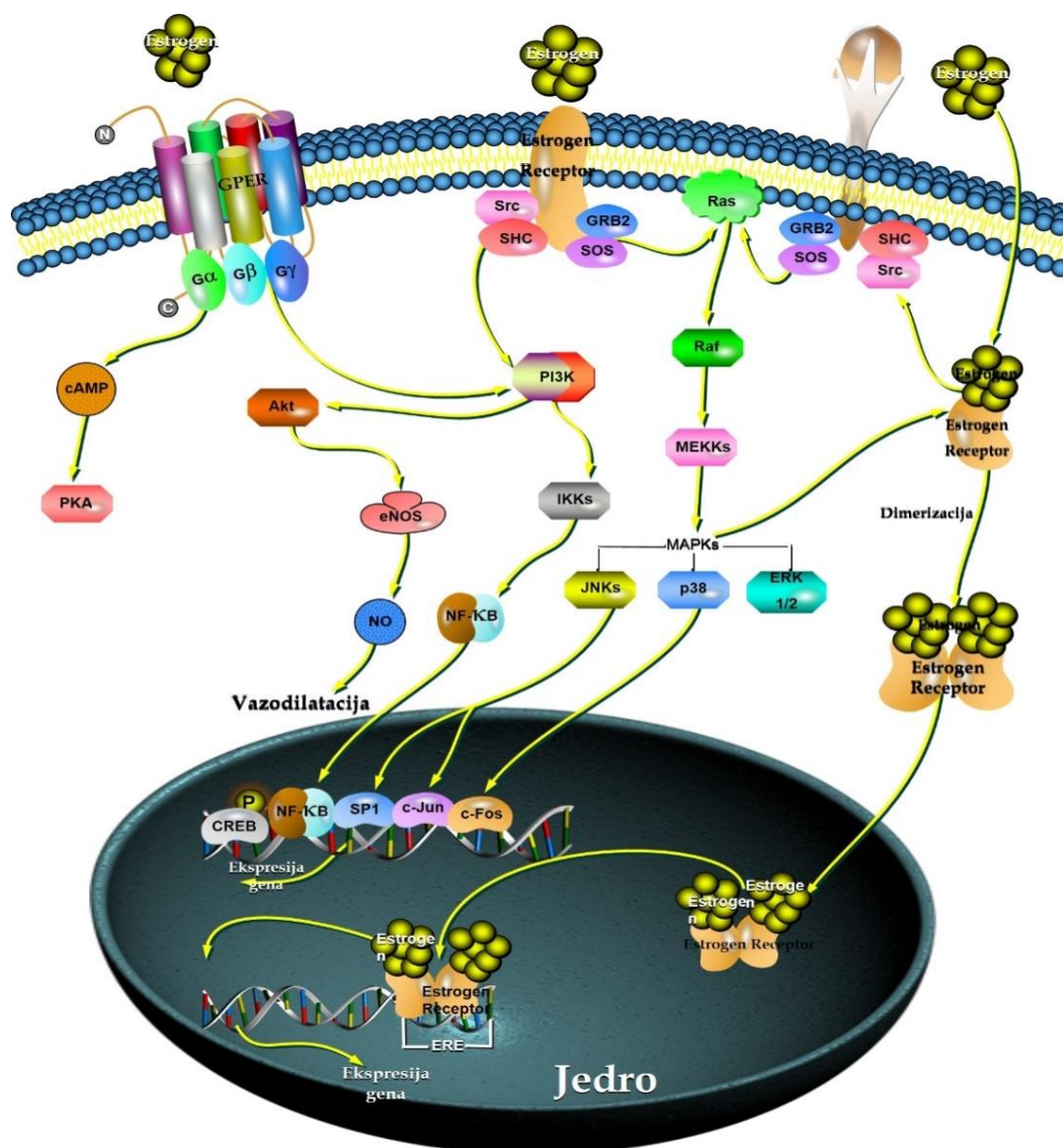
KVS-kardiovaskularni sistem; ↓-smanjenje; ↑-povećanje; Ca²⁺-jon kalcijuma; K⁺-jon kalijuma.

1.1.3.2. Negenomski efekti delovanja estradiola

Mnogobrojni fiziološki efekti estradiola se ostvaruju brzo, u intervalu od nekoliko sekundi do nekoliko minuta i ne mogu se pripisati genomskim efektima, stoga su oni rezultat negenomskog delovanja ovog hormona u organizmu.

Negenomske efekte estradiol može da ostvari vezujući se za receptore koji se nalaze na plazma membrani ili u citoplazmi, i tako aktivira brze signalne puteve. Na ovaj način estradiol aktivira kinaze koje posle mogu da fosforilišu nishodno lokalizovane transkripcione faktore i tako mogu da regulišu i transkripciju specifičnih gena (**Slika 3. B**) (Lorenzo, 2003). Negenomski mehanizam delovanja estradiola zavisi od interakcije kompleksa ER-estradiol sa drugim nesteroidnim ili steroidnim receptorima za hormone, koji se takođe nalaze na plazma membrani, uz učešće Src i proteina koji sadrži domen 2 homolog Src (Shc) (Pedram i sar., 2002; Ling i sar., 2006). Ova interakcija utiče na aktivaciju različitih signalnih molekula, kao što su: fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K), protein kinaza B (Akt), protein kinaza A (PKA *engl. protein kinase A*), protein kinaza C (PKC *engl. protein kinase C*), mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK), RhoA i mnoge druge (**Slika 4.**) (Marino i sar., 2006). Neki od signalnih puteva koji su aktivirani pri negenomskom delovanju estradiola mogu da indukuju brzo oslobađanje NO u endotelnim ćelijama (Caulin-Glaser i sar., 1997; Babiker i sar., 2002), kao i da regulišu homeostazu Ca^{2+} i kalijuma (K^+), kao i metabolizam energetskih supstrata (Aronica i sar., 1994; Babiker i sar., 2002).

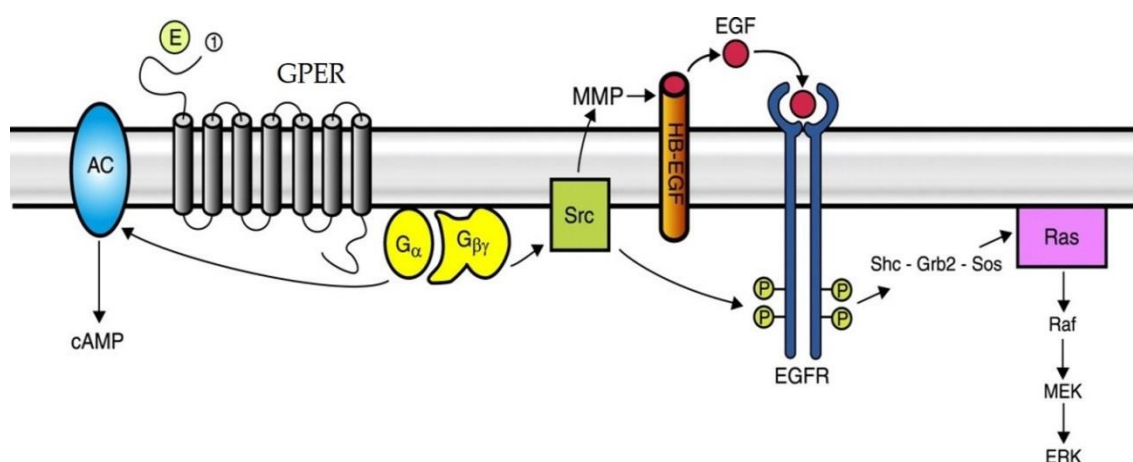
Estradiol posredstvom ER lokalizovanih u kaveolama utiče, negenomskim mehanizmom delovanja i na aktivaciju eNOS, pozitivno deluje na vazodilataciju i otvaranje Ca^{2+} -aktiviranih K kanala i sprečava agregaciju trombocita (**Tabela 1.**) (Chambliss i Shaul, 2002). ER α stupa u vezu sa kaveolom palmitoilacijom na aminokiselini cistein⁴⁴⁷ (Murphy, 2011).



Slika 4. Signalni molekuli uključeni u negenomski mehanizam delovanja estradiola

GPER-receptor za estrogen spregnut sa proteinom G; cAMP-ciklični adenozin mmonofosfat; PKA-protein kinaza A; Akt-protein kinaza B; PI3K-fosfatidil-inozitol-3-kinaza; eNOS-endotelna azot-monoksid-sintaza; NO-azot monoksid; Shc-protein koji sadrži domen 2 homolog Src; GRB2-engl. growth factor receptor-bound protein 2; SOS-engl. son of sevenless; Ras-mali GTP vezujući protein; Raf-Ser/Thr protein kinaza; MEK-MAPK kinaza; MAPK-mitogenom-aktivirane protein kinaze; JNK-c-Jun N-terminalne kinaze; ERK 1/2-kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2; NF-κB-nuklearni faktor-κB; IKK-kinaza inhibitor NF-κB; SP1-protein stimulator-1. Preuzeto i modifikovano sa <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=166>

Studije su pokazale da estradiol interaguje sa GPER na plazma membrani vaskularnih ćelija, i indukuje brzu unutarćelijsku signalizaciju preko cikličnog adenozin monofosfata (cAMP). Takođe, vezivanje estradiola za GPER rezultuje aktivacijom Src. Src zatim aktivira matriksne metaloproteinaze, koje zatim oslobađaju epidermalni faktor rasta (EGF, *engl. epidermal growth factor*) iz kompleksa sa heparinom. Oslobođeni EGF je ligand za EGF receptor (EGFR, *engl. epidermal growth factor receptors*) koji interaguje sa Shc, proteinom za ukvotljavanje (*engl. docking proteins*), i aktivira Ras/Raf/MEK/ERK signalnu kaskadu (**Slika 5.**) (Wierman, 2007). Estradiol delujući preko GPER može da aktivira i PKA i PI3K (Deschamps i sar., 2010; Yang i Reckelhoff, 2011).



Slika 5. Negenomski efekti delovanja estradiola preko receptora za estrogene spregnutim sa proteinom G (GPER)

E-estradiol; MMP-matriksna metaloproteinaza; EGF-epidermalni faktor rasta; EGFR-receptor EGF; HB-EGF-kompleks heparin-EGF; SOS-engl. son of sevenless; Shc-protein koji sadrži domen 2 homolog Src; Ras-mali GTP vezujući protein; Raf-Ser/Thr protein kinaza; Src-engl. Src homology domain 2; MEK-MAPK kinaza; ERK-kinaze regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2. Preuzeto i modifikovano iz Wierman, 2007 (Wierman, 2007).

1.1.3.3. Uloga IRS-1, PI3K, Akt i RhoA u molekulskim mehanizmima delovanja estradiola

Tačni molekularni mehanizmi delovanja estradiola, kao i receptori koji učestvuju u prenosu signala negenomskim putem u KVS nisu u potpunosti razjašnjeni (Walsh i sar., 1996; Xie i sar., 2003). Većina studija koja se bavila ispitivanjem direktne veze kompleksa estradiol-ER sa supstratom receptora za insulin 1 (IRS-1) rađena je na ćelijama kancera dojke. Pokazano je da sva tri tipa ER, kada su lokalizovani na plazma membrani, interaguju sa Shc i formiraju komplekse ER/Shc/receptor za faktor rasta sličan insulinu 1 (IGF-1R) ili ER/Shc/receptor za insulin (InsR). Takođe, ER koji su lokalizovani u citoplazmi mogu da interaguju sa Src koja zatim fosforiliše Shc i na taj način aktivira InsR ili IGF-1R. Fosforilacijom na specifičnim tirozinskim (Tyr) ostacima InsR i IGF-1R fosforilišu IRS-1 i omogućavaju mu da stupi u interakciju sa proteinima koji imaju SH2 domene (Richards i sar., 1996; Osborne i Schiff, 2005; Lanzino i sar., 2008). Ispitivanjem efekata estradiola u KVS pokazano je da postoji interakcija u signalnom putu estradiola i insulina nishodno od njihovih receptora (Grohé C. i sar., 1999; Koricanac i sar., 2011). Estradiol vezujući se za ER povećava ekspresiju i aktivnost IRS-1 (Isenovic i sar., 2003; Xie i sar., 2003). Formirani kompleks estradiol-ER fosforiliše IRS-1 i utiče na molekule PI3K/Akt signalnog puta, koji zatim regulišu metabolizam energetskih supstrata i proizvodnju NO u srcu.

IRS-1: IRS-1 protein karakteriše prisustvo konzerviranog domena homologog plekstrinu (PH; *engl. pleckstrin homology domain*) na N-terminalnom kraju koji služi za interakciju sa plazma membranom i nalazi se u blizini fosfotirozin vezujućeg mesta (PTB; *engl. phosphotyrosine-binding domain*). C-terminalni kraj sadrži brojna Tyr (aktivirajuća) i serin (Ser)/treonin (Thr) (inhibirajuća) mesta fosforilacije, važna za regulaciju funkcije IRS-1, koja nakon fosforilacije deluju kao "ON/OFF" prekidač koji aktivira nishodne signalne proteine, uključujući i PI3K (Copps i White, 2012; Guo, 2014). IRS-1 protein

sadrži oko dvadeset potencijalnih Tyr ostataka na kojima može biti fosforilisan (Guo, 2014). Fosforilacija IRS-1 na Tyr⁶⁰⁸ i Tyr⁶²⁸ ostacima generiše glavno mesto vezivanja proteina sa SH2 domenom, kao što je regulatorna subjedinica PI3K (Gual i sar., 2005). Guo i saradnici (Guo, 2014) su pokazali da supresija ekspresije gena za IRS-1 u jetri i srcu životinja sa IR dovodi do slabosti srca i smrti (Qi i sar., 2013; Guo, 2014).

PI3K: PI3K je lipidna kinaza, heterodimerni protein koga čine katalitička p110 i regulatorna p85 subjedinica. Regulatorna subjedinica p85 sadrži SH2 i SH3 domene koji se vezuju za fosforilisane Tyr ostatke IRS. Katalitička subjedinica PI3K p110, preko SH2 domena interaguje sa p85 i nakon aktivacije se translocira na plazma membranu ćelije (Datta i sar., 1996; McFarlane i sar., 2001). Aktivirana PI3K stvara fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat (PIP3; *engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) iz fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfata (PIP2; *engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*) fosforilacijom OH grupe na poziciji 3 u inozitolnom prstenu PIP2. PIP3 ima ulogu sekundarnog glasnika u aktivaciji fosfoinozimid-zavisne protein kinaze 1 (PDK1; *engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*) koja posreduje u aktivaciji Akt (Alessi i Cohen, 1998).

Akt (PKB): Akt je Ser/Thr kinaza koja ima bitnu ulogu u srcu regulišući rast, funkciju i metabolizam kardiomiocita. Sadrži dva domena, katalitički i PH domen. Katalitički domen ima visok stepen homologije sa članovima familije PKC i PKA. Preko PH domena Akt se vezuje za PIP2 ili PIP3, aktivira se privremenom translokacijom na membranu i na taj način omogućava da je PDK1 fosforiliše. Za potpunu aktivnost Akt neophodno je da bude fosforilisana na aminokiselinama Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸ (Alessi i Cohen, 1998; Manning i Cantley, 2007). Akt fosforiliše brojne nishodne proteine uključene u mnogobrojne biološke odgovore organizma, kao što je aktivacija eNOS, translokacija GLUT4 iz unutarćelijskih depoa na površinu plazma membrane, a reguliše i ekspresiju iNOS delujući na transkripcioni faktor NF-κB (*engl. Nuclear Factor-κB*) (Guo, 2014).

Aktivacija IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta ima važnu ulogu u srcu tako što reguliše funkciju i preživljavanje kardiomiocita, a ima i ulogu u regulaciji metabolizma energetskih supstrata (Huang i Kaley, 2004; Matsui i Rosenzweig, 2005).

Još jedan od molekula uključenih u molekulske mehanizme delovanja estradiola koji ima uticaj na IRS-1/PI3K/Akt signalni put je RhoA.

RhoA: RhoA pripada Rho subfamiliji malih GTP vezujućih proteina (Mackay i Hall, 1998). RhoA deluje na nishodne molekule kao što su RhoA-asocirane protein kinaze 1 i 2 (ROCK1/ROCK2). U kardiomiocitima su eksprimirani svi molekuli RhoA/ROCK signalne kaskade (Peters i Michel, 2007). RhoA/ROCK signalni put utiče na regulaciju proliferacije i kontrakcije glatkih mišićnih ćelija (Uehata i sar., 1997). Aktivacija molekula RhoA/ROCK signalnog puta zabeležena je u različitim kardiovaskularnim poremećajima, kao što su ateroskleroza i hipertenzija (Uehata i sar., 1997). Estradiol može da učestvuje u regulaciji aktivnosti RhoA delujući preko ER zavisnog mehanizma, tako što aktivira proteinske kinaze kao što je adenozin monofosfat-aktivirana protein kinaza (AMPK), koje zatim inhibiraju aktivnost RhoA (Oviedo i sar., 2011).

1.2. Efekti estradiola u patofiziološkim stanjima

Smanjenje koncentracije estradiola doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja koji mogu da dovedu do gojaznosti, IR kao i hipertenzije i drugih KVB.

Rezultati drugih autora (Murase i sar., 2012; Souza i sar., 2014) kao i objavljeni rezultati naše laboratorije (Obradovic i sar., 2013) pokazuju da tretman estradiolom kod gojaznih pacova utiče na morfologiju kardiomiocita i na smanjenje hipertrofije srca. Ishrana bogata mastima u trajanju od dve do tri nedelje dovodi do razvoja gojaznosti kod pacova (Oakes i sar., 1997; Lijnen,

2008), kao i do nastanka hiperglikemije i IR, i ovi pacovi predstavljaju validan eksperimentalni animalni model za izučavanje efekata estradiola u stanju gojaznosti združenim sa pojavom IR i hipertenzijom (Oakes i sar., 1997).

1.2.1. Efekti estradiola u gojaznosti

Gojaznost predstavlja hroničan metabolički poremećaj koji je usko povezan sa nastankom KVB (Poirier i sar., 2006), ali i hroničnom inflamacijom niskog stepena (Wang i Nakayama, 2010). Akumulacija visceralnog masnog tkiva predstavlja jedan od faktor rizika za razvoj metaboličkog sindroma, koga karakteriše skup metaboličkih poremećaja koji nastaju u organizmu (Lee i sar., 2009; Brown i sar., 2010). Nastanak metaboličkog sindroma karakterišu i drugi poremećaji kao što su IR, hiperglikemija, povišen krvni pritisak i dislipidemija (Basciano i sar., 2005). U stanjima gojaznosti, usled povećanja masti u organizmu, dolazi do povećanja mase srca (Alexander, 1985; Abel i sar., 2008) i do promena u vezivnom tkivu i krvnim sudovima, što sve zajedno dovodi do ishemijske kardiomiopatije (Abel i sar., 2008). Osim toga, gojaznost dovodi do hipertrofije leve komore srca, što predstavlja kompenzatorni mehanizam miokarda, usled povećanog opterećenja srca, a u cilju normalizacije pritiska u zidu leve komore. Ovaj kompenzatorni mehanizam međutim može dovesti i do iznenadne srčane smrti (Dzau i sar., 2001; Colić i Milutinović, 2005; Ouwens i sar., 2007). Tretman estradiolom dovodi i do poboljšanja vaskularne funkcije i smanjenja ateroskleroze kod gojaznih miševa (Cui i sar., 2013). Takođe, prethodni rezultati naše laboratorije su pokazali da tretman estradiolom kod gojaznih pacova utiče na smanjenje hipertrofije srca i koncentracije ukupnog holesterola (TC; *engl. total cholesterol*) indukovane ishranom bogatom mastima (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015).

Estradiol je uključen u kontrolu energetske ravnoteže, unosa hrane i distribucije masnog tkiva u organizmu (Brown i Clegg, 2010). Murase i

saradnici (2012) su pokazali da tretman estradiolom gojaznih ovarijektomisanih pacova dovodi do smanjenja količine unete hrane, mase tela i visceralne masti. Sa druge strane, estrogeni podstiču akumulaciju subkutanih masnih naslaga (Bouchard i sar., 1993; Brown i sar., 2010). Količina visceralnog masnog tkiva obrnuto je proporcionalna nivou estrogena (Bouchard i sar., 1993; Brown i sar., 2010). Tretman estradiolom dovodi do smanjenja viscelarnog masnog tkiva, nivoa glukoze i insulina kod žena u menopauzi (Munoz i sar., 2002; Lizcano i Guzman, 2014). Terapija estrogenima žena u menopauzi takođe ima uticaj i na smanjenje nivoa TC kao i LDL holesterola (Pickar i sar., 1998; Lizcano i Guzman, 2014).

Estradiol je uključen u regulaciju metabolizma i količine masti preko ER (Shin i sar., 2007; Ropero i sar., 2008). U Japanskoj studiji sa ženama pre menopause, pokazano je prisustvo povećane količine masti i indeksa visceralne gojaznosti kod žena sa polimorfizmom u genu za ER α (Okura i sar., 2003). Odsustvo ER α dovodi do hiperplazije i hipertrofije adipocita belog masnog tkiva, ali ne i mrkog masnog tkiva i praćeno je IR i intolerancijom na glukozu kod mužjaka i ženki miševa (Heine i sar., 2000; Cooke i sar., 2001; Ropero i sar., 2008). Tretman ovarijektomisanih pacova estradiolom utiče pozitivno na centralnu osetljivost na leptin, a samim tim i distribuciju masti u organizmu (Clegg i sar., 2006). Leptin je hormon poreklom iz adipocita belog masnog tkiva, koji ima ulogu u smanjenju unosa hrane i povećanju potrošnje energije. Povećanje sinteze leptina, kao posledica povećanja masnog tkiva, kod gojaznih ljudi dovodi do razvoja hiperleptinemije (Wauters i sar., 2000; Wabitsch i sar., 2001).

1.2.2. Estradiol i rezistencija na insulin

Rezistencija na insulin (IR) se definiše kao poremećen biološki odgovor na delovanje insulina (Sowers i sar., 1994; Hunter i Garvey, 1998; McFarlane i

sar., 2001). Početne stadijume razvoja IR karakteriše hiperinsulinemija (pojačano lučenje insulina) (Guo, 2014). U fiziološkim uslovima pankreas luči insulin u cilju održavanja optimalne koncentracije glukoze u krvi. U stanjima kada fiziološke koncentracije insulina ne mogu da obezbede preuzimanje glukoze od strane tkiva, i na taj način smanje koncentraciju glukoze u krvi, pankreas počinje dodatno da luči insulin pri čemu se nakon nekog vremena javlja hiperinsulinemija. Hiperinsulinemija se javlja pretežno kod gojaznih osoba, usled poremećenog signalnog puta insulina i manifestuje se smanjenjem insulinom stimulisanog transporta glukoze u ćelije (Reaven, 1995; Miller i sar., 2012).

Srcu je organ za čiji rad je konstantno neophodna energija (Guo, 2014). Kao izvor energije srce većinom koristi masne kiseline i glukozu, a u manjim količinama laktate i ketonska tela (Wentz i sar., 2010; Dirx i sar., 2011). U fiziološkim uslovima većina acetil koenzima A (CoA) koji ulazi u Krebsov ciklus nastaje oksidacijom masnih kiselina (Scolletta i Biagioli, 2010; Dirx i sar., 2011), dok manji deo nastaje oksidacijom piruvata, koji je produkt procesa glikolize (Scolletta i Biagioli, 2010; Dirx i sar., 2011). Promena u oksidaciji supstrata u korist masnih kiselina, a na štetu glukoze, dešava se u patološkim stanjima kao što su gojaznost i dijabetes melitus tip 2 (DMT2, *engl. Diabetes Mellitus Type II*) (Carley i Severson, 2005; Dirx i sar., 2011). Ova promena u metabolizmu energetske supstrate (masnih kiselina i glukoze) opisana je na animalnim modelima, kao i u humanim studijama i najčešće je posledica ishrane bogate mastima (Dirx i sar., 2011).

Promene u metabolizmu masnih kiselina vode do trajne translokacije molekula CD36 na plazma membranu kardiomiocita, kao i smanjenja insulin zavisnog preuzimanja glukoze, posredovanog glukoznim transporterom GLUT4 (Coort i sar., 2007; Dirx i sar., 2011). Redistribucija transportera masnih kiselina na površinu plazma membrane i povećanje iskorišćenosti SMK u srcu mogu biti direktno povezani sa sistemskim povećanjem nivoa SMK i triglicerida (Tg) koje je zabeleženo u stanjima gojaznosti (Abel i sar., 2012).

Estrogeni su prepoznati kao jedni od glavnih regulatora energetske ravnoteže i homeostaze glukoze. Smanjenje koncentracije estrogena, koje je karakteristično za žene u menopauzi, promovira razvoj visceralne gojaznosti i IR (Handgraaf i sar., 2013). Istraživanja pokazuju da insulin i estradiol koriste iste signalne puteve nishodno od svojih receptora, koji se nalaze na površini kardiomiocita, i na taj način estradiol može da utiče na povećanje ili smanjenje osetljivosti ćelija na dejstvo insulina (Marsden i sar., 1996; Alonso i sar., 2006). Pokazano je da estradiol može da stimuliše asocijaciju IRS-1 sa p85 (McFarlane i sar., 2001; Sykiotis i Papavassiliou, 2001; Liu i sar., 2004). Ova asocijacija i aktivacija PI3K je od ključnog značaja za prenos signala u ćelijama KVS (Zeng i Quon, 1996), kao i drugim ćelijama osetljivim na insulin (McFarlane i sar., 2001). Poremećaj u IRS-1/PI3K/Akt signalnom putu dovodi do rezistencije na dejstvo insulina (razvija se IR), što utiče na stimulaciju proizvodnje NO u vaskularnim tkivima (Zeng i Quon, 1996; Begum i sar., 1998), kao i na transport glukoze (McFarlane i sar., 2001).

Merenjem nivoa indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) kod žena pre i nakon menopauze uočeno je da se značajno povećava nivo HOMA-IR kod žena nakon menopauze. To ukazuje na razvoj IR, usled smanjenja nivoa endogenih estrogena (Matthews i sar., 1989; Matsui i sar., 2013). Takođe, nakon menopauze uočeno je povećanje centralne gojaznosti, IR i dislipidemije, što sve ukazuje na razvoj metaboličkog sindroma (Mauvais-Jarvis i sar., 2013; Gupte i sar., 2015). Tretman žena nakon menopauze estradiolom ublažava efekte menopauze, utičući na metabolizam glukoze i nivo insulina i smanjujući IR (Brussaard i sar., 1997; Roperio i sar., 2008).

Eksperimenti na životinjskim modelima su pokazali da je smanjenje nivoa estradiola, usled ovarijektomije, povezano sa povećanim rizikom za razvoj DMT2, i da tretman estradiolom poboljšava glukozom indukovanu sekreciju insulina, kako kod pacova tako i kod miševa (Suba, 2012). Istraživanja Gonsalesa i saradnika (2000) na ovarijektomisanim pacovima su pokazala da tretman estradiolom povećava osetljivost ćelija na dejstvo insulina. Takođe,

Gorres i saradnici (2011) su pokazali da trodnevni tretman ovarijektomisanih pacova estradiolom povećava transport glukoze, kao i nivo GLUT4 proteina u skeletnim mišićima. Miševi sa odstranjenim genom za GLUT4 pokazuju srčanu disfunkciju, što ukazuje da IR doprinosi razvoju kontraktilne disfunkcije (Domenighetti i sar., 2010). Kod miševa sa inaktiviranom aromatazom (ArKO), enzimom odgovornim za biosintezu estrogena, zabeležena je povećana količina masnog tkiva, visok nivo insulina i IR usled nedostatka estrogena. Tretman estradiolom kod ovih miševa poništava efekte nastale inaktivacijom gena za aromatazu (Jones i sar., 2000; Suba, 2012).

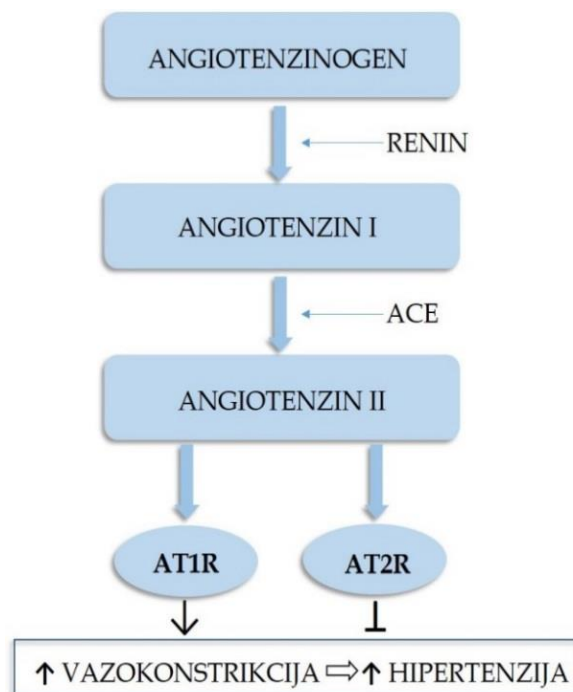
Takođe, naši prethodni rezultati pokazuju da tretman estradiolom kod gojaznih pacova sa IR utiče direktno na morfologiju ćelija srca, stimulišući aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i povećavajući kontraktilnost ćelija srca (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015).

1.2.3. Estradiol i renin-angiotenzin sistem

Renin-angiotenzin sistem (RAS) ima ulogu u regulaciji krvnog pritiska, kao i ravnoteže tečnosti i elektrolita u organizmu (Velloso i sar., 1996; Folli i sar., 1997; Dinh i sar., 2001; McFarlane i sar., 2001). Ang II je glavni efektorni molekul RAS. Nastaje iz angiotenzinogena, koga renin konvertuje u angiotenzin I, a njega dalje angiotenzin konvertujući enzim (ACE), prevodi u Ang II (**Slika 6.**) (Muller i sar., 1997).

Angiotenzin II (Ang II) svoje fiziološke efekte u organizmu ostvaruje vezujući se za dva tipa membranskih receptora: AT1R i AT2R (Oelkers, 1996; Benigni i sar., 2010). Vezivanjem za AT1R, Ang II indukuje vazokonstrikciju što za posledicu ima povećanje krvnog pritiska. Sa druge strane, vezivanjem za AT2R, Ang II ostvaruje suprotne efekte i smanjuje povišen krvni pritisak (Zhou i sar., 2004; Benigni i sar., 2010). AT2R stimuliše bradikininski receptor tipa 2,

povećava fosforilaciju eNOS i sintezu NO i na taj način dovodi do vazodilatacije (Li i sar., 2012).

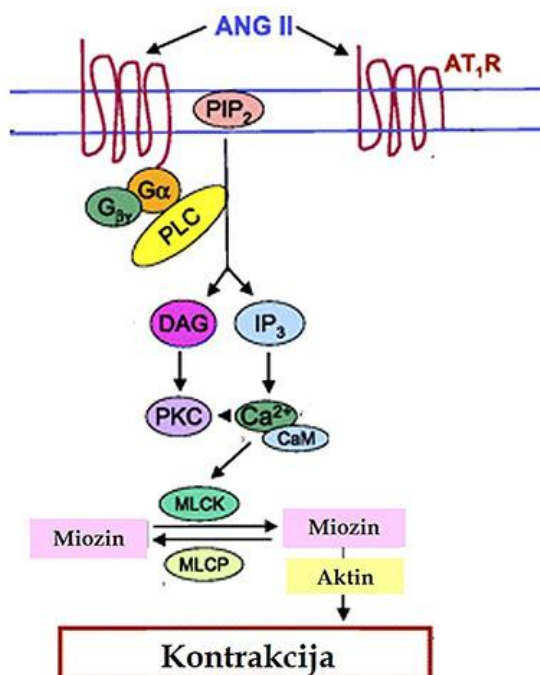


Slika 6. Sinteza i delovanje Ang II na KVS

ACE-angiotenzin konvertujući enzim; AT1R-receptor za angiotenzin II tipa 1; AT2R-receptor za angiotenzin II tipa 2.

Aktivacija AT1R stimuliše fosfolipaze A2 (PLA2), C (PLC) i D (PLD) (Vivar i sar., 2008). Aktivacijom PLC nastaju inozitol-1,4,5-trisfosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG) od PIP2. Novonastali IP3 se zatim vezuje za svoj receptor na sarkoplazmatskom retikulumu i otvara kanal koji omogućava povećanje unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ (Slika 7.).

Vezivanjem Ca²⁺ za kalmodulin (CaM) aktivira se kinaza lakog lanca miozina (MLCK, engl. *myosin light chain kinase*), koja fosforiliše lake lance miozina (MLC, engl. *myosin light chain*), povećava interakciju između aktina i miozina i indukuje kontrakciju mišićnih ćelija (vazokonstrikcija). DAG aktivira PKC koja zatim fosforiliše i menja katalitičke aktivnosti drugih proteina (Lee i sar., 1997; Dasgupta i Zhang, 2011).



Slika 7. Molekulski mehanizam delovanja angiotenzina II

ANG II-angiotenzin II; AT1R-receptor za angiotenzin II tipa 1; PIP2- fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfat; PLC-fosfolipaza C; IP3-inozitol-1,4,5-trisfosfat; DAG-diacilglicerol; PKC protein kinaza C; Ca²⁺-jon kalcijuma; CaM-kalmodulin; MLCK-kinaza lakog lanca miozina; MLCP-fosfataza lakog lanca miozina.

Angiotenzin II (Ang II) vezujući se za AT1R stupa u interakciju sa drugim tirozin kinazama kao što je receptor za insulin. U glatkim mišićnim ćelijama vaskulature, Ang II vezujući se za AT1R omogućava RhoA da se translocira iz citoplazme na plazma membranu, gde aktivira ROCK1/2. Aktivirana RhoA/ROCK signalna kaskada zatim stupa u interakciju sa IRS-1, fosforiliše ga na specifičnim Ser ostacima i inhibira asocijaciju IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (Begum i sar., 2002; Francis i sar., 2010). AT1R takođe može da aktivira i Ser/Thr kinaze kao što su PKC i MAPK (ERK1/2, p38 MAPK i JNK) koje su uključene u rast i hipertrofiju ćelija (Mehta i Griendling, 2007). Ang II delujući preko ERK1/2 i JNK takođe povećava fosforilaciju IRS-1 na specifičnim Ser ostacima što dovodi do poremećaja u signalnom putu insulina (Andreozzi i sar., 2004). Redukcija aktivacije PI3K/Akt signalne kaskade vodi

do smanjenja sinteze NO i poremećaja u metabolizmu energetskih supstrata i razvoja IR (McFarlane i sar., 2001; Lastra i sar., 2009).

Ishrana bogata mastima i razvoj gojaznosti združene sa IR imaju uticaj i na komponente RAS, tako što povećavaju ekspresiju Ang II i AT1R (Tian i sar., 2012). Uvećanje masnog tkiva, koje karakteriše stanje gojaznosti, praćeno je i povećanjem sinteze angiotenzinogena (Jones i sar., 1997; Re, 2009).

Poznato je da je hipertenzija zastupljenija kod muškaraca nego kod žena pre menopauze, i da se ovaj odnos menja tokom životne dobi, odnosno da se nakon menopauze broj hipertenzivnih žena i muškarca izjednačava (Taddei, 2009; O'Hagan i sar., 2012). Studija Burta i saradnika (1995) pokazala je da je hipertenzija učestalija kod žena starijih od 60 godina i muškaraca uopšte u poređenju sa ženama pre menopauze. Smanjenje sistolnog i dijastolnog pritiska takođe je zabeleženo i kod transrodnih osoba, muškarca tretiranih estradiolom radi razvoja sekundarnih ženskih karakteristika (Deutsch i sar., 2015).

Ovarijektomisani Dahl pacovi (DS, *engl. Dahl salt-sensitive*) predstavljaju animalni model za izučavanje promena koje nastaju u RAS kao posledica smanjenja koncentracije estradiola kod žena u menopauzi. Studija na ovarijektomisanim DS pacovima, kod kojih se razvila hipertenzija, pokazala je da tretman estradiolom značajno snižava krvni pritisak (Hinojosa-Laborde i sar., 2004). Tretman ovarijektomisanih ženki transgenih hipertenzivnih (Ren2) miševa estradiolom dovodi do normalizacije krvnog pritiska tako što dovodi do smanjenja nivoa ACE i povećanja koncentracije angiotenzina I (Brosnihan i sar., 1997). Roesch i saradnici (2000) su pokazali da tretman estradiolom ovarijektomisanih ženki pacova vraća povišen krvni pritisak na normalne vrednosti, što je posledica smanjenja nivoa Ang II. Ove studije ukazuju na značaj estradiola u regulaciji hipertenzije. Mehanizami delovanja estradiola i Ang II su posredovani kompleksnim unutarćelijskim signalnim putevima koji su stimulisani vezivanjem estradiola i Ang II za svoje receptore (Silva-Antonialli i sar., 2004; Surma i sar., 2011).

1.3. Azot-monoksid i azot-monoksid sintaze

1.3.1. Azot-monoksid: otkriće i uloga

Azot monoksid (NO) je važan, visoko reaktivan signalni molekul uključen u brojne fiziološke i patofiziološke procese. Otkriven je 1772. godine od strane Džozefa Priestlija (Joseph Priestley, 1733–1804) kao bezbojan gas sa polu-životom od 6–10 sekundi (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Mnoga istraživanja koja su usledila nakon otkrića NO su pokazala da se on sintetiše i u ćelijama sisara (Ignarro i sar., 1987; Yetik-Anacak i Catravas, 2006).

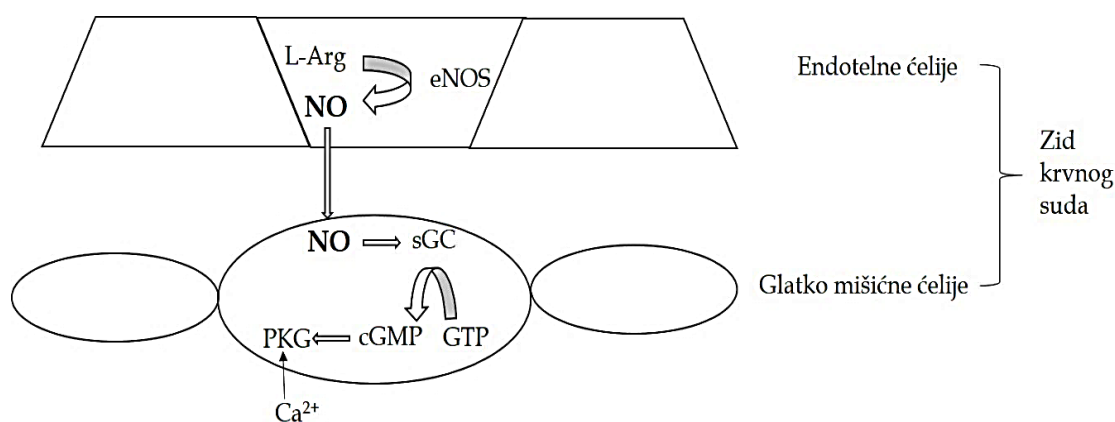
Azot monoksid je jedan od glavnih vazodilatatornih molekula (Furchgott, 1983; Brecht i Snyder, 1994; Liu i Huang, 2008) koji ima važne biološke funkcije u KVS (Liu i Huang, 2008). NO se proizvodi i u ćelijama srca i reguliše njegovu kontraktilnost (Masion i sar., 2003; Liu i Huang, 2008). Osim toga, održavanje bazalnog nivoa NO u endotelu je važno za očuvanje normalne vaskularne fiziologije, a smanjena bioraspodivost NO dovodi do razvoja endotelne disfunkcije i povećanog rizika za razvoj ateroskleroze (Cai i Harrison, 2000; Liu i Huang, 2008). NO uzrokuje hiperpolarizaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, inhibira adheziju monocita i agregaciju trombocita i na taj način ispoljava svoje antiaterosklerotske efekte (Deroo i Korach, 2006).

1.3.1.1. *Mehanizam delovanja azot-monoksida*

Endogeno sintetisani NO je intra/inter ćelijski signalni molekul koji svoje dejstvo može ostvariti u ćeliji u kojoj nastaje (autokrino), a može delovati i na susedne ćelije (parakrino) (Furchgott, 1998; Paterson, 2001).

U ciljnim ćelijama NO se vezuje za hem deo solubilne guanil ciklaze (sGC) (Snyder i Brecht, 1992; Liu i Huang, 2008), što dovodi do povećanja nivoa

cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) i sledstvene aktivacije protein kinaze G (PKG) (Denninger i Marletta, 1999; Liu i Huang, 2008). U glatkim mišićnim ćelijama, cGMP posreduje u NO-zavisnoj relaksaciji glatkih mišićnih ćelija, što dovodi do vazodilatacije na račun smanjenja koncentracije unutarćelijskog Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) (Denninger i Marletta, 1999; Liu i Huang, 2008) (**Slika 8.**). U glatkim mišićnim ćelijama PKG fosforiliše MLCK, utiče na sarkoendoplazmatični retikulum Ca^{2+} -ATPazu (SERCA) i na taj način reguliše kontrakcije. Transport Ca^{2+} je od velike važnosti za kontraktilnost srca. U kardiomiocitima, Ca^{2+} neophodan za kontrakcije i relaksacije je poreklom iz krvi i unutraćelijskih depoa. Ulazak Ca^{2+} u kardiomiocite je posredovan L- Ca^{2+} kanalima koji se nalaze na plazma membrani ćelije. Relaksacija srčanog mišića, do koje dolazi razdvajanjem aktinskih od miozinskih filamenata, je uslovljena smanjenjem unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} , što se postiže uz pomoć SERCA pumpi (Seddon i sar., 2007; Francis i sar., 2010).



Slika 8. Mehanizam delovanja NO na glatke mišićne ćelije krvnih sudova

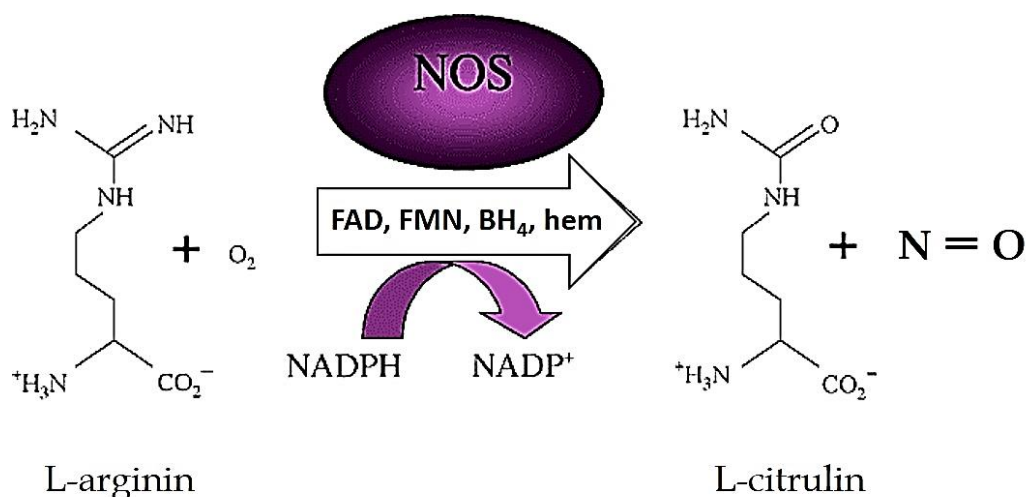
ER-receptor za estrogene; NO-azot-monoksid; eNOS-endotelna NO-sintaza; sGC-solubilna guanilat ciklaza; GTP-guanozin trifosfat; cGMP-ciklični guanozin monofosfat; PKG-protein kinaza G; Ca^{2+} -jon kalcijuma; L-Arg-L-arginin. Preuzeto i modifikovano iz Sudar i saradnici, 2012 (Sudar i sar., 2012).

Osim NO/cGMP puta (Denninger i Marletta, 1999), NO može da reaguje i sa drugim molekulima i na taj način da se inaktivira. Reakcija NO sa superoksid anjonom (O_2^-) dovodi do formiranja drugih reaktivnih molekula,

poput peroksinitrita (ONOO^-) i azot IV oksida. Inaktivacija NO molekula nastaje i interakcijom sa kiseonikom što dovodi do nastanka nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-) (Forstermann i Sessa, 2012).

1.3.2. Azot-monoksid sintaze

Palmer i saradnici su pokazali da se NO sintetise iz aminokiseline L-Arginina (L-Arg) (Palmer i sar., 1988; Moncada i Higgs, 1995; Bruckdorfer, 2005) koja se konvertuje u L-citrulin uz pomoć jedne od izoformi enzima NOS (Slika 9).



Slika 9. Mehanizam nastanka NO

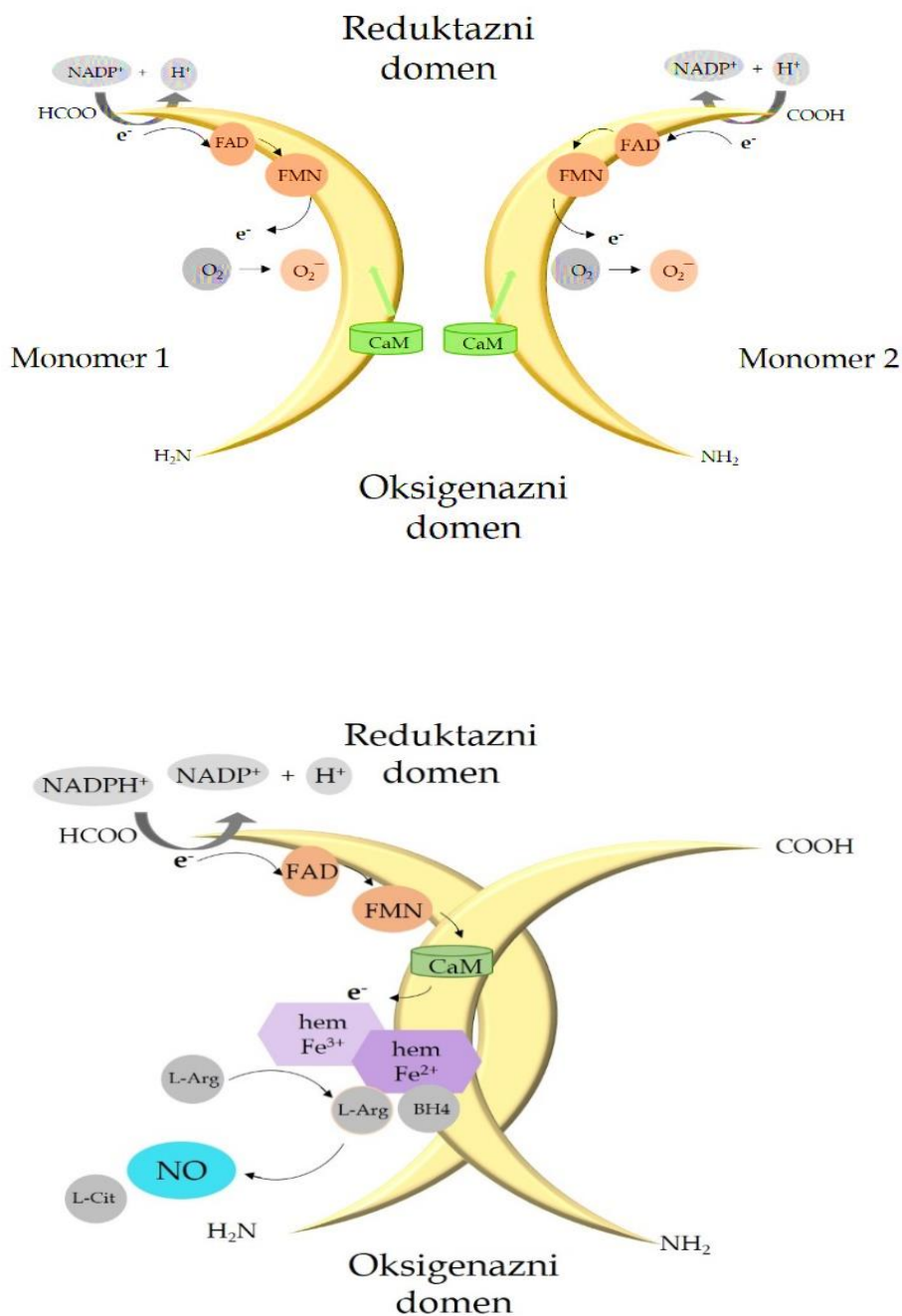
NO-azot-monoksid; NOS-NO-sintaza; FAD/FMN-flavin adenin dinukleotid/flavin mononukleotid; NADPH-redukovani nikotinamid adenin dinukleotid; BH_4 -tetrahidrobiopterin; hem-gvožđe protoporfirin IX; O_2 -kiseonik.

Eksperimenti iz 1989. godine su pokazali da endotelne ćelije sadrže citosolni enzim koji je direktno ili indirektno regulisan od strane Ca^{2+} , i koji pretvara L-Arg u jedinjenje koje ima „relaksirajući“ efekat na ćelije endotela (EDRF; engl. *Endothelium-Derived Relaxing Factor*). Kasnije je pokazano da je taj citosolni enzim NOS (Yetik-Anacak i Catravas, 2006).

Tri glavne izoforme NOS su: nNOS, iNOS i eNOS (Bruckdorfer, 2005; Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Prvi put je NOS izolovana iz mozga i nazvana nNOS (Forstermann i sar., 1994; Yetik-Anacak i Catravas, 2006). nNOS je konstitutivno eksprimirana u raznim ćelijama, uključujući endotelne i nervne ćelije (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Nakon nNOS usledilo je i otkriće iNOS, koja je izolovana iz makrofaga (Forstermann i sar., 1994; Yetik-Anacak i Catravas, 2006). iNOS se eksprimira u različitim ćelijama nekoliko sati nakon izlaganja citokinima (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Iz endotelnih ćelija goveđe aorte izolovana je eNOS izoforma (Forstermann i sar., 1994; Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Sve tri pomenute izoforme NOS su ekspimirane u KVS, a međusobno se razlikuju po nivou ekspresije i aktivnosti. Pored nNOS, eNOS i iNOS postoji i konstitutivno aktivna NOS izoforma prisutna u mitohondrijima i naziva se mtNOS (Ghafourifar i sar., 1999; Liu i Huang, 2008). Sinteza NO zavisi i od raspoloživosti kofaktora kao što su flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), tetrahidrobiopterin (BH₄) i gvožđe protoporfirin IX (hem) (Albrecht i sar., 2003).

Sinteza sve tri izoforme NOS je kodirana različitim genima, lociranim na različitim hromozomima (Forstermann i sar., 1994; Liu i Huang, 2008). DNK i proteinske sekvence NOS izoformi su visoko konzervirane između vrsta (Liu i Huang, 2008). Izoforma nNOS ima 96%, eNOS 93% a iNOS 80% identičnih aminokiselinskih sekvenci između miševa i ljudi (Liu i Huang, 2008). Unutar svake vrste, NOS izoforme dele oko 51-59% identičnih aminokiselinskih sekvenci, ali svaka izoforma ima značajne strukturne karakteristike (Liu i Huang, 2008), a produkt koji nastaje delovanjem svih tipova NOS je isti (NO).

Za potpunu aktivaciju NOS neophodna je njena dimerizacija i prisustvo kofaktora (Bruckdorfer, 2005). NOS sadrže specifična mesta za koja se vezuju mnogi kofaktori, neophodni za prenos elektrona, a koji su bitni za aktivnost enzima (Bruckdorfer, 2005). NOS se sastoji od oksigenaznog i reduktaznog domena od kojih svaki ima svoje katalitičke aktivnosti (**Slika 10.**) (Bruckdorfer, 2005).



Slika 10. Funkcijska struktura NOS homodimera

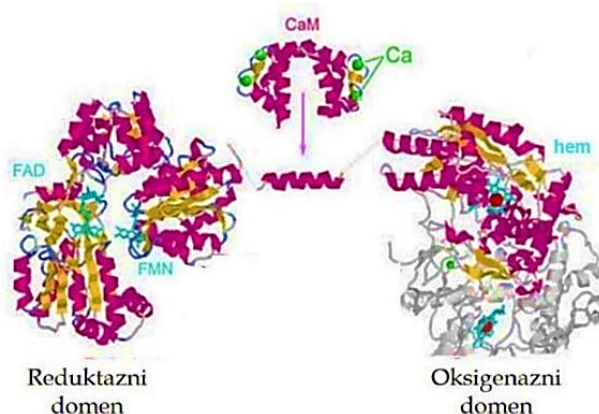
FAD-flavin adenin dinukleotid; FMN-flavin mononukleotid; NADPH-redukovani nikotinamid adenin dinukleotid; hem-gvožđe protoporfirin IX; BH₄-tetrahidrobiopterin; CaM-kalmodulin; L-Cit-L citrulin; L-Arg-L arginin. Preuzeto i modifikovano iz Forsterman i saradnici, 2012 (Forstermann i Sessa, 2012).

N-terminalni oksigenazni domen sadrži vezujuća mesta za hem, BH₄, kao i L-Arg, a povezan je sa C-terminalnim reduktaznim domenom preko mesta za vezivanje CaM. C-terminalni reduktazni domen sadrži mesta za vezivanje FAD, FMN i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (Bruckdorfer, 2005). Da bi se proizveo NO iz L-Arg, NOS mora biti povezana sa BH₄ (Bruckdorfer, 2005). BH₄ utiče na strukturu i funkciju NOS, pošto se pretpostavlja da vrši alosteričku promenu radi stabilizacije dimerne forme NOS enzima i njegove aktivacije (Cosentino i Luscher, 1999; Naseem, 2005). Stoga je BH₄ od ključne važnosti za normalno funkcionisanje ćelija endotela (Naseem, 2005). *In vitro* studije su pokazale da smanjena dostupnost BH₄ rezultuje funkcionalnom razgradnjom NOS dimera (nastaju monomeri NOS; *engl. NOS uncoupling*), što dovodi do proizvodnje O₂⁻ (Stroes i sar., 1998; Naseem, 2005). Zanimljivo je da se sve tri izoforme NOS ponašaju na sličan način u slučaju smanjenja dostupnosti BH₄ (Naseem, 2005).

Za sve tri izoforme, sinteza NO zavisi od vezivanja enzima za CaM (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Takođe je pokazano da je za eNOS i nNOS povećanje [Ca²⁺]_i neophodno za vezivanje CaM čime ove izoforme postaju potpuno aktivirane (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Nasuprot tome, aktivnost iNOS ne zavisi od [Ca²⁺]_i, pošto ima visok afinitet za ovaj jon. Vezivanje CaM za CaM-vezujući region na NOS omogućava transfer elektrona od FMN do hem (Smith i sar., 2013). U zavisnosti od izoforme NOS koja je aktivirana zavise biološki efekti koje NO ostvaruje u srcu.

1.3.2.1. Endotelna azot-monoksid sintaza

Azot-monoksid (NO) se proizvodi u endotelnim ćelijama krvnih sudova i kardiomiocitima (Liu i Huang, 2008). U kardiomiocitima, koji su odgovorni za kontrakcije srca, eksprimirane dve forme enzima: eNOS (**Slika 11.**) i nNOS (Hare i Stamler, 1999; Liu i Huang, 2008).



Slika 11. Trodimenzionalna struktura eNOS

Reduktazni i oksigenazni domeni eNOS i mesto vezivanja Ca^{2+} -CaM kompleks. FAD-flavin adenin dinukleotid; FMN-flavin mononukleotid; CaM-kalmodulin; Ca^{2+} -jon kalcijuma; hem-gvožđe protoporfirin IX. Preuzeto i modifikovano iz Daff i saradnici, 2010 (Daff, 2010).

U bazalnim uslovima, u kaveolama kardiomiocita, eNOS je vezana za kaveolin-3 (Shaul, 2002; Bruckdorfer, 2005), dok je u endotelnim ćelijama eNOS vezana za kaveolin-1 (Feron i sar., 1996; Barouch i sar., 2002; Liu i Huang, 2008). Kaveole su mesta na plazma membranama koja su značajna za kontrolu ulaska Ca^{2+} u ćeliju. Pošto je eNOS Ca^{2+} zavisna izoforma, za njenu aktivnost je neophodno povećanje koncentracije Ca^{2+} u ćeliji koje dovodi do vezivanja eNOS za CaM (Hare i Stamler, 1999). U neaktivnom stanju enzim eNOS je vezan za kaveolin, a njegova aktivacija se vrši kao odgovor na povećanu koncentraciju $[Ca^{2+}]_i$ (Bruckdorfer, 2005).

eNOS u fiziološkim uslovima. eNOS je neophodna za fiziološke procese u KVS jer stvarajući NO utiče na vazodilataciju, sprečava vezivanje trombocita, kontroliše proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i ima antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo (Hayden i Tyagi, 2003).

U fiziološkim uslovima endotelne ćelije konstantno proizvode malu količinu NO. Konstantna proizvodnja male količine NO se postiže aktivacijom

Ser/Thr kinase, Akt koja direktno fosforiliše eNOS (Boo i Jo, 2003; Bruckdorfer, 2005). eNOS je regulisana fosforilacijom na Ser, Thr i Tyr (Liu i Huang, 2008). Akt fosforiliše eNOS na Ser¹¹⁷⁷ i na taj način povećava enzimsku aktivnost eNOS i predstavlja jedan od mehanizama kojim estrogeni povećavaju proizvodnju NO. Sa druge strane, fosforilacija eNOS na Thr⁴⁹⁵ koju vrši PKC dovodi do smanjenja enzimске aktivnosti eNOS i samim tim i smanjenja proizvodnje NO (Mendelsohn, 2002; Bruckdorfer, 2005; Chen i sar., 2008).

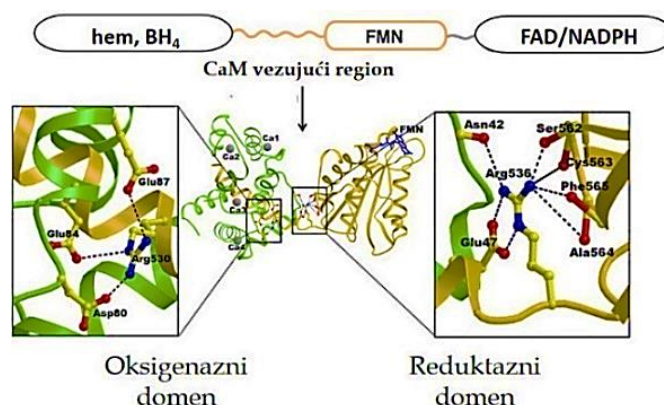
eNOS u patofiziološkim uslovima. Kod pacijenta sa hipertenzijom, hiperholesterolemijom, DM2 i/ili vaskularnim oboljenjima pokazano je da endotel ne može da stvara dovoljnu količinu NO, i time indukuje NO-zavisnu vazodilataciju (Forstermann i Sessa, 2012). Oksidativni stres, karakterističan za KVB, povećava degradaciju NO jer reaguje sa O₂⁻ (Forstermann i Sessa, 2012).

Takođe, povećana količina cirkulišućih SMK, koja se javlja u stanjima gojaznosti združenim sa IR, inhibira PI3K/Akt signalni put i samim tim smanjuje aktivaciju eNOS i nivo NO. Studije na gojaznim miševima, pacovima i svinjama pokazuju smanjenu količinu sintetisanog NO kao posledicu smanjene aktivacije eNOS, usled smanjene fosforilacije eNOS na aminokiselini Ser¹¹⁷⁷ (Sansbury i Hill, 2014).

Efekat estradiola na eNOS. Povećana ekspresija i aktivnost eNOS, a time i dostupnost NO nakon tretmana estradiolom pokazana je u mnogobrojnim *in vivo* i *in vitro* studijama (McNeill i sar., 2002; Stirone i sar., 2003; Koricanac i sar., 2011). Weiner i saradnici (1994) su pokazali da estradiol povećava aktivnost eNOS u arterijama, srcu i skeletnim mišićima. Studija Darblade i saradnika (2002) je pokazala da tretman estradiolom povećava bazalni nivo NO u aorti ovarijektomisanih miševa u poređenju sa ovarijektomisanim miševima koji su primili placebo. Huang i saradnici (2000) su pokazali da inkubacija arteriola skeletnih mišića spontano hipertenzivnih pacova sa fiziološkim koncentracijama estradiola reguliše ekspresiju gena za eNOS.

1.3.2.2. Inducibilna azot-monoksid sintaza

iNOS u fiziološkim uslovima. iNOS je eksprimirana u ćelijama plućnog epitela i epitela debelog creva, gde dovodi do povećanja koncentracije NO, koji može imati ulogu barijere koja smanjuje prolazak bakterija kroz mukozu pluća i creva (Roberts i sar., 2001). U fiziološkim uslovima iNOS je u KVS slabo eksprimirana. Iako je prvobitno identifikovana u makrofagima, pokazano je da ekspresija enzima može da bude stimulisana u svim ćelijama i tkivima (Forstermann i sar., 1994). iNOS se s visokim afinitetom vezuje za CaM, čak i u ćelijama sa niskom koncentracijom $[Ca^{2+}]_i$, i stoga je njegova aktivnost nezavisna od koncentracije Ca^{2+} (Slika 12.) (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Jednom eksprimirana iNOS je konstantno aktivna i ne zavisi od promene koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ (Forstermann i Sessa, 2012).



Slika 12. Trodimenzionalna struktura iNOS

Reduktazni i oksigenazni domeni iNOS i mesto vezivanja CaM. FAD-flavin adenin dinukleotid; FMN-flavin mononukleotid; CaM-kalmodulin; Ca^{2+} -jon kalcijuma; hem-gvožđe protoporfirin IX; BH₄-tetrahidrobiopterin; NADPH-ređukovani nikotinamid adenin dinukleotid. Preuzeto i modifikovano iz Iyanagi i saradnici, 2012 (Iyanagi i sar., 2012).

iNOS u patofiziološkim uslovima. iNOS je jedan od glavnih medijatora inflamacije, visoko je eksprimirana u patofiziološkim stanjima, kada dovodi do višestrukog povećanja nivoa NO (Balligand i sar., 1994; Hare i Stamler, 1999).

Visoka koncentracija NO može da ima štetne efekte u organizmu (Heneka i sar., 1998; Shimabukuro i sar., 1998). Gojaznost i inflamatorni procesi posredovani citokinima imaju ulogu u aktivaciji iNOS (Fujimoto i sar., 2005). Noronha i saradnici (2005) su pokazali da je ekspresija iNOS značajno povećana u aortama gojaznih miševa. Povećana ekspresija iNOS kod miševa dovodi do uvećanja komora i hipertrofije srca (Zhang i sar., 2007; Umar i van der Laarse, 2010), fibroze i iznenadne smrti (Mungrue i sar., 2003). Takođe, povećana ekspresija iNOS u srcu zabeležena je kod pacijenata i životinja sa hroničnom insuficijencijom srca (Haywood, 1996; Drexler i sar., 1998; Vejstrup i sar., 1998; Chen i sar., 2002; Gealekman i sar., 2002).

Efekat estradiola na iNOS. Kauser i saradnici (1998) su ispitivali efekat estradiola na citokinima indukovanu proizvodnju NO na izolovanim aortama pacova. Rezultati ove studije pokazali su da tretman estradiolom smanjuje nivo iNOS indukovani interleukinima, posredstvom smanjenja količine informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) za iNOS (Kauser i sar., 1998). Takođe, Tamura i saradnici (2000) su pokazali da tretman estradiolom smanjuje povećan nivo iNOS proteina kod ovarijektomisanih ženki Wistar pacova. Estradiol smanjuje fosforilaciju p65 subjedinice NF- κ B, čime smanjuje njegovu aktivnost i doprinosi smanjenju nivoa ekspresije iNOS (Murphy i sar., 2010). NF- κ B je dimerni DNK-vezujući protein, vezan u citoplazmi za inhibitorski protein NF- κ B (I κ B, *engl. Inhibitor of NF- κ B*), čiji je zadatak da spreči njegovu aktivaciju i prelazak u jedro (Hattori i sar., 2003). Subjedinica p65 NF- κ B ima regulatornu ulogu i prelaskom u jedro može da se veže za 5' kraj gena za iNOS čime ga aktivira (Nathan i Xie, 1994; Hattori i sar., 2003).

2. Ciljevi rada

Smanjenje nivoa estradiola doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja koji mogu da dovedu do gojaznosti, IR, DMT2 kao i KVB. Tačan mehanizam kojim estradiol ostvaruje pozitivno delovanje na KVS u patofiziološkim stanjima gojaznosti nije još u potpunosti razjašnjen, te je razumevanje etiologije i mehanizama uključenih u nastanak gojaznosti, kao i mehanizama uključenih u nastanak IR i hipertenzije u stanjima gojaznosti, od velikog značaja. Kardioprotektivno dejstvo estradiola posredstvom NO, takođe je nedovoljno proučavano, kao i uloga signalnih molekula PI3K, Akt i RhoA u regulaciji ekspresije eNOS i iNOS enzima koji sintetišu NO. Stoga su postavljeni ciljevi ove doktorske disertacije da se izuči:

1. *in vivo* efekat estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova;
2. *in vivo* efekat estradiola na ulogu signalnih molekula IRS-1, PI3K i Akt u regulaciji ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova;
3. interakcija estradiola i Ang II, kao i uloga RhoA, u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova;
4. *in vivo* efekat estradiola na ćelijsku lokalizaciju transportera za slobodne masne kiseline i glukozu u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta

Za izradu ove doktorske disertacije korišćeno je 28 adultnih mužjaka pacova soja Wistar iz odgajališta Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, starosti od sedam do osam nedelja i telesne mase 150–200 g.

Na početku eksperimenta životinje su podeljene u dve grupe, označene kao Kontrola i Gojazni. Tokom narednih 10 nedelja kontrolne životinje (Kontrola) imale su slobodan pristup (*ad libitum*) vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani (D.D. “Veterinarski zavod Subotica”, Subotica, R. Srbija) (Tabela 1.)

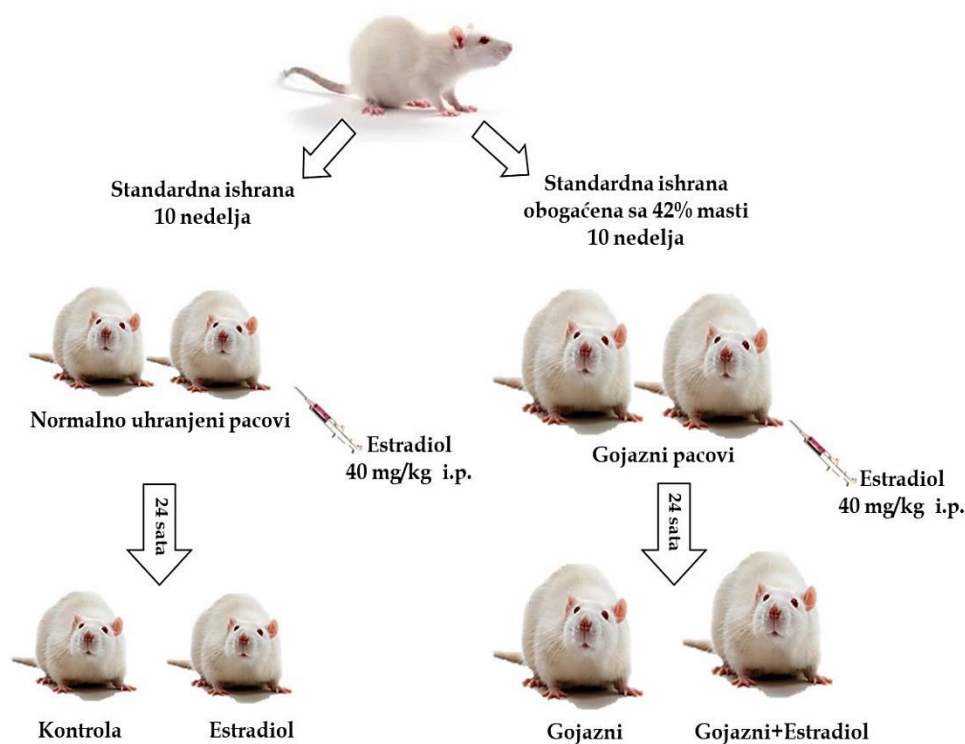
Tabela 1. Standardna smeša za ishranu laboratorijskih pacova

Proteini	20%	Vitamini	A 10000 IU/kg
Celuloza	8%		D3 1600 IU/kg
Vlaga	13%		E 25 mg/kg,
Kalcijum	1%		B12 0,02 mg/kg
Lizin	0,90%	Minerali (mg/kg)	Cink 100
Metionin+Cistin	0,75%		Gvožđe 100
Fosfor	0,5%		Magnezijum 30
Natrijum	0,15-0,25%		Bakar 20
Antioksidansi	100 mg/kg		Jod 0,5
Svarljiva energija	11MJ/kg		Selen 0,1

Istovremeno je druga grupa eksperimentalnih životinja (Gojazni) imala *ad libitum* pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani obogaćenoj sa 42% masti

(suncokretovo ulje), tj. bila je na ishrani bogatoj mastima, za koju je pokazano da dovodi do razvoja gojaznosti združene sa IR (Woods i sar., 2003; Buettner i sar., 2006; Obradovic i sar., 2015). Eksperimenti su izvođeni u uslovima koji ispunjavaju standardne zahteve o čuvanju laboratorijskih životinja: ambijentalna temperatura 21–24 °C, provetravanje sistemom ventilacije i relativna vlažnost vazduha od 60–70%. Dnevno noćni ritam (12 sati svetla/12 sati mraka, sa početkom svetlog perioda u 7h) je obezbeđivan veštačkim osvetljenjem. Životinje su čuvane u kavezima (grupe od dve do tri jedinke po kavezu) od pleksiglasa sa poklopcem od nerđajuće čelične žice sa podlogom od piljevine, koja je menjana dva-tri puta nedeljno.

Nakon 10 nedelja na različitim režimima ishrane (standardna laboratorijska hrana ili hrana bogata mastima), a 24 sata pre žrtvovanja, životinje u okviru obe grupe (Kontrola i Gojazni) su podeljene na po dve grupe, tako da je ukupno bilo četiri eksperimentalne grupe sa po sedam pacova u svakoj grupi. Polovina normalno uhranjenih (označeni Estradiol) i gojaznih pacova (označeni sa Gojazni+Estradiol) tretirana je 24 sata pre žrtvovanja intraperitonealno sa 40 mg/kg (Sigma, E8875) estradiola rastvorenim u 1% etanolu u fiziološkom rastvoru. Preostale životinje obe grupe (označene Kontrola i Gojazni) tretirane su 24 sata pre žrtvovanja intraperitonealno istom količinom 1% etanola u fiziološkom rastvoru. Na osnovu naših prethodnih eksperimenata (Koricanac i sar., 2011), kao i literaturnih podataka drugih autora (Barbacanne i sar., 1999; Ren i sar., 2003; Wu i sar., 2008) izabrana je doza estradiola koja je korišćena za *in vivo* injeciranje. Pokazano je da doza estradiola kojom su tretirane životinje utiče na regulaciju unutraćelijskih signalnih puteva. U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su efekti koje estradiol ostvaruje na srce, ne samo delujući negenomskim putem, nego i genomskim, pošto su životinje žrtvovane 24 sata nakon tretmana estradiolom, što je dovoljno vremena da estradiol ostvari svoje efekte i na regulaciju ekspresije gena. U toku žrtvovanja životinje su donošene pojedinačno u kavezima, da bi se izbegao efekat stresa žrtvovanjem prethodnih životinja.



Slika 1. Dizajn eksperimenta

Životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji, iskrvarenjem. Krv je sakupljena i izolovana je plazma, a srca su ekstrahovana i merena je njihova masa. Delovi tkiva srca koji su odvajani za izolaciju proteina i RNK trenutno su zamrzavani u tečnom azotu, a potom čuvani na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, dok su delovi tkiva iz predela vrha srca (u cilju izolovanja leve i desne komore kao i septuma) čuvani u 4% neutralno puferisanom formaldehidu, radi daljih imunohistohemijskih analiza tkiva srca.

3.2. Izolovanje plazme iz krvi pacova

Iz sakupljene krvi svakog pacova izolovana je plazma inkubacijom tokom 60 minuta na ledu u epruvetama sa EDTA a zatim centrifugiranjem 15

minuta na 4000 rpm. Dobijeni supernatanti (plazma) su alikvotirani i čuvani na -20 °C za dalje analize.

3.3. Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva srca pacova

Tkiva srca (200 mg) svih grupa eksperimentalnih životinja sitnjena su skalpelom i resuspendovana u mililitru pufera za liziranje (pH=7,4) a zatim homogenizovana na +4 °C, korišćenjem homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax IKA.Werke, Nemačka). Pufer za liziranje je sadržao: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 1% Triton X-100, 10% glicerola, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka) i koktel fosfataznih inhibitora (PhosSTOP, EASYpack, Roche, Nemačka). Homogenati su sonifikovani dva puta po pet sekundi korišćenjem sonifikatora (Sonifier B-12, Branson Sonic power company, USA), i nakon toga inkubirani, uz konstantnu rotaciju sat vremena na +4 °C. Uzorci su centrifugirani (Beckman, J21) 20 minuta na 14000 rpm i temperaturi od +4 °C, a supernatanti su alikvotirani i čuvani na -70 °C do dalje upotrebe.

3.4. Izolovanje proteina plazma membrane i mikrozoma male gustine iz tkiva srca pacova

Proteini plazma membrana i mikrozoma male gustine (LDM) su izolovani prema protokolu Luikena i saradnika (Luiken i sar., 2002). Tkivo srca svih eksperimentalnih grupa sitnjeno je skalpelom i inkubirano 30 minuta na +4 °C u 1 ml preinkubacionog pufera (pH 7,4), koji je sadržao: 2 M NaCl, 20 mM HEPES i 5 mM NaN₃. Uzorci su zatim centrifugirani pet minuta na 1000 x g u centrifugi (Beckman, J21). Talozci su resuspendovani, a potom homogenizovani

u 1 ml TES pufera za izolovanje proteina (pH 7,4) uz pomoć homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax, IKA.Werke, Nemačka). TES pufer je sadržao: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoze, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka), uz dodatak koktela fosfataznih inhibitora (PhosSTOP, EASYpack, Roche, Nemačka). Homogenat je centrifugiran pet minuta na 1000 x g, a dobijeni talog homogenizovan u 1 ml TES pufera. Supernatant iz prethodnog centrifugiranja je spajan sa dobijenim homogenatom i ponovo centrifugiran 10 minuta na 100 x g. Supernatanti su odvajani, a zatim centrifugirani 10 minuta na 5000 x g, a dobijeni talog označen kao T2 (u kome se nalazi frakcija proteina plazma membrana), resuspendovan je u 300 µl TES pufera i čuvan na -70 °C do dalje upotrebe. Radi izolovanja LDM, supernatanti prethodno odvajani za dobijanje T2 u talogu, centrifugirani su 20 minuta na 20000 x g, a talog dobijen centrifugiranjem, označen kao T3, je resuspendovan u 300 µl TES pufera. Dobijeni supernatant je centrifugiran 30 minuta na 48000 x g (Beckman, Ti-65 rotor), a dobijeni talog označen kao T4 resuspendovan u 150 µl TES pufera. Supernatant je centrifugiran 80 minuta na 210000 x g, a nastali talog označen kao T5 je resuspendovan u 150 µl TES pufera. Prema autorima originalnog protokola (Luiken i sar., 2002) talog T5 predstavlja frakciju LDM.

3.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina, kao i koncentracija proteina plazma membrana i LDM određivana je primenom spektrofotometrijske metode po Loriju (Lowry i sar., 1951).

Metoda se zasniva na merenju apsorpcije svetlosti dva obojena kompleksa, redukovano Folin-Šialteovog (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) i biuretskog reagensa, koji se formira u baznoj sredini između jona bakra i azota iz peptidnih veza. Pri oksidaciji kompleks dobija žutu boju, a

zatim redukcijom menja boju u plavo. Broj peptidnih veza i redukujućih grupa određuju intenzitet boje.

Homogenat srca pacova (5 μ l) je razblaživan dejonizovanom vodom (495 μ l) i 25 μ l novonastalog razblaženja je odvajano i dodatno razblaživano dodavanjem 75 μ l dejonizovane vode. U epruvete sa 100 μ l finalnog razblaženja lizata srca pacova dodavano je 100 μ l rastvora 2% natrijum dodecil sulfata (SDS; *engl. Sodium Dodecyl Sulphate*), a nakon mućkanja dodavan je po mililitar 1% rastvora Na-K tartarata u 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, prethodno 25 puta razblaživan u 2% rastvoru Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH. Sadržaj epruveta je snažno mućkan a zatim 10 minuta inkubiran na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u reakcionu smešu je dodavano 100 μ l Folin-Šialteovog reagensa (1:2), sadržaj epruveta je mućkan i ponovo inkubiran, 20 minuta u mraku. Apsorbanca je merena na 750 nm na spektrofotometru (Ultrospec 2000, Pharmacia, Biotech).

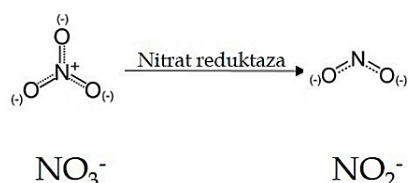
Očitavanjem vrednosti apsorbanci za seriju rastvora albumina iz seruma govečeta (BSA; *engl. Bovine Serum Albumin*) poznatih koncentracija (od 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konstruisana je standardna kriva na osnovu koje je određivana koncentracija proteina. Koncentracija proteina je bila proporcionalna intenzitetu dobijene boje i izražavana je u $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.6. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata kao krajnjih produkata azot-monoksida u plazmi i lizatu srca pacova

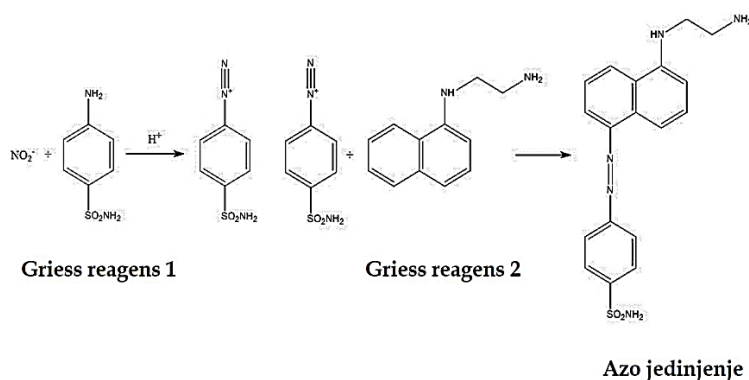
Koncentracija NO u plazmi i lizatu srca pacova određivana je indirektno, određivanjem koncentracije NO_2^- i NO_3^- kao krajnjih produkata NO, korišćenjem $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ komercijalnog kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001) prema upustvu proizvođača. Određivanje koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ rađeno je u dva koraka: reakcijom nitrat reduktaze i Griess-ovom reakcijom. U prvom koraku se NO_3^- uz dodavanje

nitrat reduktaze konvertuju u NO_2^- (Slika 2.A), dok se u drugom koraku dodavanjem Griess-ovog reagensa NO_2^- konvertuje u azo jedinjenje (Slika 2.B), tamno ljubičaste boje. Merenjem apsorbance nastalog azo jedinjenja određuje se koncentracija NO_2^- , čija je apsorbance očitavana na 540 nm.

A.



B.



Slika 2. Konverzija nitrata u Azo jedinjenje

- A. Konverzija nitrata (NO_3^-) u nitrite (NO_2^-)
B. Nastanak Azo jedinjenja iz nitrita

Esej za određivanje NO je rađen u mikrotitarskoj polistirenskoj ploči sa 96 bunarića. Posle nanošenja serije standarda NaNO_3^- poznate koncentracije ili uzoraka plazme ili lizata srca u mikrotitar ploču u volumenu od 80 μl , u svaki bunarić dodavano je po 10 μl kofaktora enzima, a potom po 10 μl nitrat reduktaze. Nakon tri sata inkubacije na sobnoj temperaturi u svaki bunarić dodavano je po 50 μl Griess-ovog reagensa 1 i 2 i nakon dodatne inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi očitavana je apsorbance na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Perkin Elmer, Wallac 1420 Victor) na 540 nm. Očitavanjem vrednosti apsorbanci za seriju rastvora NaNO_3^- poznate

koncentracije konstruisana je standardna kriva na osnovu koje je određivana koncentracija NO_2^- , izražavana u μM .

3.7. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u lizatu srca pacova

Koncentracija SMK u lizatu srca pacova određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Duncombu (Duncombe, 1964). Metoda se zasniva na korišćenju organskog rastvora u cilju ekstrakcije lipida, pri čemu dolazi do eliminacije interferirajućih jedinjenja. Reakcija hloroformskog rastvora SMK sa reagensom koji sadrži bakar rezultuje formiranjem soli bakra, koje zatim stvaraju kompleks sa dietilditiokarbamatom (DDC; *engl. Diethyl-dithiocarbamate*). Maksimum apsorpcije svetlosti novonastalog jedinjenja žute boje je na talasnoj dužini od 436 nm pri čemu je intenzitet boje proporcionalan koncentraciji SMK.

Određivanje koncentracije SMK je izvođeno korišćenjem 45 μl lizata srca pacova, u koji je dodavano 225 μl trietanolaminskog pufera (TEA) $\text{pH}=7.8$. Nakon kratkog mućkanja dodavano je 1125 μl hloroforma i smeša je snažno mućkana 20 minuta na sobnoj temperaturi. Inkubaciona smeša je centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Galaxy 14D, VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD), nakon čega je uklonjen gornji, plavozeleni sloj sa proteinima. Iz preostalog, donjeg hloroformskog sloja odvajano je po 450 μl uzorka u nove epruvete i dodavano je 45 μl DDC. Uzorci su nakon snažnog mućkanja inkubirani na sobnoj temperaturi 20 min. Apsorbanca standarda i uzoraka merena je na spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer) na 436 nm.

Koncentracija SMK u uzorcima izračunavana je na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija palmitinske kiseline u rasponu od 0,05 mM do 2,5 mM, i izražavana je u mmol/mg tkiva.

3.8. Određivanje koncentracije L-arginina u lizatu srca pacova

Koncentracija L-Arg u lizatu srca pacova je određivana ninhidrinskom reakcijom, primenom metode po Kovalčuku (Kowalczyk i sar., 2007). Princip metode se zasniva na ninhidrinskoj reakciji u kojoj se ninhidrin redukuje do hidrindantina, a alfa aminokiselina dekarboksilacijom, preko imino i keto kiseline, prelazi u odgovarajući aldehid. Višak ninhidrina, hidrindantin i oslobođeni amonijak formiraju kondenzaciono jedinjenje plave boje, koje ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 404 nm.

Koncentracija L-Arg je određivana u 20 μ l lizata srca pacova koncentracije proteina 20 μ g/ μ l. U svaki uzorak je dodavano po 1980 μ l 25 mM fosfatnog pufera pH=9 i po mililitar 2% ninhidrinskog reagensa (Ninhzdrinum, Serva, Hajdelberg, Nemačka) prethodno rastvaranog u 25 mM fosfatnom puferu (pH=9). Nakon kratkog mešanja inkubaciona smeša je kuvana u vodenom kupatilu 15 minuta na temperaturi od 80 °C, a zatim je hlađena na sobnoj temperaturi nakon čega je merena apsorbanca na spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer). Na osnovu vrednosti apsorbaneci očitavanih za seriju rastvora L-Arg (L-arginine monohydrochloride, Kemika, Zagreb, R. Hrvatska) poznatih koncentracija konstruisana je standardna kriva na osnovu koje su određivane koncentracije L-Arg u uzorcima lizata srca pacova. Intenzitet dobijene boje svakog uzorka proporcionalan je koncentraciji L-Arg i izražava se u μ g/ μ l.

3.9. Određivanje relativne ekspresije gena za eNOS i iNOS

Tkivo srca pacova je korišćeno za izolaciju ukupne RNK. Reakcijom reverzne transkripcije RNK molekula kao matrice, sintetisan je komplementarni lanac molekula DNK (cDNK; *engl. complementary DNA*) koji je dalje korišćen za određivanje relativne ekspresije gena za eNOS i iNOS metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR, *engl. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

3.9.1. Izolacija ukupne RNK iz srca pacova

Za izolaciju ukupne RNK iz srca pacova korišćena je metoda fenolske ekstrakcije uz korišćenje Trizola (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija). Ekstrakcija je izvođena na hladnom, homogenizovanjem tkiva srca pacova u mililitru trizola, korišćenjem homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax IKA, Werke, Nemačka). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od pet minuta u homogenate je dodavano po 0,2 ml hloroforma, smeša je snažno mućkana i inkubirana 10 minuta na +4 °C. Uzorci su centrifugirani (12000 × g, 15 minuta, +4 °C), nakon čega je odvajana hloroformska od fenolske faze. Ukupna RNK je taložena sa 500 µl izopropil alkohola (-20 °C) 24 sata, a zatim centrifugirana (12000 × g, 15 minuta, +4 °C). Staložena RNK je prana dva puta sa mililitrom 75% etanola i sušena pet minuta na sobnoj temperaturi. Voda tretirana dietilpirokarbonatom (DPC-H₂O) korišćena je za rastvaranje dobijenog taloga RNK. Koncentracija izolovane RNK određivana je spektrofotometrijski, na aparatu BioSpec-nano (Shimatzu, SAD). Izmerene koncentracije RNK su bile u opsegu od 400 do 3500 ng/µL. Odnos apsorpcija na 260 nm i 280 nm korišćen je za određivanje čistoće uzorka (A₂₆₀/A₂₈₀>1,8 smatran je zadovoljavajućim). Provera degradiranosti izolovane RNK rađena je horizontalnom

nedenaturišućom elektroforezom na 1,2% agaroznom gelu u trajanju od 30 minuta i pri konstantnoj voltaži od 100 V.

3.9.2. Reverzna transkripcija

Prepis RNK u cDNK vršen je korišćenjem komercijalog kita Thermo Scientific, RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanija).

Sinteza cDNK rađena je prema uputstvu proizvođača, pripremom uzoraka na ledu. Mikrogram ukupne RNK izolovane iz srca pacova inkubiran je sa mikrolitrom heksamera (Random Hexamer Primer) i dejoniozovanom vodom do ukupne zapremine od 12 μ l pet minuta na 65 °C. Nakon završene inkubacije u smešu su dodavane sledeće komponente: 4 μ l reakcionog pufera (5xReaction Buffer), 1 μ l (20U/ μ l) inhibitora RNKze (RiboLock RNase Inhibitor), 2 μ l dNTP Mix (10mM) i 1 μ l (200U/ μ l) reverzne transkriptaze (RevertAid H Minus M-MuL Reverse Transkriptase). Nakon blagog mućkanja i centrifugiranja uzorci su inkubirani pet minuta na 25 °C, a zatim 60 minuta na 42 °C. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem u trajanju od pet minuta na 70 °C. Dobijena cDNK je direktno korišćena za kvantifikaciju relativne ekspresije gena za eNOS i iNOS.

3.9.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu eNOS i iNOS

Za određivanje nivoa relativne ekspresije gena za eNOS i iNOS korišćena je qRT-PCR. Za normalizaciju genske ekspresije eNOS i iNOS korišćen je β

aktin kao endogena kontrola, pošto β aktin u srcu pacova ima stabilnu ekspresiju.

Za izvođenje qRT-PCR analize su korišćeni: 1 x Eva Green qPCR Master Mix (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canada) za eNOS, Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mixes with low ROX (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) za iNOS, specifični prajmeri i 40 ng cDNK za eNOS, odnosno 20 ng cDNK za iNOS kao matrica. Sekvence specifičnih prajmera za eNOS, iNOS i β aktin su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Sekvence parova prajmera korišćenih u qRT-PCR analizi

Gen pacova	Prajmer		GenBank accession number	Dužina PCR produkta (bp)
iNOS	forward	5'-AGAAGTCCAGCCGCACCAC-3'	NM_012611	103
	reverse	5'-TGGTTGCCTGGGAAAATCC-3'		
eNOS	forward	5'-TGGAAATTAACGTGGCTGTG-3'	NM_021838	112
	reverse	5'-GCCTTCTGCTCATTTCCAA-3'		
β aktin	forward	5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3'	NM_031144	76
	reverse	5'-GAGCCACCAATCCACACAGA-3'		

Temperaturni profil PCR reakcija (Applied Biosystem 7500, Carlsbad, SAD) bio je sledeći: 10 minuta na 95 °C, nakon toga 40 ciklusa od po 15 sekundi na 95 °C i po jedan minut na 60 °C za eNOS ili tri minuta na 95 °C, pa 40 ciklusa od po pet sekundi na 95 °C i po jedan minut na 61 °C za iNOS. Temperaturni profili za β aktin su identični uslovima za eNOS i iNOS. Svi uzorci su rađeni u triplikatu na mikrotitar pločama od 96 mesta (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD). Provera kontaminacije uzorka i nastanak nespecifičnih produkata (dimer-prajmer) vršena je konstruisanjem krive topljenja po završetku umnožavanja.

Primenom komparativne metode "ciklus praga" (Ct; *engl. cycle threshold*) obrađeni su rezultati dobijeni za qRT-PCR za ekspresiju eNOS i iNOS gena. Ct se nalazi u eksponencijalnoj fazi PCR. Tokom eksponencijalne faze fluorescencija se duplira u svakom ciklusu amplifikacije, zatim dolazi do usporavanja kinetike PCR reakcije i reakcija ulazi u "plato" fazu. Ct vrednost je proporcionalna logaritmu početne količine ispitivanog ciljnog molekula u uzorku. Nivo ekspresije gena od interesa iskazan je kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i Ct vrednosti β aktina, a $\Delta\Delta Ct$ je razlika između ΔCt i ΔCt kalibratora (za vrednost kalibratora je uzeta srednja vrednost svih uzoraka kontrolne grupe) (Livak i Schmittgen, 2001). Dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem programa Detection RQ Study za 7500 System SDS (Applied Biosystem, Carlsbad, SAD).

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

Nivo proteina, izolovanih iz srca pacova u frakcijama plazma membrana, LDM i ukupnom ćelijskom lizatu srca je određivan primenom dve metode: metodom diskontinuirane poliakrilamid gel elektroforeze u prisustvu deterdženta SDS (SDS-PAGE; *engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970), i Western blot analizom (Towbin i sar., 1979; Burnette, 1981). SDS-PAGE obezbeđuje razdvajanje proteina u uzorku na osnovu njihove molekulske mase (Laemmli, 1970). Visoka rezolucija razdvajanja proteina postiže se primenom 4% gela za koncentrovanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O) i 10% gela za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O), kao i korišćenjem pufera za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H₂O) i 5 x koncentrovanog redukujućeg pufera za uzorkovanje-5 x Laemli

pufera (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2- β -mercaptoetanol, 0,1% bromfenol plavo).

Za SDS-PAGE su uzorci lizata, plazma membrana i LDM svođeni na iste koncentracije proteina korišćenjem odgovarajućeg pufera (pufer za liziranje ili TES) (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a zatim kuvani u 5 x Laemli puferu, pet minuta na 95 °C. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni u bunariće gela u količini od po 100 μg i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom, prvo 15 minuta pri naponu od 80 V, a zatim 120 minuta pri naponu od 120 V. Na svaki gel je nanošen i proteinski marker za elektroforezu, koji sadrži devet proteina različitih molekulskih masa (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa-marker PageRegularTMPrestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Litvanija) radi lokalizovanja ispitivanih proteina prema molekulskoj masi. Elektroforeza je izvođena korišćenjem aparature za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell electrophoresis, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD).

Neredukujuća SDS-PAGE elektroforeza je rađena za detekciju native forme eNOS proteina. Proteinski lizati srca pacova, koncentracije 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, razblaživani su sa 2 puta koncentrovanim neredukujućim puferom za uzorkovanje (2 x Lemli pufer bez 2- β -merkaptoetanol). Smeša je zatim direktno nanošena u bunariće gela u količini od 200 μg , bez prethodnog kuvanja kako proteini ne bi denaturisali. Uzorci su razdvajani SDS-PAGE elektroforezom na hladnom (+4 °C), 10 minuta na 100 V, a zatim 60 minuta na 200 V.

3.10.1. Imunoprecipitacija

Reakcija imunoprecipitacije se bazira na precipitaciji željenog proteina pomoću njegovog antigena za koji se vezuje specifično antitelo. Specifično antitelo se kupluje za supstrat-agarozu, za koju je vezan protein A ili G, koji služi za "kačenje" imunokompleksa nastalog prethodnom inkubacijom uzorka

sa specifičnim antitelom. Ovako izolovan protein se resuspenduje u puferu za liziranje, kuva pet minuta na 95 °C, nanosi u bunariće gela i razdvaja SDS-PAGE a dalja detekcija proteina se vrši metodom Western blota.

Protein A/G sefaroza (Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) je pripremana ispiranjem 20 µl sefaroze TBS-T puferom (25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 7.8), tri puta uz centrifugiranje. Pripremljena sefaroza (dobijeni talog) inkubirana je preko noći na +4 °C sa prethodno pripremljenim uzorkom sa antitelom (eNOS ili IRS-1), uz rotiranje. Uzorak proteinskog lizata srca pacova (500 µg ukupnih proteina) i 2 µg primarnog antitela za eNOS (sc-653, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) ili IRS-1 (ab52167, Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL) inkubirani su preko noći na +4 °C, uz rotiranje. Novonastali kompleks (uzorak+antitelo+protein A/G sefaroza) je centrifugiran, a dobijeni pelet je pran u 500 µl TBS-T tri puta uz centrifugiranje. Ovako pripremljen uzorak kuvan je pet minuta na 95 °C, zatim je nanošen na gel i nivo proteina određivan je SDS-PAGE i Western blot metodom.

3.10.2. Ko-imunoprecipitacija

Ko-imunoprecipitacija je metoda koja omogućava detekciju protein-protein interakcija, indirektnim „kačenjem“ proteina koji su u kompleksu sa specifičnim željenim proteinom. Nakon završene imunoprecipitacije sa specifičnim antitelom (IRS-1) izolovan je željeni protein, koji sa sobom ponese i sve proteine sa kojima je u kompleksu. Ovako izolovan protein je resuspendovan u puferu za liziranje, kuvan pet minuta na 95 °C, nanošen u bunariće gela i razdvajan SDS-PAGE, dok je detekcija drugog proteina (p85, ab86714 Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL) iz kompleksa vršena Western blot metodom.

3.11. Western blot

Western blot predstavlja semikvantitativnu metodu koja se koristi za detekciju nivoa proteina u analiziranom uzorku. Nakon elektroforeze, transfer proteina je vršen sa poliakrilamidnog gela na poliviniliden fluorid (PVDF) membranu (Immobilon-P membrana, veličine pora 0,45 μm , Millipore Corporation, SAD), u aparatu za mokri transfer (Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD) uz korišćenje pufera za transfer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicin). Transfer je rađen sat vremena pri konstantnoj struji od 350 mA na +4 °C.

Nakon završenog transfera je proveravana efikasnost transfera proteina bojenjem membrana rastvorom PonsoS (0,1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, razblaživan sa istom zapreminom TBS-T pufera). Nakon toga, membrane su blokirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBS-T ili 5% nemasno mleko u prahu rastvoreno u TBS-T) dva sata na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje, da bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za membranu.

Zatim su membrane sa razblaženim, specifičnim primarnim antitelima inkubirane preko noći uz konstantnu rotaciju, na +4°C. Antitela na β -aktin, (konstitutivno eksprimiran protein) su korišćena kao kontrola nanošenja količine uzoraka (*engl. loading control*). Odgovarajuća razblaženja primarnih antitela (**Tabela 3.**) su pripremana u 5% nemasnom mleku ili 5% BSA u TBS-T. Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelima membrane su ispirane tri puta po pet minuta u TBS-T puferu na sobnoj temperaturi, a zatim su inkubirane sat vremena, uz rotaciju, na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti—mišijim, anti—kozijim ili anti—zečijim, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD). Nakon inkubacije membrana sa sekundarnim antitelima, membrane su ispirane TBS-T puferom pet puta po tri minuta, na sobnoj temperaturi. U zavisnosti od enzima sa kojim je konjugovano odgovarajuće sekundarno antitelo na membrane je nanošen supstrat za

peroksidazu rena (HRP; *engl. Horseradish Peroxidase*) ili supstrat za alkalnu fosfatazu (ALP; *engl. Alkaline phosphatase*).

ECL (ECL; *engl. enhanced chemiluminescence*) reagens je dodavan na membranu kada su sekundarna antitela bila vezana sa HRP. Detekcija analiziranih proteina je vršena pomoću autoradiografskog filma. Metoda se zasniva na principu da peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola, pri čemu nastalo intermedijarno jedinjenje emituje svetlost (luminiscencija), koja potom osvetljava film. Postupak je izvođen tako što je membrana inkubirana u reagensu dobijenom mešanjem istih zapremina rastvora luminola i p-kumarične kiseline rastvorenih u Tris-HCl, pH 8,5 i rastvora H₂O₂ u Tris-HCl, pH 8,5, u trajanju od jednog minuta. Detekcija signala je vršena u kasetama za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD) u koje su postavljane membrane, a preko membrana je stavljan rentgen film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija). Vreme ekspozicije je variralo od nekoliko minuta do nekoliko sati.

Ukoliko su sekundarna antitela bila vezana sa ALP na membrane je dodavan BCIP/NBT (BCIP/NBT; *engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Chloride*; sc-2498, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) reagens, koji predstavlja supstrat za delovanje ALP. Membrane su inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, do razvijanja boje. Pufer u kome su membrane inkubirane sadržao je 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂ u koji je dodavano po 200 µl reagensa BCIP/NBT. Nakon pojavljivanja signala na membranama, u vidu plavo-ljubičastih traka koje odgovaraju analiziranim proteinima, membrane su ispirane vodom, sušene, a potom su signali kvantifikovani.

Kvantifikacija rezultata dobijenih nakon završene Western blot metode je rađena korišćenjem programa ImageJ 1.48 (NIH, SAD). Sve dobijene vrednosti za nivo proteina su izražene u odnosu na vrednosti dobijene za konstitutivno eksprimiran protein, β aktin, sa istog blota u lizatima, plazma membranama i LDM.

Tabela 3. Primarna antitela korišćena za detekciju proteina

Primarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Korišćeno razblaženje
β aktin	Santa Cruz Biotechnology	Sc-81178	1:1000
eNOS	Santa Cruz Biotechnology	Sc-653	1:600
iNOS	Abcam	ab15323	1:200
NF- κ B p65	Santa Cruz Biotechnology	Sc-372	1:500
pIRS-1 (Ser ³⁰⁷)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-33956	1:100
IRS-1	Abcam	ab52167	1:600
Anti-PI3K p85	Abcam	ab86714	1:600
Anti-PI3K p110	Cell Signaling	4249	1:200
pAkt (Thr ³⁰⁸)	Abcam	ab38449	1:600
Akt	Abcam	ab8805	1:1000
RhoA	Abcam	ab68829	1:1000
AT1R	Abcam	ab9391	1:300
AT2R	Abcam	ab19134	1:600
CD36	Santa Cruz Biotechnology	sc-9154	1:100
GLUT1	Santa Cruz Biotechnology	sc-7903	1:200
GLUT4	Santa Cruz Biotechnology	sc-7938	1:200

IRS-1-supstrat receptora za insulin 1; PI3K p85-regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol-3 kinaze; PI3K p110-katalitička subjedinica fosfatidilinozitol-3 kinaze; iNOS-inducibilna azot-monoksid sintaza; eNOS-endotelna azot-monoksid sintaza; Akt-protein kinaza B; NF- κ B p65-p65 subjedinica nuklearnog faktora κ B; AT1R-receptor za angiotensin II tipa 1; AT2R-receptor za angiotensin II tipa 2; CD36-translokaza masnih kiselina; GLUT1-transporter za glukozu tip 1; GLUT4-transporter za glukozu tip 4.

3.12. Imunohistohemijska analiza eNOS i iNOS

Imunohistohemijska analiza eNOS i iNOS proteina rađena je iz parafinskih kalupa tkiva srca. Isecci tkiva srca za imunohistohemijsku analizu su deparafinirani i ispirani 10 minuta TBS-T puferom (pH 7,4). Demaskiranje antigena je vršeno u mikrotalasnoj pećnici u citratnom puferu (pH 6,0). Primarna antitela specifična na eNOS i iNOS razblaživana su komercijalno dostupnim razblaživačem (Large Volume UltraAb Diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD). Blokada delovanja endogene peroksidaze vršena je komercijalnim preparatom (Large Volume Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-HP), a zatim je nanošen komercijalni rastvor (UltraV Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-UB) radi blokiranja nespecifičnog bojenja.

Pri razvijanju reakcije sistemom UltraVision (Thermo Scientific LabVision, TL-060-HL) primenjivana je sledeća procedura: nakon ispiranja TBS-T puferom, na isečke je dodavano primarno antitelo specifično na eNOS ili iNOS. Inkubacija isečaka je vršena sa primarnim antitelom preko noći, na sobnoj temperaturi. Isecci su ispirani TBS-T puferom i inkubirani sa sekundarnim, biotinizovanim antitelom na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije je korišćen streptavidin peroksidazni obeleživač i isecci su ponovo ispirani i izlagani delovanju rastvora hromogena: DAB (diaminobenzidin). Nakon završenog ispiranja TBS-T puferom, isecci su kontrastno bojani Majerovim hematoksilinom (Merck, 1092490500). Dehidratacija isečaka je vršena alkoholima rastuće koncentracije nakon čega su uzorci prosvetljavani ksilolom i pokriveni pomoću DPX-a. Za sva imunohistohemijska bojenja su korišćene pozitivne (nanošenjem primarnog antitela i praćenjem bojenja glatkih mišićnih ćelija koronarnih krvnih sudova) i negativne (nanošenjem TBS-T pufera umesto primarnog antitela) kontrole.

Gojaznost postepeno dovodi do nakupljanja masti u tkivu srca, povećanja volumena krvi, hipertrofije leve komore, kao i drugih patoloških

promena u strukturi tkiva srca. Povećanje mase srca utiče na povećanje komora srca, kao i povećanje pritiska na zidove komora. Ovaj proces dovodi u početku do zadebljanja leve komore, a nakon nekog vremena i do hipertrofije leve komore koja je zadužena da potisne krv kroz sistemski krvotok.

3.13. Statistička obrada prikazanih rezultata

Rezultati su izražavani kao aritmetička srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Za statističku analizu je korišćen program SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA) i Student-ov *t*-test primenom Excel PC programa. Statistički značajnom razlikom između dve grupe je smatrana verovatnoća manja od 0,05 ($p < 0,05$).

4. Rezultati

Rezultati generisani u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju nastavak prethodno započetih istraživanja u kojima su izučavani *in vivo* efekti estradiola na regulaciju različitih bioloških markera srca kod normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2013; Obradovic i sar., 2014; Obradovic i sar., 2015).

Tabela 1. Morfometrijski i biohemijski parametri (Obradovic, 2013)

Eksperimentalna grupa Parametar	Kontrola	Estradiol	Gojazni	Gojazni + Estradiol
Masa tela [g]	171±10	216±6**	198±10*	217±12*
Masa srca [g]	1,14±0,03	1,154±0,023	1,29±0,02**	1,17±0,03#
INS [mIU/l]	70±4	212±22**	165±28*	180±28**
Glukoza [mmol/l]	9,5±0,3	10,89±0,33**	10,7±0,4*	10,3±0,4
Leptin [ng/ml]	0,06±0,01	0,09±0,02	0,20±0,01***	0,19±0,08*
HOMA-IR	30±1	102±14*	82±15*	82±13**
HOMA-β	235±25	473±127**	435±62*	552±92*
TC [mmol/l]	1,49±0,08	1,1±0,06**	1,72±0,04*	1,25±0,06*#
Tg [mmol/l]	1,27±0,07	2,2±0,45	1,64±0,14*	1,86±0,10**
CRP [ng/l]	43±1	48±4	60±2***	43±2***

Masa tela (merena neposredno pre žrtvovanja) i masa srca su izražene u g (n=6-7). Koncentracija insulina (INS) je izražena u mIU/l (n=4-5). Koncentracija glukoze (Glu) je izražena u mmol/l (n=7). Koncentracija leptina je izražena u ng/ml (n=3). Vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA-β su dobijene korišćenjem formula (n=4-5). Koncentracije holesterola (TC) i triglicerida (Tg) su izražene u mmol/l (n=5-7). Koncentracija C-reaktivniog proteina (CRP) je izražena mg/l (n=5-6). Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM. #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola.

Rezultati morfometrijskih merenja i analiza biohemijskih parametara (Obradovic, 2013) u serumu eksperimentalnih životinja prikazani su u Tabeli 1.

Polazeći od postavljenih ciljeva istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji su izučavani *in vivo* efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Takođe, izučavani su efekti estradiola na signalne molekule IRS-1, PI3K, Akt koji su uključeni u regulaciju ekspresije eNOS i iNOS, kao i na transkripcioni faktor NF-kB u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Interakcija estradiola sa komponentama RAS, koje imaju važnu ulogu u kardiovaskularnoj fiziologiji, praćena je merenjem nivoa proteina RhoA u lizatu i AT1R i AT2R u lizatu i plazma membrani kardiomiocita normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

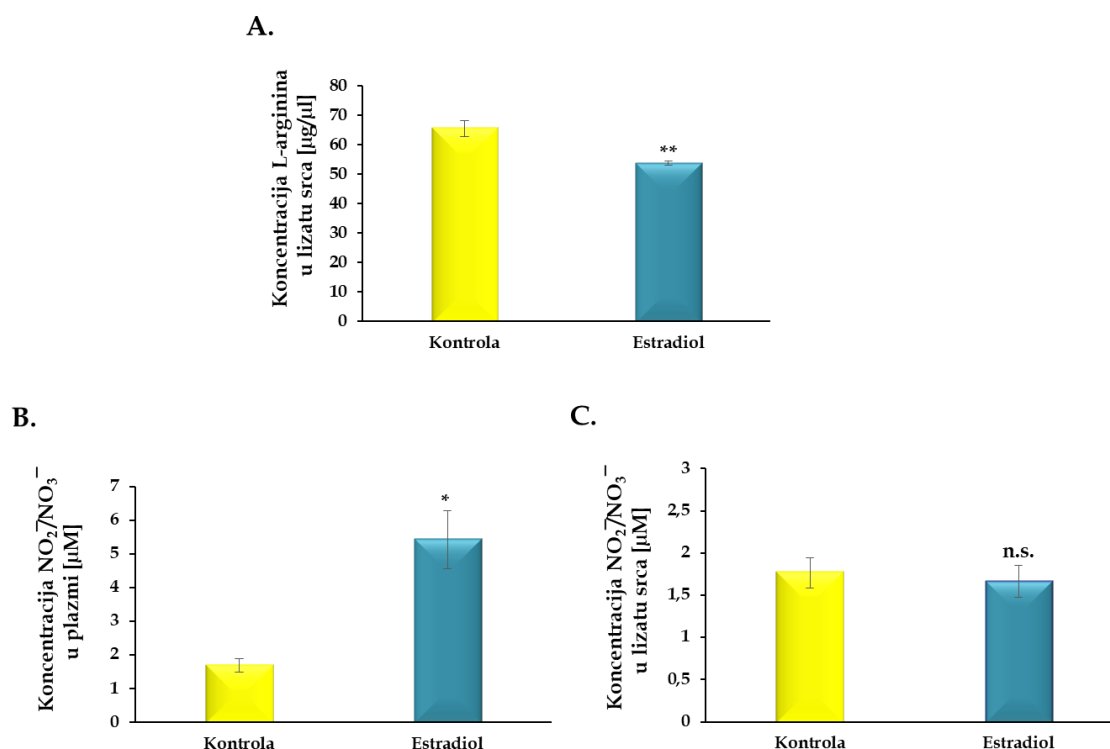
Srce je organ za čiji rad je konstantno neophodna energija za kontrakcije i najvećim delom srce koristi masne kiseline i glukozu da bi obezbedilo neophodnu energiju za rad. Transporteri masnih kiselina i glukoze imaju važnu ulogu u metabolizmu energetskih supstrata u srcu. U cilju izučavanja efekata koje estradiol ostvaruje na energetske supstrate u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova merena je koncentracija SMK u lizatu srca pacova, a takođe je praćena i preraspodela transportera CD36, GLUT1 i GLUT4 u unutarćelijskim membranskim frakcijama.

4.1. Efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih pacova

4.1.1. Efekti estradiola na koncentraciju L-Arg u lizatu i $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca normalno uhranjenih pacova

U cilju izučavanja efekata estradiola na regulaciju eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih pacova, prva istraživanja su bila usmerena na merenje koncentracije L-Arg i $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. Merenjem koncentracije L-Arg u lizatu srca normalno uhranjenih pacova dobijeni su rezultati (Slika 1.A) koji pokazuju da tretman estradiolom značajno smanjuje ($p < 0,01$) koncentraciju L-Arg u srcu u poređenju sa kontrolnim životinjama (Kontrola = $65,42 \pm 2,76 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Estradiol = $53,63 \pm 0,71 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Vrednosti dobijene merenjem koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca kontrolnih i normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom prikazane su na Slici 1. B i C. Tretman estradiolom ne dovodi do promene u koncentraciji $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u lizatu srca (Kontrola = $1,76 \pm 0,18 \mu\text{M}$; Estradiol = $1,66 \pm 0,18 \mu\text{M}$) (Slika 1.C), ali dovodi do značajnog povećanja ($p < 0,05$) koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (Slika 1.B) u poređenju sa koncentracijom $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi kontrolnih, normalno uhranjenih pacova (Kontrola = $1,69 \pm 0,19 \mu\text{M}$; Estradiol = $5,42 \pm 0,86 \mu\text{M}$).



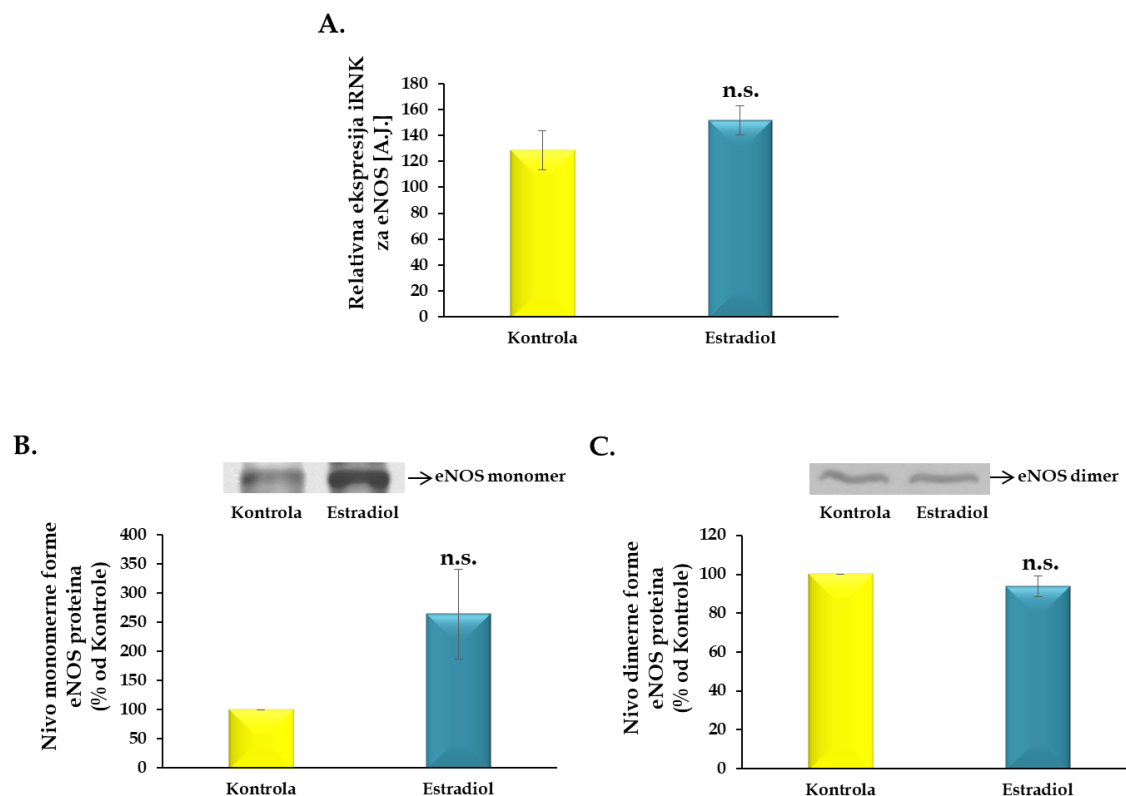
Slika 1. Koncentracija L-Arg u lizatu srca (A) i NO₂/NO₃ u plazmi (B) i lizatu srca (C) normalno uhranjenih i pacova tretiranih estradiolom

A. Koncentracija L-Arg u lizatu srca pacova izražena je u µg/µl; B. i C. Koncentracija NO₂/NO₃ u plazmi i lizatu izražena je u µM. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n=4-7) (*p<0,05; **p<0,01; n.s.-statistički neznačajno).

4.1.2. Uticaj estradiola na ekspresiju gena za eNOS u srcu normalno uhranjenih pacova

Rezultati efekta estradiola na ekspresiju gena za eNOS u srcu normalno uhranjenih pacova prikazani su na Slici 2. Merene su i neaktivna monomerna i aktivna dimerna forma eNOS proteina, budući da je za aktivaciju eNOS neophodna njegova dimerizacija. Dobijeni i prikazani rezultati (Slika 2. A) pokazuju da je nakon tretmana estradiolom relativna ekspresija gena za eNOS (iRNK: Kontrola=128±14 A.J.; Estradiol=151±11 A.J.) ostala nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu pacova. Izostanak efekta estradiola u srcu

normalno uhranjenih pacova takođe je zapažen i na nivou monomerne (Kontrola=100%; Estradiol=263±77%) (Slika 2. B) i dimerne (Kontrola=100%; Estradiol=94±5%) (Slika 2. C) forme eNOS proteina.



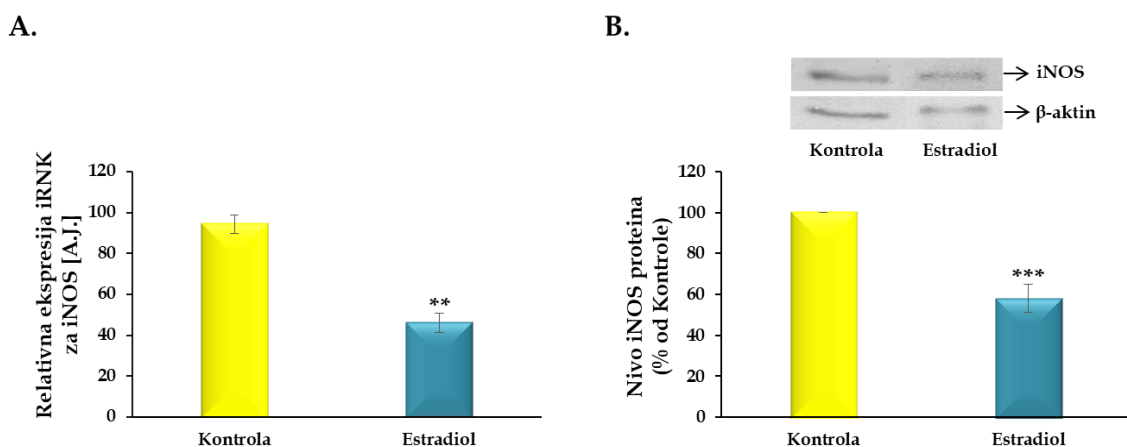
Slika 2. Efekat estradiola na relativnu ekspresiju gena za eNOS (A) i nivo monomerne (B) i dimerne (C) forme eNOS proteina u srcu normalno uhranjenih pacova

A. Relativna ekspresija gena za eNOS dobijena primenom qRT-PCR metode, izražena preko relativne količine iRNK za eNOS, kao A.J.; **B.** Rezultati nivoa monomerne forme eNOS proteina, dobijeni metodom imunoprecipitacije, su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu; **C.** Rezultati nivoa dimerne forme eNOS proteina, dobijeni metodom neredukujuće elektroforeze, su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM (n=3-4) (n.s.-statistički neznačajno).

A.J.-arbitrarna jedinica.

4.1.3. Efekti estradiola na ekspresiju gena za iNOS u srcu normalno uhranjenih pacova

Rezultati prikazani na Slici 3. pokazuju da je ekspresija gena za iNOS smanjena u srcu normalno uhranjenih životinja tretiranih estradiolom u poređenju sa vrednostima dobijenim kod netretiranih životinja i to iRNK za 51% (Kontrola=94±4 A.J.; Estradiol=46±5 A.J.; $p<0,01$), a nivo iNOS proteina za 42% (Kontrola=100%; Estradiol=58±7%; $p<0,001$).



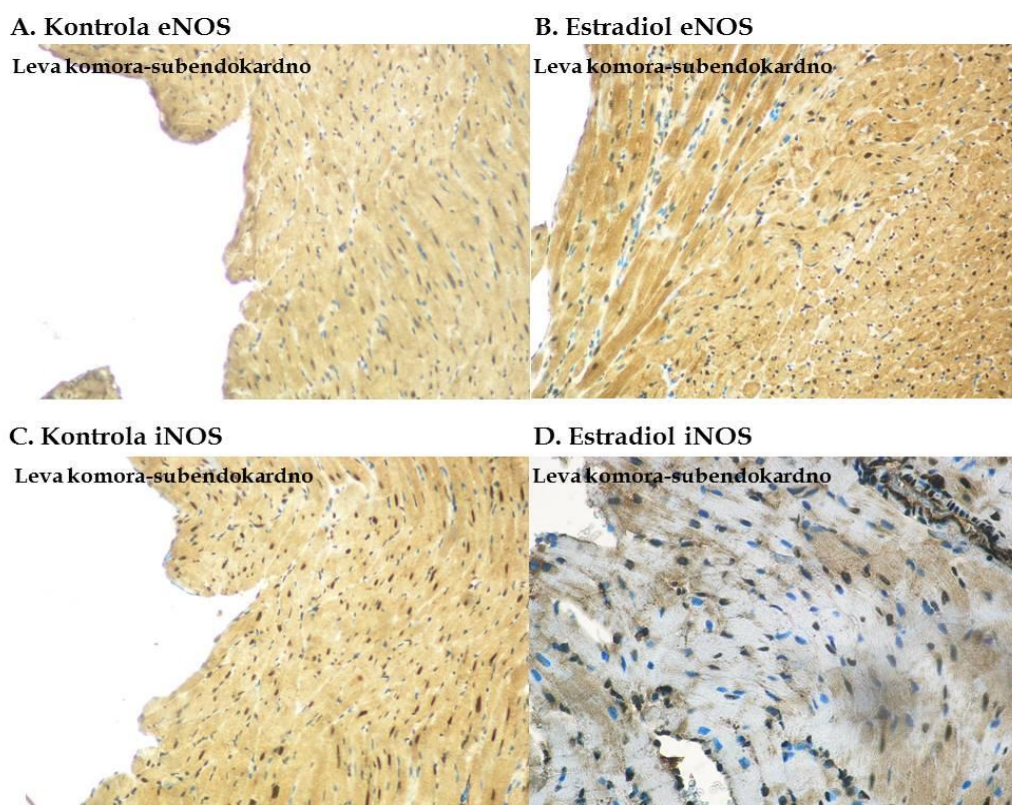
Slika 3. Efekat estradiola na relativnu ekspresiju gena za iNOS (A) i nivo iNOS proteina (B) u srcu normalno uhranjenih pacova

A. Relativna ekspresija gena za iNOS dobijena primenom qRT-PCR metode, izražena preko relativne količine iRNK za iNOS, kao A.J; **B.** Rezultati za nivo iNOS proteina dobijeni Western blot metodom, predstavljeni su kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM (n=3-5) (** $p<0,01$; *** $p<0,001$). A.J.-arbitrarna jedinica.

4.1.4. Imunohistohemijska detekcija eNOS i iNOS proteina u srcu kontrolnih i estradiolom tretiranih normalno uhranjenih pacova

Rezultati imunohistohemijske analize pokazuju da tretman estradiolom kod normalno uhranjenih pacova ne dovodi do promene u ekspresiji eNOS

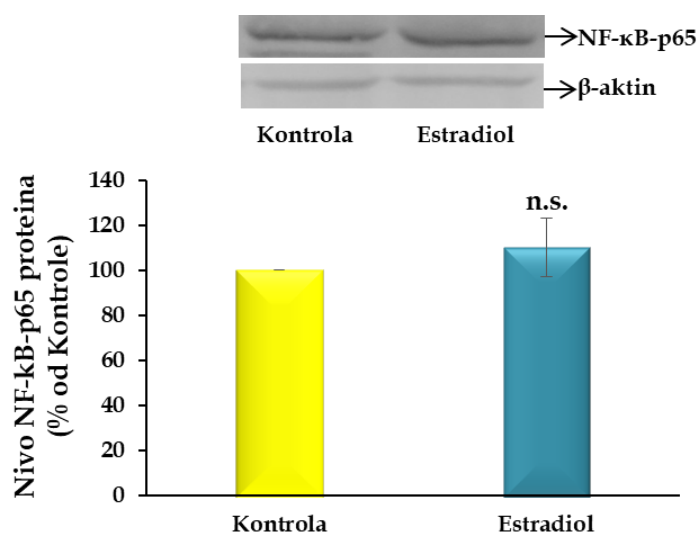
proteina u poređenju sa ekspresijom eNOS proteina zabeleženom kod netretiranih životinja (Slika 4. A i B), kao i da lokalizacija eNOS u srcu odgovara ravnomernoj, citoplazmatskoj distribuciji enzima u obe eksperimentalne grupe pacova (Slika 4. A i B). Takođe, rezultati imunohistohemijske analize dobijeni za ekspresiju iNOS proteina pokazuje da tretman estradiolom ne utiče na ekspresiju iNOS proteina kod normalno uhranjenih životinja u poređenju sa netretiranim kontrolama (Slika 4. C i D). Lokalizacija iNOS proteina je ravnomerno raspoređena po citoplazmi kardiomiocita obe analizirane grupe (Slika 4. C i D).



Slika 4. Imunohistohemijska detekcija eNOS (A i B) i iNOS (C i D) u predelu leve komore srca (UltraVision/DAB; uveličanja: A-D-20x). Kontrola-kontrolni, normalno uhranjeni pacovi (Slika 4. A, C); Estradiol-normalno uhranjeni pacovi tretirani estradiolom (Slika 4. B, D).

4.1.5. Nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NF- κ B u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom

Imajući u vidu da je ekspresija gena za iNOS regulisana transkripcionim faktorom NF- κ B, koji se vezuje za specifično mesto u okviru promotora gena za iNOS, na Slici 5. su prikazani rezultati efekta estradiola na nivo p65 subjedinice NF- κ B u lizatu srca normalno uhranjenih pacova. Tretman estradiolom ne dovodi do promene u nivou p65 subjedinice NF- κ B u poređenju sa netretiranim životinjama (Kontrola=100%; Estradiol=110 \pm 13%).



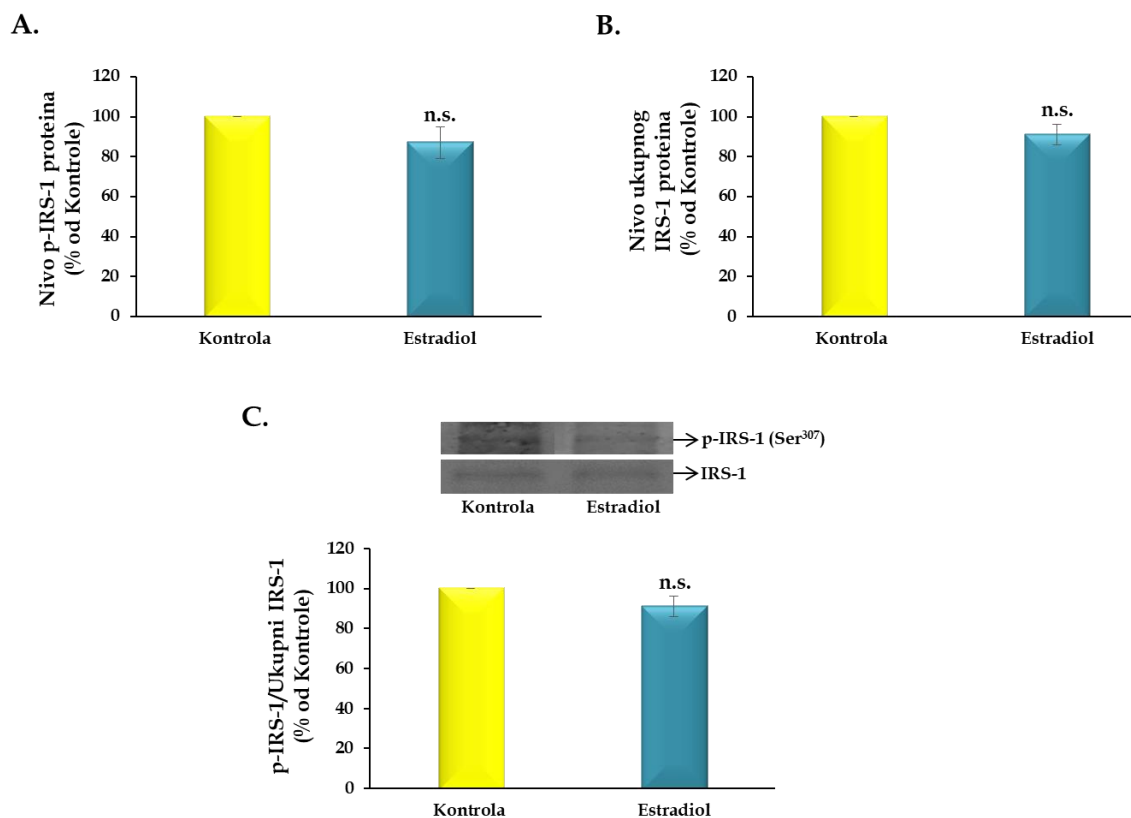
Slika 5. Uticaj tretmana estradiolom na nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NF- κ B u srcu normalno uhranjenih pacova

Rezultati nivoa NF- κ B-p65 proteina predstavljeni su kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju vrednost \pm SEM (n=5) (n.s.-statistički neznačajno).

4.1.6. Efekti estradiola na nivo proteina IRS-1, PI3K i Akt u srcu normalno uhranjenih pacova

Da bi se ustanovilo koji molekuli su uključeni signalni put kojim estradiol deluje na ekspresiju eNOS i iNOS, analiziran je nivo fosforilisane forme IRS-1 proteina na aminokiselini Ser³⁰⁷, nivo ukupnog IRS-1 proteina, kao i odnos fosforilisane forme IRS-1 i ukupnog IRS-1 proteina. Odnos fosforilisane forme i ukupnog nivoa proteina predstavlja stepen fosforilacije proteina na određenoj aminokiselini. Takođe, određivan je nivo regulatorne p85 i katalitičke p110 subjedinice PI3K, kao i asocijacija IRS-1 proteina sa regulatornom p85 subjedinicom PI3K, koja je neophodna za aktivaciju PI3K/Akt signalne kaskade. Efekat tretmana estradiolom na Akt kinazu, u srcu normalno uhranjenih pacova, određivan je merenjem nivoa fosforilisane forme Akt proteina na aminokiselini Thr³⁰⁸, ukupnog Akt proteina, kao i određivanjem odnosa fosforilisane forme i ukupnog Akt proteina.

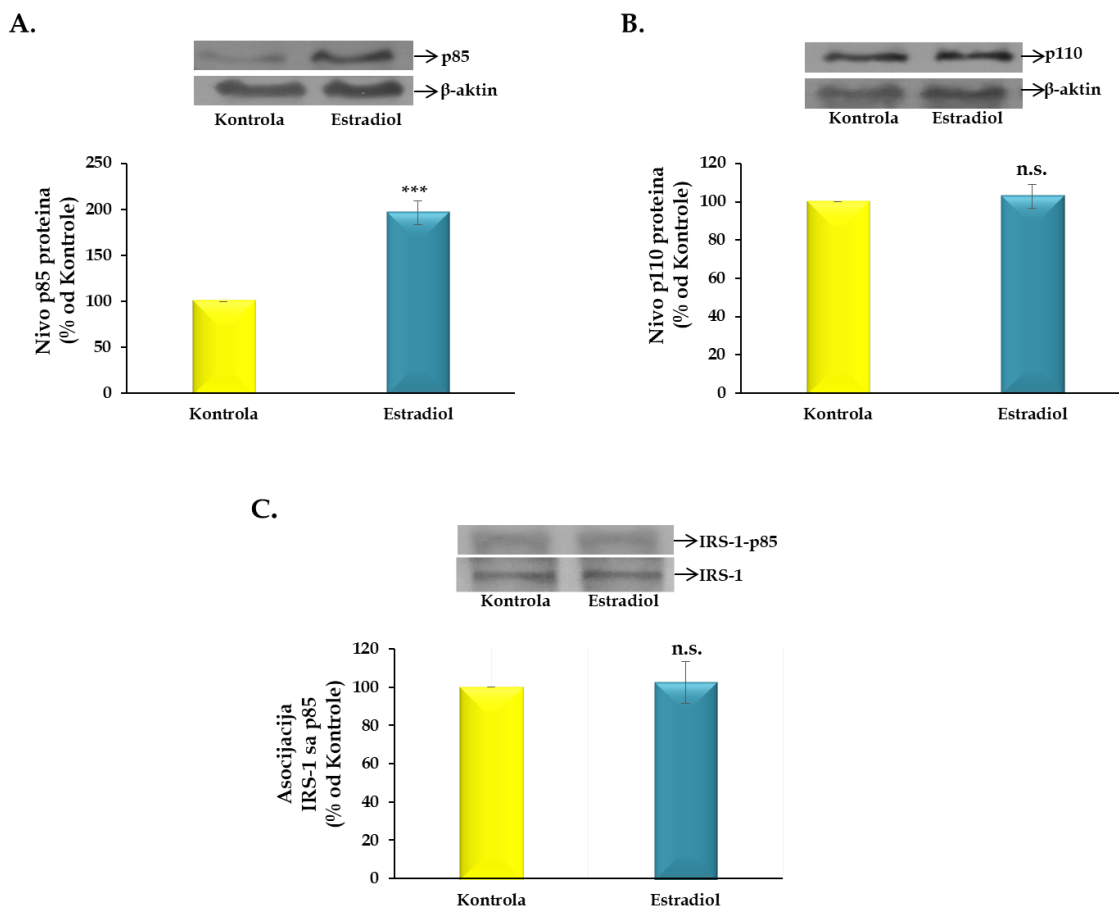
Dobijeni rezultati pokazuju da tretman estradiolom normalno uhranjenih pacova ne dovodi do značajnih promena u nivou fosforilacije IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ (Slika 6. A) (Kontrola=100%; Estradiol=87±8%), nivou ukupnog IRS-1 proteina (Slika 6. B) (Kontrola=100%; Estradiol=95±9%), kao ni njihovog odnosa (Slika 6. C) (Kontrola=100%; Estradiol=91±5%) u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne životinje.



Slika 6. Fosforilacija IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ i nivo ukupnog IRS-1 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova nakon tretmana estradiolom

A. Nivo fosforilacije IRS-1 proteina na aminokiselini Ser³⁰⁷; **B.** Nivo ukupnog IRS-1 proteina; **C.** Odnos nivoa p-IRS-1 i ukupnog IRS-1 proteina. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3-4$) (n.s.-statistički neznačajno).

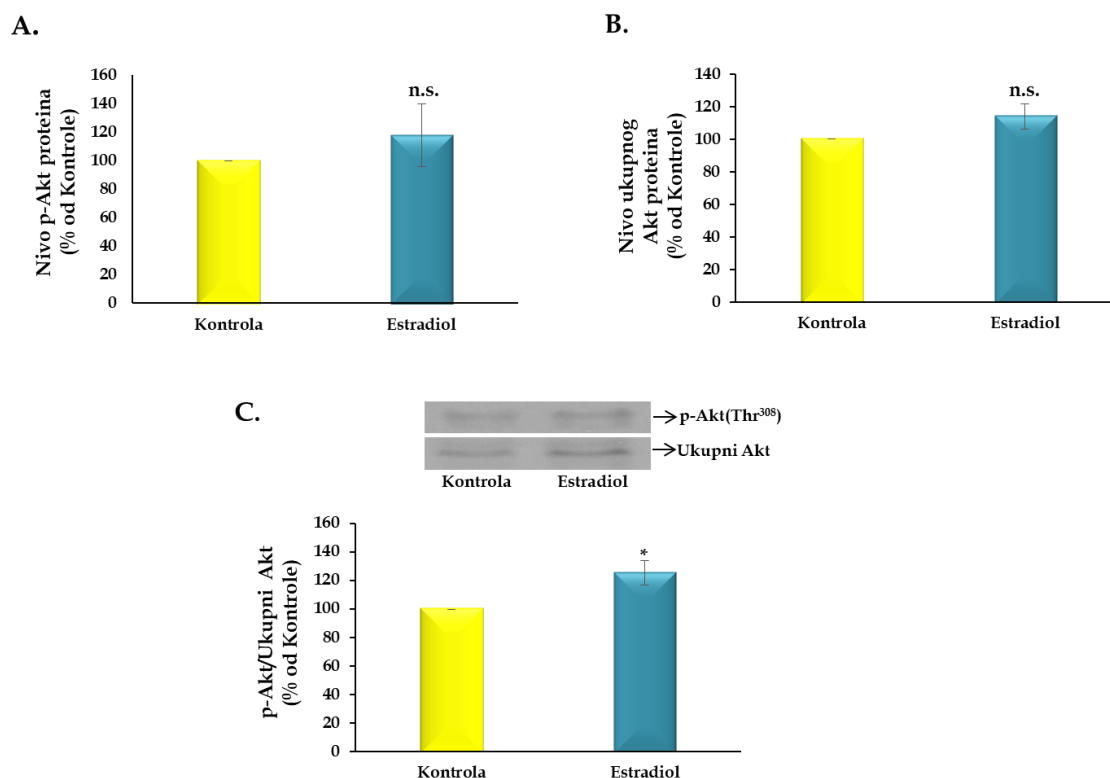
Tretman estradiolom normalno uhranjenih pacova dovodi do povećanja nivoa proteina p85 regulatorne subjediniice PI3K (Slika 7. A) (Kontrola=100%; Estradiol=196 \pm 13%; $p<0,001$), ali bez značajnih promena u nivou proteina za katalitičku p110 subjedinicu PI3K (Kontrola=100%; Estradiol=103 \pm 6%) (Slika 7. B). Osim toga, tretman estradiolom ne dovodi do značajnih promena u asocijaciji IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K u poređenju sa rezultatima dobijenim kod kontrolnih, normalno uhranjenih životinja (Slika 7. C) (Kontrola=100%; Estradiol=102 \pm 11%).



Slika 7. Efekat estradiola na nivo proteina p85 (A) i p110 (B) i asocijaciju IRS-1 sa p85 (C) u srcu normalno uhranjenih pacova

A. Nivo p85; B. Nivo p110; C. Asocijacija IRS-1 proteina sa p85. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=4$) (***) $p<0,001$; n.s.-statistički neznačajno).

Tretman estradiolom normalno uhranjenih pacova ne dovodi do značajnih promena u fosforilaciji Akt proteina na aminokiselini Thr³⁰⁸ (Slika 8. A) (Kontrola=100%; Estradiol=117 \pm 22%), niti promena u nivou ukupnog Akt proteina (Slika 8. B) (Kontrola=100%; Estradiol=114 \pm 8%), ali dovodi do povećanja ($p<0,05$) odnosa fosforilisane forme Akt (Thr³⁰⁸) i ukupnog Akt (Slika 8. C) u srcu u poređenju sa rezultatima dobijenim za kontrolne životinje (Kontrola=100%; Estradiol=125 \pm 9%).

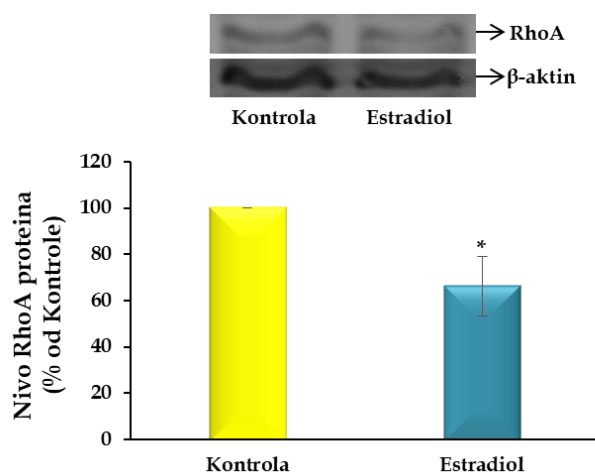


Slika 8. Efekat estradiola na fosforilaciju Akt na aminokiselini Thr³⁰⁸ i nivo ukupnog Akt proteina u srcu normalno uhranjenih pacova

A. Nivo fosforilacije Akt proteina na aminokiselini Thr³⁰⁸; **B.** Nivo ukupnog Akt proteina; **C.** Odnos vrednosti p-Akt i ukupnog Akt. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n=4-5) (*p<0,05; n.s.-statistički neznačajno).

4.1.7. Nivo RhoA proteina u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom

RhoA je mali GTP vezujući protein koji u srcu ima važnu ulogu u patofiziološkim stanjima, kao što su hipertenzija i insuficijencija rada srca. Rezultati merenja nivoa RhoA proteina u srcu normalno uhranjenih pacova prikazani su na Slici. 9, i pokazuju da tretman estradiolom dovodi do smanjenja (p<0,05) nivoa RhoA proteina u poređenju sa kontrolnim pacovima (Kontrola=100%; Estradiol=66±13%).



Slika 9. Efekat estradiola na nivo RhoA proteina u srcu normalno uhranjenih pacova

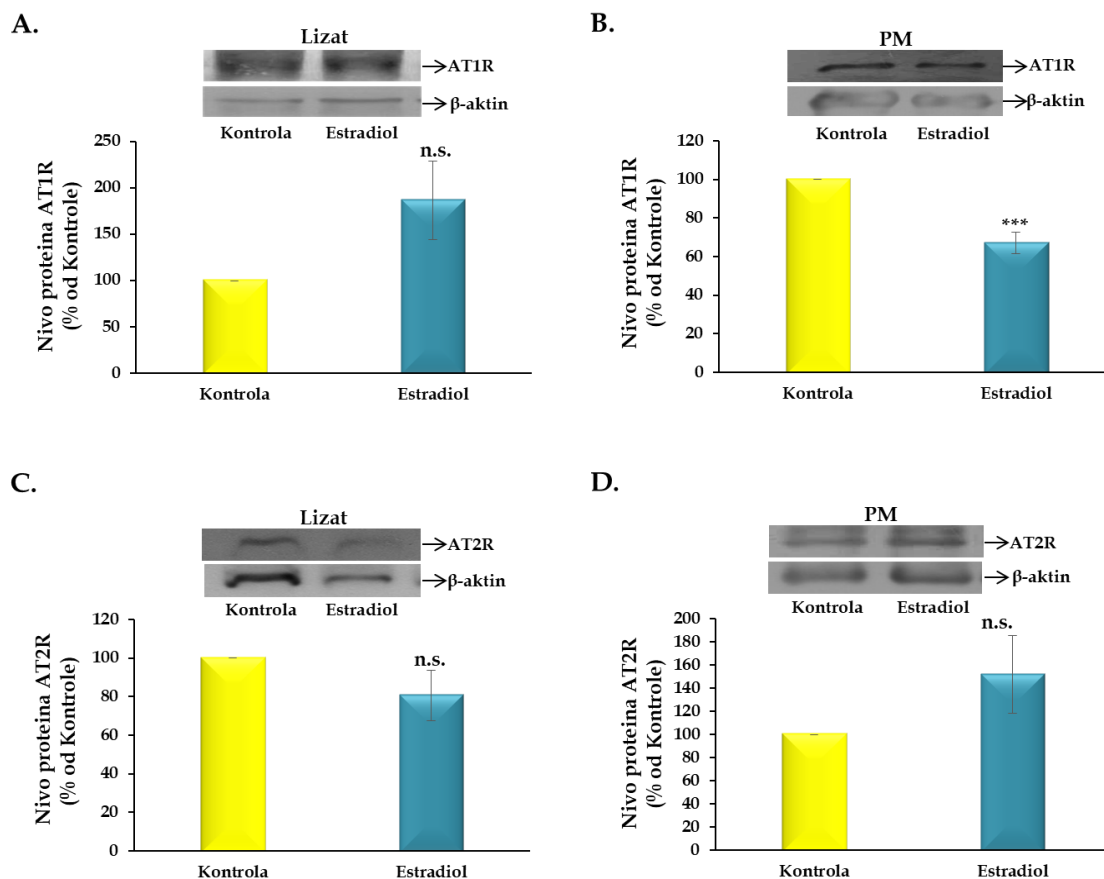
Rezultati za nivo RhoA proteina su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=5$) ($*p<0,05$).

4.1.8. Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu normalno uhranjenih pacova

Angiotenzin II ima značajnu ulogu u nastanku hipertenzije i endotelne disfunkcije. Svoje efekte AngII ostvaruje vezujući se za dva tipa receptora kada se nalaze na plazma membranama efektornih ćelija: AT1R i AT2R. Rezultati merenja nivoa AT1R i AT2R u srcu normalno uhranjenih pacova nakon tretmana estradiolom prikazani su na Slici 10. Tretman pacova estradiolom ne dovodi do značajnih promena u nivou AT1R u lizatu srca (Slika 10. A) (Kontrola=100%; Estradiol=186 \pm 43%), dok je nivo AT1R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca (Slika 10. B) smanjen ($p<0,001$) u odnosu na nivo AT1R kod kontrolnih pacova (Kontrola=100%; Estradiol=67 \pm 5%).

Tretman estradiolom ne dovodi do značajnih promena u nivou AT2R u lizatu (Slika 10. C) (Kontrola=100%; Estradiol=80 \pm 13%) i plazma membranskoj

frakciji tkiva srca normalno uhranjenih pacova (Slika 10. D) (Kontrola=100%; Estradiol=152±33%) u poređenju sa kontrolnim životinjama.



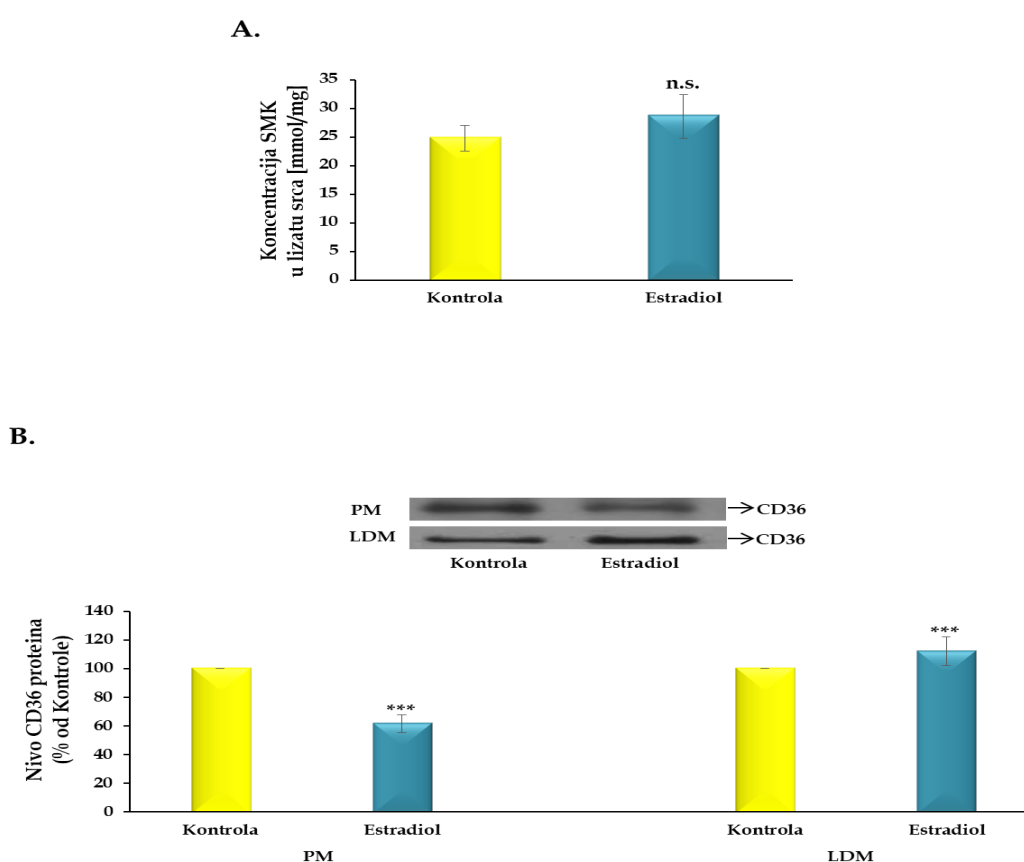
Slika 10. Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu normalno uhranjenih pacova

A. Nivo AT1R u lizatu srca pacova; **B.** Nivo AT1R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova; **C.** Nivo AT2R u lizatu srca pacova; **D.** Nivo AT2R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3-5$) (** $p<0,001$; n.s.-statistički neznačajno).

PM-plazma membrana.

4.1.9. Efekat estradiola na koncentraciju SMK i nivo CD36 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova

Rezultati merenja koncentracije SMK u lizatu srca normalno uhranjenih i normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom (Slika 11. A) pokazuju da davanje estradiola ne dovodi do značajnih promena u koncentraciji SMK (Kontrola=24,80±2,26 mmol/mg; Estradiol=28,64±3,80 mmol/mg).



Slika 11. Koncentracija SMK u lizatu (A) i nivo CD36 proteina (B) u plazma membranskim i LDM frakcijama tkiva srca normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom

A. Koncentracija SMK izražena je u mmol/mg tkiva i predstavlja srednju aritmetičku vrednost±SEM; **B.** Rezultati za nivo CD36 proteina su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM (n=3-5) (***) $p < 0,001$; n.s.-statistički neznačajno).

SMK-slobodne masne kiseline; PM-plazma membrana; LDM-mikrozomi male gustine.

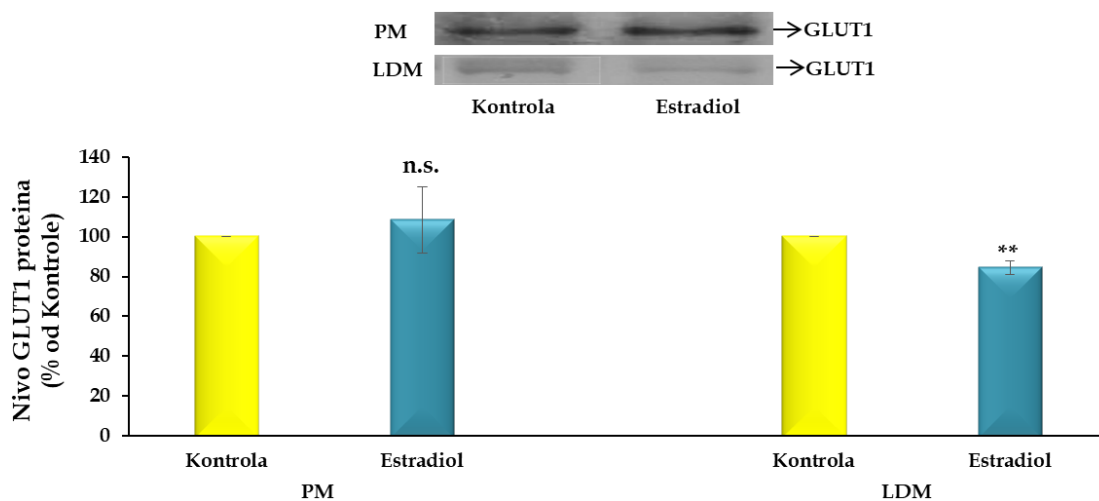
Unos energetskih supstrata u kardiomiocite se odvija uz učešće transpotera koji se translociraju iz unutarćelijskih depoa na plazma membranu kardiomiocita i na taj način omogućavaju ulazak supstrata u ćeliju. Merenjem nivoa transportera SMK, proteina CD36 (Slika 11. B) u srcu normalno uhranjenih pacova nakon tretmana estradiolom uočeno je smanjenje (38%; $p < 0,001$) sadržaja CD36 u plazma membranskoj frakciji tkiva srca (Kontrola=100%; Estradiol=62±6%), dok je povećanje ($p < 0,001$) sadržaja CD36 uočeno u LDM frakciji tkiva srca (Kontrola=100%; Estradiol=112±10%) u poređenju sa kontrolnim životinjama.

4.1.10. *In vivo* efekat estradiola na nivo GLUT1 i GLUT4 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova

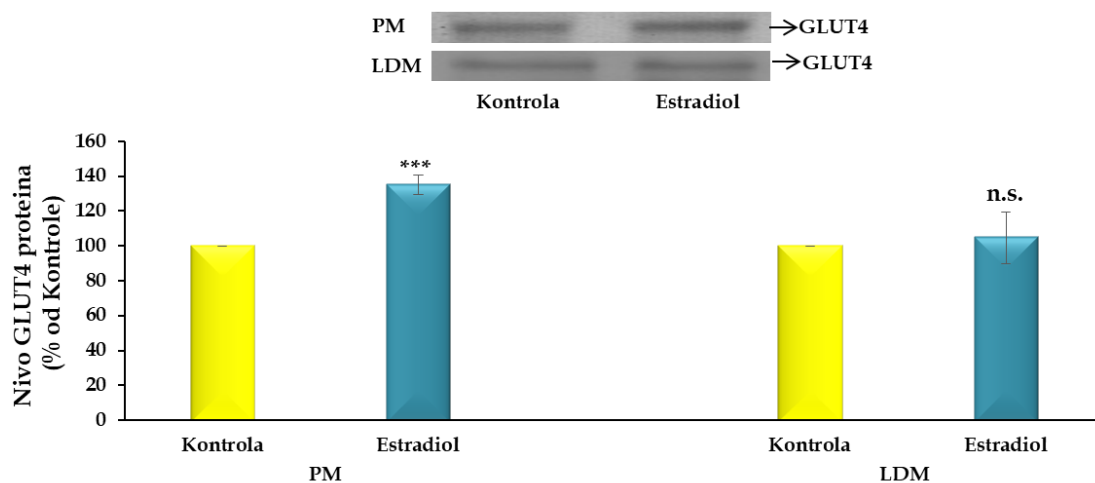
Unos glukoze u kardiomocite posredovan je familijom glukoznih transportera od kojih su GLUT1 i GLUT4 najzastupljeniji u srcu i imaju važnu ulogu u metabolizmu glukoze. Na Slici 12. A prikazani su rezultati dobijeni analizom efekata estradiola na nivo GLUT1 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova. Injeciranje estradiola ne dovodi do značajnih promena u nivou GLUT1 proteina u plazma membranskoj frakciji tkiva srca (Kontrola=100%; Estradiol=108±17%), ali dovodi do smanjenja ($p < 0,01$) u LDM frakciji (Kontrola=100%; Estradiol=84±3%) tkiva srca u poređenju sa kontrolnim pacovima.

Sa druge strane, estradiol uzrokuje povećanje nivoa drugog glukoznog transportera, GLUT4 u plazma membranskoj frakciji (Kontrola=100%; Estradiol=135±6%; $p < 0,001$) (Slika 12. B), ali ne dovodi do značajnih promena u LDM frakciji tkiva srca pacova (Kontrola=100%; Estradiol=104±15%) u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

A.



B.



Slika 12. Efekat estradiola na nivo GLUT1 (A) i GLUT4 (B) proteina u plazma membranskim i LDM frakcijama tkiva srca normalno uhranjenih pacova Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=4-5$) (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; n.s.-statistički neznačajno).

PM-plazma membrana; LDM-mikrozomi male gustine.

4.2. *In vivo* efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu gojaznih pacova

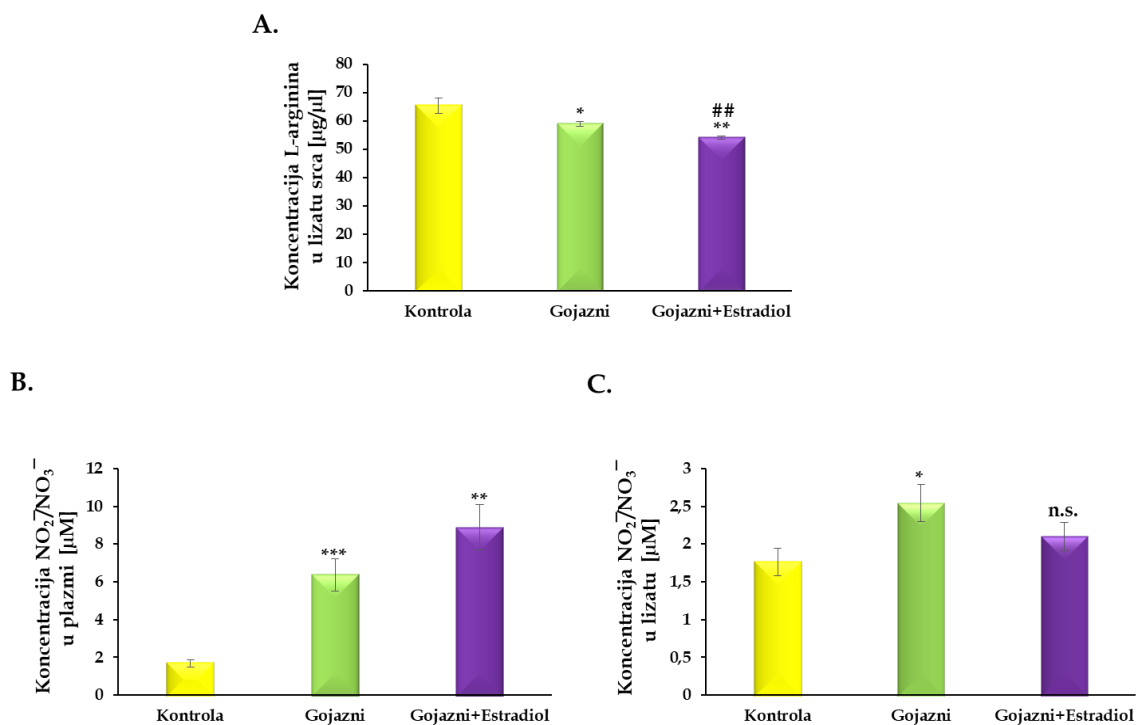
Prethodno prikazani rezultati jasno pokazuju da tretman estradiolom normalno uhranjenih životinja dovodi do promena u regulaciji ekspresije iNOS. Takođe je pokazano da tretman estradiolom normalno uhranjenih životinja ima uticaj na metabolizam energetskih supstrata u srcu. Stoga je sledeći set eksperimenata bio dizajniran sa ciljem da se ispita da li tretman estradiolom utiče na regulaciju eNOS i iNOS u srcu gojaznih pacova.

4.2.1. Efekat estradiola na koncentraciju L-Arg u lizatu i $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca gojaznih pacova

Koncentracija L-Arg u lizatu srca kontrolnih, gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazana je na Slici 13. A. Rezultati pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja koncentracije L-Arg ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih pacova, kao i da tretman estradiolom gojaznih pacova dovodi do smanjenja ($p < 0,01$) koncentracije L-Arg u poređenju sa vrednostima izmerenim kod netretiranih gojaznih pacova (Kontrola= $65,42 \pm 2,76$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Gojazni= $58,93 \pm 0,88$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Gojazni+Estradiol= $54,11 \pm 0,64$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca kontrolnih, gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazani su na Slici 13. B i C. Rezultati pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do povećanja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi ($p < 0,001$) i lizatu ($p < 0,05$) srca gojaznih pacova. Sa druge strane, koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi (Slika 13. B) (Kontrola= $1,69 \pm 0,19$ μM ; Gojazni= $6,36 \pm 0,84$ μM ; Gojazni+Estradiol= $8,88 \pm 1,19$ μM) i lizatu srca (Slika 13. C) (Kontrola= $1,79 \pm 0,18$

μM ; Gojazni= $2,54 \pm 0,24 \mu\text{M}$; Gojazni+Estradiol= $2,07 \pm 0,19 \mu\text{M}$) gojaznih pacova tretiranih estradiolom nije značajno promenjena u poređenju sa gojaznim, netretiranim životinjama.



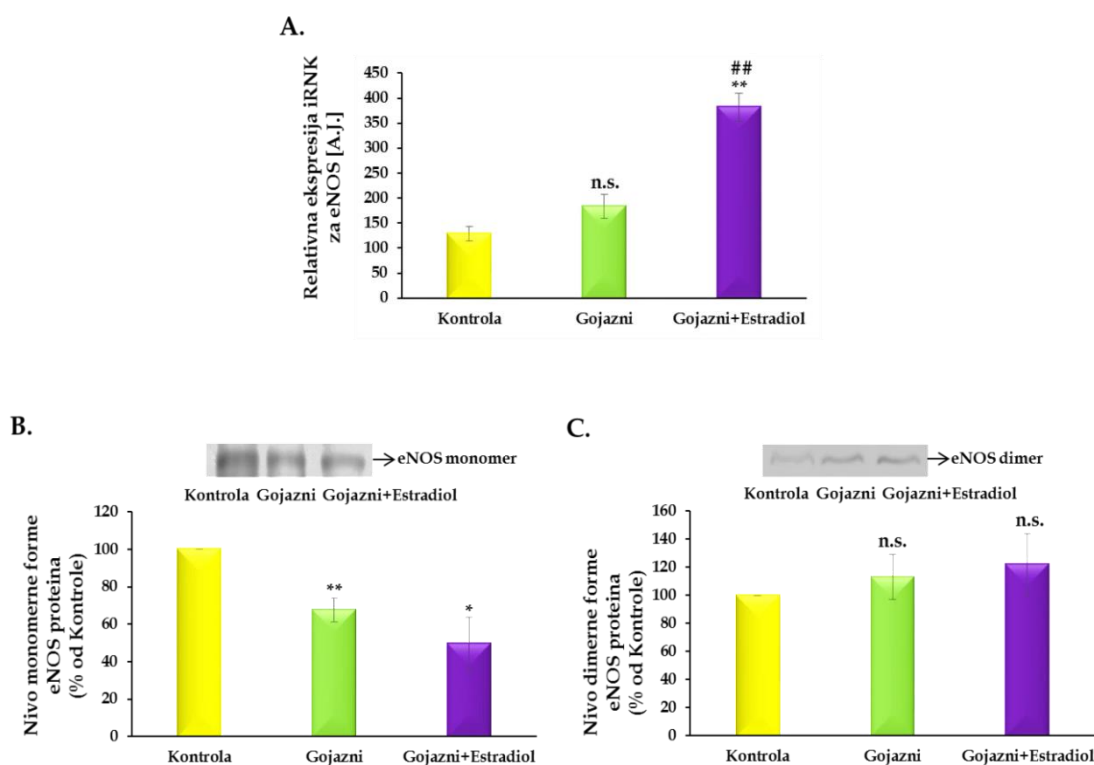
Slika 13. Efekat estradiola na koncentraciju L-Arg u lizatu (A) i koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi (B) i lizatu (C) srca gojaznih pacova

A. Koncentracija L-Arg u lizatu srca pacova izražena je u $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; B. i C. Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u plazmi i lizatu srca pacova izražena je u μM . Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=4-7$) ($###p<0,01$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

4.2.2. Efekat estradiola na ekspresiju gena za eNOS u srcu gojaznih pacova

Ekspresiju gena za eNOS u srcu gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazana je na Slici 14. Ishrana bogata mastima ne menja relativnu ekspresiju gena za eNOS i nivo dimerne forme eNOS proteina, ali smanjuje

($p < 0,01$) nivo monomerne forme eNOS proteina (Slika 14. B) u poređenju sa vrednostima dobijenim za normalno uhranjene životinje. Međutim, tretman estradiolom kod gojaznih pacova dovodi do povećanja (108%; $p < 0,01$) relativne ekspresije gena za eNOS (Slika 14. A) u poređenju sa gojaznim, netretiranim pacovima (Kontrola=128±14 A.J.; Gojazni=184±24 A.J.; Gojazni+Estradiol=382±29 A.J.), ali ne utiče na nivo monomerne (Slika 14. B) (Kontrola=100%; Gojazni=68±6%; Gojazni+Estradiol=49±14%) i dimerne forme eNOS proteina (Slika 14. C) (Kontrola=100%; Gojazni=113±16%; Gojazni+Estradiol=122±22%).

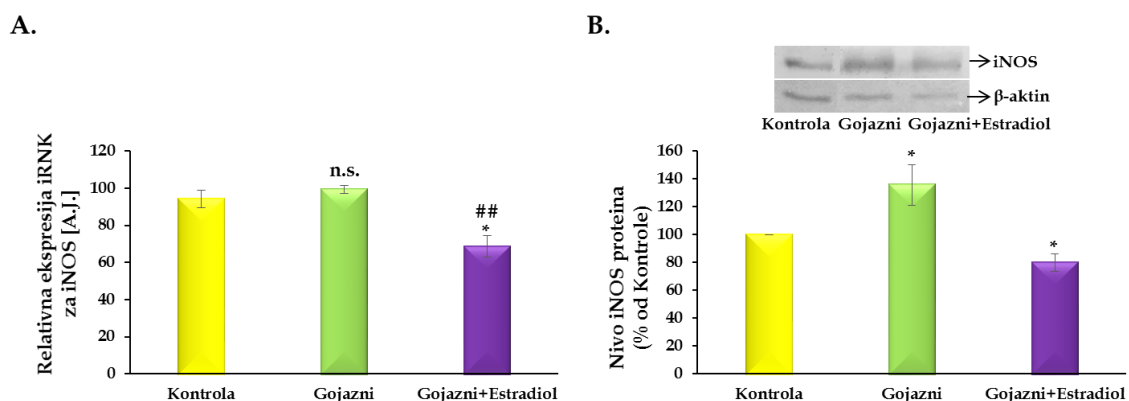


Slika 14. Efekat estradiola na relativnu ekspresiju gena za eNOS (A) i nivo monomerne (B) i dimerne (C) forme eNOS proteina u srcu gojaznih pacova

A. Relativna ekspresije gena za eNOS dobijena primenom qRT-PCR metode, izražena preko relativne količine iRNK za eNOS, kao A.J; **B.** Rezultati nivoa monomerne forme eNOS proteina, dobijeni metodom imunoprecipitacije, su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu; **C.** Rezultati nivoa dimerne forme eNOS proteina, dobijeni metodom neredukujuće elektroforeze, su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM (n=3-4) (## $p < 0,01$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno) A.J.-arbitrarna jedinica.

4.2.3 Ekspresija gena za iNOS u srcu gojaznih pacova tretiranih estradiolom

Ishrana bogata mastima ne dovodi do značajne promene u relativnoj ekspresiji gena za iNOS (Slika 15. A), ali dovodi do povećanja ($p < 0,05$) u nivou iNOS proteina (Slika 15. B) u poređenju sa normalno uhranjenim životinjama. Na Slici 15. A su prikazani rezultati koji pokazuju da tretman gojaznih pacova estradiolom dovodi do smanjenja (31%; $p < 0,01$) relativne ekspresije gena za iNOS (Kontrola = 94 ± 4 A.J.; Gojazni = 99 ± 2 A.J.; Gojazni+Estradiol = 68 ± 6 A.J.), bez uticaja na nivo iNOS proteina (Slika 15. B) u poređenju sa netretiranim, gojaznim pacovima (Kontrola = 100%; Gojazni = 136 ± 14 %; Gojazni+Estradiol = 80 ± 6 %).

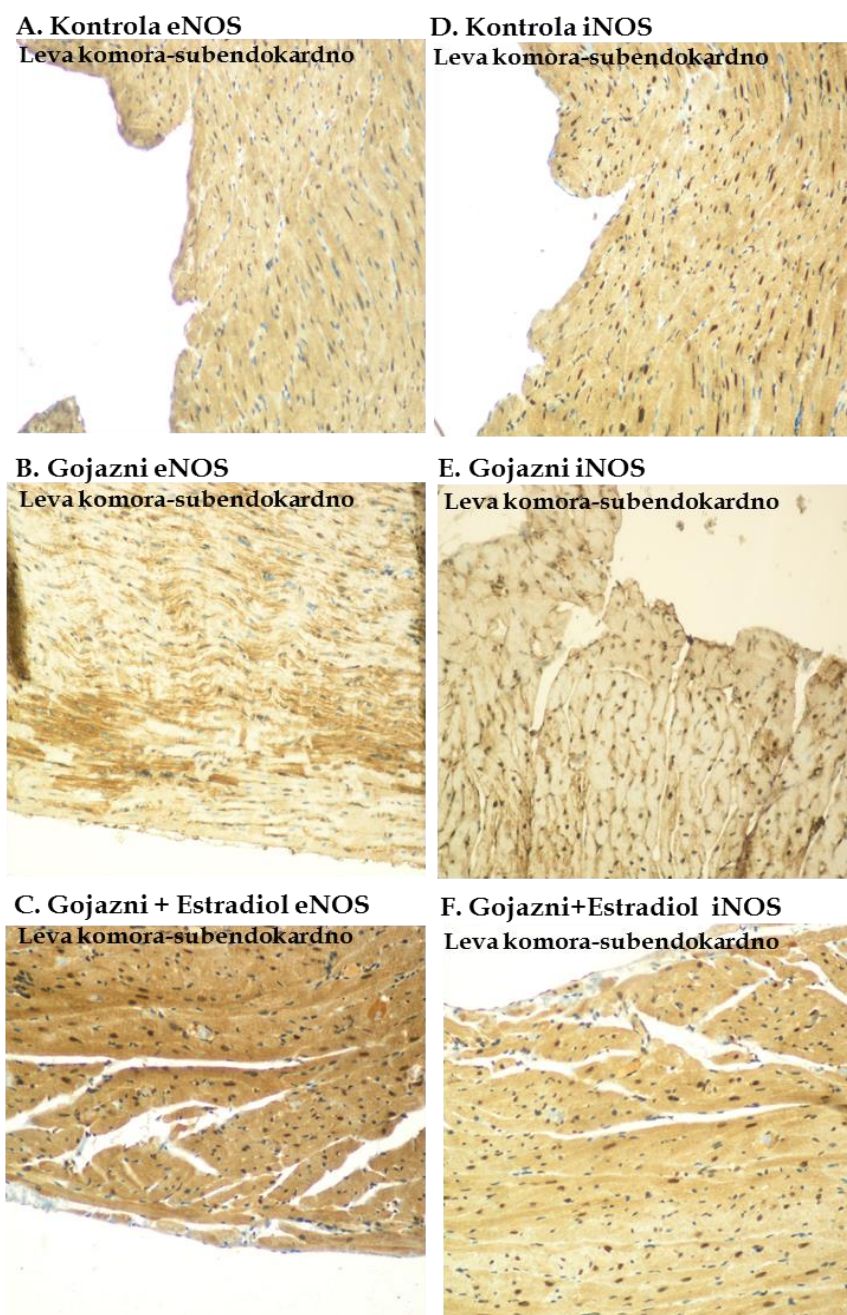


Slika 15. Efekat estradiola na relativnu ekspresiju gena za iNOS (A) i nivo iNOS proteina (B) u srcu gojaznih pacova

A. Relativna ekspresija gena za iNOS dobijena primenom qRT-PCR metode, izražena preko relative količine iRNK, kao A.J.; **B.** Rezultati za nivo iNOS proteina dobijeni Western blot metodom, predstavljeni su kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n=3-5$) (## $p < 0,01$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; * $p < 0,05$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola; n.s.-statistički neznačajno). A.J.-arbitrarna jedinica.

4.2.4. Uticaj tretmana estradiolom na imunohistohemijsku detekciju eNOS i iNOS proteina u srcu gojaznih pacova

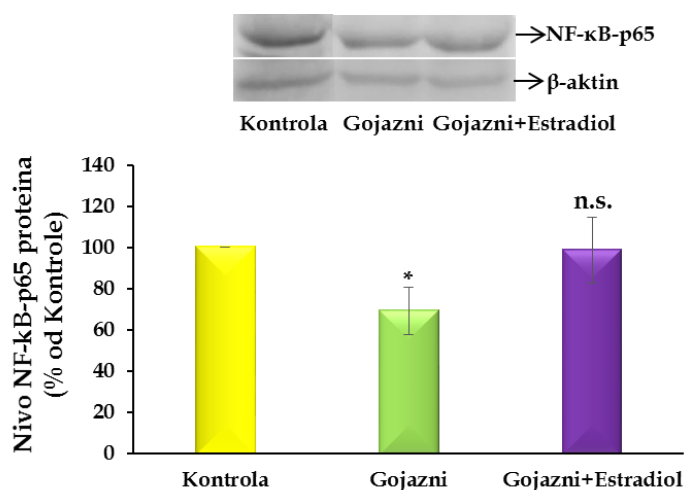
Rezultati imunohistihemijske analize prikazani su na Slici 16. Nije uočena promena u ekspresiji kako eNOS tako i iNOS proteina kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom u poređenju sa kontrolnim životinjama. Sa druge strane, imunohistohemijska analiza isečaka srca pacova pokazala je da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja ekspresije eNOS i iNOS proteina u poređenju sa kontrolnim, normalno uhranjenim životinjama (Slika 16. B i E). Lokalizacija eNOS proteina u grupi gojaznih pacova tretiranih estradiolom (Slika 16. C) odgovara ravnomernoj, intracitoplazmatskoj distribuciji enzima, dok je kod kontrolnih (Slika 16. A) i gojaznih (Slika 16. B) životinja lokalizacija eNOS proteina pretežno periferna, neposredno ispod plazma membrane kardiomiocita. Rezultati dobijeni za iNOS protein pokazuju da je kod kontrolnih pacova (Slika 16. D) i gojaznih pacova koji su tretirani estradiolom (Slika 16. F) lokalizacija iNOS proteina ravnomerno raspoređena po citoplazmi, dok u grupi gojaznih pacova (Slika 16. E) postoji periferna lokalizacija iNOS proteina .



Slika 16. *Imunohistohemijsko bojenje na eNOS i iNOS u predelu leve komore (UltraVision/DAB; uveličanja: A-D-20x). Kontrola-normalno uhranjeni (Slika 16. A, D); Gojazni-gojazni pacovi (Slika 16. B, E); Gojazni+Estradiol-gojazni pacovi tretirani estradiolom (Slika 16. C, F).*

4.2.5. Efekat tretmana estradiolom na nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NF-kB u srcu gojaznih pacova

Na Slici 17. prikazani su rezultati merenja nivoa proteina p65 subjedinice NF-kB u srcu kontrolnih, gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom. Ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja ($p < 0,05$) nivoa p65 subjedinice NF-kB u lizatu srca gojaznih pacova. Sa druge strane, tretman estradiolom gojaznih pacova ne dovodi do značajne promene u nivou p65 proteina u poređenju sa rezultatima dobijenim kod gojaznih, netretiranih pacova (Kontrola=100%; Gojazni=69±11%; Gojazni+Estradiol=99±14%).

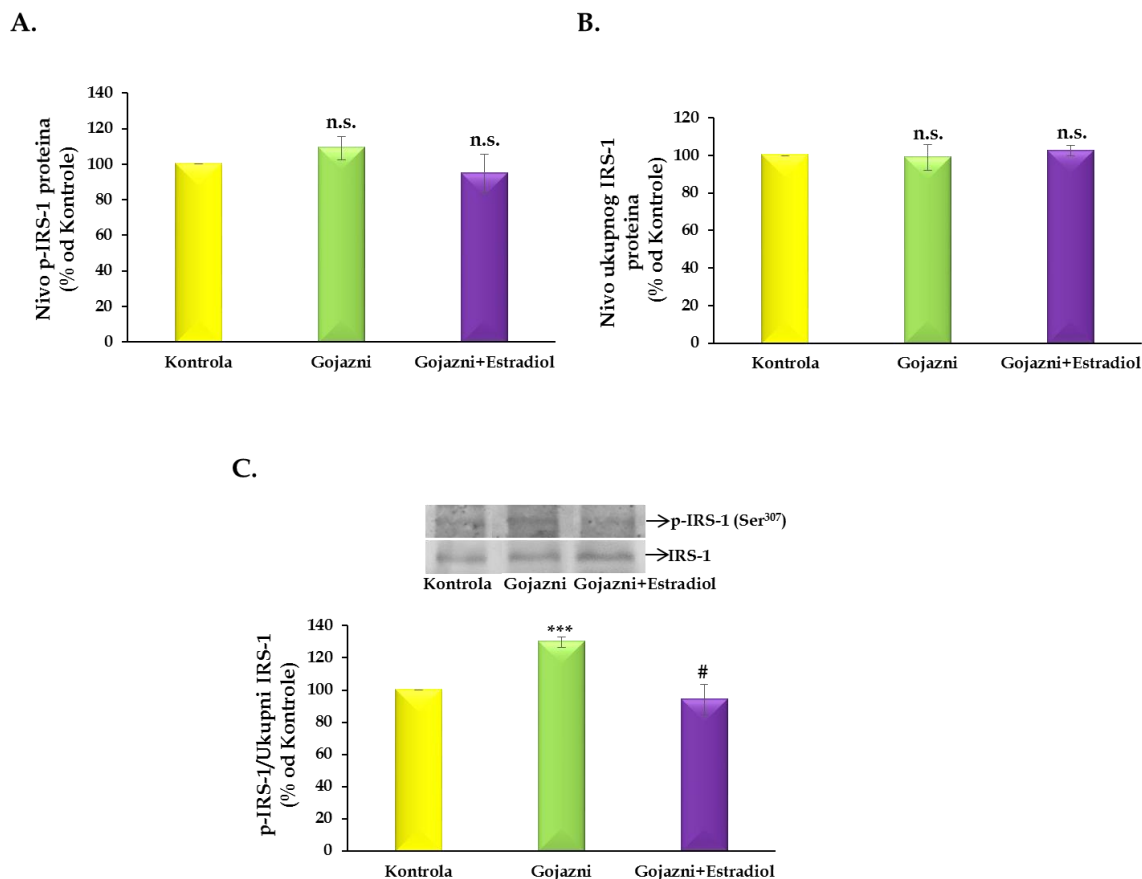


Slika 17. Nivo proteina p65 subjedinice transkripcionog faktora NF-kB u srcu gojaznih pacova pod delovanjem estradiola

Rezultati za nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NF-kB, predstavljeni su kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju vrednost±SEM ($n=4$) (* $p < 0,05$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

4.2.6. Efekti estradiola na nivoe proteina IRS-1, PI3K i Akt u srcu gojaznih pacova

Rezultati efekta ishrane bogate mastima i tretmana estradiolom kod gojaznih pacova na nivoe IRS-1 proteina, kao i PI3K i Akt kinaze u srcu pacova prikazani su na Slikama 18-20. Rezultati prikazani na Slici 18. A pokazuju da ishrana bogata mastima, kao i tretman estradiolom kod gojaznih pacova ne dovode do značajnih promena u nivou fosforilacije IRS-1 proteina na aminokiselini Ser³⁰⁷ (Kontrola=100%; Gojazni=109±7%; Gojazni+Estradiol=95±11%), kao ni do promena u nivou ukupnog IRS-1 proteina (Slika 18. B) (Kontrola=100%; Gojazni=99±7%; Gojazni+Estradiol=102±3%). Tretman estradiolom kod gojaznih pacova dovodi do smanjenja odnosa fosforilisane i ukupne forme IRS-1 ($p<0,05$) u poređenju sa gojaznim, netretiranim životinjama, dok je kod gojaznih životinja (Slika 18. C) isti odnos povećan ($p<0,001$) u poređenju sa normalno uhranjenim pacovima (Kontrola=100%; Gojazni=130±3%; Gojazni+Estradiol=94±9%).

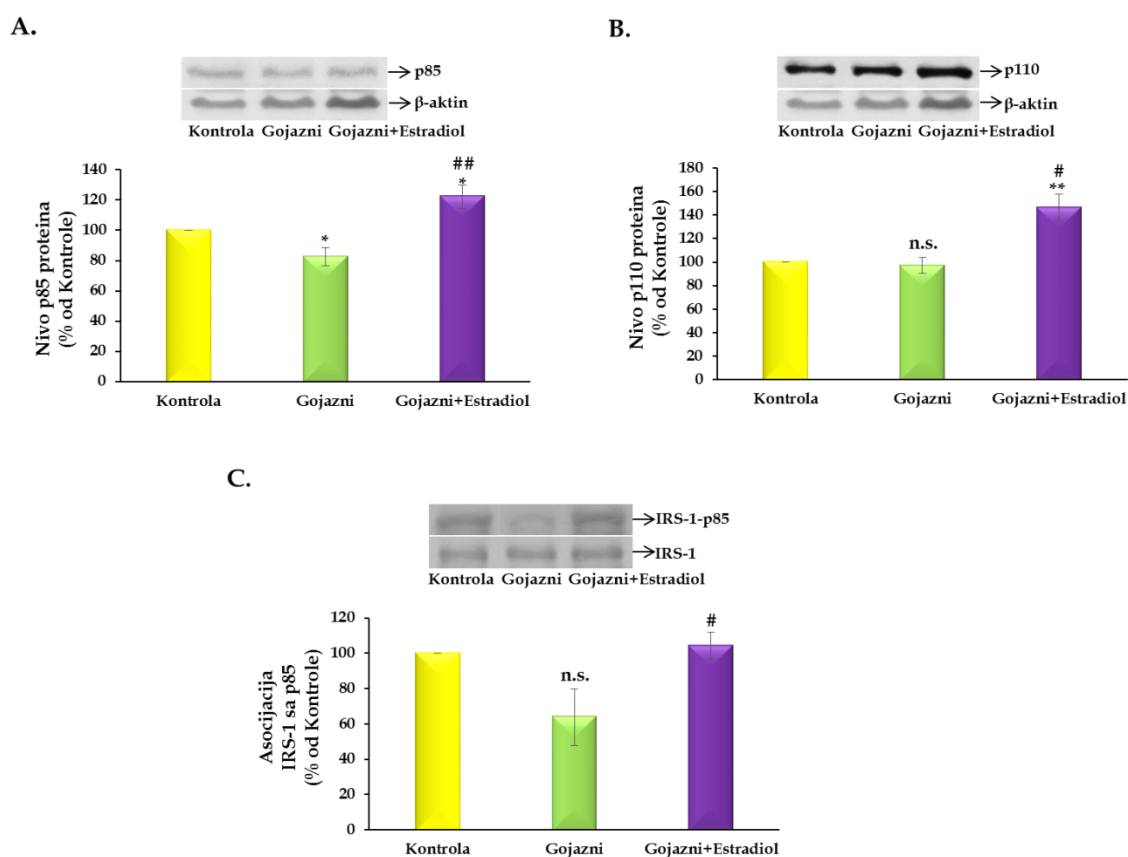


Slika 18. Efekat estradiola na fosforilaciju IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ i nivo ukupnog IRS-1 proteina u srcu gojaznih pacova

A. Nivo fosforilacije IRS-1 proteina na aminokiselini Ser³⁰⁷; **B.** Nivo ukupnog IRS-1 proteina; **C.** Odnos nivoa p-IRS-1 i ukupnog IRS-1 proteina. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3$) (# $p<0,05$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; *** $p<0,001$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

Na Slici 19. su prikazani rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina obe subjedinice PI3K (p85: Kontrola=100%; Gojazni=83 \pm 6%; Gojazni+Estradiol=122 \pm 8%; p110: Kontrola=100%; Gojazni=97 \pm 7%; Gojazni+Estradiol=146 \pm 11%), kao i asocijacije IRS-1 proteina sa regulatornom subjedinicom PI3K (Kontrola=100%; Gojazni=64 \pm 16%; Gojazni+Estradiol=104 \pm 8%). Rezultati pokazuju smanjenje ($p<0,05$) nivoa p85 proteina u srcu gojaznih pacova (Kontrola=100%; Gojazni=83 \pm 6%), ali nisu uočene promene u nivou asocijacije IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K

(Slika 19. C) i nivou katalitičke p110 subjedinice PI3K (Slika 19. B), u poređenju sa vrednostima dobijenim za normalno uhranjene pacove. Sa druge strane, tretman estradiolom kod gojaznih pacova povećava nivoe proteina obe subjedinice PI3K, kako regulatorne p85 (47%; $p < 0,01$) (Slika 19. A) tako i katalitičke p100 (51%; $p < 0,05$) (Slika 19. B), a dovodi i do povećanja (62%; $p < 0,05$) asocijacije IRS-1 sa p85 proteinom (Slika 31. C) u poređenju sa vrednostima dobijenim kod netretiranih, gojaznih životinja.

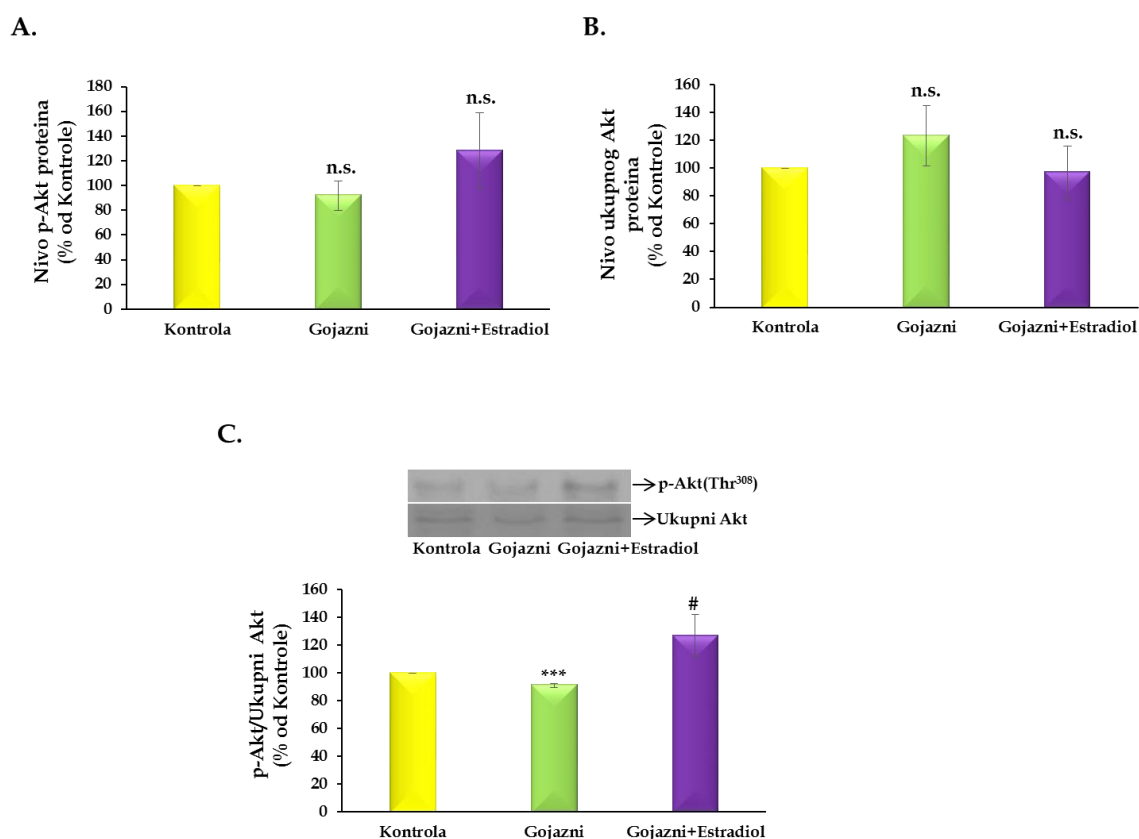


Slika 19. Efekat estradiola na nivo p85 (A) i p110 (B) subjedinice PI3K i asocijaciju IRS-1 sa p85 proteinom (C) u srcu gojaznih pacova

A. Nivo p85 proteina; B. Nivo p110 proteina; C. Asocijacija IRS-1 proteina sa p85 proteinom. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3-4$) (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

Rezultati merenja nivoa Akt kinaze pokazuju da ishrana bogata mastima, kao i tretman estradiolom kod gojaznih pacova ne dovode do promena u nivou

fosforilacije Akt na aminokiselini Thr³⁰⁸ (Kontrola=100%; Gojazni=92±12%; Gojazni+Estradiol=128±31%), niti u nivou ukupnog Akt proteina (Kontrola=100%; Gojazni=123±22%; Gojazni+Estradiol=97±19%). Merenjem odnosa fosforilisane (Thr³⁰⁸) i ukupne forme Akt proteina (Kontrola=100%; Gojazni=91±1%; Gojazni+Estradiol=127±15%) uočeno je smanjenje ovog odnosa ($p < 0,001$) kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj mastima u odnosu na normalno uhranjene životinje. Sa druge strane tretman gojaznih pacova estradiolom povećava ($p < 0,05$) odnos fosforilisane (Thr³⁰⁸) i ukupne forme Akt proteina za 40% u odnosu na gojazne, netretirane životinje.

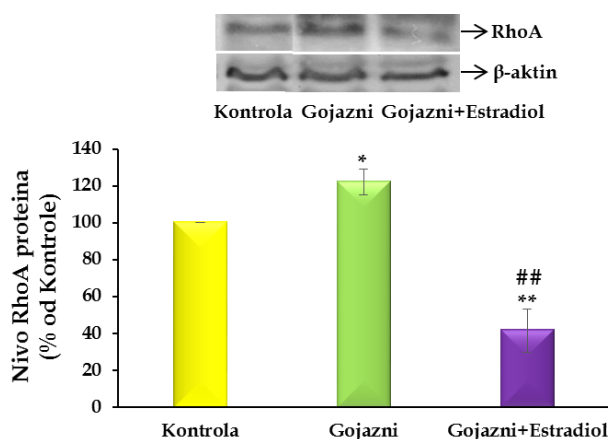


Slika 20. Efekat estradiola na fosforilaciju Akt proteina na aminokiselini Thr³⁰⁸ i nivo ukupnog Akt proteina u srcu gojaznih pacova

A. Nivo fosforilacije Akt proteina na aminokiselini Thr³⁰⁸; **B.** Nivo ukupnog Akt proteina; **C.** Odnos vrednosti p-Akt i ukupnog Akt. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM ($n=4-6$) (# $p < 0,05$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; *** $p < 0,001$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

4.2.7. Nivo RhoA proteina u srcu gojaznih pacova tretiranih estradiolom

Rezultati merenja nivoa RhoA proteina u lizatu srca kontrolnih, gojaznih, kao i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazani su na Slici 21. Ishrana bogata mastima dovela do povećanja ($p < 0,05$) nivoa RhoA proteina u poređenju sa vrednostima dobijenim za normalno uhranjene životinje (Kontrola=100%; Gojazni=122±7%; Gojazni+Estradiol=41±12%). Sa druge strane, tretman estradiolom kod gojaznih pacova dovodi do smanjenja ($p < 0,01$) nivoa RhoA proteina za 66% u poređenju sa vrednostima dobijenim kod netretiranih gojaznih pacova.



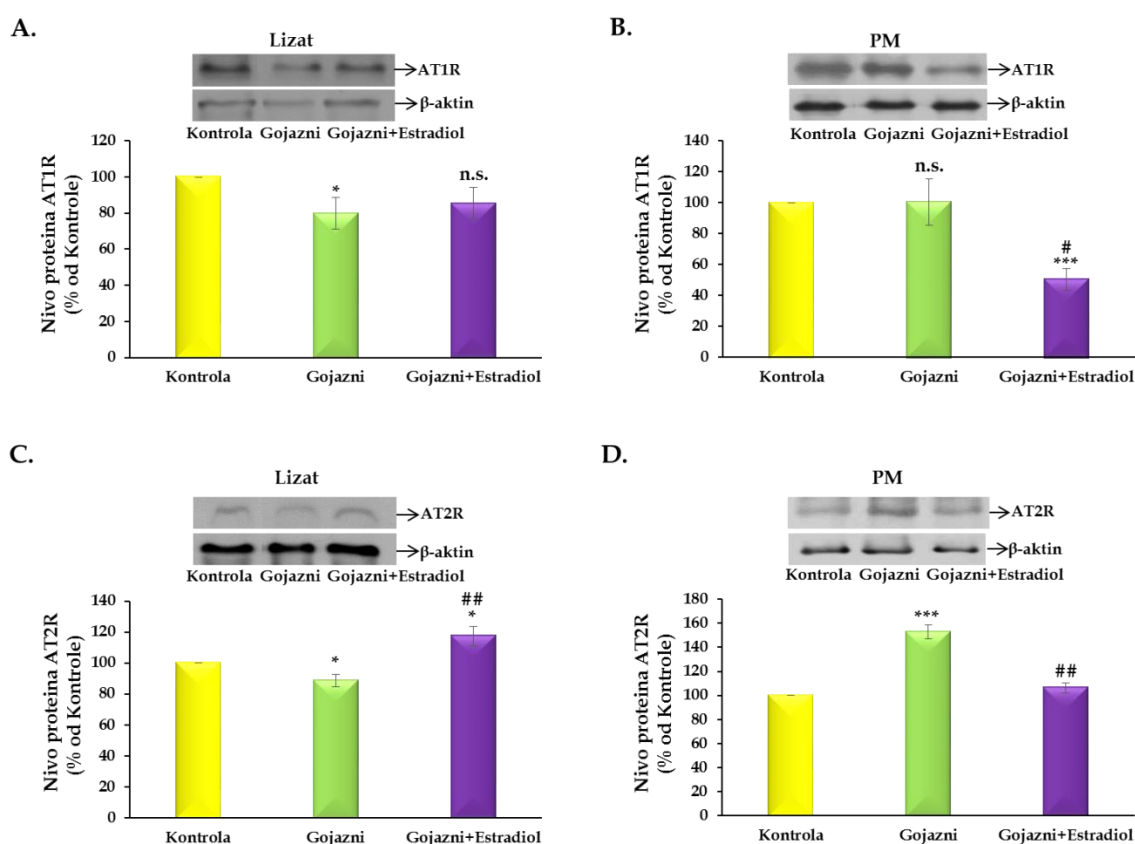
Slika 21. Efekat estradiola na nivo RhoA proteina u srcu gojaznih pacova

Rezultati za nivo RhoA proteina su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM ($n=4-5$) (## $p < 0,01$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu).

4.2.8. Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu gojaznih pacova

Rezultati merenja nivoa AT1R i AT2R u plazma membranskoj frakciji (AT1R: Kontrola=100%; Gojazni=100±15%; Gojazni+Estradiol=50±7%; AT2R:

Kontrola=100%; Gojazni=153±6%; Gojazni+Estradiol=106±4%) tkiva srca kontrolnih, gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazani su na Slici 22. B i D. Rezultati pokazuju smanjenje nivoa AT1R i AT2R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca gojaznih pacova tretiranih estradiolom u poređenju sa gojaznim, netretiranim pacovima. Ishrana bogata mastima dovodi do povećanja samo nivoa AT2R dok na nivo AT1R ne utiče u poređenju sa normalno uhranjenjnim životinjama.



Slika 22. Efekat estradiola na nivo AT1R i AT2R u srcu gojaznih pacova

A. Nivo AT1R u lizatu srca pacova; **B.** Nivo AT1R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova; **C.** Nivo AT2R u lizatu srca pacova; **D.** Nivo AT2R u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost±SEM (n=3-5) (#p<0,05; ##p<0,01; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; *p<0,05; ***p<0,001; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno). PM-plazma membrana.

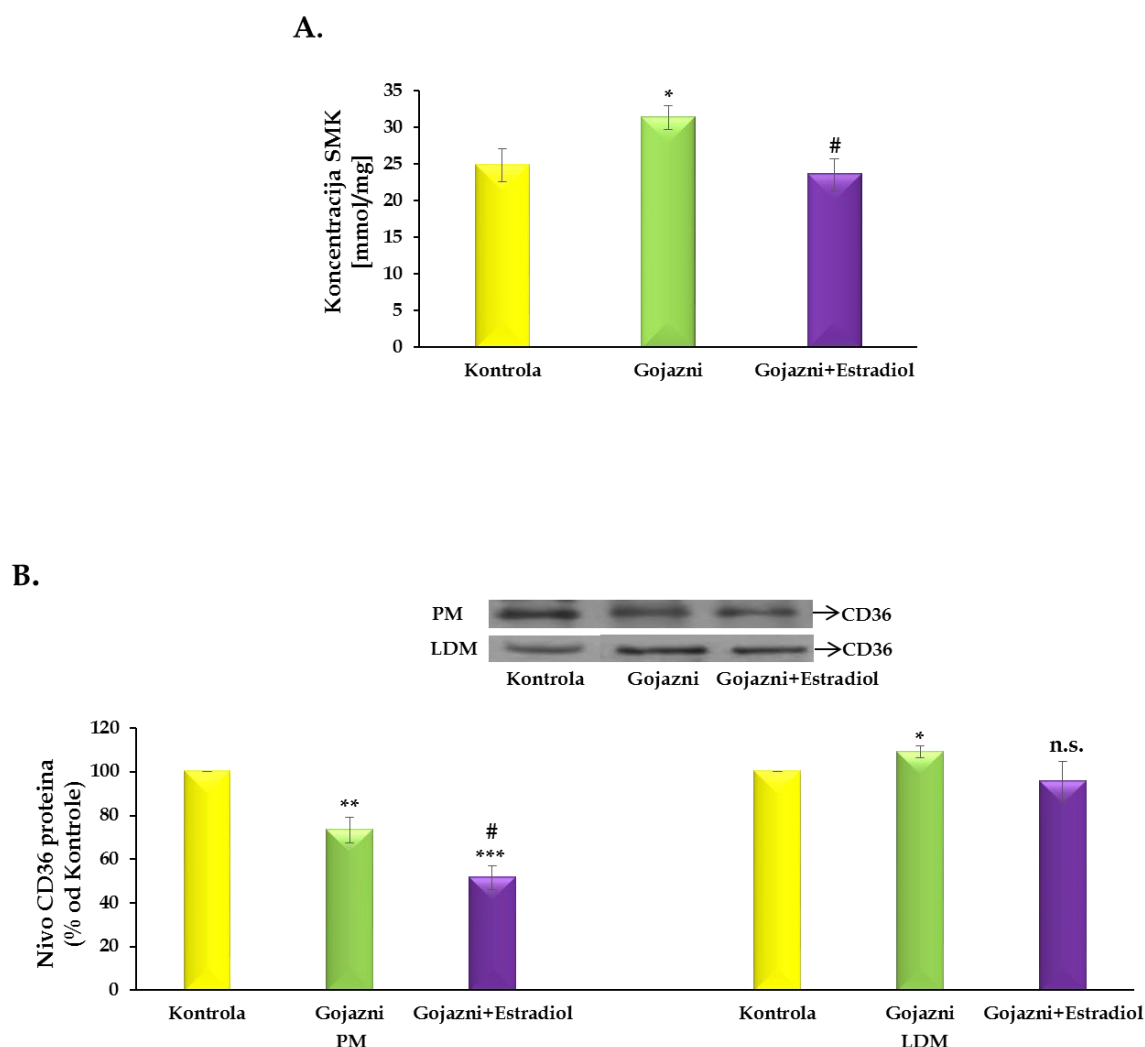
Rezultati merenja nivoa AT1R i AT2R u lizatu srca (Slika 22. A i C) gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom (AT1R: Kontrola=100%; Gojazni=80±9%; Gojazni+Estradiol=85±9%; AT2R: Kontrola=100%; Gojazni=89±4%; Gojazni+Estradiol=117±6%) pokazuju smanjenje nivoa AT1R i AT2R u lizatu srca gojaznih životinja u odnosu na normalno uhranjenje životinje. Tretman estradiolom kod gojaznih životinja dovodi do povećanje AT2R, ali ne utiče na nivo AT1R u poređenju sa gojaznim netretiranim životinjama.

4.2.9. Efekat estradiola na koncentraciju SMK i nivo CD36 proteina u srcu gojaznih pacova

Rezultati merenja koncentracije SMK (Slika 23. A) u lizatu srcu kontrolnih, gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom pokazuju da estradiol kod gojaznih pacova dovodi do smanjenja ($p < 0,05$) koncentracije SMK za 25% u poređenju sa gojaznim netretiranim pacovima (Kontrola=24,8±2,26 mmol/mg; Gojazni=31,31±1,66 mmol/mg; Gojazni+Estradiol=23,55±2,17 mmol/mg). Ishrana bogata mastima ($p < 0,05$) povećava koncentraciju SMK u poređenju sa vrednostima dobijenim kod normalno uhranjenih životinja.

Efekat ishrane bogate mastima i tretmana estradiolom kod gojaznih životinja na nivo CD36 proteina u srcu pacova prikazan je na Slici 23. B. Rezultati pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja nivoa CD36 proteina u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova (Kontrola=100%; Gojazni=73±6%; Gojazni+Estradiol=52±6, dok u LDM frakciji (Kontrola=100%; Gojazni=109±3%; Gojazni+Estradiol=96±9%) tkiva srca pacova dovodi do povećanja ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih, normalno uhranjenih pacova. Tretman gojaznih pacova estradiolom dovodi do smanjenja nivoa CD36 proteina za 29% ($p < 0,05$) u plazma membranskoj frakciji srca pacova, ali ne utiče na nivo CD36 detektovan u LDM

frakciji tkiva srca pacova u poređenju sa vrednostima izmerenim kod gojaznih, netretiranih životinja.



Slika 23. Efekat estradiola na koncentraciju SMK u lizatu (A) i nivo CD36 proteina (B) u plazma membranskim i LDM frakcijama tkiva srca gojaznih pacova

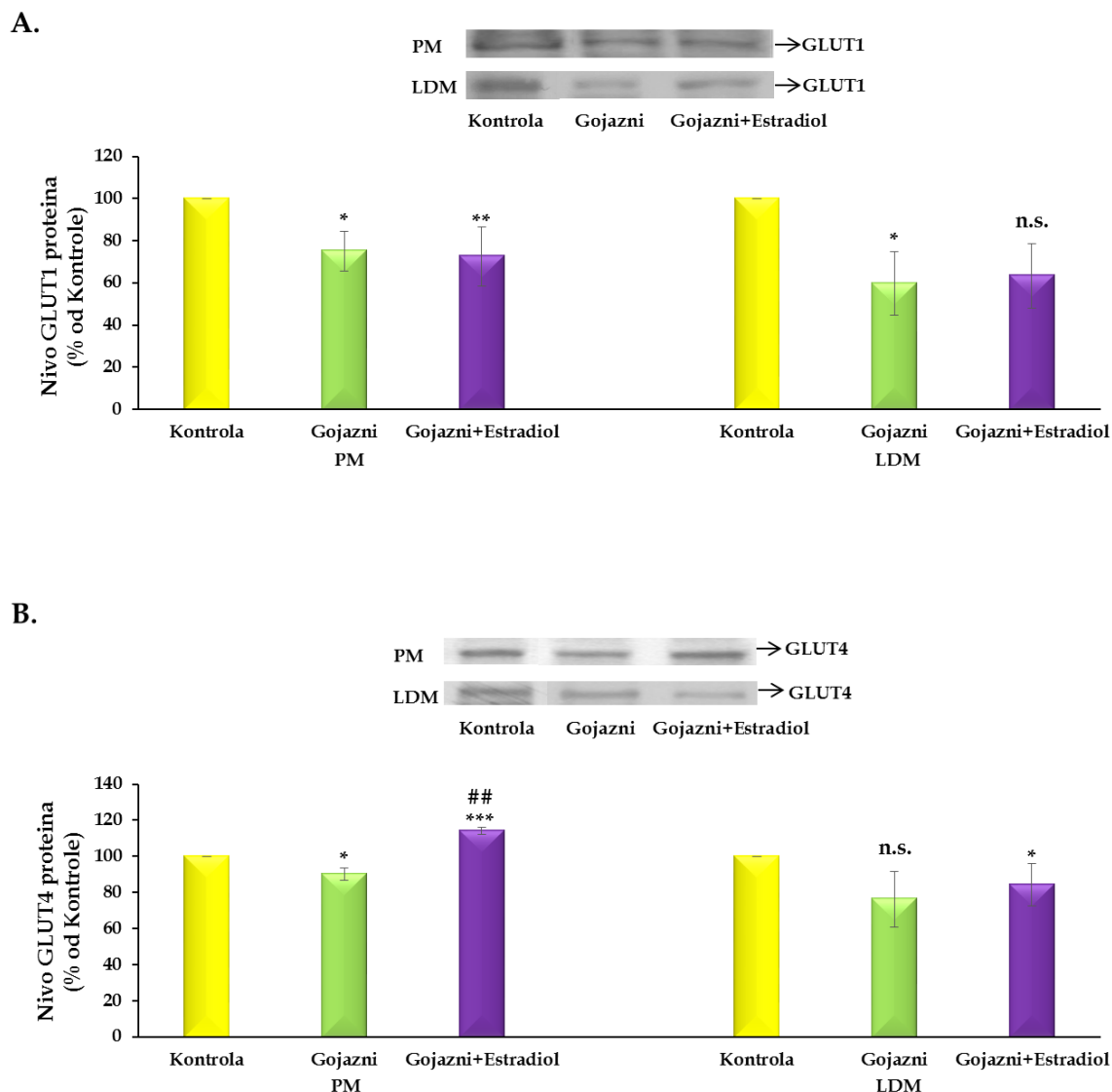
A. Koncentracija SMK izražena je u mmol/mg tkiva; **B.** Nivo CD36 proteina, rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3-5$) (# $p<0,05$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; *-Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu; n.s.-statistički neznačajno).

SMK-slobodne masne kiseline; PM-plazma membrana; LDM-mikrozomi male gustine.

4.2.10. *In vivo* efekti estradiola na nivo GLUT1 i GLUT4 proteina u srcu gojaznih pacova

Rezultati merenja nivoa GLUT1 proteina u membranskim frakcijama tkiva srca kontrolnih, gojaznih kao i gojaznih pacova tretiranih estradiolom prikazani su na Slici 24. Ishrana bogata mastima smanjuje nivo GLUT1 u plazma membranskoj i LDM frakciji tkiva srca pacova u odnosu na vrednosti dobijene kod normalno uhranjenih pacova. Sa druge strane, injeciranje estradiola gojaznim pacovima ne dovodi do značajnih promena u nivou GLUT1 proteina u plazma membranskoj (Kontrola=100%; Gojazni=75±9%; Gojazni+Estradiol=73±14%) i LDM frakciji (Kontrola=100%; Gojazni=60±15%; Gojazni+Estradiol=63±15%) tkiva srca u odnosu na vrednosti izmerene kod netretiranih, gojaznih pacova (Slika 24. A).

Tretman estradiolom ne utiče na nivo GLUT4 proteina (Slika 24. B) u LDM frakciji (Kontrola=100%; Gojazni=76±15; Gojazni+Estradiol=84±12%) tkiva srca pacova, ali dovodi do povećanja ($p<0,05$) nivoa ovog proteina u plazma membranskoj frakciji (Kontrola=100%, Gojazni=90±4%; Gojazni+Estradiol=114±2%) tkiva srca pacova u poređenju sa vrednostima dobijenim kod gojaznih, netretiranih životinja. Rezultati takođe prikazani na Slici 24. B pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja ($p<0,05$) nivoa GLUT4 proteina u plazma membranskoj frakciji tkiva srca pacova bez promena u nivou GLUT4 proteina u LDM frakciji u poređenju sa normalno uhranjenim životinjama.



Slika 24. Efekat estradiola na nivo GLUT1 (A) i GLUT4 (B) proteina u plazma membranskim i LDM frakcijama tkiva srca gojaznih pacova

A. Nivo GLUT1 proteina; **B.** Nivo GLUT4 proteina. Rezultati su izraženi kao procenat vrednosti dobijene za Kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost \pm SEM ($n=3-4$) (# $p<0,05$; #-Gojazni+Estradiol prema Gojazni; n.s.-statistički neznačajno). PM-plazma membrana; LDM-mikrozomi male gustine.

5. Diskusija

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji proistekli su iz eksperimenata dizajniranih sa ciljem da se izuče efekti estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu pacova. Osnovna hipoteza istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom jeste da je estradiol uključen u regulaciju ekspresije eNOS i iNOS molekulskim mehanizmom koji uključuje aktivaciju PI3K/ Akt signalnog puta u srcu pacova.

U okviru osnovne hipoteze pretpostavljeno je da će, u patofiziološkim stanjima kao što je stanje gojaznosti združeno sa IR i hipertenzijom, usled primene ishrane bogate mastima, doći do poremećaja molekulskog mehanizma delovanja estradiola zbog promena u aktivnosti signalnih molekula, a posledično i do poremećaja u regulaciji ekspresije eNOS i iNOS enzima u srcu pacova.

Molekulski mehanizmi kojima estradiol ostvaruje pozitivne efekte u KVS uključeni su i u regulaciju ekspresije eNOS i iNOS enzima, koji su odgovorni za sintezu NO (Nuedling i sar., 1999; Ricchiuti i sar., 2009). NO sintetisan u srcu je uključen u regulaciju funkcija srca (Moncada i Higgs, 1995; Nuedling i sar., 1999). Budući da je fiziološko delovanje estradiola složeno i da su ograničeni literaturni podataci o *in vivo* efektima estradiola na signalne puteve uključene u regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu, ova doktorska disertacija dizajnirana je sa ciljem da se ispita efekat tretmana estradiolom na ove enzime kod normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

U postavci hipoteze, takođe smo pretpostavili da je estradiol u srcu pacova uključen u regulaciju ekspresije eNOS i iNOS inhibicijom aktivnosti RhoA, tako što sprečava asocijaciju RhoA sa IRS-1. U patofiziološkim stanjima,

kao što je stanje gojaznosti združeno sa IR i hipertenzijom, delovanje estradiola je onemogućeno usled Ang II indukovane aktivacije RhoA i sledstvene asocijacije sa IRS-1, što dovodi do promena u ekspresiji eNOS i iNOS u srcu (Surma i sar., 2011).

Većina objavljenih studija koje se bave ispitivanjem efekata estradiola je rađena *in vitro* ili u slučaju *in vivo* eksperimenata na ovarijektomisanim ženka (Xie i sar., 2003; Sunday i sar., 2006; Riant i sar., 2009), dok su eksperimenti u okviru ove doktorske disertacije rađeni na mužjacima Wistar pacova, kako bi se izbegle cirkardijalne varijacije nivoa estradiola kao i razvoj IR, gojaznosti i inflamacije koji se inače javljaju nakon bilateralne ovarijektomije ženki, tj. uklanjanja endogenog estradiola (Kumagai i sar., 1993; Wagner i sar., 1998; Hao i sar., 2010; Stubbins i sar., 2012; Handgraaf i sar., 2013; Zhu i sar., 2013). Prethodna istraživanja naše grupe bila su usmerena na ispitivanje kratkotrajnih efekata (20, 30 i 40 minuta) estradiola u srcu pacova (Koricanac i sar., 2011; Tepavcevic i sar., 2011). Duncan i saradnici (2002) su pokazali da 24 sata nakon aplikacije estradiol ostvaruje kardioprotektivne efekte u srcu. U eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije, životinje su žrtvovane 24 sata nakon tretmana estradiolom da bi se pratili i genomski i negenomski efekti estradiola u srcu, pošto je 24 sata dovoljan vremenski period da estradiol ostvari svoje efekte na regulaciju ekspresije gena.

Kao animalni model gojaznosti, u eksperimentima su korišćeni Wistar pacovi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom za pacove obogaćenom sa 42% masti, tokom 10 nedelja. Odabir ovog eksperimentalnog modela gojaznosti zasnovan je na podacima iz literature koji pokazuju da ovakav način ishrane dovodi do razvoja gojaznosti združene sa IR i hipertenzijom (Woods i sar., 2003; Buettner i sar., 2006). Prethodno uređeni eksperimenti na istim životinjama pokazali su da je došlo do razvoja IR na osnovu merenja koncentracija glukoze i insulina u serumu i računanja HOMA-IR, čije su vrednosti bile povećane u poređenju sa kontrolama što ukazuje na smanjenje osetljivosti efektorskih ćelija na insulin (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015;

Obradovic i sar., 2015). Dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije, kao i prethodno publikovani rezultati, predstavljaju potvrdu validnosti odabranog eksperimentalnog modela za razvoj patofiziološkog stanja gojaznosti združenog sa IR i hipertenzijom.

5.1. *In vivo* efekat estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova

U cilju izučavanja efekata estradiola na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova, prva istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bila usmerena na merenje koncentracija L-Arg i NO. L-Arg je esencijalna aminokiselina koja ima važnu ulogu u biosintezi NO, kreatina, poliamina, prolina i glutamata (Peluffo, 2007). NO ima važnu ulogu u KVS jer reguliše promer krvnih sudova, a takođe utiče i na kontraktilnost kardiomiocita (Moncada i Higgs, 1995). Endogeno se NO oslobađa kao produkt konverzije aminokiseline L-Arg u L-citrulin, u reakciji posredovanoj enzimom NOS (Palmer i sar., 1988). Stoga, sinteza NO molekula, koji je neophodan za normalno funkcionisanje KVS, zavisi od raspoloživosti supstrata L-Arg, pa je nedostatak L-Arg povezan sa nastankom KVB. Promene u L-Arg/NO putu su zabeležene i u stanjima hronične srčane insuficijencije (Mendes Ribeiro i sar., 2001).

Merenjem koncentracije L-Arg u lizatu srca svih grupa pacova, pokazano je da tretman estradiolom značajno smanjuje koncentraciju L-Arg i kod normalno uhranjenih i kod gojaznih pacova u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slike 1.A i 13.A**). Takođe, smanjenje koncentracije L-Arg u lizatu srca pacova zabeleženo je i kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj mastima u poređenju sa normalno uhranjenim pacovima (**Slika 13. A**), što je u saglasnosti sa rezultatima Korda i saradnika (2008) koji su pokazali smanjenje nivoa L-Arg u endotelu aorte gojaznih miševa. Zanimljivo je pomenuti da su

Cooke i saradnici (1992) pokazali da se lokalno smanjenje koncentracije L-Arg, izmereno u tkivima, javlja na mestima inflamacije. U okviru ove doktorske disertacije nismo bili u mogućnosti da merimo nivo citokina, ali objavljeni rezultati eksperimenata na istim životinjama pokazali su da ishrana bogata mastima dovodi do porasta koncentracije CRP, koji je marker inflamacije (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015). Povećana koncentracija CRP ukazuje na razvoj inflamacije kod gojaznih pacova i može dovesti do povećane aktivnosti iNOS i smanjenja raspoloživog L-Arg, koje je zapaženo u lizatu srca gojaznih pacova. U prilog ovoj tvrdnji idu i rezultati Zunic i saradnika (2009) koji su pokazali da je povećana ekspresija iNOS u stanjima inflamacije praćena smanjenjem nivoa L-Arg. Sa druge strane, činjenica da estradiol smanjuje koncentraciju L-Arg u lizatu srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova nije u skladu sa rezultatima studije koja je ispitivala polne razlike i pokazala da ženke pacova imaju povećanu koncentraciju L-Arg u plazmi (kao posledica prisustva estrogena) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod mužjaka (Chang i sar., 2013). Jedno od mogućih objašnjenja naših rezultata može biti i činjenica da smo koncentraciju L-Arg određivali u lizatu srca pacova, a ne u krvi. Pokazano je da pojedini tipovi ćelija imaju mogućnost sinteze L-Arg iz ornitina ili citrulina, dok većina tkiva, u koje spada i miokard, nema mogućnost *de novo* sinteze ove aminokiseline (Hattori i sar., 1995; Peluffo, 2007). Kao posledica toga, L-Arg u miokard mora biti transportovan iz cirkulacije da bi se obezbedila neophodna unutarćelijska koncentracija (Hattori i sar., 1995; Peluffo, 2007). Podaci iz literature, koji pokazuju da povećanje koncentracije L-Arg u miokardu mora biti posledica recikliranja L-Arg iz cirkulacije, daju nam mogućnost da pretpostavimo da smanjena koncentracija L-Arg u lizatu tkiva srca pacova, zabeležena nakon tretmana estradiolom, kako normalno uhranjenih tako i gojaznih životinja, može biti objašnjena povećanom ekspresijom eNOS enzima. Estradiol svojim delovanjem povećava aktivnost eNOS, koji koristi L-Arg kao supstrat (Yang i sar., 2000; McNeill i sar., 2002) i na taj način može da dovede do

smanjenja koncentracije L-Arg u lizatu srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Pošto je L-Arg limitirajući faktor za sintezu NO (Mendes Ribeiro i sar., 2001), u daljim eksperimentima smo merili efekat estradiola na koncentraciju NO u plazmi i lizatu srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Poznato je da je NO neophodan za normalno funkcionisanje srca u fiziološkim uslovima (Pfitzer i sar., 1982; Padilla i sar., 2000). NO se proizvodi u svim tipovima ćelija koje čine miokard. Za nastanak NO u KVS primarno je odgovorna aktivnost eNOS enzima (Rhodes i sar., 1995), dok povećanje aktivnosti iNOS dovodi do prekomerne sinteze NO i sledstvenog smanjenja kontraktilnosti i smrti kardiomiocita, kao i hipertrofije srca (Mungrue i sar., 2002).

Rezultati merenja koncentracije NO u plazmi i lizatu srca normalno uhranjenih pacova (**Slika 1. B i C**) pokazuju da tretman estradiolom nije doveo do promene koncentracije NO u lizatu srca, ali je uticao na povećanje koncentracije NO u plazmi u poređenju sa kontrolnim, netretiranim životinjama. Ovakvi rezultati su očekivani, imajući u vidu rezultate drugih autora, koji su pokazali da terapija estrogenima kod žena nakon menopauze dovodi do povećanja nivoa NO u sistemske cirkulaciji (Guetta i sar., 1997; Blum i sar., 2000). Takođe je pokazano da estrogeni ispoljavaju svoje pozitivne efekte na cerebrovaskularni endotel povećavajući koncentraciju NO (Pelligrino i sar., 2000). *In vitro* studije na endotelnim ćelijama poreklom iz vene pupčane vrpce čoveka, goveđe aorte i fetalne plućne arterije ovce pokazuju da estradiol povećava sintezu NO (Hishikawa i sar., 1995; MacRitchie i sar., 1997). Na osnovu naših rezultata, kao i rezultata drugih autora (Hishikawa i sar., 1995; Guetta i sar., 1997; Pelligrino i sar., 2000) može se zaključiti da estradiol ostvaruje pozitivne efekte na srce stimulišući aktivnost konstitutivno eksprimirane NOS, što za posledicu ima već pomenuto smanjenje koncentracije L-Arg u lizatu normalno uhranjenih pacova kao i povećanu sintezu NO (MacRitchie i sar., 1997; Yang i sar., 2000). Takođe, pretpostavljamo da

izostanak promene u koncentraciji NO u lizatu srca pacova, nakon tretmana estradiolom, može biti posledica otpuštanja NO u cirkulaciju. Datta i saradnici (2004) su pokazali da se NO otpušta u cirkulaciju da bi se transportovao do mesta gde je neophodno da ispolji svoje efekte.

Rezultati dobijeni merenjem koncentracije NO u plazmi i lizatu srca gojaznih pacova pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do povećanja koncentracije NO kako u plazmi tako i u lizatu srca u poređenju sa normalno uhranjenim kontrolama (**Slika 13. B i C**). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Shimabukura i saradnika (1997) koji su pokazali da je kod pacova kod kojih je gojaznost dovela do razvoja dijabetesa, nivo NO povećan četiri puta u odnosu na normalno uhranjene životinje, a takođe je izmeren i povećan nivo iRNK za iNOS (Shimabukuro i sar., 1997). Ovako dobijeni rezultati ukazuju da povećana koncentracija NO u plazmi i lizatu, izmerena kod naših gojaznih životinja, može biti posledica povećane aktivnosti iNOS. Takođe, treba imati u vidu da povećanje koncentracije proinflammatoryh citokina (IL-6, TNF, INF- γ), karakteristično za stanje gojaznosti, dovodi do povećanja aktivnosti iNOS i povećane produkcije NO (Adams i sar., 2002). U stanjima gojaznosti, masno tkivo oslobađa proinflammatory citokine kao što je IL-6, koji dovodi do povećane sinteze CRP (Pou i sar., 2007; Clemente i sar., 2015). Iz svega iznetog može se pretpostaviti da je povećanje nivoa NO, zapaženo kod gojaznih pacova, posledica povećanja koncentracije IL-6 za koji je pokazano da dovodi do povećane aktivnosti iNOS i sinteze NO (LaPointe i Isenovic, 1999; Roytblat i sar., 2000).

Međutim, tretman gojaznih životinja estradiolom nije doveo do očekivanog smanjenja koncentracije NO u plazmi i lizatu srca pacova u odnosu na gojazne, netretirane životinje (**Slika 13. B i C**). Pretpostavljamo da do promene u nivou NO u plazmi i lizatu srca nije došlo zbog izostanka očekivanog antiinflammatoryh efekta injeciranog estradiola usled poremećaja molekularnih mehanizama delovanja estradiola u patološkim stanjima

gojaznosti, kao i promenama u aktivnosti signalnih molekula koji učestvuju u regulaciji ekspresije NOS i samim tim u sintezi NO.

Polazeći od saznanja da produkcija NO zavisi i od aktivnosti enzima eNOS i iNOS (Palmer i sar., 1988; Bruckdorfer, 2005), u daljem radu smo analizirali nivo iRNK za eNOS i iNOS, kao i nivo eNOS i iNOS proteina nakon tretmana estradiolom normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Merene su i neaktivna monomerna i aktivna dimerne forma eNOS proteina, budući da je za aktivaciju eNOS neophodna njegova dimerizacija (Fleming i Busse, 1999).

Rezultati merenja nivoa iRNK za eNOS, kao i nivoa monomerne i dimerne forme eNOS proteina u srcu normalno uhranjenih pacova, pokazuju da estradiol ne menja nivo iRNK za eNOS, kao ni nivo monomerne i dimerne forme eNOS proteina (**Slika 2.**). U okviru ove doktorske disertacije određivana je samo ukupna količina kako monomerne, tako i dimerne forme, ali nije određivan stepen fosforilacije eNOS na aminokiselini Ser¹¹⁷⁷ koji je potreban da bi se eNOS aktivirao. Izostanak efekta estradiola na ekspresiju eNOS u našem eksperimentu je moguće objasniti činjenicom da estradiol u kardiomiocitima može da deluje i negenomskim i genomskim mehanizmom. Negenomskim mehanizmom delovanja estradiol ostvaruje svoje efekte u roku od nekoliko minuta nakon aplikacije hormona, a pacovi u našem eksperimentu su tretirani jednom dozom estradiola, 24 sata pre žrtvovanja, što ostavlja mogućnost da je ekspresija eNOS bila statistički značajno povećana u kardiomiocitima odmah nakon tretmana (Chen i sar., 1999; Haynes i sar., 2000).

Kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj mastima uočeno je značajno smanjenje nivoa monomerne forme eNOS proteina (**Slika 14. B**) u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene pacove. Ovi rezultati su u saglasnosti s rezultatima Zemse i saradnika (2010) koji su pokazali da povišen nivo citokina, koji se javlja u stanjima gojaznosti i inflamacije, može uticati na smanjenje ekspresije monomerne forme eNOS. Takođe, ovi rezultati se mogu dovesti i u vezu sa povišenim nivoom SMK, HOL i Tg uočenim kod naših gojaznih pacova (Obradovic, 2013), a za koje je pokazano da mogu inhibirati aktivnost eNOS

(Davda i sar., 1995). Ishrana bogata mastima ne menja nivo iRNK za eNOS i nivo dimerne forme eNOS proteina u srcu pacova (**Slika 14. A i C**). Izostanak promene u nivou iRNK za eNOS kod gojaznih pacova može biti objašnjen povećanom produkcijom NO (**Slika 13. B i C**), imajući u vidu da povećana produkcija NO utiče na smanjenje aktivnosti konstitutivno eksprimirane eNOS izoforme u srcu (Scott i sar., 2002). Drugi autori su pokazali da je u patofiziološkim stanjima aktivnost eNOS smanjena (Davda i sar., 1995; Zemse i sar., 2010), što može biti objašnjenje za izostanak promene u nivou dimerne forme eNOS proteina kod gojaznih pacova.

Kod gojaznih pacova tretman estradiolom dovodi do povećanja nivoa iRNK za eNOS u odnosu na netretirane, gojazne pacove (**Slika 14. A**). Dobijeni rezultati su zanimljivi s obzirom da je u srcu normalno uhranjenih pacova izostao očekivani efekat estradiola na nivo iRNK za eNOS. Logično se nameće pitanje na koji način je estradiol doveo do povećanja nivoa iRNK za eNOS u srcu gojaznih pacova? Poznato je da se u stanjima gojaznosti nivo insulina u cirkulaciji povećava (Segura i Ruilope, 2007; Underwood i Adler, 2013), što su naši raniji rezultati (Sudar, 2011; Dobutović, 2013), kao i rezultati drugih autora (Kahn i Flier, 2000; Riant i sar., 2009; Akamine i sar., 2010) nedvosmisleno pokazali. Nivo insulina kod naših pacova koji su bili na ishrani bogatoj mastima je takođe povećan, kao što je ranije već pomenuto (Obradovic, 2013). Stoga se povećanje nivoa iRNK za eNOS kod gojaznih, estradiolom tretiranih životinja može pripisati udruženom delovanju insulina i estradiola. U prilog ovoj pretpostavci idu i literaturni podaci, koji pokazuju da insulin može stimulisati povećanje nivoa iRNK za eNOS (Kuboki i sar., 2000).

Međutim, tretman gojaznih pacova estradiolom ne utiče značajno na nivo monomerne (**Slika 14. B**), niti dimerne forme eNOS proteina (**Slika 14. C**) u poređenju sa netretiranim gojaznim pacovima. Nivo dimerne forme eNOS proteina kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom, iako nije značajno povećan, pokazuje tendenciju porasta u odnosu na gojazne, netretirane životinje, dok nivo monomerne forme eNOS proteina pokazuje tendenciju

zmanjenja kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom. Ovi rezultati sugerišu da je nakon povećanja nivoa iRNK za eNOS, došlo do dimerizacije i porasta nivoa aktivne forme eNOS proteina, uz istovremeno smanjenje nivoa monomerne forme prisutne u lizatu srca, iako ove promene nisu statistički značajne.

Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije eNOS proteina u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom, takođe ne pokazuju značajne promene u poređenju sa kontrolnim, netretiranim životinjama (**Slika 4. A i B**). Rezultati imunohistohemijske analize pokazuju smanjenu ekspresiju eNOS proteina u srcu gojaznih životinja u odnosu na normalno uhranjene životinje (**Slika 16. A i B**). Ispitivani enzim je uočen u srcu gojaznih životinja neposredno ispod ćelijske membrane, što može da ukaže na postojanje interakcije neaktivne forme eNOS sa kaveolom (Knowles i sar., 2011). Poznato je da je u neaktivnoj, monomernoj formi eNOS u kardiomiocitima vezan za kaveolu, koja predstavlja invaginaciju plazma membrane, interakcijom sa kaveolinom-3 (Knowles i sar., 2011). Nakon stimulacije i povećanja unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} , formira se Ca^{2+} -CaM kompleks koji se vezuje za eNOS i omogućava mu odvajanje od kaveolina i kaveole. Ovako oslobođen eNOS protein u citoplazmi dimerizuje i postaje aktivan (Barouch i sar., 2002; Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Rezultati imunohistohemijskih analiza (**Slika 16. B i C**) potvrđuju rezultate dobijene Western blot analizom (**Slika 14.**), koji pokazuju da se nivo eNOS proteina na menja u srcu estradiolom tretiranih gojaznih pacova u poređenju sa netretiranim gojaznim kontrolama.

U daljem radu smo hteli da odgovorimo na pitanje da li tretman estradiolom normalno uhranjenih i gojaznih pacova dovodi do promena u ekspresiji gena i nivou iNOS proteina?

Rezultati merenja nivoa iRNK i nivoa iNOS proteina u srcu normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom pokazuju da estradiol značajno smanjuje nivo iRNK za iNOS i količinu iNOS proteina u poređenju sa kontrolnim, normalno uhranjenim životinjama (**Slika 3. A i B**). U srcu gojaznih pacova estradiol dovodi do smanjenja nivoa iRNK za iNOS (**Slika 15. A**), ali ne

i do značajne promene u nivou iNOS proteina (**Slika 15. B**) u poređenju sa netretiranim, gojaznim pacovima. Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da estradiol reguliše ekspresiju iNOS na nivou transkripcije. Izostanak promene u nivou iNOS proteina može biti posledica žrtvovanja pacova 24 sata nakon tretmana estradiolom, pa efekat estradiola nije još stigao da se odrazi na nivo detektovanog proteina. U skladu sa našim rezultatima su i rezultati istraživanja Neweze i saradnika (2012), koji pokazuju da tretman estradiolom smanjuje nivo iRNK za iNOS i nivo iNOS proteina u srcima pacova kod kojih je tretman citokinima uticao na razvoj inflamacije, što ukazuje da estradiol smanjuje stanje inflamacije. Takođe, tretman estradiolom dovodi do smanjenja nivoa iNOS proteina kod ovarijektomisanih ženki pacova kod kojih je inflamacija izazvana lipopolisaharidima (Sunday i sar., 2006). Osim toga, pokazano je da postoji i razlika u nivou citokina u cirkulaciji između muškaraca i žena, pri čemu je zabeležen povećan nivo TNF, IL-1 β , IL-6 i IL-8 kod muškaraca u odnosu na žene (Aulock i sar., 2006). Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da je smanjenje ekspresije iNOS kod naših mužjaka pacova, u obe ispitivane grupe nakon tretmana estradiolom, posledica efekta estradiola na smanjenje nivoa proinflamatornih citokina kao i nivoa CRP (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015), a za koje je ranije pokazano da imaju ulogu u regulaciji ekspresije iNOS (Hattori i sar., 2003; Pou i sar., 2007; Clemente i sar., 2015).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do povećanja nivoa iNOS proteina, dok je nivo iRNK za iNOS ostao nepromenjen (**Slika 15.**) u poređenju sa normalno uhranjenim životinjama. Ovi rezultati su u skladu sa našim ranije objavljenim rezultatima (Dobutović, 2013; Sudar Milovanovic i sar., 2015; Jovanovic i sar., 2016; Stanimirovic i sar., 2016), kao i rezultatima drugih istraživača (Noronha i sar., 2005; de Luca i Olefsky, 2008; Nagareddy i sar., 2009) koji jasno pokazuju povećanje ekspresije iNOS u stanjima gojaznosti. Osim toga, povećanje nivoa lipida, kao i nivoa CRP kod naših gojaznih pacova utiče i na razvoj inflamacije koja je praćena porastom

nivoa iNOS proteina (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015). Povećana ekspresija iNOS dovodi i do povećane sinteze NO (**Slika 13. B i C**).

Rezultati dobijeni imunohistohemijskim bojenjem iNOS proteina u srcu pacova pokazuju smanjenje količine ovog proteina u grupi gojaznih pacova (**Slika 16. D i E**), dok je nivo iNOS proteina u grupama tretiranim estradiolom nepromenjen u odnosu na kontrolne životinje (**Slika 4. C i D i Slika 16. D i F**). Rezultati koji pokazuju smanjenje ekspresije iNOS proteina u srcu gojaznih pacova nisu očekivani. Naime, na osnovu rezultata dobijenih Western blot analizom za nivo iNOS proteina kod gojaznih pacova (**Slika 15.**) bilo bi očekivano povećanje ekspresije iNOS proteina. Moguće objašnjenje ovih rezultata je korišćenje različitih delova tkiva srca za imunohistohemijske analize i izolaciju proteina i RNK. Naime, za pripremanje uzoraka tkiva za izolaciju proteina i RNK korišćen je središnji deo srca, dok je za imunohistohemijske analize korišćen vrh srca. Takođe, naši rezultati pokazuju da je u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova koji su tretirani estradiolom iNOS ravnomerno raspoređen u citoplazmi (**Slika 4. D i Slika 16. F**), dok je u grupi gojaznih pacova iNOS raspoređen periferno (**Slika 16.E**). Lukien i saradnici (1997) su pokazali da u srcu gojaznih i dijabetičnih životinja dolazi do povećane akumulacije lipida u kardiomiocitima, pa se može pretpostaviti da periferna lokalizacija iNOS u grupi gojaznih pacova može biti posledica nakupljanja lipida u citoplazmi i potiskivanja iNOS ka periferiji kardiomiocita.

Imajući u vidu da je ekspresija gena za iNOS regulisana transkripcionim faktorom NF- κ B, koji se vezuje za specifično mesto u okviru promotora gena za iNOS (Balligand i Cannon, 1997), u daljem radu je izučavan efekat tretmana estradiolom na nivo regulatorne p65 subjedinice NF- κ B u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Rezultati merenja nivoa p65 subjedinice NF- κ B u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova pokazuju da estradiol ne menja nivo ove subjedinice u poređenju sa vrednostima dobijenim kod netretiranih, normalno uhranjenih (**Slika 5.**) i gojaznih životinja (**Slika 17.**). Jedno od mogućih

objašnjenja za izostanak očekivane promene u nivou NF-κB nakon tretmana estradiolom kod obe grupe pacova, normalno uhranjenih i gojaznih je mogućnost postojanja alternativnog signalnog puta koji je uključen u regulaciju ekspresije iNOS u srcu pacova pod uticajem estradiola. Osim sa NF-κB, estradiol stupa u interakcije i sa drugim transkripcionim faktorima kao što su AP-1 i STAT, koji takođe regulišu transkripciju gena za iNOS (Paech i sar., 1997), ali ispitivanje efekta estradiola na ove transkripcione faktore nije predviđeno dizajnom ove disertacije. Paech i saradnici (1997) su pokazali da estradiol ostvaruje suprotne efekte na transkripcionu aktivnost NF-κB i AP-1. Moguće je da u našem eksperimentu tretman estradiolom, za koji je pokazano da reguliše ekspresiju iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova, deluje preko AP-1, što bi moglo objasniti izostanak efekta estradiola na nivo p65 subjedinice NF-κB, tj. moguće je da se efekti estradiola na regulaciju iNOS ostvaruju preko AP-1 transkripcionog faktora.

Osim toga, povećana aktivnost AP-1 se javlja i pri povećanom unosu masnih kiselina koje je karakteristično za ishranu bogatu mastima (Foldes i sar., 2006). Stoga se može pretpostaviti da povećana aktivnost AP-1, a ne NF-κB, može biti razlog povećanja ekspresije iNOS u srcu gojaznih pacova. Ustanovljeno je da je nivo p65 subjedinice NF-κB čak značajno smanjen u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene životinje (**Slika 17.**), što je u skladu sa našim prethodnim istraživanjem u lizatu srca gojaznih pacova (Sudar Milovanovic i sar., 2015), ali nije u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali povećanje količine NF-κB proteina (Patten i Karas, 2006; Patel i sar., 2007). Takođe, moguće objašnjenje različitih rezultata je da je u našim eksperimentima meren nivo NF-κB u lizatu, ali ne i u jedarnoj frakciji kardiomiocita pacova, tako da postoji mogućnost da je već obavljena translokacija NF-κB u jedro, pa je stoga njegov nivo u citoplazmi smanjen (Hattori i sar., 2003).

5.2. *In vivo* efekat estradiola na ulogu signalnih molekula IRS-1, PI3K i Akt u regulaciji eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova

Literaturni podaci koji se odnose na signalne puteve kojima estradiol ostvaruje *in vivo* efekte u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova veoma su oskudni. Polazeći od rezultata *in vitro* studija da estradiol svoje efekte ostvaruje, između ostalog, preko IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta (Grohé C. i sar., 1999; Isenovic i sar., 2003; Kim i sar., 2012), u daljem radu je ispitivano da li u našim eksperimentalnim uslovima estradiol ostvaruje svoje efekte preko tog signalnog puta i na taj način indukuje promene u ekspresiji eNOS i iNOS u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Supstrat receptora za insulin 1 se aktivira fosforilacijom na specifičnim Tyr ostacima. Pored fosforilacije na specifičnim Tyr ostacima, IRS-1 protein može biti fosforilisan i na aminokiselini Ser³⁰⁷, usled čega dolazi do smanjenja hormonom stimulisane fosforilacije na Tyr (Craparo i sar., 1997). Pri fosforilaciji IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ smanjuje se efekat estradiola, tako što dolazi do inhibicije asocijacije IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K (Sun i sar., 1999; Sykiotis i Papavassiliou, 2001). IRS-1 protein kada je fosforilisan na specifičnim Tyr ostacima može da interaguje sa regulatornom p85 subjedinica PI3K, preko SH2 domena, čime se aktivira katalitička p110 subjedinica PI3K, koja zatim fosforiliše PIP2 i nastaje PIP3. Akumulacija PIP3 privremeno translocira Akt iz citoplazme na plazma membranu (Myers i sar., 1992).

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da tretman estradiolom kod normalno uhranjenih pacova ne dovodi do značajnih promena u nivou fosforilacije IRS-1 proteina na aminokiselini Ser³⁰⁷, u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne, netretirane životinje (**Slika 6.**). Izostanak fosforilacije IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ uočen u našoj studiji je u skladu sa očekivanim kardioprotektivnim efektima koje estradiol ostvaruje u srcu (Sykiotis i Papavassiliou, 2001). Takođe, naša ranija studija pokazuje da akutni tretman

estradiolom ne utiče na nivo IRS-1 proteina u srcu ovarijektomisanih, normalno uhranjenih ženki pacova (Koricanac i sar., 2009).

Tretman normalno uhranjenih pacova estradiolom doveo je do značajnog povećanja nivoa proteina regulatorne p85 subjedinice PI3K, međutim povećanje koje je zabeleženo u nivou proteina katalitičke p110 subjedinice PI3K nije bilo značajno, kao ni promena u asocijaciji IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K u poređenju sa rezultatima dobijenim kod kontrolnih životinja (Slika 7.). Uočeno povećanje nivoa regulatorne p85 subjedinice nakon tretmana estradiolom je u skladu sa rezultatima Chan i saradnika (2001) koji su takođe pokazali povećanje regulatorne p85 subjedinice PI3K kod ženki Sprague Dawley pacova nakon tretmana estradiolom. Takođe, u našim ranijim radovima (Isenovic i sar., 2003) uočeno je da tretman estradiolom dovodi do povećanja aktivnosti PI3K, ali i povećanja asocijacije IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (Isenovic i sar., 2003). Izostanak promena u asocijaciji IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K, uz povećanje nivoa p85 subjedinice PI3K usled delovanja estradiola se može objasniti direktnom interakcijom ER α i p85 subjedinice PI3K i povećanjem aktivnosti PI3K koja zatim aktivira nizvodno lokalizovan Akt (Simoncini i sar., 2000).

S obzirom da je u našim ranijim eksperimentima pokazano da davanje estradiola normalno uhranjenim pacovima dovodi do povećanja fosforilacije Akt na aminokiselini Ser⁴⁷³ (Obradovic, 2013), i da je za punu aktivaciju Akt potrebno da ova kinaza bude fosforilisana i na aminokiselini Thr³⁰⁸ (Andjelkovic i sar., 1999), u sledećim eksperimentima smo ispitivali efekat estradiola na fosforilaciju Akt na aminokiselini Thr³⁰⁸ u srcu normalno uhranjenih pacova. Dobijeni rezultati pokazuju da je tretman estradiolom u srcu normalno uhranjenih pacova doveo do povećanja odnosa fosforilisane forme Akt (Thr³⁰⁸) i ukupnog Akt u poređenju sa rezultatima dobijenim za kontrolne životinje (**Slika 8.**). Dobijeni rezultati su u saglasnosti kako sa našim prethodno objavljenim rezultatima (Isenovic i sar., 2003; Obradovic, 2013), tako i sa literaturnim podacima (Ren i sar., 2003; Sovershaev i sar., 2006), koji takođe

pokazuju da estradiol svojim delovanjem utiče na proces fosforilacije Akt i na aminokiselinu Thr³⁰⁸.

Na osnovu hipoteze postavljene u ovoj doktorskoj disertaciji očekuje se da će u patofiziološkim stanjima, kao što je stanje gojaznosti združeno sa pojavom IR i hipertenzijom, nastalim usled primene ishrane bogate mastima, doći do poremećaja molekulskog mehanizma delovanja estradiola usled promena u aktivnosti IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta i sledstvenog poremećaja u regulaciji ekspresije eNOS i iNOS u srcu pacova. Polazeći od postavljene hipoteze dalja istraživanja su bila usmerena na izučavanje efekata estradiola na IRS-1/PI3K/Akt signalne molekule u srcu gojaznih pacova.

U našoj studiji, ishrana bogata mastima dovela je do značajnog povećanja odnosa fosforilisanog (Ser³⁰⁷) i ukupne forme IRS-1 kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene pacove (**Slika 18.**), što je u saglasnosti sa rezultatima Hirosumi i saradnika (2002) koji su pokazali povećanje fosforilacije IRS-1 proteina na Ser³⁰⁷ kod gojaznih miševa u odnosu na normalno uhranjene životinje. Tretman estradiolom kod gojaznih pacova uticao je na smanjenje odnosa fosforilisanog (Ser³⁰⁷) i ukupnog IRS-1 proteina (**Slika 18.**) u poređenju sa vrednostima dobijenim za netretirane, gojazne pacove. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Kima i saradnika (2012) koji su *in vitro* pokazali da tretman estradiolom smanjuje fosforilaciju IRS-1 na Ser³⁰⁷ u adipocitama. Ista grupa autora je pokazala da tretman estradiolom u stanjima gojaznosti ostvaruje pozitivne efekte povećavajući fosforilaciju IRS-1 proteina na specifičnim Tyr ostacima. Smanjenje fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ nakon tretmana estradiolom, može se dovesti u vezu sa koncentracijom lipida (Zhang i sar., 2010), za koju smo ranije pokazali da je smanjena u serumu gojaznih pacova nakon tretmana estradiolom (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015). Povećana koncentracija lipida u plazmi utiče na akumulaciju unutarćelijskog acil CoA, što dovodi do aktiviranja Ser kinaza, kao što je PKC i na taj način utiče na fosforilaciju IRS-1 na Ser ostacima (Dresner i sar., 1999; Schmitz-Peiffer i Biden, 2008).

Tretman gojaznih pacova estradiolom dovodi do značajnog povećanja nivoa obe subjedinice PI3K, i p85 i p110, a uočeno je i značajno povećanje asocijacije IRS-1 sa p85 u poređenju sa rezultatima dobijenim kod netretiranih, gojaznih pacova kod kojih je ishrana bogata mastima dovela do smanjenja nivoa p85, ali nije dovela do promena u nivou p110 subjedinice PI3K, kao ni do promena u nivou asocijacije IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (**Slika 19**). Rezultati studija pokazuju da je kod gojaznih životinja kod kojih se razvila IR, molekularni mehanizam delovanja estradiola poremećen, što se ogleda u smanjenju aktivnosti PI3K, kao i u izostanku asocijacije IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (Shirakami i sar., 2002; Akamine i sar., 2010). Sa druge strane, Bernard i saradnici (2006) su pokazali *in vitro* da estradiol dovodi do povećanja nivoa IRS-1 proteina i do sledstvenog aktiviranja PI3K kinaze, i to obe subjedinice: i p85 i p110, što je u skladu sa našim rezultatima. Jedno od mogućih objašnjenja naših navedenih rezultata je da estradiol kod gojaznih životinja povećava asocijaciju IRS-1 sa PI3K tako što, sa jedne strane utiče na brzu defosforilaciju IRS-1 na Ser³⁰⁷, dok sa druge strane povećava fosforilaciju IRS-1 na specifičnim Tyr ostacima, nakon čega IRS-1 stupa u asocijaciju sa p85 subjedinicom PI3K i aktivira PI3K/Akt signalnu kaskadu (Sykietis i Papavassiliou, 2001). Međutim, izostanak asocijacije IRS-1 sa p85 kod normalno uhranjenih pacova nakon tretmana estradiolom može biti posledica izostanka fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷. Možemo pretpostaviti da brza defosforilacija IRS-1 na Ser³⁰⁷, koja je zabeležena kod gojaznih pacova nakon tretmana estradiolom, dodatno povećava stopu fosforilacije IRS-1 na specifičnim Tyr ostacima i na taj način aktivira PI3K/Akt signalnu kaskadu.

Kao što je pretpostavljeno, ishrana bogata mastima u našem eksperimentu je uticala na PI3K/Akt signalnu kaskadu i smanjila fosforilaciju Akt na Thr³⁰⁸ (**Slika 20.**) u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene životinje (**Slika 20.**). U skladu sa ovim rezultatom su i raniji rezultati naše grupe koji pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja fosforilacije Akt u srcu pacova (Obradovic i sar., 2015; Sudar Milovanovic i sar., 2015). Tretman

estradiolom kod gojaznih pacova je kao i kod normalno uhranjenih doveo do povećanja odnosa fosforilisane (Thr³⁰⁸) i ukupne forme Akt proteina u poređenju sa vrednostima dobijenim za njihove netretirane kontrole (**Slika 20**). Dakle, tretman estradiolom kod gojaznih pacova dovodi do pune aktivnosti Akt, i to povećanjem fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ i ranije pomenutim efektima na fosforilaciju Akt na Ser⁴⁷³ (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Rianta i saradnika (2009) koji su pokazali da tretman estradiolom povećava fosforilaciju Akt na aminokiselinama Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸ kod gojaznih miševa koji su bili na ishrani bogatoj mastima i kod kojih se razvila IR. Na osnovu naših rezultata, kao i rezultata drugih autora (Hisamoto i sar., 2001; Riant i sar., 2009), može se zaključiti da estradiol u srcu gojaznih pacova povećava fosforilaciju Akt, koja je inače kod gojaznih pacova smanjena, i na taj način utiče na ekspresiju eNOS i iNOS.

5.3. Interakcija estradiola i angiotenzina II, kao i uloga RhoA, u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova

Jedan od postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije je bio da se ispita da li estradiol svoje efekte na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS u srcu pacova ostvaruje u interakciji sa Ang II, kao i da li je RhoA uključen u ovu interakciju. Stoga je u daljem radu izučavan efekat estradiola na nivo RhoA, kao i na receptore za Ang II, AT1R i AT2R, u srcu kontrolnih i gojaznih pacova.

Rezultati pokazuju da tretman estradiolom značajno smanjuje nivo RhoA proteina, kako kod kontrolnih, normalno uhranjenih pacova (**Slika 9.**), tako i kod gojaznih pacova (**Slika 21.**). Estradiol u srcu pacova utiče na signalnu kaskadu RhoA/ROCK/IRS-1 tako što inhibira aktivnost RhoA i sledstveno sprečava asocijaciju RhoA/ROCK sa IRS-1 (Surma i sar., 2011). Analizirajući efekte koje estradiol ostvaruje na fosforilaciju RhoA na Ser¹⁸⁸ u kulturi glatkih

mišićnih ćelija vaskulature i uzorcima arterija *ex vivo*, Gayard i saradnici (2011) su pokazali da estradiol aktivira AMPK α 1, koja fosforiliše RhoA na Ser¹⁸⁸ i time je inaktivira, što sledstveno inhibira RhoA/ROCK signalni put, i uzrokuje vazodilataciju. U stanju gojaznosti dolazi do povećanja nivoa RhoA u srcu u odnosu na kontrole (Lin i sar., 2007; Soliman i sar., 2008; Soliman i sar., 2015), što su i naši rezultati (Slika 21.) potvrdili. U stanjima gojaznosti dolazi do pojave hipertenzije između ostalog i usled aktivacije RAS, koga karakteriše povećanje nivoa Ang II u cirkulaciji (Crowley i sar., 2006). Nishimatsu i saradnici (2010) su pokazali da vazokonstrikcija indukovana delovanjem Ang II, u aorti gojaznih Zucker pacova uključuje smanjenje ekspresije PI3K/Akt i aktivaciju RhoA zavisnog puta. Hipertrofija kardiomiocita, do koje dolazi u stanjima gojaznosti kao posledica delovanja Ang II, takođe uključuje i aktivaciju RhoA (Crowley i sar., 2006; Soliman i sar., 2015). Pedram i saradnici (2010) su pokazali da estradiol inaktivirajući RhoA, smanjuje hipertrofiju kardiomiocita izazvanu delovanjem Ang II u stanjima gojaznosti. Inaktivacijom RhoA, estradiol inhibira RhoA/ROCK signalnu kaskadu i sprečava fosforilaciju IRS-1 na Ser³⁰⁷. Izostanak fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ omogućava fosforilaciju IRS-1 na specifičnim Tyr ostacima, čime je omogućeno vezivanje p85 subjednice PI3K za IRS-1 i aktivacija PI3K (Begum i sar., 2002).

S obzirom da su efekti Ang II posredovani preko dva podtipa receptora spregnutih s proteinom G, AT1R i AT2R, u narednim eksperimentima su praćeni efekti estradiola na AT1R i AT2R u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Brojne studije su pokazale da je AT1R prekomerno eksprimiran u patofiziološkim stanjima, kao što je stanje gojaznosti praćeno razvojem IR i hipertenzijom (Xu i sar., 2005; Goossens i sar., 2007), postoje i studije koje pokazuju da povećana koncentracija Ang II, koja je karakteristična za stanje gojaznosti, može da utiče i na inhibiciju ekspresije AT1R (Lassegue i sar., 1995; Ouali i sar., 1997). Ouali i saradnici (1997) su pokazali da je inhibicija ekspresije AT1R, usled delovanja Ang II, posledica internalizacije/degradacije receptora

kao i smanjenja ekspresije iRNK za AT1R usled smanjenja nivoa transkripcije. Ista grupa autora je pokazala da Ang II utiče na smanjenje ekspresije AT2R smanjujući stabilnost iRNK (Ouali i sar., 1997). Takođe, Lasseque i saradnici (1995) su pokazali da tretman glatkih mišićnih ćelija pacova Ang II smanjuje ekspresiju iRNK za AT1R. U skladu sa prethodno pomenutim studijama su i rezultati naše studije koji su pokazali da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja nivoa oba ova receptora u lizatu srca, dok je nivo AT2R na plazma membranama kardiomiocita povećan (**Slika 22.**).

Tretman estradiolom kod normalno uhranjenih (**Slika 10.**) i kod gojaznih životinja smanjuje nivo AT1R (**Slika 22.**) na izolovanim plazma membranama kardiomiocita u poređenju sa netretiranim kontrolama. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da estrogen smanjuje ekspresiju AT1R (Hoeg i sar., 1977; Galien i Garcia, 1997; Li i sar., 1997) i inhibira signalnu transdukciju Ang II (Nickenig i sar., 1998; Javeshghani i sar., 2003). Nedostatak estradiola je povezan sa povećanjem ekspresije gena za ACE i AT1R, što dovodi do povećanja nivoa Ang II i AT1R (Galien i Garcia, 1997; Li i sar., 1997; Mendelsohn i Karas, 1999), dok tretman estradiolom sprečava taj efekat (Li i sar., 1997). Osim toga, studija Xu i saradnika (2003) pokazuje da tretman estradiolom smanjuje nivo AT1R i povećava nivo AT2R u srcu i na taj način pozitivno utiče na dimenziju, masu i oblik komora srca kod jednogodišnjih ovarijektomisanih pacova.

Sa druge strane, estradiol ne dovodi do promene nivoa AT2R na plazma membrani kardiomiocita normalno uhranjenih pacova (**Slika 10.**). Međutim, kod gojaznih pacova tretman estradiolom dovodi do povećanja nivoa AT2R izmerenog u lizatu srca ali je nivo ovog receptora smanjen na plazma membrani (**Slika 22.**) u poređenju sa netretiranim životinjama. Na osnovu ovako dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da doza estradiola primenjena jednokratno, 24 sata pre žrtvovanja, verovatno nije bila dovoljna da izazove translokaciju AT2R na plazma membranu kardiomiocita kod normalno uhranjenih i gojaznih pacova, iako je uspela da značajno poveća nivo AT2R u lizatu gojaznih pacova.

Povećanje nivoa AT2R u lizatu je u saglasnosti sa gore pomenutiom studijom Xu i saradnika (2003) koji su takođe zabeležili povećanje nivoa AT2R eksprimiranog u srcu ovarijektomisanih pacova nakon tretmana estradiolom.

Interakcija Ang II i estradiola utiče na ekspresiju NOS u patofiziološkim stanjima, kao što je stanje gojaznosti združeno sa IR i hipertenzijom. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije nam omogućavaju da sagledamo mogući mehanizam interakcije Ang II i estradiola. Ang II aktivirajući AT1R i RhoA utiče na signalni put kojim estradiol ostvaruje svoje efekte u srcu. Vezivanjem za AT1R, Ang II aktivira RhoA/ROCK signalnu kaskadu koja fosforiliše IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷ i tako inhibira fosforilaciju IRS-1 na specifičnim Tyr ostacima, što sprečava asocijaciju IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K. Inhibicija PI3K/Akt signalnog puta u stanjima gojaznosti dovodi do smanjene ekspresije eNOS, ali i do povećanja ekspresije iNOS. Sa druge strane, tretman estradiolom inhibira delovanje Ang II, tako što utiče na signalnu kaskadu RhoA/ROCK/IRS-1 inhibicijom fosforilacije IRS-1 na Ser ostacima i omogućava asocijaciju IRS-1 sa p85. Aktivirana PI3K/Akt signalna kaskada inhibira ekspresiju iNOS (**Slika 15.**) i stimuliše ekspresiju eNOS (**Slika 14.**).

5.4. *In vivo* efekat estradiola na ćelijsku lokalizaciju transportera za slobodne masne kiseline i glukozu u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova

Slobodne masne kiseline i glukozu predstavljaju glavne izvore energije u srcu (Tian i sar., 2012). U kardiomiocitima, transport SMK i glukoze je posredovan transporterima masnih kiselina i glukoznim transporterima koji migriraju između unutarćelijskih depoa i plazma membrana kardiomiocita. Konstantan unos velikih količina lipida, tokom ishrane bogate mastima, pored povećane oksidacije SMK u srcu gojaznih i pacova sa IR uzrokuje akumulaciju lipida u ćelijama miokarda i sledstvenu disfunkcija srca (Tian i sar., 2012).

Gojaznost je oboljenje koje nastaje usled prekomernog unošenja hranljivih materija, pri čemu dolazi do povećanja ukupne telesne mase, kao i mase adipoznog tkiva (Bray, 1989). Adipozno tkivo ima posebnu ulogu u razvoju IR, jer se iz adipocita oslobađaju SMK u cirkulaciju i doprinose povećanju koncentracije SMK u cirkulaciji. Samo povećanje koncentracije SMK u cirkulaciji u stanjima IR, doprinosi smanjenju transporta glukoze u ćelije, smanjujući premeštanje transportera na plazma membranu (Bergman i Ader, 2000). Kao što je ranije pomenuto, povećana koncentracija SMK u plazmi utiče na akumulaciju unutarćelijskog acil CoA, što dovodi do aktiviranja Ser kinaze, kao što je PKC i na taj način utiče na fosforilaciju IRS-1 na Ser ostacima, što zatim inhibira asocijaciju IRS-1 sa PI3K (Dresner i sar., 1999; Schmitz-Peiffer i Biden, 2008).

Rezultati dobijeni merenjem koncentracije SMK u lizatu srca normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom pokazuju da tretman ne utiče na nivo SMK u poređenju sa netretiranim, normalno uhranjenim životinjama (**Slika 11. A**). Polazeći od rezultata drugih autora (Jensen i sar., 1994), koji pokazuju da hroničan tretman estradiolom ima mali uticaj na lipolizu u masnom tkivu, pretpostavljamo da akutni tretman estradiolom nije imao efekta na lipolizu adipoznog tkiva, pa je stoga izostao efekat estradiola na nivo SMK u lizatu srca normalno uhranjenih pacova.

Koncentracija SMK izmerena u lizatu srca pacova koji su bili na ishrani bogatoj mastima pokazuje očekivano povećanje koncentracije SMK (**Slika 23. A**). Naši raniji rezultati su pokazali da ishrana bogata mastima dovodi i do povećanja koncentracije lipida u cirkulaciji (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015). Boden i saradnici (2001) su takođe pokazali da povećan unos lipida dovodi do povećanja njihovog nivoa u cirkulaciji, a potom i akumulacije u tkivima. Povećan nivo lipida u cirkulaciji (Obradovic, 2013) i tkivu srca gojaznih pacova (**Slika 23. A**) samo je još jedna potvrda da ishrana bogata mastima dovodi do razvoja gojaznosti i IR (Boden, 2011).

Estradiol ispoljava antiaterogeni efekat na taj način što smanjuje koncentraciju lipida, kako u serumu (Shi i sar., 2013), tako i u tkivu (Hewitt i sar., 2004; Jelenik i Roden, 2013). U stanjima hiperinsulinemije, estradiol svojim delovanjem smanjuje sintezu, a povećava oksidaciju SMK (Musatov i sar., 2007; Gorres i sar., 2011). Naši rezultati pokazuju da je tretman gojaznih pacova estradiolom doveo do smanjenja koncentracije SMK u lizatu srca u poređenju sa netretiranim, gojaznim životinjama (**Slika 23. A**), a naša ranija istraživanja su pokazala da je isti tretman smanjio i koncentraciju lipida u cirkulaciji gojaznih pacova (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015).

Unos masnih kiselina u ćelije se odvija putem pasivne difuzije ili je posredovan transporterima (Coort i sar., 2004; Bharadwaj i sar., 2010; Rider i sar., 2013). Unos posredovan transporterima zavisi od ekspresije i lokalizacije CD36 proteina plazma membrane koji vezuje masne kiseline (engl. fatty acid binding protein-FABPpm), ili od transportnog proteina masnih kiselina 6 (engl. fatty acid transport protein 6-FATP6) (Wilson i sar., 2007; Rider i sar., 2013). Većina SMK se transportuje pomoću CD36, membranskog receptora od 88 kDa eksprimiranog u kardiomiocitima (van der Vusse i sar., 2000; Rider i sar., 2013). Tokom fizičke aktivnosti broj kontrakcija srca se povećava i CD36 se premešta iz unutarćelijskih rezervoara (vezikula) na plazma membranu kardiomiocita, kako bi se povećala brzina transporta SMK u ćeliju (Bonen i sar., 2000; Steinberg i sar., 2002). Translokacija CD36 na plazma membranu kardiomiocita je brz i reverzibilan proces koji, osim mišićnih kontrakcija mogu da aktiviraju insulin i estradiol, a može biti regulisan i farmakološkim sredstvima (Glatz i sar., 2013).

Merenjem nivoa CD36 proteina u srcu normalno uhranjenih pacova, nakon tretmana estradiolom, uočeno je smanjenje nivoa ovog transportera u plazma membranama kardiomiocita i njegovog povećanja u LDM u poređenju sa kontrolom (**Slika 11. B**). Povećanje CD36 u LDM odgovara premeštanju transportera sa površine ćelije u unutraćelijske depoe. Ovi rezultati nas navode na pretpostavku da je smanjen nivo CD36 na plazma membranama kardiomiocita posledica izostanka efekta estradiola na lipolizu. S obzirom da

tretman estradiolom nije uticao na promenu koncentracije SMK u lizatu srca normalno uhranjenih pacova bilo je očekivano da ne dođe ni do translokacije CD36 na plazma membranu kardiomiocita.

Dalje, naši rezultati pokazuju da je nivo CD36 proteina na plazma membrani kardiomiocita gojaznih pacova smanjen, dok je nivo ovog transportera u LDM povećan u poređenju sa kontrolama (**Slika 23. B**). Uočeno smanjenje nivoa CD36 na plazma membranama kardiomiocita gojaznih pacova nije u saglasnosti sa rezultatima drugih autora, čiji rezultati pokazuju povećanje ovog transportera na plazma membranama kardiomiocita u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene pacove (Luiken i sar., 2001). Smanjenje nivoa CD36 na plazma membranama kardiomiocita, koje pokazuju naši rezultati, može se objasniti značajno povećanim nivoom leptina izmerenim u serumu gojaznih pacova (Obradovic, 2013). Poznato je da je povećan nivo leptina, koji se javlja kod gojaznih osoba, praćen razvojem rezistencije na ovaj hormon belog masnog tkiva (Frederich i sar., 1995). Tako su Steinberg i saradnici (2002) pokazali da tretman pacova leptinom tokom dve nedelje, kao i ishrana pacova hranom bogatom mastima tokom istog perioda, indukuje razvoj hiperleptinemije. Isti autori su pokazali da tretman leptinom dovodi do smanjenja ukupne ekspresije CD36 proteina, a takođe i do smanjenja njegovog nivoa na plazma membrani kardiomiocita (Steinberg i sar., 2002), što je u skladu sa našim rezultatima. Momken i saradnici (2017) su pokazali na izolovanim kardiomiocitima da leptin stimuliše preuzimanje SMK procesom koji uključuje aktivaciju AMPK i translokaciju CD36 na plazma membranu. Usled razvoja rezistencije na leptin kod naših životinja, moguće je da ne dolazi do aktivacije AMPK i translokacije CD36 na plazma membranu. Povećan nivo SMK u lizatu srca gojaznih pacova (**Slici 23. A**), izmeren u našem eksperimentu, može da ukaže na prisustvo nekog drugog funkcionalnog transportera masnih kiselina. Gimneo i saradnici (2003) su pokazali da se na plazma membrani kardiomiocita nalazi i FATP6 pa su predložili moguću povezanost ova dva proteina u cilju transporta SMK u srcu. Povećanje nivoa CD36 izmereno u LDM kardiomiocita

gojaznih pacova odgovara translokaciji transportera sa površine ćelije u unutraćelijske depoe. Osim toga, smanjenje translokacije CD36 na plazma membranu može biti usled povećanja SMK u lizatu ćelija srca gojaznih pacova (**Slici 23. A**). Možemo pretpostaviti da povećan nivo SMK, prisutnih u lizatu kardiomiocita gojaznih pacova, negativnom povratnom spregom smanjuje translokaciju CD36 na plazma membranu kardiomiocita i povećava nivo CD36 u LDM.

Tretman gojaznih pacova estradiolom, takođe dovodi do smanjenja nivoa CD36 proteina na plazma membrani kardiomiocita, dok je nivo CD36 u LDM ostao nepromenjen u poređenju sa netretiranim, gojaznim životinjama (**Slika 23. B**). Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Coorta i saradnika (2004) koji su pokazali da davanje estradiola u stanjima gojaznosti dovodi do povećanja nivoa CD36 proteina na plazma membrani kardiomiocita. Neusaglašenost pomenutih i naših rezultata može biti posledica efekta koji estradiol ostvaruje na povećanje osetljivosti ćelija na leptin. Pokazano je da tretman estradiolom dovodi do povećanja ekspresije receptora za leptin i samim tim do smanjenja rezistencije na ovaj hormon (Clegg i sar., 2006). Doza estradiola primenjena jednokratno, 24 sata pre žrtvovanja kod naših gojaznih pacova, za koje je ranije pokazano da su razvile hiperleptinemiju i sledstvenu rezistenciju na leptin (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015), verovatno nije bila dovoljna da smanji povećan nivo leptina. To znači da estradiol nije uticao na hiperleptinemiju kod naših gojaznih pacova i zato nije doveo ni do translokacije CD36 na plazma membranu kardiomiocita gojaznih pacova.

U metabolizmu energetskih supstrata u srcu, osim transportera masnih kiselina, važnu ulogu imaju i transporteri glukoze-GLUT. U srcu su detektovani brojni članovi familije glukoznih transportera, uključujući GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT8, GLUT10, GLUT11 i GLUT12 (Shao i Tian, 2015). GLUT1 i GLUT4 su najzastupljeniji u ovom tkivu, pa samim tim imaju najvažniju ulogu u metabolizmu glukoze. GLUT1 je odgovoran za bazalni metabolizam glukoze i zbog toga se većinski nalazi na plazma membranama kardiomiocita (Santalucia

i sar., 1992; Montessuit i Lerch, 2013). GLUT4 je glavni transporter glukoze u srcu pri delovanju vanćelijskih stimulusa, kao što je insulin, pri čemu se brzo premešta iz unutarćelijskog depoa na plazma membranu kardiomiocita i omogućava 10-20 puta veći ulazak glukoze u ćeliju (Fischer i sar., 1997; Steinbusch i sar., 2011).

Tretman normalno uhranjenih pacova estradiolom doveo je do povećanja količine GLUT4 transportera na plazma membranama kardiomiocita, ali nije uticao na nivo GLUT4 u LDM kardiomiocita kod pacova (**Slika 12. B**). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su takođe ispitivali efekte estradiola na ekspresiju i lokalizaciju transportera za glukožu kod miševa kojima je odstranjen gen za ER α i pokazali smanjen nivo iRNK za GLUT4, što ukazuje na direktan efekat estradiola na regulaciju ekspresije ovog transportera (Barros i sar., 2006). Takođe je pokazano u studiji na ovarijektomisanim ženka pacova, da tretman estradiolom utiče na povećanje stope translokacije GLUT4 transportera na plazma membranu kardiomiocita (Tepavcevic i sar., 2011). Naši, kao i rezultati drugih autora (Barros i sar., 2006; Tepavcevic i sar., 2011), ukazuju na značaj estradiola u održavanju homeostaze glukoze u srcu normalno uhranjenih pacova, a samim tim i na metabolizam energetske supstrate.

Rezultati pokazuju da injeciranje estradiola normalno uhranjenim pacovima dovodi do povećanja, iako ne značajnog u nivou GLUT1 proteina u plazma membranama, ali značajno smanjuje nivo ovog transportera u LDM kardiomiocita (**Slika 12. A**). Rezultati studije Welcha i saradnika (1999) su pokazali da tretman estradiolom dovodi do povećanja nivoa iRNK za GLUT1 ali da ne dovodi do translokacije GLUT1. Sa druge strane, doza estradiola primenjena u našem eksperimentu smanjuje nivo GLUT1 u LDM ali verovatno nije bila dovoljna da izazove translokaciju vezikule na plazma membranu.

Poznato je da gojaznost združena sa IR utiče na metabolizam energetske supstrate u srcu, inhibirajući translokaciju i na taj način smanjujući količinu glukoznih transportera koji se nalaze na plazma membrani kardiomiocita

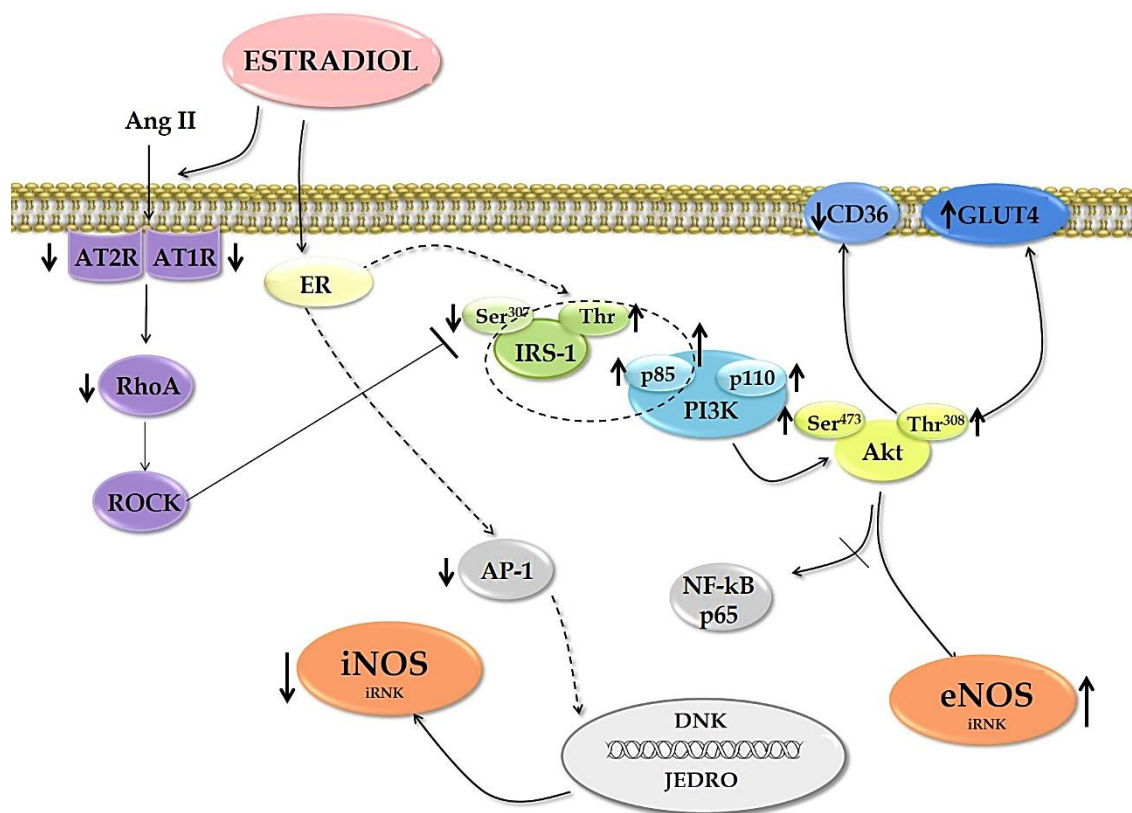
(Huisamen i sar., 2001). Važno je istaći da su gojazni pacovi korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji takođe bili IR (Obradovic, 2013; Obradovic i sar., 2015) i kod njih smo takođe pokazali da su nivoi GLUT4 i GLUT1 smanjeni na plazma membranama kardiomiocita (**Slika 24. A i B**) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih, normalno uhranjenih životinja. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su takođe pokazali da je kod gojaznih pacova sa IR poremećena upotreba energetskih supstrata (Huisamen i sar., 2001; Luiken i sar., 2002; Coort i sar., 2004). Ovo je očekivano, s obzirom da je poznato da su u stanjima gojaznosti i IR signalni putevi delovanja kako estradiola, tako i insulina poremećeni (Kahn i Flier, 2000; Shi i sar., 2013).

Izučavajući efekte estradiola na nivo transportera za glukozu kod gojaznih, IR pacova, pokazali smo da tretman estradiolom povećava translokaciju GLUT4 na plazma membranu, ali ne utiče na nivo GLUT1 proteina u kardiomiocitama (**Slika 24.**). Ovi rezultati ukazuju na to da estradiol ima isti uticaj na metabolizam energetskih supstrata u srcu u fiziološkim i patofiziološkim stanjima kao što je IR, povećavajući transport glukoze u srce. U skladu sa našim rezultatima su rezultati Rianta i saradnika (2009) koji pokazuju da tretman estradiolom ovarijektomisanih gojaznih miševa poboljšava osetljivost na insulin, povećavajući fosforilaciju Akt na dve aminokiseline, i Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸, i na taj način utiče na translokaciju GLUT 4 i transport glukoze. Stoga se promene u GLUT 4 nakon delovanja estradiola u srcu gojaznih pacova takođe mogu dovesti u vezu sa povećanjem fosforilacije Akt pod uticajem estradiola, koja je uočena u našim eksperimentima i diskutovana ranije (**Slika 20.**).

Zanimljivo je primetiti da estradiol utiče na translokaciju GLUT4 na plazma membranu kardiomiocita kako kod normalno uhranjenih, tako i kod gojaznih pacova, ali ne utiče na translokaciju GLUT1 ni u jednoj ispitivanoj grupi (Garvey i sar., 1993; Welch i Gorski, 1999; Cheng i sar., 2001), što je očekivano jer se zna da je GLUT1 zadužen za bazalni metabolizam glukoze u fiziološkim uslovima (Santalucia i sar., 1992; Montessuit i Lerch, 2013).

Sumarno, tretman estradiolom dovodi do povećanja transporta glukoze u ćelije kako u srcu normalno uhranjenih, tako i gojaznih, IR pacova, i to povećavajući translokaciju GLUT4 transportera na plazma membranu kardiomiocita što ukazuje na pozitivne efekte estradiola na srce. Efekti estradiola na translokaciju GLUT4 kod gojaznih pacova se mogu dovesti i u vezu sa ranije pomenutim efektom koji estradiol ostvaruje na IRS-1/PI3K/Akt signalnu kaskadu (**Slika 25.**). U fiziološkim uslovima, aktivacija IRS-1/PI3K/Akt dovodi do fosforilacije i inhibicije suprstata za Akt od 160 kDa (AS160) koji omogućava translokaciju GLUT4 na plazma membranu (Miinea i sar., 2005). Iako ovaj signalni put nije u potpunosti razjašnjen pretpostavlja se da AS160 ima ulogu GTP-aktivirajućeg proteina (GAP) za članove porodice Rab proteina. Rab proteini pripadaju grupi malih G-proteina koji učestvuju u translokaciji i fuziji vezikula u kojima se nalaze transporteri glukoze za plazma membranu. Aktivacijom Akt fosofriliše se AS160, čime se inhibira njegova GAP uloga što dovodi do povećanja nivoa GTP-Rab proteina i premeštanja vezikula u kojima se nalaze transporteri za glukozu na plazma membranu (Miinea i sar., 2005).

Estradiol smanjuje nivo CD36 na plazma membrani kardiomiocita i koncentraciju SMK u lizatu srca kod pacova koji su bili na ishrani bogatoj mastima, što može biti posledica smanjenja ekspresije iNOS nakon tretmana estradiolom. Pokazano je da ekspresija iNOS može da utiče na translokaciju CD36 na plazma membranu kardiomiocita. Translokacija CD36 na plazma membranu zavisi od transporta FoxO1 u jedro gde indukuje ekspresiju gena za iNOS (Puthanveetil i sar., 2011). Pokazano je da FoxO1 ima ulogu u preuzimanju masnih kiselina, oksidaciji i skladištenju Tg. Tretman kardiomiocita lipidima utiče na povećanu akumulaciju Tg, koja povećava transport FoxO1 u jedro (Puthanveetil i sar., 2011). Kod naših gojaznih životinja tretman estradiolom doveo je do smanjenja koncentracije Tg, ekspresije iNOS i moguće na taj način smanjio transport CD36 na plazma membranu kardiomiocita (**Slika 25.**).



Slika 25. Predloženi mehanizam delovanja estradiola na regulaciju eNOS, iNOS i translokaciju transportera za masne kiseline i glukoze u srcu gojaznih pacova

ER-receptor za estrogene; Ang II-angiotenzin II; AT1R-receptor za Ang II tipa; AT2R-receptor za Ang II tipa 2; RhoA-mali GTP vezujući protein; ROCK-RhoA-asocirana protein kinaza; IRS-1-supstrat receptora za insulin 1; Ser-serin; Thr-treonin, PI3K-fosfatidil-inozitol-3-kinaza; p85-regulatorna subjedinica PI3K; p110-katalitička subjedinica PI3K; Akt-protein kinaza B; CD36-translokaza masnih kiselina; GLUT4-familija transportera za glukoze tipa 4; iNOS-inducibilna azot-monoksid sintaza; eNOS-endotelna azot-monoksid sintaza; AP-1-protein aktivator-1; NF- κ B p65-nuklearni faktor- κ B subjedinca p65; DNK-dezoksiribonukleinska kiselina.

6. Zaključci

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

1. Tretman estradiolom smanjuje ekspresiju gena za iNOS kod normalno uhranjenih i gojaznih pacova, a povećava ekspresiju gena za eNOS samo u srcu gojaznih pacova;
2. Tretman estradiolom povećava nivo p85 subjedinice PI3K i Akt u srcu normalno uhranjenih pacova, dok u srcu gojaznih pacova smanjuje fosforilaciju IRS-1 na aminokiselini Ser³⁰⁷, povećava asocijaciju IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K i aktivira PI3K/Akt signalnu kaskadu;
3. Ispitujući interakciju estradiola i Ang II pokazano je da tretman estradiolom smanjuje nivo AT1R na plazma membrani kardiomiocita, kao i nivo RhoA proteina u lizatu srca normalno uhranjenih pacova i gojaznih pacova, dok kod gojaznih pacova smanjuje i nivo AT2R na plazma membrani kardiomiocita;
4. Tretman estradiolom doveo je do smanjenja nivoa CD36 i povećanja nivoa GLUT4 na plazma membrani kardiomiocita normalno uhranjenih i gojaznih pacova, dok je nivo GLUT1 bio smanjen samo na plazma membrani kardiomiocita normalno uhranjenih životinja.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da tretman estradiolom u fiziološkim uslovima reguliše ekspresiju iNOS u srcu, posredstvom PI3K/Akt signalne kaskade. Takođe, estradiol smanjuje ekspresije AT1R i nivo RhoA proteina, i time dodatno aktivira PI3K/Akt signalnu kaskadu i sintezu NO. Estradiol regulišući PI3K/Akt signalnu kaskadu reguliše transport glukoze u srce, povećavajući nivo GLUT4 na plazma membranama kardiomiocita.

Estradiol kod gojaznih životinja smanjuje nivo AT1R i AT2R na plazma membrani kardiomiocita, inhibira RhoA i tako dovodi do smanjenja fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷. Inhibicija fosforilacija IRS-1 na Ser³⁰⁷ omogućava fosforilaciju IRS-1 na specifičnim Tyr ostacima čime se povećava asocijacija IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K. Asocijacija IRS-1/p85 stimuliše aktivnost PI3K/Akt signalne kaskade i utiče na povećanje ekspresije eNOS, kao i na translokaciju GLUT4 na plazma membranu kardiomiocita. Smanjenje ekspresije iNOS, nakon tretmana gojaznih pacova estradiolom, ukazuje na antiinflamatorne efekte koje estradiol ostvaruje u srcu gojaznih pacova. Takođe, estradiol smanjuje i translokaciju CD36 na plazma membranu kardiomiocita gojaznih pacova (**Slika 25.**).

Pozitivni efekti estradiola u patologiji gojaznosti ogledaju se u smanjenju nivoa lipida akumuliranih u srcu i regulaciji ekspresije eNOS i iNOS enzima. Kompletno razumevanje mehanizama poremećene regulacije ekspresije NOS je neophodno za razvoj adekvatne terapije u patologiji gojaznosti združene sa IR i hipertenzijom. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom su doprinela sagledavanju molekularnih mehanizama kojima estradiol utiče na regulaciju ekspresije eNOS i iNOS kao i na metabolizam energetskih supstrata u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova i predstavlja značajan doprinos razumevanju mehanizama koji se nalaze u osnovi patologije gojaznosti.

7. Literatura

1. Abel, E. D., S. E. Litwin and G. Sweeney (2008). "Cardiac remodeling in obesity." *Physiol Rev* **88**(2): 389-419.
2. Abel, E. D., K. M. O'Shea and R. Ramasamy (2012). "Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(9): 2068-2076.
3. Adams, V., B. Nehrhoff, U. Spate, A. Linke, P. C. Schulze, A. Baur, S. Gielen, R. Hambrecht and G. Schuler (2002). "Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study." *Cardiovasc Res* **54**(1): 95-104.
4. Akamine, E. H., A. C. Marcal, J. P. Camporez, M. S. Hoshida, L. C. Caperuto, E. Bevilacqua and C. R. Carvalho (2010). "Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary." *J Endocrinol* **206**(1): 65-74.
5. Albrecht, E. W., C. A. Stegeman, P. Heeringa, R. H. Henning and H. van Goor (2003). "Protective role of endothelial nitric oxide synthase." *J Pathol* **199**(1): 8-17.
6. Alessi, D. R. and P. Cohen (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 55-62.
7. Alexander, J. K. (1985). "The cardiomyopathy of obesity." *Prog Cardiovasc Dis* **27**(5): 325-334.
8. Alonso, A., R. Fernandez, M. Moreno, P. Ordonez, H. Gonzalez-Pardo, N. M. Conejo, F. Diaz and C. Gonzalez (2006). "Positive effects of 17beta-estradiol on insulin sensitivity in aged ovariectomized female rats." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(5): 419-426.

9. Andjelkovic, M., S. M. Maira, P. Cron, P. J. Parker and B. A. Hemmings (1999). "Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5061-5072.
10. Andreozzi, F., E. Laratta, A. Sciacqua, F. Perticone and G. Sesti (2004). "Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells." *Circ Res* **94**(9): 1211-1218.
11. Aronica, S. M., W. L. Kraus and B. S. Katzenellenbogen (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8517-8521.
12. Aulock, S. V., S. Deininger, C. Draing, K. Gueinzius, O. Dehus and C. Hermann (2006). "Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA." *J Interferon Cytokine Res* **26**(12): 887-892.
13. Babiker, F. A., L. J. De Windt, M. van Eickels, C. Grohe, R. Meyer and P. A. Doevendans (2002). "Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function." *Cardiovasc Res* **53**(3): 709-719.
14. Balligand, J. L. and P. J. Cannon (1997). "Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 1846-1858.
15. Balligand, J. L., D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly and et al. (1994). "Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro." *J Biol Chem* **269**(44): 27580-27588.
16. Barouch, L. A., R. W. Harrison, M. W. Skaf, G. O. Rosas, T. P. Cappola, Z. A. Kobeissi, I. A. Hobai, C. A. Lemmon, A. L. Burnett, B. O'Rourke, E. R.

- Rodriguez, P. L. Huang, J. A. Lima, D. E. Berkowitz and J. M. Hare (2002). "Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms." *Nature* **416**(6878): 337-339.
17. Barros, R. P., U. F. Machado, M. Warner and J. A. Gustafsson (2006). "Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1605-1608.
18. Basciano, H., L. Federico and K. Adeli (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia." *Nutr Metab (Lond)* **2**(1): 5.
19. Begum, N., L. Ragolia, J. Rienzie, M. McCarthy and N. Duddy (1998). "Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension." *J Biol Chem* **273**(39): 25164-25170.
20. Begum, N., O. A. Sandu, M. Ito, S. M. Lohmann and A. Smolenski (2002). "Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **277**(8): 6214-6222.
21. Benigni, A., P. Cassis and G. Remuzzi (2010). "Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging." *EMBO Mol Med* **2**(7): 247-257.
22. Bergman, R. N. and M. Ader (2000). "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *Trends Endocrinol Metab* **11**(9): 351-356.
23. Bernard, L., C. Legay, E. Adriaenssens, A. Mougel and J. M. Ricort (2006). "Estradiol regulates the insulin-like growth factor-I (IGF-I) signalling pathway: a crucial role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) in estrogens requirement for growth of MCF-7 human breast carcinoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **350**(4): 916-921.
24. Bharadwaj, K. G., Y. Hiyama, Y. Hu, L. A. Huggins, R. Ramakrishnan, N. A. Abumrad, G. I. Shulman, W. S. Blaner and I. J. Goldberg (2010). "Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different

pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake." *J Biol Chem* **285**(49): 37976-37986.

25. Blum, A., L. Hathaway, R. Mincemoyer, W. H. Schenke, M. Kirby, G. Csako, M. A. Waclawiw, J. A. Panza and R. O. Cannon, 3rd (2000). "Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women." *J Am Coll Cardiol* **35**(2): 271-276.

26. Boden, G. (2011). "Obesity, insulin resistance and free fatty acids." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **18**(2): 139-143.

27. Boden, G., B. Lebed, M. Schatz, C. Homko and S. Lemieux (2001). "Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects." *Diabetes* **50**(7): 1612-1617.

28. Bonen, A., J. J. Luiken, Y. Arumugam, J. F. Glatz and N. N. Tandon (2000). "Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase." *J Biol Chem* **275**(19): 14501-14508.

29. Boo, Y. C. and H. Jo (2003). "Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases." *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(3): C499-508.

30. Bouchard, C., J. P. Despres and P. Mauriege (1993). "Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution." *Endocr Rev* **14**(1): 72-93.

31. Bray, G. A. (1989). "Obesity: basic considerations and clinical approaches." *Dis Mon* **35**(7): 449-537.

32. Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." *Annu Rev Biochem* **63**: 175-195.

33. Brosnihan, K. B., P. Li, D. Ganten and C. M. Ferrario (1997). "Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): R1908-1915.

34. Brown, L. M. and D. J. Clegg (2010). "Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity." *J Steroid Biochem Mol Biol* **122**(1-3): 65-73.

35. Brown, L. M., L. Gent, K. Davis and D. J. Clegg (2010). "Metabolic impact of sex hormones on obesity." *Brain Res* **1350**: 77-85.
36. Bruckdorfer, R. (2005). "The basics about nitric oxide." *Mol Aspects Med* **26**(1-2): 3-31.
37. Brussaard, H. E., J. A. Gevers Leuven, M. Frolich, C. Kluft and H. M. Krans (1997). "Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM." *Diabetologia* **40**(7): 843-849.
38. Buettner, R., K. G. Parhofer, M. Woenckhaus, C. E. Wrede, L. A. Kunz-Schughart, J. Scholmerich and L. C. Bollheimer (2006). "Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types." *J Mol Endocrinol* **36**(3): 485-501.
39. Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
40. Burt, V. L., P. Whelton, E. J. Rocella, C. Brown, J. A. Cutler, M. Higgins, M. J. Horan and D. Labarthe (1995). "Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991." *Hypertension* **25**(3): 305-313.
41. Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res* **87**(10): 840-844.
42. Carley, A. N. and D. L. Severson (2005). "Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts." *Biochim Biophys Acta* **1734**(2): 112-126.
43. Caulin-Glaser, T., G. Garcia-Cardena, P. Sarrel, W. C. Sessa and J. R. Bender (1997). "17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization." *Circ Res* **81**(5): 885-892.
44. Chambliss, K. L. and P. W. Shaul (2002). "Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase." *Endocr Rev* **23**(5): 665-686.

45. Chan, T. W., M. Pollak and H. Huynh (2001). "Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182,780." *Clin Cancer Res* **7**(8): 2545-2554.
46. Chang, K. A., I. C. Lin, J. M. Sheen, Y. C. Chen, C. C. Chen, Y. L. Tain, C. S. Hsieh and L. T. Huang (2013). "Sex differences of oxidative stress to cholestatic liver and kidney injury in young rats." *Pediatr Neonatol* **54**(2): 95-101.
47. Chen, C. A., L. J. Druhan, S. Varadharaj, Y. R. Chen and J. L. Zweier (2008). "Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme." *J Biol Chem* **283**(40): 27038-27047.
48. Chen, Y., J. H. Traverse, R. Du, M. Hou and R. J. Bache (2002). "Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart." *Circulation* **106**(2): 273-279.
49. Chen, Z., I. S. Yuhanna, Z. Galcheva-Gargova, R. H. Karas, M. E. Mendelsohn and P. W. Shaul (1999). "Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen." *J Clin Invest* **103**(3): 401-406.
50. Cheng, C. M., M. Cohen, J. Wang and C. A. Bondy (2001). "Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex." *FASEB J* **15**(6): 907-915.
51. Clegg, D. J., L. M. Brown, S. C. Woods and S. C. Benoit (2006). "Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin." *Diabetes* **55**(4): 978-987.
52. Clemente, G., M. Mancini, R. Giacco, A. Tornatore, M. Ragucci and G. Riccardi (2015). "Visceral adiposity and subclinical atherosclerosis in healthy young men." *Int J Food Sci Nutr* **66**(4): 466-470.
53. Colić, Z. and S. Milutinović (2005). "Hipertrofija miokarda leve komore u gojaznih bolesnika." *Opšta medicina* **1**(1-2): 52-56.

54. Cooke, J. P., A. H. Singer, P. Tsao, P. Zera, R. A. Rowan and M. E. Billingham (1992). "Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit." *J Clin Invest* **90**(3): 1168-1172.
55. Cooke, P. S., P. A. Heine, J. A. Taylor and D. B. Lubahn (2001). "The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue." *Mol Cell Endocrinol* **178**(1-2): 147-154.
56. Coort, S. L., A. Bonen, G. J. van der Vusse, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2007). "Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters." *Mol Cell Biochem* **299**(1-2): 5-18.
57. Coort, S. L., D. M. Hasselbaink, D. P. Koonen, J. Willems, W. A. Coumans, A. Chabowski, G. J. van der Vusse, A. Bonen, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2004). "Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats." *Diabetes* **53**(7): 1655-1663.
58. Copps, K. D. and M. F. White (2012). "Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2." *Diabetologia* **55**(10): 2565-2582.
59. Cosentino, F. and T. F. Luscher (1999). "Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity." *Cardiovasc Res* **43**(2): 274-278.
60. Cowley, S. M., S. Hoare, S. Mosselman and M. G. Parker (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." *J Biol Chem* **272**(32): 19858-19862.
61. Craparo, A., R. Freund and T. A. Gustafson (1997). "14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner." *J Biol Chem* **272**(17): 11663-11669.
62. Crowley, S. D., S. B. Gurley, M. J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A. P. Kumar, H. S. Kim, O. Smithies, T. H. Le and T. M. Coffman (2006). "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17985-17990.

63. Cui, J., Y. Shen and R. Li (2013). "Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain." *Trends Mol Med* **19**(3): 197-209.
64. Daff, S. (2010). "NO synthase: structures and mechanisms." *Nitric Oxide* **23**(1): 1-11.
65. Darblade, B., C. Pendaries, A. Krust, S. Dupont, M. J. Fouque, J. Rami, P. Chambon, F. Bayard and J. F. Arnal (2002). "Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor." *Circ Res* **90**(4): 413-419.
66. Dasgupta, C. and L. Zhang (2011). "Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease." *Drug Discov Today* **16**(1-2): 22-34.
67. Datta, B., T. Tufnell-Barrett, R. A. Bleasdale, C. J. Jones, I. Beeton, V. Paul, M. Frenneaux and P. James (2004). "Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure." *Circulation* **109**(11): 1339-1342.
68. Datta, K., A. Bellacosa, T. O. Chan and P. N. Tsichlis (1996). "Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells." *J Biol Chem* **271**(48): 30835-30839.
69. Davda, R. K., K. T. Stepniakowski, G. Lu, M. E. Ullian, T. L. Goodfriend and B. M. Egan (1995). "Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism." *Hypertension* **26**(5): 764-770.
70. de Luca, C. and J. M. Olefsky (2008). "Inflammation and insulin resistance." *FEBS Lett* **582**(1): 97-105.
71. Denninger, J. W. and M. A. Marletta (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 334-350.
72. Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." *J Clin Invest* **116**(3): 561-570.

73. Deschamps, A. M., E. Murphy and J. Sun (2010). "Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury." *Trends Cardiovasc Med* **20**(3): 73-78.
74. Deutsch, M. B., V. Bhakri and K. Kubicek (2015). "Effects of cross-sex hormone treatment on transgender women and men." *Obstet Gynecol* **125**(3): 605-610.
75. Dinh, D. T., A. G. Frauman, C. I. Johnston and M. E. Fabiani (2001). "Angiotensin receptors: distribution, signalling and function." *Clin Sci (Lond)* **100**(5): 481-492.
76. Dirks, E., R. W. Schwenk, J. F. Glatz, J. J. Luiken and G. J. van Eys (2011). "High fat diet induced diabetic cardiomyopathy." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **85**(5): 219-225.
77. Dobutović, B. (2013). Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri pacova. PhD, University of Belgrade.
78. Domenighetti, A. A., V. R. Danes, C. L. Curl, J. M. Favalaro, J. Proietto and L. M. Delbridge (2010). "Targeted GLUT-4 deficiency in the heart induces cardiomyocyte hypertrophy and impaired contractility linked with Ca(2+) and proton flux dysregulation." *J Mol Cell Cardiol* **48**(4): 663-672.
79. Donaldson, C., S. Eder, C. Baker, M. J. Aronovitz, A. D. Weiss, M. Hall-Porter, F. Wang, A. Ackerman, R. H. Karas, J. D. Molkentin and R. D. Patten (2009). "Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation." *Circ Res* **104**(2): 265-275, 211p following 275.
80. Dresner, A., D. Laurent, M. Marcucci, M. E. Griffin, S. Dufour, G. W. Cline, L. A. Slezak, D. K. Andersen, R. S. Hundal, D. L. Rothman, K. F. Petersen and G. I. Shulman (1999). "Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Clin Invest* **103**(2): 253-259.

81. Drexler, H., S. Kastner, A. Strobel, R. Studer, O. E. Brodde and G. Hasenfuss (1998). "Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart." *J Am Coll Cardiol* **32**(4): 955-963.
82. Duncan, A. C., J. R. Petrie, M. J. Brosnan, A. M. Devlin, R. A. Bass, D. S. Charnock-Jones, J. M. Connell, A. F. Dominiczak and M. A. Lumsden (2002). "Is estradiol cardioprotection a nitric oxide-mediated effect?" *Hum Reprod* **17**(7): 1918-1924.
83. Duncombe, W. G. (1964). "The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma." *Clin Chim Acta* **9**: 122-125.
84. Dzau, V. J., K. Bernstein, D. Celermajer, J. Cohen, B. Dahlof, J. Deanfield, J. Diez, H. Drexler, R. Ferrari, W. van Gilst, L. Hansson, B. Hornig, A. Husain, C. Johnston, H. Lazar, E. Lonn, T. Luscher, J. Mancini, A. Mimran, C. Pepine, T. Rabelink, W. Remme, L. Ruilope, M. Ruzicka, H. Schunkert, K. Swedberg, T. Unger, D. Vaughan, M. Weber and I. S. o. C. P. Working Group on Tissue Angiotensin-converting enzyme (2001). "The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data." *Am J Cardiol* **88**(9A): 1L-20L.
85. Dzurba, A., A. Ziegelhoffer, N. Vrbjar, J. Styk and J. Slezak (1997). "Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma." *Mol Cell Biochem* **176**(1-2): 113-118.
86. Farooq, A. (2015). "Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands." *Curr Top Med Chem* **15**(14): 1372-1384.
87. Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T. W. Smith, R. A. Kelly and T. Michel (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." *J Biol Chem* **271**(37): 22810-22814.
88. Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton, Jr. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal

growth factor receptor through release of HB-EGF." *Mol Endocrinol* **14**(10): 1649-1660.

89. Fischer, Y., J. Thomas, L. Sevilla, P. Munoz, C. Becker, G. Holman, I. J. Kozka, M. Palacin, X. Testar, H. Kammermeier and A. Zorzano (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**(11): 7085-7092.

90. Fleming, I. and R. Busse (1999). "Signal transduction of eNOS activation." *Cardiovasc Res* **43**(3): 532-541.

91. Foldes, G., S. Vajda, Z. Lako-Futo, B. Sarman, R. Skoumal, M. Ilves, R. deChatel, I. Karadi, M. Toth, H. Ruskoaho and I. Lepran (2006). "Distinct modulation of angiotensin II-induced early left ventricular hypertrophic gene programming by dietary fat type." *J Lipid Res* **47**(6): 1219-1226.

92. Folli, F., C. R. Kahn, H. Hansen, J. L. Bouchie and E. P. Feener (1997). "Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk." *J Clin Invest* **100**(9): 2158-2169.

93. Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath and H. Kleinert (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." *Hypertension* **23**(6 Pt 2): 1121-1131.

94. Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J* **33**(7): 829-837, 837a-837d.

95. Francis, S. H., J. L. Busch, J. D. Corbin and D. Sibley (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." *Pharmacol Rev* **62**(3): 525-563.

96. Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell and J. S. Flier (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." *Nat Med* **1**(12): 1311-1314.

97. Fujimoto, M., N. Shimizu, K. Kunii, J. A. Martyn, K. Ueki and M. Kaneki (2005). "A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice." *Diabetes* **54**(5): 1340-1348.
98. Furchgott, R. F. (1983). "Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle." *Circ Res* **53**(5): 557-573.
99. Furchgott, R. F. (1998). "Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes." *An R Acad Nac Med (Madr)* **115**(2): 317-331.
100. Galien, R. and T. Garcia (1997). "Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site." *Nucleic Acids Res* **25**(12): 2424-2429.
101. Garvey, W. T., L. Maianu, J. H. Zhu, J. A. Hancock and A. M. Golichowski (1993). "Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters." *Diabetes* **42**(12): 1773-1785.
102. Gayard, M., C. Guilluy, A. Rousselle, B. Viollet, D. Henrion, P. Pacaud, G. Loirand and M. Rolli-Derkinderen (2011). "AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(11): 2634-2642.
103. Gealekman, O., Z. Abassi, I. Rubinstein, J. Winaver and O. Binah (2002). "Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure." *Circulation* **105**(2): 236-243.
104. Ghafourifar, P., U. Schenk, S. D. Klein and C. Richter (1999). "Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation." *J Biol Chem* **274**(44): 31185-31188.

105. Gimeno, R. E., A. M. Ortegon, S. Patel, S. Punreddy, P. Ge, Y. Sun, H. F. Lodish and A. Stahl (2003). "Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein." *J Biol Chem* **278**(18): 16039-16044.
106. Glatz, J. F., Y. Angin, L. K. Steinbusch, R. W. Schwenk and J. J. Luiken (2013). "CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **88**(1): 71-77.
107. Gonzalez, C., A. Alonso, N. Alvarez, F. Diaz, M. Martinez, S. Fernandez and A. M. Patterson (2000). "Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy." *J Endocrinol* **166**(2): 283-291.
108. Goossens, G. H., E. E. Blaak, P. Arner, W. H. Saris and M. A. van Baak (2007). "Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue." *Int J Obes (Lond)* **31**(2): 382-384.
109. Gorres, B. K., G. L. Bomhoff, J. K. Morris and P. C. Geiger (2011). "In vivo stimulation of oestrogen receptor alpha increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake." *J Physiol* **589**(Pt 8): 2041-2054.
110. Grohé C., Meyer R. and V. H. (1999). Crosstalk between the Estrogen Receptor and the Insulin-Like Growth Factor (IGF-1) Receptor. Implications for Cardiac Disease. Implications for Cardiac Disease. . Cardiovascular Specific Gene Expression. Developments in Cardiovascular Medicine. R. R. S. Doevendans P.A., van Bilsen M., Springer, Dordrecht. **214**.
111. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel and J. F. Tanti (2005). "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation." *Biochimie* **87**(1): 99-109.
112. Guetta, V., A. A. Quyyumi, A. Prasad, J. A. Panza, M. Waclawiw and R. O. Cannon, 3rd (1997). "The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women." *Circulation* **96**(9): 2795-2801.
113. Guo, S. (2014). "Decoding insulin resistance and metabolic syndrome for promising therapeutic intervention." *J Endocrinol* **220**(2): E1-3.

114. Guo, S. (2014). "Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms." *J Endocrinol* **220**(2): T1-T23.
115. Gupte, A. A., H. J. Pownall and D. J. Hamilton (2015). "Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function." *J Diabetes Res* **2015**: 916585.
116. Handgraaf, S., E. Riant, A. Fabre, A. Waget, R. Burcelin, P. Liere, A. Krust, P. Chambon, J. F. Arnal and P. Gourdy (2013). "Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERalpha activation function-2 (ERalphaAF-2), whereas ERalphaAF-1 is dispensable." *Diabetes* **62**(12): 4098-4108.
117. Handgraaf, S., E. Riant, A. Fabre, A. Waget, R. Burcelin, P. Liere, A. Krust, P. Chambon, J. F. Arnal and P. Gourdy (2013). "Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERalpha activation function-2 (ERalphaAF-2), whereas ERalphaAF-1 is dispensable." *Diabetes*.
118. Hao, L., Y. Wang, Y. Duan and S. Bu (2010). "Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment." *Eur J Appl Physiol* **109**(5): 879-886.
119. Harada, N., H. Sasano, H. Murakami, T. Ohkuma, H. Nagura and Y. Takagi (1999). "Localized expression of aromatase in human vascular tissues." *Circ Res* **84**(11): 1285-1291.
120. Hare, J. M. and J. S. Stamler (1999). "NOS: modulator, not mediator of cardiac performance." *Nat Med* **5**(3): 273-274.
121. Hattori, Y., S. Hattori and K. Kasai (2003). "Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation." *Eur J Pharmacol* **481**(2-3): 153-158.
122. Hattori, Y., S. Shimoda and S. S. Gross (1995). "Effect of lipopolysaccharide treatment in vivo on tissue expression of argininosuccinate

synthetase and argininosuccinate lyase mRNAs: relationship to nitric oxide synthase." *Biochem Biophys Res Commun* **215**(1): 148-153.

123. Hayden, M. R. and S. C. Tyagi (2003). "Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress." *Cardiovasc Diabetol* **2**: 2.

124. Haynes, M. P., D. Sinha, K. S. Russell, M. Collinge, D. Fulton, M. Morales-Ruiz, W. C. Sessa and J. R. Bender (2000). "Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells." *Circ Res* **87**(8): 677-682.

125. Haywood, G. A., et al. (1996). "Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure." *Circulation* **93**(6): 1 087 -094.

126. Heine, P. A., J. A. Taylor, G. A. Iwamoto, D. B. Lubahn and P. S. Cooke (2000). "Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12729-12734.

127. Heneka, M. T., P. A. Loschmann, M. Gleichmann, M. Weller, J. B. Schulz, U. Wullner and T. Klockgether (1998). "Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide." *J Neurochem* **71**(1): 88-94.

128. Hewitt, K. N., K. Pratis, M. E. Jones and E. R. Simpson (2004). "Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse." *Endocrinology* **145**(4): 1842-1848.

129. Hewitt, S. C. and K. S. Korach (2002). "Estrogen receptors: structure, mechanisms and function." *Rev Endocr Metab Disord* **3**(3): 193-200.

130. Higashi, Y., T. Oshima, N. Ono, H. Hiraga, M. Yoshimura, M. Watanabe, H. Matsuura, M. Kambe and G. Kajiyama (1995). "Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(7): 2198-2202.

131. Hinojosa-Laborde, C., T. Craig, W. Zheng, H. Ji, J. R. Haywood and K. Sandberg (2004). "Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats." *Hypertension* **44**(4): 405-409.

132. Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* **420**(6913): 333-336.
133. Hisamoto, K., M. Ohmichi, H. Kurachi, J. Hayakawa, Y. Kanda, Y. Nishio, K. Adachi, K. Tasaka, E. Miyoshi, N. Fujiwara, N. Taniguchi and Y. Murata (2001). "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* **276**(5): 3459-3467.
134. Hishikawa, K., T. Nakaki, T. Marumo, H. Suzuki, R. Kato and T. Saruta (1995). "Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells." *FEBS Lett* **360**(3): 291-293.
135. Hoeg, J. M., L. R. Willis and M. H. Weinberger (1977). "Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol* **233**(3): H369-373.
136. Holinka, C. F., E. Diczfalusy and H. J. Coelingh Bennink (2008). "Estetrol: a unique steroid in human pregnancy." *J Steroid Biochem Mol Biol* **110**(1-2): 138-143.
137. Horard, B. and J. M. Vanacker (2003). "Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand." *J Mol Endocrinol* **31**(3): 349-357.
138. Huang, A., D. Sun, A. Koller and G. Kaley (2000). "17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats." *Circulation* **101**(1): 94-100.
139. Huisamen, B., M. van Zyl, A. Keyser and A. Lochner (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**(1-2): 15-25.
140. Hunter, S. J. and W. T. Garvey (1998). "Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system." *Am J Med* **105**(4): 331-345.

141. Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9265-9269.
142. Isenovic, E. R., A. Divald, N. Milivojevic, T. Grgurevic, S. E. Fisher and J. R. Sowers (2003). "Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells." *Metabolism* **52**(4): 482-487.
143. Iyanagi, T., C. Xia and J. J. Kim (2012). "NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: prototypic member of the diflavin reductase family." *Arch Biochem Biophys* **528**(1): 72-89.
144. Jakacka, M., M. Ito, J. Weiss, P. Y. Chien, B. D. Gehm and J. L. Jameson (2001). "Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway." *J Biol Chem* **276**(17): 13615-13621.
145. Javeshghani, D., R. M. Touyz, M. R. Sairam, A. Viridis, M. F. Neves and E. L. Schiffrin (2003). "Attenuated responses to angiotensin II in follitropin receptor knockout mice, a model of menopause-associated hypertension." *Hypertension* **42**(4): 761-767.
146. Jelenik, T. and M. Roden (2013). "How estrogens prevent from lipid-induced insulin resistance." *Endocrinology* **154**(3): 989-992.
147. Jensen, E. V. and H. I. Jacobson (1960). "Basic guides to the mechanism of estrogen action." *Recent Prog Horm Res* **18**: 387-414.
148. Jensen, M. D., M. L. Martin, P. E. Cryer and L. R. Roust (1994). "Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans." *Am J Physiol* **266**(6 Pt 1): E914-920.
149. Jones, B. H., M. K. Standridge, J. W. Taylor and N. Moustaid (1997). "Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): R236-242.
150. Jones, M. E., A. W. Thorburn, K. L. Britt, K. N. Hewitt, N. G. Wreford, J. Proietto, O. K. Oz, B. J. Leury, K. M. Robertson, S. Yao and E. R. Simpson (2000).

"Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12735-12740.

151. Jovanovic, A., E. S. Milovanovic, M. Obradovic, S. J. Pitt, A. J. Stewart, S. Zafirovic, J. Stanimirovic, D. Radak and E. R. Isenovic (2016). "Influence of a high-fat diet on cardiac iNOS in female rats." *Curr Vasc Pharmacol*.

152. Kahn, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* **106**(4): 473-481.

153. Kauser, K., D. Sonnenberg, P. Diel and G. M. Rubanyi (1998). "Effect of 17beta-oestradiol on cytokine-induced nitric oxide production in rat isolated aorta." *Br J Pharmacol* **123**(6): 1089-1096.

154. Kim, J., K. Jo, B. Kim, H. Baik and S. Lee (2012). "17β-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 979-985. <https://doi.org/10.3892/ijmm>." *International Journal of Molecular Medicine* **30**.

155. Kim, J. K. and E. R. Levin (2006). "Estrogen signaling in the cardiovascular system." *Nucl Recept Signal* **4**: e013.

156. Kim, J. Y., K. J. Jo, B. J. Kim, H. W. Baik and S. K. Lee (2012). "17beta-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes." *Int J Mol Med* **30**(4): 979-985.

157. Kimura, M., K. Sudhir, M. Jones, E. Simpson, A. M. Jefferis and J. P. Chin-Dusting (2003). "Impaired acetylcholine-induced release of nitric oxide in the aorta of male aromatase-knockout mice: regulation of nitric oxide production by endogenous sex hormones in males." *Circ Res* **93**(12): 1267-1271.

158. Knowles, C. J., M. Dionne, M. Cebova and I. M. Pinz (2011). "Palmitate-Induced Translocation of Caveolin-3 and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiomyocytes." *Online J Biol Sci* **11**(2): 27-36.

159. Korda, M., R. Kubant, S. Patton and T. Malinski (2008). "Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(4): H1514-1521.
160. Koricanac, G., T. Milosavljevic, M. Stojiljkovic, Z. Zakula, S. Tepavcevic, N. Ribarac-Stepic and E. R. Isenovic (2009). "Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart." *Cell Biochem Funct* **27**(2): 102-110.
161. Koricanac, G., S. Tepavcevic, Z. Zakula, T. Milosavljevic, M. Stojiljkovic and E. R. Isenovic (2011). "Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase." *Eur J Pharmacol* **655**(1-3): 23-30.
162. Kowalczyk D, Pietraś R and B. A. J (2007). "Spectrophotometric analysis of cefepime and L-arginine the pharmaceutical preparation." *Universitatis Mariae CurieSkłodowska*: 83-87.
163. Kuboki, K., Z. Y. Jiang, N. Takahara, S. W. Ha, M. Igarashi, T. Yamauchi, E. P. Feener, T. P. Herbert, C. J. Rhodes and G. L. King (2000). "Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin." *Circulation* **101**(6): 676-681.
164. Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-5930.
165. Kumagai, S., A. Holmang and P. Bjorntorp (1993). "The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats." *Acta Physiol Scand* **149**(1): 91-97.
166. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
167. Lanzino, M., C. Morelli, C. Garofalo, M. L. Panno, L. Mauro, S. Ando and D. Sisci (2008). "Interaction between estrogen receptor alpha and insulin/IGF signaling in breast cancer." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(7): 597-610.

168. LaPointe, M. C. and E. Isenovic (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**(1 Pt 2): 276-282.
169. Lassegue, B., R. W. Alexander, G. Nickenig, M. Clark, T. J. Murphy and K. K. Griendling (1995). "Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation." *Mol Pharmacol* **48**(4): 601-609.
170. Lastra, G., J. Habibi, A. T. Whaley-Connell, C. Manrique, M. R. Hayden, J. Rehmer, K. Patel, C. Ferrario and J. R. Sowers (2009). "Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression." *Endocrinology* **150**(6): 2561-2568.
171. Lee, C. G., M. C. Carr, S. J. Murdoch, E. Mitchell, N. F. Woods, M. H. Wener, W. L. Chandler, E. J. Boyko and J. D. Brunzell (2009). "Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(4): 1104-1110.
172. Lee, H. R., T. H. Kim and K. C. Choi (2012). "Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, identified by estrogen receptor knockout mouse." *Lab Anim Res* **28**(2): 71-76.
173. Lee, M. R., L. Li and T. Kitazawa (1997). "Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase." *J Biol Chem* **272**(8): 5063-5068.
174. Lew, R., P. Komesaroff, M. Williams, T. Dawood and K. Sudhir (2003). "Endogenous estrogens influence endothelial function in young men." *Circ Res* **93**(11): 1127-1133.
175. Li, X., N. Paech, J. Nield, D. Hayman and P. Langridge (1997). "Self-incompatibility in the grasses: evolutionary relationship of the S gene from

Phalaris coerulescens to homologous sequences in other grasses." *Plant Mol Biol* **34**(2): 223-232.

176. Li, Y., X. H. Li and H. Yuan (2012). "Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system." *Cardiovasc Diagn Ther* **2**(1): 56-62.

177. Lijnen, H. R. (2008). "Angiogenesis and obesity." *Cardiovasc Res* **78**(2): 286-293.

178. Lin, G., G. P. Craig, L. Zhang, V. G. Yuen, M. Allard, J. H. McNeill and K. M. MacLeod (2007). "Acute inhibition of Rho-kinase improves cardiac contractile function in streptozotocin-diabetic rats." *Cardiovasc Res* **75**(1): 51-58.

179. Ling, S., P. Komesaroff and K. Sudhir (2006). "Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens." *Clin Sci (Lond)* **111**(2): 107-118.

180. Liu, V. W. and P. L. Huang (2008). "Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice." *Cardiovasc Res* **77**(1): 19-29.

181. Liu, Y. F., A. Herschkovitz, S. Boura-Halfon, D. Ronen, K. Paz, D. Leroith and Y. Zick (2004). "Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9668-9681.

182. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.

183. Lizcano, F. and G. Guzman (2014). "Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause." *Biomed Res Int* **2014**: 757461.

184. Lorenzo, J. (2003). "A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass." *J Clin Invest* **111**(11): 1641-1643.

185. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.

186. Luconi, M., G. Forti and E. Baldi (2002). "Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction." *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**(4-5): 369-381.
187. Luiken, J. J., Y. Arumugam, D. J. Dyck, R. C. Bell, M. M. Pellers, L. P. Turcotte, N. N. Tandon, J. F. Glatz and A. Bonen (2001). "Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats." *J Biol Chem* **276**(44): 40567-40573.
188. Luiken, J. J., S. L. Coort, D. P. Koonen, D. J. van der Horst, A. Bonen, A. Zorzano and J. F. Glatz (2004). "Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters." *Pflugers Arch* **448**(1): 1-15.
189. Luiken, J. J., D. P. Koonen, J. Willems, A. Zorzano, C. Becker, Y. Fischer, N. N. Tandon, G. J. Van Der Vusse, A. Bonen and J. F. Glatz (2002). "Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36." *Diabetes* **51**(10): 3113-3119.
190. Luiken, J. J., F. A. van Nieuwenhoven, G. America, G. J. van der Vusse and J. F. Glatz (1997). "Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins." *J Lipid Res* **38**(4): 745-758.
191. Mackay, D. J. and A. Hall (1998). "Rho GTPases." *J Biol Chem* **273**(33): 20685-20688.
192. MacRitchie, A. N., S. S. Jun, Z. Chen, Z. German, I. S. Yuhanna, T. S. Sherman and P. W. Shaul (1997). "Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium." *Circ Res* **81**(3): 355-362.
193. Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell* **129**(7): 1261-1274.
194. Marino, M., P. Galluzzo and P. Ascenzi (2006). "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription." *Curr Genomics* **7**(8): 497-508.

195. Marsden, P. J., A. Murdoch and R. Taylor (1996). "Adipocyte insulin action during the normal menstrual cycle." *Hum Reprod* **11**(5): 968-974.
196. Masood, D. E., E. C. Roach, K. G. Beauregard and R. A. Khalil (2010). "Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease." *Curr Drug Metab* **11**(8): 693-714.
197. Massion, P. B., O. Feron, C. Dessy and J. L. Balligand (2003). "Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing." *Circ Res* **93**(5): 388-398.
198. Matsui, S., T. Yasui, A. Tani, K. Kunimi, H. Uemura, S. Yamamoto, A. Kuwahara, T. Matsuzaki and M. Irahara (2013). "Associations of estrogen and testosterone with insulin resistance in pre- and postmenopausal women with and without hormone therapy." *Int J Endocrinol Metab* **11**(2): 65-70.
199. Matthews, K. A., E. Meilahn, L. H. Kuller, S. F. Kelsey, A. W. Caggiula and R. R. Wing (1989). "Menopause and risk factors for coronary heart disease." *N Engl J Med* **321**(10): 641-646.
200. Mauvais-Jarvis, F., D. J. Clegg and A. L. Hevener (2013). "The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis." *Endocr Rev* **34**(3): 309-338.
201. McFarlane, S. I., M. Banerji and J. R. Sowers (2001). "Insulin resistance and cardiovascular disease." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2): 713-718.
202. McNeill, A. M., C. Zhang, F. Z. Stanczyk, S. P. Duckles and D. N. Krause (2002). "Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone." *Stroke* **33**(6): 1685-1691.
203. Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C82-97.
204. Mendelsohn, M. E. (2002). "Protective effects of estrogen on the cardiovascular system." *Am J Cardiol* **89**(12A): 12E-17E; discussion 17E-18E.

205. Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." *N Engl J Med* **340**(23): 1801-1811.
206. Mendes Ribeiro, A. C., T. M. Brunini, J. C. Ellory and G. E. Mann (2001). "Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure." *Cardiovasc Res* **49**(4): 697-712.
207. Mendez-Luna, D., M. Martinez-Archundia, R. C. Maroun, G. Ceballos-Reyes, M. J. Fragoso-Vazquez, D. E. Gonzalez-Juarez and J. Correa-Basurto (2015). "Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations." *J Biomol Struct Dyn* **33**(10): 2161-2172.
208. Miinea, C. P., H. Sano, S. Kane, E. Sano, M. Fukuda, J. Peranen, W. S. Lane and G. E. Lienhard (2005). "AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain." *Biochem J* **391**(Pt 1): 87-93.
209. Miller, C. N., L. M. Brown, S. Rayalam, M. Della-Fera and C. A. Baile (2012). "Estrogens, inflammation and obesity: an overview." *Front. Biol.*
210. Modena, M. G., N. Muia, Jr., P. Aveta, R. Molinari and R. Rossi (1999). "Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women." *Hypertension* **34**(5): 1041-1046.
211. Momken, I., A. Chabowski, E. Dirkx, M. Nabben, S. S. Jain, J. T. McFarlan, J. F. Glatz, J. J. Luiken and A. Bonen (2017). "A new leptin-mediated mechanism for stimulating fatty acid oxidation: a pivotal role for sarcolemmal FAT/CD36." *Biochem J* **474**(1): 149-162.
212. Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." *FASEB J* **9**(13): 1319-1330.
213. Monteiro, R., D. Teixeira and C. Calhau (2014). "Estrogen signaling in metabolic inflammation." *Mediators Inflamm* **2014**: 615917.
214. Montessuit, C. and R. Lerch (2013). "Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes." *Biochim Biophys Acta* **1833**(4): 848-856.

215. Muller, D. N., J. Bohlender, K. F. Hilgers, D. Dragun, O. Costerousse, J. Menard and F. C. Luft (1997). "Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II." *Hypertension* **29**(1 Pt 1): 98-104.
216. Mungrue, I. N., D. S. Bredt, D. J. Stewart and M. Husain (2003). "From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?" *Acta Physiol Scand* **179**(2): 123-135.
217. Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart and M. Husain (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." *J Clin Invest* **109**(6): 735-743.
218. Munoz, J., A. Derstine and B. A. Gower (2002). "Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement." *Obes Res* **10**(6): 424-431.
219. Murase, T., T. Hattori, M. Ohtake, C. Nakashima, M. Takatsu, T. Murohara and K. Nagata (2012). "Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats as a new animal model of metabolic syndrome." *Hypertension* **59**(3): 694-704.
220. Murphy, A. J., P. M. Guyre and P. A. Pioli (2010). "Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages." *J Immunol* **184**(9): 5029-5037.
221. Murphy, E. (2011). "Estrogen signaling and cardiovascular disease." *Circ Res* **109**(6): 687-696.
222. Musatov, S., W. Chen, D. W. Pfaff, C. V. Mobbs, X. J. Yang, D. J. Clegg, M. G. Kaplitt and S. Ogawa (2007). "Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7): 2501-2506.
223. Myers, M. G., Jr., J. M. Backer, X. J. Sun, S. Shoelson, P. Hu, J. Schlessinger, M. Yoakim, B. Schaffhausen and M. F. White (1992). "IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10350-10354.

224. Nagareddy, P. R., H. Soliman, G. Lin, P. S. Rajput, U. Kumar, J. H. McNeill and K. M. MacLeod (2009). "Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible nitric oxide synthase-mediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats." *Diabetes* **58**(10): 2355-2364.
225. Naseem, K. M. (2005). "The role of nitric oxide in cardiovascular diseases." *Mol Aspects Med* **26**(1-2): 33-65.
226. Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* **78**(6): 915-918.
227. Nelson, L. R. and S. E. Bulun (2001). "Estrogen production and action." *J Am Acad Dermatol* **45**(3 Suppl): S116-124.
228. Nickenig, G., A. T. Baumer, C. Grohe, S. Kahlert, K. Strehlow, S. Rosenkranz, A. Stablein, F. Beckers, J. F. Smits, M. J. Daemen, H. Vetter and M. Bohm (1998). "Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo." *Circulation* **97**(22): 2197-2201.
229. Nilsson, B. O., B. Olde and L. M. Leeb-Lundberg (2011). "G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling." *Br J Pharmacol* **163**(6): 1131-1139.
230. Noronha, B. T., J. M. Li, S. B. Wheatcroft, A. M. Shah and M. T. Kearney (2005). "Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity." *Diabetes* **54**(4): 1082-1089.
231. Nuedling, S., S. Kahlert, K. Loebbert, P. A. Doevendans, R. Meyer, H. Vetter and C. Grohe (1999). "17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo." *Cardiovasc Res* **43**(3): 666-674.
232. Nweze, I. C., J. W. Smith, B. Zhang, C. M. Klinge, J. Lakshmanan and B. G. Harbrecht (2012). "17beta-Estradiol attenuates cytokine-induced nitric oxide production in rat hepatocyte." *J Trauma Acute Care Surg* **73**(2): 408-412.
233. O'Hagan, T. S., W. Wharton and P. G. Kehoe (2012). "Interactions between oestrogen and the renin angiotensin system - potential mechanisms for

- gender differences in Alzheimer's disease." *Am J Neurodegener Dis* **1**(3): 266-279.
234. Oakes, N. D., G. J. Cooney, S. Camilleri, D. J. Chisholm and E. W. Kraegen (1997). "Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding." *Diabetes* **46**(11): 1768-1774.
235. Obradovic, M. (2013). Efekti estradiola na regulaciju natrijum-kalijumove pumpe i morfologiju srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova. PhD, Belgrade.
236. Obradovic, M., A. J. Stewart, S. J. Pitt, M. Labudovic-Borovic, E. Sudar, V. Petrovic, S. Zafirovic, V. Maravic-Stojkovic, V. Vasic and E. R. Isenovic (2014). "In vivo effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase expression and activity in rat heart." *Mol Cell Endocrinol* **388**(1-2): 58-68.
237. Obradovic, M., E. Sudar, S. Zafirovic, J. Stanimirovic, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2013). "Estradiol In Vivo Induces Changes in Cardiomyocytes Size in Obese Rats." *Angiology*.
238. Obradovic, M., E. Sudar, S. Zafirovic, J. Stanimirovic, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2015). "Estradiol in vivo induces changes in cardiomyocytes size in obese rats." *Angiology* **66**(1): 25-35.
239. Obradovic, M., S. Zafirovic, A. Jovanovic, E. S. Milovanovic, S. A. Mousa, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2015). "Effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase in high fat diet fed rats." *Mol Cell Endocrinol* **416**: 46-56.
240. Oelkers, W. K. (1996). "Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure." *Steroids* **61**(4): 166-171.
241. Ohashi, Y., S. Kawashima, K. Hirata, T. Yamashita, T. Ishida, N. Inoue, T. Sakoda, H. Kurihara, Y. Yazaki and M. Yokoyama (1998). "Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase." *J Clin Invest* **102**(12): 2061-2071.

242. Okura, T., M. Koda, F. Ando, N. Niino, S. Ohta and H. Shimokata (2003). "Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**(9): 1020-1027.
243. Orshal, J. M. and R. A. Khalil (2004). "Gender, sex hormones, and vascular tone." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**(2): R233-249.
244. Osborne, C. K. and R. Schiff (2005). "Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications." *J Clin Oncol* **23**(8): 1616-1622.
245. Ouali, R., M. C. Berthelon, M. Begeot and J. M. Saez (1997). "Angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 are down-regulated by angiotensin II through AT1 receptor by different mechanisms." *Endocrinology* **138**(2): 725-733.
246. Ouwens, D. M., M. Diamant, M. Fodor, D. D. Habets, M. M. Pelsers, M. El Hasnaoui, Z. C. Dang, C. E. van den Brom, R. Vlasblom, A. Rietdijk, C. Boer, S. L. Coort, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2007). "Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification." *Diabetologia* **50**(9): 1938-1948.
247. Oviedo, P. J., A. Sobrino, A. Laguna-Fernandez, S. Novella, J. J. Tarin, M. A. Garcia-Perez, J. Sanchis, A. Cano and C. Hermenegildo (2011). "Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway." *Mol Cell Endocrinol* **335**(2): 96-103.
248. Padilla, F., D. Garcia-Dorado, L. Agullo, J. Inserte, A. Paniagua, S. Mirabet, J. A. Barrabes, M. Ruiz-Meana and J. Soler-Soler (2000). "L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig." *Cardiovasc Res* **46**(3): 412-420.
249. Paech, K., P. Webb, G. G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P. J. Kushner and T. S. Scanlan (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites." *Science* **277**(5331): 1508-1510.
250. Palmer, R. M., D. D. Rees, D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in

endothelium-dependent relaxation." *Biochem Biophys Res Commun* **153**(3): 1251-1256.

251. Patel, C., H. Ghanim, S. Ravishankar, C. L. Sia, P. Viswanathan, P. Mohanty and P. Dandona (2007). "Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(11): 4476-4479.

252. Paterson, D. (2001). "Nitric oxide and the autonomic regulation of cardiac excitability. The G.L. Brown Prize Lecture." *Exp Physiol* **86**(1): 1-12.

253. Patten, R. D. and R. H. Karas (2006). "Estrogen replacement and cardiomyocyte protection." *Trends Cardiovasc Med* **16**(3): 69-75.

254. Pedram, A., M. Razandi, M. Aitkenhead, C. C. Hughes and E. R. Levin (2002). "Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology." *J Biol Chem* **277**(52): 50768-50775.

255. Pedram, A., M. Razandi, F. O'Mahony, D. Lubahn and E. R. Levin (2010). "Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis." *Mol Endocrinol* **24**(11): 2152-2165.

256. Pelligrino, D. A., S. Ye, F. Tan, R. A. Santizo, D. L. Feinstein and Q. Wang (2000). "Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(1): 165-171.

257. Peluffo, R. D. (2007). "L-Arginine currents in rat cardiac ventricular myocytes." *J Physiol* **580**(Pt.3): 925-936.

258. Peters, S. L. and M. C. Michel (2007). "The RhoA/Rho kinase pathway in the myocardium." *Cardiovasc Res* **75**(1): 3-4.

259. Pfitzer, G., J. C. Ruegg, V. Flockerzi and F. Hofmann (1982). "cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers." *FEBS Lett* **149**(2): 171-175.

260. Pickar, J. H., I. Thorneycroft and M. Whitehead (1998). "Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: a

review of randomized clinical trials, 1985 to 1995." *Am J Obstet Gynecol* **178**(5): 1087-1099.

261. Pinto, S., A. Viridis, L. Ghiadoni, G. Bernini, M. Lombardo, F. Petraglia, A. R. Genazzani, S. Taddei and A. Salvetti (1997). "Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women." *Hypertension* **29**(1 Pt 2): 268-273.

262. Poirier, P., T. D. Giles, G. A. Bray, Y. Hong, J. S. Stern, F. X. Pi-Sunyer, R. H. Eckel, A. American Heart, P. A. Obesity Committee of the Council on Nutrition and Metabolism (2006). "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." *Circulation* **113**(6): 898-918.

263. Pou, K. M., J. M. Massaro, U. Hoffmann, R. S. Vasan, P. Maurovich-Horvat, M. G. Larson, J. F. Keaney, Jr., J. B. Meigs, I. Lipinska, S. Kathiresan, J. M. Murabito, C. J. O'Donnell, E. J. Benjamin and C. S. Fox (2007). "Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study." *Circulation* **116**(11): 1234-1241.

264. Puthanveetil, P., Y. Wang, D. Zhang, F. Wang, M. S. Kim, S. Innis, T. Pulinilkunnil, A. Abrahani and B. Rodrigues (2011). "Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1-iNOS-CD36 pathway." *Free Radic Biol Med* **51**(2): 352-363.

265. Qi, Y., Z. Xu, Q. Zhu, C. Thomas, R. Kumar, H. Feng, D. E. Dostal, M. F. White, K. M. Baker and S. Guo (2013). "Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance." *Diabetes* **62**(11): 3887-3900.

266. Qiao, X., K. R. McConnell and R. A. Khalil (2008). "Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging." *Gend Med* **5 Suppl A**: S46-64.

267. Re, R. N. (2009). "Obesity-related hypertension." *Ochsner J* **9**(3): 133-136.

268. Reaven, G. M. (1995). "Pathophysiology of insulin resistance in human disease." *Physiol Rev* **75**(3): 473-486.
269. Ren, J., K. K. Hintz, Z. K. Roughead, J. Duan, P. B. Colligan, B. H. Ren, K. J. Lee and H. Zeng (2003). "Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(5): H1800-1807.
270. Rhodes, P., A. M. Leone, P. L. Francis, A. D. Struthers, S. Moncada and P. M. Rhodes (1995). "The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans." *Biochem Biophys Res Commun* **209**(2): 590-596.
271. Riant, E., A. Waget, H. Cogo, J. F. Arnal, R. Burcelin and P. Gourdy (2009). "Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice." *Endocrinology* **150**(5): 2109-2117.
272. Ricchiuti, V., C. G. Lian, E. M. Oestreicher, L. Tran, J. R. Stone, T. Yao, E. W. Seely, G. H. Williams and G. K. Adler (2009). "Estradiol increases angiotensin II type 1 receptor in hearts of ovariectomized rats." *J Endocrinol* **200**(1): 75-84.
273. Richards, R. G., R. P. DiAugustine, P. Petrusz, G. C. Clark and J. Sebastian (1996). "Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 12002-12007.
274. Rider, O. J., P. Cox, D. Tyler, K. Clarke and S. Neubauer (2013). "Myocardial substrate metabolism in obesity." *Int J Obes (Lond)* **37**(7): 972-979.
275. Roberts, P. J., G. P. Riley, K. Morgan, R. Miller, J. O. Hunter and S. J. Middleton (2001). "The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon." *J Clin Pathol* **54**(4): 293-297.
276. Roesch, D. M., Y. Tian, W. Zheng, M. Shi, J. G. Verbalis and K. Sandberg (2000). "Estradiol attenuates angiotensin-induced aldosterone secretion in ovariectomized rats." *Endocrinology* **141**(12): 4629-4636.

277. Ropero, A. B., P. Alonso-Magdalena, I. Quesada and A. Nadal (2008). "The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis." *Steroids* **73**(9-10): 874-879.
278. Roytblat, L., M. Rachinsky, A. Fisher, L. Greemberg, Y. Shapira, A. Douvdevani and S. Gelman (2000). "Raised interleukin-6 levels in obese patients." *Obes Res* **8**(9): 673-675.
279. Ryan, K. J. (1982). "Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology." *Cancer Res* **42**(8 Suppl): 3342s-3344s.
280. Sansbury, B. E. and B. G. Hill (2014). "Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide." *Free Radic Biol Med* **73**: 383-399.
281. Santalucia, T., M. Camps, A. Castello, P. Munoz, A. Nuel, X. Testar, M. Palacin and A. Zorzano (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**(2): 837-846.
282. Schmitz-Peiffer, C. and T. J. Biden (2008). "Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes." *Diabetes* **57**(7): 1774-1783.
283. Scolletta, S. and B. Biagioli (2010). "Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure." *Biomed Pharmacother* **64**(3): 203-207.
284. Scott, J. A., S. Mehta, M. Duggan, A. Bihari and D. G. McCormack (2002). "Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(10): 1426-1432.
285. Seddon, M., A. M. Shah and B. Casadei (2007). "Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling." *Cardiovasc Res* **75**(2): 315-326.
286. Segura, J. and L. M. Ruilope (2007). "Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system." *Public Health Nutr* **10**(10A): 1151-1155.
287. Shao, D. and R. Tian (2015). "Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy." *Compr Physiol* **6**(1): 331-351.

288. Shaul, P. W. (2002). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location." *Annu Rev Physiol* **64**: 749-774.
289. Shi, H., S. P. Kumar and X. Liu (2013). "G protein-coupled estrogen receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis." *Prog Mol Biol Transl Sci* **114**: 193-250.
290. Shimabukuro, M., M. Ohneda, Y. Lee and R. H. Unger (1997). "Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease." *J Clin Invest* **100**(2): 290-295.
291. Shimabukuro, M., Y. T. Zhou, M. Levi and R. H. Unger (1998). "Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2498-2502.
292. Shin, J. H., J. Y. Hur, H. S. Seo, Y. A. Jeong, J. K. Lee, M. J. Oh, T. Kim, H. S. Saw and S. H. Kim (2007). "The ratio of estrogen receptor alpha to estrogen receptor beta in adipose tissue is associated with leptin production and obesity." *Steroids* **72**(6-7): 592-599.
293. Shirakami, A., T. Toyonaga, K. Tsuruzoe, T. Shirotani, K. Matsumoto, K. Yoshizato, J. Kawashima, Y. Hirashima, N. Miyamura, C. R. Kahn and E. Araki (2002). "Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes." *J Endocrinol* **174**(2): 309-319.
294. Silva-Antonialli, M. M., R. C. Tostes, L. Fernandes, D. R. Fior-Chadi, E. H. Akamine, M. H. Carvalho, Z. B. Fortes and D. Nigro (2004). "A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats." *Cardiovasc Res* **62**(3): 587-593.
295. Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, W. W. Chin and J. K. Liao (2000). "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase." *Nature* **407**(6803): 538-541.
296. Simoncini, T., P. Mannella, L. Fornari, A. Caruso, G. Varone and A. R. Genazzani (2004). "Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells." *Steroids* **69**(8-9): 537-542.

297. Simpson, E. R., M. Misso, K. N. Hewitt, R. A. Hill, W. C. Boon, M. E. Jones, A. Kovacic, J. Zhou and C. D. Clyne (2005). "Estrogen--the good, the bad, and the unexpected." *Endocr Rev* **26**(3): 322-330.
298. Smith, B. C., E. S. Underbakke, D. W. Kulp, W. R. Schief and M. A. Marletta (2013). "Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(38): E3577-3586.
299. Snyder, S. H. and D. S. Bredt (1992). "Biological roles of nitric oxide." *Sci Am* **266**(5): 68-71, 74-67.
300. Soliman, H., G. P. Craig, P. Nagareddy, V. G. Yuen, G. Lin, U. Kumar, J. H. McNeill and K. M. Macleod (2008). "Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats." *Cardiovasc Res* **79**(2): 322-330.
301. Soliman, H., V. Nyamandi, M. Garcia-Patino, J. N. Varela, G. Bankar, G. Lin, Z. Jia and K. M. MacLeod (2015). "Partial deletion of ROCK2 protects mice from high-fat diet-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**(1): H70-81.
302. Souza, R. R., V. C. Oliveira, T. C. Curi and D. C. Maldonado (2014). "Effects of ovariectomy on the secretory apparatus in the right atrial cardiomyocytes of middle-aged mice." *Clinics (Sao Paulo)* **69**(8): 554-558.
303. Sovershaev, M. A., E. M. Egorina, T. V. Andreasen, A. K. Jonassen and K. Ytrehus (2006). "Preconditioning by 17beta-estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(4): H1554-1562.
304. Sowers, J. R., P. S. Sowers and J. D. Peuler (1994). "Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis." *J Lab Clin Med* **123**(5): 647-652.
305. Stanimirovic, J., M. Obradovic, A. Jovanovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Zafirovic, S. J. Pitt, A. J. Stewart and E. R. Isenovic (2016). "A high fat diet

induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats." *Nitric Oxide* **54**: 51-59.

306. Steinberg, G. R., D. J. Dyck, J. Calles-Escandon, N. N. Tandon, J. J. Luiken, J. F. Glatz and A. Bonen (2002). "Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle." *J Biol Chem* **277**(11): 8854-8860.

307. Steinbusch, L. K., R. W. Schwenk, D. M. Ouwens, M. Diamant, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2011). "Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes." *Cell Mol Life Sci* **68**(15): 2525-2538.

308. Stirone, C., Y. Chu, L. Sunday, S. P. Duckles and D. N. Krause (2003). "17 Beta-estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction." *Eur J Pharmacol* **478**(1): 35-38.

309. Stroes, E., M. Hijmering, M. van Zandvoort, R. Wever, T. J. Rabelink and E. E. van Faassen (1998). "Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase." *FEBS Lett* **438**(3): 161-164.

310. Stubbins, R. E., K. Najjar, V. B. Holcomb, J. Hong and N. P. Nunez (2012). "Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance." *Diabetes Obes Metab* **14**(1): 58-66.

311. Suba, Z. (2012). "Interplay between insulin resistance and estrogen deficiency as co-activators in carcinogenesis." *Pathol Oncol Res* **18**(2): 123-133.

312. Sudar, E. (2011). *Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom*. PhD, University of Belgrade.

313. Sudar Milovanovic, E., A. Jovanovic, M. Misirkic-Marjanovic, L. Vucicevic, K. Janjetovic and E. R. Isenovic (2015). "Effects of Intracerebroventricularly (ICV) Injected Ghrelin on Cardiac Inducible Nitric Oxide Synthase Activity/Expression in Obese Rats." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **123**(10): 581-588.

314. Sudhir, K. and P. A. Komesaroff (1999). "Clinical review 110: Cardiovascular actions of estrogens in men." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(10): 3411-3415.
315. Sun, X. J., J. L. Goldberg, L. Y. Qiao and J. J. Mitchell (1999). "Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway." *Diabetes* **48**(7): 1359-1364.
316. Sunday, L., M. M. Tran, D. N. Krause and S. P. Duckles (2006). "Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(2): E261-267.
317. Surma, M., L. Wei and J. Shi (2011). "Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease." *Future Cardiol* **7**(5): 657-671.
318. Sykiotis, G. P. and A. G. Papavassiliou (2001). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance." *Mol Endocrinol* **15**(11): 1864-1869.
319. Taddei, S. (2009). "Blood pressure through aging and menopause." *Climacteric* **12 Suppl 1**: 36-40.
320. Tamura, K., K. Yamaguchi and H. Kogo (2000). "17Beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo." *Life Sci* **66**(17): PL 259-264.
321. Tanabe, Y., T. Yano and T. Nakamura (1983). "Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic ducks." *Gen Comp Endocrinol* **49**(1): 144-153.
322. Tepavcevic, S., G. Koricanac, Z. Zakula, T. Milosavljevic, M. Stojiljkovic and E. R. Isenovic (2011). "Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters." *Horm Metab Res* **43**(8): 524-530.
323. Tian, Y. Q., S. S. Li, X. D. Su, G. Z. Zhang, J. J. Zhao, G. W. Li and L. Wang (2012). "Effects of pioglitazone on high-fat-diet-induced ventricular remodeling and dysfunction in rats." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **17**(2): 223-228.

324. Toft, D. and J. Gorski (1966). "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6): 1574-1581.
325. Tolbert, T. and S. Oparil (2001). "Cardiovascular effects of estrogen." *Am J Hypertens* **14**(6 Pt 2): 186S-193S.
326. Tostes, R. C., D. Nigro, Z. B. Fortes and M. H. Carvalho (2003). "Effects of estrogen on the vascular system." *Braz J Med Biol Res* **36**(9): 1143-1158.
327. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
328. Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa and S. Narumiya (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." *Nature* **389**(6654): 990-994.
329. Umar, S. and A. van der Laarse (2010). "Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart." *Mol Cell Biochem* **333**(1-2): 191-201.
330. Underwood, P. C. and G. K. Adler (2013). "The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans." *Curr Hypertens Rep* **15**(1): 59-70.
331. Vafiadaki, E., V. Papalouka, D. A. Arvanitis, E. G. Kranias and D. Sanoudou (2009). "The role of SERCA2a/PLN complex, Ca(2+) homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate." *Pflugers Arch* **457**(3): 687-700.
332. van der Vusse, G. J., M. van Bilsen and J. F. Glatz (2000). "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease." *Cardiovasc Res* **45**(2): 279-293.
333. Vejlstrup, N. G., A. Bouloumie, S. Boesgaard, C. B. Andersen, J. E. Nielsen-Kudsk, S. A. Mortensen, J. D. Kent, D. G. Harrison, R. Busse and J. Aldershvile (1998). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart:

expression and localization in congestive heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **30**(6): 1215-1223.

334. Velloso, L. A., F. Folli, X. J. Sun, M. F. White, M. J. Saad and C. R. Kahn (1996). "Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12490-12495.

335. Vina, J., J. Sastre, F. V. Pallardo, J. Gambini and C. Borrás (2006). "Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens." *Free Radic Res* **40**(12): 1359-1365.

336. Vivar, R., C. Soto, M. Copaja, F. Mateluna, P. Aranguiz, J. P. Muñoz, M. Chiong, L. Garcia, A. Letelier, W. G. Thomas, S. Lavandero and G. Diaz-Araya (2008). "Phospholipase C/protein kinase C pathway mediates angiotensin II-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor." *J Cardiovasc Pharmacol* **52**(2): 184-190.

337. Wabitsch, M., A. Ballauff, R. Holl, W. F. Blum, E. Heinze, H. Renschmidt and J. Hebebrand (2001). "Serum leptin, gonadotropin, and testosterone concentrations in male patients with anorexia nervosa during weight gain." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(7): 2982-2988.

338. Wagner, J. D., M. J. Thomas, J. K. Williams, L. Zhang, K. A. Greaves and W. T. Cefalu (1998). "Insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in ovariectomized monkeys with estradiol alone or combined with noregestrol acetate." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(3): 896-901.

339. Walsh, M. F., M. Barazi, G. Pete, R. Muniyappa, J. C. Dunbar and J. R. Sowers (1996). "Insulin-like growth factor I diminishes in vivo and in vitro vascular contractility: role of vascular nitric oxide." *Endocrinology* **137**(5): 1798-1803.

340. Wang, Z. and T. Nakayama (2010). "Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease." *Mediators Inflamm* **2010**: 535918.

341. Wauters, M., R. V. Considine and L. F. Van Gaal (2000). "Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator." *Eur J Endocrinol* **143**(3): 293-311.

342. Weiner, C. P., I. Lizasoain, S. A. Baylis, R. G. Knowles, I. G. Charles and S. Moncada (1994). "Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5212-5216.
343. Welch, R. D. and J. Gorski (1999). "Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus." *Endocrinology* **140**(8): 3602-3608.
344. Wentz, A. E., D. A. d'Avignon, M. L. Weber, D. G. Cotter, J. M. Doherty, R. Kerns, R. Nagarajan, N. Reddy, N. Sambandam and P. A. Crawford (2010). "Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment." *J Biol Chem* **285**(32): 24447-24456.
345. Wierman, M. E. (2007). "Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action." *Adv Physiol Educ* **31**(1): 26-33.
346. Wilson, C. R., M. K. Tran, K. L. Salazar, M. E. Young and H. Taegtmeyer (2007). "Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats." *Biochem J* **406**(3): 457-467.
347. Woods, S. C., R. J. Seeley, P. A. Rushing, D. D'Alessio and P. Tso (2003). "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats." *J Nutr* **133**(4): 1081-1087.
348. Xie, P., M. L. Liu, Y. P. Gu, J. Lu, X. Xu, W. M. Zeng and H. P. Song (2003). "Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**(9): 643-648.
349. Xu, Y., I. A. Arenas, S. J. Armstrong and S. T. Davidge (2003). "Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart." *Cardiovasc Res* **57**(2): 388-394.
350. Xu, Z. G., L. Lanting, N. D. Vaziri, Z. Li, L. Sepassi, B. Rodriguez-Iturbe and R. Natarajan (2005). "Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney: reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade." *Circulation* **111**(15): 1962-1969.

351. Yang, S., L. Bae and L. Zhang (2000). "Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium." *J Cardiovasc Pharmacol* **36**(2): 242-247.
352. Yang, X. P. and J. F. Reckelhoff (2011). "Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**(2): 133-138.
353. Yetik-Anacak, G. and J. D. Catravas (2006). "Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease." *Vascul Pharmacol* **45**(5): 268-276.
354. Zemse, S. M., C. W. Chiao, R. H. Hilgers and R. C. Webb (2010). "Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF-alpha on the endothelium of murine aorta." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(4): H1160-1167.
355. Zeng, G. and M. J. Quon (1996). "Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells." *J Clin Invest* **98**(4): 894-898.
356. Zhang, L., W. Keung, V. Samokhvalov, W. Wang and G. D. Lopaschuk (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): 1-22.
357. Zhang, P., X. Xu, X. Hu, E. D. van Deel, G. Zhu and Y. Chen (2007). "Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure." *Circ Res* **100**(7): 1089-1098.
358. Zhou, M. S., I. H. Schulman and L. Rajj (2004). "Nitric oxide, angiotensin II, and hypertension." *Semin Nephrol* **24**(4): 366-378.
359. Zhu, L., W. C. Brown, Q. Cai, A. Krust, P. Chambon, O. P. McGuinness and J. M. Stafford (2013). "Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance." *Diabetes* **62**(2): 424-434.

360. Zunic, G., G. Supic, Z. Magic, B. Draskovic and M. Vasiljevska (2009). "Increased nitric oxide formation followed by increased arginase activity induces relative lack of arginine at the wound site and alters whole nutritional status in rats almost within the early healing period." *Nitric Oxide* **20**(4): 253-258.

Biografija autora

Sonja S. Zafirović je rođena 18. januara 1983. godine u Sremskoj Mitrovici, Republika Srbija. Diplomirala je na grupi za Molekularnu biologiju i fiziologiju, Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu, 29.09.2011. godine odbranivši diplomski rad pod nazivom: "Ispitivanje antiproliferativnog efekta kompleksa oksaprozina sa metalima (Cu, Co, Ni) prema HCT 116 i MDA 231 tumorskim ćelijskim linijama" pod rukovodstvom Prof. dr Biljane Božić.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu-Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine, na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Od 01.01.2012. godine Sonja S. Zafirović je zaposlena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ -Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač saradnik je stekla 26.12.2012. godine. Tema za izradu doktorske disertacije pod naslovom „Efekat estradiola na regulaciju endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova" odobrena je 25.09.2014. godine od strane Veća naučnih oblasti prirodnih nauka, Univerziteta u Beogradu.

Sonja S. Zafirović je trenutno angažovana na projektu: „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja" (br. 173033), čiji je rukovodilac Prof. dr Esma R. Isenović, Naučni savetnik.

U svom dosadašnjem radu bila je koautor na 17 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, 6 publikacija objavljenih u časopisima nacionalnog značaja, kao i na 5 saopštenja sa skupova međunarodnog značaja. Glavne oblasti naučno-istraživačkog rada Sonje S. Zafirović su: gojaznost, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i molekularna endokrinologija.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Соња С. Зафировић _____

Број индекса _____ Б3052/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне
азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова**

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Соња С. Зафировић

Број индекса Б3052/2011

Студијски програм Биологија-Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова

Ментор др Есма Р. Исеновић и др Јелена Ђорђевић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Ефекат естрадиола на регулацију ендотелне и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у срцу гојазних пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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