

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tijana M. Milosavljević

**Tkivna specifičnost efekata  $17\beta$ -estradiola  
na signalni put insulina**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tijana M. Milosavljević

**Tissue specificity of  $17\beta$ -estradiol effects on  
insulin signaling pathway**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

## **Komisija za pregled i odbranu:**

### **Mentori:**

dr Goran Korićanac, viši naučni saradnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča“

dr Gordana Cvijić, redovni profesor  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

### **Član Komisije**

dr Zorica Žakula, viši naučni saradnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča“

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

## **ZAHVALNICA**

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" pod neposrednim rukovodstvom dr Gorana Korićanca.

Posebno se zahvaljujem članovima komisije:

Mentoru dr Goranu Korićancu na definisanju forme i sadržaja ove disertacije, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom eksperimentalnog rada i tokom pisanja disertacije, kao i na beskrajnom strpljenju.

Mentoru dr Gordani Cvijić, na korektnoj saradnji i dragocenim sugestijama.

Dr Zorici Žakula, na velikoj pomoći i podršci tokom eksperimentalnog rada, kao i na dragocenim sugestijama za konačno formiranje teksta ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim dragim kolegicama, Mojci i Snežani, za pomoć tokom izrade eksperimentalnog dela ovog rada, za prijateljske savete i podršku u brojnim trenucima kada je to bilo potrebno, a pre svega za prijatnu atmosferu tokom svih ovih godina. Dragim kolegicama Ani Kalijadis i Snježani Romić, zahvaljujem na prijateljskoj podršci i korisnim savetima.

Svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke "Vinča", koji su mi na bilo koji način pomogli i pružili podršku u izradi ovog rada najtoplije zahvaljujem.

Hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci tokom svih ovih godina.

Veliko hvala Milanu na pomoći, strpljenju i razumevanju.

Beograd, april 2012

## **Tkivna specifičnost efekata 17 $\beta$ -estradiola na signalni put insulina**

### **REZIME**

Insulin i estradiol imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata i lipida. Različita klinička istraživanja i eksperimentalni podaci ukazuju da varijacije u koncentraciji estrogena utiču na insulinsko delovanje. Cilj ove studije je bilo poređenje uticaja estradiola na početne molekule insulinskog signalnog puta u glavnim ciljnim tkivima za insulin (jetra) i estradiol (uterus), kao i u srcu, u kome oba hormona ostvaruju značajne efekte. Ovarijsktomisane ženke pacova su tretirane estradiolom 6 h pre analize sadržaja proteina i iRNK molekula signalnog puta insulina. Da bi se istakli efekti estradiola na fosforilacije i asocijacije molekula relevantne za insulinski signalni put, životinje su dodatno injecirane insulinom 30 min pre eksperimenta. Tretman estradiolom nije promenio nivo insulina i glukoze u plazmi, ali je doveo do značajnog smanjenja nivoa slobodnih masnih kiselina i povećanja težine uterusa. U jetri, tretman estradiolom je doveo do smanjenja fosforilacije IR, kao i smanjenja proteinskog sadržaja IRS-1, što navodi na zaključak da je estradiol suprimirao efekte insulina preko IR/IRS-1 puta i verovatno ih usmerio na alternativni put, što je potkrepljeno i povećanjem proteinskog sadržaja IRS-2. U uterusu je tretman estradiolom nakon 6 h doveo do statistički značajnog povećanja proteinskog sadržaja skoro svih ispitivanih molekula signalnog puta insulina. U srcu je estradiol uzrokovao povećanje asocijacije IRS-1/p85, povećanja sadržaja proteina i iRNK p85, kao i povećanje fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>. S druge strane, tretman estradiolom je u srcu izazvao i smanjenje fosforilacije tirozina IR, smanjenje proteinskog sadržaja IRS-2 i iRNK oba IRS proteina. Rezultati ove studije ukazuju na to da tretman estradiolom indukuje tkivno specifične promene u insulinskom signalnom putu. Posledice tretmana estradiolom na molekule insulinskog signalnog puta su očiglednije u uterusu, ali je njihov fiziološki značaj za insulinsko delovanje verovatno veći u jetri. S druge strane, rezultati dobijeni u srcu sugerišu veoma kompleksnu ulogu estradiola u fiziologiji srca, koja se manifestuje i kombinacijom pozitivnog i negativnog, genomskog i negenomskog delovanja ovog hormona na molekule signalnog puta insulina.

**Ključne reči:** estradiol, insulinski signalni put, jetra, uterus, srce

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna endokrinologija

**UDK broj:** 577.175.6:577.175.72

## **Tissue specificity of 17 $\beta$ -estradiol effects on insulin signaling pathway**

### ***ABSTRACT***

Insulin and estradiol play important role in regulation of carbohydrate and lipid metabolism. Various clinical observations and experimental data suggest that variations in the concentration of estrogens affect insulin action. The aim of the present study was to compare the impact of estradiol on early steps of insulin signaling in main target tissues of insulin (the liver) and estradiol (the uterus), and in the heart, where both hormones realize important effects. Ovariectomized female rats were treated with estradiol 6 h prior to analysis of protein and mRNA content of insulin signaling molecules. To delineate estradiol effects on phosphorylations and molecular associations relevant for insulin signaling, animals were treated additionally with insulin 30 min before the experiment. Treatment with estradiol did not change the levels of plasma insulin and glucose, but it significantly decreased the free fatty acid level and increased uterine weight. In liver, estradiol treatment decreased IR phosphorylation and IRS-1 protein content, suggesting that estradiol suppressed insulin action through IR/IRS-1 and probably redirected it to alternative pathway. This conclusion is supported with increase of IRS-2 protein content. In uterus, estradiol treatment resulted in significant increase of protein content of almost all analyzed molecules. In heart, estradiol increased IRS-1/p85 association, p85 protein and mRNA level, and Ser<sup>473</sup>Akt phosphorylation. On the other hand, estradiol treatment decreased tyrosine phosphorylation of cardiac IR, protein content of IRS-2, and mRNA of both IRS proteins. These results suggest that estradiol treatment induces tissue-specific changes in insulin signaling. Consequences of estradiol treatment on insulin signaling molecules are more apparent in uterus, but their physiological relevance for insulin action is probably more important in liver. On the other hand, results obtained in heart suggest very complex role of estradiol in heart physiology, represented by, amongst other effects, combination of positive and negative, genomic and nongenomic actions of this hormone on insulin signaling molecules.

**Keywords:** estradiol, insulin signaling, liver, uterus, heart

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Molecular endocrinology

**UDK number:** 577.175.6:577.175.72

## **SKRAĆENICE**

**Akt/PKB:** proteinska kinaza B (eng. *protein kinase B*)

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

**BSA:** albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*)

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

**ER:** receptor za estrogene (eng. *estrogene receptor*)

**ERE:** estrogen responsivni elementi (eng. *estrogen response elements*)

**ERK:** kinaza regulisana ekstraćelijskim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinase*)

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

**GAPDH:** gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

**GLUT:** familija transportera za glukozu (eng. *glucose transporter*)

**HRT:** supstitucionna hormonska terapija (eng. *hormone replacement therapy*)

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

**IR:** receptor za insulin (eng. *insulin receptor*)

**IRS:** familija supstrata receptora za insulin (eng. *insulin receptor substrate*)

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

**MAPK:** mitogenom aktivirana proteinska kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

**MEK:** kinaza MAPK (eng. *MAPK kinase*)

**PKD1:** kinaza tipa 1 zavisna od PIP3 (eng. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*)

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

**PIP3:** fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (eng. *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*)

**PKC:** proteinska kinaza C (eng. *protein kinase C*)

**RT-PCR:** reverzna transkripcija – lančana polimerazna reakcija (eng. *reverse transcription - polymerase chain reaction*)

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

**Ser:** serin

**Shc:** (eng. *Src-homology-2-containing protein*)

**Thr:** treonin

**Tyr:** tirozin

## **SADRŽAJ**

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1	INSULIN .....	2
1.1.1	<i>Sinteza insulina</i> .....	2
1.1.2	<i>Signalni put insulina</i> .....	3
1.1.2.1	Receptor za insulin.....	3
1.1.2.2	Supstrati insulinskog receptora .....	5
1.1.2.3	Metabolički put – PI3K.....	10
1.1.2.4	Metabolički put - Akt/proteinska kinaza B .....	12
1.1.2.5	Mitogeni put.....	13
1.1.3	<i>Efekti insulina u jetri, srcu i uterusu</i> .....	14
1.1.4	<i>Poremećaji u delovanju insulina</i> .....	17
1.2	ESTRADIOL.....	19
1.2.1	<i>Genomski efekti estrogena</i> .....	20
1.2.1.1	ERE-zavisni mehanizam delovanja estrogena .....	20
1.2.1.2	ERE-nezavisni signalni mehanizmi delovanja estrogena .....	21
1.2.2	<i>Negenomski efekti estrogena</i> .....	22
1.2.3	<i>Efekti estradiola u uterusu, srcu i jetri</i> .....	23
1.2.4	<i>Efekti estradiola na delovanje insulina</i> .....	25
<b>2.</b>	<b>CILJ</b> .....	30
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	31
3.1	MATERIJAL.....	31
3.1.1	<i>Hemikalije</i> .....	31
3.1.2	<i>Eksperimentalne životinje</i> .....	32
3.2	METODE .....	33
3.2.1	<i>Priprema uzoraka tkiva</i> .....	33
3.2.2	<i>Biohemijske analize</i> .....	33
3.2.2.1	Određivanje koncentracije glukoze u krvi .....	33
3.2.2.2	Određivanje koncentracije insulina u plazmi.....	34
3.2.2.3	Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi .....	34
3.2.2.4	Određivanje koncentracije estradiola u plazmi.....	35



3.2.3	<i>Određivanje koncentracije proteina</i> .....	35
3.2.4	<i>SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)</i> .....	36
3.2.5	<i>„Western blot“</i> .....	36
3.2.6	<i>Koimunoprecipitacija</i> .....	37
3.2.7	<i>RT-PCR</i> .....	37
3.2.7.1	<i>Izolacija RNK</i> .....	38
3.2.7.2	<i>Reverzna transkripcija (RT)</i> .....	38
3.2.7.3	<i>PCR</i> .....	39
3.2.8	<i>Statistička analiza</i> .....	41
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>42</b>
4.1	KONCENTRACIJA ESTRADIOLA.....	42
4.2	EFEKAT TRETMANA ESTRADILOM NA MASU UTERUSA.....	43
4.3	EFEKAT TRETMANA ESTRADILOM NA KONCENTRACIJU INSULINA, GLUKOZE I SLOBODNIH MASNIH KISELINA.....	44
4.4	EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U JETRI I UTERUSU.....	47
4.4.1	<i>Efekat tretmana estradiolom na sadržaj proteina i tirozinsku fosforilaciju receptora za insulin u jetri i uterusu</i> .....	47
4.4.2	<i>Efekat tretmana estradiolom na supstrate insulinskog receptora u jetri i uterusu</i> .....	49
4.4.3	<i>Efekat tretmana estradiolom na regulatornu subjedinicu PI3K u jetri i uterusu</i> .....	55
4.4.4	<i>Efekat tretmana estradiolom na Akt u jetri i uterusu</i> .....	56
4.5	EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU.....	58
4.5.1	<i>Efekat tretmana estradiolom na sadržaj proteina, iRNK i tirozinsku fosforilaciju receptora za insulin u srcu</i> .....	58
4.5.2	<i>Efekat tretmana estradiolom na supstrate insulinskog receptora u srcu</i> .....	59
4.5.3	<i>Efekat tretmana estradiolom na put PI3K/Akt u srcu</i> .....	63

<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	66
5.1	EFEKTI ESTRADIOLA NA INSULINSKI RECEPTOR U JETRI, UTERUSU I SRCU .....	70
5.2	EFEKTI ESTRADIOLA NA SUPSTRATE INSULINSKOG RECEPTORA U JETRI, UTERUSU I SRCU .....	71
5.3	EFEKTI ESTRADIOLA NA PI3K/AKT PUT U JETRI, UTERUSU I SRCU.....	74
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	78
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	80

## **PRILOZI**

## 1. UVOD

Brojni podaci dobijeni iz humanih studija ukazuju na važnu ulogu polnih steroida u regulaciji insulinske senzitivnosti. Postoje određene fiziološke situacije u kojima je insulinska senzitivnost smanjena bez kliničkih implikacija. Na primer, u pubertetu je detektovano smanjenje insulinske senzitivnosti koje može biti posledica povećanja nivoa polnih steroida u cirkulaciji u ovom periodu života (Amiel i sar., 1991). Kod zdravih žena je tokom lutealne faze menstrualnog ciklusa takođe uočena smanjena insulinska senzitivnost koja je izgleda u vezi sa povišenim nivoima estrogena i progesterona (Alonso i Gonzalez, 2008). Pored toga, poznato je da je normalna trudnoća povezana sa progresivnim smanjenjem insulinske senzitivnosti (Leturque i sar., 1987). Insulinska rezistencija u trudnoći predstavlja fiziološku adaptaciju organizma majke kojim se obezbeđuje dopremanje glukoze fetusu (Leturque i sar., 1987). Menopauza kod žena, koja je povezana sa smanjenjem produkcije polnih steroida u ovarijumima, takođe dovodi do razvoja insulinske rezistencije (Reaven i Reaven, 1985).

Pored fizioloških stanja u kojima promena koncentracije polnih steroida koincidira sa promenom insulinske senzitivnosti, dosta je ispitan i uticaj tretmana polnim steroidima na insulinsko delovanje. Poznato je da je korišćenje oralnih kontraceptiva povezano sa razvojem insulinske rezistencije, naročito kod žena sa istorijom gestacijskog dijabetesa (Godsland i sar., 1992). Takođe, pokazano je da supstitucionarna hormonska terapija može da obnovi insulinsku senzitivnost koja je narušena u menopauzi (Alonso i Gonzalez, 2008).

Uprkos činjenici da kliničke studije jasno ukazuju na vezu između polnih steroida i insulinskog delovanja, relativno je malo podataka o molekularnoj osnovi ovih interakcija.

## 1.1 INSULIN

Koncentracija glukoze u plazmi zdravih ljudi ostaje u opsegu između 4 i 7 mM, uprkos periodima hranjenja i gladovanja. Ovakva čvrsta kontrola je omogućena balansom između apsorpcije glukoze iz creva, produkcije od strane jetre i njenog transporta i metabolizma u perifernim tkivima (Saltiel i Kahn, 2001).

Insulin je najpotentniji poznati fiziološki anabolički agens, koji podstiče skladištenje i sintezu lipida, proteina i ugljenih hidrata i inhibira njihovu razgradnju i oslobađanje u cirkulaciju (Chang i sar., 2004). Insulin primarno reguliše koncentraciju glukoze u krvi, tako što povećava ulazak glukoze u ćelije mišića i masnog tkiva, a inhibira produkciju glukoze u jetri (smanjenjem glukoneogeneze i glikogenolize) (Saltiel i Kahn, 2001). Takođe, insulin utiče na metabolizam lipida, povećavajući sintezu lipida u jetri i adipocitima i smanjujući oslobađanje masnih kiselina iz adipoznog tkiva (Sesti, 2006). Stimulišući lipogenezu, sintezu glikogena i proteina i inhibirajući lipolizu, glikogenolizu i razgradnju proteina, insulin stimuliše ćelijski rast i diferencijaciju, i podstiče skladištenje supstrata u masnom tkivu, jetri i mišićima (Saltiel i Kahn, 2001). Insulin povećava ulazak glukoze u ćelije stimulišući translokaciju glukoznog transportera GLUT4 (eng. *glucose transporter 4*) iz unutarćelijskih depoa do površine ćelije (Saltiel i Kahn, 2001).

### 1.1.1 *Sinteza insulina*

Insulin se sintetiše u  $\beta$  ćelijama pankreasa. Humani insulin sadrži 51 amino kiselinu i ima molekulsku težinu 5700 Da (Nussey i Whitehead, 2001). Gen za insulin kodira pre-proinsulin koji na N-završetku ima signalnu sekvencu od 23 aminokiseline. Signalna sekvencu se brzo iseca nakon što se sinteza hormona usmeri ka endoplazmatičnom retikulumu. Proinsulin zatim migrira u Goldžijev aparat, gde se C peptid iseca, ostavljajući A (21 aminokiselina) i B (30 aminokiselina) lance spojene disulfidnim vezama, koji formiraju aktivni molekul insulina (Nussey i Whitehead, 2001). U mikromolarnim koncentracijama, insulin dimerizuje i u prisustvu cinkovih jona dalje asocira u heksamere (De Meyts, 2004).

Insulin se izlučuje pulsativno na oko 10 minuta i ima vreme poluraspada u sistemske cirkulaciji oko 3 minuta. Oko 50% insulina se uklanja u jetri. Ovo je poznato kao efekat “prvog prolaza” (tj. prvi put insulin prolazi kroz jetru). Insulin koji “pobegne” od inaktivirajuće aktivnosti jetre, ima važnu regulatornu ulogu u perifernim tkivima. C-peptid se oslobađa u odnosu 1:1 sa insulinom, a pošto ga jetra ne uklanja značajno, a vreme poluraspada mu je 30 minuta, često se koristi kao indeks insulinske sekrecije (Nussey i Whitehead, 2001).

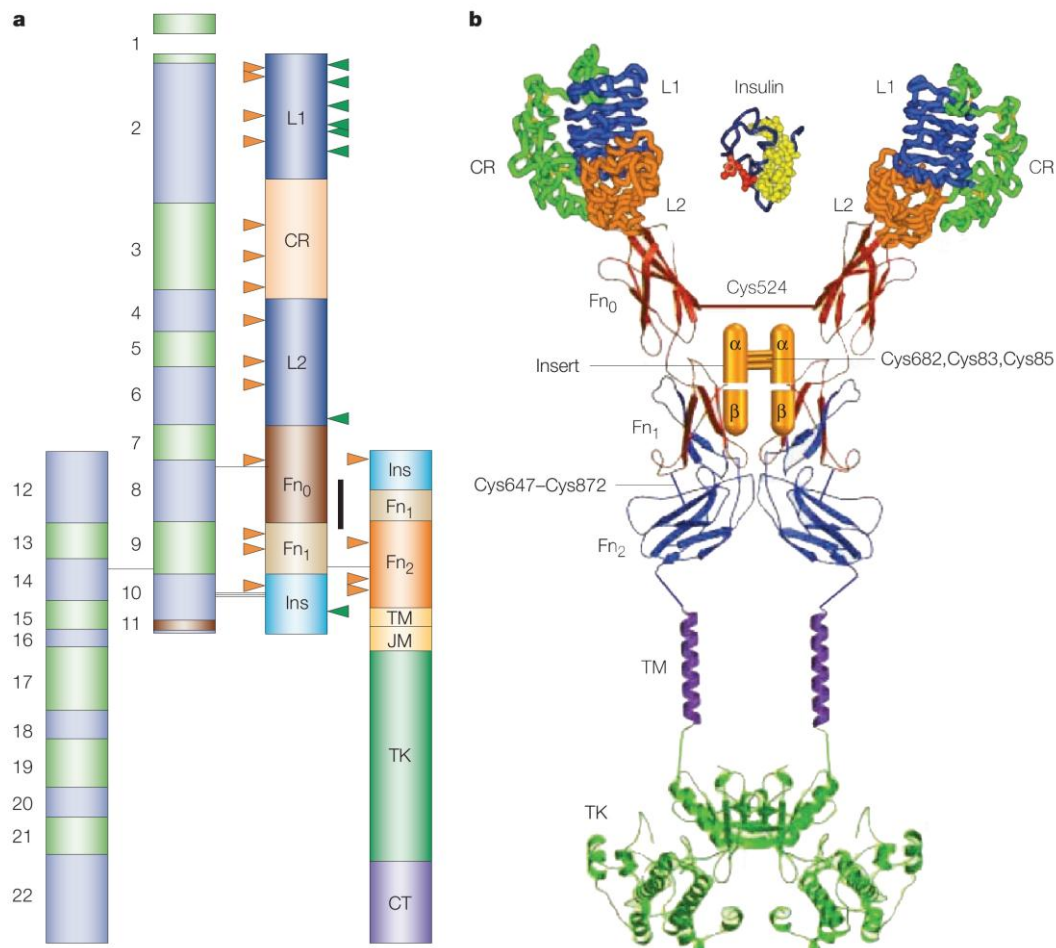
Insulin se luči u odgovoru na povećanje koncentracije glukoze u cirkulaciji. Ovaj metabolički signal zahteva metabolizam glukoze do piruvata i detektuje se aktivnošću enzima glukokinaze koja katalizuje produkciju glukozo-6-fosfata. Ovo inicira signal oslobađanja insulina egzocitozom, koji uključuje povećanje adenozin trifosfata (ATP, eng. *adenosine triphosphate*), zatvaranje  $K^+$  kanala, depolarizaciju i otvaranje  $Ca^{2+}$  kanala. Ovaj proces je vrlo brz i sekrecija insulina se dešava u okviru jednog minuta nakon izlaganja glukozi (Nussey i Whitehead, 2001).

## ***1.1.2 Signalni put insulina***

### **1.1.2.1 Receptor za insulin**

Insulin ostvaruje svoje delovanje vezivanjem za specifičan receptor na ćelijskoj membrani. Receptor za insulin (IR) pripada subfamiliji receptora tirozin kinaza koja uključuje i receptor za faktor rasta sličan insulinu IGF-1 (eng. *insulin-like growth factor – I*) i receptor sličan receptoru za insulin IRR (eng. *insulin receptor-related receptor*) (Becker i Roth, 1990). Svi ovi receptori su heterotetramerni proteini (Slika 1) sačinjeni od dve  $\alpha$  i dve  $\beta$  subjedinice koje funkcionišu kao alosterički enzimi u kojima  $\alpha$  subjedinica inhibira tirozin kinaznu aktivnost  $\beta$  subjedinice (Saltiel i Kahn, 2001). Alfa-subjedinica je u potpunosti ekstracelularna i učestvuje u vezivanju insulina. U inaktivnom stanju, katalitičko mesto tirozin kinaze je skriveno aktivacionom petljom, koja sprečava pristup ATP-u i potencijalnim supstratima (Le Roith i Zick, 2001). Kada se insulin veže za  $\alpha$  subjedinicu, dolazi do oslobađanja kinazne aktivnosti  $\beta$  subjedinice i transfosforilacije jedne  $\beta$  subjedinice drugom na specifičnim tirozinskim ostacima u aktivacionoj petlji, što

rezultuje povišenom katalitičkom aktivnošću kinaze (Saltiel i Kahn, 2001; Chang i sar., 2004).



### Slika 1. Modularna struktura receptora za insulin

**Panel a** pokazuje crtež  $\alpha 2\beta 2$  strukture receptora za insulin. Leva polovina dijagrama pokazuje granice 22 egzona gena za insulinski receptor. Desna polovina dijagrama ukazuje na pretpostavljene granice proteinskog modula. Granice modula uglavnom odgovaraju granicama egzona. L1 i L2 - veliki domeni 1 i 2; CR – cisteinom bogat domen; Fn<sub>0</sub>, Fn<sub>1</sub>, Fn<sub>2</sub> – fibronektin tip III domeni, Ins – umetak u Fn; TM - transmembranski domen; JM - jukstamembranski domen; TK - domen tirozin kinaze; CT - karboksi terminalni rep. Crna linija duž Fn<sub>0</sub> ukazuje na glavni imunogeni region. Narandžaste strelice ukazuju na mesta N-glikozilacije. Zelene strelice ukazuju na identifikovane "hot-spotove" za vezivanje liganda. **Panel b** prikazuje organizaciju supradomena receptora za insulin. Dijagram prikazuje "rastegnuti" model pretpostavljenih ili stvarnih modularnih struktura (De Meyts i Whittaker, 2002).

Aktivnost IR je dobro regulisana, pošto nekontrolisana aktivacija ili neaktivnost ima ozbiljne metaboličke posledice. Postoje dve „splajs“ izoforme IR, i svaka ima drugačiji afinitet za insulin (Sesti i sar., 1994). Pored toga postoji nekoliko mehanizama negativne regulacije. Jedna klasa regulatornih proteina su tirozin fosfataze, koje katalizuju brzu defosforilaciju receptora i njegovih supstrata (Taniguchi i sar., 2006a). Najviše proučavana proteinska tirozin fosfataza je PTP1B (eng. *protein - tyrosine phosphatase 1B*), koja interaguje direktno sa IR i defosforiliše važne tirozinske ostatke, redukujući njihovu aktivnost (Taniguchi i sar., 2006a).

Pored tirozinske fosforilacije, IR podleže serinskoj fosforilaciji, koja može da uspori prenos signala smanjujući tirozinsku fosforilaciju koju stimuliše insulin (Saltiel i Kahn, 2001). Ove inhibitorne fosforilacije obezbeđuju negativnu povratnu spregu insulinskom signalnom putu i služe kao mehanizam razmene („cross-talk“) sa drugim signalnim putevima koji dovode do insulinske rezistencije (Saltiel i Kahn, 2001). Negativni regulatori funkcije IR mogu biti i proteini, kao što su SOCS1 i SOCS3 (eng. *suppressor of cytokine signaling 1 i 3*), Grb-10 (eng. *growth factor receptor bound protein 10*) i PC1 (eng. *plasma cell membrane glycoprotein 1*), koji sterički blokiraju njegovu interakciju sa IRS proteinima ili modifikuju njegovu kinaznu aktivnost (Taniguchi i sar., 2006a). IR je takođe negativno regulisan na nivou proteina, internalizacijom i degradacijom koju stimuliše ligand, što je uobičajena odlika mnogih insulin rezistentnih, hiperinsulinemičnih stanja, kao što su gojaznost i dijabetes tip 2 (Taniguchi i sar., 2006a).

### 1.1.2.2 Supstrati insulinskog receptora

Za razliku od drugih receptor tirozin kinaza koje se vezuju direktno za citoplazmatske repove nishodnih efektor, u vezivanju IR i IGF1R za unutarćelijske efekte učestvuju satelitski proteini poznatiji kao supstrati insulinskog receptora (IRS, eng. *insulin receptor substrate*) (Taniguchi i sar., 2006a). Fosforilacija tirozina IR aktivira delovanje tirozin kinaze receptora, omogućujući fosforilaciju adaptorskih proteina koji funkcionišu kao pristajuća mesta za efektorne proteine koji sadrže domene homologe Src (SH2) (Cohen, 2006). Ove reakcije tirozinske fosforilacije aktiviraju mnogostruko grananje signalnih puteva koji učestvuju u insulinskoj regulaciji ćelijskog rasta i

metabolizma u ciljnim tkivima (Giorgino i sar., 1999). Identifikovano je barem 11 unutarćelijskih supstrata IR i IGF1R. Šest od njih pripada porodici IRS proteina, i nazvani su IRS1-6. Ostali supstrati su Gab-1 (eng. *Grb2-associated binder-1*), Cbl (eng. *Cas-br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence*) i razne forme proteina Shc (eng. *Src-homology-2-containing protein*) (Taniguchi i sar., 2006a).

IRS proteini sadrže konzervirani PH (eng. *pleckstrin homology*) domen i PTB (eng. *phospho tyrosine binding*) domen, blizu N-kraja koji su zaslužni za afinitet ovih supstrata za IR (Taniguchi i sar., 2006a). PH domen, služi da lokalizuje IRS proteine vrlo blizu receptora (Le Roith i Zick, 2001). PTB domen, koji je prisutan u brojnim signalnim molekulima, ima 75% identičnu sekvencu kod IRS-1 i IRS-2 proteina i funkcionira kao vezujuće mesto za NPXY motiv na jukstamembranskom regionu IR i tako dovodi do interakcije između IR i IRS-1 (Le Roith i Zick, 2001). COOH-kraj IRS proteina je slabo konzerviran i sadrži motive za tirozinsku fosforilaciju koji služe kao pristajuća mesta za proteine koji sadrže SH2 domen, kao što je p85 $\alpha$  regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*), Grb2 (eng. *growth factor receptor-bound protein 2*), Nck, Crk, Fyn, SHP-2 i drugi (Le Roith i Zick, 2001). Svi ovi proteini učestvuju u metaboličkim funkcijama insulina kao i funkcijama promocije rasta (Le Roith i Zick, 2001).

Prvi ovakav efektorni protein koji je opisan je bio IRS-1, citosolni protein od 185 kDa koji insulinski receptor fosforiliše na više mesta (Cohen, 2006). Gen za IRS-1 se nalazi na hromozomu 2q36-37. Pokazano je da je IRS-1 glavni pristajući protein za vezivanje i aktivaciju PI3K u odgovoru na insulin (Sesti i sar., 2001). Humani IRS-2 je lokalizovan na hromozomu 13q34 (Sesti i sar., 2001). IRS-1 i IRS-2 su široko rasprostranjeni u organizmu, dok je IRS-3 uglavnom ograničen na adipocite i mozak, a IRS-4 je primarno eksprimiran u embrionalnim tkivima (Taniguchi i sar., 2006a). IRS-5 i IRS-6 izgleda imaju ograničenu tkivnu ekspresiju i funkciju u prenosu signala (Cai i sar., 2003).

Receptor za insulin i IRS proteini imaju zajedničke mehanizme regulacije: aktivirani su fosforilacijom tirozina, a negativno ih regulišu proteinske tirozin fosfataze, fosforilacija serina, kao i sam ligand (Taniguchi i sar., 2006a). IRS proteini podležu fosforilaciji na serinu u odgovoru na insulin i druge stimuluse kao što su citokini i slobodne masne kiseline (FFA, eng. *free fatty acid*) (Zick, 2005). U stanjima insulinske rezistencije, fosforilacija na serinu IRS-1 je povećana i izgleda da ova fosforilacija



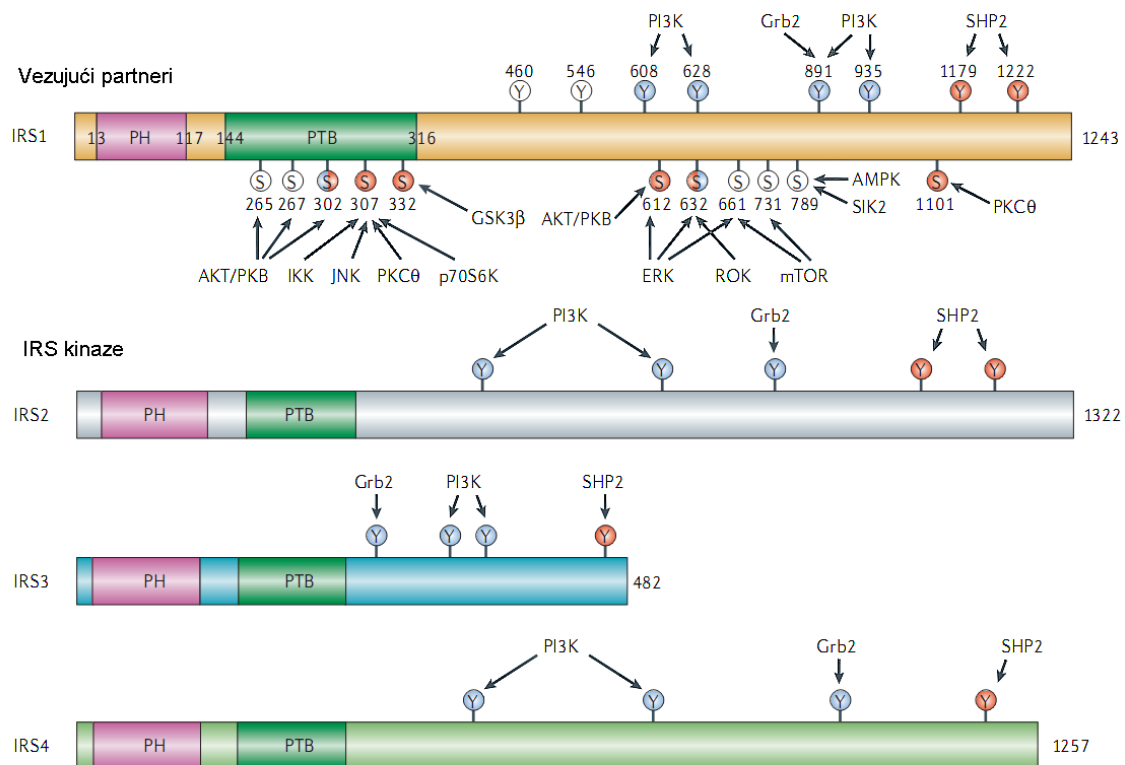
negativno reguliše prenos signala preko IRS (Taniguchi i sar., 2006a). Jedan od mogućih oblika regulacije IRS je na nivou ekspresije proteina (Taniguchi i sar., 2006a). Naime, pokazano je da hiperinsulinemija smanjuje ekspresiju IRS-1 i IRS-2 i u ćelijskoj kulturi i u tkivima miša (Hirashima i sar., 2003). Moguće objašnjenje ovog efekta je da hiperinsulinemija indukuje degradaciju IRS-1 proteina i inhibira sintezu IRS-2 na transkripcionom nivou (Hirashima i sar., 2003). Pored toga, pokazano je da SOCS proteini mogu da indukuju degradaciju IRS-1 i IRS-2 (Rui i sar., 2002). Bez obzira na mehanizam, smanjeni nivoi proteina IRS svakako doprinose insulinskoj rezistenciji (Taniguchi i sar., 2006a).

Iako su IRS proteini visoko homologni i poseduju mnoge slične motive tirozinske fosforilacije, istraživanja na „nokaut“ miševima ukazuju na to da različiti IRS proteini imaju komplementarnu, pre nego redundantnu ulogu u prenosu insulinskog signala (Sesti i sar., 2001) (Slika 2). Tkivno specifičan „nokdaun“ IRS-1 i IRS-2 u jetri je pokazao da ovi proteini imaju komplementarne uloge u održavanju aktivacije proteinske kinaze B (Akt/PKB, eng. *protein kinase B*), ali pokazuju diferencijalne uloge u regulaciji ekspresije gena (Taniguchi i sar., 2005). Tako je smanjen IRS-1 u jetri u korelaciji sa povećanom ekspresijom gena koji su uključeni u glukoneogenezu, dok negativna regulacija IRS-2 u jetri rezultuje povećanom ekspresijom gena koji su uključeni u lipogenezu (Taniguchi i sar., 2006a).

IRS-1 i IRS-2 se razlikuju u sposobnosti da se vezuju za različite SH2 partnere. Pokazano je da IRS-1 i IRS-2 imaju različitu sposobnost da aktiviraju različite članove familije atipične proteinske kinaze C (aPKC) (Miura i sar., 2004). IRS-3 i IRS-4 verovatno modifikuju delovanje IRS-1 i IRS-2, pošto ne mogu da aktiviraju mitogenom aktiviranu proteinsku kinazu (MAPK) i PI3K u istom stepenu kao IRS-1 i IRS-2, i mogli bi u stvari da, u situacijama kada su visoko ekspimirani, antagonizuju neke od njihovih funkcija (Tsuruzoe i sar., 2001). Izoforme IRS proteina se takođe razlikuju po svojoj ćelijskoj kompartmentalizaciji i aktivacionoj kinetici (Taniguchi i sar., 2006a).

Iako IRS-1 i IRS-2 imaju suštinsku sličnost u amino kiselinskom sastavu, postoje značajne strukturne razlike između njih (Huang i sar., 2005). IRS-2 poseduje jedinstveni region sačinjen od amino kiselina 591-786 koji specifično interaguje sa vezujućim domenom kinazne regulatorne petlje  $\beta$  subjedinice insulinskog receptora (Sesti i sar., 2001). Pošto ovaj region ne postoji kod IRS-1, pretpostavlja se da baš on doprinosi signalnoj specifičnosti IRS-2 (Sesti i sar., 2001). Pored toga, IRS-1 i IRS-2 se razlikuju u

kinetici tirozinske fosforilacije koju stimuliše insulin, interakciji sa putem MAPK i unutarćelijskoj lokalizaciji (Huang i sar., 2005).

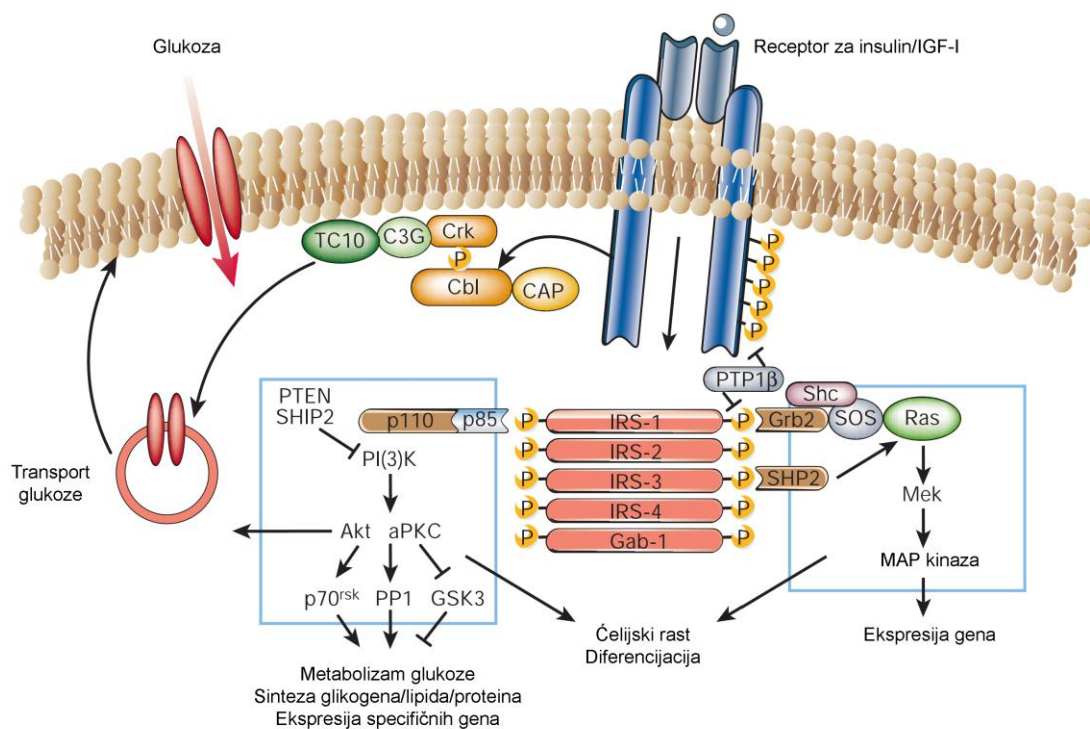


### Slika 2. Struktura i partneri u interakcijama supstrata insulinskog receptora

Četiri izoforme supstrata insulinskog receptora (IRS1-4) dele PH domen, PTB vezujući domen i nekoliko mesta fosforilacije na tirozinskim i serinskim ostacima. Na slici su prikazane pozicije tirozinskih rezidua (Y) koje fosforiliše IR, kao i nishodni signalni proteini koji se vezuju za ova mesta (Taniguchi i sar., 2006a)

IRS-1 „nokaut“ miševi zaostaju u rastu i izgleda da ne razvijaju dijabetes, ali su u perifernim tkivima rezistentni na insulin, sa poremećenom tolerancijom na glukozu (Chang i sar., 2004). IRS-2 „nokaut“ miševi su rezistentni na insulin i u perifernim tkivima i u jetri i razvijaju dijabetes tip 2 zbog insulinske rezistencije zajedno sa smanjenom funkcijom  $\beta$  ćelija, ali imaju defektan rast samo u nekim tkivima (Chang i sar., 2004). Suprotno tome, IRS-3 i IRS-4 „nokaut“ miševi imaju normalan rast i metabolizam (Saltiel i Kahn, 2001).

Shc je još jedan supstrat IR. Ovaj molekul sadrži PTB domen na N-kraju, CH (eng. *collagen homology*) domen u centru i SH2 domen na C-kraju (Pelicci i sar., 1992). Kod sisara je identifikovano tri gena za Shc: ShcA, ShcB i ShcC (Pelicci i sar., 1996). ShcA je široko eksprimiran, dok je ekspresija ShcB i ShcC izgleda ograničena na nervne ćelije (Ravichandran, 2001). Postoje tri izoforme ShcA, p46, p52 i p66 kDa, koje nastaju alternativnim „splajsovanjem“ primarnog transkripta (Migliaccio i sar., 1997). Izoforme od 46 i 55 kDa su široko rasprostranjene izuzev u centralnom nervnom sistemu, a p66 je odsutan u nekim hematopoetskim ćelijama (Migliaccio i sar., 1997). Ove tri izoforme regulišu veoma različite funkcije kao što su rast (p52/p46 Shc), apoptoza (p66 Shc) i dužina života (p66 Shc) (Luzi i sar., 2000).



### Slika 3. Prenos signala u insulinskom delovanju.

Receptor za insulin podleže autofosforilaciji i katalizuje fosforilaciju ćelijskih proteina, kao što su članovi familije IRS, Shc i Cbl. Ovi proteini, nakon fosforilacije, interaguju sa signalnim molekulima preko SH2 domena, što vodi grananju signalnog puta. Jedna grana uključuje aktivaciju PI3K i nishodinih kinaza, druga predstavlja kaskadu Ras i MAP kinaze, a treća Cbl/CAP i aktivaciju TC10. Ovi putevi koordiniraju regulaciju translokacije vezikula, sinteze proteina, aktivacije i inaktivacije enzima i genske ekspresije, što vodi regulaciji metabolizma glukoze, lipida i proteina (Saltiel i Kahn, 2001).

Aktivirani IR interaguje sa PTB domenom Shc (Sasaoka i sar., 1996) i fosforiliše ovaj molekul na nekoliko mesta, od kojih je najvažniji Tyr<sup>317</sup>, a koja služe kao pristajuća mesta za Grb2 (Sasaoka i Kobayashi, 2000). Asocijacija Shc sa Grb2 vodi aktivaciji puta MAPK (Sasaoka i Kobayashi, 2000).

Vezivanje insulina za receptor inicira aktivaciju dva glavna puta – signalni put PI3K/Akt i signalni put MAPK (Slika 3). Ova dva puta, pod određenim okolnostima mogu da aktiviraju jedan drugog (Le Roith i Zick, 2001).

### 1.1.2.3 Metabolički put – PI3K

Metabolički odgovor na insulin je primarno posredovan putem PI3K/Akt (Le Roith i Zick, 2001). Inhibitori PI3K ili transfekcija dominantno negativnim konstruktima blokira skoro sva metabolička delovanja insulina, uključujući stimulaciju transporta glukoze, sintezu lipida i diferencijaciju adipocita, što ukazuje na centralnu ulogu ovog enzima u metaboličkim delovanjima insulina (Taniguchi i sar., 2006a). PI3K je heterodimer koga čine katalitička subjedinica od 110 kDa i regulatorna subjedinica od približno 85 kDa, koja sadrži SH2 domen (Taniguchi i sar., 2006a). Od tri različita gena, nastaju tri različite katalitičke subjedinice, p110 $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$ , koje pokazuju različitu tkivnu distribuciju, pri čemu su  $\alpha$  i  $\beta$  skoro svuda prisutne, dok je  $\delta$  ograničena na leukocite (Shepherd i sar., 1998). Katalitička subjedinica PI3K je skoro uvek vezana za regulatornu subjedinicu, pošto je slobodna p110 nestabilna i brzo degradira (Yu i sar., 1998). Ovo vezivanje p110 za regulatornu subjedinicu ne samo da stabilizuje katalitičku subjedinicu, već i alosterički inhibira enzimsku funkciju sve dok se heterodimer ne veže za fosfotirozine, što oslobađa inhibiciju (Yu i sar., 1998). Katalitička subjedinica PI3K takođe reguliše sopstvenu funkciju preko svoje unutrašnje serin kinazne aktivnosti koja fosforiliše regulatornu subjedinicu p85 $\alpha$  na Ser<sup>608</sup> (Taniguchi i sar., 2006a). Ova fosforilacija smanjuje enzimsku aktivnost heterodimera (Taniguchi i sar., 2006a).

Regulatorna subjedinica poseduje dva SH2 domena koji interaguju sa pYMXM i pYXXM motivima proteina IRS koji sadrže fosforilisane tirozine (Myers i sar., 1992). Identifikovano je barem osam izoformi regulatorne subjedinice, koje nastaju od tri gena (Saltiel i Kahn, 2001). Predominantna izoforma je p85 $\alpha$  i smatra se da je to glavni put

odgovora na većinu stimulusa (Saltiel i Kahn, 2001). Tačna uloga različitih regulatornih subjedinica PI3K u insulinskom delovanju nije jasna. „Splajs“ varijante poseduju razlike u potencijalu za aktivaciju enzima, tkivnoj distribuciji i osetljivosti na insulin (Saltiel i Kahn, 2001).

Pored uloge pozitivnog regulatora funkcije PI3K, regulatorna subjedinica je i negativni regulator PI3K i insulinskog delovanja (Taniguchi i sar., 2006a). Naime, primećen je paradoks da se insulinska senzitivnost poboljšava kod „nokaut“ miševa kojima nedostaje regulatorna subjedinica PI3K (Chen i sar., 2004). Inverzna korelacija između nivoa p85 i insulinske senzitivnosti se takođe može primetiti u situacijama kada je regulatorna subjedinica eksprimirana u nivoima većim od normalnih (Taniguchi i sar., 2006a). Na primer, povećana ekspresija p85 je u korelaciji sa insulinskom rezistencijom u skeletnim mišićima mišjeg modela gestacionog dijabetesa (Barbour i sar., 2004). Negativna regulacija insulinskog signalnog puta regulatornom subjedinicom PI3K se verovatno dešava preko nekoliko mehanizama. Jedan faktor je stehiometrija regulatorne subjedinice u katalitičkom heterodimeru (Mauvais-Jarvis i sar., 2002). U normalnim uslovima, koncentracija regulatorne subjedinice je u višku u odnosu na katalitičku i fosforilisane IRS proteine (Taniguchi i sar., 2006a). Ovaj katalitički neaktivan monomerni p85 kompetira sa p85-p110 heterodimerom za vezivanje za fosfotirozine na IRS proteinima (Taniguchi i sar., 2006a). Zbog toga, redukcija regulatorne subjedinice može da poboljša insulinsko delovanje jer se prvo redukuje p85 $\alpha$  monomer i omogućava dimeru da se veže za fosforilisane IRS proteine (Taniguchi i sar., 2006a).

Aktivacija PI3K može da prenese višestruke signale (Saltiel i Kahn, 2001). PI3K katalizuje fosforilaciju fosfoinozitida na poziciji 3 i produkuje fosfatidilinozitol – fosfate (PIP), posebno PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, koji se vezuju za PH domene različitih signalnih molekula čime menjaju njihovu aktivnost ili subćelijsku lokalizaciju (Saltiel i Kahn, 2001). Među ovim proteinima su protein AGC superfamilije serin/treonin kinaza, guanin-nukleotid-razmenjujući protein Rho familije i TEC familija tirozin kinaza. Verovatno najvažnija za insulinsko delovanje je AGC kinaza PDK1 (eng. *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*), koja je odgovorna za aktivaciju Akt/PKB i aPKC (Taniguchi i sar., 2006a).

PI3K takođe aktivira mTOR/FRAP put i može biti uključena u regulaciju fosfolipaze D, što vodi hidrolizi fosfatidil holina i povećanju fosfatidične kiseline i diacilglicerola (Saltiel i Kahn, 2001).

#### 1.1.2.4 Metabolički put - Akt/proteinska kinaza B

Akt/PKB sadrži PH domen koji se vezuje za PIP3 visokim afinitetom, što dovodi do usmeravanja proteina ka membrani, međutim ova interakcija ne aktivira Akt/PKB (Cohen, 2006). Zapravo, aktivacija Akt/PKB koju indukuje insulin je posledica fosforilacije ovog proteina na dve rezidue, Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup> (Cohen, 2006). Pokazano je da je za fosforilaciju Akt na Thr<sup>308</sup> odgovorna PDK1 (Alessi i sar., 1997). Proteinska kinaza koja fosforiliše Akt/PKB na Ser<sup>473</sup> je kasnije identifikovana i izgleda da je specifična forma mTOR vezana za regulatornu subjedinicu poznatu kao RICTOR (Hresko i Mueckler, 2005; Sarbassov i sar., 2005).

Akt/PKB izgleda reguliše ulazak glukoze fosforilišući i inhibirajući AS160 (*Rab-GTPase-activating protein*) (Sano i sar., 2003). Ovo je okidač aktivacije malih GTPaza Rab koje su uključene u reorganizaciju citoskeleta koja je potrebna za translokaciju glukoznog transportera GLUT4 do plazma membrane (Sano i sar., 2003). Stimulacija sinteze glikogena je drugi ključni metabolički efekat insulina. Kinaza glikogen sintaze 3 (GSK-3) barem delimično učestvuje u aktivaciji glikogen sintaze u odgovoru na insulin (Le Roith i Zick, 2001). Aktivacija Akt od strane insulina rezultuje fosforilacijom i inaktivacijom GSK-3, čineći je nesposobnom da inhibira aktivnost glikogen sintaze (Le Roith i Zick, 2001). Akt/PKB takođe reguliše ekspresiju enzima glukoneogeneze i lipogeneze, kontrolišući aktivnost FOX klase transkripcionih faktora (Taniguchi i sar., 2006a).

Aktivnost Akt/PKB je regulisana pomoću nekoliko inhibitornih molekula, uključujući enzime kao što su proteinska fosfataza 2A (PP2A, eng. *protein phosphatase-2A*) i PHLPP (eng. *PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase*), koji je direktno defosforilišu i deaktiviraju. Drugi regulatori, kao što je tribl-3 (TRB3), se vezuju za nefosforilisani Akt/PKB i inhibiraju njegovu fosforilaciju i aktivaciju *in vivo* (Taniguchi i sar., 2006a).

Kod sisara postoje tri izoforme Akt/PKB i svaku kodira drugi gen (Taniguchi i sar., 2006a). Ove izoforme imaju istu opštu strukturu koju čine N-terminalni PH domen i C-terminalni katalitički domen (Taniguchi i sar., 2006a). Međutim, podaci pokazuju da su ove izoforme uključene u regulaciju različitih bioloških procesa (Taniguchi i sar., 2006a). Zanimljivo je da izoforme Akt, Akt1 i Akt2 nisu funkcionalno suvišne (Chang i sar.,

2004). „Nokaut“ studije na miševima kao i „nokdaun“ studije u 3T3L1 adipocitima korišćenjem siRNA su pokazale da redukcija samo Akt1 ne menja insulinsku senzitivnost, dok redukcija nivoa Akt2 smanjuje insulinsku senzitivnost i redukuje odlaganje glukoze (Chang i sar., 2004). Metabolički fenotip je potpuniji kada su redukovani proteinski nivoi i Akt1 i Akt2, što sugeriše da su obe izoforme potrebne za prenos insulinskog signala (Chang i sar., 2004).

Zanimljivo je da Akt verovatno nije jedina nishodna kinaza koja reguliše translokaciju GLUT4 do površine ćelije. Izoforme proteinske kinaze C su takođe aktivirane od strane PI3K i PDK1 i regulišu translokaciju GLUT4 (Le Roith i Zick, 2001).

#### 1.1.2.5 Mitogeni put

Kao i drugi faktori rasta, insulin stimuliše put MAPK (Saltiel i Kahn, 2001). Ovaj put uključuje tirozinsku fosforilaciju IRS proteina i/ili Shc, koji zauzvrat interaguju sa adapterskim proteinom Grb2, privlačeći SOS (eng. *son of sevenless*) protein do plazma membrane da bi se aktivirala mala GTP-aza Ras (eng. *rat sarcoma*) (Saltiel i Kahn, 2001). SOS je protein nukleotidne razmene koji katalizuje razmenu GDP za GTP na Ras, što rezultuje aktivacijom Ras (Le Roith i Zick, 2001). Kada se aktivira, Ras funkcioniše kao molekularni prekidač, stimulišući kaskadu serin kinaze preko aktivacije Raf, MEK (eng. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) i ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinase*). (Saltiel i Kahn, 2001). Ras se vezuje za unutrašnju stranu plazma membrane i kada se aktivira, vezuje se za NH<sub>2</sub>-kraj Raf, čime dovodi Raf do membrane (Le Roith i Zick, 2001). Ras-Raf interakcija pomera 14-3-3 proteine koji su vezani za Raf, čime se omogućuje fosforilacija Raf brojnim serin/treonin kinazama, i uklanja se inhibicija Raf kinaze (Le Roith i Zick, 2001). Raf-1 fosforiliše i aktivira dvostruko specifične kinaze MEK1 i MEK2, koje zauzvrat fosforilišu MAPK/ERK1 i ERK2 na treoninskim i tirozinskim ostacima (Taniguchi i sar., 2006a). Aktivirani ERK, može da se translocira u nukleus, gde katalizuje fosforilaciju transkripcionih faktora na serinu ili treoninu, inicirajući transkripcioni program koji vodi ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji. Blokada ovog puta, dominantno negativnim

mutantima ili farmakološkim inhibitorima, sprečava stimulaciju ćelijskog rasta insulinom, ali nema efekta na metaboličko delovanje ovog hormona (Saltiel i Kahn, 2001).

### ***1.1.3 Efekti insulina u jetri, srcu i uterusu***

Jetra je jedan od najvažnijih organa u modulaciji metabolizma koji igra centralnu ulogu u kontroli glukoze homeostaze i predstavlja predmet kompleksne regulacije od strane supstrata, insulina i drugih hormona (Kitamura i sar., 2003). Transport glukoze unutar ili van hepatocita i aktivnost mnogih ključnih enzima je regulisano insulinskim signalnim sistemom (Xie i sar., 2003).

Produkcija glukoze u jetri je regulisana povratnom spregom. Najprostija povratna sprega uključuje direktan efekat glukoze, tj. kada se podigne nivo glukoze u plazmi, produkcija u jetri se smanjuje i obrnuto (Cherrington, 1999). Kompleksnija regulacija uključuje endokrini pankreas.  $\alpha$  i  $\beta$  ćelije pankreasa odgovaraju na nivo glukoze u plazmi tako što modifikuju svoju sekreciju glukagona i insulina (Cherrington, 1999). Povećani nivo insulina u portalnom krvotoku nakon obroka, dovodi do brzih promena karbohidratne i lipidne homeostaze u jetri, kao što su stimulacija sinteze glikogena, lipogeneza, sinteza lipoproteina i supresija glukoneogeneze/glikogenolize i sekrecije VLDL (eng. *very low-density lipoprotein*) (Michael i sar., 2000).

Supresija oslobađanja glukoze iz jetre zavisi od sposobnosti insulina da inhibira glukoneogenezu (Kitamura i sar., 2003). Dosta se raspravlja o tome da li je ovo direktan efekat insulina na jetru ili indirektan, tj. posledica efekta insulina na mišiće i masno tkivo, koji bi smanjio dostavljanje prekursora za glukoneogenezu (Kitamura i sar., 2003).

Insulin fosforilacijom i defosforilacijom direktno kontroliše aktivnosti seta metaboličkih enzima, ali reguliše i ekspresiju gena koji kodiraju enzime glukoneogeneze i glikolize u jetri (Pilkis i Granner, 1992). Insulin inhibira transkripciju gena koji kodira fosfoenolpiruvat karboksikinazu, što je ograničavajući korak u glukoneogenezi (Sutherland i sar., 1996). Insulin takođe smanjuje transkripciju gena koji kodiraju fruktozo-1,6-bifosfatazu i glukozo-6-fosfatazu i povećava transkripciju glikolitičkih enzima kao što su glukokinaza i piruvat kinaza i lipogenih enzima kao što su sintaza masnih kiselina i acetyl-CoA karboksilaza (Saltiel i Kahn, 2001).



Jetra je glavno mesto degradacije insulina i primarni mehanizam klirensa je vezivanje za IR u jetri što je praćeno internalizacijom i unutarćelijskom degradacijom (Duckworth i sar., 1998).

Odličan sistem za proučavanje kompleksnih puteva insulinskog delovanja u različitim tkivima predstavljaju tkivno-specifični „nokauti“ koji ometaju prenos insulinskog signala. Kako je opisano u radu Michael i sar. (Michael i sar., 2000), „nokaut“ IR u jetri (LIRKO) dovodi do potpunog gubitka ranih signalnih koraka kao što je fosforilacija IRS-1 i IRS-2. Kod mladih LIRKO miševa se javlja postprandijalna hiperglikemija, netolerancija na glukozu i insulinska rezistencija. Kod ovih miševa insulin ne uspeva da suprimira oslobađanje glukoze iz jetre, iako je insulinski signalni sistem netaknut u adipoznom tkivu i mišićima. Pošto LIRKO miševi imaju izraženu hiperinsulinemiju koja dovodi do hronične supresije oslobađanja FFA iz adipoznog tkiva, očigledno je da je ipak dominantan direktan efekat insulinskog delovanja u jetri. Pored toga, povećana produkcija glukoze u jetri i pored hiperglikemije kod LIRKO miševa, pokazuje da se autoregulacija produkcije glukoze u jetri ne dešava u odsustvu insulinskog signalnog sistema. Veoma izražena hiperinsulinemija je posledica defekta u insulinskom klirensu, ali i povećane sinteze u  $\beta$  ćelijama pankreasa, što je rezultat hiperplazije  $\beta$  ćelija kod ovih životinja. Kod starijih LIRKO miševa dolazi do smanjenja koncentracije glukoze u plazmi, koje se završava hipoglikemijom. Ovo smanjenje produkcije glukoze u jetri je verovatno posledica razvoja disfunkcije jetre (Michael i sar., 2000).

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

U izolovanom srcu, insulin povećava translokaciju glukoznog transportera, glikolitički fluks i nivo oksidacije glukoze (Abel, 2004). Takođe, insulin suprimira korišćenje masnih kiselina u srcu (Belke i sar., 2002). Pored direktnih efekata u srcu, insulin ima važnu ulogu u regulaciji balansa metaboličkih goriva koja dolaze do miokardijuma, prvenstveno kroz delovanje na adipozno tkivo, skeletne mišiće i jetru (Belke i sar., 2002). Drugim rečima, *in vivo*, mnogi efekti insulina na metabolizam i funkciju srca su u vezi sa sistemskim efektima insulina pa je teško odvojiti direktne od

sistemskih efekata insulina na kardiomiocite (Belke i sar., 2002). Na primer, antilipolitičko delovanje insulina dovodi do smanjenja dostupnosti FFA srcu, što zajedno sa povećanim unutarćelijskim nivoima malonil koenzima A dovodi do redukcije nivoa oksidacije masnih kiselina (Awan i Saggerson, 1993). Insulin takođe može da poveća kontraktilnost srca (Ren i sar., 2000) i može imati antiapoptotski efekat u kardiomiocitima (Aikawa i sar., 2000).

Dijabetes je povezan sa dubokim promenama metabolizma srca, koje karakteriše smanjeno iskorišćenje glukoze, smanjena oksidacija laktata i povećano korišćenje masnih kiselina kao metaboličkog supstrata (Belke i sar., 2002). Ovo je posledica toga što sistemska insulinska deficijencija ili insulinska rezistencija menjaju dostupnost supstrata srcu (Abel, 2004).

Eksperimenti na CIRKO miševima (miševi sa „nokautom“ IR u kardiomiocitima) su pokazali da gubitak insulinskog signalinga u srcu dovodi do značajnog smanjenja veličine kardiomiocita (Abel, 2004). Prenos insulinskog signala je ključni fiziološki regulator rasta srca i može biti važan integrator veze između nutritivnog stanja i veličine srca (Abel, 2004). Za razliku od akutnog uklanjanja insulina u izolovanim srcima miševa koje povećava nivo korišćenja masnih kiselina u srcu, kod CIRKO miševa je ono smanjeno, zajedno sa nivoom ekspresije gena koji učestvuju u beta oksidaciji (Belke i sar., 2002). Ovo je bio neočekivan rezultat. Pretpostavlja se da gubitak insulinskog signalnog puta dovodi do povećanja korišćenja masnih kiselina u srcu, što onda vodi progresivnoj disfunkciji mitohondrija, verovatno na bazi produkcije ROS (eng. *reactive oxygen species*), a sve to smanjenju oksidacije i glukoze i masnih kiselina (Abel, 2004). U bazalnim uslovima, srčana funkcija CIRKO miševa je umereno poremećena. Međutim, u odgovoru na hemodinamički stres, dolazi do rapidnog smanjenja funkcije i povećane učestalosti lezija miokarda (Hu i sar., 2003), što ukazuje na to da insulinski signalni put igra važnu ulogu u moduliranju srčanog odgovora na stres.

Uterus je šupalj organ sa zidom koga čine tri sloja, spoljašnji perimetrijum, središnji mišićni miometrijum i unutrašnji endometrijum. Endometrijum je veoma aktivno tkivo koje čine nekoliko tipova ćelija, kao što su stromalne, luminalno epitelijalne, glandularno epitelijalne i endotelijalne ćelije (Frolova i Moley, 2011). Ranije *in vitro* studije su pokazale da insulin može da stimuliše oksidaciju glukoze u kasnoj lutealnoj fazi u humanom endometrijumu, što ukazuje na uključenost ovog hormona u metaboličke aktivnosti endometrijalnog tkiva (Truchan i sar., 1987). Insulinski receptor je prisutan u

nivou endometrijuma, i njegova maksimalna ekspresija je u sekretornoj fazi, što takođe podržava hipotezu da insulin direktno deluje na rast endometrijuma svojim mitogenim i metaboličkim efektima (Strowitzki i sar., 1993). Međutim, malo se zna o metaboličkoj funkciji insulina u endometrijumu i pitanje je da li ovo tkivo poseduje svu mašineriju da bi se smatralo tkivom koje reguliše insulin (Mioni i sar., 2004).

Prvi korak u korišćenju glukoze je njen ulazak u ćeliju, u kome učestvuju glukozni transporteri. GLUT1 je prvi transporter koji je detektovan u uterusu, i primećeno je da se njegova ekspresija povećava tokom gestacije, što ukazuje na moguću ulogu GLUT1 u održavanju trudnoće i razvoju fetusa (Frolova i Moley, 2011). Međutim malo je podataka o ekspresiji GLUT4, koji je primarno eksprimiran u insulin-senzitivnim tkivima, kao što su skeletni mišići i adipozno tkivo (Frolova i Moley, 2011). U nekoliko studija je opisana ekspresija ovog proteina u uterusu pacova (Welch i Gorski, 1999; Korgun i sar., 2003; Frolova i Moley, 2011), ali je nivo ekspresije u odnosu na ostale GLUT proteine bio 100 do 1000 puta manji. Još je manje podataka koji se odnose na humano tkivo uterusu i vrlo su kontradiktorni, od studija koje su isključile ekspresiju ovog proteina (von Wolff i sar., 2003; Frolova i Moley, 2011) do onih koje su potvrdile njegovo prisustvo u humanom uterusu (Mioni i sar., 2004; Mozzanega i sar., 2004). Mioni i sar. su pokazali prisustvo GLUT4 u epitelijalnim ćelijama humanog endometrijuma (Mioni i sar., 2004). U ćelijama strome, međutim, nije detektovano prisustvo GLUT4, iako je u njima potvrđeno prisustvo IR kao i vezivanje insulina za IR (Sheets i sar., 1985). Uzevši u obzir da je stromalno tkivo fiziološki uključeno u rast endometrijuma, može se pretpostaviti da u njemu insulin deluje prvenstveno kao faktor rasta, bez uticaja na ulazak glukoze (Mioni i sar., 2004).

#### ***1.1.4 Poremećaji u delovanju insulina***

Insulinska rezistencija je patološko stanje u kome ciljna tkiva ne uspevaju da u punoj meri odgovore na normalne nivoe insulina (Moreno i sar., 2009). Ona vodi nemogućnosti da insulin obezbedi normalnu glukoznu i lipidnu homeostazu (Moreno i sar., 2009). Tako dolazi do povećanja nivoa glukoze u krvi, što je fenomen poznat kao hiperglikemija. U pokušaju da se prevaziđe hiperglikemija, luči se više insulina u β

ćelijama pankreasa, što dovodi do karakteristične hiperinsulinemije (Livingstone i Collison, 2002). Kompenzatorna hiperinsulinemija zbog povećane sekrecije  $\beta$  ćelija je obligatorna odlika insulinske rezistencije (Mlinar i sar., 2007). Glavne karakteristike insulinske rezistencije su dezinhbirana lipoliza u adipoznom tkivu, poremećeni ulazak glukoze u ćelije mišića i dezinhbirana glukoneogeneza (Mlinar i sar., 2007). Insulinska rezistencija je česta u fiziološkim stanjima kao što su menopauza i starenje, ali mehanizmi koji leže u njenoj osnovi su multifaktorijalni (Moreno i sar., 2009). Smanjena sekrecija insulina, u kombinaciji sa rezistencijom na njegovo delovanje, rezultira dijabetesom tipa 2, razornoj bolesti koja dostiže proporcije epidemije. Čak i u odsustvu dijabetesa, insulinska rezistencija je često povezana sa gojaznošću, hipertenzijom, policističnim ovarijalnim sindromom, dislipidemijom i aterosklerozom (Saltiel i Pessin, 2002).

Dijabetes melitus je grupa metaboličkih oboljenja koje karakteriše hiperglikemija, koja nastaje kao rezultat defekata u insulinskoj sekreciji, insulinskom delovanju ili oba (American Diabetes Association, 2012). Hronična hiperglikemija dijabetesa je povezana sa dugoročnim oštećenjima, disfunkcijom i propadanjem različitih organa, posebno očiju, bubrega, nerava, srca i krvnih sudova (American Diabetes Association, 2012). Najveći broj slučajeva dijabetesa može da se podeli u dve kategorije. U prvoj kategoriji, dijabetes tip 1, uzrok je potpuna deficijencija sekrecije insulina. U drugoj, mnogo češćoj kategoriji, dijabetes tip 2, uzrok je kombinacija rezistencije na delovanje insulina i neadekvatan kompenzatorni odgovor sinteze insulina (American Diabetes Association, 2012).

Procenjuje se da dijabetes melitus pogađa 6% populacije i da dijabetes tip 2 čini oko 90-95% svih slučajeva dijabetesa (Mlinar i sar., 2007). Iako dijabetes tip 2 ima vrlo heterogene korene, postoje dve opšte odlike ovog stanja: insulinska rezistencija i poremećena funkcija  $\beta$  ćelija pankreasa (McGarry, 2002). Tradicionalni pogled na razvoj dijabetesa koji je bio uglavnom "glukocentričan", nije uspevao da objasni mehanizam razvoja ove bolesti, pa se vremenom sve više razvio "lipocentričan" pristup ovom problemu (McGarry, 2002). Dugo je poznato da pored hiperglikemije, osobe sa tipom 2 dijabetesa imaju ozbiljne poremećaje u dinamici lipida, koji se obično ogledaju u povišenim nivoima cirkulišućih FFA i triglicerida, zajedno sa prevelikim odlaganjem masti u različitim tkivima. Sve je više dokaza da je ovaj poremećaj homeostaze lipida u stvari instrument razvoja dijabetičnog stanja i da abnormalno odlaganje masti u mišićima i drugim tkivima igra važnu ulogu u etiologiji insulinske rezistencije (McGarry, 2002).

Glavni razlog hiperglikemije kod većine pacijenata sa insulin-rezistentnim dijabetes melitusom je redukovani insulinom-posredovani ulazak glukoze u ćelije, koji je primarno posledica defekta delovanja hormona na ćelijskom nivou (Muller-Wieland i sar., 1993). Studije sa glukoznim klampom su pokazale da poremećaj insulinskog delovanja može biti posledica redukovane insulinske senzitivnosti i responsivnosti na insulin što ukazuje na prisustvo ne samo redukovanog broja insulinskih receptora već i postvezujućih defekata insulinskog delovanja (Kahn, 1980).

## 1.2 ESTRADIOL

Estrogeni su steroidni hormoni koji regulišu rast, diferencijaciju i funkciju u širokom rasponu ciljnih tkiva, uključujući muški i ženski reproduktivni trakt, mlečne žlezde, skeletni i kardiovaskularni sistem (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Najpotentniji i najdominantniji estrogen kod ljudi je  $17\beta$ -estradiol, ali su takođe prisutni i estron i estriol u nižim koncentracijama (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).

Biološki efekti estradiola se ostvaruju posredstvom estrogenog receptora (ER), koji se javlja u dve izoforme,  $ER\alpha$  i  $ER\beta$ , koje su članovi velike superfamilije nuklearnih receptora (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Ova dva receptora su kodirana posebnim genom, ali poseduju modularnu strukturu funkcionalnih domena karakterističnu za superfamiliju steroidnih i tiroidnih hormonskih receptora u jedru (Hall i sar., 2001).

N-terminalni domen nuklearnih receptora, koji se još naziva i A/B domen ili AF1, je odgovoran za protein-protein interakcije i transkripcionalnu aktivaciju ekspresije ciljnih gena (Nilsson i sar., 2001). AF1 funkcioniše nezavisno od liganda, za razliku od C-terminalnog domena AF2, koji je zavisn od liganda (Ellmann i sar., 2009). C-domen ili DNK vezujući domen (DBD) sadrži strukturu dva cinkova prsta, koji nisu odgovorni samo za vezivanje za DNK, već i za dimerizaciju receptora, čime se omogućuje formiranje homo i heterodimera (Ellmann i sar., 2009). DBD  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  su visoko homologni (Nilsson i sar., 2001). D-domen se zove se još i *Hinge*-region i sadrži serinsku reziduu (S305) koja se može fosforilisati (Ellmann i sar., 2009). COOH kraj, E/F- ili ligand-vezujući domen (LBD) učestvuje u vezivanju liganda, dimerizaciji receptora, nuklearnoj translokaciji i transaktivaciji ekspresije ciljnih gena (Nilsson i sar., 2001).

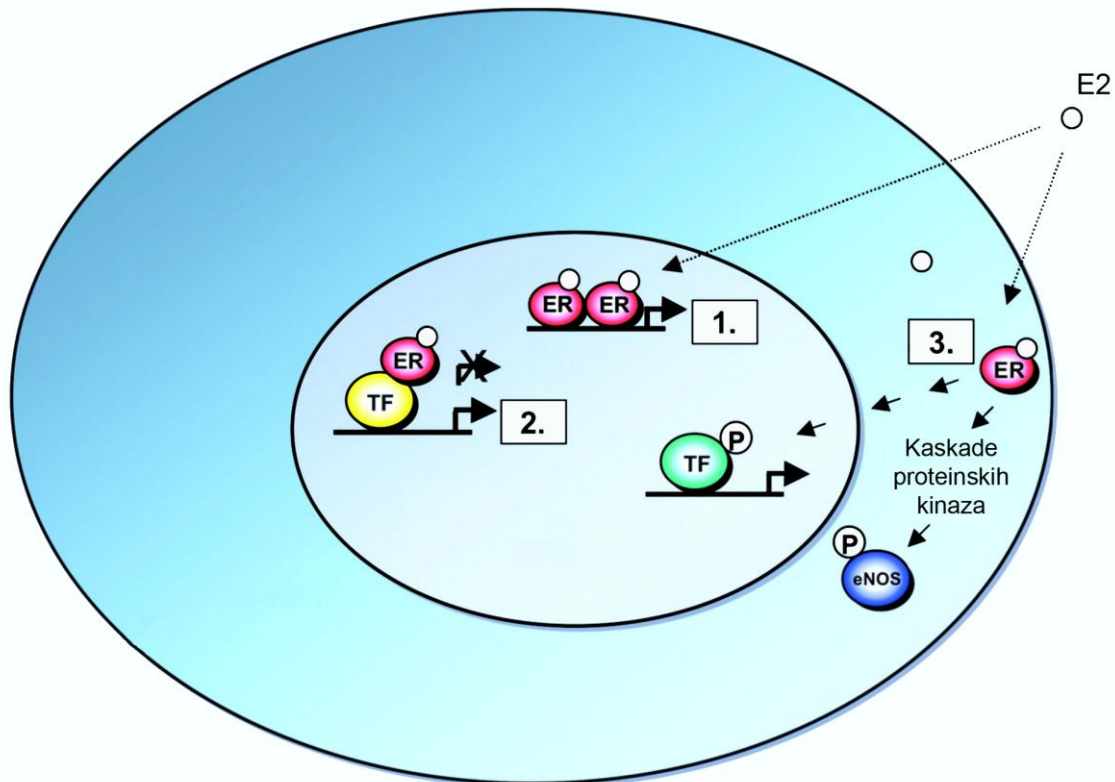
Amino kiselinski ostaci koji ovičavaju površinu šupljine koja vezuje ligand, ili koji interaguju sa vezanim ligandom, obuhvataju LBD od heliksa 3 do heliksa 12 (Nilsson i sar., 2001). LBD takođe obuhvata region AF2, koji je kompleksni region na čiju strukturu i funkciju utiče vezivanje liganda (Nilsson i sar., 2001).

### ***1.2.1 Genomski efekti estrogena***

#### **1.2.1.1 ERE-zavisni mehanizam delovanja estrogena**

Ligand-zavisni mehanizam delovanja ER je zajednička odlika članova klase I superfamilije nuklearnih steroidnih/tiroidnih receptora, čiji su članovi ER $\alpha$  i ER $\beta$  (Hall i sar., 2001). Prema ovom modelu, u odsustvu hormona, receptor je izdvojen u multiproteinski inhibitorni kompleks sa proteinima toplotnog šoka (Coleman i Smith, 2001). Estrogeni difunduju u ćeliju i vezuju se za ER, koji je lociran u nukleusu (Deroo i Korach, 2006). Vezivanje liganda za ER oslobađa receptor iz inhibitornog kompleksa sa proteinima toplotnog šoka, nakon čega receptori dimerizuju i vezuju za specifične responsivne elemente poznatije kao estrogen responsivni elementi (ERE) locirane u promotorima ciljnih gena (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Receptori koji su vezani za DNK su u kontaktu sa glavnim transkripcionim aparatom direktno ili indirektno preko kofaktorskih proteina, od kojih je nekoliko identifikovano, uključujući SRC-1, GRIP1, AIB1, CBP/p300, TRAP220, PGC-1, p68 RNA helikazu i SRA (Hall i sar., 2001). Zavisno od konteksta ćelije i promotora, receptor koji je vezan za DNK pokazuje pozitivan ili negativan efekat na ekspresiju ciljnih gena (Hall i sar., 2001).

Međutim, pojavili su se dokazi o signalnim putevima koji odstupaju od ovog klasičnog modela i sada je prihvaćeno da estrogeni receptori mogu da regulišu ekspresiju gena brojnim različitim mehanizmima (Bjornstrom i Sjoberg, 2005) (Slika 4).



**Slika 4. Šematski prikaz mehanizama delovanja estradiola (E2)**

1. Klasičan (ERE-zavisni) mehanizam delovanja estrogena. Nuklearni E2-ER kompleks se direktno veže za ERE u promotorima ciljnih gena. 2. ERE-nezavisno genomsko delovanje. Nuklearni E2-ER kompleksi se vezuju protein-protein interakcijama za kompleks transkripcionih faktora (TF) koji je u kontaktu sa promotorom ciljnih gena. 3. Negenomsko delovanje estrogena. Membranski E2-ER kompleks aktivira kaskade proteinskih kinaza, što dovodi do promena funkcija proteina u citoplazmi, kao što je na primer aktivacija eNOS, ili regulaciji genske ekspresije preko fosforilacije (P) i aktivacije TF (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).

#### 1.2.1.2 ERE-nezavisni signalni mehanizmi delovanja estrogena

Klasičan mehanizam delovanja estrogena obezbeđuje objašnjenje regulacije gena u čijim promotorima se mogu pronaći funkcionalne sekvence slične ERE (Hall i sar., 2001). Međutim, studije koje su pokazale postojanje estradiol-ER indukcije gena koji očigledno nemaju sekvence slične ERE, dovele su do otkrića da ER vezan za agonist može takođe da dovede do regulacije gena u odsustvu direktnog vezivanja za DNK (Hall i sar., 2001), tako što modulira funkciju drugih klasa transkripcionih faktora preko protein-protein interakcija u nukleusu (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Interakcija ER sa

aktivatornim proteinom-1 (AP-1), kompleksom transkripcionih faktora, je tipičan primer takvog ERE-nezavisnog genomskog delovanja (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). Pored toga, brojni estrogen-responsivni geni koji nemaju ERE sadrže ERE polu-mesta, ili vezujuća mesta za „orfan“ nuklearni hormon receptor SF-1 (SF-1 responsivni elementi (SFRE)) koja služe kao direktna vezujuća mesta za ER (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).

### ***1.2.2 Negenomski efekti estrogena***

Klasični ili “genomski” mehanizam delovanja estrogena se obično ostvaruje u toku nekoliko sati (Deroo i Korach, 2006). Međutim, primećeno je da estrogeni mogu da deluju mnogo brže, u intervalu od nekoliko sekundi ili minuta (Deroo i Korach, 2006). Uzimajući u obzir to da brzina aktivacije čini da je modulacija genske transkripcije manje verovatna i da ovi brzi efekti nisu blokirani inhibitorima proteinske ili RNK sinteze, ovi ekstranuklearni mehanizmi se obično nazivaju nenuklearni ili negenomski efekti estrogena (Ho i Liao, 2002). Pretpostavlja se da estrogeni mogu ostvariti svoje negenomske efekte preko formi ER na površini ćelije koje su povezane sa unutarćelijskim proteinima signalne transdukcije (Hall i sar., 2001).

Negenomsko delovanje  $17\beta$ -estradiola uključuje mobilizaciju unutarćelijskog kalcijuma (Improta-Brears i sar., 1999) i stimulaciju aktivnosti adenilat ciklaze i produkciju cAMP-a (Aronica i sar., 1994). Aktivacija MAPK signalnog puta od strane  $17\beta$ -estradiola je dosta izučavana u nekoliko ćelijskih linija, uključujući ćelije kancera dojke, endotelijalne, koštane i ćelije neuroblastoma (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).  $17\beta$ -estradiol takođe aktivira signalni put PI3K u endotelijalnim ćelijama (Chen i sar., 1999), ćelijama kancera dojke (Castoria i sar., 2001), ćelijama jetre (Marino i sar., 2002), kardiomiocitima (Patten i sar., 2004) i ćelijama uterusa (Kazi i sar., 2009).

Još uvek je nejasno da li pretpostavljeni membranski ER nalikuje jednoj ili obema unutarćelijskim formama. Neki autori su sugerisali da u negenomskim efektima estrogena učestvuje subpopulacija klasičnih ER,  $ER\alpha$  i  $ER\beta$ , koji su locirani u plazma membrani (Bjornstrom i Sjoberg, 2005). U endotelnim ćelijama, kao i u drugim tipovima ćelija, ER su pronađeni u kaveolama, malim invaginacijama plazma membrane, gde aktiviraju endotelijalnu sintazu azot oksida (eNOS) preko fosforilacije u kojoj posreduje



proteinska kinaza (Kim i sar., 1999; Chambliss i sar., 2002). Međutim, dosta podataka dobijenih o strukturi dve poznate nuklearne forme ER jasno ukazuju da nijedan od njih nije transmembranski protein (Hall i sar., 2001), pa sposobnost ER $\alpha$  da se veže za plazma membranu može biti ostvarena zahvaljujući palmitoilaciji receptora (Bjornstrom i Sjoberg, 2005).

### ***1.2.3 Efekti estradiola u uterusu, srcu i jetri***

Uterus ima centralnu ulogu u reprodukciji. Uterus glodara kao i humani, podleže cikličnim promenama rasta i degeneracije (Groothuis i sar., 2007). U polno zreloom uterusu, estrogenu stimulišu kompleksne procese proliferacije i diferencijacije epitela, koji vode formiranju višeslojnog sekretornog endometrijuma (Couse i sar., 2006). Ovaj efekat je kritičan za obezbeđivanje intrauterine sredine za uspostavljanje i održavanje trudnoće (Couse i sar., 2006). Odgovor uterusa ovarijektomisanih glodara na estradiol je dobro izučen i obično se opisuje kao bifazni (Couse i Korach, 1999). Prvu fazu čine efekti koji su vidljivi u prvih 6 h nakon tretmana estrogenom. Ovo uključuje metaboličke odgovore kao što su povećana imbibicija vode, povećana vaskularna permeabilnost i hiperemija, oslobađanje prostaglandina, metabolizam glukoze i infiltracija eozinofila (Couse i Korach, 1999). U ovoj fazi se javlja i serija biosintetičkih odgovora koji uključuju povećanu aktivnosti RNK polimeraze i hromatina, sintezu proteina i lipida i povećanje glukoze-6 fosfat dehidrogenaze (Couse i Korach, 1999). Ove promene su praćene odloženim odgovorom, koji je najjači 24-72 sata nakon tretmana. Druga faza odgovora uključuje dramatično povećanje sinteze RNK i DNK, proliferaciju i diferencijaciju epitela, dramatično povećanje težine uterusa i dalju ekspresiju gena (Couse i sar., 2006). Ovo mitogeno i stimulatorno delovanje estradiola u uterusu je kompleksan proces koji uključuje povećanje RNK polimerazne i ribozomalne aktivnosti, što rezultuje u regulaciji velikog broja gena (Couse i Korach, 1999).

Učestalost kardiovaskularnih bolesti je niska kod žena pre menopauze ali se značajno povećava nakon menopauze (poklapajući se sa incidencom kod muškaraca), što sugeriše da estrogenu štite ženski kardiovaskularni sistem (Deroo i Korach, 2006). Međutim, iako je godinama supstitucionna terapija estrogenima (HRT, eng. hormone

replacement therapy) prepisivana ženama u postmenopauzi kao zaštita od kardiovaskularnih bolesti, rezultati skorašnjih kliničkih ispitivanja ukazuju da bi ovakav tretman mogao imati negativne kardiovaskularne konsekvence, tačnije povišeni rizik za venski tromboembolizam ili srčani udar (Farquhar i sar., 2009). Takođe HERS (eng. heart and hestrogen/progestin heplacement study) studija nije uspjela da pokaže značajne protektivne efekte HRT kod starijih žena sa koronarnom arterijskom bolešću u postmenopauzi, i pokazala je potencijalne štete ukoliko je tretman počeo kasno (Herrington i sar., 2002). Moguće objašnjenje ovako velike razlike između opservacionih i randomizovanih kontrolisanih studija je dato u takozvanoj „tajming hipotezi“, prema kojoj efekat HRT na kardiovaskularni sistem zavisi od vremena početka terapije (Vitale i sar., 2010).

Podaci dobijeni iz animalnih modela i kliničkih studija podržavaju protektivnu ulogu estrogena u regulaciji nivoa lipida i holesterola, direktne efekte na vaskularnim ćelijama i oporavak od vaskularnih oštećenja (Deroo i Korach, 2006). Opisani su brojni direktni efekti estrogena na vaskularno tkivo, među kojima su negenomska vazodilatacija koja nastaje kao posledica efekta estrogena na funkciju jonskih kanala (Valverde i sar., 1999) i sintezu NO (Chen i sar., 1999) i regulacija gustine AT1 (eng. *angiotensin receptor 1*) receptora na VSMC (eng. *vascular smooth muscle cell*) (Nickenig i sar., 1998). Genomski efekti estrogena uključuju promene u ekspresiji gena i proteina u vaskularnim ćelijama i dovode do poboljšanja endotelijalne funkcije i odgovora krvnih sudova na povredu i razvoj ateroskleroze (Mendelsohn, 2002).

Hipertrofija leve komore (LVH, eng. *left ventricular hypertrophy*) srca je nezavisan faktor rizika za različite kardiovaskularne ishode kao što su infarkt i srčana insuficijencija (Kim i Levin, 2006). Žene u premenopauzi imaju manju učestalost LVH nego muškarci njihovih godina (Agabiti-Rosei i Muiesan, 2002), a HRT sa estradiolom uklanja LVH kod žena u postmenopauzi (Modena i sar., 1999; Miya i sar., 2002). Asocijacija ER sa PI3K igra važnu zaštitnu ulogu u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju srca (Kim i Levin, 2006). Ova oštećenja su vezana za gubitak kardiomiocita apoptozom, verovatno kao posledica kombinacije značajnih ishemijskih opterećenja i oksidativnog stresa od reperfuzije (Kim i Levin, 2006). U animalnom modelu infarkta miokarda je pokazano da estradiol štiti srce tako što redukuje veličinu infarkta i smanjuje apoptozu kardiomiocita aktivacijom PI3K/Akt puta (Patten i sar., 2004). U *in vitro* simuliranom modelu ishemijske/reperfuzije (I/R), estradiol doprinosi redukciji apoptoze kardiomiocita i

u to je uključena aktivacija PI3K/Akt puta (Kim i sar., 2006). Oksidativni stres i stvaranje ROS koje se dešava nakon koronarne reperfuzije se smatra mogućim okidačem apoptoze kardiomiocita (Zhao, 2004). Sposobnost estradiola/ER da se odupru takvim redoks intermedijerima je verovatno ključna komponenta opšte protekcije. Pored toga, estradiol modulira p38 MAPK, kinazu koja je važna u sudbini ćelije u stresu (Kim i Levin, 2006). p38 $\alpha$  je eksprimirana u srcu, u ishemiji je pozitivno regulisana i smatra se da indukuje apoptozu, dok p38 $\beta$ , koja se takođe nalazi u kardiomiocitima, obično ima antiapoptotsku funkciju (Kim i Levin, 2006). Kim i saradnici su pokazali da *in vitro*, u uslovima I/R, estradiol aktivira PI3K, što je povezano sa supresijom ROS i pozitivnom regulacijom p38 $\beta$ , a vodi negativnoj regulaciji p38 $\alpha$  i preživljavanju ćelija (Kim i sar., 2006).

Deo pozitivnih efekata estrogena na funkciju i reaktivnost kardiovaskularnog sistema, dolazi od efekata specifičnih za jetru, kojima se reguliše nivo serumskih lipida – holesterola (Nilsson i Gustafsson, 2002). Apolipoprotein(a), koji je glavna komponenta aterogenog lipoproteina(a), je negativno regulisan estrogenima na nivou ekspresije iRNK u jetri, što rezultuje smanjenjem lipoproteina(a) u cirkulaciji (Zysow i sar., 1997).

Studije na „nokaut“ miševima kojima je uklonjen gen za ER (ERKO) ili aromatazu (ArKO), su pokazale glukoznu intoleranciju i lipidne abnormalnosti kao posledicu estrogenske rezistencije ili insuficijencije (Nilsson i Gustafsson, 2002). ArKO miševi su razvili insulinsku rezistenciju u jetri, koja je rezultovala razvojem hiperglikemije u gladovanju i glukozne intolerancije (Takeda i sar., 2003). Takođe, u jetri ovih miševa je ekspresija enzima uključenih u  $\beta$  oksidaciju masnih kiselina redukovana (Nemoto i sar., 2000), dok je povećana ekspresija lipogenih gena, kao što su sintaza masnih kiselina i acetil koenzim A karboksilaza (Hewitt i sar., 2004). Kada su životinje tretirane estradiolom, poremećena ekspresija gena se vratila približno na normalnu, a steatoza jetre se izgubila (Nemoto i sar., 2000; Hewitt i sar., 2004). Sve navedene studije pokazuju koliko je značajna uloga estrogena u regulaciji energetskog metabolizma u jetri.

#### ***1.2.4 Efekti estradiola na delovanje insulina***

Mnoge kliničke studije su sugerisale vezu između estrogena i insulinske senzitivnosti (Xie i sar., 2003). Kao što je pregledno dato u radu Godslanda i sar. (Godsland, 2005), dugo se smatralo da estrogeni imaju negativan uticaj na metabolizam

ugljenih hidrata. Šezdesetih godina prošlog veka primećeno je da se glukozna tolerancija pogoršava kod žena koje su uzimale oralne kontraceptive sa visokom dozom estrogena. Pogoršanje glukozne tolerancije je potvrđeno i kod upotrebe oralnih kontraceptiva sa niskom dozom estrogena kao i u nekim slučajevima supstitucione terapije estrogenima u postmenopauzi. U skladu sa tim pretpostavljalo se da estrogeni imaju negativan efekat na metabolizam ugljenih hidrata, i da se kod njihove upotrebe može očekivati odgovarajuće povećanje u incidenci dijabetesa. Međutim, dve studije koje su se bavile efektima estradiola na kardiovaskularne bolesti „Heart Estrogen Progestin Replacement Study“ i „Women’s Health Initiative“ su, neočekivano, pokazale značajno nižu incidencu dijabetesa kod ispitivanih žena. Pokazalo se da su efekti estrogena na metabolizam karbohidrata mnogo kompleksniji nego što se to mislilo (Godsland, 2005).

Povišeni nivoi polnih steroida koji su vezani za normalan pubertet, trudnoću i lutealnu fazu menstrualnog ciklusa su povezani sa smanjenjem insulinske senzitivnosti i izgleda da je ovaj efekat ograničen na periferni metabolizam glukoze (Livingstone i Collison, 2002). Takođe, pokazano je da se kod žena koje koriste oralne kontraceptive češće razvija insulinska rezistencija (Godsland i sar., 1992). S druge strane, pokazano je da supstituciona terapija estrogenima poboljšava glukoznu homeostazu kod žena u postmenopauzi sa dijabetesom tip II (Andersson i sar., 1997). Takođe, poznato je da žene sa policističnim ovarijalnim sindromom imaju povećani rizik da razviju poremećenu toleranciju na glukozu kao i dijabetes tip II. Kod ovog sindroma je karakteristična insulinska rezistencija koja se i smatra odgovornom za razvoj dijabetesa tipa II (Ehrmann i sar., 1995).

Iz svega navedenog može se pretpostaviti da je nivo hormona važan u određivanju da li će njegov efekat na insulinsku senzitivnost biti pozitivan ili negativan (Livingstone i Collison, 2002). Fiziološki nivoi estrogena verovatno imaju ulogu u održavanju normalne insulinske senzitivnosti (Livingstone i Collison, 2002), dok veoma visoke koncentracije vode smanjenju insulinske senzitivnosti (Muraki i sar., 2006). Ovi rezultati zajedno sa podacima o supstitucionoj terapiji i suprafiziološkim dozama polnih steroida, sugerišu da postoji „fiziološki prozor“ za delovanje polnih steroida na insulinsku senzitivnost (Livingstone i Collison, 2002).

Odsustvo ženskih steroidnih hormona kod ovarijektomisanih ženki pacova izgleda vodi smanjenoj insulinskoj senzitivnosti i to je očigledno glavni efekat odsustva estradiola, pošto supstitucija hormona dovodi do potpunog vraćanja u normalno stanje

(Kumagai i sar., 1993). Suprafiziološke doze su izazvale isti ili još izraženiji efekat (Gonzalez i sar., 2002a). Ovo pokazuje da visoke doze hormona izazivaju smanjenje karbohidratnog metabolizma i smanjenje insulinske senzitivnosti i ukazuje na veliku važnost doze i koncentracije estrogena u pogledu metabolizma glukoze u HRT kod žena u menopauzi i kod žena koje uzimaju oralne kontraceptive (Gonzalez i sar., 2002a).

Rezultati Nagira i sar. (Nagira i sar., 2006), pokazuju da je tretman fiziološkom koncentracijom estradiola pojačao ulazak glukoze u 3T3L1 adipocite indukovan insulinom, dok ga je visoka koncentracija estradiola inhibirala. Ovi rezultati su u skladu sa kliničkim ispitivanjima da je incidenca dijabetesa tipa 2 povećana kod žena nakon menopauze kao i da se insulinska rezistencija dešava kod žena u kasnoj trudnoći (Nagira i sar., 2006).

Polni steroidi, svojim efektima na aktivnost lipoproteinske lipaze, mogu da moduliraju delovanje insulina i da utiču na distribuciju masti u organizmu (Livingstone i Collison, 2002). Tretman pacova farmakološkim dozama estrogena dovodi do redukcije aktivnosti lipoprotein lipaze u adipoznom tkivu, dok su aktivnosti ovog enzima u srcu i dijafragmi povećane (Wilson i sar., 1976). Drugim rečima, egzogeni estrogeni u visokim dozama, pomeraju fluks triacilglicerola iz skladištenja u adipoznom tkivu, ka korišćenju u skeletnim mišićima, što je anti-insulinsko delovanje (Livingstone i Collison, 2002). U visceralnom adipoznom tkivu situacija je nešto drugačija. Visceralni adipociti imaju relativno viši nivo lipolize u poređenju sa subkutanim adipocitima i pokazuju relativno slabu responsivnost na insulin, i u pogledu njegovog antilipolitičkog efekta i u pogledu efekta na ulazak glukoze u ćelije (Johnson i sar., 2001). Neesterifikovane masne kiseline koje se oslobađaju kao rezultat lipolize u visceralnom adipoznom tkivu su uključene u razvoj insulinske rezistencije u jetri (Livingstone i Collison, 2002). Poznato je da terapija estrogenima kod žena u postmenopauzi dovodi do smanjenja visceralnog adipoznog tkiva, pa se može zaključiti da estrogeni u fiziološkim dozama, ili kao supstituciona terapija, imaju protektivan efekat u pogledu sprečavanja akumulacije visceralnog masnog tkiva kod žena (McCarty, 2001).

Efekat estrogena na sekreciju insulina i učestalost dijabetesa se donekle može pratiti proučavanjem promena koje nastaju u menopauzi, kao i promena tokom korišćenja oralnih kontraceptiva. Međutim, efekat menopauze kod žena je težak za interpretaciju, zbog promena u organizmu koje su vezane za menopauzu i razlika u starosti između žena u pre- i postmenopauzi (Godsland, 2005).

Istraživanja su pokazala da menopauza može da utiče na sekreciju insulina, ali tako da se to ne odražava na nivo glukoze ili insulina (Godsland, 2005). Proučavane žene u pre i postmenopauzi su imale slične nivoe glukoze i insulina, međutim, žene u postmenopauzi su produkovale 50% manje insulina, ali su ga sporije i eliminisale, čime je kompenzovana redukcija u sekreciji i održan je nivo insulina (Walton i sar., 1993). Literaturni podaci ukazuju na to da u ostrvcima pankreasa postoji vezivanje estrogena za receptor, kao i direktan efekat na sekreciju insulina, međutim ostrvca pokazuju povećanu sekreciju samo kada su izolovana iz životinja koje su tretirane estradiolom, dok inkubacija izolovanih ostrvaca sa estrogenom ne daje efekat na produkciju insulina (Godsland, 2005).

Pored direktnog efekta na  $\beta$  ćelije pankreasa, estrogeni mogu da utiču na sekreciju insulina i posredno, svojim efektima na druge hormone. Literaturni podaci pokazuju da estrogeni mogu da povećaju sadržaj progesteronskog receptora u pankreasu, mogu da indukuju povećanje aktivnosti glukokortikoida i hormona rasta, kao i da dovedu do smanjenja sekrecije i senzitivnosti na glukagon (Godsland, 2005). Svi ovi efekti u nekim slučajevima mogu da imaju dugoročne pozitivne efekte na sekreciju insulina i zaštitu funkcije  $\beta$  ćelija (Godsland, 2005).

Molekularni mehanizam odgovoran za vezu između estradiola i insulinske senzitivnosti je još uvek nejasan (Gonzalez i sar., 2003). *In vitro* istraživanja su pokazala da visoke koncentracije estrogena mogu da inhibiraju humani gen za IR (Garcia-Arencibia i sar., 2005b). Ova inhibicija je regulisana transkripcionom represijom ovog gena i izaziva ćelijsku insulinsku rezistenciju u smislu opstanka ćelija, sinteze DNK, transporta glukoze i glukozne oksidacije (Garcia-Arencibia i sar., 2005b). *In vivo*, estradiol deluje na ekspresiju gena za IR, na količinu ovog receptora na membrani i na nivo fosforilacije ovog proteina i ovaj efekat je izgleda dozno i vremenski zavisna (Gonzalez i sar., 2002a).

*In vitro* istraživanja su pokazala da estradiol može da poveća ekspresiju i fosforilaciju IRS-1 u ćelijama humanog kancera dojke ili da može da smanji insulinom stimulisan transport glukoze smanjujući koncentraciju IRS-1 u 3T3L1 adipocitima (Gonzalez i sar., 2003). *In vivo*, kada je koncentracija estradiola u plazmi slična onoj u ranoj trudnoći, IRS-1 je pozitivno regulisan i povećava se insulinska senzitivnost u perifernim tkivima (skeletni mišići i adipozno tkivo) (Gonzalez i sar., 2001). Međutim, kada je koncentracija estradiola u plazmi kao u kasnoj trudnoći, IRS-1 je negativno

regulisan, smanjujući insulinsku senzitivnost u perifernim tkivima (Gonzalez i sar., 2001). Estrogen indukuje ekspresiju IRS-2 u ćelijama karcinoma dojke (Choi i sar., 2005).

Kod ovarijektomisanih pacova, količina GLUT1 proteina u krvno-moždanoj barijeri je povećana nakon tretmana estradiolom (Shi i Simpkins, 1997). U uterusu pacova tretman estradiolom je izazvao višestruko povećanje količine GLUT1 proteina i ulazak glukoze u ćelije (Welch i Gorski, 1999). Različite studije pokazuju da estradiol učestvuje u ekspresiji i translokaciji GLUT4, ali mehanizam kojim estradiol reguliše GLUT4 ostaje nejasan (Barros i sar., 2006).

Interesantna je interakcija koju ova dva hormona mogu da ostvare preklapanjem svojih signalnih puteva. Naime, zna se da estradiol svojim negenomskim delovanjem aktivira signalni put PI3K (Bjornstrom i Sjoberg, 2005), pa na taj način koristi deo istog signalnog puta kao insulin.

## 2. CILJ

Različita klinička istraživanja i eksperimentalni podaci ukazuju na interakcije insulina i estradiola, najznačajnijeg estrogenog hormona, u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata. Fiziološki uslovi u kojima je koncentracija estrogena značajno promenjena imaju očigledan efekat na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i intermedijerni metabolizam, a takođe imaju za posledicu i modifikaciju osetljivosti tkiva na insulin.

Cilj ove studije je komparativna analiza efekata estradiola na molekule signalnog puta insulina u jetri, uterusu i srcu. S jedne strane praćeni su efekti estradiola u jetri i uterusu kao glavnim ciljnim tkivima ova dva hormona. S druge strane su praćeni efekti u srcu, kao ciljnom tkivu u kome oba hormona ostvaruju značajne efekte.

Polazna hipoteza studije je da su efekti estradiola na signalni put insulina tkivno specifični i da imaju različite fiziološke konsekvence u različitim tkivima. Hipoteza je zasnovana na literaturnim podacima koji govore o tome da (1) estradiol menja biohemijske parametre (npr. koncentraciju slobodnih masnih kiselina) koji utiču na insulinsku senzitivnost, a u pojedinim tkivima (2) reguliše iste procese koje reguliše i insulin, (3) reguliše transkripciju gena za molekule signalnog sistema insulina (npr. IR i IRS-1) i (4) za ostvarivanje negenomskih efekata koristi iste signalne puteve kao i insulin.

Ova studija treba da doprinese definisanju molekula i procesa u signalnom sistemu insulina na koje estradiol ostvaruje efekat koji za posledicu ima promenu u insulinskoj senzitivnosti tkiva i promenu u regulaciji ćelijskih procesa kontrolisanih insulinom. Takođe, poređenje efekata estradiola na insulinski signalni sistem u jetri, uterusu i srcu treba da doprinese odgovoru na pitanje da li su ovi efekti tkivno specifični.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 MATERIJAL

##### 3.1.1 Hemikalije

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

Za određivanje koncentracije insulina u plazmi korišćen je RIA kit, proizvod firme INEP (Zemun, Srbija). Svinjski insulin je proizvod firme Galenika (Zemun, Srbija).

Za određivanje koncentracije proteina metodom BCA (eng. *bicinchoninic acid*) korišćeni su reagensi firme Pierce (Rockford, IL, USA).

Od firme Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) su nabavljene sledeće hemikalije: 17 $\beta$ -estradiol, insulin, protein A-sefaroza, albumin goveđeg seruma (BSA), natrijum dodecil sulfat (SDS), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), Tween-20, natrijum fluorid, natrijum pirofosfat, natrijum ortovanadat,  $\beta$ -merkaptotanol, etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), Triton X-100, akrilamid i bisakrilamid.

Od firme SERVA electrophoresis (Heidelberg, Germany) su nabavljene sledeće hemikalije: Tris baza, glicin, aprotinin i N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED).

U „Western blot“ analizi i imunoprecipitaciji korišćena su sledeća antitela: zečije poliklonsko antitelo na IR, IRS-1, IRS-2, Akt, fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) i sekundarno anti-mišje antitelo, koja su produkti Santa Cruz Botechnology (Santa Cruz, CA, USA). Monoklonsko mišje antitelo na p85 i anti-fosfotirozinsko antitelo PY20 su proizvodi firme BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Poliklonsko anti-Shc antitelo je proizvod firme Upstate (Charlottesville, VA, USA). Monoklonsko mišje anti-aktin antitelo i sekundarno anti-zečije antitelo su produkti firme Sigma–Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

Za izolaciju RNK je korišćen Trizol, proizvod firme Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Sve hemikalije korišćene za reverznu transkripciju i lančanu polimeraznu reakciju (PCR), kao što su First Strand cDNA Synthesis Kit, rekombinantna Taq polimeraza, dNTP, 10x PCR buffer i “prajmeri”, su nabavljene od firme Fermentas (Vilnius, Lithuania).

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

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

### **3.1.2 Eksperimentalne životinje**

U eksperimentima su korišćene ženke pacova soja Wistar (starosti 2-2,5 meseca, težine 200-250 g). Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima (na temperaturi od 22°C i svetlosnom režimu 12 h svetlo/12 h mrak, sa slobodnim pristupom hrani i vodi) u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“. Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičkog komiteta za upotrebu eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke "Vinča".

Sve životinje su dve nedelje pre žrtvovanja anestetizirane kombinacijom ketamina (40 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg) i ovarijektomisane, čime su izbegnute varijacije u nivou estrogena. Životinje su podeljene u dve eksperimentalne grupe: kontrolne (OVX) i životinje tretirane estradiolom (E2). Nakon gladovanja preko noći, životinje su dobile injekciju estradiola intraperitonealno (20 µg/kg telesne mase) i žrtvovane su 6 sati nakon injeciranja. Vreme davanja estradiolske injekcije je izabrano na osnovu rezultata drugih autora (Richards i sar., 1996; Richards i sar., 1998; Richards i sar., 2001) i optimizovano je tako da se uoči pik promena u sadržaju proteina, iRNK i funkcije signalnih molekula insulina. Kontrolne životinje su primile 0.14 M NaCl sa 1% etanolom u kome je rastvaran hormon.

Sadržaj proteina insulinskih signalnih molekula je određivan bez dodavanja egzogenog insulina. Međutim, fosforilacija molekula insulinskog receptora, IRS i Akt, kao i asocijacija IRS sa p85, su određivani u uslovima stimulacije insulinom, da bi se efekti estradiola doveli u kontekst insulinskog signalnog puta. Naime, ovi molekuli, odnosno njihove fosforilacije i asocijacije, su takođe integralni deo signalnih puteva nekih faktora rasta i citokina. Za ove eksperimente, životinje (i kontrolna i grupa tretirana estradiolom) su injecirane intraperitonealno insulinom (20 IU po životinji) 30 minuta pre žrtvovanja (Giorgino i sar., 1999).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 *Priprema uzoraka tkiva*

Nakon gladovanja preko noći, životinje su žrtvovane dekapitacijom. Krv je sakupljena u staklene epruvete u kojima se kao antikoagulans nalazio 6% EDTA i centrifugirana 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehnica LC-321). Nakon centrifugiranja, plazma je prebačena u plastične epruvete i čuvana na -20°C do određivanja koncentracije estradiola, insulina i slobodnih masnih kiselina.

Nakon dekapitacije, tkiva (jetra, srce i uterus) su izmerena, iseckana, pulovana i homogenizovana na ledu u puferu za homogenizovanje (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) kome su dodati proteazni inhibitori (2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, i 10 µg/ml aprotinin) i fosfatazni inhibitori (100 mM natrijum fluorid, 10 mM natrijum pirofosfat i 2 mM natrijum ortovanadat), korišćenjem Ultra-Turrax homogenizera (Dupont i sar., 1998). Homogenati su centrifugirani 20 minuta na 600xg (Sorvall) na 4°C, a zatim su supernatanti centrifugirani 60 minuta na 100000xg (Beckman Ti-50 rotor). Koncentracije proteina su određene BCA metodom (Smith i sar., 1985). Supernatanti, koji predstavljaju ukupni ćelijski lizat, su korišćeni za „Western blot“ i imunoprecipitaciju. Uzorci koji su spremljeni za „Western blot“ su skuvani 5 min na 100°C u jednakoj zapremini 2xLaemmli pufera i čuvani u frižideru na -20°C.

### 3.2.2 *Biohemijske analize*

#### 3.2.2.1 *Određivanje koncentracije glukoze u krvi*

Koncentracija glukoze je određivana u punoj krvi Accutrend glukozometrom (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### 3.2.2.2 Određivanje koncentracije insulina u plazmi

Koncentracija insulina u plazmi je određena RIA metodom, korišćenjem pacovskih standarda. Ova metoda se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka i radioaktivno obeleženog insulina za određene epitope na specifičnim anti-insulinskim antitelima, pri čemu nastaju obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Kompleksi se talože imunoabsorbentom, pri čemu se u talogu dobijaju sekundarna antitela sa vezanim insulinom i polietilenglikol, a u tečnoj fazi zaostaju slobodni insulin i slobodna antitela. Koncentracija insulina u uzorcima se određuje merenjem radioaktivnosti taloga i upoređivanjem sa standardnom krivom, koja je dobijena pomoću standarda precizno definisane koncentracije insulina u rasponu od 0,3 do 300 mIU/l. Konkretno, standardi i uzorci plazme su inkubirani sa  $^{125}\text{I}$ -insulinom 20 h na sobnoj temperaturi, nakon čega su nastali kompleksi inkubirani sa imunoabsorbentom 30 min na sobnoj temperaturi i centrifugirani 25 min na 3000xg. Radioaktivnost taloga je merena u toku 1 minuta u brojaču 1219 LKB. Senzitivnost eseja je 0.6 mIU/l, a unutrašnji koeficijent varijacije u eseju 5.24 %.

### 3.2.2.3 Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi je određena modifikovanom metodom po Duncombe-u (Duncombe, 1964). Ovo je kolorimetrijska metoda, koja se zasniva na tome da masne kiseline u hloroformu uz prisustvo odgovarajućeg reagensa (trietanolamin pufer i  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) grade soli bakra, koje u kontaktu sa dietilditiokarbamatom (DDC) grade kompleksno jedinjenje žute boje, sa maksimumom apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm. Ukratko, uzorak plazme je inkubiran sa hloroformom i trietanolaminskim puferom (1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 1 M TEA, 6.5%  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) 20 min na sobnoj temperaturi. Inkubaciona smeša je zatim centrifugirana 10 min/3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehtnica LC-321), nakon čega je srednji hloroformski sloj prenet u nove epruvete, inkubiran 20 min sa 0.2% DDC i merena je apsorbanca na 436 nm (Ultrospec II, LKB). Standardna kriva je dobijena korišćenjem različitih koncentracija palmitinske kiseline u rasponu od 0,25 mM do 2,5 mM.

### 3.2.2.4 Određivanje koncentracije estradiola u plazmi

Koncentracija estradiola u plazmi je određena ELISA kitom. Ovaj esej se zasniva na principu kompetitivnog vezivanja između estradiola iz uzorka i estradiola konjugovanog sa HRP (eng. *horse radish peroxidase*), za ograničenu količinu zečijeg anti-estradiolskog antitela. U bunarićima obloženim kozjim anti-zečijim IgG antitelima su inkubirani standardi ili uzorci sa konjugatom hormona i zečijim antitelima, 90 minuta na sobnoj temperaturi. Tokom inkubacije, ograničena količina obeleženog estradiola kompetira sa endogenim estradiolom u standardu ili uzorku za ograničen broj vezujućih mesta na specifičnom estradiolskom antitelu, pa se količina konjugata koji je vezan za bunariće progresivno smanjuje što je veća koncentracija estradiola u uzorku. Nevezani konjugat je ispiranjem uklonjen iz bunarića i dodat je rastvor TMB (tetrametilbenzidin) reagensa koji nakon 20 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi razvija plavu boju. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 N HCl i merena je apsorbancija na 450 nm. Standardna kriva je dobijena korišćenjem različitih koncentracija estradiola u rasponu od 10 pg/ml do 1000 pg/ml.

### 3.2.3 *Određivanje koncentracije proteina*

Koncentracija proteina u uzorcima je određena korišćenjem eseja BCA (Smith i sar., 1985). Ovo je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na tome da proteini u alkalnoj sredini redukuju jone bakra  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{1+}$  (biuretska reakcija), koje zatim reaguje sa bicinhoniničnom kiselinom selektivno prepoznaje. Ružičasto obojeni produkt ovog eseja se formira helacijom dva molekula BCA sa jednim jonom  $\text{Cu}^{1+}$ . Apsorbancija se meri na 562 nm i koncentracija proteina u uzorku se očitava sa standardne krive, koja je dobijena korišćenjem poznatih koncentracija BSA u rasponu 20  $\mu\text{g/ml}$  do 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.2.4 SDS elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteini izolovani iz jetre, srca i uterusa su razdvojeni po molekularnoj masi SDS-elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (Laemmli, 1970). Denaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza se zasniva na disocijaciji i denaturaciji proteina u linearne polipeptidne lance uz pomoć anjonskog deterdženta SDS-a (eng. *sodium dodecyl sulfate*). Uzorci (50 µg proteina/bunariću) su naneti na 7.5% ili 10% SDS poliakrilamidni gel. Elektroforeza je trajala 60 minuta pri konstantnom naponu od 120 V, u aparatu Mini Protean Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Kao molekularni marker korišćen je ProteinPlus Prestained Ladder (Fermentas, Lithuania).

### 3.2.5 „Western blot“

„Western blot“ je semikvantitativna tehnika koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u uzorku. Nakon elektroforetskog razdvajanja, vrši se elektrotransfer proteina na nitroceluloznu ili PVDF (eng. polyvinyl difluoride) membranu na kojoj se specifični proteini detektuju korišćenjem primarnih antitela specifičnih za ciljani protein i sekundarnih antitela koja su kuplovana sa enzimom čija aktivnost daje obojeni ili hemiluminiscentni produkt.

Nakon elektroforeze je izvršen transfer proteina na PVDF membranu (Hybond-P, membrana, veličine pora 0.45 µm, Amersham). Transfer je rađen preko noći na 4°C, pri konstantnoj jačini struje od 80 mA u aparatu za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio-Rad). Membrane su inkubirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBST puferu, TBST pufer: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 8,0) 1,5 h na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa primarnim antitelima na IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt, pAkt (Ser<sup>473</sup>) ili Shc, 1,5 h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela su razblažena u TBST puferu u odnosu 1:1000. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom, membrane su isprane TBST puferom i inkubirane 1,5 h sa sekundarnim antitelom. Za detekciju su korišćena odgovarajuća anti-zečija (razblaženje 1:7500 u TBST) ili anti-mišja (razblaženje 1:2500 u TBST) sekundarna antitela kuplovana sa alkalnom fosfatazom. Po završetku inkubacije, membrane su ponovo isprane TBST puferom i zatim

inkubirane u mraku 5 min sa BCIP/NBT supstratom. Kombinacija NBT (eng. *nitro-blue tetrazolium chloride*) i BCIP (eng. *5-bromo-4-chloro-3'-indolphosphate p-toluidine salt*) daje intenzivni nerastvorljivi tamno-ljubičasti precipitat kada reaguje sa alkalnom fosfatazom. Radi kontrole jednakog unosa proteina u svim uzorcima, korišćeno je mišje anti-aktin antitelo. Kvantifikacija je izvršena korišćenjem laserskog denzitometra (LKB, Uppsala, Sweden).

### **3.2.6 Koimunoprecipitacija**

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

Lizati jetre, srca i uterusa su inkubirani preko noći sa 1 µg antitela na IR, IRS-1 ili IRS-2 (Richards i sar., 1996). Imunokompleksi su absorbovani sa protein A Sefarozom 2 h na 4°C, centrifugirani, isprani i razdvojeni na SDS-PAGE gelu, a zatim preneti na PVDF membranu. Membrane su inkubirane sa anti-fosfotirozinskim ili anti-p85 antitelom. Za detekciju su korišćena sekundarna anti-mišja antitela (razblaženje 1:2500 u TBST) kuplovana sa alkalnom fosfatazom i BCIP/NBT supstrat. Kvantifikacija je izvršena korišćenjem laserskog denzitometra (LKB, Uppsala, Sweden).

### **3.2.7 RT-PCR**

Za određivanje efekata tretmana na ekspresiju određenih gena u srcu, korišćena je metoda reverzna transkripcija - lančana polimerazna reakcija (RT-PCR). Ukupna RNK izolovana iz tkiva je prevedena u cDNK koja je zatim amplifikovana korišćenjem

specifičnih "prajmera" za IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt ili tzv. „housekeeping“ gena gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH).

### 3.2.7.1 Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana Trizol reagensom. 100 mg tkiva je homogenizovano u 1 ml Trizola. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 12000xg, talog je odbačen, a u supernatant je dodato 0,2 ml hloroforma na 1 ml supernatanta. Uzorci su inkubirani 5 minuta na 30°C i ponovo cetrifugirani 10 min na 12000xg (Eppendorf centrifuga). Vodena faza je pažljivo skupljena i dodat je 3 M natrijum acetat pH 5 u odnosu 1:10. Nakon mešanja dodato je 2 volumena apsolutnog etanola i uzorak je ostavljen preko noći na -20°C da se precipitira. Nakon precipitacije, uzorak je centrifugiran 10 min na 12000xg (Eppendorf centrifuga), odliven je supernatant i talog je ispran 75% etanolom. RNK je rastvorena u DEPC vodi i koncentracija je određena spektrofotometrijski merenjem apsorpcije uzoraka na 260 nm. Stepem prečišćenosti izolovane RNK je dobijen poređenjem odnosa  $A_{260}/A_{280}$ .

Za proveru kvaliteta izolovane RNK rađena je horizontalna elektroforeza na 1,2% agaroznom gelu kome je dodat etidijum bromid. Elektroforeza je trajala 30 min pri konstantnoj voltaži od 100 V.

### 3.2.7.2 Reverzna transkripcija (RT)

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



### 3.2.7.3 PCR

Za semikvantitativni PCR, korišćeno je 2  $\mu$ l cDNK što je ekvivalentno količini od 250 ng ukupne RNK. Uzorci cDNK su amplifikovani korišćenjem Hot Start Taq DNK polimeraze (Fermentas) u Mastercycler Personal System PCR aparatu (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR smeša je sadržala 0.25  $\mu$ g cDNK, 1xTaq pufer, 0.2 mM dNTP mix, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.25  $\mu$ M "prajmere" za IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt ili GAPDH i 2 U Taq polimeraze. Ukupna zapremina reakcione smeše je bila 25  $\mu$ l. Uslovi za amplifikaciju su bili sledeći: inicijalna denaturacija 5 min na 94°C, denaturacija 45 s na 94°C, vezivanje "prajmera" 1 min na temperaturi optimalnoj za svaki par "prajmera" (Tabela 1), ekstenzija 1 min na 72°C i finalna ekstenzija 7 min na 72°C. Broj ciklusa je optimizovan za svaki gen tako da se postigne amplifikacija u eksponencijalnoj fazi (Tabela 1).

Produkti PCR reakcije su razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu koji je sadržao etidijum-bromid (0.5  $\mu$ g/ml), u aparatu Mini SubCell (BioRad). Elektroforeza je trajala 30 minuta, pri konstantnoj voltaži od 100 V. Gelovi su zatim fotografisani pod UV svetlom u aparatu GelDoc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a signali su kvantifikovani u programu ImageJ (NIH, USA). Kao molekularni marker korišćen je GeneRuler DNA Ladder (Fermentas, Lithuania).

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

Gen	Veličina produkta		Sekvence “prajmera”	PCR uslovi
IR	376 bp	sense:	AGCCTGGCTGAGCAACCTTA	58°C
		antisense:	CATAGGTCCGTTTGATGCTC	35 ciklusa
IRS-1	511 bp	sense:	ACAGGCATTGCTGCAGAGAA	58°C
		antisense:	GGTGCTGCTTAACATCCTTG	35 ciklusa
IRS-2	453 bp	sense:	ATATGAGCATGGATAGGCC	60°C
		antisense:	GTGGTTGCAGGATCTGCTTA	35 ciklusa
p85	170 bp	sense:	GACTGGAGGAAGACTTGAAG	58°C
		antisense:	CGTTTCCCAACCATTTCGTTTC	35 ciklusa
Akt	411 bp	sense:	CTCTGCATTGCCGAGTCC	58°C
		antisense:	TGTCATCTTGATCAGGCGGT	35 ciklusa
GAPDH	308 bp	sense:	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA	58°C
		antisense:	AGATCCACAACGGATACATT	30 ciklusa

### 3.2.8 Statistička analiza

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa ukupno devet životinja po grupi.

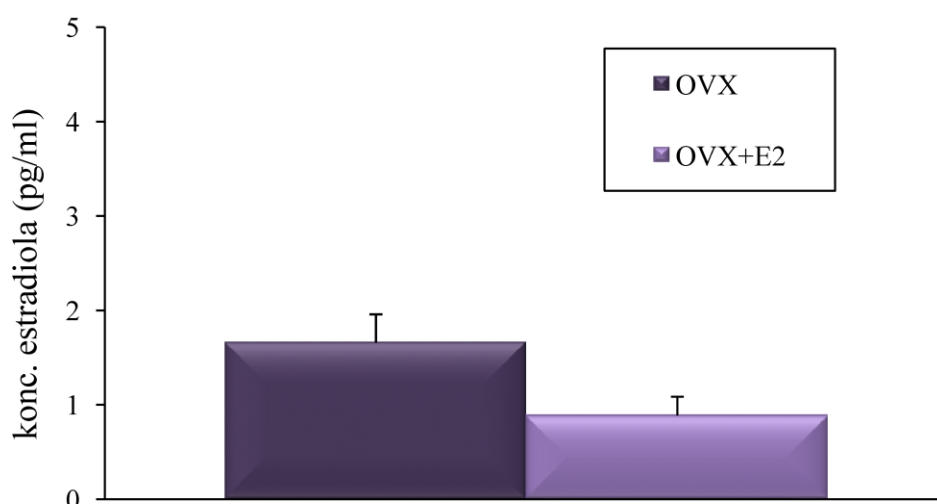
Kvantifikacija rezultata dobijenih koimunoprecipitacijom i „Western blot“ metodom je izvršena denzitometrijski korišćenjem laserskog denzitometra (LKB, Uppsala, Sweden). Sve vrednosti su izražene u odnosu na  $\beta$  aktin sa istog blota. Kvantifikacija rezultata dobijenih RT-PCR metodom je izvršena korišćenjem programa ImageJ (NIH, USA) i sve dobijene vrednosti su izražene u odnosu na GAPDH iz istih uzoraka. Izmerene vrednosti optičke gustine su predstavljene kao procenat od odgovarajuće kontrole.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (S.D.). Za statističku analizu je korišćen program SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena jednofaktorskom analizom varijanse (one-way ANOVA), sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1 KONCENTRACIJA ESTRADIOLA

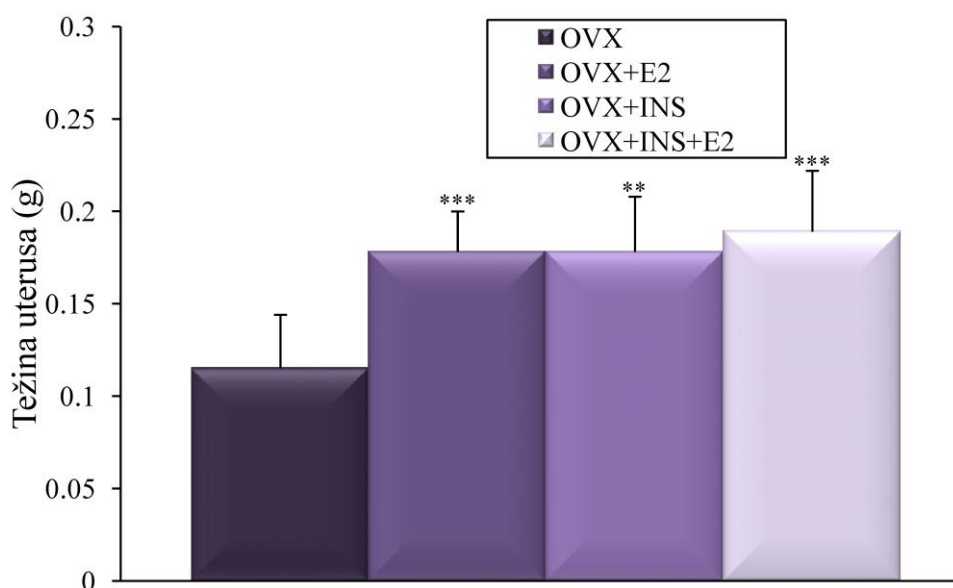
Da bi se izbegle varijacije koncentracija endogenog estradiola u zavisnosti od faze ciklusa, kao i da bi se odvojio efekat estradiola od progesterona, sve životinje korišćene u ovoj studiji su ovarijektomisane dve nedelje pre eksperimenta. Koncentracije estradiola u plazmi izmerene na dan eksperimenta su potvrdile da je kod OVX životinja endogeni estradiol skoro potpuno uklonjen (Slika 5). Životinje koje su primile injekciju estradiola 6 h pre eksperimenta su imale slične vrednosti koncentracije ovog hormona kao i OVX životinje (Slika 5). Ovaj rezultat je u skladu sa vremenskom kinetikom uklanjanja estradiola iz krvi koja je ranije pokazana eksperimentima sa radioaktivno obeleženim hormonom (Jensen i Jacobson, 1962). U tom eksperimentu je pokazano da estradiol u krvi ima najveću koncentraciju odmah nakon injekcije, i da se već nakon 2 h vraća na bazalnu vrednost (Jensen i Jacobson, 1962). Tretman insulinom 30 min pre žrtvovanja nije uticao na koncentraciju estradiola u plazmi, što je i očekivano.



**Slika 5. Koncentracija estradiola u plazmi kod kontrolnih i estradiolom tretiranih životinja.** Sve životinje su ovarijektomisane dve nedelje pre žrtvovanja, a OVX+E2 grupa je dobila injekciju estradiola (20 µg/kg, i.p.) 6 h pre žrtvovanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D.

## 4.2 EFEKAT TRETMANA ESTRADIOLOM NA MASU UTERUSA

Poznato je da je odgovor uterusa pacova na estradiol bifazni i da prvu fazu čine efekti koji su vidljivi u prvih 6 h nakon tretmana estrogenom (Couse i Korach, 1999). U cilju potvrde delotvornosti estradiolske injekcije, merena je masa uterusa kod svih ispitivanih životinja.

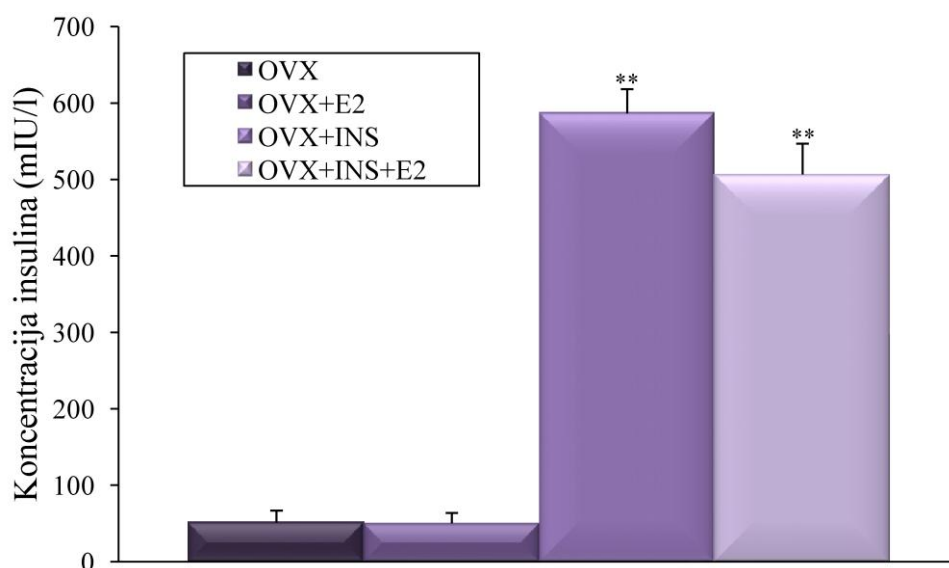


**Slika 6. Efekat tretmana estradiolom na masu uterusa.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$  vs. OVX, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. OVX. OVX - ovarijska neoplazija; E2 - estradiol; INS – insulin.

Tretman estradiolom je doveo do statistički značajnog povećanja mase uterusa u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,001$ ). Neočekivano, insulinski tretman je sam značajno povećao masu uterusa ( $0,178 \pm 0,030$  g vs  $0,115 \pm 0,029$  g;  $p < 0,01$ ) u poređenju sa OVX životinjama. Još izraženije povećanje mase uterusa vidi se kod životinja koje su tretirane i estradiolom i insulinom ( $0,189 \pm 0,033$  g vs  $0,115 \pm 0,029$  g;  $p < 0,001$ ) u poređenju sa OVX životinjama (Slika 6).

### 4.3 EFEKAT TRETMANA ESTRADIOLOM NA KONCENTRACIJU INSULINA, GLUKOZE I SLOBODNIH MASNIH KISELINA

S obzirom da su prethodna istraživanja pokazala da tretman estradiolom reguliše metabolizam ugljenih hidrata (Van Pelt i sar., 2003) i lipida (Jensen i sar., 1994), bilo je interesantno utvrditi da li je estradiol uključen i u regulaciju koncentracije insulina, glukoze i slobodnih masnih kiselina u plazmi. Biohemijske analize su urađene za sve eksperimentalne grupe, životinje koje su dobile injekciju estradiola (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  telesne težine) intraperitonealno, životinje koje su osim estradiola dobile dodatnu injekciju insulina (20 IU po životinji), kao i odgovarajuće kontrolne grupe.

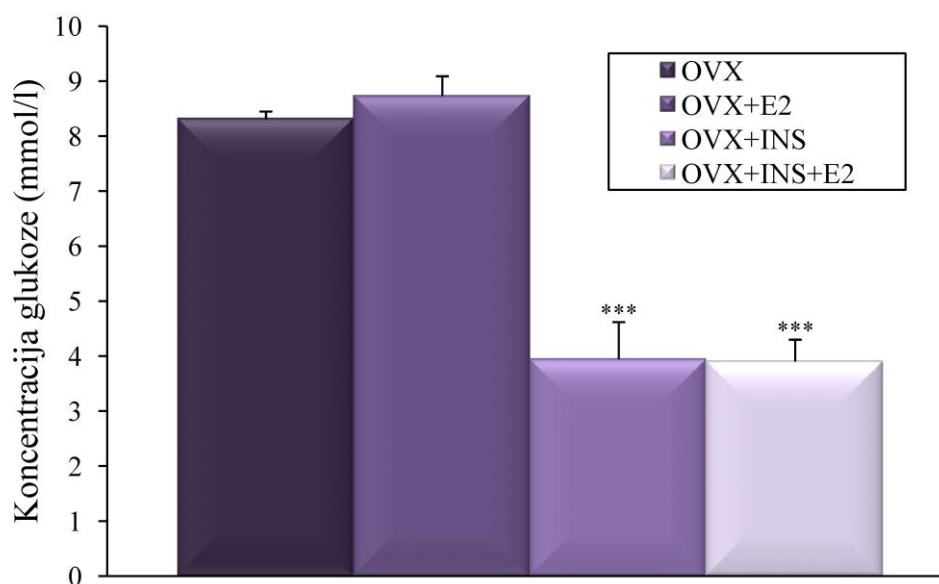


**Slika 7. Efekat tretmana estradiolom na koncentraciju insulina.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . Skraćenice su date u opisu uz sliku 6. \*\*  $p < 0,01$  vs OVX.

Nivo insulina u plazmi nije promenjen 6 h nakon injekcije estradiola. Takođe, koncentracija insulina nije promenjena ni kod životinja koje su dobile oba hormona u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su tretirane samo insulinom. Očekivano, sam insulinski tretman je statistički značajno povećao koncentraciju insulina u plazmi

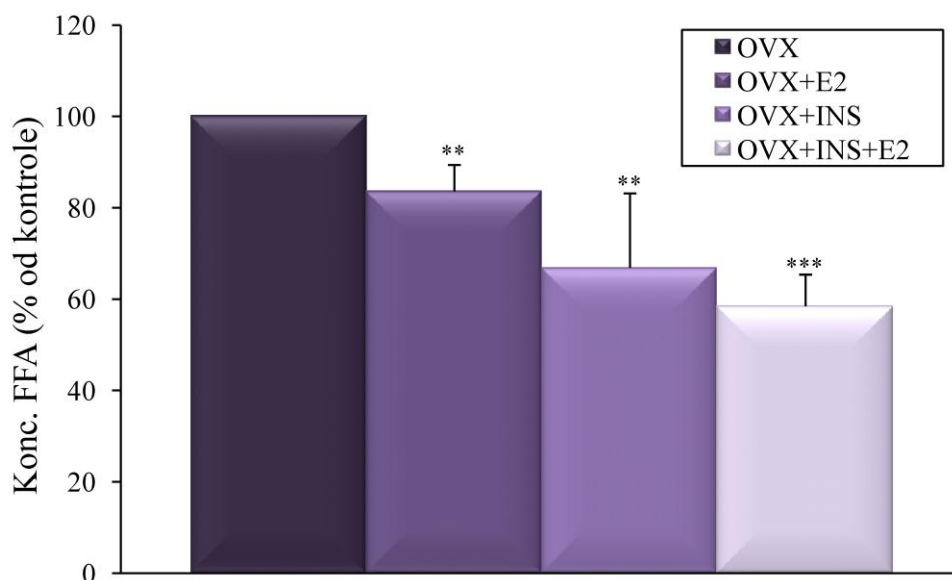
( $586,48 \pm 31,82$  mIU/l vs  $51,25 \pm 15,76$  mIU/l;  $p < 0,01$ ) u poređenju sa OVX životinjama. Pored toga, koncentracija insulina u plazmi je statistički značajno povećana i kod životinja koje su primile oba hormona u poređenju sa OVX životinjama ( $506,74 \pm 40,39$  mIU/l vs  $51,25 \pm 15,76$  mIU/l;  $p < 0,01$ ) (Slika 7).

U skladu sa rezultatom koji ukazuje da estradiol nije promenio koncentraciju insulina u plazmi, nivo glukoze u krvi nije promenjen nakon estradiolskog tretmana u poređenju sa kontrolom. U kombinaciji sa insulinskim tretmanom, estradiolski tretman takođe nije promenio koncentraciju glukoze u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su tretirane insulinom. Međutim, sam insulinski tretman je očekivano značajno smanjio nivo glukoze ( $3,94 \pm 0,68$  mmol/l vs  $8,31 \pm 0,14$  mmol/l;  $p < 0,001$ ) u plazmi u poređenju sa OVX životinjama. Slično kao i u slučaju koncentracije insulina, životinje koje su dobile injekcije oba hormona su imale značajno manju koncentraciju glukoze u krvi u poređenju sa OVX životinjama ( $3,90 \pm 0,40$  mmol/l vs  $8,31 \pm 0,14$  mmol/l;  $p < 0,001$ ) (Slika 8).



**Slika 8. Efekat tretmana estradiolom na koncentraciju glukoze.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . Skraćenice su date u opisu uz sliku 6. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. OVX.

Iako nije došlo do značajne promene koncentracije glukoze i insulina u plazmi, tretman estradiolom je doveo do statistički značajnog smanjenja nivoa FFA u plazmi ovarijektomisanih pacova za 16,39% ( $p < 0,01$ ). U kombinaciji sa insulinskim tretmanom, estradiolski tretman nije promenio koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi, u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su tretirane insulinom. Međutim, sam insulinski tretman je značajno smanjio nivo slobodnih masnih kiselina ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa OVX životinjama. Pored toga, životinje koje su primile injekciju oba hormona su imale nivo slobodnih masnih kiselina u plazmi za 41,56% niži nego kontrolne (OVX) životinje ( $p < 0,001$ ) (Slika 9).



**Slika 9. Efekat tretmana estradiolom na koncentraciju FFA.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . Skraćenice su date u opisu uz sliku 6. \*\*  $p < 0,01$  vs. OVX, \*\*\*  $p < 0,001$  vs. OVX.



## 4.4 EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U JETRI I UTERUSU

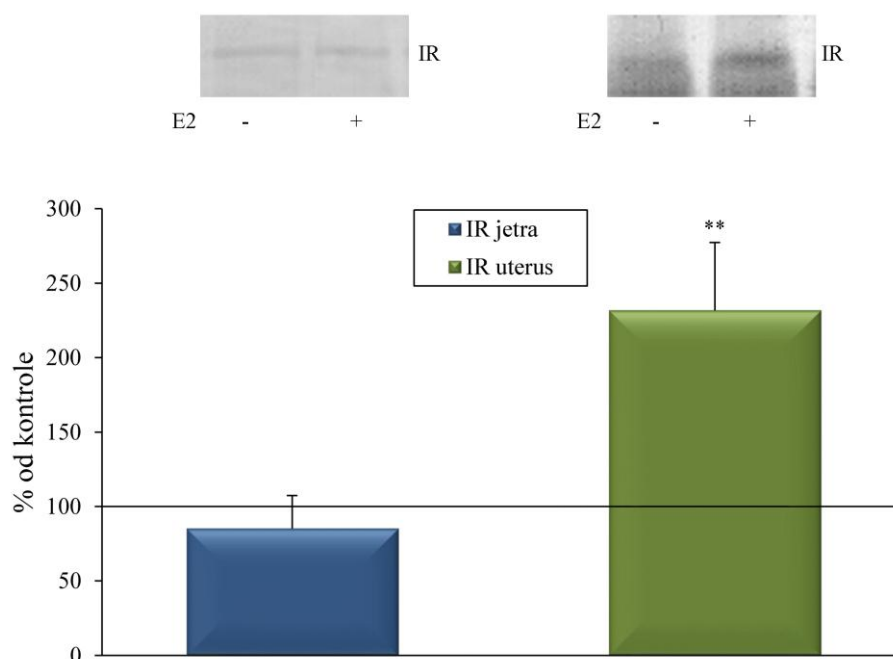
S obzirom da je estradiolski tretman značajno snizio koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi, a poznato je da masne kiseline utiču na insulinsku senzitivnost tkiva, bilo je interesantno ispitati da li postoje efekti estradiola na prve korake insulinskog signalnog puta u glavnim ciljnim tkivima oba hormona. Na osnovu literaturnih podataka, pored ovih indirektnih efekata, očekivani su i direktni efekti estradiola na molekule signalnog puta insulina u ciljnim tkivima.

### 4.4.1 *Efekat tretmana estradiolom na sadržaj proteina i tirozinsku fosforilaciju receptora za insulin u jetri i uterusu*

Insulin ostvaruje svoje delovanje vezivanjem za IR na membrani, pa su stoga prvo ispitivani efekti estradiola na bazalni sadržaj proteina IR “Western blot” metodom. Efekti tretmana na ukupnu fosforilaciju tirozina IR, koja ukazuje na kinaznu aktivnost receptora, su ispitivani koimunoprecipitacijom, tj. uzorci su imunoprecipitirani sa anti-IR antitelom, a zatim “blotovani” sa anti-fosfotirozinskim antitelom. Da bi efekat tretmana bio doveden u kontekst insulinskog signalnog puta, koimunoprecipitacija je rađena u uzorcima dobijenim iz životinja koje su injecirane insulinom.

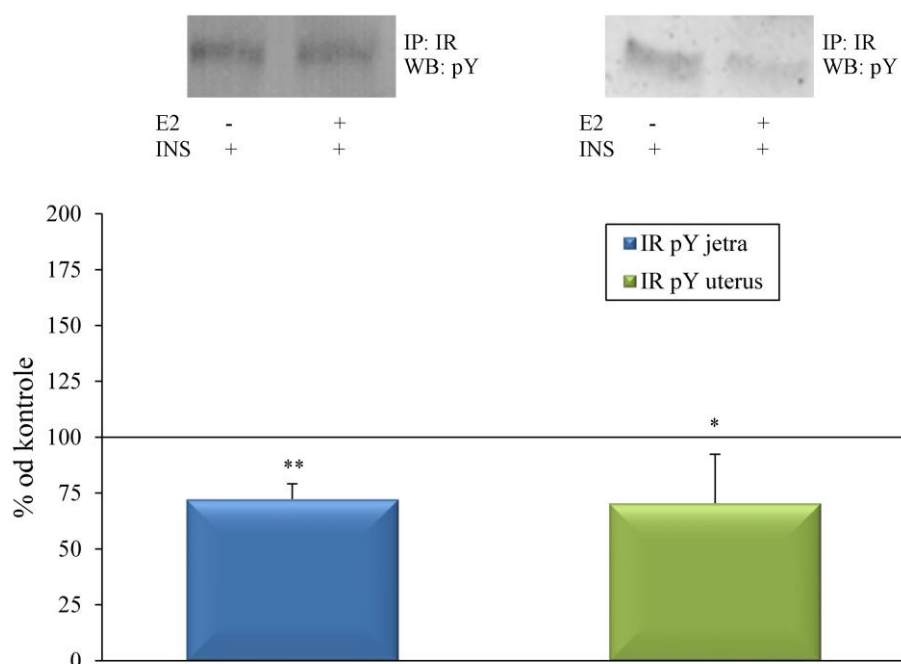
Jetra je esencijalni organ za homeostazu glukoze i poremećaj regulacije insulinskog delovanja u jetri je kritična komponenta patogeneze dijabetesa tipa 2. Miševi sa delecijom IR u jetri imaju izraženu insulinsku rezistenciju i hiperglikemiju nakon jela, što ukazuje da IR ima centralnu ulogu u regulaciji glukozne homeostaze u jetri i celom organizmu (Michael i sar., 2000). S druge strane, uterus igra centralnu ulogu u reprodukciji i svi događaji u ovom tkivu su vezani za pripremu za implantaciju embriona. Eksperimentalni podaci pokazuju prisustvo IR u endometrijalnim ćelijama uterusa, pri čemu je najveći sadržaj IR u toku perioda implantacije, što ukazuje na važnu ulogu insulina u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji tokom decidualizacije (Korgun i sar., 2003).

Izlaganje životinja jednokratnom estradiolskom tretmanu nakon 6 h nije dovelo do značajne promene sadržaja IR u jetri, međutim u uterusu je došlo do statistički značajnog povećanja količine ovog proteina za 130% ( $p < 0,01$ ) (Slika 10).



**Slika 10. Efekat estradiola na sadržaj proteina IR u jetri i uterusu OVX pacova.** OVX pacovi su tretirani estradiolom (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) 6 h pre žrtvovanja. Sadržaj proteina je određen „Western blot“ analizom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja IR predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D., odnosno kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . IR – receptor za insulin.

Interesantno je da je fosforilacija tirozina IR indukovana insulinom statistički značajno smanjena u oba tkiva za približno 30% (jetra: 28%,  $p < 0,01$ ; uterus: 30%,  $p < 0,05$ ) nakon estradiolskog tretmana (Slika 11).



**Slika 11. Efekat estradiola na tirozinsku fosforilaciju IR u jetri i uterusu OVX pacova.** OVX pacovi su tretirani estradiolom (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.) 6 h pre žrtvovanja. Sve životinje (i kontrolne i tretirane estradiolom) su dobile injekciju insulina (20 IU/životinji, i.p.) 30 min pre žrtvovanja. Nivo tirozinske fosforilacije je određen koimunoprecipitacijom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata koimunoprecipitacije, predstavljena kao srednja vrednost $\pm$ S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . pY – fosforilacija tirozina

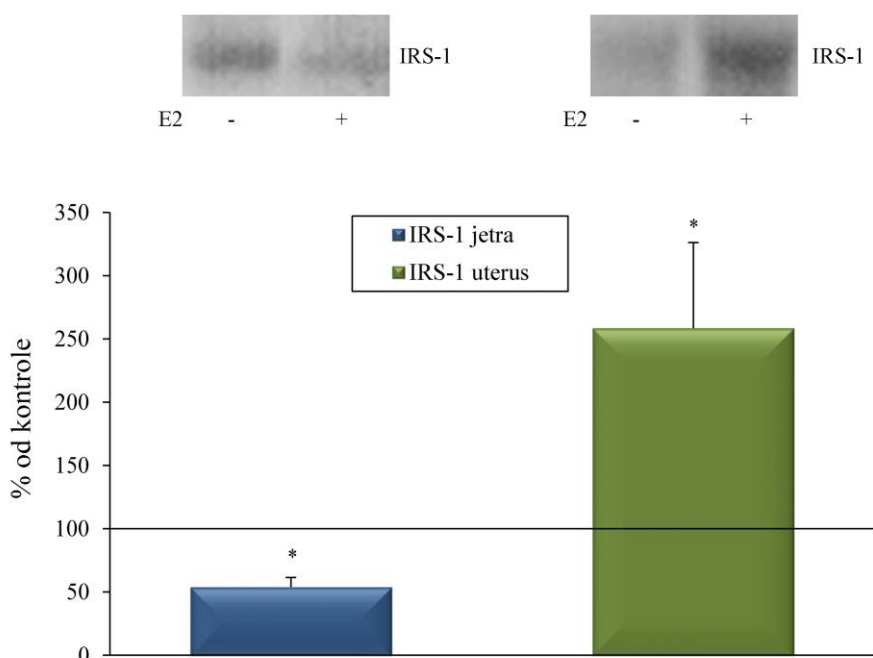
#### 4.4.2 Efekat tretmana estradiolom na supstrate insulinskog receptora u jetri i uterusu

U vezivanju IR i IGF1R za unutarćelijske efekte učestvuju satelitski proteini poznatiji kao supstrati insulinskog receptora (Taniguchi i sar., 2006a). Ovi proteini zajedno sa IR čine prvo kritično čvorište u signalnoj mreži insulina (Taniguchi i sar., 2006a). S obzirom da je estradiolski tretman izazvao promene u fosforilaciji IR u jetri i uterusu, kao i u sadržaju IR u uterusu, dalje je praćen efekat na supstrate IR i to IRS-1, IRS-2 i Shc. Pored proteinskog sadržaja, praćene su promene tirozinske fosforilacije IRS-1 i IRS-2, kao i asocijacija ovih molekula sa p85 subjedinicom PI3K. Tirozinske

fosforilacije IRS-1 i IRS-2, kao i asocijacija ovih molekula sa p85, su praćene u kontekstu insulinskog delovanja korišćenjem metode koimunoprecipitacije u uzorcima životinja koje su primile insulinsku injekciju.

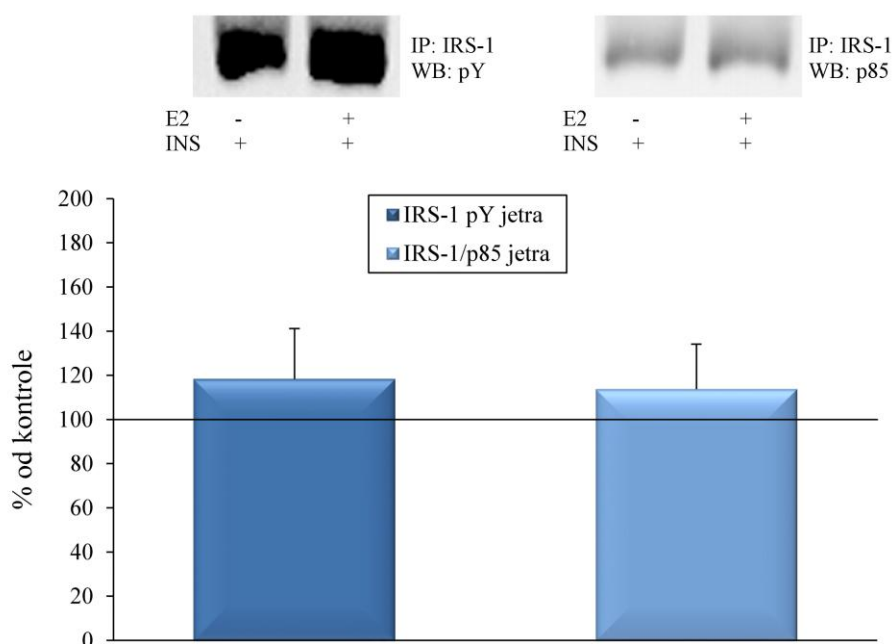
Eksperimentalni podaci pokazuju da su IRS-1 i IRS-2 bogato eksprimirani u jetri i smatra se da su ova dva supstrata skoro ekskluzivno odgovorna za prenos insulinskog signala u jetri (Kubota i sar., 2008). U uterusu je pokazano prisustvo IRS-1 i IRS-2, ali uglavnom u kontekstu prenosa signala IGF-1 (Richards i sar., 1998; Richards i sar., 2001).

Rezultati analize proteinskog sadržaja IRS-1 u uzorcima jetre OVX životinja nakon tretmana estradiolom, pokazuju da estradiol dovodi do značajnog smanjenja količine ovog proteina (46%,  $p < 0,05$ ). Nasuprot efektu u jetri, u uterusu je tretman estradiolom doveo do statistički značajnog povećanja proteinskog sadržaja IRS-1 za 159% ( $p < 0,05$ ) (Slika 12), pri čemu ono prati povećanje sadržaja receptornog proteina (Slika 10).

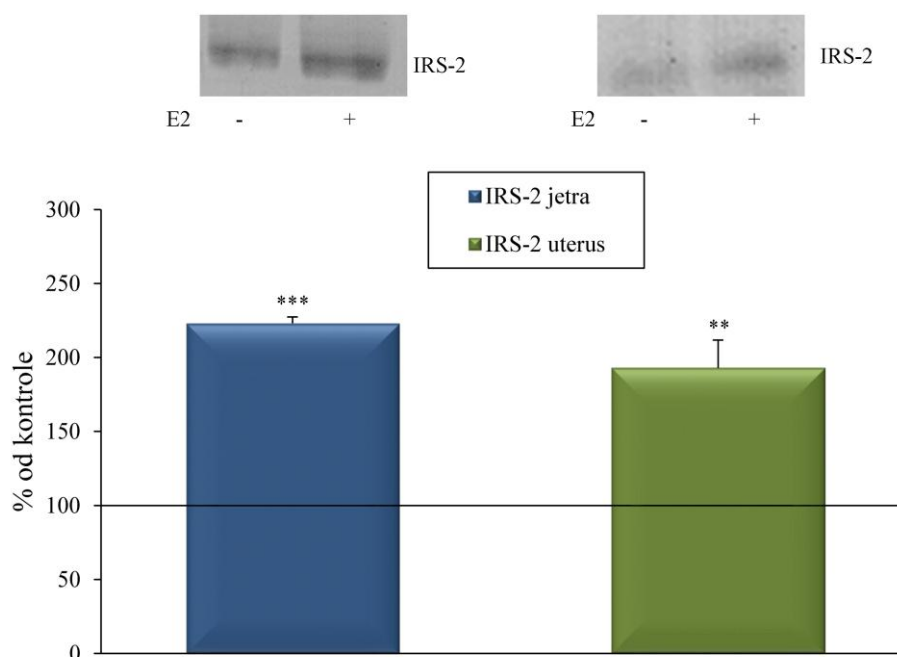


**Slika 12. Efekat estradiola na sadržaj proteina IRS-1 u jetri i uterusu.** Sadržaj proteina IRS-1 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 10. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja IRS-1. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izraženi su kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$

Tirozinska fosforilacija IRS-1 indukovana insulinom, kao i asocijacija sa p85, nije promenjena 6 h nakon injekcije estradiola u jetri (Slika 13), dok u uterusu, što je posebno interesantno, fosforilacija tirozina IRS-1 kao i asocijacija IRS-1 sa p85 nisu detektovane ni kod kontrolnih ni kod estradiolom tretiranih životinja nakon insulinske stimulacije.



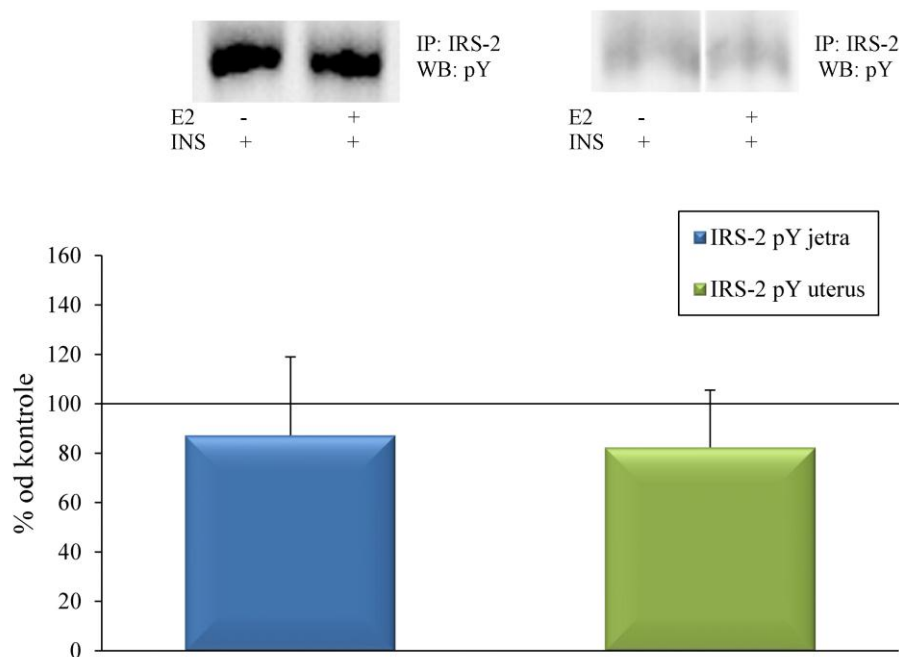
**Slika 13. Efekat estradiola na tirozinsku fosforilaciju IRS-1 i asocijaciju sa p85 u jetri OVX pacova.** Nivo fosforilacije tirozina IRS-1 i asocijacije sa p85 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 11. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata koimunoprecipitacije, predstavljena kao srednja vrednost±S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ .



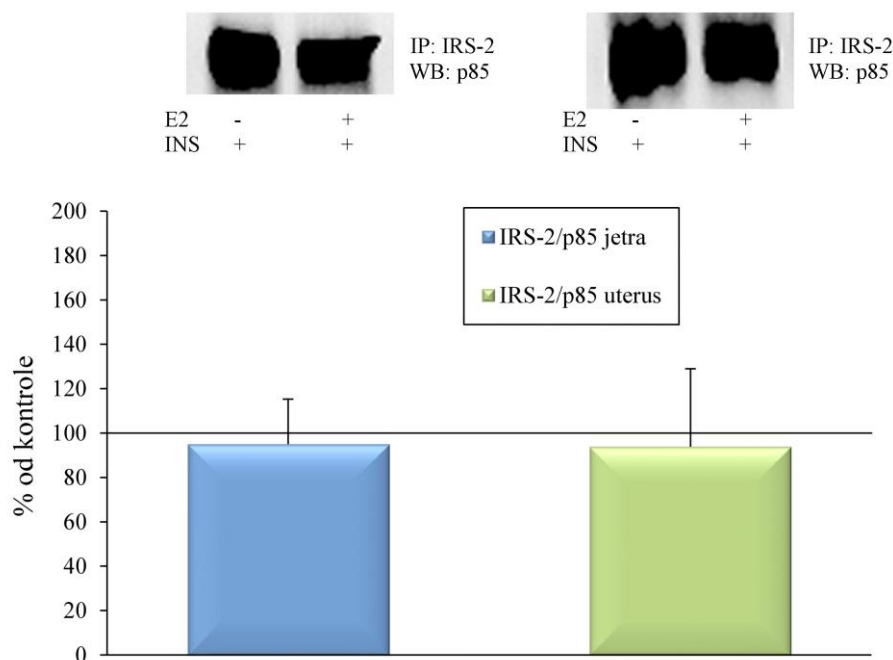
**Slika 14. Efekat estradiola na sadržaj proteina IRS-2 u jetri i uterusu OVX pacova.** Sadržaj proteina IRS-2 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 10. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja IRS-2 predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

U slučaju kada je analiziran sadržaj IRS-2 u uzorcima jetre i uterusa životinja tretiranih estradiolom, pokazano je da estradiol značajno povećava njegov sadržaj u oba analizirana tkiva i to 123% ( $p < 0,001$ ) u jetri i 93% ( $p < 0,01$ ) u uterusu (Slika 14).

Međutim, estradiolski tretman nije značajno promenio tirozinsku fosforilaciju IRS-2 stimulisanu insulinom, kao ni asocijaciju IRS-2 sa p85 subjedinicom PI3K ni u jednom od analiziranih tkiva (Slika 15 i Slika 16).



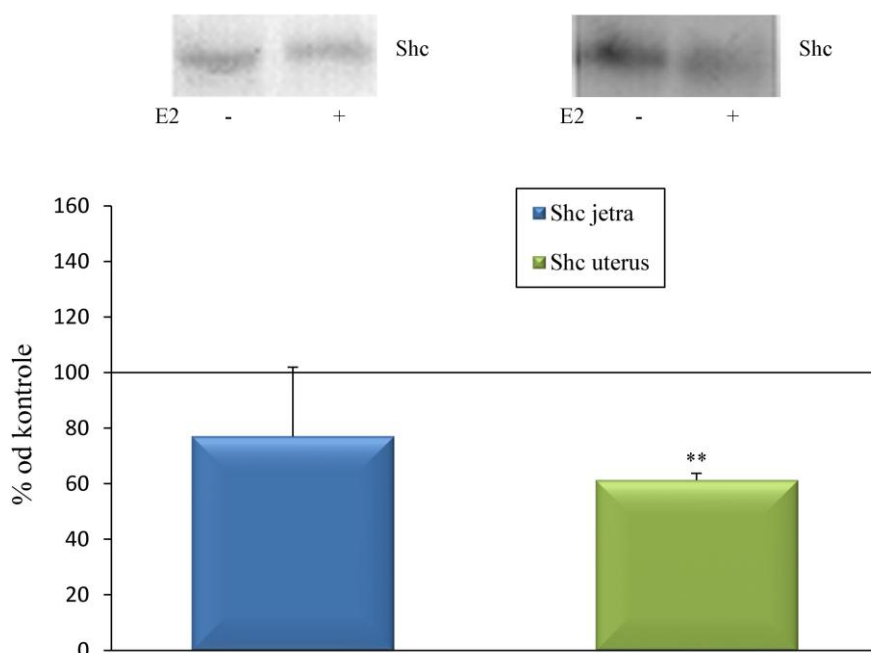
**Slika 15. Efekat estradiola na tirozinsku fosforilaciju IRS-2 u jetri i uterusu OVX pacova.** Nivo fosforilacije tirozina IRS-2 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 11. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata koimunoprecipitacije, predstavljena kao srednja vrednost±S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole.



**Slika 16. Efekat estradiola na asocijaciju IRS-2 sa p85 u jetri i uterusu OVX pacova.** Sadržaj IRS-2 u kompleksu sa p85 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 11. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata koimunoprecipitacije, predstavljena kao srednja vrednost±S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole.

Poznato je da Shc igra kritičnu ulogu u mitogenezi koju indukuje insulin preko regulacije aktivnosti Ras (Sasaoka i Kobayashi, 2000), pa je bilo interesantno ispitati kakav je efekat tretmana estradiolom na početni korak mitogene grane insulinskog signalnog puta.

Dobijeni rezultati analize efekata estradiola pokazuju da je proteinski sadržaj Shc statistički značajno smanjen za 39% ( $p < 0,01$ ) u uterusu životinja tretiranih estradiolom u odnosu na kontrolne. Značajne promene u sadržaju Shc, međutim, nisu zapažene u jetri (Slika 17).



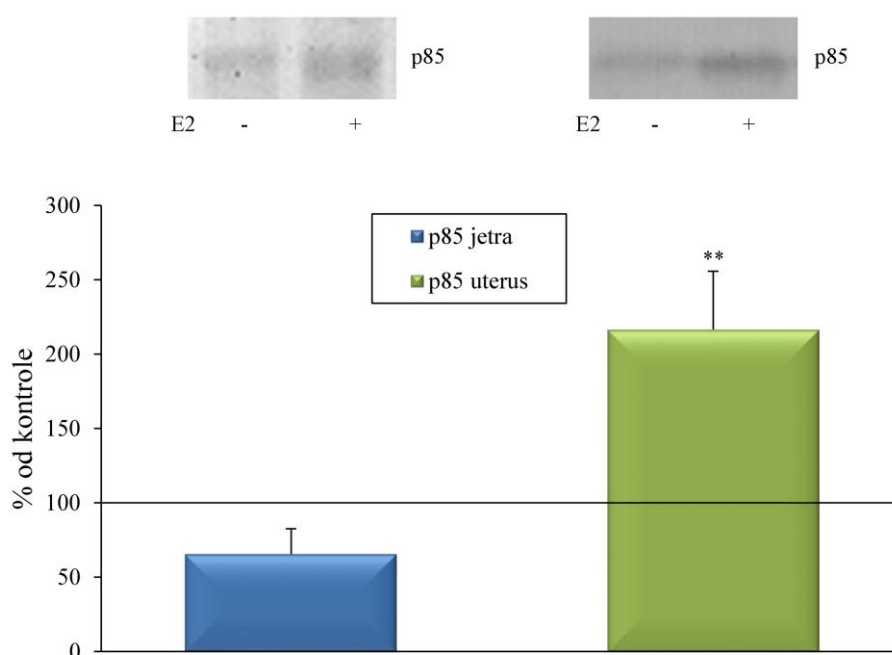
**Slika 17. Efekat estradiola na sadržaj proteina Shc u jetri i uterusu OVX pacova.** Sadržaj proteina Shc je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 10. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja Shc predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$



#### 4.4.3 *Efekat tretmana estradiolom na regulatornu subjedinicu PI3K u jetri i uterusu*

Drugo kritično čvorište u signalnom putu insulina je PI3K, pa je s obzirom na promene uočene na ushodno lociranim molekulima, praćen efekat estradiola na proteinski sadržaj regulatorne subjedinice ovog molekula, p85.

Ranije je pokazano da miševi sa „nokautom“ p85 u jetri imaju metaboličke defekte slične onima koji se javljaju kod LIRKO miševa, što ukazuje na to da PI3K posreduje u većini regulatornih funkcija insulina u jetri (Michael i sar., 2000; Taniguchi i sar., 2006b). S druge strane, u uterusu je pokazano da estradiol pozitivno utiče na interakciju p85 sa IRS proteinima u kontekstu signalnog puta IGF-1, učestvujući tako u prenosu signala za mitogenezu u ovom tkivu (Richards i sar., 1998).



**Slika 18. Efekat estradiola na sadržaj proteina p85 u jetri i uterusu OVX pacova.** Sadržaj proteina p85 je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 10. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja p85 predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$

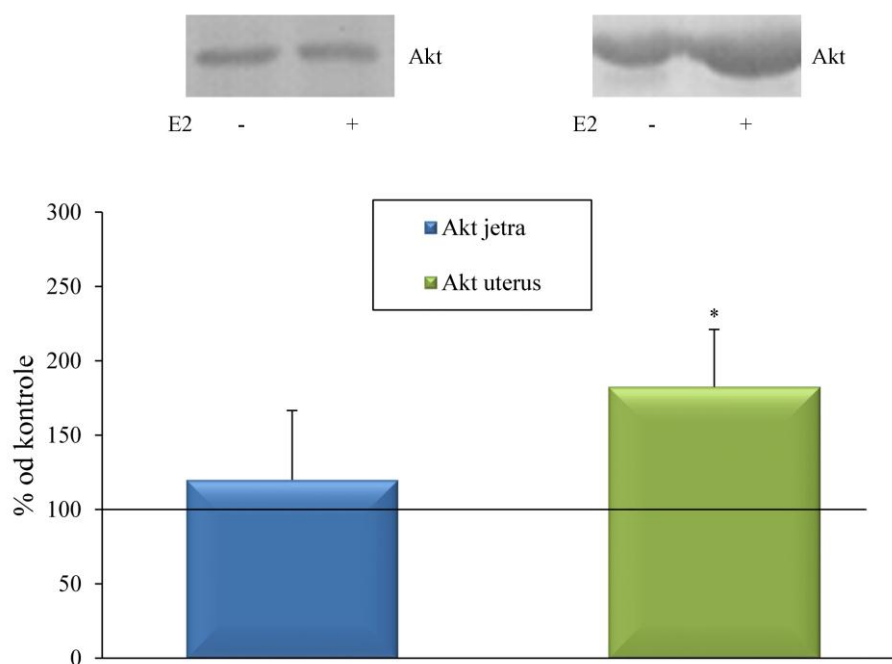
Dobijeni rezultati pokazuju da je, uprkos tome što nakon tretmana estradiolom u uterusu nije bilo promene u asocijaciji IRS-2 i p85, proteinski sadržaj p85 značajno povećan za 116% ( $p < 0.01$ ). U jetri, međutim, nije bilo statistički značajne promene proteinskog sadržaja ovog molekula (Slika 18).

#### ***4.4.4 Efekat tretmana estradiolom na Akt u jetri i uterusu***

Treće kritično čvorište u signalnom putu insulina je Akt/PKB, molekul uključen u ostvarivanje efekata insulina na brojne ćelijske procese, pa je bilo interesantno ispitati efekat estradiolskog tretmana na sadržaj ovog proteina.

Poznato je da je metabolizam glukoze u jetri regulisan PI3K/Akt putem (Taniguchi i sar., 2006b). Akt suprimira glukoneogenezu (Zhang i sar., 2002) i aktivira sintezu glikogena (Cross i sar., 1995). U uterusu pacova je pokazano da je ovaj molekul važan faktor preživljavanja ćelija (Dery i sar., 2003).

Analiza ukupnog ćelijskog sadržaja Akt je pokazala da pod delovanjem estradiola dolazi do povećanja prisustva Akt u uzorcima uterusu (82%,  $p < 0,05$ ), što je u potpunosti u skladu sa povećanjem sadržaja svih ushodnih molekula signalnog puta insulina u ovom tkivu. U jetri, sadržaj ovog proteina nije promenjen 6 h nakon injekcije estradiola (Slika 19).



**Slika 19. Efekat estradiola na sadržaj proteina Akt u jetri i uterusu OVX pacova.** Sadržaj proteina Akt je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 10. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija sadržaja Akt predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \* $p < 0,05$

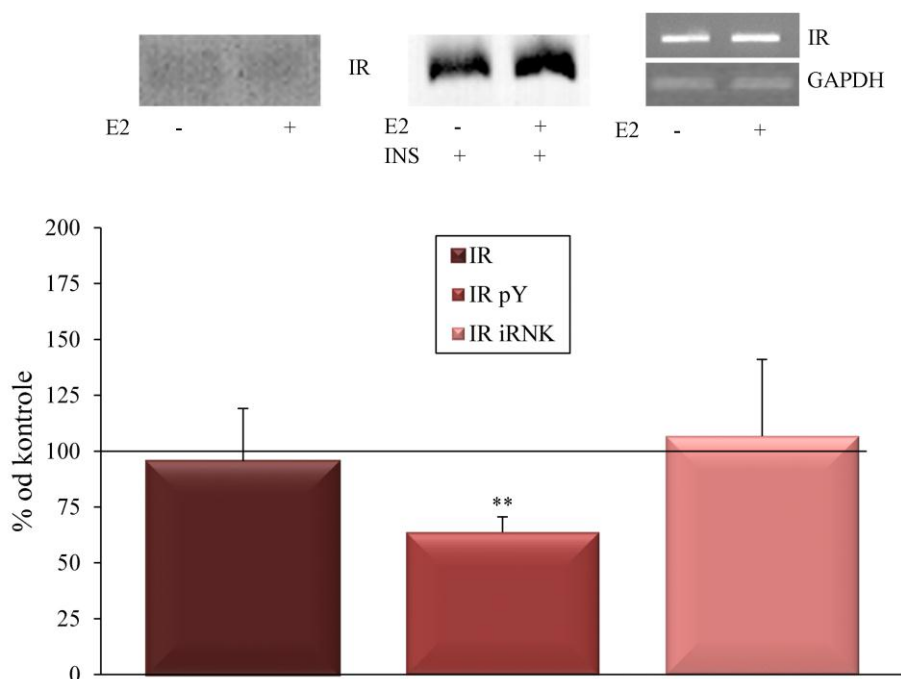
## 4.5 EFEKTI ESTRADIOLA NA MOLEKULE INSULINSKOG SIGNALNOG PUTA U SRCU

S obzirom da je poznato da insulin i estradiol mogu delovati kardioprotektivno, kao i da regulišu iste procese u srcu, bilo je zanimljivo ispitati kakav je uticaj estradiola na početne korake insulinskog signalnog puta u ovom tkivu. Kako bi se izvršila što detaljnija karakterizacija efekata estradiola na insulinske signalne molekule u srcu i dodatno analizirali genomski efekti estradiola, metodologija je proširena analizom relativne ekspresije iRNK signalnih molekula klasičnom PCR metodom.

### 4.5.1 *Efekat tretmana estradiolom na sadržaj proteina, iRNK i tirozinsku fosforilaciju receptora za insulin u srcu*

Istraživanja drugih autora su pokazala da je prenos signala preko IR neophodan za normalno funkcionisanje srca (Laustsen i sar., 2007). Specifična delecija ovog molekula u srcu miševa, dovodi do poremećenog rada srca i smrti ovih životinja (Laustsen i sar., 2007).

Eksperimentalni rezultati dobijeni analizom sadržaja proteina kao i iRNK IR pokazuju da tretman estradiolom ne menja njihov sadržaj u srcu (Slika 20). Međutim, fosforilacija IR indukovana insulinom je statistički značajno smanjena 6 h nakon injekcije estradiola (36%,  $p < 0,01$ ), što ukazuje na smanjenu kinaznu aktivnost receptora. Interesantno je da je slično smanjenje fosforilacije tirozina IR zapaženo u sva tri ispitivana tkiva.



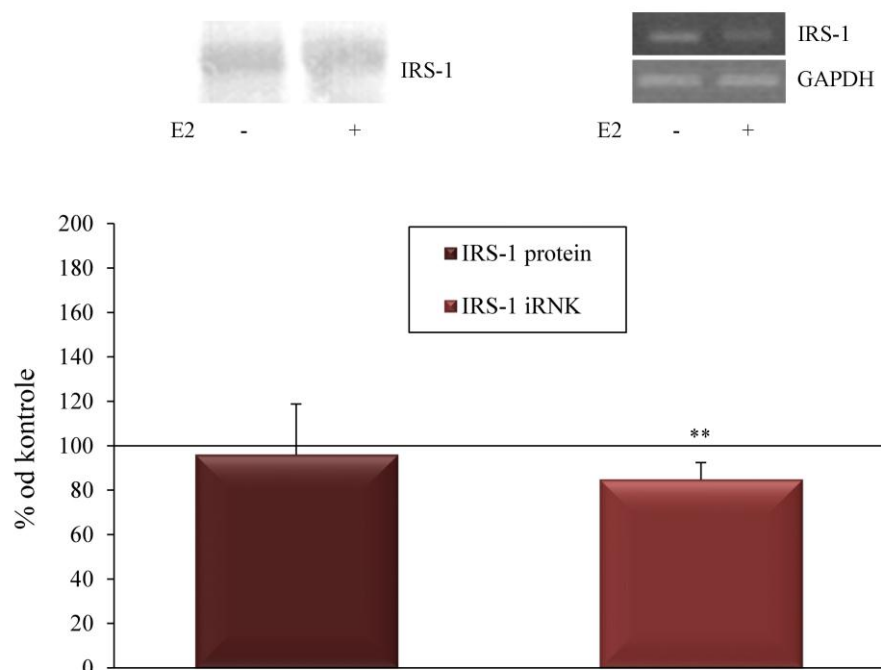
**Slika 20. Efekat estradiola na sadržaj proteina, tirozinsku fosforilaciju i sadržaj iRNK IR u srcu OVX pacova.** OVX pacovi su tretirani estradiolom (20 µg/kg, i.p.) 6 h pre žrtvovanja. Za ispitivanje efekata estradiola na tirozinsku fosforilaciju IR, životinje (i kontrolne i tretirane estradiolom) su dobile injekciju insulina (20 IU/životinji, i.p.) 30 min pre žrtvovanja. Sadržaj proteina je određen „Western blot“ analizom, nivo tirozinske fosforilacije koimunoprecipitacijom, a nivo ekspresije mRNK RT-PCR metodom, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, agarozni gelovi i kvantifikacija rezultata, predstavljena kao srednja vrednost ± S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistička značajnost razlika između dve grupe je određena „one-way ANOVA“ testom, sa graničnom vrednošću  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$

#### 4.5.2 Efekat tretmana estradiolom na supstrate insulinskog receptora u srcu

Istraživanja su pokazala da je odgovor na insulin značajno poremećen u jetri i mišićima miševa sa „nokautom“ IRS-1 (Yamauchi i sar., 1996). Međutim, IRS-1 je samo jedan od supstrata insulinskog receptora, pa se u srcu ovaj nedostatak može kompenzovati prenosom signala preko alternativnih puteva, na primer IRS-2 (Furumoto i sar., 2005).

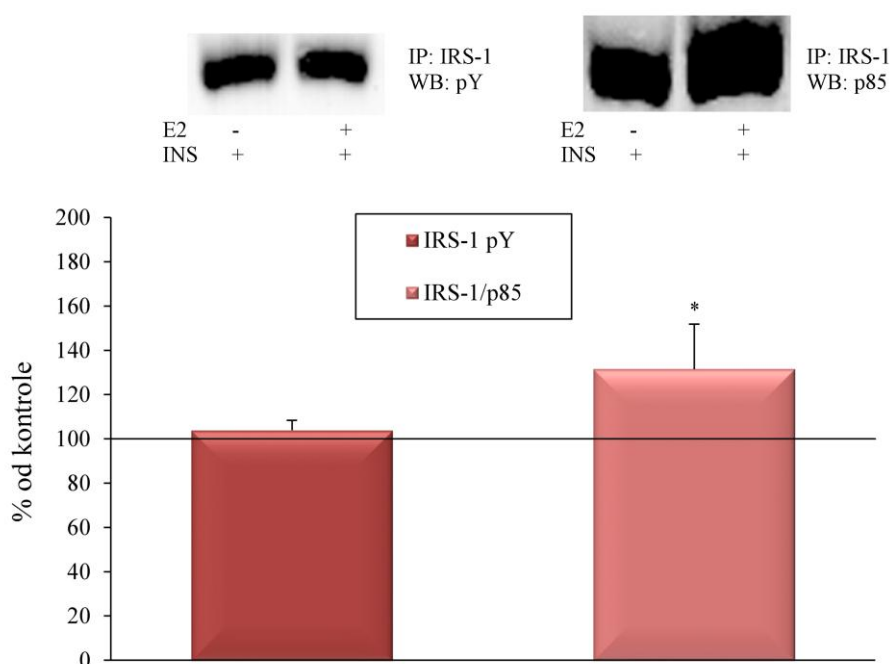
Rezultati dobijeni određivanjem prisustva IRS-1 u srcu OVX ženki pacova pokazuju da estradiolski tretman nije promenio značajno njegov proteinski sadržaj,

međutim, nivo iRNK u ovom tkivu je bio smanjen za 15% ( $p < 0,01$ ) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Slika 21).



**Slika 21. Efekat estradiola na sadržaj proteina i iRNK IRS-1 u srcu OVX pacova.** Sadržaj proteina i iRNK IRS-1 su određeni kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, agarozni gelovi i kvantifikacija rezultata, predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*  $p < 0,01$

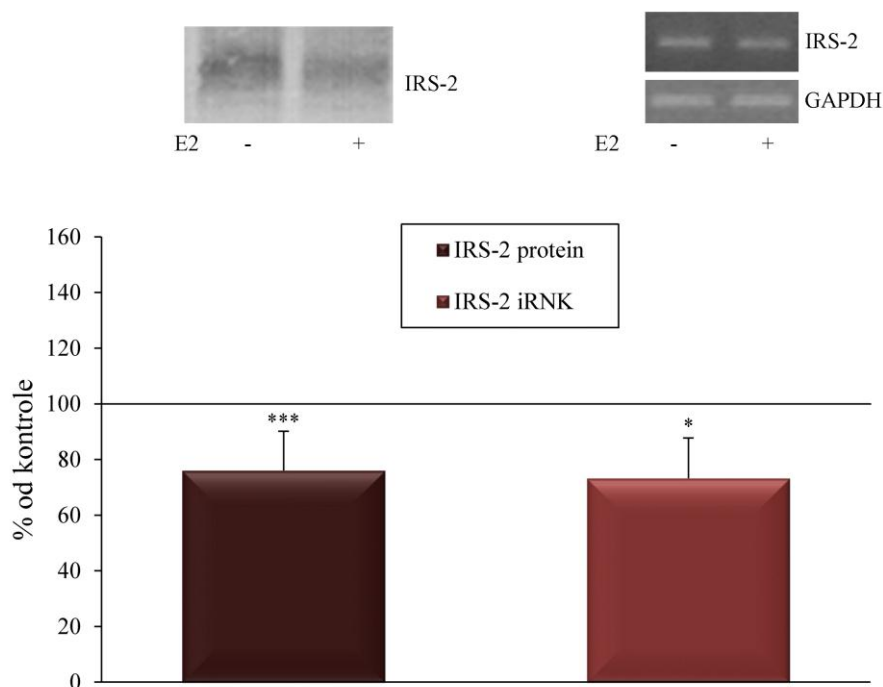
Pored toga, rezultati pokazuju da tirozinska fosforilacija IRS-1 stimulisana insulinom, nije promenjena 6 h nakon tretmana estradiolom, dok je asocijacija IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K povećana za 31% ( $p < 0,05$ ) (Slika 22).



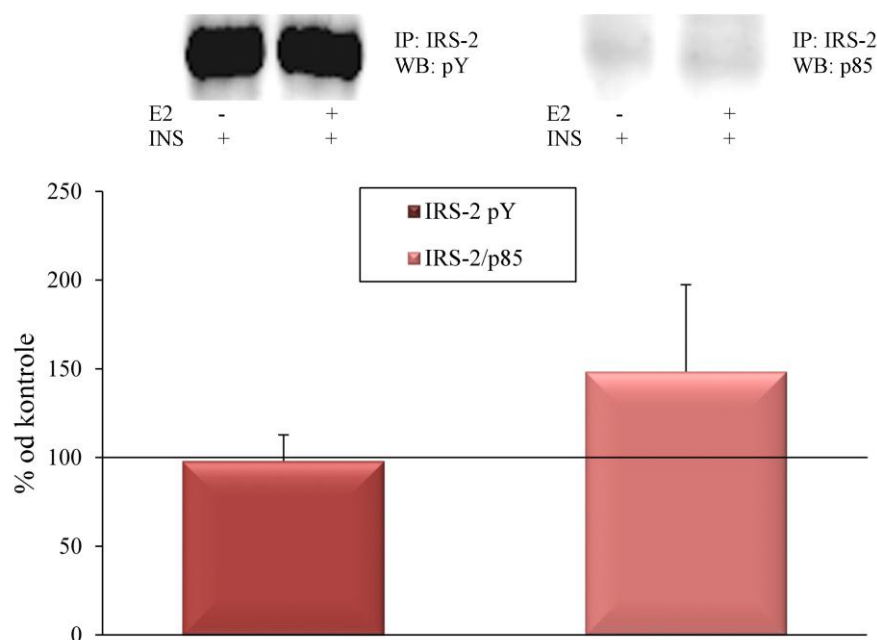
**Slika 22. Efekat estradiola na tirozinsku fosforilaciju i asocijaciju IRS-1 sa p85 u srcu OVX pacova.** Nivo tirozinske fosforilacije IRS-1 i asocijacije sa p85 su određeni koimunoprecipitacijom, kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$

U slučaju kada je vršena analiza proteinskog sadržaja IRS-2 u srcu životinja tretiranih estradiolom, količina ovog proteina je bila smanjena (26%,  $p < 0,001$ ) 6 h nakon tretmana, pri čemu je ovo smanjenje praćeno i smanjenjem količine iRNK (27%,  $p < 0,05$ ) (Slika 23).

Uprkos smanjenju ekspresije IRS-2, tretman estradiolom nije doveo do statistički značajne promene fosforilacije tirozina IRS-2, kao ni asocijacije ovog proteina sa p85 subjedinicom PI3K (Slika 24). Ako se ne uzima u obzir statistička značajnost promena, interesantno je istaći da se sličan profil promena vidi kod IRS-1 u srcu - sadržaj proteina i iRNK je smanjen, a asocijacija sa p85 je povećana.



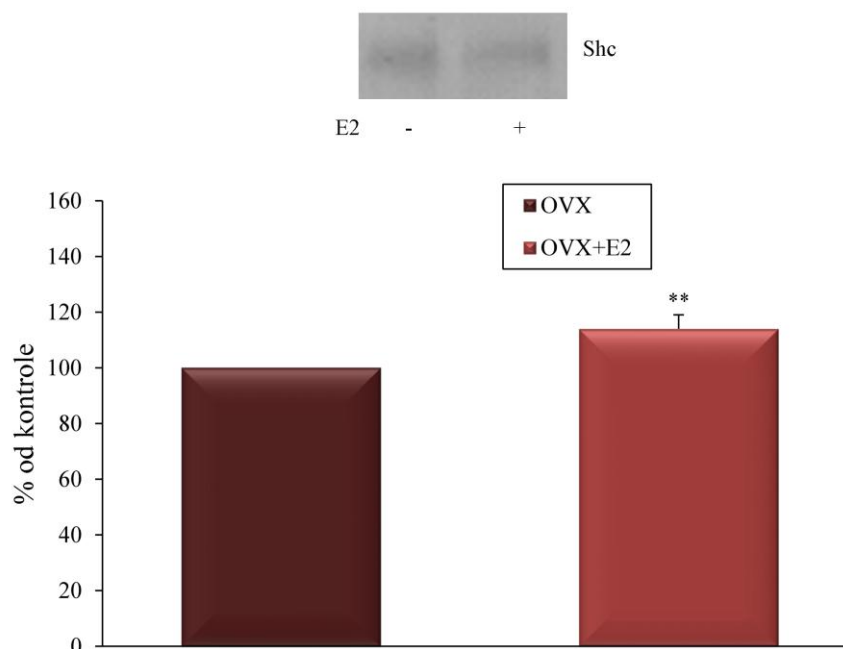
**Slika 23. Efekat estradiola na sadržaj proteina i iRNK IRS-2 u srcu OVX pacova.** Sadržaj proteina i iRNK IRS-2 su određeni kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i agarozni gelovi, i kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$



**Slika 24. Efekat estradiola na tirozinsku fosforilaciju i asocijaciju IRS-2 sa p85 u srcu OVX pacova.** Nivo tirozinske fosforilacije IRS-2 i asocijacije sa p85 su određeni koimunoprecipitacijom, kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole.



Sadržaj proteina Shc, još jednog direktnog supstrata receptora za insulin, je povećan za 14% nakon tretmana estradiolom ( $p < 0,01$ ) (Slika 25).



**Slika 25. Efekat estradiola na sadržaj proteina Shc u srcu OVX pacova.** Sadržaj proteina Shc je određen kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazan je reprezentativni imunoblot i kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\* $p < 0,01$

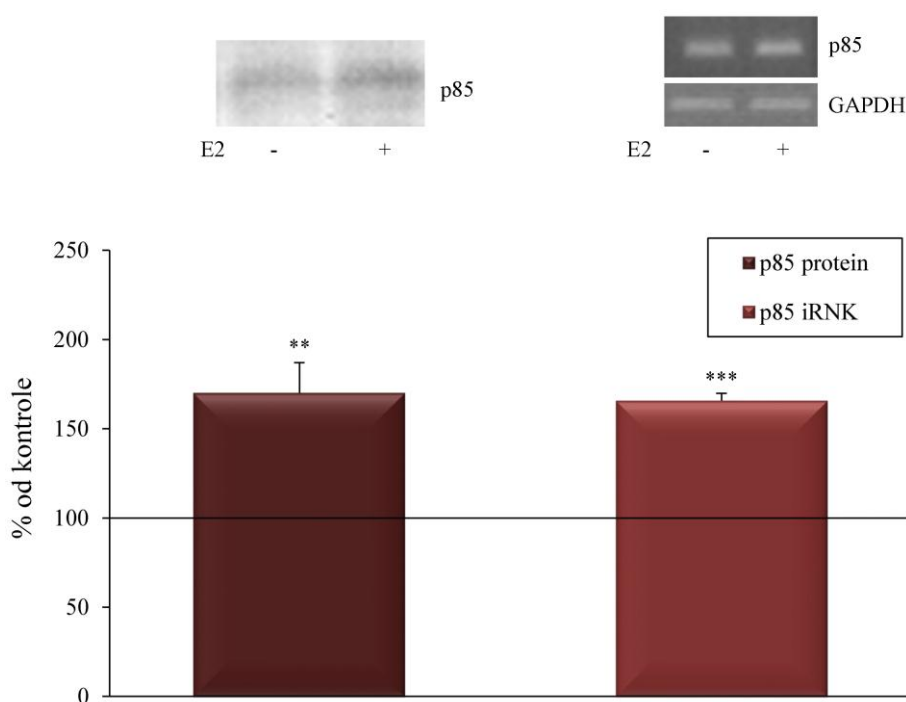
#### 4.5.3 Efekat tretmana estradiolom na put PI3K/Akt u srcu

U mnogim sistemima, aktivacija puta PI3K/Akt obezbeđuje važan stimulus za proliferaciju, rast i opstanak ćelija. U srcu, u kome postoji ograničenje proliferativnog kapaciteta kardiomiocita, ovaj put igra važnu ulogu u regulaciji rasta i opstanka kardiomiocita, sa malim efektom na proliferaciju. Simultano, PI3K i Akt su važni modulatori iskorišćenja metaboličkih supstrata i funkcije kardiomiocita (Matsui i sar., 2003).

Akutna aktivacija puta PI3K/Akt je dovoljna da inhibira apoptozu kardiomiocita (Matsui i sar., 1999). Takođe kod miševa je pokazano da je put PI3K neophodan za promociju rasta srca (Shioi i sar., 2000). Primećeno je da aktivnost PI3K promenjena u

nekim patološkim stanjima, kao što su hipertrofija srca ili srčana insuficijencija i pretpostavlja se da su upravo promene PI3K uključene u progresiju ovih bolesti (Naga Prasad i sar., 2003).

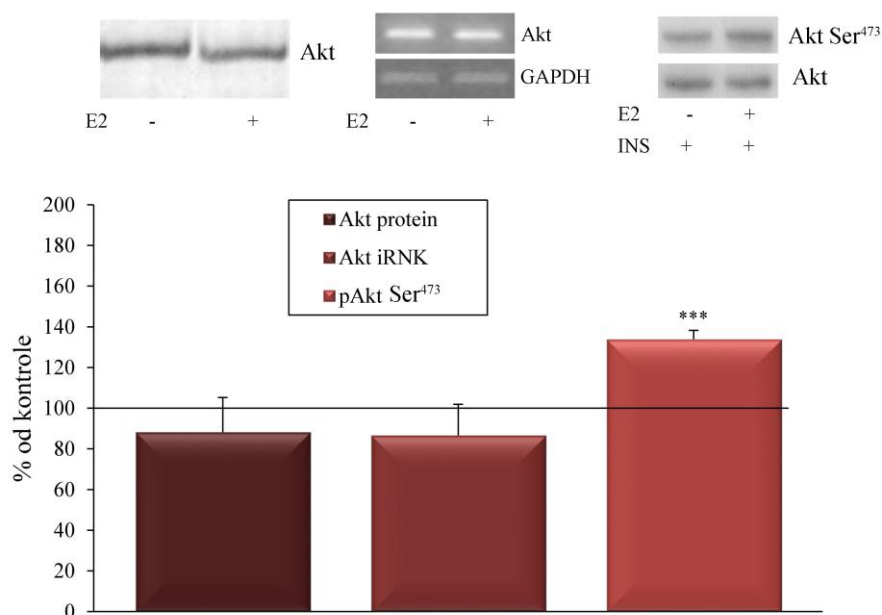
S tim u vezi, dalje analize su se odnosile na određivanje efekata estradiola na sadržaj proteina i iRNK p85 subjednice PI3K u srcu OVX životinja. Rezultati pokazuju da je, u skladu sa povećanom asocijacijom IRS-1 sa p85 u srcu, sadržaj proteina p85 povećan za 70% ( $p < 0,01$ ) pod delovanjem estradiola, što je praćeno značajnim povećanjem iRNK za 65% ( $p < 0,001$ ) (Slika 26).



**Slika 26. Efekat estradiola na sadržaj proteina i iRNK p85 u srcu OVX pacova.** Sadržaj proteina i iRNK p85 su određeni kao što je dato u opisu uz Sliku 20. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i agarozni gelovi, i kvantifikacija rezultata predstavljena kao srednja vrednost ± S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Istraživanja drugih autora su pokazala da Akt ima veoma važnu ulogu u homeostazi i funkciji kardiomiocita, kao i da je ovaj molekul važan medijator fiziološke hipertrofije srca (Latronico i sar., 2004). S obzirom na važnost Akt u prenosu signala i insulina i estradiola u srcu, pored sadržaja proteina i iRNK praćen je efekat estradiola na insulinom stimulisanu fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> koja je neophodna za aktivaciju kinaze.

Sadržaj proteina i iRNK Akt se nije promenio 6 h nakon tretmana estradiolom. Međutim, insulinom indukovana fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> (rezultat prikazan kao odnos pAkt/totAkt) je u srcu povećana za 34% (p<0,001) (Slika 27).



**Slika 27. Efekat estradiola na sadržaj proteina, fosforilaciju na Ser<sup>473</sup> i sadržaj iRNK Akt u srcu OVX pacova.** OVX pacovi su tretirani estradiolom (20 µg/kg, i.p.) 6 h pre žrtvovanja. Za ispitivanje efekata estradiola na fosforilaciju Akt (Ser<sup>473</sup>) životinje (i kontrolne i tretirane estradiolom) su dobile injekciju insulina (20 IU/životinji, i.p.) 30 min pre žrtvovanja. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, agarozni gelovi i kvantifikacija rezultata, predstavljena kao srednja vrednost ± S.D. i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole. \*\*\* p<0,001

## 5. DISKUSIJA

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su proistekli iz izučavanja efekata estradiola na početne molekule signalnog puta insulina u jetri, uterusu i srcu. Iako postoje jasni dokazi o vezi između estrogena i insulinske senzitivnosti, relativno malo studija se bavilo molekularnom osnovom ove veze. S obzirom da je insulinska rezistencija jedan od uzroka patologija vezanih za starenje žena, kao što su dijabetes tip 2 i kardiovaskularne bolesti, istraživanja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi ove veze bi mogla imati dugoročne terapijske posledice.

Dijabetes tip 2 se smatra jednom od najvećih pretnji za svetsko zdravlje, koja počinje da dobija proporcije epidemije u industrijalizovanim zemljama. Sve je više dokaza da moderna ishrana i sedentarni način života progresivno vode akumulaciji zasićenih masnih kiselina u neadipoznom tkivu (McGarry, 2002). Metabolizam ovih ektopičnih masnih kiselina vodi smanjenom insulinom stimulisanom ulasku glukoze u skeletne mišiće, nesuprimiranoj produkciji glukoze u jetri i promenama u oslobađanju insulina iz  $\beta$  ćelija pankreasa koje stimuliše glukoza (McGarry, 2002). Kada se javi dijabetes, zajedničkim delovanjem hiperglikemije i povišenih slobodnih masnih kiselina dolazi do opšteg oksidativnog stresa u tkivima, čime se dodatno pooštrava insulinska rezistencija i deficijencija, što na kraju dovodi do apoptoze  $\beta$  ćelija pankreasa (Evans i sar., 2003). Potrebni su novi tretmani koji bi sprečili ove skokove masnih kiselina kao i oksidativni stres u  $\beta$  ćelijama pankreasa (Louet i sar., 2004).

Jedan aspekt regulacije glukoze i lipidne homeostaze koji obećava, ali nije još uvek dovoljno istražen, uključuje protektivnu ulogu  $17\beta$ -estradiola na energetski metabolizam (Louet i sar., 2004). Naime, primećeno je da kod zdravih ljudi postoji seksualni dimorfizam u odnosu na dijabetes. Dva kritična faktora koja regulišu glukoznu homeostazu su skeletni mišići, koji su glavno mesto odlaganja glukoze u celom organizmu i adipozno tkivo, koje oslobađa u cirkulaciju različite modulatore insulinskog delovanja, kao što su adipocitokini i slobodne masne kiseline. Normalne žene imaju samo dve trećine mase skeletnih mišića i duplo veću masu adipoznog tkiva u odnosu na muškarce, što su dva faktora koja vode insulinskoj rezistenciji, međutim, učestalost dijabetesa ostaje jednaka između polova sve do menopauze (Louet i sar., 2004). Drugim

rečima, izgleda da su žene pre menopauze zaštićenije od insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 u poređenju sa muškarcima.

Eksperimentalni podaci idu u prilog tezi da je deficijencija estrogena (zbog ovarijektomije ili menopauze) povezana sa relativno malim smanjenjem glukoze tolerancije i povećanjem insulinske rezistencije, što se gubi fiziološkom supstitucijom estrogena. Međutim, višak estrogena, kao u terapiji oralnim kontraceptivima ili HRT sa potentnim alkilovanim estrogenima ili visokim dozama prirodnih estrogena, je takođe povezan sa smanjenjem glukoze tolerancije i insulinskom rezistencijom (Godsland i sar., 1990; Margolis i sar., 2004). Klasičan efekat oralnih kontraceptiva i supstitucione terapije estrogenom je smanjenje bazalnog nivoa glukoze u plazmi, dok bazalni nivo insulina u plazmi nije promenjen ili je redukovan (Godsland, 2005).

Tretman estradiolom u ovoj studiji je značajno povećao težinu uterusa (Slika 6), što je u skladu sa istraživanjima drugih autora, koja ukazuju da estradiol učestvuje u hipertrofiji uterusa (Ruzycky, 1996). Iz eksperimenata sa ovarijektomisanim miševima je poznato da se prvi „talas“ odgovora uterusa na estradiol dešava u toku prvih 6 h i da između ostalog obuhvata i imbibiciju vode, ekspresiju nekih gena (c-fos) i sintezu lipida i proteina (Couse i sar., 2006), pa je i povećanje težine uterusa u ovoj studiji 6 h nakon tretmana estradiolom u skladu sa ovim rezultatima. Pored toga, tretman insulinom je kod svih tretiranih životinja doveo do povećanja težine uterusa, pri čemu je promena izraženija kod pacova koji su pretretirani estradiolom (Slika 6).

Analizom rezultata dobijenih merenjem koncentracije insulina i glukoze u plazmi primećuje se blaga hiperinsulinemija i hiperglikemija kod kontrolnih (OVX) životinja u odnosu na literaturne podatke dobijene za neoperisane ili sham operisane ženke, koje estradiolski tretman nije uspeo da promeni (Slika 7 i Slika 8). Literaturni podaci pokazuju velike razlike u pogledu efekata ovarijektomije na koncentraciju glukoze i insulina u plazmi. U eksperimentima Liu i sar. (Liu i sar., 2004) bazalni nivo glukoze je povećan nakon ovarijektomije, kao i nivo insulina, a tretman estradiolom je koncentracije ovih parametara spustio ispod kontrolnih. Song i sar. (Song i sar., 2005a) nisu uočili promene u bazalnom nivou glukoze i insulina nakon ovarijektomije, a Barros i sar. (Barros i sar., 2008) su čak detektovali smanjenje nivoa insulina u plazmi tri nedelje nakon ovarijektomije, koje je estradiol vratio na nivo kontrolnih vrednosti. Ovako raznoliki rezultati su verovatno posledica različitog trajanja perioda između ovarijektomije i merenja, kao i različitih doza estradiola, načina aplikovanja i dužine trajanja hormonskog tretmana. Nedostatak efekta estradiola na nivoe glukoze i insulina u ovoj studiji je

verovatno vezan za vreme davanja injekcije estradiola, koje je optimizovano tako da se vide najveće promene u sadržaju i funkciji signalnih molekula insulina (Richards i sar., 1996; Richards i sar., 1998; Richards i sar., 2001). Možda estradiol nakon 6 h nije stigao da vrati efekat ovarijektomije, međutim, moguće je i da je 6 h suviše dugo vreme, tj. da su efekti estradiola na koncentraciju insulina i glukoze u krvi oslabili sa prolaskom vremena i da su se, nakon 6 h, već vratili na kontrolne (OVX) vrednosti.

I gojaznost i dijabetes tip 2 su povezani sa insulinskom rezistencijom (Kahn i sar., 2006). Međutim, kod većine gojaznih, insulin rezistentnih osoba, ne dolazi do razvoja hiperglikemije jer  $\beta$  ćelije pankreasa povećavaju oslobađanje insulina dovoljno da prevaziđu redukovanu efikasnost insulinskog delovanja, i na taj način održavaju normalnu glukoznu toleranciju (Kahn i sar., 1993). Da bi se gojaznost i insulinska rezistencija povezale sa dijabetesom tipa 2, mora da dođe do poremećaja u funkciji  $\beta$  ćelija tako da one više ne budu sposobne da kompenzuju smanjenu insulinsku senzitivnost (Kahn, 2001). FFA indukuju i insulinsku rezistenciju i poremećenu funkciju  $\beta$  ćelija, što ih čini jednim od glavnih krivaca za razvoj dijabetesa (Kahn i sar., 2006). Pokazano je da osobe obolele od dijabetesa imaju povišen nivo FFA (Bergman i Ader, 2000). Takođe, pokazano je da je povećana visceralna adipoznost važan faktor rizika za razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa, jer su ovi adipociti posebno rezistentni na antilipolitičko delovanje insulina, i mogu da oslobode FFA u portalnu venu, čime izlažu jetru visokim koncentracijama FFA (Bergman i Ader, 2000). Pretpostavlja se da same FFA učestvuju u defektima različitih organa koji prethode dijabetesu tip 2: insulinskoj rezistenciji skeletnih mišića, redukovanoj sekreciji insulina, povećanoj produkciji glukoze u jetri i redukovanom klirensu insulina u jetri (Bergman i Ader, 2000). Povišene FFA mogu da povećaju akumulaciju masti u mišićima, jetri i/ili  $\beta$  ćelijama, a akumulirani trigliceridi obezbeđuju lipidno okruženje koje može da ometa metabolički signaling u ovim tkivima (Bergman i Ader, 2000).

Uprkos nedostatku efekta na koncentraciju glukoze i insulina u plazmi, estradiolski tretman je doveo do značajnog smanjenja nivoa slobodnih masnih kiselina (Slika 9). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da estradiol smanjuje lipolizu u adipocitima (Jensen i sar., 1994). Naime, mereno je oslobađanje FFA iz adipoznog tkiva kod žena u menopauzi i pokazano je da je tretman fiziološkim dozama estradiola statistički značajno smanjio fluks FFA u odnosu na netretirane kontrole (Jensen i sar., 1994).

Dobijeno smanjenje koncentracije slobodnih masnih kiselina potvrđuje tezu da fiziološke koncentracije estradiola imaju antidijabetogeno dejstvo. Takođe ovaj rezultat u kombinaciji sa rezultatima dobijenim merenjem koncentracije glukoze i insulina u plazmi, ukazuje na to da je glavni medijator efekata estradiola na signalni put insulina upravo metabolizam lipida. Slično zapažanje su izneli i drugi autori koji su pokazali da bi mogući mehanizam insulinske rezistencije kod gojaznih (*ob/ob*) i ERKO miševa mogao uključiti promenjeni metabolizam lipida u jetri (Bryzgalova i sar., 2006). Naime, tretman *ob/ob* miševa estradiolom je doveo do smanjenog nivoa ekspresije lipogenih gena u jetri kao što su FAS (eng. *fatty-acid synthase*) i SCD1 (eng. *stearoyl-CoA desaturase*), paralelno sa poboljšanjem insulinske senzitivnosti u jetri (Gao i sar., 2006). Sa druge strane, kod ERKO miševa je primećena povišena ekspresija SCD1 u jetri, što je praćeno izraženom insulinskom rezistencijom u ovom tkivu (Bryzgalova i sar., 2006). Pretpostavlja se da su ovi efekti estradiola uglavnom posredovani negativnom regulacijom transkripcionog faktora SREBP1c (eng. *sterol regulatory element-binding protein*) i njegovih nishodno regulisanih lipogeničkih gena, kao što su FAS i SCD1 u jetri (Bryzgalova i sar., 2008).

Insulinska injekcija 30 minuta pre žrtvovanja je takođe smanjila nivo slobodnih masnih kiselina u plazmi u svim grupama u poređenju sa ovarijektomisanom kontrolom (Slika 9). Ranija istraživanja su pokazala da je metabolizam FFA veoma osetljiv na insulin, odnosno da male promene u koncentraciji insulina imaju krupne efekte na koncentraciju FFA u cirkulaciji (Swislocki i sar., 1987), pa je ovaj rezultat očekivan. Interesantno je da je efekat najveći u grupi koja je primila oba hormona (Slika 9), što ukazuje na sinergističko delovanje ova dva hormona u regulaciji koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi.

U eksperimentu na 3T3 L1 adipocitima pokazano je da je ulazak glukoze u ćelije indukovano insulinom pojačan tretmanom fiziološkom koncentracijom estradiola, dok ga je visoka koncentracija estradiola inhibirala (Nagira i sar., 2006). Ovi rezultati su u skladu sa kliničkim ispitivanjima koja pokazuju da je učestalost dijabetesa tipa 2 povećana kod žena nakon menopauze (Hernandez-Ono i sar., 2002), dok se kod žena u kasnoj trudnoći, kada su estrogene izrazito visoke, javlja insulinska rezistencija (Friedman i sar., 1999). Može se reći da je regulacija metabolizma glukoze estrogenima dozno-specifična (Nagira i sar., 2006). Drugim rečima, potrebna je određena koncentracija estrogena za održavanje insulinske senzitivnosti, dok veoma niske i veoma visoke koncentracije vode smanjenju insulinske senzitivnosti (Muraki i sar., 2006).

## 5.1 EFEKTI ESTRADIOLA NA INSULINSKI RECEPTOR U JETRI, UTERUSU I SRCU

Insulinski receptor je odgovoran za prenos insulinskog signala u ciljne ćelije, čime inicira širok spektar ćelijskih insulinskih efekata (Withers i White, 2000). Eksperimenti Gonzalez i sar. (Gonzalez i sar., 2002a) su pokazali da estradiol ima važnu ulogu u kontroli insulinske signalne kaskade na nivou insulinskog receptora, delujući na ekspresiju gena za IR, na količinu receptora na membrani i na nivo fosforilacije ovog proteina. Ovaj efekat je tkivno, dozno i vremenski zavisian (Gonzalez i sar., 2002a; Gonzalez i sar., 2002b). Rezultati istraživanja ove grupe su takođe pokazali da je nivo proteina i iRNK IR u jetri povećan kada su ovarijektomisane životinje tretirane niskim dozama estradiola (Gonzalez i sar., 2002a). Međutim, tirozinska fosforilacija IR u jetri je redukovana 16. dana tretmana (Gonzalez i sar., 2002a). S druge strane, u eksperimentima na hepatocitima, nije bilo efekta estradiolskog tretmana na ekspresiju IR (Xie i sar., 2003).

U ovoj studiji tretman estradiolom nije doveo do statistički značajne promene količine proteina IR u jetri (Slika 10). Razlike u rezultatima između ove studije i studije Gonzalez i sar. (Gonzalez i sar., 2002a) verovatno potiču od različitih doza estradiola kao i načina aplikacije ovog hormona. Naime, Gonzalez i sar. su u svojim eksperimentima koristili doze koje su više ili niže od doza korišćenih u ovoj studiji, a tretmani su bili višekratni i trajali su više od dve nedelje (Gonzalez i sar., 2002a; Gonzalez i sar., 2002b). Za razliku od ekspresije proteina IR, tirozinska fosforilacija IR u jetri je statistički značajno smanjena (Slika 11), što je u skladu sa rezultatima Gonzalez i sar. (Gonzalez i sar., 2002a).

Za razliku od jetre, u uterusu je tretman estradiolom doveo do statistički značajnog povećanja količine proteina IR (Slika 10). Ovo povećanje bi moglo biti posledica transkripcione kontrole gena za IR estradiolom, pošto je pokazano da promotor gena za IR u humanim U-937 promonocitima, sadrži ERE (Garcia-Arencibia i sar., 2005a).

U srcu, kao i u jetri, tretman estradiolom nije promenio količinu proteina IR niti ekspresiju iRNK (Slika 20). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatom drugih autora (Liu i sar., 2005), koji su pokazali da hroničan tretman estradiolom nije promenio ekspresiju iRNK u miokardu pacova.



Zanimljivo je da je uprkos različitom efektu na proteinski sadržaj IR, tretman estradiolom u sva tri tkiva statistički značajno smanjio tirozinsku fosforilaciju IR indukovanu insulinom (Slika 11 i Slika 20). Eksperimenti Takeda-Matsubara i sar. (Takeda-Matsubara i sar., 2002) su pokazali da estradiol aktivira fosfataze u VSMC pacova, pa bi to moglo objasniti smanjenje fosforilacije IR pod delovanjem estradiola.

## **5.2 EFEKTI ESTRADIOLA NA SUPSTRATE INSULINSKOG RECEPTORA U JETRI, UTERUSU I SRCU**

Od svih molekula insulinskog signalnog puta, najviše je proučavano delovanje estradiola na IRS-1, ali su ova istraživanja uglavnom bila u kontekstu unakrsnih efekata estradiola i IGF-I (Richards i sar., 1996; Richards i sar., 1998; Richards i sar., 2001). Poremećena ekspresija IRS molekula se dovodi u vezu sa patogenezom dijabetesa, ali i razvojem drugih bolesti, kao što su kancer dojke, pankreasa i jetre (Morelli i sar., 2003). Međutim, mehanizmi koji kontrolišu količinu ovih molekula u ćeliji su samo delimično poznati (Morelli i sar., 2003). Istraživanja su ukazala na to da je ekspresija IRS-1 i IRS-2 razvojno regulisana, da zavisi od ćelijskog konteksta i da može da uključi transkripcione i posttranskripcione događaje (Giovannone i sar., 2000). Lee i sar. su pokazali da estradiol u ćelijama kancera dojke transkripcionim mehanizmom povećava ekspresiju iRNK IRS-1 i IRS-2, dok antiestrogeni blokiraju ovaj efekat (Lee i sar., 1999). Pored transkripcione kontrole, količina IRS proteina u ćeliji je regulisana posttranskripcionim mehanizmima, posebno onima koji kontrolišu obradu proteina (Morelli i sar., 2003).

Put ubikvitin-proteazom je glavni sistem u eukariotskim ćelijama za selektivnu degradaciju kratkoživećih regulatornih proteina (Haas i Siepmann, 1997). Zajednička odlika proteinskih degradacija u kojima učestvuje proteazom, je kovalentno vezivanje proteina ubikvitina za lizinske ostatke proteina koji su određeni za degradaciju, što je praćeno formiranjem poli-ubikvitinskih lanaca, koji su kovalentno vezani za ciljni protein (Nawaz i sar., 1999). Proteine koji su vezani za ubikvitin prepoznaje i degradira multisubjedinični proteazni kompleks 26S proteazom (Ciechanover i Schwartz, 1994). U 3T3-L1 adipocitima, hronično izlaganje insulinu je povećalo serin/treonin fosforilaciju IRS-1 i rezultovalo degradacijom IRS-1 preko 26S proteazoma (Pederson i sar., 2001). Takođe, opisana je i degradacija IRS-2 preko 26S proteazoma u ćelijama uterusa miša

(Richards i sar., 2001). Morelli i sar. su pokazali da prisustvo ER $\alpha$  inhibira ubikvitinaciju IRS-1 i IRS-2, a samim tim i degradaciju ovih proteina (Morelli i sar., 2003). S druge strane, poznato je da, u prisustvu estradiola, sam ER $\alpha$  postaje target za degradaciju (Nawaz i sar., 1999). Drugim rečima, estradiol bi mogao imati posredni efekat na degradaciju IRS-1 i IRS-2 preko regulacije degradacije sopstvenog receptora.

Ranija istraživanja su pokazala da niske doze estradiola podižu nivo tirozinske fosforilacije IRS-1 u jetri ovarijektomisanih pacova (Gonzalez i sar., 2003). Suprotno tome, farmakološka doza estradiola u istom eksperimentu je dovela do smanjenja ekspresije i fosforilacije IRS-1 proteina u jetri i adipoznom tkivu (Gonzalez i sar., 2003). U eksperimentima na HepG2 ćelijama, različite doze estradiola su povećale sadržaj iRNK i proteina IRS-1 (Xie i sar., 2003).

U ovoj studiji, tretman estradiolom je statistički značajno smanjio sadržaj proteina IRS-1 u jetri, što je u suprotnosti sa literaturnim podacima (Slika 12). Moguće je da je ovo smanjenje posledica razlika u dozi ili vremenu davanja estradiola.

Suprotno od jetre, u uterusu je došlo do statistički značajnog povećanja sadržaja proteina IRS-1 (Slika 12). Ovo povećanje proteinskog sadržaja IRS-1 bi moglo biti posledica delovanja estradiola na nivou gena jer je pokazano da promotor gena za IRS-1 sadrži ERE (Panno i sar., 2006). Smanjena ubikvitinacija IRS-1 bi takođe mogla doprineti povećanju sadržaja ovog molekula u uterusu (Morelli i sar., 2003). Interesantno je da u ovom radu, fosforilacija IRS-1 i asocijacija sa p85 subjedinicom PI3K, nakon pretretmana insulinom, nisu detektovane u uzorcima uterusu, što sugeriše da insulin u uterusu pacova možda ne deluje preko IRS-1, već alternativnim putevima.

Literaturni podaci pokazuju da dugotrajan tretman estradiolom indukuje ekspresiju IRS-1 u miokardu pacova (Liu i sar., 2005). Međutim, u ovoj studiji nije došlo do promene sadržaja proteina IRS-1, kao ni promene tirozinske fosforilacije ovog proteina u srcu, 6 sati nakon tretmana estradiolom, a sadržaj iRNK je čak statistički značajno smanjen (Slika 21 i Slika 22). Doduše, tretman estradiolom je doveo do statistički značajnog povećanja asocijacije IRS-1 sa p85, što je verovatno u vezi sa povećanjem sadržaja p85 u srcu pod delovanjem estradiola (Slika 22).

Eksperimenti drugih autora (Richards i sar., 1998; Richards i sar., 2001) su u uterusu pokazali smanjenje sadržaja proteina i iRNK IRS-2 nakon tretmana estradiolom. Međutim, u ovoj studiji sadržaj IRS-2 u jetri i uterusu je povećan, bez promene tirozinske fosforilacije i asocijacije sa p85 (Slika 14, Slika 15 i Slika 16), što može biti posledica smanjene degradacije ovog molekula pod delovanjem estradiola (Morelli i sar., 2003).

Suprotno efektu u jetri i uterusu, u srcu je došlo do statistički značajnog smanjenja kako sadržaja proteina IRS-2, tako i sadržaja iRNK (Slika 23).

Odsustvo promena u tirozinskoj fosforilaciji IRS, kao u asocijaciji sa p85 može biti posledica delovanja tirozinskih fosfataza koje estradiol indukuje (Takeda-Matsubara i sar., 2002).

Dosta su ispitivani mehanizmi koji čine funkcionalne razlike između izoformi IRS proteina. U eksperimentima sa malim interferujućim RNK (siRNK) u L6 miotubama, pokazano je da IRS-1 više reguliše ulazak glukoze, dok je IRS-2 izgleda više vezan za aktivaciju MAPK puta (Huang i sar., 2005). Taniguchi i sar. su u eksperimentima sa tkivno specifičnim „nokdaunom“ IRS-1 i IRS-2 u jetri, pokazali da ovi proteini održavaju metaboličku homeostazu svojim komplementarnim ulogama u regulaciji prenosa insulinskog signala i ekspresije gena (Taniguchi i sar., 2005). Iako ova dva proteina zajedno održavaju prenos insulinskog signala preko PI3K/Akt puta, oni učestvuju u regulaciji ekspresije različitih gena (Taniguchi i sar., 2005). Naime, pokazano je da je IRS-1 više vezan za regulaciju gena uključenih u glukoneogenezu (fosfoenolpiruvat karboksikinaza, glukozo-6-fosfataza i fruktozo-1,6-bifosfataza), dok je IRS-2 više vezan za regulaciju lipogeneze (Taniguchi i sar., 2005). U svetlu ovih istraživanja, rezultati dobijeni u ovoj studiji bi mogli ukazati na to da je tretman estradiolom u jetri usporio efekte insulina na metabolizam glukoze i preusmerio ih ka metabolizmu lipida.

Pored IRS proteina ispitivan je i efekat estradiolskog tretmana na još jedan od supstrata insulinskog receptora, Shc. Poznato je da aktivirani insulinski receptor fosforilise Shc na tirozinima i interaguje sa PTB domenom Shc proteina (Sasaoka i Kobayashi, 2000). Asocijacija Shc sa Grb2/SOS predstavlja predominantni mehanizam kojim insulin aktivira put MAPK (Sasaoka i sar., 1994). Shc igra kritičnu ulogu u mitogenezi koju indukuje insulin preko regulacije aktivnosti Ras (Sasaoka i Kobayashi, 2000). Iako uloga Shc nije potpuno jasna u kontekstu metaboličkog delovanja insulina, zna se da kompetira sa IRS kao supstrat insulinskog receptora (Sasaoka i Kobayashi, 2000). Takođe, pokazano je da je prekomernom ekspresijom Shc smanjen prenos signala IRS koji vodi sintezi glikogena (Sasaoka i sar., 2001).

U jetri i uterusu, estradiol je doveo do smanjenja količine ovog proteina, mada je statistički značajno smanjenje samo u uterusu (Slika 17). Suprotno tome, u srcu je došlo do statistički značajnog povećanja količine ovog proteina (Slika 25). S obzirom da je ovaj molekul veoma važan za mitogene efekte insulina, može se zaključiti da u uterusu estradiol suprimira granu signalnog puta insulina koja vodi ka ćelijskom rastu. Uzevši u

obzir i to da je tretman estradiolom doveo do izraženog povećanja količine IRS proteina u uterusu, može se zaključiti da je ovaj hormon u uterusu pomerio težište insulinskog signalnog puta ka metaboličkoj grani, dok je u srcu težište pomerenom ka mitogenim efektima insulina.

### 5.3 EFEKTI ESTRADIOLA NA PI3K/AKT PUT U JETRI, UTERUSU I SRCU

PI3K je kritični medijator insulinskog delovanja u jetri (Taniguchi i sar., 2006b). PI3K-zavisna aktivacija Akt definiše mnoge aspekte regulacije metabolizma glukoze u jetri pod delovanjem insulina, ali učestvuje i u regulaciji ćelijskog rasta (Taniguchi i sar., 2006b). Delecija svih glavnih regulatornih subjedinica PI3K u jetri je dovela do značajne redukcije aktivnosti ove kinaze pod delovanjem insulina i akumulacije PIP3 (Taniguchi i sar., 2006b). Pored toga ove delecije su izazvale značajne poremećaje u homeostazi glukoze i lipida, ali i funkcije i veličine jetre (Taniguchi i sar., 2006b).

Međutim, interesantni rezultati su dobijeni proučavanjem ćelija i miševa sa heterozigotnim „nokautom“ p85 subjedinice PI3K (Mauvais-Jarvis i sar., 2002; Ueki i sar., 2002). Ćelije sa heterozigotnim „nokautom“ p85 imaju oko 40% manje ovog proteina od *wt* (eng. *wild type*) ćelija, ali se aktivnost PI3K održava na skoro normalnom nivou (Ueki i sar., 2002). Jedno od mogućih objašnjenja je da kod *wt* ćelija postoji disproporcija u količini katalitičke i regulatorne subjedinice, pa ovo smanjenje količine regulatorne subjedinice ne utiče na količinu p85-p110 heterodimera (Ueki i sar., 2002). Pored toga, kod ovih ćelija nivo PIP3 nakon IGF stimulacije je značajno veći nego kod *wt* ćelija, iako je aktivnost PI3K skoro ista (Ueki i sar., 2002). Uporedo sa povišenim nivoom PIP3 kod heterozigotnih „nokaut“ ćelija, pozitivno je regulisana i fosforilacija i aktivnost Akt, dok je kod ćelija kod kojih je gen za p85 potpuno isključen ona smanjena (Ueki i sar., 2002). Takođe, smanjenje nivoa p85 za 50% značajno poboljšava insulinsku senzitivnost i smanjuje učestalost razvoja dijabetesa kod miševa sa insulinskom rezistencijom (Mauvais-Jarvis i sar., 2002). S druge strane, prekomerna ekspresija p85 subjedinice inhibira prenos insulinskog signala kompeticijom sa p85-p110 dimerom za vezivanje za fosforilisane IRS proteine (Ueki i sar., 2000). Navedeni rezultati idu u prilog tezi da određeno smanjenje količine p85 može pozitivno da utiče na prenos insulinskog

signala, naročito u pogledu antiapoptoze i glukoznog metabolizma (Mauvais-Jarvis i sar., 2002).

Mada u realizaciji sopstvenih negenomskih efekata estradiol aktivira PI3K/Akt put, efekti estradiola na sadržaj PI3K i Akt u kontekstu insulinskog delovanja nisu mnogo izučavani. Iako u ovoj studiji nakon estradiolske injekcije nije došlo do statistički značajne promene sadržaja proteina p85 i Akt u jetri (Slika 18 i Slika 19), primećuje se tendencija smanjenja količine proteina p85. U svetlu prethodno navedenih istraživanja, možda ova tendencija smanjenja može čak da ukaže na pozitivan efekat estradiola na prenos insulinskog signala u jetri.

Uterus glodara pokazuje značajne histološke promene tokom estrusnog ciklusa i polni steroidi su direktno odgovorni za ove promene u uterusu tokom ciklusa (Sato i sar., 1997). Apoptoza je mehanizam kojim se luminalni epitelijum uterusa i žlezde, u odsustvu embrionalnih faktora, ciklično degenerišu i regenerišu tokom estrusnog ciklusa (Dery i sar., 2003). Istraživanja su pokazala da estrogeni indukuju proliferaciju epitelnih ćelija u uterusu i da nedostatak estrogena vodi ćelijskoj smrti (Quarmby i Korach, 1984). Drugim rečima, polni steroidi održavaju balans između proliferacije i ćelijske smrti u ovom tkivu.

U ovoj studiji, estradiolski tretman je doveo do statistički značajnog povećanja sadržaja p85 u uterusu, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Bernard i sar., 2006). Naime, pokazano je da estradiol dozno i vremenski zavisno indukuje ekspresiju ovog proteina u ćelijama kancera dojke, što ukazuje na to da ekspresija ovog gena mora biti pod kontrolom signalnog puta estradiola (Bernard i sar., 2006). U ovim ćelijama je pokazano i da PI3K pospešuje ulazak u S fazu kod ćelija koje su stimulisane estradiolom (Castoria i sar., 2001).

U normalnoj fiziologiji uterusa, tokom svakog reproduktivnog ciklusa, estradiol stimuliše proliferaciju epitelijalnih ćelija (Finn i Martin, 1970). Estradiol podstiče preživljavanje i proliferaciju ćelija svojim genomskim i negenomskim delovanjem (Lengyel i sar., 2007). S obzirom da negenomsko delovanje estradiola uključuje aktivaciju PI3K/Akt puta, moguće je da je i povećanje količine proteina p85 dobijeno u ovoj studiji pod delovanjem estradiola u uterusu, kao glavnom ciljnom tkivu ovog hormona, u funkciji negenomskih efekata ovog hormona.

Akt ima inhibitorni efekat na pokretanje procesa apoptoze i pokazano je da je u endometrijumu pacova tokom estrusnog ciklusa ovaj molekul regulisan estradiolom (Dery i sar., 2003). Richards i sar. su u svojim eksperimentima pokazali značajno povećanje fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> u uterusima miševa tretiranih estradiolom u

poređenju sa netretiranim životinjama (Richards i sar., 2001). Ovo povećanje fosforilacije Akt ukazuje na povećanu aktivnost PI3K, pošto je Akt nishodni target PI3K (Richards i sar., 2001). Naime, ligandom aktivirani ER $\alpha$  aktivira PI3K, i pokreće kaskadu fosforilacija koje dovode do aktivacije Akt koja zatim, fosforiliše nekoliko proteina u citoplazmi i nukleusu izazivajući inhibiciju apoptoze i pojačavajući ćelijsku proliferaciju (Song i sar., 2005b). Jedan od najvažnijih supstrata Akt je FOXO subfamilija transkripcionih faktora (Lengyel i sar., 2007). FOXO1 pozitivno reguliše ekspresiju gena koji učestvuju u ćelijskoj smrti, pa je ovaj protein veoma važan u regulaciji apoptoze (Lengyel i sar., 2007). Akt fosforiliše FOXO1 na tri aminokiselinska ostatka (Thr<sup>24</sup>, Ser<sup>256</sup> i Ser<sup>319</sup>), što vodi inaktivaciji ovog molekula i njegovom izlasku iz nukleusa (Van Der Heide i sar., 2004). FOXO transkripcioni faktori su veoma važni u prevenciji razvoja tumora i njihovu supresivnu aktivnost na razvoj tumora može ugroziti fosforilacija posredovana Akt-om. Smatra se da je ovaj efekat estradiola uzrok povećanog rizika od kancera nakon produženog izlaganja ovom hormonu.

Kao i svi ushodni signalni molekuli u uterusu, u ovoj studiji je bazalni nivo Akt statistički značajno povećan nakon tretmana estradiolom (Slika 19). Ovo povećanje količine proteina Akt je u skladu sa rezultatima Dery i sar. (Dery i sar., 2003), i verovatno predstavlja mehanizam kojim estradiol deluje antiapoptotski u uterusu.

PI3K je voma važan molekul u regulaciji kritičnih srčanih funkcija kao što su kontraktilnost kardiomiocita i hipertrofija miokardijuma, kao i miokardijalna i vaskularna inflamacija (Ghigo i sar., 2011). Prenos signala receptora tirozin kinaza preko PI3K reguliše normalan razvoj miokardijuma, fiziološku hipertrofiju i kontraktilnost srca (Shioi i sar., 2000; McMullen i sar., 2004; Lu i sar., 2009). Rezultati ove studije pokazuju da je estradiolski tretman doveo do značajnog povećanja količine proteina, kao i ekspresije iRNK p85 u srcu (Slika 26). Povećanje količine proteina p85 u srcu je u skladu sa povećanjem količine kompleksa IRS-1/p85 koje je takođe dobijeno u srcu i ova dva rezultata ukazuju na pozitivne efekte estradiola na insulinsko delovanje u srcu.

Estradiolski tretman nije doveo do promene količine Akt proteina u srcu (Slika 27), što je u skladu sa rezultatima Ren i sar., koji ukazuju na to da estradiolska supstitucija ne utiče na ukupan nivo Akt proteina u srcu (Ren i sar., 2003). Međutim, aktivacija Akt, predstavljena kao ukupna količina Akt fosforilisanog na Ser<sup>473</sup> ili kao procenat od totalnog Akt proteina, se značajno smanjuje kod ovarijektomisanih životinja i vraća na normalan nivo nakon supstitucije (Ren i sar., 2003). U skladu sa navedenim istraživanjem je i rezultat dobijen u ovoj studiji koji pokazuje da je u srcu estradiolski

tretman statistički značajno povećao insulinom-stimulisanu fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup>, što ukazuje na povećanje aktivnosti ovog enzima u srcu pod delovanjem estradiola (Slika 27).

Kada se sagledaju efekti estradiola na molekule insulinskog signalnog puta u sva tri analizirana tkiva, uočava se da je u jetri estradiol delovao na nivou supstrata IR i to pomerajući težište insulinskog signalnog puta ka IRS-2. S obzirom da je jetra jedno od glavnih ciljnih tkiva za insulin, efekat u ovom tkivu, iako najmanje izražen, je možda fiziološki najvažniji. Uzimajući u obzir istraživanja drugih autora, koja ukazuju na komplementarnost uloga IRS-1 i IRS-2 (Taniguchi i sar., 2005), nameće se zaključak da estradiol ima važnu ulogu u održavanju balansa između metabolizma glukoze i lipida u jetri.

Sa druge strane, molekuli insulinskog signalnog puta u uterusu su mnogo izraženije promenjeni pod delovanjem estradiola, što je i očekivano s obzirom da se radi o glavnom ciljnom tkivu za estradiol. Međutim, uloga insulina u ovom tkivu nije potpuno razjašnjena, pa se pretpostavlja da insulin deluje u uterusu primarno kao faktor rasta (Mioni i sar., 2004). Pošto je jedna od glavnih uloga estradiola u ciljnim tkivima stimulacija ćelijske proliferacije, verovatno je ovako izražen efekat na molekule signalnog puta insulina u funkciji ostvarivanja ovog aspekta estradiolskog delovanja.

Posredni efekat estradiola u srcu preko promene koncentracije FFA u plazmi može biti veoma važan za metabolizam u srcu. Srce može da koristi različite metaboličke supstrate i da se brzo prilagođava na iskorišćavanje određenih supstrata u zavisnosti od njihove dostupnosti. Iako su FFA glavni metabolički supstrat u srcu, povišene koncentracije masnih kiselina unutar miocita, kao posledica visokih koncentracija u plazmi su štetne za srce. Efekti estradiola u srcu su kompleksniji nego u prethodna dva tkiva i verovatno odražavaju činjenicu da oba hormona imaju važnu ulogu u fiziologiji srca. Rezultati dobijeni u srcu sugerišu da je efekat estradiola kombinacija pozitivnog i negativnog delovanja ovog hormona, i to i genomskog i negenomskog. Rezultat ovako kompleksne regulacije je veoma važan za fiziologiju srca, pa bi bilo korisno ispitati kakvi su efekti estradiola na molekule koji su nishodno u signalnom putu insulina, prvenstveno na transportere za glukozu i FFA, što bi imalo direktne implikacije na funkciju srca. Ispitivanje nishodnih efektornih molekula za insulin u jetri i uterusu bi takođe doprinelo objašnjenju značaja zapaženih efekata estradiola na početne molekule signalnog puta insulina u tim tkivima.

## 6. ZAKLJUČCI

- Tretman estradiolom je doveo do smanjenja fosforilacije IR, kao i smanjenja proteinskog sadržaja IRS-1 u jetri, što navodi na zaključak da je estradiol suprimirao efekte insulina preko IR/IRS-1 puta i usmerio ih na alternativni put, što je potkrepljeno i povećanjem proteinskog sadržaja IRS-2 u jetri.
- Uprkos činjenici da efekti estradiolskog tretmana u jetri nisu tako izraženi kao u uterusu, rezultati ove studije ukazuju na to da su njihove fiziološke konsekvence značajnije za insulinsko delovanje.
- U uterusu je tretman estradiolom nakon 6 h doveo do statistički značajnog povećanja proteinskog sadržaja skoro svih ispitivanih molekula signalnog puta insulina.
- Povećanje težine uterusa kod životinja koje su tretirane insulinom ukazuje na ulogu insulina u regulaciji funkcije uterusa. S obzirom da postoji tendencija daljeg povećanja težine uterusa kod životinja koje su pre insulina primile estradiol, može se pretpostaviti da je povećanje sadržaja signalnih molekula insulina koje je izazvao estradiol dovelo do pojačavanja efekta insulina u uterusu.
- U srcu je estradiol doveo do povećanja asocijacije IRS-1/p85, povećanja sadržaja proteina i iRNK p85, kao i povećanja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>, što ukazuje na benefitne efekte estradiola na prenos insulinskog signala.
- S druge strane, smanjenje fosforilacije tirozina IR, smanjenje proteinskog sadržaja IRS-2 i iRNK oba IRS proteina ukazuju na to da estradiol ima i supresivne efekte na insulinski signalni sistem u srcu.
- Delovanje estradiola na prenos insulinskog signala u srcu predstavlja kombinaciju pozitivnih i negativnih efekata, koji mogu biti i genomski i negenomski, i imaju potencijalno važan uticaj na fiziologiju srca

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju doprinos razumevanju uticaja ženskih polnih hormona na prenos insulinskog signala u jetri, uterusu i srcu. Pored činjenice da je efekat estradiola dozno i vremenski zavisian, rezultati ove studije pokazuju da postoji i tkivna specifičnost u delovanju ovog hormona na molekule insulinskog signalnog puta. Kako je pokazano da je efekat estradiola najkompleksniji u srcu, dalja



istraživanja bi mogla da objasne kakve su posledice delovanja ovog hormona na molekule koji se nalaze nishodno od ispitivanih molekula u ovoj studiji, kao i kakva je uloga estradiola u regulaciji insulinskog signalnog puta u nekim patofiziološkim stanjima kao što su insulinska rezistencija i dijabetes tip 2.

## 7. LITERATURA

- Abel ED (2004) Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep* 6, 416-423.
- Agabiti-Rosei E, Muiesan ML (2002) Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. *J Hypertens Suppl* 20, S34-38.
- Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T et al. (2000) Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102, 2873-2879.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7, 261-269.
- Alonso A, Gonzalez C (2008) Relationship between non-genomic actions of estrogens and insulin resistance. *Infectious disorders drug targets* 8, 48-51.
- American Diabetes Association (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1, S64-71.
- Amiel SA, Caprio S, Sherwin RS, Plewe G, Haymond MW et al. (1991) Insulin resistance of puberty: a defect restricted to peripheral glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 277-282.
- Andersson B, Mattsson LA, Hahn L, Marin P, Lapidus L et al. (1997) Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 638-643.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS (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, 8517-8521.
- Awan MM, Saggerson ED (1993) Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295 ( Pt 1), 61-66.
- Barbour LA, Shao J, Qiao L, Leitner W, Anderson M et al. (2004) Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of

- phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* 145, 1144-1150.
- Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med* 12, 425-431.
- Barros RP, Morani A, Moriscot A, Machado UF (2008) Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol Cell Endocrinol* 295, 24-31.
- Becker AB, Roth RA (1990) Insulin receptor structure and function in normal and pathological conditions. *Annu Rev Med* 41, 99-115.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME et al. (2002) Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109, 629-639.
- Bergman RN, Ader M (2000) Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11, 351-356.
- Bernard L, Legay C, Adriaenssens E, Mougel A, Ricort JM (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, 916-921.
- Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19, 833-842.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF (1997) Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34, 3-24.
- Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D et al. (2006) Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49, 588-597.
- Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A et al. (2008) Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E904-912.

- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003) Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278, 25323-25330.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A et al. (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20, 6050-6059.
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 16, 938-946.
- Chang L, Chiang SH, Saltiel AR (2004) Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10, 65-71.
- Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, Fisher SJ, Jozsi A et al. (2004) p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* 24, 320-329.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME et al. (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103, 401-406.
- Cherrington AD (1999) Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 48, 1198-1214.
- Choi SB, Jang JS, Park S (2005) Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology* 146, 4786-4794.
- Ciechanover A, Schwartz AL (1994) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J* 8, 182-191.
- Cohen P (2006) The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 867-873.
- Coleman KM, Smith CL (2001) Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, D1379-1391.
- Couse JF, Hewitt SC, Korach KC (2006) Steroid Receptors in the Ovary and Uterus. In: Neill JD (ed). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, Vol. Elsevier academic press, St Louis, MO, USA. pp. 593-678.

- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358-417.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- De Meyts P (2004) Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* 26, 1351-1362.
- De Meyts P, Whittaker J (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews Drug discovery* 1, 769-783.
- Deroo BJ, Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116, 561-570.
- Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E (2003) Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 47.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19, 608-624.
- Duncombe WG (1964) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta* 9, 122-125.
- Dupont J, Derouet M, Simon J, Taouis M (1998) Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken. *Am J Physiol* 274, E309-316.
- Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM, Karrison T, Rosenfield RL et al. (1995) Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 96, 520-527.
- Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R et al. (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66, 2405-2426.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.

- Farquhar C, Marjoribanks J, Lethaby A, Suckling JA, Lamberts Q (2009) Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004143.
- Finn CA, Martin L (1970) The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse. *J Endocrinol* 47, 431-438.
- Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T et al. (1999) Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 48, 1807-1814.
- Frolova AI, Moley KH (2011) Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. *Reproduction* 142, 211-220.
- Furumoto T, Fujii S, Onozuka H, Tarikuz Zaman AK, Goto D et al. (2005) Loss of insulin receptor substrate-1 signaling induces the cardiovascular and proteo(fibrino)lytic system derangements typical of insulin resistance. *Coron Artery Dis* 16, 117-123.
- Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, Khan A, Efendic S et al. (2006) Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 20, 1287-1299.
- Garcia-Arencibia M, Davila N, Campion J, Carmen Carranza M, Calle C (2005a) Identification of two functional estrogen response elements complexed with AP-1-like sites in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 1-14.
- Garcia-Arencibia M, Molero S, Davila N, Carranza MC, Calle C (2005b) 17beta-Estradiol transcriptionally represses human insulin receptor gene expression causing cellular insulin resistance. *Leuk Res* 29, 79-87.
- Ghigo A, Morello F, Perino A, Damilano F, Hirsch E (2011) Specific PI3K isoform modulation in heart failure: lessons from transgenic mice. *Curr Heart Fail Rep* 8, 168-175.
- Giorgino F, Logoluso F, Davalli AM, Napoli R, Laviola L et al. (1999) Islet transplantation restores normal levels of insulin receptor and substrate tyrosine

- phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle and myocardium of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 48, 801-812.
- Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D et al. (2000) Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 434-441.
- Godsland IF (2005) Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia* 48, 2213-2220.
- Godsland IF, Crook D, Simpson R, Proudler T, Felton C et al. (1990) The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism. *N Engl J Med* 323, 1375-1381.
- Godsland IF, Walton C, Felton C, Proudler A, Patel A et al. (1992) Insulin resistance, secretion, and metabolism in users of oral contraceptives. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 64-70.
- Gonzalez C, Alonso A, Diaz F, Patterson AM (2003) Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1. *J Endocrinol* 176, 367-379.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM et al. (2001) Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on insulin receptor substrate-1. *JOP* 2, 140-149.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM et al. (2002a) Role of 17beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids* 67, 993-1005.
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Esteban MM, Fernandez S et al. (2002b) Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on the insulin receptor. *Life Sci* 70, 1621-1630.
- Groothuis PG, Dassen HH, Romano A, Punyadeera C (2007) Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* 13, 405-417.
- Haas AL, Siepmann TJ (1997) Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* 11, 1257-1268.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 36869-36872.

- Hernandez-Ono A, Monter-Carreola G, Zamora-Gonzalez J, Cardoso-Saldana G, Posadas-Sanchez R et al. (2002) Association of visceral fat with coronary risk factors in a population-based sample of postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 33-39.
- Herrington DM, Vittinghoff E, Lin F, Fong J, Harris F et al. (2002) Statin therapy, cardiovascular events, and total mortality in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 105, 2962-2967.
- Hewitt KN, Pratis K, Jones ME, Simpson ER (2004) Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 145, 1842-1848.
- Hirashima Y, Tsuruzoe K, Kodama S, Igata M, Toyonaga T et al. (2003) Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 179, 253-266.
- Ho KJ, Liao JK (2002) Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1952-1961.
- Hresko RC, Mueckler M (2005) mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280, 40406-40416.
- Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED et al. (2003) Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1261-1269.
- Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A (2005) Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in 16 myotubes. *J Biol Chem* 280, 19426-19435.
- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T et al. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4686-4691.
- Jensen EV, Jacobson HI (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res* 18, 387-414.
- Jensen MD, Martin ML, Cryer PE, Roust LR (1994) Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans. *Am J Physiol* 266, E914-920.



- Johnson JA, Fried SK, Pi-Sunyer FX, Albu JB (2001) Impaired insulin action in subcutaneous adipocytes from women with visceral obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E40-49.
- Kahn CR (1980) Role of insulin receptors in insulin-resistant states. *Metabolism* 29, 455-466.
- Kahn SE (2001) Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4047-4058.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN et al. (1993) Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42, 1663-1672.
- Kazi AA, Molitoris KH, Koos RD (2009) Estrogen rapidly activates the PI3K/AKT pathway and hypoxia-inducible factor 1 and induces vascular endothelial growth factor A expression in luminal epithelial cells of the rat uterus. *Biol Reprod* 81, 378-387.
- Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK et al. (1999) Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 257-262.
- Kim JK, Levin ER (2006) Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nucl Recept Signal* 4, e013.
- Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J Biol Chem* 281, 6760-6767.
- Kitamura T, Kahn CR, Accili D (2003) Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* 65, 313-332.
- Korgun ET, Dohr G, Desoye G, Demir R, Kayisli UA et al. (2003) Expression of insulin, insulin-like growth factor I and glucocorticoid receptor in rat uterus and embryo during decidualization, implantation and organogenesis. *Reproduction* 125, 75-84.

- Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H et al. (2008) Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab* 8, 49-64.
- Kumagai S, Holmang A, Bjorntorp P (1993) The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. *Acta Physiol Scand* 149, 91-97.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G (2004) Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015, 250-260.
- Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, Entingh-Pearsall A, Holzenberger M et al. (2007) Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol* 27, 1649-1664.
- Le Roith D, Zick Y (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24, 588-597.
- Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E et al. (1999) Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13, 787-796.
- Lengyel F, Vertes Z, Kovacs KA, Kornyei JL, Sumegi B et al. (2007) Effect of estrogen and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase on Akt and FOXO1 in rat uterus. *Steroids* 72, 422-428.
- Leturque A, Hauguel S, Ferre P, Girard J (1987) Glucose metabolism in pregnancy. *Biology of the neonate* 51, 64-69.
- Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP (2004) Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol* 97, 485-493.
- Liu ML, Xu X, Xie P, Lu J, Chen SH et al. (2005) [Effects of long-term estrogen replacement treatment on the blood pressure and expression of IR and IRS-1 in myocardium]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 30, 38-40, 56.
- Livingstone C, Collison M (2002) Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 102, 151-166.

- Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F (2004) Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep* 6, 180-185.
- Lu Z, Jiang YP, Wang W, Xu XH, Mathias RT et al. (2009) Loss of cardiac phosphoinositide 3-kinase p110 alpha results in contractile dysfunction. *Circulation* 120, 318-325.
- Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG (2000) Evolution of Shc functions from nematode to human. *Current opinion in genetics & development* 10, 668-674.
- Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS et al. (2004) Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 47, 1175-1187.
- Marino M, Acconcia F, Bresciani F, Weisz A, Trentalance A (2002) Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 13, 3720-3729.
- Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF et al. (1999) Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation* 100, 2373-2379.
- Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A (2003) Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle* 2, 220-223.
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K et al. (2002) Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* 109, 141-149.
- McCarty MF (2001) Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity. *Med Hypotheses* 57, 192-200.
- McGarry JD (2002) Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7-18.
- McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O et al. (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 279, 4782-4793.

- Mendelsohn ME (2002) Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 89, 12E-17E; discussion 17E-18E.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI et al. (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97.
- Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM et al. (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J* 16, 706-716.
- Mioni R, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, Granzotto M et al. (2004) Evidence for the presence of glucose transporter 4 in the endometrium and its regulation in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4089-4096.
- Miura A, Sajjan MP, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kahn CR et al. (2004) Insulin substrates 1 and 2 are corequired for activation of atypical protein kinase C and Cbl-dependent phosphatidylinositol 3-kinase during insulin action in immortalized brown adipocytes. *Biochemistry* 43, 15503-15509.
- Miya Y, Sumino H, Ichikawa S, Nakamura T, Kanda T et al. (2002) Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women. *Hypertens Res* 25, 153-159.
- Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M (2007) Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta* 375, 20-35.
- Modena MG, Muia N, Jr., Aveta P, Molinari R, Rossi R (1999) Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension* 34, 1041-1046.
- Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E (2003) Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 4007-4016.
- Moreno M, Ordonez P, Alonso A, Diaz F, Tolivia J et al. (2009) Chronic 17beta-estradiol treatment improves skeletal muscle insulin signaling pathway components in insulin resistance associated with aging. *Age (Dordr)* 32, 1-13.
- Mozzanega B, Mioni R, Granzotto M, Chiarelli S, Xamin N et al. (2004) Obesity reduces the expression of GLUT4 in the endometrium of normoinsulinemic

- women affected by the polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 364-374.
- Muller-Wieland D, Streicher R, Siemeister G, Krone W (1993) Molecular biology of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol* 101, 17-29.
- Muraki K, Okuya S, Tanizawa Y (2006) Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 53, 841-851.
- Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P et al. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10350-10354.
- Naga Prasad SV, Perrino C, Rockman HA (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 13, 206-212.
- Nagira K, Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Ikubo M et al. (2006) Altered subcellular distribution of estrogen receptor alpha is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147, 1020-1028.
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW (1999) Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1858-1862.
- Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T et al. (2000) Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 1819-1825.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K et al. (1998) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97, 2197-2201.
- Nilsson S, Gustafsson JA (2002) Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 1-28.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535-1565.
- Nussey S, Whitehead S (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

- Panno ML, Mauro L, Marsico S, Bellizzi D, Rizza P et al. (2006) Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor alpha through its interaction with Sp1. *J Mol Endocrinol* 36, 91-105.
- Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F et al. (2004) 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 95, 692-699.
- Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM (2001) Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50, 24-31.
- Pelicci G, Dente L, De Giuseppe A, Verducci-Galletti B, Giuli S et al. (1996) A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene* 13, 633-641.
- Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F et al. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.
- Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885-909.
- Quarmby VE, Korach KS (1984) The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 114, 694-702.
- Ravichandran KS (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.
- Reaven GM, Reaven EP (1985) Age, glucose intolerance, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American Geriatrics Society* 33, 286-290.
- Ren J, Hintz KK, Roughead ZK, Duan J, Colligan PB et al. (2003) Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1800-1807.
- Ren J, Sowers JR, Walsh MF, Brown RA (2000) Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H1708-1714.
- Richards RG, DiAugustine RP, Petrusz P, Clark GC, Sebastian J (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, 12002-12007.
- Richards RG, Klotz DM, Bush MR, Walmer DK, DiAugustine RP (2001) E2-induced degradation of uterine insulin receptor substrate-2: requirement for an IGF-I-stimulated, proteasome-dependent pathway. *Endocrinology* 142, 3842-3849.
- Richards RG, Walker MP, Sebastian J, DiAugustine RP (1998) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor-insulin receptor substrate complexes in the uterus. Altered signaling response to estradiol in the IGF-1(m/m) mouse. *J Biol Chem* 273, 11962-11969.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.
- Ruzycky AL (1996) Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on mitogen-activated protein kinase expression and activity in rat uterine smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 300, 247-254.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Saltiel AR, Pessin JE (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 12, 65-71.
- Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM et al. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278, 14599-14602.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sasaoka T, Draznin B, Leitner JW, Langlois WJ, Olefsky JM (1994) Shc is the predominant signaling molecule coupling insulin receptors to activation of guanine nucleotide releasing factor and p21ras-GTP formation. *J Biol Chem* 269, 10734-10738.
- Sasaoka T, Ishihara H, Sawa T, Ishiki M, Morioka H et al. (1996) Functional importance of amino-terminal domain of Shc for interaction with insulin and epidermal growth factor receptors in phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* 271, 20082-20087.

- Sasaoka T, Ishiki M, Wada T, Hori H, Hirai H et al. (2001) Tyrosine phosphorylation-dependent and -independent role of Shc in the regulation of IGF-1-induced mitogenesis and glycogen synthesis. *Endocrinology* 142, 5226-5235.
- Sasaoka T, Kobayashi M (2000) The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr J* 47, 373-381.
- Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T et al. (1997) Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec* 248, 76-83.
- Sesti G (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 665-679.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P et al. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15, 2099-2111.
- Sesti G, Tullio AN, D'Alfonso R, Napolitano ML, Marini MA et al. (1994) Tissue-specific expression of two alternatively spliced isoforms of the human insulin receptor protein. *Acta Diabetol* 31, 59-65.
- Sheets EE, Tsibris JC, Cook NI, Virgin SD, DeMay RM et al. (1985) In vitro binding of insulin and epidermal growth factor to human endometrium and endocervix. *Am J Obstet Gynecol* 153, 60-65.
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 ( Pt 3), 471-490.
- Shi J, Simpkins JW (1997) 17 beta-Estradiol modulation of glucose transporter 1 expression in blood-brain barrier. *Am J Physiol* 272, E1016-1022.
- Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM et al. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19, 2537-2548.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Song D, Arikawa E, Galipeau DM, Yeh JN, Battell ML et al. (2005a) Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypertens* 18, 1189-1194.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005b) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* 9, 59-71.



- Strowitzki T, von Eye HC, Kellerer M, Haring HU (1993) Tyrosine kinase activity of insulin-like growth factor I and insulin receptors in human endometrium during the menstrual cycle: cyclic variation of insulin receptor expression. *Fertil Steril* 59, 315-322.
- Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK (1996) New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 191-199.
- Swislocki AL, Chen YD, Golay A, Chang MO, Reaven GM (1987) Insulin suppression of plasma-free fatty acid concentration in normal individuals and patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 30, 622-626.
- Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T et al. (2002) Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension* 39, 41-45.
- Takeda K, Toda K, Saibara T, Nakagawa M, Saika K et al. (2003) Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 176, 237-246.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006a) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 85-96.
- Taniguchi CM, Kondo T, Sajan M, Luo J, Bronson R et al. (2006b) Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC $\lambda$ /zeta. *Cell Metab* 3, 343-353.
- Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R (2005) Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest* 115, 718-727.
- Truchan B, Taylor P, Goren HJ, Lederis K, Hollenberg MD et al. (1987) Basal, oxytocin-, and insulin-stimulated glucose oxidation in human endometrium. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 323-327.
- Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR (2001) Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21, 26-38.
- Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn CR (2000) Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three

- different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 20, 8035-8046.
- Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC et al. (2002) Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol* 22, 965-977.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P et al. (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285, 1929-1931.
- Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380, 297-309.
- Van Pelt RE, Gozansky WS, Schwartz RS, Kohrt WM (2003) Intravenous estrogens increase insulin clearance and action in postmenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E311-317.
- Vitale C, Fini M, Speziale G, Chierchia S (2010) Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. *Fundam Clin Pharmacol* 24, 675-685.
- von Wolff M, Ursel S, Hahn U, Steldinger R, Strowitzki T (2003) Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3885-3892.
- Walton C, Godsland IF, Proudler AJ, Wynn V, Stevenson JC (1993) The effects of the menopause on insulin sensitivity, secretion and elimination in non-obese, healthy women. *Eur J Clin Invest* 23, 466-473.
- Welch RD, Gorski J (1999) Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology* 140, 3602-3608.
- Wilson DE, Flowers CM, Carlile SI, Udall KS (1976) Estrogen treatment and gonadal function in the regulation of lipoprotein lipase. *Atherosclerosis* 24, 491-499.
- Withers DJ, White M (2000) Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 141, 1917-1921.
- Xie P, Liu ML, Gu YP, Lu J, Xu X et al. (2003) Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 643-648.

- Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y et al. (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16, 3074-3084.
- Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA et al. (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 $\alpha$  catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18, 1379-1387.
- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X et al. (2002) Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* 277, 45276-45284.
- Zhao ZQ (2004) Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Curr Opin Pharmacol* 4, 159-165.
- Zick Y (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005, pe4.
- Zysow BR, Kauser K, Lawn RM, Rubanyi GM (1997) Effects of estrus cycle, ovariectomy, and treatment with estrogen, tamoxifen, and progesterone on apolipoprotein(a) gene expression in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1741-1745.

***PRILOZI***

---



## Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol

G. Koricnac<sup>a,\*</sup>, T. Milosavljevic<sup>a</sup>, M. Stojiljkovic<sup>a</sup>,  
Z. Zakula<sup>a</sup>, N. Ribarac-Stepic<sup>a</sup>, E.R. Isenovic<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology, Vinca Institute of Nuclear Sciences, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, Vinca Institute of Nuclear Sciences, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

Received 25 September 2006; accepted 1 June 2007

### Abstract

We used rat hepatic and uterine tissues to examine the impact of estradiol (E2) on insulin (INS) signaling. Ovariectomized (OVX) female Wistar rats were treated with E2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.wt., i.p.) and used for the experiment 6 h after E2 administration. To highlight E2 effects on tyrosine phosphorylation of INS receptor (IR) and INS receptor substrates (IRSs) and IRSs association with p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) in the context of INS signaling, E2-treated OVX rats were also injected with INS (20 IU, i.p.), 30 min before the experiment. Treatment with E2 did not change the levels of plasma INS and glucose (Glu). However, it significantly decreased the free fatty acid (FFA) level and increased uterine weight. Furthermore, the results show that E2 had no effect on the content of hepatic IR protein, but significantly increased IR protein content in the uterus and decreased IR tyrosine phosphorylation in both the liver and uterus. Compared to the control, hepatic IRS-1 and IRS-2 were significantly decreased and increased, respectively, after E2 treatment. Protein content of both molecules, IRS-1 and IRS-2, was increased in uterine tissue after E2 administration. Protein content of the p85 subunit of PI3-K and that of protein kinase B (Akt) were increased in the uterus, with no changes in the liver. The results suggest that E2 treatment induces tissue-specific changes in INS signaling. The consequences of E2 treatment on INS signaling molecules are more apparent in the uterus, but their physiological relevance for INS action is probably greater in the liver.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Estradiol; Insulin signaling; Liver; Uterus

### 1. Introduction

Various clinical observations and experimental data suggest that insulin (INS) and estradiol (E2) interact on carbohydrate metabolism. Physiological conditions where estrogen concentration is markedly altered have a substantial effect on carbohydrate, lipid, and intermediary metabolism, as well as modify INS sensitivity [1]. INS sensitivity is modulated in puberty, menstrual cycle, pregnancy, and menopause. At physiological levels estrogens are thought to be involved in maintaining normal INS sensitivity. Outside physiological range these steroids may promote INS resistance [2]. It seems apparent therefore, that physiological variations

in the concentrations of estrogen hormones could have an effect on the first steps of the intracellular INS signaling cascade [2–5]. However, the molecular mechanism responsible for the relationship between E2 and INS sensitivity remains unclear.

The binding of INS to the  $\alpha$ -subunit of the INS receptor (IR) results in autophosphorylation and activation of its  $\beta$ -subunit. Activated IR phosphorylates IR substrates (IRSs) like IRS-1, IRS-2, Shc, etc., at tyrosine residues, and tyrosine-phosphorylated IRS binds to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), causing activation of the p110 catalytic subunit. PI3-K generates PI triphosphate from PI-bisphosphate, leading to the phosphorylation and activation of protein kinase B (Akt), an important mediator of the INS-induced uptake of glucose (Glu) (reviewed in [6]).

\* Corresponding author. Tel.: +381 11 2442 532; fax: +381 11 2455 561.  
E-mail address: [gogi@rt270.vin.bg.ac.yu](mailto:gogi@rt270.vin.bg.ac.yu) (G. Koricnac).

E2 binds to specific estrogen receptors (ER) of two subtypes: ER $\alpha$  and ER $\beta$ . ERs are expressed not only in the reproductive tissues, but also in nonreproductive organs such as the liver. It has been shown that the effect of E2 is mediated by intracellular ER transcriptional activity in the nucleus. In addition, recent reports suggest nontranscriptional action mediated by ER situated in the plasma membrane through the p85/Akt pathway (reviewed in [7]).

Effects of E2 on molecules of INS signaling cascade were studied in many different contexts. IRS-1 predominantly, IRS-2 and Shc were subject of studies of E2/IGF-I cross-talk in regulation of breast cancer growth [8–12]. IRS-1, IRS-2, and PI3-K were also investigated as a part of IGF-I signaling in E2/IGF-I interactions in regulation of uterine physiology [13–15]. In genetic reports IR and IRS-1 genes were identified to be transcriptionally controlled by ER [16,17]. In addition, PI3-K and Akt were linked to and extensively studied in membrane ER signaling [7,18]. Finally, effects of E2 on these molecules in the context of INS signaling were subject of some *in vitro* studies [1,19–21]. However, *in vivo* investigation of E2 effects on INS signaling cascade in their whole complexity was a subject of interest of single research group [2–4,22]. To our knowledge, there are no comparative reports on the role of E2 in the modulation of INS signaling cascade on the principal INS- and E2-sensitive tissues. There are also no studies integrating the data about the importance of these molecules in INS signaling network and E2 nontranscriptional signaling. A full understanding of the molecular basis of the effects of estrogens on INS action will suggest how these effects might be open to therapeutic intervention [23].

The aim of the present study was to compare the impact of E2 on INS signaling molecules in tissues which are the principal targets of INS (the liver) and E2 (the uterus) action. Specifically, we addressed the hypothesis that the impact of E2 on INS signaling would involve PI3-K/Akt pathway in the liver and uterus and that alteration of IR, IRS-1, IRS-2, and Shc might be an important intermediate signal. To test this hypothesis, we used ovariectomized (OVX) female rats injected with E2 and compared them with controls in terms of E2 regulation of (1) plasma INS, Glu, and FFA levels; (2) IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt, and Shc protein content; and (3) IR, IRS-1, and IRS-2 tyrosine phosphorylation, and IRS/p85 association.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The RIA INS kit was a product of INEP (Zemun, Serbia). Porcine INS was purchased from Galenika (Zemun, Serbia). Polyclonal anti-IR $\beta$  antibody, anti-IRS-1, IRS-2, Akt1, and secondary anti-mouse antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal anti-Shc antibody was purchased from Upstate (Charlottesville, VA, USA). Monoclonal anti-p85 and anti-

phosphotyrosine antibody PY20 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Reagents for the bicinchoninic acid (BCA) assay were purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). Secondary anti-rabbit antibody, monoclonal mouse anti-actin antibody, 17 $\beta$ -estradiol, protein A-sepharose, and all other chemicals of analytical grade were purchased from Sigma–Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Animals

Female Wistar rats (2–2.5 months old; 200–250 g b.wt.), maintained at 22 °C, under conditions of a 12/12 h light–dark regime with rat chow and water *ad libitum*, were ovariectomized under Nesdonal anesthesia 2 weeks prior to the experiment. Protein content of INS signaling molecules was determined as basal content, without addition of exogenous INS. However, tyrosine phosphorylation of IR and IRSs and association of IRS/p85 was analysed in INS-stimulated conditions, in order to underline E2 effects on these interactions in the context of INS signaling, because they also take place in other signaling pathways. Animals were divided into two main experimental groups: control (OVX) and E2-treated. Each experiment was performed three times using three rats per group. After overnight fasting, animals were injected intraperitoneally with E2 (20  $\mu$ g/kg b.wt.) and sacrificed 6 h after E2 administration. Optimization of the timing of E2 injection was performed as described previously [13–15]. The timing of E2 administration was optimized to observe the peak of changes in content and function of INS signaling molecules. After an overnight fasting, the control animals received 0.14 M NaCl with 1% ethanol and were sacrificed along with their E2-treated counterparts. For some experiments (those testing tyrosine phosphorylation of IR and IRS-1/2, as well as IRS/p85 association), E2-treated OVX rats were injected intraperitoneally with INS (20 IU/animal) 30 min prior to the experiment [24]. For these experiments control group consisted of OVX animals treated with the same dose of INS. The uterus was weighted before sample preparation. Animal experiments were conducted according to standards approved by the official Vinca Institute's Ethical Committee for Experimental Animals and were in compliance with the principles set forth in "Good Laboratory Animal Practice".

### 2.3. Determination of plasma INS, plasma Glu, and plasma FFA levels

For measurement of plasma INS, Glu, and FFA levels animals were fasted overnight before blood samples were collected. The plasma INS level was determined by the RIA method using rat INS standards, with assay sensitivity of 0.6 mIU/l and an intra-assay coefficient of variation of 5.24%. The Glu level was measured using an Accutrend glucometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The plasma FFA level was measured using a modified version of the method of Duncombe [25].

#### 2.4. Tissue sample preparation

After decapitation, rat liver and uterus tissues were homogenized [26] on ice with an Ultra-Turrax homogenizer in buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors (2 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml aprotinin), and phosphatase inhibitors (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, and 2 mM sodium orthovanadate). Homogenates were centrifuged at 600  $\times$  g for 20 min at 4 °C, and supernatants were then ultracentrifuged for 60 min at 100,000  $\times$  g. Protein concentrations were determined by the BCA method [27]. Supernatants were used for Western blot analysis or immunoprecipitation with anti-IR, IRS-1, or IRS-2 antibodies.

#### 2.5. SDS-PAGE and Western blotting

Proteins isolated from liver and uterine tissues were subjected to electrophoresis, immunoblotting, and alkaline phosphatase (ALP) detection of IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt, and Shc content. Lysate proteins (50  $\mu$ g/lane) were separated by 7.5% or 10% SDS polyacrylamide gels [28] and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with either 5% nonfat dry milk or 5% bovine albumin and probed with anti-IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt, or Shc antibodies. After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary ALP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody (in a dilution of 1:7500) and used for subsequent detection with BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) and NBT (nitroblue tetrazolium). To check equal protein loading, blots were probed with mouse anti-actin monoclonal antibody. Signals on membranes were quantified using a laser densitometer (LKB, Uppsala, Sweden).

#### 2.6. Immunoprecipitation

Liver and uterus lysates were normalized for protein content (450  $\mu$ g of uterine protein and 750  $\mu$ g of hepatic protein) and incubated overnight with 1  $\mu$ g of anti-IR, IRS-1, or IRS-2 antibody [13]. Immunocomplexes were absorbed with protein A-sepharose for 2 h at 4 °C and then recovered by centrifugation, washed three times and separated on SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane, and probed with an anti-phosphotyrosine or anti-p85 antibody. The secondary antibody linked to ALP was used in a dilution of 1:7500 for detection with BCIP/NBT. Signals on membranes were quantified using a laser densitometer (LKB, Uppsala, Sweden).

#### 2.7. Statistical analysis

Values are means  $\pm$  S.D., with *n* representing the number of experiments. The SPSS program for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. Results were evaluated by parametric statistics and the significance of

differences between two groups being estimated by ANOVA test.  $p < 0.05$  was considered significant (compared with the corresponding control unless otherwise specified).

### 3. Results

#### 3.1. Effect of E2 treatment on uterine weight and plasma INS, plasma Glu, and plasma FFA levels

It was previously shown that E2 treatment regulates Glu metabolism [5,29]. We questioned whether E2 is also involved in the regulation of plasma INS, plasma Glu, and plasma FFA. For these experiments, OVX female rats were intraperitoneally injected with E2 (20  $\mu$ g/kg b.wt.) 6 h before analysis. Uterine weight, plasma INS, plasma Glu, and plasma FFA were also determined in experiments performed in INS-stimulated conditions (20 IU/animal of INS, i.p., 30 min before the experiment). Table 1 shows that exposure to E2 did not change plasma INS and Glu levels, but significantly ( $p < 0.01$ ) decreased the plasma FFA level by 16.39% compared to the control and significantly increased uterine weight ( $p < 0.001$ ). In addition, E2 treatment combined with INS injection (30 min) did not change uterine weight or the plasma INS, plasma Glu, and plasma FFA levels compared to INS-treated OVX rats. However, INS administered alone significantly increased uterine weight ( $0.178 \pm 0.030$  g versus  $0.115 \pm 0.029$  g,  $p < 0.01$ ) and the plasma INS level ( $586.48 \pm 31.82$  mIU/l versus  $51.25 \pm 15.76$  mIU/l,  $p < 0.01$ ), but decreased the plasma Glu level ( $3.94 \pm 0.68$  mmol/l versus  $8.31 \pm 0.14$  mmol/l,  $p < 0.001$ ) and plasma FFA level (by 41.56%,  $p < 0.01$ ) compared to OVX controls.

#### 3.2. Effect of E2 treatment on IR protein content

To test whether the lowering of FFA by E2 has consequences in INS signaling, we examined the effect of E2 in OVX rats on IR protein content in hepatic and uterine tissues. Fig. 1 shows that exposure of OVX rats to E2 resulted in 2.3-fold increase ( $p < 0.01$ ) of uterine IR protein content, with no change of hepatic IR protein content. In contrast, pretreatment of OVX rats with E2 significantly ( $p < 0.01$ ) decreased tyrosine phosphorylation of IR in both hepatic (by 28%), and uterine (by 30%) tissues ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

#### 3.3. Effect of E2 treatment on postreceptor INS signaling in liver and uterus of OVX rats

Because of the observed changes of IR protein content in uterus and IR phosphorylation in both tissues (Fig. 1) after E2 treatment, we tested the effects of E2 on IRS-1 protein content, IRS-1 tyrosine phosphorylation, and IRS-1/p85 association (Fig. 2). When OVX rats were treated with E2, IRS-1 protein content decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in hepatic tissue by 46%, but increased significantly ( $p < 0.05$ )

Table 1  
Effects of E2 treatment on uterine weight and plasma INS, Glu, and FFA levels in OVX rats

Experimental groups	Weight of uterus (g)	INS (mIU/l)	Glu (mmol/l)	FFA (% of control)
OVX	0.115 ± 0.029	51.25 ± 15.76	8.31 ± 0.14	100 ± 4.24
OVX + E2	0.178 ± 0.022***	50.11 ± 13.79	8.73 ± 0.36	83.61 ± 5.79**
OVX + INS	0.178 ± 0.030##	586.48 ± 31.82##	3.94 ± 0.68###	66.90 ± 16.26##
OVX + INS + E2	0.189 ± 0.033###	506.74 ± 40.39##	3.90 ± 0.40###	58.44 ± 6.95###

Insulin (INS), glucose (Glu), and free fatty acid (FFA) levels were determined as described in Section 2. Data (means ± S.D.) were generated from  $n=3$  separate experiments (total of nine animals per group). OVX: ovariectomized rats; E2: estradiol treatment (20 µg/kg b.wt., i.p.) 6 h before the experiment; INS: insulin treatment (20 IU, i.p.) 30 min prior to the experiment. Comparisons of E2 effects in the absence (OVX+E2 vs. OVX) or presence (OVX + E2 + INS vs. OVX + INS) of exogenous INS are assigned an asterisk (\*), while OVX + INS vs. OVX and OVX + E2 + INS vs. OVX comparisons are assigned a sharp symbol (#). \*\* or ##  $p < 0.01$ , \*\*\* or ###  $p < 0.001$ .

by 159% in uterine tissue (Fig. 2). In addition, Fig. 2 shows no changes of IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1/p85 association in the liver. Uterine IRS-1 tyrosine phosphorylation and its association with p85 were not detected in control and E2-treated rats after INS stimulation (Fig. 2).

Further experiments were performed to test the effects of E2 treatment on IRS-2 protein content, IRS-2 tyrosine phosphorylation and IRS-2/p85 association in hepatic and

uterine tissues obtained from OVX rats (Fig. 3). E2 treatment significantly increased IRS-2 protein content by 123% ( $p < 0.001$ ) in hepatic and by 93% ( $p < 0.01$ ) in uterine tissue, while there was no effect on IRS-2 phosphorylation and IRS-2/p85 association in either tissue (Fig. 3).

Despite the lack of changes in IRS-2/p85 association upon E2 treatment (Fig. 3), uterine p85 and Akt1 protein content

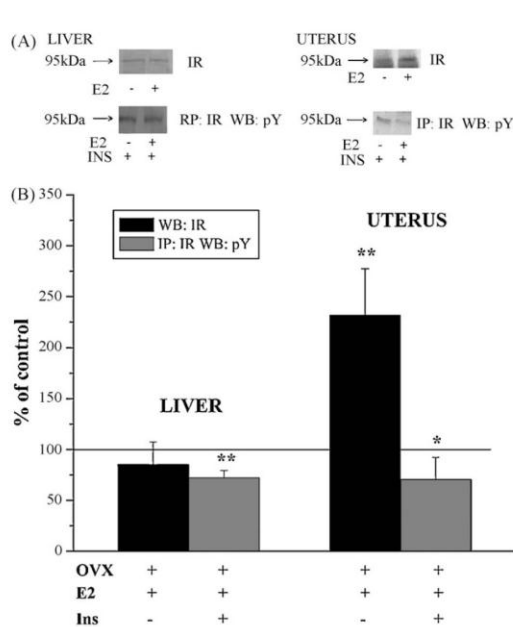


Fig. 1. Effects of E2 on hepatic and uterine IR protein content and IR tyrosine phosphorylation in OVX rats. OVX rats were treated with E2 (20 µg/kg b.wt., i.p.) 6 h before the experiment. For analysis of IR tyrosine phosphorylation, OVX rats already treated with E2, as well as control OVX animals, were injected with INS (20 IU/animal, i.p.) 30 min prior to the experiment. IP and WB assays of liver and uterus samples were performed as described in Section 2. Representative WB (A) and data generated from  $n=3$  separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means ± S.D. (B) are shown. Values for control rats were arbitrarily taken as 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate control. IR: insulin receptor; pY: tyrosine phosphorylation; OVX: ovariectomy; E2: estradiol; INS: insulin; WB: Western blot; IP: immunoprecipitation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

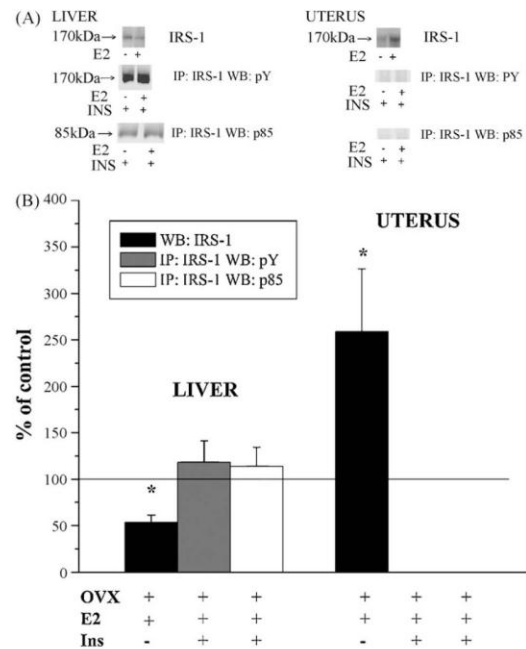


Fig. 2. IRS-1 protein content, IRS-1 tyrosine phosphorylation, and IRS-1/p85 association in the liver and uterus of E2-treated OVX rats. OVX rats were treated with E2 (20 µg/kg b.wt., i.p.) 6 h before the experiment. For analysis of tyrosine phosphorylation and IRS-1/p85 association, OVX rats already treated with E2, as well as control OVX animals, were injected with INS (20 IU/animal, i.p.) 30 min prior to the experiment. IP and WB of liver and uterus samples were performed as described in Section 2. Representative WB (A) and data generated from  $n=3$  separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means ± S.D. (B) are shown. Values for control rats were arbitrarily taken as 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate control. IRS-1: IR substrate 1. See Fig. 1 for meaning of other abbreviations (\* $p < 0.05$ ).



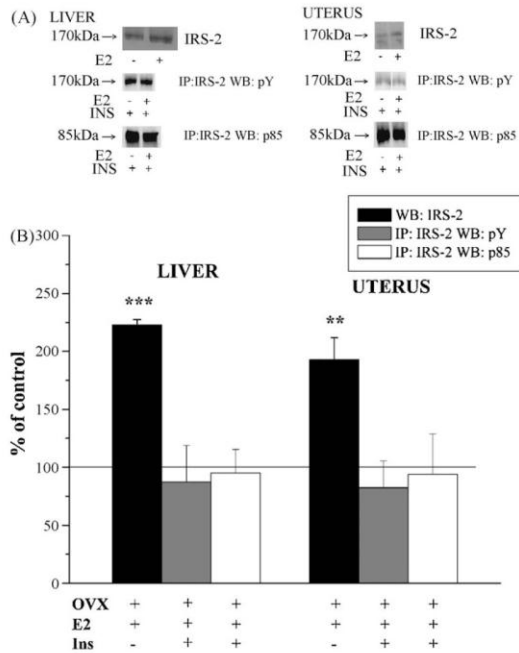


Fig. 3. Changes of hepatic and uterine IRS-2 protein content, IRS-2 tyrosine phosphorylation, and IRS-2/p85 association in OVX rats treated with E2. The content of IRS-2 protein, its tyrosine phosphorylation, and association IRS-2/p85 in the liver and uterus were determined as described for IRS-1 in the caption of Fig. 2. Values for control rats were arbitrarily taken as 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate control. IRS-2: IR substrate 2. See Fig. 1 for meaning of other abbreviations. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

increased significantly ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) by 116% and by 82%, respectively, while Shc protein content decreased significantly ( $p < 0.01$ ) by 39% in the uterus of E2-treated rats (Figs. 4–6, respectively). Protein content of these molecules was not changed in the liver of E2-treated rats (Figs. 4–6).

#### 4. Discussion

The present investigation shows that E2 administration alters INS signaling in hepatic and uterine tissues of OVX rats. This finding is in keeping with the hypothesis that the impact of E2 on INS signaling could involve PI3-K/Akt pathway and that modification of IR, IRS-1, IRS-2, and Shc might be an important intermediate signal. Furthermore, this study demonstrates an important link between E2 and INS signaling.

The obtained data show that E2 significantly increased weight of the uterus in the absence of INS treatment (Table 1). This agrees with previous observations indicating that E2 mediates uterine hypertrophy [30]. INS also induced an increase of uterine weight 30 min after administration. More-

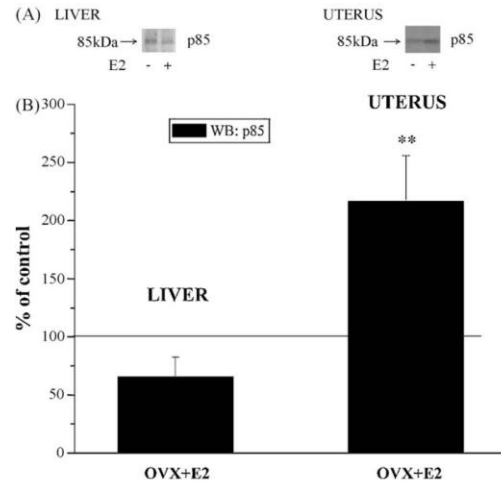


Fig. 4. Protein content of p85 in the liver and uterus of OVX rats treated with E2. OVX rats were treated with E2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.t., i.p.) 6 h before sacrifice to determine p85 protein content. WB analysis of liver and uterus samples was performed as described in Section 2. Representative WB (A) and data generated from  $n = 3$  separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  S.D. (B) are shown. Values for OVX rats were arbitrarily taken as a 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate OVX control. See Fig. 1 for meaning of abbreviations (\*\* $p < 0.01$ ).

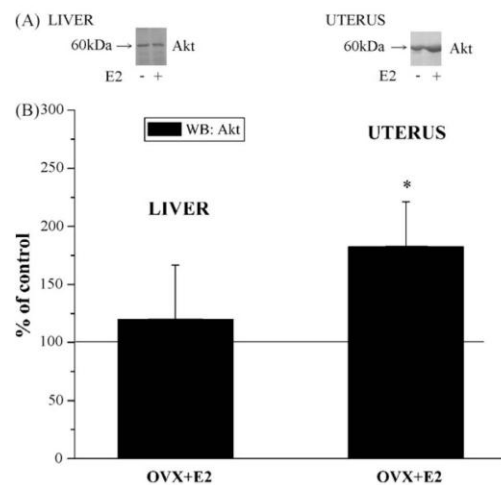


Fig. 5. Effects of E2 on protein kinase B (Akt) protein content in the liver and uterus of OVX rats. Determination of Akt1 protein content in the liver and uterus was performed by Western blot as described in Section 2. Representative WB (A) and data generated from  $n = 3$  separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  S.D. (B) are shown. Values for OVX rats were arbitrarily taken as 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate OVX control. See Fig. 1 for meaning of abbreviations (\* $p < 0.05$ ).

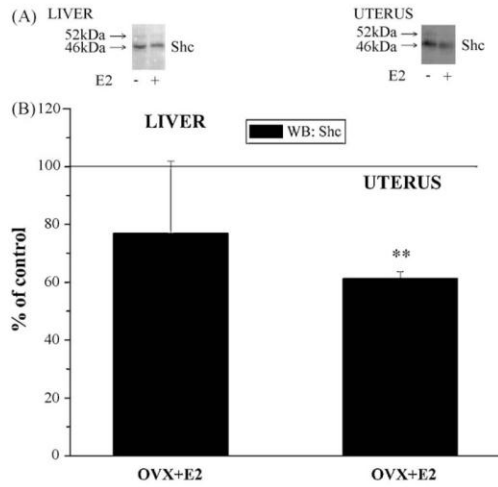


Fig. 6. Effects of E2 on hepatic and uterine content of Shc protein. Shc protein content in hepatic and uterine tissue of OVX rats was determined by Western blot as described in Section 2. Representative WB (A) and data generated from  $n = 3$  separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  S.D. (B) are shown. Values for OVX rats were arbitrarily taken as 100%, values for E2-treated rats being expressed as percentage of the appropriate OVX control. See Fig. 1 for meaning of abbreviations (\*\* $p < 0.01$ ).

over, combined treatment with E2 and INS affects uterine weight more strongly than does treatment with INS alone ( $p < 0.001$  versus  $p < 0.01$ ). Lack of changes of basal INS and Glu levels in response to E2 (Table 1) is in agreement with the results of Godsland [29] and Gonzalez et al. [2]. The given effect of E2 could be related to the timing of E2 administration which was optimized in this study to observe the peak of changes in content and function of INS signaling molecules [13–15]. To be specific, it is possible that E2 effects on plasma INS and plasma Glu levels are weakened with the passage of time and that both levels returned to the control value 6 h after treatment [31]. However, the significant decrease in the FFA level that we observed after E2 treatment (Table 1) indicates some general antidiabetogenic potential of this hormone [32,33]. This decrease supports the idea that lipid metabolism may be an important mediator of E2 effects on INS signaling. Furthermore, INS injection lowered the FFA level (Table 1). It is interesting that combined treatment with E2 and INS affect also the FFA level more strongly than does treatment with INS alone ( $p < 0.001$  versus  $p < 0.01$ ), indicating synergism of E2 and INS action in regulation of plasma FFA.

It was previously shown that low concentrations of E2 increase IR mRNA and IR protein content in the liver of OVX rats in a tissue-, dose- and time-dependent manner [3,4]. Hepatic IR tyrosine phosphorylation was even reduced, regardless of the E2 dose, on the 16th day of treatment [3,4], as we observed in both analysed tissues 6 h after single injection of E2 (Fig. 1). Differences between the results of this study,

showing no change of hepatic IR content, and published data [3,4] are probably a consequence of differences in the dose of E2 and the timing of hormone administration. The authors of these studies used doses of E2 below or above the dose of E2 used in our study and multiple injections of E2 over 16 days of treatment [3,4]. Our result indicating no changes of hepatic IR protein is in agreement with the observations of Xie et al. [1], who showed that IR protein content was not changed after treatment of HepG2 cells with different doses of E2. The estrogen response element (ERE) in the human IR gene promoter of U-937 human promonocytes was recently identified [16,34]. Thus, the increase in uterine IR protein content after E2 treatment (Fig. 1) could be attributable to transcriptional control of the IR gene by E2.

IRS-1 is the most investigated molecule of the INS signaling pathway following E2 treatment, but primarily in the context of E2/IGF-1 cross-talk [13–15]. Low doses of E2, in contrast to high doses, raise the level of tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver of OVX rats [2]. In addition, different doses of E2 increase both mRNA and protein content of IRS-1 in HepG2 cells [1]. In the uteri of E2-treated mice, IRS-1 protein was not altered, but its tyrosine phosphorylation was increased and its complex with p85 was more plentiful [13,14]. Contrary to results of other authors, we observed that acute treatment of OVX rats with E2 increased uterine, but decreased hepatic IRS-1 content (Fig. 2). This discrepancy could be a consequence of different doses or timing of E2 administration. It is also interesting that IRS-1 tyrosine phosphorylation and its association with p85 were not detected in uterine samples after INS pretreatment (Fig. 2), suggesting that INS does not act through IRS-1 in uterine tissue. The observed increase of uterine IRS-1 protein content (Fig. 2) could be a consequence of a genomic effect of E2 realized through the ERE that was recently identified in the regulatory region of the IRS-1 gene [17] or result from reduction of IRS-1 degradation [10,11].

The increase in hepatic and uterine content of IRS-2 protein was not accompanied by changes of its tyrosine phosphorylation and association with p85 in E2-treated rats (Fig. 3). However, other authors [14,15] observed decrease in the content of uterine IRS-2 mRNA and protein, but increase in the complex of the latter with p85. There is evidence suggesting that E2 decreases IRS-2 protein degradation [10], which could explain mechanism of the increase in IRS-2 protein observed in our study. The absence of changes in tyrosine phosphorylation of IRSs and their interaction with p85 could be a consequence of E2 induction of Tyr-phosphatases [22].

The obtained results indicate that E2 elevates p85 protein content in uterine tissue (Fig. 4). These data suggest that E2 can induce changes of INS signaling molecules downstream of IRSs. However, p85 content remains unchanged in the liver (Fig. 4). There are no previously published results obtained in a comparable animal model system.

In the context of elevated content of all upstream signaling molecules, E2 increases the basal content of uterine Akt protein (Fig. 5). This could be related to increase of Akt phos-

phorylation in response to E2 treatment in mouse uteri [15]. E2 did not alter basal content of hepatic Akt.

The content of Shc protein was exceptionally diminished in the uterus after E2 administration (Fig. 6). This molecule is very important for mitogenic effects of INS, and it would appear that E2 stimulates the INS metabolic pathway in the uterus and suppresses signaling leading to cell growth. Another possibility is that Shc is changed outside the context of INS signaling. Richards et al. [14] observed no changes of uterine Shc tyrosine phosphorylation and interaction with Grb2 in E2-treated OVX mice.

Collectively, these results suggest that although changes induced by E2 in hepatic INS signaling molecules are less dramatic than those observed in uterine tissue, their physiological consequences are probably more important for INS action. The decrease of IR tyrosine phosphorylation and decline of IRS-1 protein content (Figs. 1 and 2) implies attenuation of INS effects mediated by the IR/IRS-1 pathway. However, the rise in IRS-2 protein content (Fig. 3) may point to redirection of INS signaling to an IRS-2-related pathway.

Our data suggest that the consequences of enhanced uterine content of INS signaling molecules after E2 treatment could be multiple. Uterine content of molecules involved in non-genomic effects of E2 (p85 and Akt) is increased, but their hepatic content is unchanged or diminished after E2 treatment (Figs. 4 and 5). On the other hand, changes of IR and IRSs content are observed in both tissues. The obtained data on the physiological relevance of INS action in the uterus are insufficient, but the significant increase in weight of the uterus 30 min after INS administration (Table 1) points to a role of INS in regulation of uterine function. The tendency towards further increase of uterine weight after INS administration to animals previously treated with E2 indicates that the rise in content of INS signaling molecules caused by E2 probably leads to a stronger effect of INS in uterine tissue.

In summary, consistent increase in the content of INS signaling molecules in the uterus indicates that the effect of E2 is tissue-specific and more prominent in the principal estrogen target tissue (the uterus) than in the INS target tissue (the liver). These observations, in line with several recent reports indicating that INS signaling molecules can also play a role in E2 signaling [7,18], shed new light on signaling mechanisms involved in the cross-talk between E2 and INS in regulation of cell processes.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia (project grant no. 143030B). The authors wish to thank Dr. Kristina Kovacina, Department of Molecular Pharmacology, Stanford University, CA, USA, for constructive comments and the generous gift of chemicals. They are also grateful to Professor

P. Marche, Universite Pierre et Marie Curie, Hospital Broussais, Paris, France, for a critical review of the manuscript and helpful suggestions.

#### References

- [1] P. Xie, M.L. Liu, Y.P. Gu, J. Lu, X. Xu, W.M. Zeng, H.P. Song, Oestrogen improves glucose metabolism and insulin signal transduction in HepG2 cells, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (2003) 643–648.
- [2] C. Gonzalez, A. Alonso, F. Diaz, A.M. Patterson, Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1, *J. Endocrinol.* 176 (2003) 367–379.
- [3] C. Gonzalez, A. Alonso, N.A. Grueso, F. Diaz, M.M. Esteban, S. Fernandez, A.M. Patterson, Role of 17beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor, *Steroids* 67 (2002) 993–1005.
- [4] C. Gonzalez, A. Alonso, N.A. Grueso, M.M. Esteban, S. Fernandez, A.M. Patterson, Effect of treatment with different doses of 17beta-estradiol on the insulin receptor, *Life Sci.* 70 (2002) 1621–1630.
- [5] R.E. Van Pelt, W.S. Gozansky, R.S. Schwartz, W.M. Kohrt, Intravenous estrogens increase insulin clearance and action in postmenopausal women, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2003) E311–E317.
- [6] C.M. Taniguchi, B. Emanuelli, C.R. Kahn, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 85–96.
- [7] L. Bjornstrom, M. Sjoberg, Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 833–842.
- [8] A.V. Lee, J.G. Jackson, J.L. Gooch, S.G. Hilsenbeck, E. Coronado-Heinsohn, C.K. Osborne, D. Yee, Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo, *Mol. Endocrinol.* 13 (1999) 787–796.
- [9] C.A. Molloy, F.E. May, B.R. Westley, Insulin receptor substrate-1 expression is regulated by estrogen in the MCF-7 human breast cancer cell line, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12565–12571.
- [10] C. Morelli, C. Garofalo, M. Bartucci, E. Surmacz, Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells, *Oncogene* 22 (2003) 4007–4016.
- [11] C. Morelli, C. Garofalo, D. Sisci, S. del Rincon, S. Cascio, X. Tu, A. Vecchione, E.R. Sauter, W.H. Miller Jr., E. Surmacz, Nuclear insulin receptor substrate 1 interacts with estrogen receptor alpha at ERE promoters, *Oncogene* 23 (2004) 7517–7526.
- [12] R.X. Song, R.A. McPherson, L. Adam, Y. Bao, M. Shupnik, R. Kumar, R.J. Santen, Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha–Shc association and Shc pathway activation, *Mol. Endocrinol.* 16 (2002) 116–127.
- [13] R.G. Richards, R.P. DiAugustine, P. Petrusz, G.C. Clark, J. Sebastian, 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 (1996) 12002–12007.
- [14] R.G. Richards, M.P. Walker, J. Sebastian, R.P. DiAugustine, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor–insulin receptor substrate complexes in the uterus: altered signaling response to estradiol in the IGF-1 (m/m) mouse, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11962–11969.
- [15] R.G. Richards, D.M. Klotz, M.R. Bush, D.K. Walmer, R.P. DiAugustine, E2-induced degradation of uterine insulin receptor substrate-2: requirement for an IGF-I-stimulated, proteasome-dependent pathway, *Endocrinology* 142 (2001) 3842–3849.
- [16] M. Garcia-Arencibia, N. Davila, J. Campion, M. Carmen Carranza, C. Calle, Identification of two functional estrogen response elements complexed with AP-1-like sites in the human insulin receptor gene promoter, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94 (2005) 1–14.

- [17] M.L. Panno, L. Mauro, S. Marsico, D. Bellizzi, P. Rizza, C. Morelli, M. Salerno, F. Giordano, S. Ando, Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor alpha through its interaction with Sp1, *J. Mol. Endocrinol.* 36 (2006) 91–105.
- [18] X. Yu, R.V. Rajala, J.F. McGinnis, F. Li, R.E. Anderson, X. Yan, S. Li, R.V. Elias, R.R. Knapp, X. Zhou, W. Cao, Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17beta-estradiol-mediated neuroprotection, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13086–13094.
- [19] M. Collison, I.W. Campbell, I.P. Salt, A.F. Dominiczak, J.M. Connell, H. Lyall, G.W. Gould, Sex hormones induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by reducing cellular content of IRS proteins, *Diabetologia* 43 (2000) 1374–1380.
- [20] K. Muraki, S. Okuya, Y. Tanizawa, Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes, *Endocr. J.* 53 (2006) 841–851.
- [21] K. Nagira, T. Sasaoka, T. Wada, K. Fukui, M. Ikubo, S. Hori, H. Tsuneki, S. Saito, M. Kobayashi, Altered subcellular distribution of estrogen receptor alpha is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrinology* 147 (2006) 1020–1028.
- [22] C. Gonzalez, A. Alonso, N.A. Grueso, F. Diaz, M.M. Esteban, S. Fernandez, A.M. Patterson, Effect of treatment with different doses of 17beta-estradiol on insulin receptor substrate-1, *JOP* 2 (2001) 140–149.
- [23] C. Livingstone, M. Collison, Sex steroids and insulin resistance, *Clin. Sci. (Lond.)* 102 (2002) 151–166.
- [24] F. Giorgino, F. Logoluso, A.M. Davalli, R. Napoli, L. Laviola, M.F. Hirschman, E.S. Horton, G.C. Weir, R.J. Smith, Islet transplantation restores normal levels of insulin receptor and substrate tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle and myocardium of streptozocin-induced diabetic rats, *Diabetes* 48 (1999) 801–812.
- [25] W.G. Duncombe, The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma, *Clin. Chim. Acta* 9 (1964) 122–125.
- [26] J. Dupont, M. Derouet, J. Simon, M. Taouis, Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) E309–E316.
- [27] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [28] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [29] I.F. Godsland, Oestrogens and insulin secretion, *Diabetologia* 48 (2005) 2213–2220.
- [30] A.L. Ruzicky, Effects of 17beta-estradiol and progesterone on mitogen-activated protein kinase expression and activity in rat uterine smooth muscle, *Eur. J. Pharmacol.* 300 (1996) 247–254.
- [31] M.T. Sutter-Dub, Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte, and other cell types, *Steroids* 67 (2002) 77–93.
- [32] J.F. Louet, C. LeMay, F. Mauvais-Jarvis, Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models, *Curr. Atheroscler. Rep.* 6 (2004) 180–185.
- [33] M.D. Jensen, M.L. Martin, P.E. Cryer, L.R. Roust, Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) E914–E920.
- [34] M. Garcia-Arencibia, S. Molero, N. Davila, M.C. Carranza, C. Calle, 17beta-estradiol transcriptionally represses human insulin receptor gene expression causing cellular insulin resistance, *Leuk. Res.* 29 (2005) 79–87.

## Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart

Goran Koricanac<sup>1\*</sup>, Tijana Milosavljevic<sup>1</sup>, Mojca Stojiljkovic<sup>1</sup>, Zorica Zakula<sup>1</sup>, Snezana Tepavcevic<sup>1</sup>, Nevena Ribarac-Stepic<sup>1</sup> and Esma R. Isenovic<sup>2</sup>

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

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

It is well known that variation in the concentration of estrogens affects insulin action. In this study we examine the impact of estradiol (E2) on insulin signaling in the rat heart. Ovariectomized female rats were treated with E2 6 h prior to analysis of basal protein and mRNA content of insulin signaling molecules, and additionally with insulin 30 min before the experiment to delineate E2 effects on phosphorylations and molecular associations relevant for insulin signaling. The results show that E2 decreased insulin receptor (IR) tyrosine phosphorylation, while it did not alter IR protein and mRNA content. E2 administration did not change IR substrate 1 (IRS-1) protein content and tyrosine phosphorylation, while decreased mRNA content and increased its association with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). E2 decreased protein and mRNA content of IR substrate 2 (IRS-2), while did not change IRS-2 tyrosine phosphorylation and IRS-2 association with p85. The increase of IRS-1/p85 is accompanied by increase of p85 protein and mRNA levels, and by stimulation of protein kinase B (Akt) Ser<sup>473</sup> phosphorylation. In contrast, Akt protein and mRNA content were not changed. In summary, although in some aspects cardiac insulin signaling is obviously improved by E2 treatment (increase of p85 mRNA and protein levels, enhancement of IRS-1/p85 association and Ser<sup>473</sup> Akt phosphorylation), the observed decrease of IR tyrosine phosphorylation, IRS-2 protein content, and IRSs mRNA contents, suggest very complex interplay of beneficial and suppressive effects of E2, both genomic and non-genomic, in regulation of heart insulin signaling. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — 17 $\beta$ -estradiol; heart; insulin signaling; insulin receptor; PI3 kinase; Akt

### INTRODUCTION

The binding of insulin to the  $\alpha$ -subunit of the insulin receptor (IR) results in autophosphorylation and activation of its  $\beta$ -subunit. Activated IR phosphorylates IR substrates (IRSs), like IR substrate 1 (IRS-1) and IR substrate 2 (IRS-2), at tyrosine residues, and tyrosine-phosphorylated IRS binds to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), causing activation of the p110 catalytic subunit. PI3K generates PI triphosphate from PI bisphosphate, leading to the phosphorylation and activation of protein kinase B (Akt), an important mediator of the insulin-induced uptake of glucose.<sup>1</sup>

The early steps of insulin signaling in the heart include phosphorylation (activation) of the IR and engagement of IRS-1 and -2 with consequent activation of PI3K.<sup>2–4</sup> Mice lacking IR show impaired cardiac performance at 6 months. Signaling from these receptors is required for normal cardiac metabolism and function.<sup>5,6</sup> PI3K and Akt play an important role in the heart through regulation of cardiomyocyte

growth, survival, function, and metabolism.<sup>7</sup> Acute activation of PI3K and Akt has beneficial cardioprotective effects both *in vitro* and *in vivo*.<sup>8,9</sup> Activation of PI3K and Akt also plays an important role in promoting cardiomyocyte survival and function in models of cardiac injury.<sup>10</sup> Alterations in PI3K activity found in conditions from hypertrophy to heart failure are likely to be involved in the pathologic progression of those diseases.<sup>11</sup>

Insulin signaling influences many functions in the heart, for example metabolic substrate preference, cell size, and the heart's response to ischemia and hypertrophy.<sup>12</sup> Insulin plays a major role in regulating the balance of metabolic fuels received by the myocardium<sup>13</sup> and has direct effects on cardiac glucose transport, glycolysis, glucose oxidation, and glycogen synthesis, altering translocation of glucose transporters (GLUT) GLUT-1 and GLUT-4, changing the activity of cardiac enzymes of carbohydrate metabolism,<sup>14</sup> and suppressing fatty acid utilization by the heart.<sup>15</sup> Insulin's antilipolytic effect reduces the delivery of free fatty acid (FFA) to the heart and reduces fatty acid oxidation rates.<sup>14</sup> In addition to its metabolic effects, the actions of insulin on cellular gene expression may also contribute to cardiac myocyte growth in the normal heart and in hypertrophy.<sup>12,14</sup> Moreover, treatment with insulin markedly reduces myocardial apoptotic death<sup>14</sup> and the effects are mediated by PI3K.<sup>16</sup>

\*Correspondence to: Dr G. Koricanac, Laboratory for Molecular Biology and Endocrinology, Vinca Institute of Nuclear Sciences, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia. Tel: 381 11 2442 532; Fax: 381 11 2455 561. E-mail: gogi@vinca.rs

The heart is an insulin-responsive organ and disorders of insulin action such as diabetes and obesity can have profound effects on cardiac function.<sup>14,17</sup> Not only that cardiovascular disease is the primary cause of death in individuals with diabetes, but also impaired insulin signaling is a characteristic of the heart in insulin resistant state and it may contribute to altered myocardial substrate utilization, energetics and cardiac electrophysiology.<sup>17</sup> New findings on gene modulation by estrogen receptor (ER) of insulin-sensitive tissues indicate that estradiol (E2) participates in glucose homeostasis by modulating the expression of genes that are involved in insulin sensitivity and glucose uptake. Drugs that can selectively modulate the activity of ER in their interactions with target genes represent a promising frontier in diabetes mellitus adjuvant therapy.<sup>18</sup> Moreover, chronic E2 treatment has some beneficial effects on cardiovascular disease, which come from the results of improvement of insulin sensitivity and post-ischemia cardiac function.<sup>19</sup>

Insulin and E2 realize their myocardial antiapoptotic effect through the PI3K/Akt pathway<sup>16,20</sup> and treatment with insulin (like E2 treatment) results in increased Akt phosphorylation through the PI3K signaling pathway in ischemic/reperfused myocardial tissue.<sup>21</sup> Thus, E2 alters the insulin signaling cascade and some cardiac effects of E2 and insulin are mediated by the same signaling pathways. Long-term estrogen replacement treatment might protect the cardiovascular system by decreasing blood pressure and inducing the expression of IRS-1 in myocardium.<sup>22</sup>

Based upon (i) our recently published observation that E2 treatment decreases the FFA plasma level,<sup>23</sup> which is important for cardiac insulin sensitivity and heart fuel utilization,<sup>24,25</sup> (ii) data indicating that insulin and E2 regulate the same processes in the heart,<sup>20</sup> (iii) reports that E2 exerts non-genomic effects through the PI3K/Akt pathway,<sup>26,27</sup> and (iv) data indicating that E2 regulates genes of some insulin signaling molecules,<sup>28–30</sup> we initiated the present study on the hypothesis that E2 unquestionably influences heart insulin signaling.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Porcine insulin was purchased from Galenika (Zemun, Serbia). Polyclonal anti-IR $\beta$  antibody, anti-IRS-1, IRS-2, Akt, anti-phospho Ser<sup>473</sup>-Akt (pAkt), and secondary anti-mouse antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal anti-p85 and anti-phosphotyrosine antibody PY20 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Reagents for the bicinchoninic acid (BCA) assay were purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). Secondary anti-rabbit antibody, monoclonal mouse anti-actin antibody, 17 $\beta$ -estradiol, and protein A-sepharose were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). The TRIZOL used is a product of the Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA).

All chemicals for the RT PCR assay were purchased from Fermentas (Vilnius, Lithuania).

### Animals

The rat hearts used in this study were from the same animals described in a recently published paper.<sup>23</sup> As previously indicated, female Wistar rats (2.5–3 months old; 200–250 g) maintained at 22°C under conditions of a 12/12 h light-dark regime with rat chow and water *ad libitum*, were ovariectomized (OVX) 2 weeks prior to the experiment under Nesdonal anesthesia. The basal protein and mRNA content of insulin signaling molecules was determined, without addition of exogenous insulin. Analysis of tyrosine phosphorylation of IR and IRSs, association of IRS/p85, and phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> was performed in insulin-stimulated conditions in order to observe E2 effects relevant for insulin action. Animals were divided into two main experimental groups: control (OVX) and E2-treated. Each experiment was repeated three times ( $n = 3$ ) using three rats per group per experiment.

After overnight fasting, animals were injected intraperitoneally with E2 (20  $\mu$ g/kg b.wt.) and sacrificed 6 h after E2 administration. The timing of E2 administration was optimized to observe the peak of changes in protein content, mRNA content, and function of insulin signaling molecules. Optimization of the timing of E2 administration was performed on the basis of data published by Richards.<sup>31–33</sup> In addition, the evidence collected in the past years indicates that the heart is regulated by a complex interplay of genomic and non-genomic signaling mechanisms of E2, and the integrated action of these machineries has important functional roles in a regulation of physiological processes. In view of these facts, we selected the time that allows E2 to realize both kind of effects, particularly long-term genomic effects.

After overnight fasting, the control animals received 0.14 M NaCl with 1% ethanol and were sacrificed along with their E2-treated counterparts. For the experiments investigating phosphorylation and association of insulin signaling molecules, E2-treated and control OVX rats were injected additionally with insulin (20 IU/animal, i.p.) 30 min before the experiment.<sup>34</sup> Animal experiments were conducted according to standards approved by the official Vinca Institute's Ethical Committee for Experimental Animals.

### Determination of plasma insulin, plasma glucose, and plasma FFA levels

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

Germany). The plasma FFA level was measured using a modified version of the method of Duncombe.<sup>35</sup>

#### Tissue sample preparation

After decapitation, rat hearts were homogenized on ice with an Ultra-Turrax homogenizer in buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, and 10 µg/ml aprotinin), and phosphatase inhibitors (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, and 2 mM sodium orthovanadate).<sup>36</sup> Homogenates were centrifuged at 600 × g for 20 min at 4°C, after which supernatants were ultracentrifuged for 60 min at 100 000 × g. Protein concentration was determined by the BCA method. Supernatants were used for Western blot (WB) analysis or immunoprecipitation (IP) with anti-IR, IRS-1, or IRS-2 antibodies.

#### Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting

Lysate proteins (50 µg/lane) were separated by 7.5 or 10% SDS polyacrylamide gels<sup>37</sup> and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked with either 5% non-fat dry milk or 5% bovine albumin and probed with anti-IR, IRS-1, IRS-2, p85, Akt, or phospho Akt antibodies. After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary alkaline phosphatase (ALP)-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody (in a dilution of 1:7500) and used for subsequent detection with BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) and NBT (nitroblue tetrazolium). After analysis of pAkt, membranes were stripped and reblotted with antibody detecting total Akt content. In order to be sure that protein loading was equal in all samples, blots were probed with mouse anti-actin monoclonal antibody. Signals on membranes were quantified using a laser densitometer (LKB, Uppsala, Sweden).

#### Immunoprecipitation

Heart lysates were normalized for protein content (750 µg) and incubated overnight with 1 µg of anti-IR, IRS-1, or IRS-

2 antibody.<sup>31</sup> Immunocomplexes were absorbed with protein A-Sepharose for 2 h at 4°C and then recovered by centrifugation, washed three times and separated on SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane, and probed with an anti-phosphotyrosine or anti-p85 antibody. The secondary antibody linked to ALP was used in a dilution of 1:7500 for detection with BCIP/NBT. Signals on membranes were quantified using a laser densitometer (LKB, Uppsala, Sweden).

#### RNA isolation

Total RNA from the heart of rats was isolated by TRIZOL reagent according to the procedure recommended by the manufacturer (Invitrogen). Briefly, 100 mg of tissue was homogenized in 1 ml of TRIZOL and the aqueous phase was collected after addition of chloroform. RNA was precipitated with isopropyl alcohol and washed with 75% ethanol. The RNA pellet was dried and redissolved in diethylpyrocarbonate-water. RNA concentration and purity were determined by measurement of absorbance at 260/280 nm. For control of degradation of RNA, samples (2.5 or 5 µg of total RNA) were analyzed by 1.2% agarose electrophoresis.

#### Reverse transcription and PCR amplifications

cDNA synthesis was carried out with the RNA PCR Core Kit from Fermentas. Equal amounts of total RNA (2.5 µg) were heat-denatured and reverse-transcribed by incubation at 37°C for 60 min in a final volume of 20 µl. The reactions were terminated by heating for 10 min at 70°C and finally for 5 min at 4°C.

For semiquantitative PCR, 2 µl aliquots of the cDNA samples (equivalent to 250 ng total RNA input) were amplified using Fermentas Hot Start Taq DNA Polymerase and an appropriate pair of primers deduced from cloned rat insulin signaling molecules (Table 1).<sup>38</sup> The number of cycles was optimized to ensure amplification in the exponential phase of PCR. Conditions for the amplification were: 45 s at 94°C, 60 s at temperature optimal for annealing primers, and 60 s at 72°C. To make possible appropriate amplification in the exponential phase for each target, PCR

Table 1. Primer design and PCR protocols (annealing temperature and number of cycles)

Product size	PCR primer sequences	PCR protocols	GenBank accession number
IR (376 bp)	sense: AGCCTGGCTGAGCAACCTTA antisense: CATAGGTCGGTTTGATGCTC	58°C, 35 cycles	<a href="#">M29014.1</a>
IRS-1 (511 bp)	sense: ACAGGCATTGCTGCAGAGAA antisense: GGTGCTGCTTAACATCCTTG	58°C, 35 cycles	<a href="#">X58375.1</a>
IRS-2 (453 bp)	sense: ATATGAGCATGGATAGGCC antisense: GTGGTTGCAGGATCTGCTTA	60°C, 35 cycles	<a href="#">XM_001076309.1</a>
p85 (170 bp)	sense: gactgaggaagactgaag antisense: cgttccaaccattgcttc	58°C, 35 cycles	<a href="#">D64045</a>
Akt (411 bp)	sense: CTCTGCATTGCCGAGTCC antisense: TGTCACTTGATCAGGCCGGT	58°C, 35 cycles	<a href="#">NM_033230</a>
GAPDH (308 bp)	sense: TCCCTCAAGATTGTCAGCAA antisense: AGATCCACAACGGATACATT	58°C, 30 cycles	<a href="#">XR_009165.1</a>

IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase.

amplifications of insulin signaling molecules and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were carried out in separate reactions with a different number of cycles, but using equal amounts of the corresponding cDNA templates, generated in single RT reactions. The reverse transcription and PCR reaction were carried out in the Mastercycler Personal System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The final PCR products were separated on 2% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 µg/ml), then visualized and photographed in Gel Doc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The molecular size of PCR products was determined by comparison with size markers run together with the cDNA products. Expression of mRNA of insulin signaling molecules is expressed in relation to GAPDH mRNA.

#### Statistical analysis

Values are the means ± SD of at least three independent experiments each performed with three animals per group. The SPSS program for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. The results were evaluated by parametric statistics, and the significance of differences between two groups was estimated by the ANOVA test.  $p < 0.05$  was considered significant (compared with control unless otherwise specified).

## RESULTS

### Plasma insulin, plasma glucose, and plasma FFA levels in OVX rats treated with E2

The effect of E2 on plasma insulin, plasma glucose, and plasma FFA was determined in experiments performed with or without additional insulin stimulation (Table 2). As we reported previously,<sup>23</sup> exposure to E2 did not change plasma insulin and glucose levels, but significantly ( $p < 0.01$ ) decreased the plasma FFA level compared to the control. The OVX and E2-treated rats seem to be hyperinsulinemic and hyperglycaemic. Furthermore, E2 combined with insulin did not change the plasma insulin, plasma glucose, and plasma FFA levels compared to insulin-treated OVX rats. However, insulin administered alone unquestionably increased the plasma insulin level ( $p < 0.01$ ), but decreased

the plasma glucose level ( $p < 0.001$ ) and plasma FFA level ( $p < 0.01$ ) compared to OVX controls.

### Alterations of cardiac IR in OVX rats treated with E2

Since we recently showed that E2 administration caused alteration of the FFA level,<sup>23</sup> strongly indicating changes in cardiac insulin signaling,<sup>24</sup> we further analyzed the effect of E2 on early steps of the insulin signaling cascade. Figure 1 shows that E2 treatment did not alter basal IR protein content and basal IR mRNA content in the heart, but significantly decreased insulin-stimulated cardiac IR tyrosine phosphorylation ( $p < 0.01$ ) 6 h after administration.

### E2-induced changes of heart IRSs

The observed decrease in receptor tyrosine phosphorylation (Figure 1) led us to further analyze IRSs function. The results show that basal cardiac IRS-1 protein and insulin-stimulated tyrosine phosphorylation did not change following acute E2 administration, while its insulin-stimulated association with the p85 subunit of PI3K significantly increased at 6 h ( $p < 0.05$ ) (Figure 2). However, E2 treatment significantly decreased mRNA content of IRS-1 ( $p < 0.01$ ).

In difference to IRS-1, basal heart IRS-2 protein content decreased 6 h after E2 treatment ( $p < 0.001$ ) (Figure 3). The decrease in protein content was accompanied to significant decrease in basal mRNA content of IRS-2 ( $p < 0.05$ ). Despite the decrease in IR tyrosine phosphorylation, E2 treatment did not change insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and IRS-2/p85 association (Figure 3).

Although E2 administration significantly altered only IRS-2 protein content and changed significantly IRSs mRNA content, protein and messenger content of both IRSs had a tendency to decline 6 h following E2 treatment (Figures 2 and 3). It is also interesting that association of both IRSs with p85 tended to increase, but only IRS-1/p85 significantly (Figures 2 and 3).

### Effect of E2 on cardiac p85/Akt signaling

Since we previously showed that upstream insulin signaling changed after E2 treatment and because of the important role

Table 2. Plasma insulin, plasma glucose, and plasma FFA levels in OVX rats treated with E2

Experimental groups	Insulin (mIU/l)	Glucose (mmol/l)	FFA (% of control)
OVX	51.25 ± 15.76	8.31 ± 0.14	100 ± 4.24
OVX + E2	50.11 ± 13.79	8.73 ± 0.36	83.61 ± 5.79**
OVX + Insulin	586.48 ± 31.82###	3.94 ± 0.68####	66.90 ± 16.26##
OVX + Insulin + E2	506.74 ± 40.39##	3.90 ± 0.40####	58.44 ± 6.95###

Insulin, glucose, and free fatty acid (FFA) levels were determined as described in Section "Materials and Methods." Data (means ± SD) were generated from  $n = 3$  separate experiments (total of nine animals per group). OVX, ovariectomized rats; E2, estradiol treatment (20 µg/kg b.wt., i.p.) 6 h before the experiment; INS, insulin treatment (20 IU, i.p.) 30 min before the experiment. Comparisons of E2 effects in the absence (OVX + E2 vs. OVX) or presence (OVX + E2 + INS vs. OVX + INS) of exogenous INS are assigned an asterisk, while OVX + INS vs. OVX and OVX + E2 + INS vs. OVX comparisons are assigned a sharp symbol. \*\* or ##  $p < 0.01$ , or ###  $p < 0.001$ .



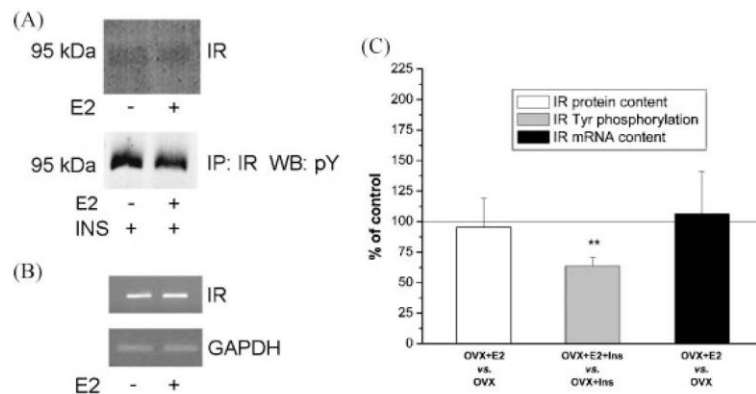


Figure 1. Impact of E2 on heart IR protein content, IR Tyr-phosphorylation, and IR mRNA content. OVX rats were treated with E2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.wt., i.p.) 6 h before the experiment. For analysis of IR Tyr-phosphorylation, OVX rats already treated with E2 and control OVX animals were injected with insulin (20 IU/animal, i.p.) 30 min before the experiment. IP, WB, and RT PCR assays of heart samples were performed as described in Section "Materials and Methods." Representative WB (A), representative PCR (B), and data generated from three separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  SD (C) are shown. Values for E2-treated rats are expressed as % of the appropriate control. OVX rats were control to E2 treated OVX rats for basal protein and mRNA content analyses, while OVX rats treated with insulin were control to OVX rats treated with E2 and insulin for analysis of IR phosphorylation. IR, insulin receptor; pY, tyrosine phosphorylation; OVX, ovariectomy; E2, estradiol; INS-insulin; WB, Western blot; IP, immunoprecipitation. RT PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction. \*\* $p < 0.01$

of the PI3K/Akt pathway in insulin and E2 signaling in the heart,<sup>16,20</sup> we performed further analysis of p85 and Akt protein and mRNA content. The presented results indicate that the rise of insulin-stimulated cardiac IRS-1/p85 (Figure 2) is orchestrated with E2-induced basal p85 protein ( $p < 0.01$ ) and p85 mRNA ( $p < 0.001$ ) content in the rat heart (Figure 4).

Moreover, Akt protein and mRNA content in the rat heart did not change after E2 treatment (Figure 5). However, insulin-stimulated phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> (the pAkt/Akt ratio) increased significantly ( $p < 0.001$ ) 6 h after

E2 administration (Figure 5). E2 also increased the basal level of Ser<sup>473</sup> pAkt/Akt (our preliminary data). These effects of E2 are apparently beneficial for heart insulin action.

## DISCUSSION

The heart is capable of utilizing a variety of metabolic substrates and is able to rapidly adjust its substrate utilization in response to changes of substrate supply. Fatty acids are the major metabolic substrate for the heart, and

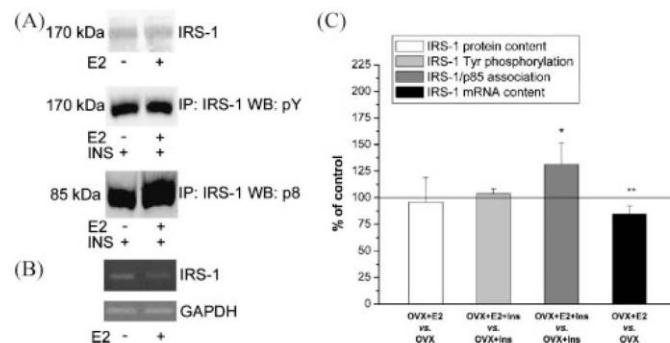


Figure 2. IRS-1 protein content, IRS-1 Tyr-phosphorylation, IRS-1/p85 association, and IRS-1 mRNA content in the heart of E2-treated OVX rats. OVX rats were treated with E2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.wt., i.p.) 6 h before the experiment. For analysis of Tyr-phosphorylation and IRS-1/p85 association, OVX rats already treated with E2 and control OVX animals were injected with insulin (20 IU/animal, i.p.) 30 min before the experiment. IP, WB, and RT PCR of heart samples were performed as described in Section "Materials and Methods." Representative WB (A), representative PCR (B), and data generated from three separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  SD (C) are shown. Values for E2-treated rats are expressed as % of the appropriate control. OVX rats were control to E2 treated OVX rats for basal protein and mRNA content analyses, while OVX rats treated with insulin were control to OVX rats treated with E2 and insulin for analyses of IRS-1 phosphorylation and IRS-1/p85 association. IRS-1—IR substrate 1. The meanings of other abbreviations are the same as in Figure 1. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

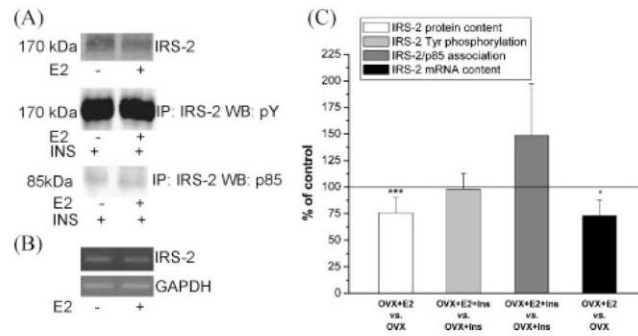


Figure 3. Changes of cardiac IRS-2 protein content, IRS-2 Tyr-phosphorylation, IRS-2/p85 association, and IRS-2 mRNA content in OVX rats treated with E2. The content of IRS-2 protein, its Tyr-phosphorylation, association of IRS-2 and p85, and IRS-2 mRNA content in the heart were determined as described for IRS-1 in the caption to Figure 2. Values for E2-treated rats are expressed as % of the appropriate control. OVX rats were control to E2 treated OVX rats for basal protein and mRNA content analyses, while OVX rats treated with insulin were control to OVX rats treated with E2 and insulin for analyses of IRS-2 phosphorylation and IRS-2/p85 association. IRS-2—IR substrate 2. The meanings of other abbreviations are the same as in Figure 1. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

FFA use is increased in the diabetic heart as a result of high plasma FFA concentrations.<sup>15</sup> Increased concentrations of fatty acids inside myocytes will impair myocardial function.<sup>24,39</sup> Improvement of myocardial contractile function in acute ischemia is associated with decreased FFA oxidation and increased glucose uptake.<sup>40</sup> Excess glucose or fatty acids can lead to myocardial insulin resistance.<sup>24,25</sup>

As we reported previously,<sup>23</sup> E2 did not change the plasma glucose and insulin levels, but significantly lowered the plasma FFA level 6 h after treatment (Table 2).

The OVX and E2-treated rats seem to be hyperinsulinemic and hyperglycaemic (Table 2). Published data show no change or increase in glucose level after ovariectomy and no change, increase, or even decrease of insulin level in OVX animals compared to sham operated.<sup>22,41,42</sup> The effects of OVX and E2 treatment are not consistent and depends on duration of postovariectomy period, E2 dose, time of

hormone treatment, application procedure etc. In accordance with our observation, Liu *et al.*<sup>22</sup> suggested that ovariectomy increases glucose and insulin level, but E2 decreases them below the control level. In addition, in studies of Song *et al.*<sup>41</sup> and Barros *et al.*<sup>42</sup> the concentration of glucose in sham operated, ovariectomized, and E2-treated rats was as high as in our study. Increased glucose and insulin concentration in our study could be a consequence of ovariectomy that E2 was not able to revert in acute treatment 6 h before analysis. It is also possible that fast E2 effects on plasma insulin and glucose levels are weakened with the passage of time and that both levels returned to the control (OVX) values 6 h after treatment. Molecular mechanism of changes in glucose and insulin level caused by variation of E2 concentration could be related to the effects of E2 on insulin secretion,<sup>43,44</sup> insulin clearance,<sup>45</sup> and glucose transport into target cells.<sup>42,46</sup>

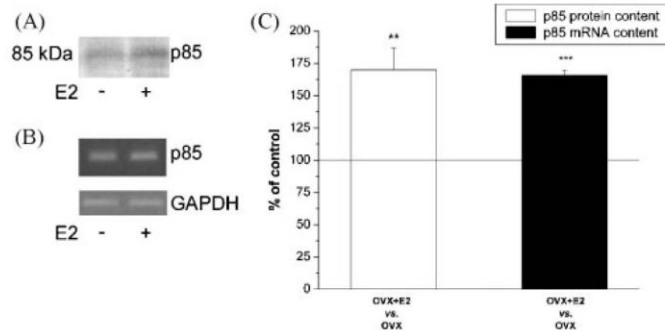


Figure 4. Protein content and mRNA content of p85 in the heart of OVX rats treated with E2. OVX rats were treated with E2 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.wt., i.p.) 6 h before sacrifice. WB and RT PCR analysis of heart samples was performed as described in Section "Materials and Methods." Representative WB (A), representative PCR (B), and data generated from three separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  SD (C) are shown. Values for E2-treated rats are expressed as % of the OVX control. The meanings of abbreviations are the same as in Figure 1. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

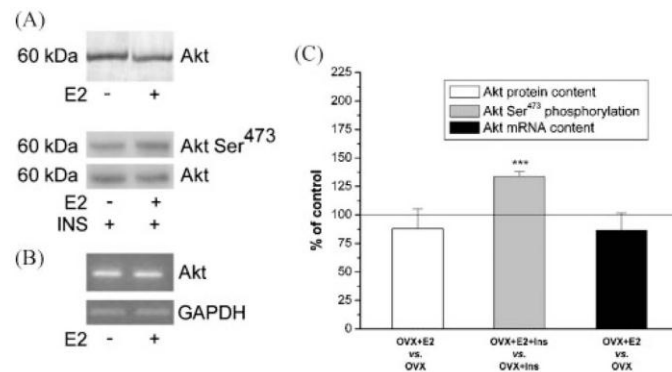


Figure 5. Effects of E2 on Akt protein content, Akt phosphorylation at Ser<sup>473</sup>, and Akt mRNA content in the heart of OVX rats. Determination of Akt protein content, phosphorylation at Ser<sup>473</sup> (pAkt/total Akt), and mRNA content in the heart was performed by Western blot and RT PCR as described in Section "Materials and Methods." For analysis of the pAkt/total Akt ratio, OVX rats already treated with E2 and control OVX animals were injected with insulin (20 IU/animal, i.p.) 30 min before the experiment. Representative WB (A), representative PCR (B), and data generated from three separate experiments (total of nine animals per group) expressed as means  $\pm$  SD (C) are shown. Values for E2-treated rats are expressed as % of the appropriate control. OVX rats were control to E2 treated OVX rats for basal protein and mRNA content analyses, while OVX rats treated with insulin were control to OVX rats treated with E2 and insulin for analysis of Akt phosphorylation. The meanings of abbreviations are the same as in Figure 1. \*\*\* $p < 0.001$

Significant decrease in the FFA level indicates some general antidiabetogenic potential of E2.<sup>47,48</sup> This decrease could be especially important for cardiac insulin signaling and cardiac metabolism and supports the idea that lipid metabolism may generally be an important mediator of E2 effects on insulin signaling.

In this study, E2 treatment did not influence IR protein and mRNA content (Figure 1), although an estrogen response element (ERE) in the human IR gene promoter of U-937 human promonocytes was recently identified.<sup>28,29</sup> These observations are in accordance with reports indicating that the plasma estrogen level does not significantly influence IR expression.<sup>22</sup> However, E2 administration significantly lowered IR tyrosine phosphorylation in the present study, which could be related to induction of some tyrosine phosphatases.<sup>49</sup>

Liu *et al.*<sup>22</sup> observed that long-term estrogen replacement treatment induces expression of IRS-1 in the myocardium. This could be attributable to a genomic effect of E2 realized through the ERE that was recently identified in the regulatory region of the IRS-1 gene.<sup>30</sup> However, our results show that IRS-1 protein content was not modified 6 h after E2 treatment, while its mRNA content was decreased (Figure 2). In addition, E2-induced association between cardiac IRS-1 and p85 might be related to increase of p85 protein content (Figure 4). Changes in Tyr phosphorylation of IRSs and their association with p85 can be a consequence of E2 induction of Tyr-phosphatases.<sup>49</sup> Moreover, E2 treatment decreased both IRS-2 protein content and mRNA content (Figure 3). Since E2 regulates IRS-2 protein degradation,<sup>50,51</sup> this might explain decrease of IRS-2 protein content. It is important to emphasize that the observed changes in both IRSs after E2 treatment have similar tendencies (regardless of their significance):

decrease of protein and mRNA content, but increase of IRS/p85 association.

The PI3K/Akt pathway is important for cardiac effects of insulin and E2, as reported previously.<sup>16,20,27</sup> However, to the best of our knowledge, the relevance of these E2-induced changes in the content of these molecules for insulin signaling in the heart has not been studied before. The observed increase of basal cardiac p85 protein and mRNA content (Figure 4), accompanied by increased insulin-stimulated IRS-1/p85 association (Figure 2) suggests beneficial effects of E2 on insulin signaling and cardiac insulin action. E2 treatment did not change Akt protein and mRNA content, while basal (results not shown) and insulin-induced phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> were increased by E2 (Figure 5). This result is in accordance with published data indicating that E2 replacement does not affect the total cardiac Akt level. However, Akt activation, presented either as the absolute pAkt level or as a percentage of total Akt (the pAkt-to-Akt ratio), was significantly reduced in the OVX group and restored by E2 replacement.<sup>52</sup> In addition, an increase of Akt at Ser<sup>473</sup> phosphorylation was observed in the heart following E2 preconditioning, this increase occurring in combination with no changes in the levels of total Akt.<sup>53</sup>

In summary, these results, together with other recently reported data of ours<sup>23</sup>, show that E2 induces decrease in the plasma FFA level, increase of IRS-1/p85 association, increase of p85 mRNA and protein content, and increase of Akt phosphorylation at Ser<sup>473</sup>. Taken together, these data indicate a beneficial effect of this hormone on cardiac insulin signaling and insulin action in the heart. However, decreases of IR tyrosine phosphorylation, IRS-2 protein content, and IRSs mRNA content were also registered. Thus, the results presented in this study suggest very complex interplay of

beneficial and suppressive effects of E2, both genomic (e.g., IRSs and p85 mRNA content changes) and non-genomic (e.g., induction of phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup>), with potentially significant implications for cardiac physiology.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Project grant No. 143030B (to E.R.I.), the Ministry of Science, Republic of Serbia. The authors acknowledge to Dr Kristina Kovacina, Department of Molecular Pharmacology, Stanford University, CA, USA, and Professor P. Marche, Universite Pierre et Marie Curie, Hospital Broussais, Paris, France, for constructive comments and the generous gift of chemicals.

#### REFERENCES

- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 85–96. DOI: 10.1038/nrm1837
- Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. Insulin signaling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovasc Res* 1998; **40**: 96–102. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00098-4
- Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca<sup>2+</sup>-ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem* 1997; **272**: 23696–23702.
- Thirone AC, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 2006; **17**: 72–78. DOI: 10.1016/j.tem.2006.01.005
- Eckel J, Reinauer H. Characteristics of insulin receptors in the heart muscle: binding of insulin to isolated muscle cells from adult rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1980; **629**: 510–521. DOI: 10.1016/0304-4165(80)90156-7
- Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, et al. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 1649–1664. DOI: 10.1128/MCB.01110-06
- Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, et al. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37670–37677. DOI: 10.1074/jbc.M204572200
- Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle* 2003; **2**: 220–223.
- Shioi T, Kang PM, Douglas PS, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *Embo J* 2000; **19**: 2537–2548. DOI: 10.1093/emboj/19.11.2537
- Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38**: 63–71. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.11.005
- Naga Prasad SV, Perrino C, Rockman HA. Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2003; **13**: 206–212. DOI: 10.1016/S1050-1738(03)00080-X
- Abel ED. Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep* 2004; **6**: 416–423.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 1997; **34**: 3–24. DOI: 10.1016/S0008-6363(97)00051-5
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 2002; **109**: 629–639. DOI: 10.1172/JCI0213946
- Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci* 2004; **9**: 201–215.
- Gao F, Gao E, Yue TL, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002; **105**: 1497–1502. DOI: 10.1161/01.CIR.000012529.00367.0F
- Abel ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; **5**: 219–226. DOI: 10.2174/1568008054064869
- Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 425–431. DOI: 10.1016/j.molmed.2006.07.004
- Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP. Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol* 2004; **97**: 485–493. DOI: 10.1016/j.ijcard.2003.11.046
- Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res* 2004; **95**: 692–699. DOI: 10.1161/01.RES.0000144126.57786.89
- Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Esteban MM, Fernandez S, Patterson AM. Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on the insulin receptor. *Life Sci* 2002; **70**: 1621–1630. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)01489-3
- Liu ML, Xu X, Xie P, et al. Effects of long-term estrogen replacement treatment on the blood pressure and expression of IR and IRS-1 in myocardium. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; **30**: 38–40.
- Koricanac G, Milosavljevic T, Stojilkovic M, Zakula Z, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER. Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; **108**: 109–116. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2007.06.001
- Monti LD, Landoni C, Setola E, et al. Myocardial insulin resistance associated with chronic hypertriglyceridemia and increased FFA levels in Type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**: H1225–H1231. DOI: 10.1152/ajpheart.00629.2003
- Davidoff AJ. Convergence of glucose- and fatty acid-induced abnormal myocardial excitation-contraction coupling and insulin signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33**: 152–158. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04343.x
- Kim JK, Levin ER. Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nucl Recept Signal* 2006; **4**: e013. DOI: 10.1621/nrs.04013
- Patten RD, Karas RH. Estrogen replacement and cardiomyocyte protection. *Trends Cardiovasc Med* 2006; **16**: 69–75. DOI: 10.1016/j.tcm.2006.01.002
- Garcia-Arencibia M, Davila N, Campion J, Carmen Carranza M, Calle C. Identification of two functional estrogen response elements complexed with AP-1-like sites in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **94**: 1–14. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2004.12.020
- Garcia-Arencibia M, Molero S, Davila N, Carranza MC, Calle C. 17beta-Estradiol transcriptionally represses human insulin receptor gene expression causing cellular insulin resistance. *Leuk Res* 2005; **29**: 79–87. DOI: 10.1016/j.leukres.2004.05.012
- Panno ML, Mauro L, Marsico S, et al. Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor alpha through its interaction with Sp1. *J Mol Endocrinol* 2006; **36**: 91–105. DOI: 10.1677/jme.1.01848
- Richards RG, DiAugustine RP, Petrusz P, Clark GC, Sebastian J. Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12002–12007.
- Richards RG, Klotz DM, Bush MR, Walmer DK, DiAugustine RP. E2-induced degradation of uterine insulin receptor substrate-2: requirement for an IGF-I-stimulated, proteasome-dependent pathway. *Endocrinology* 2001; **142**: 3842–3849.
- Richards RG, Walker MP, Sebastian J, DiAugustine RP. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor-insulin receptor substrate complexes in the uterus. Altered signaling response to estradiol in the IGF-1(m/m) mouse. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11962–11969.
- Giorgino F, Logoluso F, Davalli AM, et al. Islet transplantation restores normal levels of insulin receptor and substrate tyrosine phosphorylation

- and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle and myocardium of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1999; **48**: 801–812.
35. Duncombe WG. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clin Chim Acta* 1964; **9**: 122–125.
36. Dupont J, Derouet M, Simon J, Taouis M. Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken. *Am J Physiol* 1998; **274**: E309–E316.
37. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
38. Toba H, Gomyo E, Miki S, et al. Hyperinsulinaemia increases the gene expression of endothelial nitric oxide synthase and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33**: 440–447. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04385.x
39. Knuuti MJ, Maki M, Yki-Jarvinen H, et al. The effect of insulin and FFA on myocardial glucose uptake. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 1359–1367. DOI: 10.1006/jmcc.1995.0129
40. Wiggers H, Norrelund H, Nielsen SS, et al. Influence of insulin and free fatty acids on contractile function in patients with chronically stunned and hibernating myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H938–H946. DOI: 10.1152/ajpheart.00150.2005
41. Song D, Arikawa E, Galipeau DM, et al. Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypertens* 2005; **18**: 1189–1194. DOI: 10.1016/j.amjhyper.2005.04.003
42. Barros RP, Morani A, Moriscot A, Machado UF. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol Cell Endocrinol* 2008; **295**: 24–31. doi:10.1016/j.mce.2008.07.008
43. Sutter-Dub MT. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 2002; **67**: 77–93. doi:10.1016/S0039-128X(01)00142-8
44. Godsland IF. Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia* 2005; **48**: 2213–2220. DOI:10.1007/s00125-005-1930-0
45. Van Pelt RE, Gozansky WS, Schwartz RS, Kohrt WM. Intravenous estrogens increase insulin clearance and action in postmenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**: E311–E317. doi:10.1152/ajpendo.00490.2002
46. Campbell SE, Febbraio MA. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **282**: E1139–E1146. doi:10.1152/ajpendo.00184.2001
47. Jensen MD, Martin ML, Cryer PE, Roust LR. Effects of estrogen on free fatty acid metabolism in humans. *Am J Physiol* 1994; **266**: E914–E920.
48. Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep* 2004; **6**: 180–185.
49. Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, et al. Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension* 2002; **39**: 41–45. DOI: 10.1161/hy1201.097197
50. Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E. Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene* 2003; **22**: 4007–4016. DOI: 10.1038/sj.onc.1206436
51. Morelli C, Garofalo C, Sisci D, et al. Nuclear insulin receptor substrate 1 interacts with estrogen receptor alpha at ERE promoters. *Oncogene* 2004; **23**: 7517–7526. DOI: 10.1038/sj.onc.1208014
52. Ren J, Hintz KK, Roughead ZK, et al. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**: H1800–H1807. DOI: 10.1152/ajpheart.00866.2002
53. Sovershaev MA, Egorina EM, Andreasen TV, Jonassen AK, Ytrehus K. Preconditioning by 17beta-estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**: H1554–H1562. DOI: 10.1152/ajpheart.01171.2005

## STRUČNA BIOGRAFIJA

Tijana M. Milosavljević, je rođena 04.04.1976. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Školske 1994/95. godine, upisala je studije na grupi za Biologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 15. 05. 2002. godine, odbranom diplomskog rada pod naslovom: "Primena metode DNK tipizacije u sudsko-medicinskoj praksi". Prosečna ocena tokom studija bila je 8,47, a ocena na diplomskom ispitu 10. Školske 2006/07. godine upisala je doktorske studije na smeru Animalna i humana fiziologija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Od 01. 02. 2003. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke "Vinča" i od tada je uključena u istraživanja koja su fokusirana na oblast interakcija insulina i estrogenih hormona na nivou molekula signalnih puteva uključenih u regulaciju ćelijskih procesa. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2008. godine.

Do sada je publikovala 9 radova u naučnim časopisima i 5 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova. Trenutno je angažovana na projektu "Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije" (Br. 41009), Ministarstva za prosvetu i nauku, Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Тијана Милосављевић

број индекса AA060137

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ткивна специфичност ефеката 17  $\beta$ -естрадиола на сигнални пут инсулина

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2012.

Милосављевић Тијана

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Тијана Милосављевић

Број индекса AA060137

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Ткивна специфичност ефеката 17 $\beta$ -естрадиола на сигнални пут  
инсулина

Ментори др Горан Корићанац, виши научни сарадник Института за нуклеарне  
науке „Винча“, Универзитета у Београду

др Гордана Цвијић, редовни професор Биолошког факултета,  
Универзитета у Београду

Потписани/а Тијана Милосављевић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.04.2012.





Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

Ткивна специфичност ефеката 17 β-естрадиола на сигнални пут инсулина

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2012.



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

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

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.

---