

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Милан М. Обрадовић

**Ефекти естрадиола на регулацију натријум-  
калијумове пумпе и морфологију срца  
нормално ухрањених и гојазних пацова**

Докторска дисертација

Београд, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milan M. Obradović

**Efekti estradiola na regulaciju natrijum-  
kalijumove pumpe i morfologiju srca  
normalno uhranjenih i gojaznih pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milan M. Obradović

**The effects of estradiol on the regulation of  
sodium-potassium pump and heart  
morphology in normally fed and obese rat**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013.

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Milana Obradovića, izabrana je u sastavu:

dr Esmā R. Isenović, Naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd - mentor,

dr Jelena Đorđević, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet - mentor,

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

dr Vladan Bajić, Naučni savetnik, Centar za biomedicinska istraživanja, Institut Galenika a.d. - član

na \_\_\_\_\_ redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj \_\_\_\_\_ 2013. godine. Svojom odlukom broj \_\_\_\_\_ od \_\_\_\_\_ 2013., Oblasno Veće Prirodnih Nauka Univerziteta u Beogradu je potvrdilo da kandidat Milan M. Obradović može da pristupi javnoj odbrani svoje doktorske disertacije pod naslovom: „Efekti estradiola na regulaciju natrijum-kalijumove pumpe i morfologiju srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova“.

Datum i mesto javne odbrane: \_\_\_\_\_

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

*Posebno se zahvaljujem Dr Esmi Isenović, neposrednom mentoru, na ukazanom poverenju, požrtvovanosti, podršci i velikodušnoj pomoći od samog početka izrade ove disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Jeleni Đorđević, koja mi je pružila izuzetnu stručnu pomoć tokom recenzije disertacije, svojim konstruktivnim sugestijama.*

*Zahvaljujem se dr Milici Labudović-Borović, na nesebičnoj stručnoj pomoći, predusretljivosti i trudu prilikom izrade i pregleda doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se Dr Vladanu Bajiću, na stručnoj pomoći i dragocenim savetima, kao i trudu pri oceni i pregledu doktorske disertacije.*

*Najtoplije se zahvaljujem kolegicama i saradnicima na projektu: dr Emini Sudar, dr Branislavi Dobutovć, mr Sanji Soskić, Dragani Nikolić, Sonji Zafirović, Aleksandri Jovanović, Ivani Resanović i Julijani Stanimirović, koji su svojom kolegijalnošću i prijateljstvom učestvovali i doprineli izradi moje doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča” koji su na bilo koji način doprineli izradi ove disertacije.*

*Zahvaljujem se mojim roditeljima i sestri, koji su najviše zaslužni za sve što sam postigao.*

*Ova teza je posvećena mojoj ćerki Dunji i supruzi Jeleni kojoj se ovom prilikom zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, strpljenju i neizmernoj ljubavi.*

*Milan Obradović*

## SAŽETAK

### Naslov doktorske disertacije: „Efekti estradiola na regulaciju natrijum-kalijumove pumpe i morfologiju srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova”

Hormon estradiol, pored svojih efekata koje ostvaruje na reprodukciju i razviće, uključen je i u regulaciju metaboličkih procesa u različitim organima, uključujući i srce. Pored sistemskog efekta koje estradiol ostvaruje na kardiovaskularni sistem zapažen je, ali i nedovoljno razjašnjen, uticaj estradiola na srce i kardiomiocite. U literaturnim podacima koji se odnose na efekte estradiola na morfologiju srca uglavnom su izučavani efekti estradiola u patofiziološkim stanjima hipertenzije i traume, dok je uloga estradiola na morfologiju srca u patofiziološkim stanjima gojaznost i rezistencije na insulin (IR) još uvek nedovoljno izučena. Estradiol svoje efekte ostvaruje genomskim i negenomskim signalnim putevima posredstvom specifičnih receptora za estrogen (ER), pri čemu dolazi do aktivacije složene mreže međuzavisnih intracelularnih signalnih puteva uključujući i fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI3K), protein kinazu B (Akt), kao i ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2). Natrijum-kalijum adenzin trifosfataza ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze) je membranski protein koji ima ulogu u održavanju elektrohemijskog gradijenta  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona kroz ćelijsku membranu, a takođe ima i važnu ulogu u regulaciji tonusa glatkih mišića vaskulature, kao i regulaciji kontrakcija srca. Poremećaji u funkciji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze uočeni su u različitim patofiziološkim stanjima kao što su stanja hipertenzije, gojaznosti i IR. Signalni putevi koji su uključeni u estradiolom regulisanoj ekspresiji i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze uključuju i aktivaciju Akt i ERK1/2 kinaza. Stimulišući aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, estradiol ostvaruje direktan uticaj na srce povećavajući kontraktilnost ćelija srca. Nedostatak podataka u literaturi o *in vivo* efektima estradiola na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologiju srca, kao i mehanizmi kojima estradiol ostvaruje svoje efekte na ćelije srca u patofiziološkim stanjima (gojaznost i IR), ukazuju na značaj realizovanih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

U ovoj doktorskoj disertaciji izučavani su molekularni mehanizmi *in vivo* efekata estradiola na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologiju srca, u koje su uključene Akt i ERK1/2 kinaze, kako u fiziološkim tako i u patofiziološkim uslovima kao što su stanja gojaznosti i IR. U eksperimentima su korišćeni adultni pacovi Wistar soja. Dve grupe pacova za ishranu su koristile standardnu laboratorijsku hranu za pacove (normalno

uhranjeni pacovi), dok su druge dve grupe hranjene standardnom laboratorijskom hranom obogaćenom sa 42% masti (gojazni pacovi). Nakon 10 nedelja grupi normalno uhranjenih (označene kao grupa: Estradiol) i gojaznih pacova (označena kao grupa: Gojazni+Estradiol), davana je jedna doza estradiola (40 $\mu$ g/kg), dok je ostalim pacovima (Kontrolni i Gojazni pacovi) davana ista količina 1% etanola u fiziološkom rastvoru. Dvadeset četiri sata nakon tretmana pacovi iz svih grupa su žrtvovani, izolovani su serumi i plazme, a srca su ekstrahovana. U serumu pacova određivane su koncentracije: glukoze (Glu), insulina (INS), C reaktivnog proteina (CRP), leptina, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg), dok su u plazmi određivane koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), slobodnih masnih kiselina (SMK) i fosfolipida. Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze je određivana u frakciji plazma membrana izolovanih iz srca pacova. Korišćenjem Western blot metode određivan je nivo ekspresije i fosforilacije  $\alpha$ 1 subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u frakciji plazma membrana, dok je nivo fosforilacije i ekspresije Akt i ERK1/2 kinaza određivan u lizatima ćelija. Imunohistohemijska analiza je korišćena za određivanje lokalizacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u tkivu srca pomoću antitela specifičnog na  $\alpha$ 1 subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Histochemijske i morfometrijske analize tkiva srca su korišćene za određivanje *in vivo* efekata estradiola i ishrane bogate mastima na morfologiju srca.

Estradiol davan normalno uhranjenim pacovima dovodi do statistički značajnog povećanja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, ekspresije i fosforilacije  $\alpha$ 1 subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membranama kardiomiocita, fosforilacije Akt i ERK1/2 kinaza, koncentracije ukupnih proteina u lizatima srca, kao i statistički značajnog smanjenja koncentracije DLIF u plazmi i koncentracije Na<sup>+</sup> u serumu u poređenju sa netretiranim normalno uhranjenim pacovima. Ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog povećanja telesne mase, mase srca, koncentracije ukupnih proteina u lizatima srca, transverzalnih dijametara kardiomiocita, koncentracije Glu, INS, leptina, CRP, HOL i Tg u serumu, koncentracije SMK i fosfolipida u plazmi, i fosforilacije ERK1/2 kinaza. Takođe, kod gojaznih pacova je uočeno statistički značajno smanjenje aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i ekspresije  $\alpha$ 1 subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, aktivnosti Akt kinaze, koncentracije DLIF u plazmi i Na<sup>+</sup> u serumu u poređenju sa normalno uhranjenim pacovima. Estradiol davan gojaznim pacovima dovodi do statistički značajnog povećanja koncentracije Na<sup>+</sup> u serumu, aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i ekspresije  $\alpha$ 1 subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, kao povećanja fosforilacije Akt kinaze. Kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom, uočeno je statistički

značajno smanjenje mase srca, odnosa mase srca/mase tela, transverzalnih dijametara kardiomiocita, koncentracije serumskog CRP i HOL.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da estradiol u *in vivo* uslovima kod normalno uhranjenih pacova reguliše aktivnost i ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu, molekularnim mehanizmom koji uključuje Akt i ERK1/2 kinaze. Međutim, kod gojaznih pacova kod kojih su aktivnost i ekspresija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze smanjene, estradiol stimuliše aktivnost i ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze mehanizmom koji uključuje učešće Akt kinaze. Pored uticaja na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu, estradiol kod gojaznih pacova utiče i na morfologiju ćelija srca jer dovodi do smanjenja gojaznošću-indukovane hipertrofije srca. Interesantno je da dobijeni rezultati ukazuju na povezanost promena u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze sa promenama u morfologiji ćelija srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom. Izučavanja usmerena u pravcu rasvetljenja molekularnih mehanizma kojima estradiol ostvaruje svoje efekte na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca u fiziološkim i patofiziološkim stanjima kao što je stanje gojaznosti združeno sa rezistencijom na insulin su od izuzetne važnosti kako za razumevanje uloge estradiola u kardiovaskularnim oboljenjima, tako i u cilju razvijanja novih terapijskih strategija za tretman kardiovaskularnih oboljenja.

Ključne reči: **Estradiol, Akt, ERK1/2, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaza, srce**

Naučna oblast: **Biologija**

Uža naučna oblast: **Molekularna endokrinologija**

UDK broj: **577.175.6:[591.133.11+ 612.172]:636.028(043.3)**



## ABSTRACT

**Title of doctoral dissertation: “The effects of estradiol on the regulation of sodium potassium pump and heart morphology in normally fed and obese rats ”**

Hormone estradiol is also involved in the regulation of metabolic processes in various organs, including the heart. The systemic effects of estradiol on cardiovascular system, was observed, but the effect of estradiol on the heart still is not known in detail. The effects of estradiol on the morphology of the heart are mainly studied the effects of estradiol in pathophysiological conditions of hypertension and trauma, whereas the role of estradiol on the morphology of the heart in pathophysiological conditions such are obesity and insulin resistance (IR) is still insufficiently explored. Estradiol exert its effect by nongenomic and genomic signaling pathways, through specific receptors for estrogen (ER), *via* the activation of a complex network of dependent intracellular signaling pathways including phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2). Sodium-potassium adenosine triphosphatase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ) is a membrane protein that plays a role in maintaining the electrochemical gradient of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ions across the cell membrane, and also plays an important role in the regulation of muscle tone of smooth muscle vasculature , as well as in the regulation of heart contraction. Disturbances in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase function have been observed in various pathophysiological conditions such as hypertension, obesity and IR. Estradiol regulates  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and expression via the activation of Akt and ERK1/2 signaling pathways. Stimulating the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, estradiol has direct effect on the heart by increasing the contractility of cardiac cells. The lack of literature data about *in vivo* effects of estradiol on the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase regulation, the heart morphology, and the mechanisms by which estradiol achieves its effects on heart cells in pathophysiological conditions (obesity and IR) stresses the importance of the research within the framework of this doctoral dissertation.

In this doctoral thesis, the molecular mechanisms of *in vivo* effects of estradiol on the regulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and the morphology of the heart, via Akt and ERK1/2 kinase, both in physiological and in pathophysiological conditions such as obesity and IR, were studied and for these experiments adult Wistar rats were used. Two groups of rats were fed with standard laboratory rats' foods (normally fed), while the other two groups

were used standard laboratory food enriched with 42% fat (obese rats). After 10 weeks normally fed rats (marked as a group: Estradiol) and obese rats (marked as group: Obese + Estradiol), were treated with a single dose of estradiol (40µg/kg), while the other rats (marked as groups: Control and Obese) were given the same amount of 1% ethanol in saline. Twenty four hours after treatment, rats from each group were sacrificed, serum and plasma were isolated, and the hearts were extracted. Serum glucose, insulin, C-reactive protein (CRP), leptin, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, total cholesterol (HOL) and triglyceride (Tg), and plasma digoxin like immunoreactive factor(s) (DLIF), free fatty acids (FFA), phospholipids were measured. Activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane fractions was determined using a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase assay. Western blot analysis was used to monitor phosphorylation and expression of α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane fraction, and Akt and ERK1/2 in rat heart lysates. Immunohistochemical analysis was performed for detection of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase localisation in heart tissue. Histochemical and morphometric analysis of heart tissue were used to determine the effect of estradiol and high-fat diet on the morphology of the heart.

Following administration of estradiol to normally fed rats in comparison with untreated rats, leads to a statistically significant increase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, expression and phosphorylation of α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from rat hearts, Akt and ERK1/2 kinase phosphorylation, total protein concentrations in lysates of heart, as well as a significant decrease in plasma concentration DLIF and Na<sup>+</sup> concentrations in the serum. The high fat diet in rats leads to a statistically significant increase in body weight, heart weight, total protein concentrations in lysates of heart, the transverse diameters of the cardiomyocytes, the concentration of Glu, INS, leptin, CRP, HOL and Tg in serum, and concentrations of FFA and phospholipids in plasma, and the phosphorylation of ERK1/2 kinase. In obese rats was also observed a statistically significant decrease in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and expression of α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, activation of Akt kinase, concentration of DLIF in serum and Na<sup>+</sup> in plasma compared to normal fed rats. Estradiol *in vivo* in obese rats in comparison with obese non-treated rats leads to a statistically significant increase of Na<sup>+</sup> concentration in serum, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and expression of α1 subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, as Akt kinase activation. The obese rats treated with estradiol had a statistically significant reduction in heart weight, ratio of the heart weight / body weight, transverse diameters of cardiomyocytes, concentration of CRP and HOL in serum.

The results presented in this doctoral thesis suggest that estradiol administered *in vivo* under normal physiological conditions regulate the activity and expression of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, by molecular mechanisms that involve the participation of Akt and ERK1/2 activation. Also, obtained results show that estradiol administered *in vivo* in obese/IR rats (with reduction of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and expression), stimulates activity and expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by mechanism that involves the participation of Akt kinase. Besides the influence of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, estradiol in states of obesity and IR, *in vivo* affects the morphology of the cardiac cells and its actions leads to a reduction in obesity- induced cardiac hypertrophy. In addition, the results indicated that there is an association between changes in the regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase with changes in the morphology of cardiac cells under the influence of estradiol in normal and in states of obesity and IR. Despite the importance of regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase under physiological and pathophysiological conditions, the molecular mechanisms of its regulation under the influence of estradiol remain unknown. Studies directed toward illuminating the molecular mechanism(s) by which estradiol achieves its effects on the regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are of great importance for understanding its role in cardiovascular disease and for the development of new therapeutic strategies for the treatment of cardiovascular diseases.

Key Words: **Estradiol, Akt, ERK1/2, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, heart.**

Scientific Group: **Biology**

Specific Area Within A Group: **Molecular Endocrinology**

UDK number: **577.175.6:[591.133.11+ 612.172]:636.028(043.3)**

# SPISAK SKRAĆENICA

<b>AF-2</b>	domen ( <i>engl. Activation Function 2</i> )
<b>Akt</b>	protein kinaza B ( <i>engl. protein kinase B; Akt8 leukemia virus;</i> ),
<b>ALP</b>	alkalna fosfataza - ( <i>engl. Alkaline Phosphatase</i> )
<b>AMP</b>	adenozin monofosfat ( <i>engl. adenosine monophosphate</i> )
<b>AMPK</b>	proteinska kinaza aktivirana AMP-om ( <i>engl. AMP-activated protein kinase</i> )
<b>ANG II</b>	angiotenzin dva
<b>AP-1</b>	transkripcioni faktor, protein aktivator-1 ( <i>engl. Activator Protein-1</i> );
<b>APS</b>	amonijumpersulfat
<b>AT1-R</b>	receptr angiotenzina tipa 1
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BCIP/NBT</b>	reagens ( <i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i> )
<b>BMI</b>	indeks telesne mase ( <i>engl. Body Mass Index</i> )
<b>BSA</b>	albumin goveđeg seruma ( <i>engl. bovine serum albumin</i> )
<b>CH</b>	domen ( <i>engl. Collagen Homology</i> )
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>KVB</b>	kardiovaskularne bolesti
<b>KVS</b>	kardiovaskularni sistem
<b>DDC</b>	dietilditiokarbamat - ( <i>engl. Diethyl-Dithiocarbamate</i> )
<b>DLIF</b>	digoksinu slični imunoreaktivni faktori ( <i>engl. Digoxin Like Immunoreactive Factor(s)</i> )
<b>DNK</b>	dezoksiribonukleinska kiselina
<b>DUSP6</b>	specifična fosfataza 6 ( <i>engl. DUal-Specificity Phosphatase 6</i> )
<b>ECL</b>	pojačana hemiluminiscencija - ( <i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i> )
<b>EDTA</b>	etilendiamintetrasirćetna kiselina - ( <i>engl. Etylenediaminetetraacetic Acid</i> )
<b>ELISA</b>	metod ( <i>engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ER</b>	receptor za estrogen ( <i>engl. Estrogene Receptor</i> )
<b>ERE</b>	elemeneti koji odgovaraju na estrogen ( <i>engl. Estrogen Responsive</i> )

	<i>Elements</i> );
<b>ERK1/2</b>	ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 - ( <i>engl. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2</i> )
<b>FAT/CD36</b>	translokaza masnih kiselina ( <i>engl. fatty acid translocase</i> )
<b>FXYP</b>	proteini, tkivno-specifične regulatorne subjediniice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze
<b>Glu</b>	glukoza
<b>GLUT</b>	familija transportera za glukozu ( <i>engl. glucose transporters</i> )
<b>GPER</b>	receptor za estrogen spregnut sa G-proteinom ( <i>enlg. G-Protein coupled Estrogen Receptor</i> )
<b>Grb2</b>	protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta ( <i>engl. Growth factor receptor-bound protein 2</i> )
<b>HEPES</b>	pufer ( <i>engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
<b>HF</b>	ishrana obogaćena mastima ( <i>engl. High Fat</i> )
<b>HOMA-IR</b>	metod za procenu stepena rezistencije na insulin ( <i>engl. Homeostasis Model Assessment Index-IR</i> )
<b>HOMA-β</b>	metod za procenu funkcionalnog kapaciteta β-ćelija pankreasa ( <i>engl. Homeostasis Model Assessment Index-β</i> )
<b>HRP</b>	peroksidaza rena ( <i>engl. Horse Radish Peroxidase</i> )
<b>IL</b>	interleukin
<b>INS</b>	insulin
<b>IR</b>	rezistencija na insulin - ( <i>engl. Insulin Resistance</i> )
<b>IRS -1</b>	supstrat receptora za insulin 1 ( <i>engl. Insulin Receptor Substrate</i> )
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminalna kinaza ( <i>engl. c-Jun N-Terminal Kinasese</i> )
<b>LK</b>	leva komora
<b>LpL</b>	lipoprotein lipaze ( <i>engl. Lipoprotein Lipase</i> )
<b>MAPK</b>	mitogenima aktivirane protein kinaze - ( <i>engl. Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
<b>MAPKK</b>	kinaze MAPK - ( <i>engl. MAPK Kinases</i> )
<b>MAPKKK</b>	kinaze MAPKK - ( <i>engl. MAPKK Kinases</i> )
<b>MEK 1/2</b>	kinaza MAPK ( <i>engl. MAPK kinase</i> )
<b>mTORC2</b>	kompleks ciljnog molekula za rapamicin 2 kod sisara ( <i>engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2</i> )
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza</b>	natrijum, kalijum adenzin-trifosfataza

<b>NDRG2</b>	protein ( <i>engl. N-myc Downstream-Regulated Gene 2</i> )
<b>p110</b>	110 kDa katalitička subjedinica
<b>p85</b>	85 kDa regulatorna subjedinica
<b>PD98059</b>	inhibitor aktivacije ERK1/2 kinaza
<b>PDH</b>	piruvat dehidrogenaze
<b>PDK</b>	fosfoinozidid-zavisna protein kinaza ( <i>engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase</i> )
<b>PH</b>	domen homolog plekstrinu ( <i>engl. Pleckstrin Homology</i> );
<b>PI3-K</b>	fosfatidilinozitol-3 kinaza ( <i>engl. Phosphoinositide 3-Kinase</i> )
<b>PIP2</b>	fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfat ( <i>engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate</i> )
<b>PIP3</b>	fosfatidil inozitol(3,4,5)trifosfat ( <i>engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate</i> )
<b>PKA</b>	protein kinaza A ( <i>engl. protein kinase A</i> )
<b>PKB</b>	protein kinaza B ( <i>engl. Protein Kinase B</i> )
<b>PKC</b>	protein kinaza C ( <i>engl. protein kinase C</i> )
<b>PKG</b>	protein kinaza G ( <i>engl. protein kinase G</i> )
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	receptor $\alpha$ aktiviran proliferatorom peroksizoma ( <i>Engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor <math>\alpha</math></i> )
<b>PVDF</b>	poliviniliden fluorid membrana ( <i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i> )
<b>Raf</b>	kinaze kinaza MAPK ( <i>engl. MAPK Kinase Kinase</i> )
<b>Ras</b>	guanozin trifosfataza ( <i>engl. guanosine triphosphatase; Rat Sarcoma</i> ),
<b>RIA</b>	radioimunološka metoda ( <i>engl. Radioimmunoassay</i> )
<b>RNK</b>	ribonukleinska kiselina
<b>SDS</b>	natrijum dodecil sulfat - ( <i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS ( <i>engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SEM</b>	standardna greška ( <i>engl. Standard Error Mean</i> )
<b>Ser</b>	serin
<b>SH2</b>	domen ( <i>engl. Src Homology 2</i> )
<b>Shc</b>	adapterski protein
<b>SMK</b>	slobodne masne kiseline

<b>SOS</b>	guanin nukleotid faktor razmene ( <i>engl. guanine nucleotide exchange factors; Son Of Sevenless</i> )
<b>SP1</b>	transkripcioni faktor ( <i>engl. Simian virus 40 Protein-1</i> )
<b>TBS</b>	fiziološki rastvor puferovan Tris-om ( <i>engl. Tris-Buffered Saline</i> )
<b>TBS-T</b>	0,05% Tween 20 u TBS puferu
<b>HOL</b>	ukupni holesterol
<b>TEA</b>	trietanolaminski pufer
<b>TES</b>	pufer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoze)
<b>Tg</b>	trigliceridi
<b>Thr</b>	treonin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	faktora nekroze tumora- $\alpha$ ( <i>engl. tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>Tyr</b>	tirozin
<b>VLDL</b>	lipoproteini veoma male gustine ( <i>engl. Very-Low-Density Lipoprotein</i> )

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Estradiol, opšte osobine i molekularni mehanizmi delovanja estradiola.....	3
1.1.1. Opšte osobine estradiola.....	3
1.1.2. Molekularni mehanizmi delovanja estradiola.....	3
1.1.2.1. Uloga Akt i ERK1/2 u molekularnim mehanizmima delovanja estradiola.....	5
1.1.3. Efekti estradiola na morfologiju srca.....	8
1.1.3.1. Osnovne morfološke karakteristike srca.....	8
1.1.3.2. Estradiol i morfologija srca.....	10
1.2. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	13
1.2.1. Građa i funkcija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	13
1.2.2. Regulacija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	16
1.2.2.1. Regulacija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze estradiolom.....	18
1.2.3. Veza između gojaznosti, morfologije srca i Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	20
1.2.3.1. Uticaj gojaznosti na morfologiju srca.....	21
1.2.3.2. Uticaj gojaznosti na aktivnost i ekspresiju Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	23
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>25</b>
2.1. Ciljevi .....	25
2.2. Hipoteza .....	26
.	
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>27</b>
3.1. Eksperimentalni protokol – rad sa eksperimentalnim životinjama.....	27
3.2. Izolovanje seruma i plazme iz krvi pacova.....	29
3.3. Određivanje koncentracije glukoze (Glu) u serumu pacova.....	29
3.4. Određivanje koncentracije insulina (INS) u serumu.....	29
3.5. Određivanje indeksa rezistencije na INS (HOMA-IR) i sekrecije INS (HOMA-β) .....	30
3.6. Određivanje koncentracije leptina u serumu pacova.....	31
3.7. Određivanje koncentracije C-reaktivnog (CRP) proteina u serumu pacova.....	31
3.8. Određivanje koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF) u plazmi pacova.....	32



3.9. Određivanje koncentracije natrijuma (Na <sup>+</sup> ) i kalijuma (K <sup>+</sup> ) u serumu pacova.....	32
3.10. Određivanje koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu pacova.....	33
3.11. Određivanje koncentracije fosfolipida u plazmi pacova.....	33
3.12. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina (SMK) u plazmi pacova....	34
3.13. Izolovanje plazma membrana iz srca pacova.....	34
3.14. Izolovanje ukupnih proteina iz srca pacova.....	35
3.15. Određivanje koncentracije proteina.....	35
3.16. Određivanje aktivnosti Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze srca pacova.....	36
3.17. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)....	37
3.18. Western blot.....	37
3.19. Histochemijska i morfometrijska analiza tkiva i ćelija srca pacova.....	39
3.20. Imunohistochemijska detekcija α1 subjedinice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	40
3.21. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata .....	41
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>42</b>
4.1. <i>In vivo</i> efekti estradiola na regulaciju Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i morfologiju srca pacova..	42
4.1.1 Mase tela, mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i pacova tretiranih estradiolom.....	42
4.1.2. Koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma (Na <sup>+</sup> ) i kalijuma (K <sup>+</sup> ) u plazmi i serumu kontrolnih i pacova tretiranih estradiolom.....	43
4.1.3. Regulacija aktivnosti Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze, ekspresije i fosforilacije α1 subjedinice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze srca pacova pod delovanjem estradiola.....	44
4.1.4. Imunohistochemijska detekcija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu kontrolnih i estradiolom tretiranih pacova.....	46
4.1.5. Fosforilacija i nivo proteina za Akt i ERK1/2 pod delovanjem estradiola u srcu pacova.....	49
4.1.5.1. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo Akt kinaze u srcu pacova.....	49
4.1.5.2. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo ERK1/2 kinaze u srcu pacova....	50
4.1.6. <i>In vivo</i> efekti estradiola na transversalni dijametar kardiomiocita pacova.....	51
4.2. Efekti ishrane bogate mastima na regulaciju Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i morfologiju srca...53	
4.2.1. Mase tela, mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i	

gojaznih pacova.....	53
4.2.2. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju glukoze (Glu), insulina (INS), i indekse rezistencije na INS (HOMA-IR) i sekrecije $\beta$ -ćelija (HOMA- $\beta$ ) u serumu pacova.....	54
4.2.3. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju leptina, C-reaktivnog proteina (CRP), digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma ( $\text{Na}^+$ ) i kalijuma ( $\text{K}^+$ ) u serumu i plazmi pacova.....	55
4.2.4. Efekti ishrane bogate mastima na koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) kod kontrolnih i gojaznih pacova.....	56
4.2.5. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju slobodnih masnih kiselina (SMK) i fosfolipida u plazmi pacova.....	57
4.2.6. Efekti ishrane bogate mastima na regulaciju aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ekspresiju $\alpha 1$ subjedninice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i fosforilaciju $\alpha 1$ subjedninice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca pacova.....	58
4.2.7. Imunohistohemijska detekcija $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih i kontrolnih pacova.....	60
4.2.8. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo proteina Akt i ERK1/2 kinaza u srcu pacova.....	63
4.2.8.1. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo Akt kinaze u srcu pacova.....	63
4.2.8.2. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo ERK1/2 kinaze u srcu pacova.....	64
4.2.9. Efekti ishrane bogate mastima na transverzalni dijametar kardiomiocita pacova.....	65
4.3. Promene u regulaciji $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologije srca pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih, insulin rezistentnih pacova.....	67
4.3.1 Mase tela, mase srca i koncentracija ukupnih proteina iz srca gojaznih i estradiolom tretiranih gojaznih pacova.....	67
4.3.2. Efekti estradiola na koncentraciju glukoze (Glu), insulina (INS), i indekse rezistencije na INS (HOMA-IR) i sekrecije $\beta$ -ćelija (HOMA- $\beta$ ) u serumu gojaznih pacova.....	68
4.3.3. Efekti estradiola na koncentraciju leptina, C-reaktivnog proteina (CRP), digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma ( $\text{Na}^+$ ) i kalijuma	

(K <sup>+</sup> ) u serumu i plazmi pacova.....	69
4.3.4. Efekti estradiola na koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu gojaznih pacova tretiranih estradiolom.....	70
4.3.5. Efekti estradiola na koncentraciju slobodnih masnih kiselina (SMK) i fosfolipida u plazmi gojaznih pacova.....	71
4.3.6. Regulacija aktivnosti Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i ekspresije $\alpha$ 1 subjednice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova.....	72
4.3.7. Imunohistohemijska detekcija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu gojaznih i kontrolnih pacova.....	74
4.3.8. Fosforilacija i nivo proteina za Akt i ERK1/2 pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova.....	77
4.3.8.1. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo proteina za Akt kinazu u srcu gojaznih pacova.....	77
4.3.8.2. Fosforilacija i nivo proteina za ERK1/2 kinazu pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova.....	78
4.3.9. Uticaj estradiola na transversalni dijametar kardiomiocita gojaznih pacova...79	
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>81</b>
5.1. <i>In vivo</i> efekti estradiola na regulaciju Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i morfologiju srca pacova..	82
5.2. Promene u regulaciji Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i morfologije srca u eksperimentalnim uslovima gojaznosti i insulinske rezistencije.....	87
5.3. Promene u regulaciji Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze i morfologije srca pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih, insulin rezistentnih pacova.....	98
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>107</b>
.	
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>109</b>
.	
<b>8. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>134</b>
.	
<b>9. PRILOZI .....</b>	<b>135</b>

# 1. UVOD

Hormon estradiol je predominantna forma estrogena, prisutan u većoj koncentraciji kod žena nego muškaraca. Pored svojih efekata koje ostvaruje na reprodukciju i razviće, estradiol utiče i na metaboličke procese u različitim organima, uključujući i srce (Nilsson i sar., 2001; Sudar i sar., 2009; Murphy, 2011). Dosadašnji podaci iz literature nedvosmisleno ukazuju na pozitivne efekte koje estradiol ostvaruje na kardiovaskularni sistem (KVS) (Murphy 2011; Knowlton i Lee, 2012). Svoje efekte estradiol ostvaruje genomskim i negenomskim signalnim putevima posredstvom specifičnih unutarćelijskih i membranskih receptora za estrogen (ER; *engl. Estrogene Receptor*) (Nilsson i Gustafsson, 2002; Barros i Gustafsson, 2011).

Genomske efekte estradiol ostvaruju direktnim vezivanjem za specifične ER lokalizovane u jedru (Nilsson i Gustafsson, 2002). Postoje dva tipa receptora za estrogen, ER alfa (ER $\alpha$ ) i ER beta (ER $\beta$ ) i oba su eksprimirana u ćelijama srca (Grohe i sar., 1998; Nilsson i sar., 2001). Estradiol može ostvariti dejstvo i negenomskim putem, vezivanjem za ER $\alpha$  ili ER $\beta$ , koji podrazumeva aktivaciju složene mreže međuzavisnih intracelularnih signalnih puteva uključujući i fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI3K; *engl. Phosphatidylinositol-3 Kinase*), protein kinazu B (Akt; *engl. protein kinase B; Akt8 leukemia virus*), kao i ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2; *engl. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2*) (Nilsson i sar., 2001; Isenovic i sar., 2002; Sudar i sar., 2008).

Gojaznost se uglavnom karakteriše kao poremećaj sa hroničnim inflamatornim statusom i predstavlja direktan uzrok pojave i razvoja mnogih hroničnih bolesti, uključujući i kardiovaskularne bolesti (KVB). Značaj delovanja estradiola u stanju gojaznosti je posebno zapažen kod žena posle menopauze kada dolazi do povećanja visceralne gojaznosti kao i povećanog rizika od KVB (Salpeter i sar., 2006; Barros i Gustafsson, 2011). Takođe, eksperimentalni i klinički podaci ukazuju da estradiol ima pozitivan efekat na neke od propratnih komplikacija gojaznosti kao što je rezistencija na insulin (IR; *engl. Insulin Resistance*) (Barros i Gustafsson, 2011). Estradiol, takođe,

ostvaruje i pozitivne efekte na regulaciju metabolizma lipida i zaštitu srca od oštećenja nastalih ishemijskom (van Eickels i sar., 2001; Murphy, 2011). Delovanja estradiola na KVS kod muškaraca kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima, još je nedovoljno proučeno.

Natrijum ( $\text{Na}^+$ ), kalijum ( $\text{K}^+$ ) adenzin-trifosfataza ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza) je membranski protein čija je uloga u održavanju elektrohemijškog gradijenta  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona kroz ćelijsku membranu. Ova pumpa ima važnu ulogu u regulaciji tonusa glatkih mišića vaskulature (Kaplan, 2002; Isenovic i sar., 2004) i kontraktilnosti, kao i balansa kalcijumovih ( $\text{Ca}^{2+}$ ) jona u kardiomiocitama (Schwinger i sar., 2003). Poremećaji u funkciji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze uočeni su u različitim patofiziološkim stanjima kao što su stanja hipertenzije, gojaznosti i IR (Iannello i sar., 2007; Sudar i sar., 2008). Poremećaji u normalnom radu srca povezani su i sa značajnim smanjenjem ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na membrani ćelija (Liu i sar., 2012). Takođe, je pokazano da je u stanjima IR smanjena aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u perifernim tkivima (Iannello i sar., 2007), a u stanjima gojaznosti u masnom tkivu genetski gojaznih miševa, kao i gojaznih pacijenata (Iannello i sar., 1994; Iannello i sar., 2007).

Genomski i negenomski efekti estradiola utiču na povećanje aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, što je pokazano kako u našim publikovanim radovima tako i u radovima drugih autora (Dzurba i sar., 1997; Isenovic i sar., 2002; Palacios i sar., 2004; Sudar i sar., 2008). Signalni putevi kojima estradiol ostvaruje efekte na povećanje ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze uključuju i aktivaciju Akt i ERK1/2 kinaza (Isenovic i sar., 2002; Sudar i sar., 2008). Stimulišući aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, estradiol ostvaruje direktan uticaj na srce povećavajući kontraktilnost ćelija srca (Dzurba i sar., 1997; Sudar i sar., 2008).

U literaturnim podacima koji se odnose na efekte estradiola na morfologiju srca uglavnom su izučavani efekti estradiola u patofiziološkim stanjima hipertenzije (Garcia i sar., 2006) i traume (Kan i sar., 2008). Nedostatak podataka u literaturi o ulozi estradiola na morfologiju srca kao i mehanizmima kojima estradiol ostvaruje svoje efekte na kardiomiocite u patofiziološkim stanjima (gojaznost i IR), ukazuju na značaj istraživanja obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom. Poznavanje molekularnih mehanizama delovanja estradiola na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu kod ljudi, svakako će pomoći razvoju novih terapijskih strategija u tretmanu KVB kod žena, kao i muškaraca.

## **1.1. Estradiol, opšte osobine, i molekularni mehanizmi delovanja estradiola**

Estrogeni predstavljaju kompleks hormona sa višestrukim efektima, koji se primarno stvaraju u ovarijumu i placenti kod žena, odnosno u testisima kod muškaraca, kao i u kori nadbubrežnih žlezda. Takođe, estrogeni nastaju i tokom periferne steroidne konverzije (Simpson i sar., 1994). Primarni estrogeni su: estradiol, estron i estriol, od kojih je estradiol dominantan i ispoljava najjači efekat. Estradiol nastaje od testosterona posredstvom enzimskog katalitičkog kompleksa citohrom P450 aromataze (Ghosh i sar., 2009). Aromataza se nalazi u endoplazmatskom retikulumu, ćelija osetljivih na estrogen, kao što su srce i ćelije krvnih sudova, što ukazuje da estradiol ostvaruje potencijalne efekte na KVS (Harada i sar., 1999; Thum i Borlak, 2002).

### **1.1.1. Opšte osobine estradiola**

Iako je primarno ženski hormon, estradiol je odavno prepoznat kao važan regulatorni faktor širokog spektra fizioloških procesa, ne samo kod žena, već i kod muškaraca (Knowlton i Lee, 2012). Pored svojih efekata koje ostvaruje na reprodukciju i razviće, estradiol je uključen u metaboličke procese u različitim tkivima, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima (Nilsson i sar., 2001; Murphy, 2011; Knowlton i Lee, 2012). Posebno interesantni su mehanizmi i signalni putevi kojima estradiol ostvaruje svoje efekte na KVS (Murphy, 2011; Knowlton i Lee, 2012), što je očigledno kod žena posle menopauze kada nivo estradiola zapravo opada, kao i kod hormonske supstitucije (Grodstein i sar., 2003; Wellbrock i sar., 2004; Knowlton i Lee, 2012). To znači da su žene pre menopauze zaštićene od KVB, dok muškarci kao i žene posle menopauze, imaju isti rizik od nastanka ovih bolesti (Huang i Kaley 2004; Horstman i sar., 2012).

### **1.1.2. Molekularni mehanizmi delovanja estradiola**

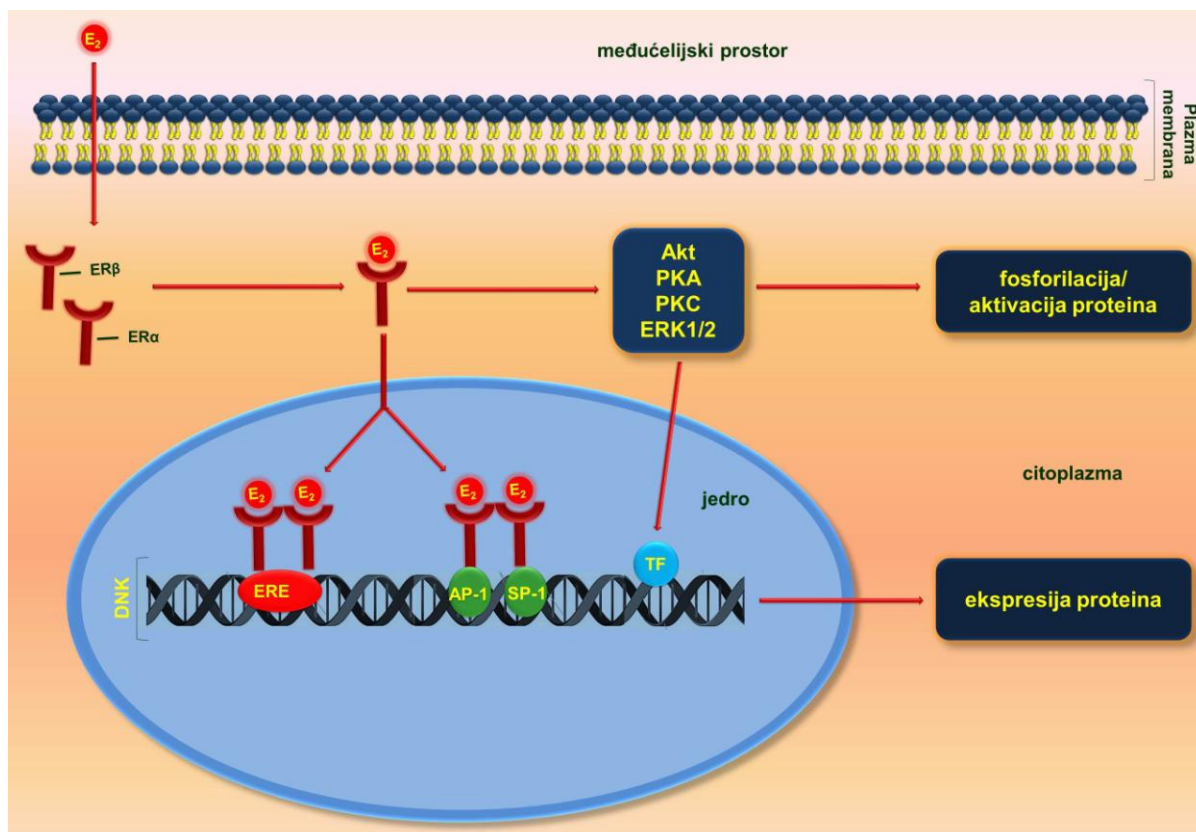
Estradiol ostvaruje mnogobrojne biološke efekte posredstvom ER. Jensen i Jacobsen su još pre pedesetak godina pokazali da estradiol ostvaruje svoje efekte vezujući se za svoj ER dok su Kuiper i saradnici 1996. godine uočili prisustvo drugog receptora  $ER\beta$  (Jensen i Jacobson, 1962; Kuiper i sar., 1996; Barros i Gustafsson, 2011).  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  su

članovi superfamilije nuklearnih receptora klase I, kodirani su različitim genima i imaju različit nivo ekspresije, kao i višestruke načine „iskrajanja“ (*engl. splicing*) u različitim tkivima (Nilsson i Gustafsson, 2002). Oba receptora su detektovana u endotelu krvnih sudova i u miokardu, što ukazuje na direktan uticaj estradiola na KVS (Grohe i sar., 1998).

Estradiol ostvaruje svoje efekte na ćelijske funkcije prolaskom kroz ćelijsku membranu i vezivanjem za ER. Nakon vezivanja estradiola dolazi do dimerizacije receptora, odnosno formiranja homodimera, a u nekom broju slučajeva  $\alpha\beta$  heterodimera (Razandi i sar., 2004). Postoje dva mehanizma dejstva estradiola (Levin, 2005; Mandusic i sar., 2011). Genomske efekte u ćeliji ostvaruje uticajem na transkripciju gena (Nilsson i sar., 2001). Kao rezultat vezivanja estradiola za AF-2 (*engl. Activation Function 2*) domen na ER dolazi do konformacijskih promena i dimerizacije receptora, a potom i translokacije kompleksa estradiol-ER iz citoplazme u jedro (Henttu i sar., 1997). Ovaj proces omogućava da estradiol-ER kompleks interaguje sa specifičnim sekvencama na DNK posredstvom elemenata koji odgovaraju na estrogen (ERE; *engl. Estrogen Responsive Elements*), a lokalizovani su u blizini promotor regiona ciljanog gena (Nilsson i Gustafsson, 2002). Nakon toga, formirani kompleks estradiol-ER se udružuje i deluje saglasno sa ko-aktivatorima koji mogu pokrenuti glavni transkripcioni aparat i inicirati ekspresiju specifičnog gena (Shibata i sar., 1997). Kada je kompleks udružen sa drugim proteinima poznatim kao ko-represori, transkripcija gena se utišava (Shibata i sar., 1997). Neki geni ne sadrže u sebi ERE, ali estradiol reguliše i njihovu ekspresiju, vezujući se indirektno za DNK preko transkripcionih faktora kao što su: SP1 (*engl. Simian virus 40 Protein-1*) i protein aktivator-1 (AP-1; *engl. Activator Protein-1*) (Slika 1) (Kushner i sar., 2000; Saville i sar., 2000).

Mnogobrojne studije su pokazale da estradiol može da dovede do brze unutarćelijske aktivacije signalnih puteva, bez aktiviranja jedarne transkripcije gena (Moriarty i sar., 2006). Ovako estradiol ispoljava negenomski efekat, koji uključuje posttranslacione modifikacije mnogih sintetisanih proteina (Kelly i Levin, 2001), kao što je fosforilacija Akt, protein kinaze A (PKA), protein kinaze C (PKC) i ERK 1/2, a koje potom dovode do aktivacije brojnih proteina (Ewart i Klip, 1995; Isenovic i sar., 2003; Levin 2005; Sudar i sar., 2008). Takođe, signalni putevi uključeni u brze efekte delovanja estradiola, dovode do fosforilacije nishodnih transkripcionih faktora, koji potom regulišu transkripciju gena (Slika 1) (Kelly i Levin, 2001; Levin, 2009).

Nedavna istraživanja su pokazala postojanje trećeg membranskog receptora za estrogen spregnutog sa proteinom G (GPER; *engl. G-Protein-coupled Estrogen Receptor*) (Deschamps i Murphy, 2009). Potrebna su dodatna istraživanja koja bi razjasnila ulogu GPER u signalnom putu delovanja estradiola.



**Slika 1. Molekularni mehanizmi delovanja estradiola.** E<sub>2</sub> — estradiol; Era — receptor za estrogen alfa; Erβ — receptor za estrogen beta; Akt — protein kinaza B; PKA — protein kinaza A; PKC — protein kinaza C; ERK1/2 — ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2; ERE — elementi koji reaguju sa estrogenom; SP1, — transkripcioni faktor; AP-1 — transkripcioni faktor, protein aktivator-1; TF — transkripcioni faktor; DNK — dezoksiribonukleinska kiselina.

### 1.1.2.1. Uloga Akt i ERK1/2 u molekularnim mehanizmima delovanja estradiola

Akt je protein koji poseduje domen homolog plekstrinu (PH *engl. Pleckstrin Homology*) na N-terminalnom kraju, kao i katalitički domen na kratkom C-terminalnom repu (Whiteman i sar., 2002). PH domeni predstavljaju kratke oligopeptidne sekvence u proteinima značajne za ćelijsku lokalizaciju proteina i vezivanje, a poseduju visoki afinitet prema fosfoinozidnim grupama (Franke i sar., 1997). Formirani estradiol-ERα kompleks



aktivira supstrat receptora za insulin 1 (IRS -1; *engl. Insulin Receptor Substrate*) (Mauro i sar., 2001; Isenovic i sar., 2003). Nakon toga, aktivirani IRS-1 fosforiliše p85 regulatornu subjedinicu (Mauro i sar., 2001; Isenovic i sar., 2003), što dovodi do aktivacije p110 katalitičke subjedinice i njene translokacije na plazma membranu ćelije (Downward, 1998). Aktivirana P110 katalitička subjedinica fosforiliše OH grupu na poziciji 3 u inozitolnom prstenu fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfata (PIP2; *engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate*), pri čemu nastaje fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifostat (PIP3; *engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate*) (Cantrell, 2001; Scheid i sar., 2002). Akumulacija PIP3 dovodi do privremene translokacije Akt iz citoplazme na plazma membranu, gde se ona fosforiliše na aminokiselinskim ostacima Treoninu<sup>308</sup> (Thr<sup>308</sup>) i Serinu<sup>473</sup> (Ser<sup>473</sup>) (Stokoe i sar., 1997; Alessi i Cohen, 1998; Andjelkovic i sar., 1999; Scheid i sar., 2002). Fosfoinozimid-zavisna protein kinaza-1 (PDK1; *engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase -1*) fosforiliše Akt na poziciji Thr<sup>308</sup> (Alessi i Cohen, 1998; Manning i Cantley, 2007), dok mehanizam fosforilacije Akt na poziciji Ser<sup>473</sup> još nije potpuno razjašnjen. Kinaza za koju se smatra da fosforiliše ovu poziciju je PDK2, mada prema nekim podacima PDK1 može fosforilisati obe pozicije (Alessi i Cohen, 1998; Sale i Sale, 2008). Jedna grupa autora sugerije da poziciju Ser<sup>473</sup> fosforiliše kompleks ciljnog molekula za rapamicin 2 kod sisara (mTORC2; *engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) koji se sastoji od mTOR kinaze i riktora (Sarbasov i sar., 2005). Rezultati mnogih studija su pokazali da estradiol dovodi do fosforilacije Akt na poziciji Ser<sup>473</sup>, ali podaci koji ukazuju na fosforilaciju Thr<sup>308</sup> su retki (Isenovic i sar., 2003; Ren i sar., 2003; Patten i sar., 2004).

Nakon aktivacije, Akt se translocira sa plazma membrane kroz citosol do jedra, gde se uključuje u regulaciju ekspresije specifičnih gena. Aktivacija PI3K/Akt signalnog puta ima važnu ulogu u srcu, pošto ove kinaze regulišu funkciju i preživljavanje ćelija srca (Huang i Kaley, 2004; Matsui i Rosenzweig, 2005). Aktivirana Akt od strane estradiola ima ulogu u polno specifičnoj sklonosti na KVB. Tako je pokazano da žene pre menopauze imaju značajno veći intenzitet bojenja Akt u jedrima ćelija srca u odnosu na muškarace ili žene posle menopauze (Camper-Kirby i sar., 2001; Sugden i Clerk, 2001), kao i da *in vitro* tretman kardiomiocita estradiolom ili fitoestrogenom, genestinom dovodi do povećanja fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) u jedru (Camper-Kirby i sar., 2001; Huang i Kaley, 2004).

Signalna kaskada protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK; *engl. Mitogen-Activated Protein Kinase*) sastoji se od tri proteinske kinaze u nizu: MAPK kinaze kinaza

(MAPKKK), MAPK kinaza (MAPKK) i MAPK (Widmann i sar., 1999). Postoje najmanje tri različite MAPK, kao i tri signalna puta, odnosno različite MAPKKK i MAPKK koje ih aktiviraju (Tomlinson, 1999). To su ERK1/2, c-Jun N-terminalna kinaza (JNK; *engl. c-Jun N-Terminal Kinase*) i p38 kinaza (Garrington i Johnson 1999; Kehat i Molkentin, 2010). JNK i p38 kinaze uglavnom predstavljaju specijalizovane prenosioce signala u odgovoru na stres ili povredu, tako da se one još klasifikuju kao protein kinaze aktivirane stresom (*engl. stress-activated protein kinases*), dok su ERK1/2 više uključene u signalne puteve inicirane mitogenima i faktorima rasta (Kehat i Molkentin 2010).

Pokazano je da estradiol brzo aktivira MAPK signalnu kaskadu (Migliaccio i sar., 1996; Levin 2001), preko Shc-Grb2-SOS-Ras signalnog puta (Song i sar., 2002; Bulayeva i sar., 2004). Naime, adapterski protein Shc se vezuje za estradiol-ER $\alpha$  kompleks pomoću fosfotirozin vezujućeg (*engl. phosphotyrosine binding*) domena, ili Src homologog 2 (SH2; *engl. Src Homology 2*) domena, tako da dolazi do fosforilacije tirozinskih ostataka na kolagen homologom (CH; *engl. Collagen Homology*) domenu (Pelicci i sar., 1995; Pelicci i sar., 1996). Fosforilisani tirozinski ostaci na CH domenu predstavljaju mesta za koja se vezuje SH2 domen Grb2—proteina 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta (Grb2; *engl. Growth factor Receptor-Bound protein 2*) (Brummer i sar., 2010), koji potom aktivira guanin nukleotid faktor razmene (SOS; *engl. guanine nucleotide exchange factors; Son Of Sevenless*) (Rojas i sar., 2011; Pierre i sar., 2011). Poslednji „član“ u nizu ovog dela signalnog puta je guanozin trifosfataza (Ras, *engl. guanosine triphosphatase; Rat Sarcoma*), koji pripada familiji G proteina ili guanozin nukleotid vezujućih proteina, koji su uključeni u različite signalne puteve u ćeliji (Vetter i Wittinghofer, 2001; Wennerberg i sar., 2005). Ras je aktiviran kada je za njega vezan guanozin—trifosfat, odnosno deaktiviran kada je za njega vezan guanozin—difosfat (Vetter i Wittinghofer, 2001; Wennerberg i sar., 2005). Aktivirani Ras dovodi do sekvencionalne aktivacije MAPK, odnosno ERK1/2 koje učestvuju u regulaciji više signalnih puteva uključenih u ćelijske procese u KVS (Avruch i sar., 2001; Wellbrock i sar., 2004). Prva u nizu aktivacije je MAPKKK, odnosno Raf koja fosforiliše i aktivira MAPKK ili MEK1/2, koje zatim aktiviraju ERK1/2 (Howe i sar., 1992; Kehat i Molkentin, 2010) (Shaul i Seger, 2007). Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i tirozin<sup>204</sup> (Tyr<sup>204</sup>) (Payne i sar., 1991; Kehat i Molkentin, 2010). Aktivirane ERK1/2 deluju tako što fosforilišu ciljane proteine u citoplazmi ili transkripcione faktore u jedru (Widmann i sar., 1999; Kehat i Molkentin 2010). Nakon translokacije u jedro, ERK1/2 direktno fosforilišu

transkripcione faktore kao što su ELK-1, c-Fos, p53, GATA4 i Ets1/2, koji predstavljaju regulatore rasta i proliferacije (Liang i sar., 2001; Kehat i Molquentin, 2010).

### 1.1.3. Efekti estradiola na morfologiju srca

Estradiol utiče na KVS kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima, direktnim uticajem na molekularne mehanizme u ćeliji ili indirektno preko sistemskih efekata na nivou celog organizma (Murphy, 2011). Sistemski efekti estradiola u KVS predstavljaju pre svega antiateromski efekti, kao što su: smanjenje koncentracije lipoproteina male gustine u krvi, povećanje koncentracije lipoproteina velike gustine u krvi, smanjenje oksidativnog stresa, kao i smanjenje proliferacije glatkih mišića vaskulature (Murphy, 2011). Takođe je pokazano da estradiol svojim delovanjem ostvaruje povoljan efekat i na faktore inflamacije tako što smanjuje produkciju faktora nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; *engl. tumor necrosis factor alpha*), interleukina-6 (IL-6) i IL-1 (Szalay i sar., 2006; Murphy, 2011). Pored sistemskog efekta, uticaj estradiola na srce i kardiomiocyte je mnogo kompleksniji i još uvek nedovoljno razjašnjen.

#### 1.1.3.1. Osnovne morfološke karakteristike srca

Srce se nalazi u perikardnoj šupljini, koja je obložena perikardom. Perikard čine visceralni i parijetalni sloj. Visceralni perikard ili epikard oblaže mišićno tkivo srca. Serozna membrana parijetalnog perikarda ojačana je spolja vezivnim tkivom bogatim kolagenim vlaknima, koji ima ulogu u povezivanju i stabilizaciji srca, perikarda i krvnih sudova u medijastinumu. Tanka praznina između parijetalne i visceralne površine koje su naspramne jedna drugoj, predstavlja perikardnu šupljinu ispunjenu perikardnom tečnošću koja ima ulogu lubrikanta. Vlažni zid perikarda smanjuje trenje koje nastaje tokom otkucaja srca (Martini i sar., 2007).

Baza srca predstavlja najširi deo srca i mesto ulaska, odnosno izlaska većine arterija i vena sistemske i plućne cirkulacije, dok se na drugom kraju nalazi vrh srca koji se konusno sužava. Srce je septumom izdvojeno na desnu i levu polovinu i sastoji se dve pretkomore i dve komore. Pored funkcijskih razlika između pretkomora i komora, postoje značajne razlike u građi. Zidovi komora mnogo su deblji od zidova pretkomora i to naročito leve komore (LK), što joj omogućava da razvije dovoljno snažan potisak da potisne krv kroz sistemski krvotok, za razliku od desne komore koja pumpa krv do pluća.

Na poprečnom preseku srca razlikuju se tri sloja: spoljašnji epikard (visceralni perikard), srednji miokard tj. mišićno tkivo srca, koje sadrži vezivno tkivo, krvne sudove i nervna vlakana i unutrašnji endokard koji predstavlja jednoslojni skvamozni epitel koji se nastavlja na endotel krvnih sudova, a od njega su izgrađeni i zalisci u srcu (Martini i sar., 2007). Pored prostog ljuspastog epitela, endotela, endokard sadrži i subendotelno i subendokardno vezivno tkivo (Buja i Vela, 2008).

Posebne histološke karakteristike miokarda obezbeđuju jedinstvene funkcijske karakteristike srca kao organa. Srčani mišić je prugast pošto su aktinski i miozinski filamenti raspoređeni u sarkomerama, ali je isprugavost slabije izražena u odnosu na skeletne mišiće. Miokard srca čine različiti tipovi ćelija: ćelije radne muskulature, ćelije sprovodnog sistema srca i mioendokrine ćelije (Buja i Vela, 2008). Radne mišićne ćelije ili kardiomiociti imaju sposobnost grananja i lateralnog povezivanja, te na dužnom preseku srčano mišićno tkivo ima izgled mreže. Naime, jedna od karakteristika kardiomiocita jeste da se one međusobno povezuju sa narednim ćelijama u lineranom nizu preko interkalatnih diskova. Interkalatni diskovi sastoje od tri tipa međućelijskih spojeva: fascia adherens, dezmozomi i komunikantni spoj (*nekus* ili *engl. gap junction*), čija je uloga da obezbede strukturni integritet miokarda i olakšaju prelaz električnog impulsa sa ćelije na ćeliju. Adherentni spojevi, *fascia adherens* i dezmozomi, formiraju transverzalni deo *ductus intercalatus* i doprinose boljem međusobnom prijanjanju ćelija. U nivou fascije adherens aktinski miofilamenti miofibrila kardiomiocita su čvrsto povezani sa sarkolemama u predelu interkalatnih diskova preko  $\alpha$  aktinina i vinkulina, dok dezmozomi obezbeđuju vezivanje dezmina, centralnog intermedijarnog filameta kardiomiocita. To omogućava bolju povezanost dve susedne ćelije, i njihove maksimalne efikasnosti prilikom kontrakcije. Kardiomiociti su povezani pomoću pukotinastih veza, koji grade longitudinalnu komponentu *discus intercalatus*. Joni i mali molekuli slobodno se kreću između ćelija kroz komunikantne spojeve, i na taj način stvaraju električnu vezu između dva kardiomiocita. Tako da se prenos akcionog potencijala sa jedne na drugu ćeliju odvija sa velikom efikasnošću. Dok adherentni spojevi obezbeđuju strukturni integritet i povezanost kardiomiocita, komunikantni spojevi omogućavaju međusobnu mehaničku, hemijsku i električnu povezanost ćelija što dovodi do toga da srčano mišićno tkivo funkcioniše kao jedna celina (srčani mišić je funkcijski sincicijum). Ovakve karakteristike kardiomiocita zahtevaju konstantnu dostupnost kiseonika i nutritijenata, što omogućava koronarna srčana

cirkulacija koja obuhvata široku mrežu krvnih sudova, koji snadbeavaju mišić srca krvlju (Martini i sar., 2007; Buja i Vela, 2008).

Većina kardiomiocita (75%) sadrži jedno centralno postavljeno jedro, dok ostatak kardiomiocita sadrži dva jedra. Pored toga, postoji uvek i mali broj ćelija (manje od 1%) koje sadrže tri ili četiri jedra (Olivetti i sar., 1996). U sarkoplazmi kardiomiocita nalaze se stotine mitohondrija, kao i obilne zalihe mioglobina (izvora kiseonika), dok su energetske rezerve sadržane u glikogenu i lipidima (Martini i sar., 2007). Između miofibrila raspoređene su brojne mitohondrije. Srčane mišićne ćelije imaju brojnije i veće mitohondrije od skeletnih mišićnih ćelija. Mitohondrije u srčanim mišićnim ćelijama čine do 40% volumena, a u skeletnim 2 – 3% (Buja i Vela, 2008).

Vezivno tkivo srca uključuje veliki broj kolagenih i elastičnih vlakana. Oko svake srčane mišićne ćelije nalazi se bazalna lamina koja sadrži poseban oblik laminina, a oko nje fina mreža retikulinskih vlakana u sastavu endomizijuma. U endomizijumu se nalazi obilje kapilara. Grupe srčanih mišićnih ćelija odvojene su tankim vezivno-tkivnim strukturama, koje sadrže krvne sudove i nerve, i odgovaraju perimizijumu skeletnog mišića. Epimizijum, u tom slučaju, bi odgovarao subendokardnom i subepikardnom vezivnom tkivu. Ova mreža vezivnog tkiva predstavlja intersticijalno vezivno tkivo srca. Pored toga, srce sadrži fibroelastično tkivo povezano sa osnovama plućne arterije i aorte, kao i srčanih zalistaka koje čini fibroznu (vezivnu) potporu srca. U fibroznu potporu srca spadaju: strukture srčanih zalistaka (listići i fibrozni prstenovi), čvrsto trougaono polje između zalistaka (*trigona fibrosa*), membranozni interventrikularni septum, kao i *chordae tendinae*. Fibrozni skelet srca stabilizuje poziciju kardiomiocita i zalistaka u srcu. Omogućava fizičku potporu kardiomiocita, krvnih sudova i nerava u miokardu, ojačava zaliske i sprečava prekomerno širenje srca, distribuira snagu kontrakcije, omogućava elastičnost, što je neophodno za vraćanje srca u prvobitno stanje posle svake kontrakcije i fizički razdvaja kardiomiocite pretkomora i komora (Martini i sar., 2007; Buja i Vela, 2008).

### **1.1.3.2. Estradiol i morfologija srca**

Estradiol reguliše rad srca i odgovoran je za polne razlike u morfologiji i funkciji srca, kao i povećanom riziku od srčanih bolesti (Nilsson i sar., 2001; Knowlton i Lee, 2012). Pre puberteta, nisu uočene statistički značajne razlike u veličini srca među polovima, pa su broj kardiomiocita i njihova veličina isti (Malcolm i sar., 1993). Međutim,

nakon puberteta srce kod muškaraca se uvećava u odnosu na srce žena, da bi konačno bilo uvećano za 15–30 % (de Simone i sar., 1995). Kardiomiociti muškaraca podležu većem stepenu hipertrofije tokom postnatalnog rasta u odnosu na kardiomiocite žena u normalnim uslovima (Grandi i sar., 1992; Leinwand, 2003). Efekti estradiola na srce u fiziološkim stanjima ogledaju se pre svega u regulaciji funkcije jonskih kanala. Tako je pokazano da estradiol utiče na povećanje aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjivača (*engl. Na/Ca-exchanger*) (Chen i sar., 2011) i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Dzurba i sar., 1997) i smanjenja aktivnosti L-tipa  $\text{Ca}^{2+}$  kanala (Johnson i sar., 1997). Takođe je pokazano da estradiol utiče na povećanje sinteze glikogena u srcu, aktivacijom Akt (Sugden i Clerk, 2001) i na taj način povećava energetske rezerve neophodne za normalan rad srca.

Sa druge strane, estradiol reguliše i različita patološka stanja kao što su: dilatacija komora, hipertrofija miokarda, promene ekstracelularnog matriksa, oksidativni stres (Gardner i sar., 2010; Murphy, 2011; Knowlton i Lee, 2012). Poznato je da žene pre menopauze imaju manju tendenciju ka hipertrofiji LK u odnosu na muškarce sličnih godina, dok je pojava hipertrofije LK kod žena posle menopauze ista kao kod muškaraca (Agabiti-Rosei i Muiesan, 2002; Kim i Levin, 2006). Iako je u nekim kliničkim studijama, u kojima je ispitivan efekat estradiola kao hormonske supstitucije, pokazano da povećava rizik od nastanka KVB (Hulley i sar., 1998; Anderson i sar., 2004) u drugim je pokazano da prilikom hormonske supstitucije dolazi do smanjenja hipertrofije LK za 20% u poređenju sa ženama koje nisu na terapiji (Lim i sar., 1999; Miya i sar., 2002). Kardioprotektivna uloga estradiola naročito se ispoljava u stanjima remodelovanja srca i razvoja srčane insuficijencije izazvane povećanjem zapremine krvi (*engl. volume overload*) nakon hirurške intervencije i stvaranja aortokavalne fistule, kod pacova mužjaka i ovarijektomisanih ženki (Gardner i sar., 2002; Brower i sar., 2003), dok davanje estradiola ovarijektomisanim ženkama i mužjacima značajno umanjuje ili sprečava razvoj srčane insuficijencije (Gardner i sar., 2008; Gardner i sar., 2010; Janicki i sar., 2013). Studije na životinjama, takođe, ukazuju na pozitivan efekat estradiola na adaptaciju (remodelovanje) srca. Pozitivan efekat estradiola u animalnim modelima ishemije srca, ispoljava se tako što dolazi do smanjenja veličine tkiva zahvaćenog infarktom (Booth i Lucchesi, 2008; Deschamps i sar., 2010), kao i smanjenje apoptoze kardiomiocita, aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta (Patten i sar., 2004). Takođe je pokazano da ženke miševa pokazuju manju inflamaciju, bržu transformaciju miofibroblasta i bržu neovaskularizaciju graničnog područja oko mesta infarkta u odnosu na mužjake (Wang i sar., 2012). Eksperimenti na

mužjacima miševa su pokazali da administracija estrogena preko minipumpe dovodi do smanjenja hipertrofije srca u stanjima posle infarkta miokarda (Cavasin i sar., 2003). Pokazano je da tretman estradiolom, u trajanju od dve nedelje, kod mužjaka pacova Sprague–Dawley soja značajno smanjuje veličinu tkiva zahvaćenu infarktom izazvanog ishemijom u odnosu na kontrolne mužjake (Lagranha i sar., 2010). Takođe je pokazano da akutna administracija estradiola 15 minuta pre okluzije koronarnih arterija smanjuje veličinu nekrotičnog tkiva izazvanog infarktom kod mužjaka zečeva u odnosu na kontrole (Hale i sar., 1997). Estradiol povoljno utiče na srce u stanjima traume (Yu i Chaudry, 2009), što je i pokazano u eksperimentima na mužjacima pacova podvrgnutim laparatomiji, a potom obilnom krvarenju (Szalay i sar., 2006; Kan i sar., 2008).

Apoptoza kardiomiocita je među glavnim karakteristikama različitih patofizioloških stanja srca (Haunstetter i Izumo, 1998). Inhibicija apoptoze kardiomiocita u cilju očuvanja broja ćelija koje se ne dele je važan aspekt u prevenciji i lečenju disfunkcije LK i daljeg razvoja bolesti srca (Ling i sar., 2006). Analize tkiva srca prilikom transplantacije su pokazale da su apoptoza i nekroza kardiomiocita dva puta veće u muškaraca u odnosu na žene (Guerra i sar., 1999). Pored toga je pokazano da estradiol svojim delovanjem direktno utiče na smanjenje apoptoze kardiomiocita (Patten i sar., 2004). Eksperimenti na mužjacima pacova su pokazali da estradiol poboljšava funkciju srca nakon oštećenja nastalih ishemijom i reperfuzijom (Wang i sar., 2006). U istoj studiji analize nivoa ekspresije proteina su pokazale da estradiol ima anti apoptotični efekat tako što smanjuje aktivaciju proteina p38 MAPK i kaspaza 3, kao i anti inflamatorni efekat tako što smanjuje produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 (Wang i sar., 2006). Pored uticaja na kardiomiocite pokazano je da estradiol utiče i na druge ćelije srca, poput fibroblasta (Pedram i sar., 2010). Fibroblasti učestvuju u strukturnim promenama u srcu, tako što podležu proliferaciji, deponovanju ekstraćelijskog materijala i zameni kardiomiocita fibroblastima (Ling i sar., 2006). Regulacija rasta fibroblasta u srcu je veoma važna tokom patofizioloških stanja kada dolazi do remodelovanja srca (Powell i sar., 1999). Smanjenje estradiola kod žena posle menopauze može doprineti progresivnoj fibrozi (Dubey i sar., 1998; Dubey i sar., 2002). Takođe je u drugim studijama pokazano da estradiol inhibira proliferaciju fibroblasta u srcu (Pedram i sar., 2010; Voloshenyuk i Gardner, 2010).

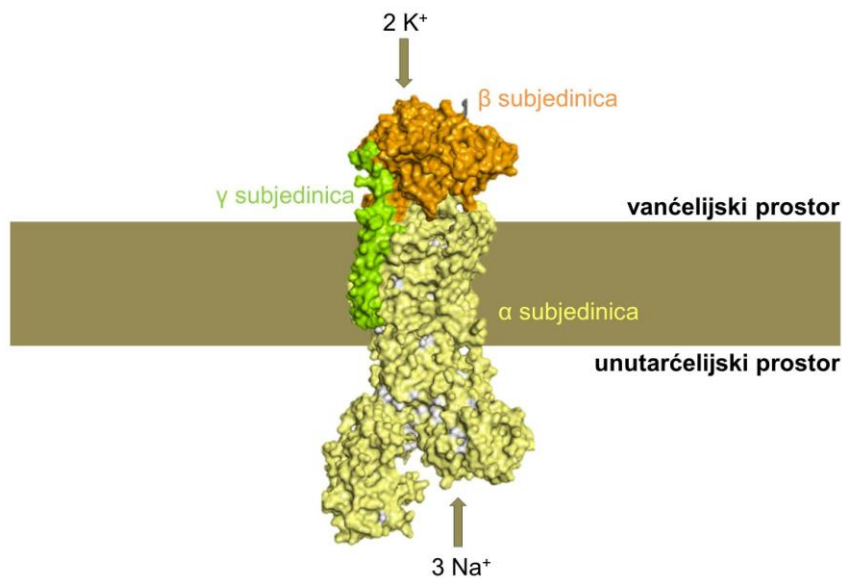
## 1.2. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza

Osnovna uloga Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze jeste održavanje niske koncentracije unutarćelijskog Na<sup>+</sup>, odnosno visoke koncentracije unutarćelijskog K<sup>+</sup>, što je neophodno za normalno odvijanje procesa u ćeliji. Energija za ovaj proces stvara se tokom hidrolize terminalne fosfatne veze u molekulu ATP, pri čemu nastaje ADP i oslobađa se orto fosfat. U stanju mirovanja na ovaj proces se utroši 19–28% celokupnog sintetisanog ATP u organizmu (Rolfe i Brown, 1997). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza je jedan od najizučavanijih enzima iz familije p-tipa ATPaza, za čije je otkriće Jens Christian Skou nagrađen Nobelovom nagradom za hemiju 1997. godine (Skou 1957).

### 1.2.1. Građa i funkcija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze

Molekul Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze je heterooligomer i sastoji se od  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica, u odnosu 1 : 1 (Kaplan 2002). Eksperimenti na prečišćenom proteinu su pokazali da svaki pokušaj razdvajanja  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica dovodi do inaktivacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Xie i sar., 1996). Na stabilizaciju i funkciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, u nekim ćelijama dodatno utiču FXYP proteini, koji se često nazivaju  $\gamma$ -subjedinica (Slika 3) (Garty i Karlish, 2006). Transport jona Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>, odvija se u nekoliko koraka. Prvo se za Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu vežu ATP i tri jona Na<sup>+</sup> iz citoplazme. Formirani acil-fosfatni intermedijer dovodi do konformacijskih promena Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i izbacivanja jona Na<sup>+</sup> izvan ćelije. Iz međućelijskog prostora preuzimaju se dva jona K<sup>+</sup>, a zatim se fosfatna grupa raskida i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza se vraća u prvobitnu konformaciju, pri čemu se joni K<sup>+</sup> oslobađaju u citoplazmu (Therien i Blostein, 2000; Liang i sar., 2001; Kaplan, 2002).





**Slika 2. Građa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze.** Na slici je prikazan topološki raspored  $\alpha$  subjedinice (žuta),  $\beta$  subjedinice (narandžasta) i  $\gamma$  subjedinica ili FXYP (zeleni); Na<sup>+</sup>, natrijum; K<sup>+</sup>, kalijum. Preuzeto i modifikovano iz (Shinoda i sar., 2009).

Velika katalitička,  $\alpha$ -subjedinica ( $M_r \sim 110$  kDa), poseduje mesta vezivanja Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> jona, kardijačnih glikozida, mesta prelazne fosforilacije sa ATP-om, kada se terminalna fosfatna grupa vezuje za  $\alpha$ -subjedinicu preko aminokiselinskog ostatka aspartata, kao i mesta fosforilacije različitim kinazama (Ohtsubo i sar., 1990; Therien i Blostein, 2000).  $\alpha$ -subjedinica poseduje 10 transmembranskih domena i 2 unutarćelijska luka, dok su N i C krajevi smešteni u unutrašnjosti ćelije (Kaplan, 2002; Morth i sar., 2007). Veći citoplazmatski luk predstavlja mesto fosforilacije i vezivanja ATP (Kaplan, 2002; Morth i sar., 2007).  $\alpha$ -subjedinica postoji u četiri izoforme ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , and  $\alpha_4$ ) (Juhaszova i Blaustein, 1997; Therien i Blostein, 2000). Dok je  $\alpha_1$ -izoforna eksprimirana u svim tkivima,  $\alpha_2$  subjedinica je najviše eksprimirana u mozgu, skeletnim mišićima, srcu, glatkim mišićima krvnih sudova i masnom tkivu, a drugim tkivima u manjoj meri (Dostanic-Larson i sar., 2006).  $\alpha_3$ -izoforna je uglavnom eksprimirana u neuronima i ovarijumima, ali takođe se nalazi i u srcu kod nekih vrsta (Jewell i Lingrel 1991; Therien i Blostein, 2000).  $\alpha_4$ -izoforna je eksprimirana u testisima i ima ulogu u pokretljivosti spermatozoida (Woo i sar., 2000). Ekspresija  $\alpha$ -subjedinica u srcu je različita kod različitih vrsta, tako su  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  izoforme prisutne kod pacova i miševa (Gao i sar., 1999; Berry i sar., 2007), dok su kod ljudi prisutne tri izoforme ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$ ) (Shamraj i sar., 1991; Jewell i sar., 1992). Razlike u aminokiselinskoj sekvenci, kod različitih  $\alpha$  subjedinica su minimalne

i one pokazuju 85% sličnosti (Jewell i Lingrel, 1991; Blanco i Mercer, 1998). U funkcijskom pogledu, postoje tkivno-specifične razlike među subjedinicama (Therien i Blostein, 2000). Tako je pokazano da su različite izoforme ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ) subjedinica različito eksprimirane u različitim delovima srca pa čak i na nivou iste ćelije, što ukazuje na fiziološke specifičnosti (James i sar., 1999).

Manja i veoma glikozilovana  $\beta$ -subjedinica ( $M_r \sim 35-55$  KDa) utiče na formiranje stabilne  $\alpha$  subjedinice (Therien i Blostein, 2000; Kaplan, 2002). Pored toga  $\beta$ -subjedinica može uticati na afinitet prema katjonima (Therien i Blostein, 2000; Kaplan, 2002).  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice se sintetišu nezavisno u endoplazmatskom retikulumu, a zatim se povezuju tokom ili nakon sinteze (Geering i sar., 1996; Efendiev i sar., 2007). Smatra se da  $\beta$ -subjedinica deluje kao „chaperon“ u spajanju sa  $\alpha$  subjedinicom i njihovom transportu do membrane (Kawamura i Noguchi, 1991).  $\beta$ -subjedinice se sastoje od kratkog citoplazmatskog repa, jednog transmembranskog segmenta i velikog glikozilovanog vanćelijskog segmenta (Beggah i sar., 1997; Morth i sar., 2007).  $\beta$ -subjedinica se eksprimira u tri izoforme ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 3$ ).  $\beta 1$  izoforma je uvek prisutna, kao i  $\alpha 1$  izoforma ukazujući na neophodnost  $\alpha 1$ - $\beta 1$  dimera u svim ćelijama, dok su ostale izoforme eksprimirane tkivno-specifično (Tokhtaeva i sar., 2012).  $\beta 2$  izoforma se predominantno eksprimira u mozgu i mišićima (Avila i sar., 1998), a  $\beta 3$  izoforma u plućima, testisima, mišićima, mozgu i jetri (Appel i sar., 1996; Tokhtaeva i sar., 2012). Kod ljudi  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  izoforme su eksprimirane zajedno sa  $\beta 1$  izoformom u srcu, dok je  $\beta 2$  izoforma prisutna u manjem obimu u pojedinim regionima srca (Schwinger i sar., 1999; Schwinger i sar., 2003). Pokazano je da svaka od 4  $\alpha$  i 3  $\beta$  izoforme subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze imaju različite iRNK, kao i da se sintetišu nezavisno jedne od drugih (Lingrel i Kuntzweiler, 1994; Jorgensen i sar., 2003). Kombinacijom različitih izoformi nastaju mnogobrojni izoenzimi ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze) koji se eksprimiraju u tkivno i ćelijski specifičnom pogledu (Jorgensen i sar., 2003; Tokhtaeva i sar., 2012).

FXYP su familija proteina koju čine sedam kratkih transmembranskih proteina (FXYP1–FXYP7), a karakteriše ih FXYP sekvenca u njihovom vanćelijskom domenu po kojoj su dobili naziv (Sweadner i Rael 2000; Garty i Karlish, 2006; Geering, 2008). FXYP proteini su tkivno-specifične regulatorne subjedinice, koje utiču na stabilizaciju i kinetičke osobine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, odnosno na afinitet prema  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u određenim ćelijama ili fiziološkim stanjima (Garty i Karlish, 2006). Tako je pokazano da je FXYP1 subjedinica ili fosfoleman (*engl. phospholemman*) uglavnom eksprimirana u srcu i skeletnim mišićima

(Chen i sar., 1997; Lifshitz i sar., 2006), dok je FXYP2, prvobitno nazivana  $\gamma$  -subjedinica uglavnom eksprimirana u bubrezima (Forbush i sar., 1978; Kim i sar., 1997; Blostein i sar., 2003; Geering 2008). Rezultati eksperimenta na prečišćenim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazama su pokazali da je kompleks  $\alpha$ - $\beta$ -FXYP1 značajno stabilniji od  $\alpha$ - $\beta$  kompleksa (Lifshitz i sar., 2006; Lifshitz i sar., 2007).

Nivo ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u tkivima je različiti a ekspresija različitih izoformi subjedinica je specifično regulisana u različitim regionima srca tokom fizioloških i patofizioloških stanja (Schwinger i sar., 2003; Geering 2008). Uočena je velika razlika u eksprimiranju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze između ćelija u kojima je najmanje eksprimiran kao što su eritrociti (250-500 molekula po ćeliji) i ćelija u kojima je ovaj enzim najviše eksprimiran, kao što su ćelije kore mozga (11000-12000 pmol/g tkiva) (Wiley i Shaller, 1977; Schmidt i sar., 1992; Schmidt i sar., 1996; Koksoy, 2002). Pored toga  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza je prilično eksprimirana i u tkivu srca (~ 700 pmol/g tkiva) (Schmidt i sar., 1993). Postojanje izoformi, različitog nivoa ekspresije i specifične regulacije ukazuje na njihov različit funkcijski potencijal. Studije u kojima su ispitivane različite heterodimerne forme  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze su pokazale da kardijačni glikozidi (ouabain) imaju dva puta manji afinitet vezivanja za  $\alpha 2$ - $\beta 1$  u odnosu na  $\alpha 1$ - $\beta 1$  ili  $\alpha 3$ - $\beta 1$  heterodimere (Crambert i sar., 2000; Muller-Ehmsen i sar., 2001). U jednoj studiji je pokazano da je afinitet prema  $\text{Na}^+$  sličan kod svih heterodimera (Muller-Ehmsen i sar., 2001), dok je u drugoj pokazano da  $\alpha 1$ - $\beta 1$  heterodimer ima najveći afinitet, a  $\alpha 3$ - $\beta 1$  ima najmanji (Crambert i sar., 2000). Afinitet prema  $\text{K}^+$  je značajno manji kod  $\alpha 2$ - $\beta 1$  heterodimera u odnosu na  $\alpha 1$ - $\beta 1$  ili  $\alpha 3$ - $\beta 1$  (Muller-Ehmsen i sar., 2001), ali takođe je pokazano da je afinitet prema  $\text{K}^+$  sličan kod svih heterodimera (Crambert i sar., 2000).

### 1.2.2. Regulacija $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Hormoni kao i faktori sredine (npr. koncentracija  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , kardijačni glikozidi) imaju efekta na aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i to uticajem na ekspresiju gena subjedinica, translokaciju sintetisanih subjedinica na plazma membranu i reverzibilnom fosforilacijom (Ewart i Klip 1995; Isenovic i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Efendiev i sar., 2007; Li i sar., 2011).

Prvi mehanizam regulacije je povećanje ili smanjenje transkripcije gena za  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu, što rezultira njenim povećanjem ili smanjenjem na plazma membrani (Therien i Blostein, 2000; Palacios i sar., 2004). Mehanizam regulacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze preko

insercije novosintetisanih  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza u plazma membranu predstavlja intermedijerni mehanizam regulacije u ćelijama, gde se novosintetisane subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze dopremaju do plazma membrane iz unutarćelijskih depoa, kada je to potrebno (Hundal i sar., 1992; Al-Khalili i sar., 2003). Pokazano je da su odeljci sa novosintetisanim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazama lokalizovani uz membranu (Efendiev i sar., 2007). Mehanizam reverzibilne fosforilacije, predstavlja direktan uticaj na kinetiku enzima već prisutnih u membrani, što se dešava u toku nekoliko minuta do nekoliko sati (Bertorello i Katz, 1993; Therien i Blostein, 2000). Reverzibilnom fosforilacijom  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze preko kinaza kao što su: PKA, Akt, PKC, PKG, kao i ERK1/2 dolazi do ubrzanog ili usporenog transporta jona (Ewart i Klip, 1995; Li i sar., 1999; Therien i Blostein, 2000; Al-Khalili i sar., 2004; Sudar i sar., 2008).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza je i specifično mesto vezivanja kardijačnih glikozida i endogenih kardiotoničnih steroida, koji se kod sisara sintetišu slično kao i steroidni hormoni (od holesterola), a deluju kao indirektni regulatori srčane kontraktilnosti, a u malim koncentracijama pokazuju pozitivan inotropni efekat (Akeri i Brody 1977; Bagrov i sar., 2009; Lingrel 2010). Endogeni kardiotonični steroidi i kardijačni glikozidi inhibiraju aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze tako što se vezuju za aktivno mesto na vanćelijskom delu  $\alpha$  subjedinice (Kaplan, 2002; Bagrov i sar., 2009), i to jedan molekul ouabaina vezuje za jedan  $\alpha$ - $\beta$  dimer (Kaplan, 2002). Nakon vezivanja za  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu u ćelijama srca, endogeni kardiotonični steroidi i kardijačni glikozidi dovode do povećanja unutarćelijske koncentracije  $\text{Na}^+$ , što dovodi do izbacivanja  $\text{Na}^+$  iz ćelije odnosno ulaska jona  $\text{Ca}^{2+}$  u ćeliju posredstvom  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjivača (Bagrov i sar., 2009; Lingrel, 2010). Povećanje unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  povećava kontraktilnu snagu srčanog mišića (Akeri i Brody, 1977; Grupp i sar., 1985). Tokom patofizioloških stanja, kao što su hipertrofija srca, srčana insuficijencija kardiomiciti postaju osetljiviji na efekat kardijačnih glikozida, jer tada dolazi do smanjenja koncentracije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u plazma membrani (Shamraj i sar., 1993; Liu i sar., 2012). Stoga kontrolisana regulacija funkcije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ima veoma važnu ulogu u tretmanu i mogućoj prevenciji ovih bolesti.

Nedavno su Liu i saradnici pokazali da smanjenje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze dovodi do smrti kardiomiocita i disfunkcije srca, i sledstvene hipertrofije i srčane insuficijencije (Nadal-Ginard i sar., 2003; Liu i sar., 2012). Drugi autori pokazuju da estradiol može usporiti razvoj hipertrofije srca (Al-Khalili i sar., 2003). Ovarijektomisane ženke miševa koje su dobijale određenu dozu estradiola ispoljavaju manji stepen hipertrofije srca nakon suženja

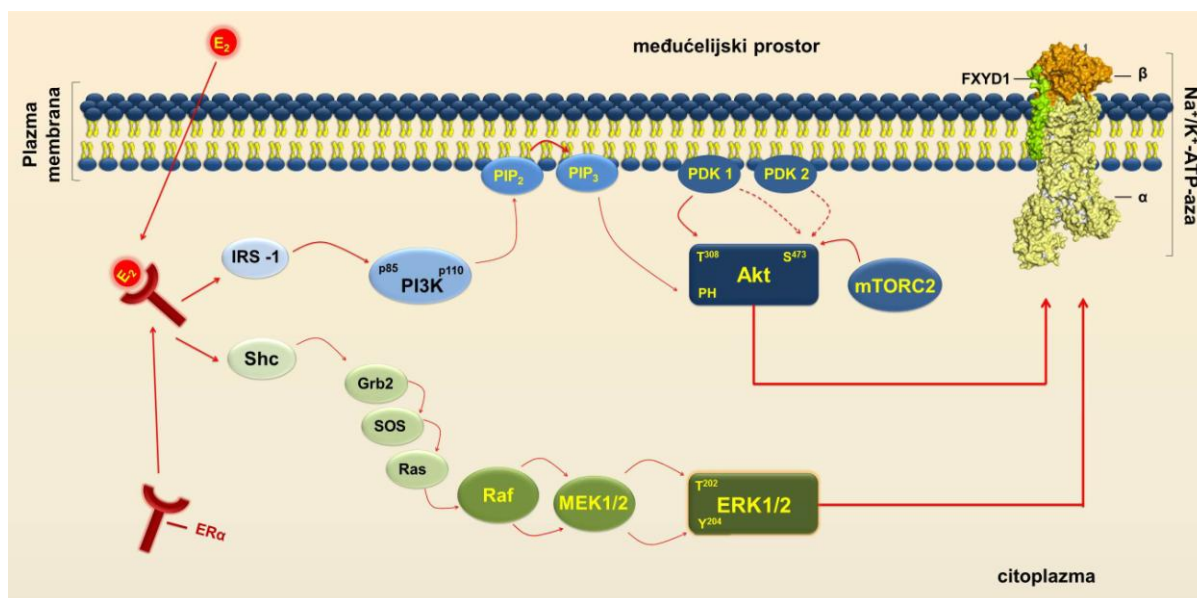
aorte u poređenju sa miševima koji nisu bili na tretmanu estradiolom (van Eickels i sar., 2001; Al-Khalili i sar., 2003; Donaldson i sar., 2009).

### 1.2.2.1. Regulacija $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze estradiolom

Estradiol je jedan od bitnih regulatora aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u KVS (Dzurba i sar., 1997; Isenovic i sar., 2002; Li i sar., 2011). Aktivnost ove pumpe je povećana u eritrocitima žena pri maksimalnom nivou estradiola, tokom menstrualnog ciklusa (Melis i sar., 1990). Estradiol povećava aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u kulturi ćelija srca (Liu i sar., 2007), i povećava ekspresiju  $\alpha 2$  subjedinice, što dodatno povećava njenu aktivnost (Palacios i sar., 2004). U nedostatku estradiola, u eksperimentima na ovarijektomisanim ženama pacova, aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je značajno smanjena u mozgu (Kaur i sar., 1997). Rezultati koje su objavili Li i saradnici (Li i sar., 2011), ukazuju na protektivnu ulogu estradiola u stanjima ishemije miokarda posredstvom povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Koristeći dvo-hibridni esej kvasaca (*engl. yeast two-hybridization assay*) ista grupa autora je indentifikovala  $\beta 1$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kao protein koji interaguje sa proteinom NDRG2 (*engl. N-myc Downstream-Regulated Gene 2*). NDRG2 je citoplazmatski protein, član NDRG familije (Deng i sar., 2003; Hu i sar., 2006), eksprimiran u mnogim tkivima, a posebno u mozgu, srcu, skeletnim mišićima i bubrezima, odnosno tkivima bogatim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazom (Hu i sar., 2006; Li i sar., 2011). Analiza promoterskog regiona NDRG2 gena je pokazala prisustvo ERE u tom regionu, što ukazuje da estradiol, može imati ulogu u regulaciji ekspresije NDRG2 (Li i sar., 2011). U ranijim radovima je pretpostavljeno da estradiol pojačava kontraktilnost srca, i da utiče na održavanje homeostaze katjona u ćelijama srca, tako što stimuliše aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na sarkolemama kardiomiocita (Dzurba i sar., 1983; Barta i sar., 1989; Dzurba i sar., 1997). Džubra i saradnici (Dzurba i sar., 1997) su pretpostavili da estradiol može uticati direktno na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu slično kao digitalis s obzirom na njihove strukturne sličnosti i da na taj način može regulisati njenu funkciju (Franck i sar., 1984).

Pokazano je da estradiol može uticati na aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze aktivacijom različitih signalnih puteva. Jedan od izučavanijih mehanizama aktivacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze estradiolom, uključuje i signalni put PI3K i Akt (Isenovic i sar., 2002; Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008). Za ERK1/2 je takođe pokazano da su uključene u regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Al-Khalili i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008). Eksperimenti u kojima je korišćen PD98059, specifični inhibitor ERK1/2, pokazali

su da dolazi do smanjenja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, što ukazuje da su ERK1/2 uključene u signalni put regulacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Isenovic i sar., 2004).



**Slika 3. Efekti estradiola na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu.**  $\text{E}_2$  – estradiol;  $\alpha$  – alfa subjedinica;  $\beta$  – beta subjedinica; FXYD 1, FXYD 1 subjedinica ili fosfoleman; Shc – adapterski protein; IRS-1 – supstrat receptora za insulin 1;  $\text{E}\alpha$  – receptor za estrogen (*engl. Estrogene Receptor*) alfa; PI3K – fosfatidilinozitol-3 kinaza; p85 – 85 kDa regulatorna subjedinica; p110, 110 kDa katalitička subjedinica;  $\text{PIP}_2$  – fosfatidil inozitol(4,5)difosfat;  $\text{PIP}_3$  – fosfatidil inozitol(3,4,5)trifosfat; PDK1 – fosfoinozimid-zavisna protein kinaza 1; PDK 2 – fosfoinozimid-zavisna protein kinaza 2; Akt – protein kinaza B; PH – domen homolog plekstrinu; mTORC2 – kompleks ciljnog molekula za rapamicin 2 kod sisara; Shc – adapterski protein; Ras, guanozin nukleotid trifosfataza; Grb2 – protein 2 koji se vezuje za receptore faktora rasta; SOS – guanin nukleotid faktor razmene; Raf – protein kinaze kinaze kinaza aktivirana mitogenom; MEK1/2 – protein kinaze kinaza aktivirana mitogenom 1 i 2; ERK1/2 – ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2; T<sup>308</sup> – treonin<sup>308</sup>; i S<sup>473</sup> – serin<sup>473</sup>; T<sup>202</sup> – treonin<sup>202</sup>; Y<sup>204</sup> – tirozin<sup>204</sup>; ↑ povećanje; Figura  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze preuzeta i modifikovana iz (Shinoda i sar., 2009).

### 1.2.3. Veza između gojaznosti, morfologije srca i $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Gojaznost se definiše kao poremećaj sa hroničnim inflamatornim statusom i predstavlja direktan uzrok pojave i razvoja KVB (Wellen i Hotamisligil, 2003; Lehrke i Lazar, 2004). Patogeneza gojaznosti je multifaktorna i odavno je poznato da masno tkivo ne predstavlja samo depoe masti već da je to organ sa endokrinom funkcijom, koji sintetiše i luči veliki broj različitih peptidnih i nepeptidnih jedinjenja u krvotok, a koji mogu imati uticaj na kardiovaskularni sistem (Abel i sar., 2008). Gojaznost povećava rizik nastanka brojnih bolesti srca, posredstvom različitih mehanizama koji dovode do strukturnih i funkcijskih promena srca. Osnovni problem u istraživanjima uticaja gojaznosti na srce jeste pojava propratnih patofizioloških efekata kao što su: hipertenzija, dijabetes i vaskularne bolesti (Alexander, 1985), ali i pored toga, mnogobrojni naučni rezultati ukazuju da gojaznost predstavlja nezavisan faktor rizika u nastanku raznih bolesti srca (Iacobellis i sar., 2002; Iacobellis, 2004; Iacobellis i sar., 2004).

Jedna od karakterističnih propratnih stanja gojaznosti jeste IR za koju je pokazano da povećava rizik od nastanka različitih bolesti srca (Shah i Shannon, 2003; Morisco i sar., 2006). Insulin (INS) je plejotropni hormon i ispoljava višestruke efekte na metabolizam lipida i proteina, transport jona, proliferaciju ćelija i diferencijaciju (Morisco i sar., 2006). Tako da IR ne dovodi samo do poremećaja homeostaze glukoze (Glu), već je to kompleks različitih patofizioloških stanja metabolizma (Morisco i sar., 2006). Patologija IR naročito dolazi do izražaja u tkivima odnosno organima uglavnom konstituisanim od terminalno diferenciranih ćelija, gde apoptoza ćelija izazvana poremećajima metabolizma dovodi do ireverzibilnog oštećenja (Condorelli i sar., 1999; Morisco i sar., 2006), a takav organ je srce. U fiziološkim stanjima, slobodne masne kiseline (SMK) predstavljaju glavni supstrat za proizvodnju ATP u srcu, pri čemu se 60-70% od ukupne dobijene energije koristi za održavanje srčanog rada (Dirkx i sar., 2011; Abel i sar., 2012). U stanju IR dolazi do supresije procesa lipolize i povećanja nivoa SMK u krvi, a kao posledica toga dolazi do nakupljanja lipida u miokardu, što remeti funkciju LK (Abel i sar., 2012). Pored toga, povećan nivo leptina, karakterističan u stanju gojaznosti dovodi do hipertrofije kardiomiocita (Rajapurohitam i sar., 2003; Xu i sar., 2004; Madani i sar., 2006). Takođe, smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je u direktnoj vezi sa stanjima hiperglikemije ili hiperinsulinemije (Iannello i sar., 2007), povećanjem koncentracije SMK u membrani

ćelija (Oishi i sar., 1990; Therien i Blostein, 2000), kao i povećanom koncentracijom leptina (Beltowski i sar., 2004).

### 1.2.3.1. Uticaj gojaznosti na morfologiju srca

Istraživanja morfoloških i fizioloških stanja srca kod eksperimentalnih životinja i ljudi ukazuju da gojaznost postepeno dovodi do povećanja volumena krvi, povećanja sistolne i dijastolne disfunkcije LK, hipertrofije LK, nakupljanja masti u tkivu srca, kao i drugih patoloških promena u strukturi tkiva srca (Artham i sar., 2008). Sve te promene zajedno, vode težim patofiziološkim stanjima kao što su disfunkcija srca i srčana insuficijencija (Levy i sar., 1990; Milani i sar., 2006). Hipertrofija srca uočena kod pacova koji su bili na režimu ishrane obogaćene mastima (HF; *engl. High Fat*) predstavlja prvi korak u nizu aklimacionih odgovora srca na stres uzrokovan velikim brojem fizioloških i patofizioloških stanja (Frey i sar., 2004). Prekomerne naslage masnog tkiva, mehanički vrše pritisak na krvne sudove što značajno otežava normalan rad srca (Poirier i sar., 2006). Pored toga, protok krvi u stanju mirovanja u masnom tkivu je obično 2-3 ml/min po 100 g tkiva (Larsen i sar., 1966; Lesser i Deutsch, 1967), što je mnogo manje u poređenju sa protokom krvi kroz skeletne mišiće, gde je pokazano da je protok krvi 50-75 ml/min po 100 g tkiva (Oberger i Rosell, 1967). Povećanje mase masnog tkiva dovodi do smanjenja ukupnog perifernog otpora što za posledicu ima povećanje ukupnog volumena cirkulišuće krvi kao i povećanja minutnog volumena srca, kako bi se namirile sve metaboličke potrebe srca (Kasper i sar., 1992; Alpert, 2001; Lakhani i Fein, 2011). Povećan minutni volumen srca u početku se može pripisati blagom povećanju broja otkucaja srca, međutim ovakvo stanje tokom dužeg vremenskog perioda dovodi do postepenog uvećanja komora srca i povećanog pritiska na zidove komora, što uzrokuje nastanak minimalnog zadebljanja zida LK (Messerli 1986; Lakhani i Fein, 2011). U početku ovakav proces se može smatrati kao mehanizamom prilagođavanja, ali u dužem vremenu dovodi do povećanja mase miokarda i hipertrofije LK, koja nije praćena povećanjem broja kapilara koji snabdevaju miokard. Pored toga, distanca između postojećih kapilara i kardiomiocita se povećava, što sve zajedno dovodi do disproporcije između potreba miokarda za krvlju i stepena perfuzije miokarda i konačno do ishemijskih promena miokarda (Lavie i Messerli, 1986; Artham i sar., 2008).

Međutim, postoje podaci nekoliko studija koje nisu pokazale da dolazi do značajnih promena u srcu gojaznih eksperimentalnih životinja (Abel i sar., 2008). Ove nedoslednosti



rezultata različitih studija mogu se objasniti korišćenjem različitih animalnih modela kao i primenom različitih metoda za indukciju stanja morfoloških i funkcijskih promena srca (Abel i sar., 2008). Rezultati studije rađene na Sprague-Dawley pacovima koji su bili na HF ishrani (32% masti) tokom 12 nedelja, nisu pokazale da i pored biohemijskih i endokrinih poremećaja tipičnih za gojaznost dolazi do značajnih promena u morfologiji srca (Carroll i sar., 2006). Studija rađena na istom pacovskom modelu podvrgnutim HF ishrani (33% masti) u trajanju od 14 nedelja nije pokazala da dolazi do razvoja hipertrofije na nivou kardiomiocita kao i celog organa (Ricci i sar., 2006).

Veći broj studija koje su rađene na animalnim modelima, pokazuju da gojaznost izazvana HF ishranom dovodi do strukturnih i funkcijskih promena srca. Ouwens i saradnici (Ouwens i sar., 2005) su ispitujući promene na srcu Wistar pacova koji su sedam nedelja bili na HF ishrani (50,4% masti), pokazali da razvoj gojaznosti dovodi do hipertrofije srca. Takođe, posmatranjem tkiva srca elektronskim mikroskopom uočene su značajne abnormalnosti u građi ćelija srca kod pacova na HF ishrani, dok su biohemijske analize pokazale da je akumulacija triglicerida (Tg) u tkivu srca dva puta veća kod pacova na HF ishrani u odnosu na normalno uhranjene pacove (Ouwens i sar., 2005). Leopoldo i saradnici (Eisele i sar., 2001; Leopoldo i sar., 2010) izučavali su uticaj gojaznosti na patofiziološke promene u srcu kod Wistar pacova koji su bili na HF ishrani (42.5% masti) u trajanju od 15 nedelja. Njihovi rezultati pokazuju da je gojaznost indukovala zadebljanje miokarda i hipertrofiju LK, kao i povećanje kolagena u miokardu. Takođe su pokazali da gojaznost dovodi do značajnih ultrastrukturnih promena, kao što su: odsustvo i/ili dezorganizacija miofilamenata, proširenje sarkoplazmatskog retikuluma, promene na mitohondrijama, kao i prisustvo velikog broja masnih kapljica između miofibrila. Gojaznost indukovana HF ishranom dovodi do nakupljanja masti i Tg u miokardu. HF ishrana bazirana na zasićenim masnim kiselinama (60% kalorija) iz kakao putera, dovodi do značajnog povećanja količine Tg u srcu, kao i apoptoze ćelija srca (Okere i sar., 2006). *In vitro* eksperimenti na kulturama neonatalnih kardiomiocita pacova su pokazali da zasićene masne kiseline dovode do promena fosfolipida u membranama ćelija srca, što inicira apoptozu ćelije (de Vries i sar., 1997; Miller i sar., 2005).

Osnovni problem u istraživanjima morfoloških promena srca gojaznih osoba jeste što ne postoje adekvatne kontrole. Veliki broj saznanja dobijenih na osnovu obdukcije tkiva srca gojaznih i normalno uhranjenih ljudi, ukazuju da gojaznost izaziva hipertrofiju srca kao i različita stanja bolesti koronarnih arterija (koronarnu bolest, aterosklerozu

koronarnih arterija) (Drenick i Fisler, 1988; Alpert i sar., 1995; Kortelainen 1996; Kortelainen 2002; Cummings i sar., 2007). Klinička istraživanja uglavnom potvrđuju dokaze o negativnim efektima gojaznosti na srce. U velikoj populacionoj studiji (Framingham Heart Study), sprovedenoj na 5881 pacijentu tokom 14 godina, pokazano je da gojaznost dovodi do poremećaja sistolne i dijastolne funkcije srca (Kenchaiiah i sar., 2002). Uvećanje vrednosti indeksa telesne mase (BMI; *engl. Body Mass Index*) za svaku jedinicu direktno je povezano sa povećanjem rizika od nastanka srčane insuficijencije. U studiji u kojoj su učestvovali gojazni pacijenti čija je telesna masa bila dva puta veća od normalne, pokazano je da je došlo do uvećanja mase LK, kao i poremećaja sistolne i dijastolne funkcije i da gubitak težine kod ovih pacijenata dovodi do poboljšanja (Alpert i sar., 1995). Iacobellis i saradnici (Iacobellis i Leonetti, 2005; Iacobellis i sar., 2007) su pokazali da kod gojaznih osoba dolazi do povećanja masti u epikardu, kao i da je to povećanje u korelaciji sa količinom visceralnog masnog tkiva (Shibata i sar., 1997). Takođe, povećanje masti u epikardu je u pozitivnoj korelaciji sa hipertrofijom LK (Iacobellis i sar., 2007).

### 1.2.3.2. Uticaj gojaznosti na aktivnost i ekspresiju $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Imajući u vidu da je smanjenje funkcije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze povezano sa razvojem i/ili patogenezom KVB, veoma je bitno razumeti mehanizme regulacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u ovakvim stanjima. Posebno je važna regulacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srčanom mišiću, gde ovaj enzim ima važnu ulogu u normalnoj funkciji kardiomiocita (Liu i sar., 2012). Povećanje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze dovodi do hiperpolarizacije i relaksacije mišića, dok njena inhibicija izaziva suprotan efekat (Akeri i Brody 1977; Blaustein i sar., 1998). U masnom tkivu gojaznih ljudi aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je smanjena i u negativnoj korelaciji sa vrednostima BMI (Iannello i sar., 2007; Iannello i sar., 2007). Takođe, pokazano je da je aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze smanjena kod gojaznih eksperimentalnih životinja (animalni modeli) (Bray i Yukimura, 1978; Guernsey i Morishige, 1979; Iannello i sar., 1994; Iannello i sar., 2007). Lin i saradnici su, izučavajući efekte gojaznosti na aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u skeletnim mišićima i jetri gojaznih miševa, pokazali da je aktivnost enzima značajno smanjena (Lin i sar., 1978; Lin i sar., 1981).

Stanja hiperglikemije ili hiperinsulinemije, česta su prateća pojava u gojaznosti, i takođe uzrokuju smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u različitim tkivima (Iannello i sar., 2007). Pokazano je da u stanjima IR za koje je karakterističan povećan nivo SMK (Iannello

i sar., 2007), povećanje SMK u membrani ćelija može dovesti do inhibicije aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Oishi i sar., 1990; Therien i Blostein, 2000). Takođe, stanje gojaznosti je povezano sa hiperleptinemijom ili rezistencijom na leptin (Katsiki i sar., 2011; Paspala i sar., 2012). Pokazano je da povećan nivo leptina smanjuje aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u bubregu pacova (Beltowski i sar., 2004). Smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je, takođe, pokazano u stanju dislipidemije i metaboličkog sindroma (Chibalin 2007; Rodrigo i sar., 2007). Pacijenti sa dijagnostikovanom dislipidemijom imaju smanjenu aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u eritrocitima (Uydu i sar., 2012).

## 2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Ciljevi

Ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- izučavanje *in vivo* efekata estradiola na morfologiju srca normalno uhranjenih pacova;
- izučavanje *in vivo* efekata estradiola na regulaciju aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu normalno uhranjenih pacova;
- izučavanje efekata ishrane bogate mastima na morfologiju srca pacova;
- izučavanje efekata ishrane bogate mastima na aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu pacova;
- izučavanje *in vivo* efekata estradiola na morfologiju srca gojaznih pacova;
- izučavanje *in vivo* efekata estradiola na regulaciju aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih pacova;
- izučavanje učešća Akt/ERK1/2 u efektima estradiola na morfologiju srca kao i aktivaciju i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

## 2.2 Hipoteza

Radna hipoteza predloženih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je da estradiol *in vivo* utiče na morfologiju ćelija srca, u smislu ublažavanja njegove hipertrofije i da reguliše aktivnost i ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze mehanizmom koji uključuje učešće Akt i ERK1/2 u srcu normalnih pacova. U patofiziološkim stanjima kao što je stanje gojaznosti, često združeno sa pojavom IR, u kojem su aktivnost i ekspresija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze smanjene, a hipertrofija ćelija srca izražena, estradiol svojim delovanjem takođe dovodi do povećanja aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i ublažavanja hipertrofije ćelija srca.

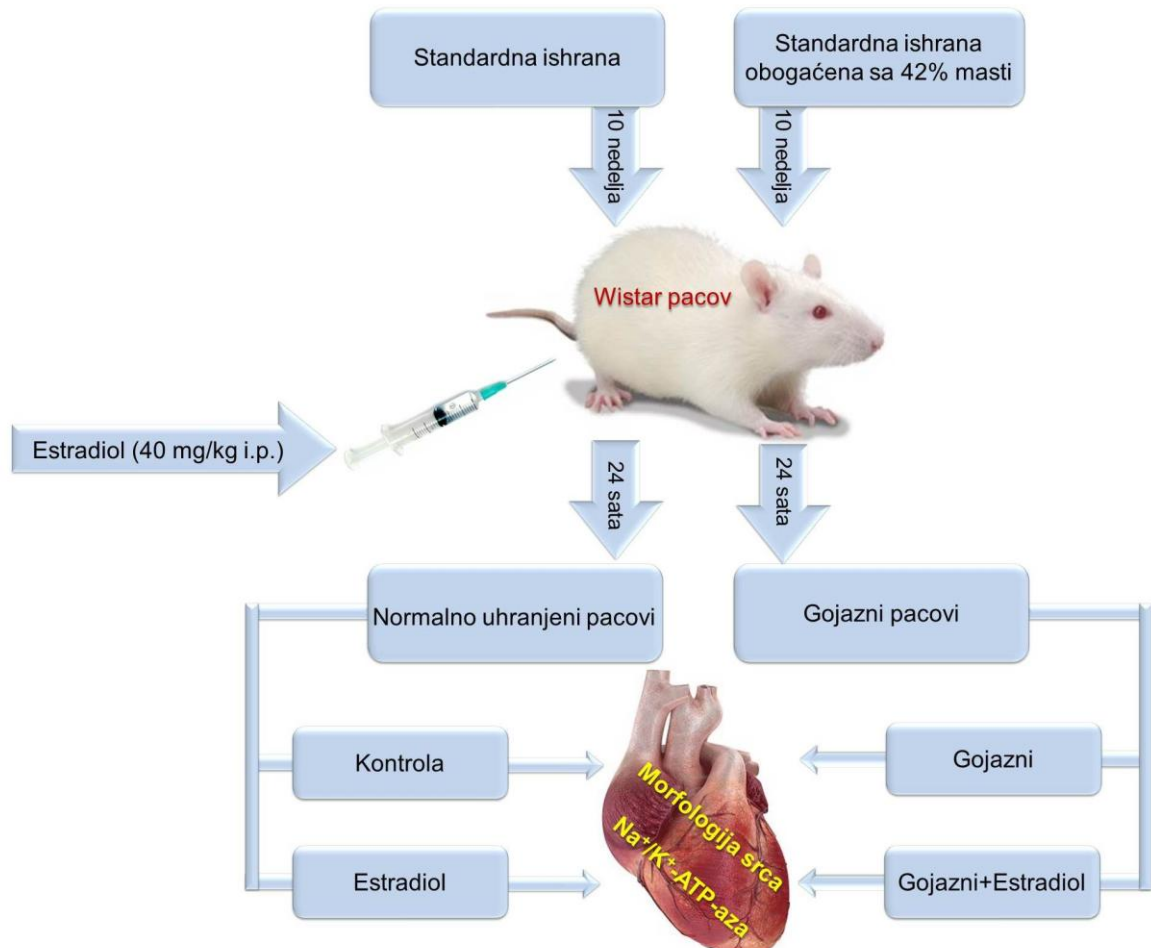
U postavci osnovne hipoteze pošlo se od činjenice da estradiol aktivacijom signalnih puteva Akt i ERK1/2 proteinskih kinaza ostvaruje kardioprotektivne efekte. Do sada su izučavani *in vitro* efekti estradiola na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i to na različitim ćelijskim linijama i ćelijskim kulturama, dok su njegovi efekti na morfologiju ćelija srca, kako u normalnim tako i u patofiziološkim uslovima, nedovoljno dokumentovani u literaturi. Takođe, još ne postoje literaturni podaci koji povezuju promene u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze sa promenama u morfologiji ćelija srca pod delovanjem estradiola u normalnim i patofiziološkim uslovima.

Imajući u vidu složenost fiziološkog uticaja estradiola, kao i ograničene literaturne podatke, koji se odnose na njegove *in vivo* efekte na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca, normalno uhranjeni i gojazni pacovi su tretirani estradiolom a potom žrtvovani nakon 24 sata. Dobijeni rezultati iz ovako dizajniranih eksperimenata su doprineli odgovoru na pitanje da li se promene u aktivnosti i ekspresiji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologije srca, pod delovanjem estradiola, u normalnim i patofiziološkim stanjima (gojaznost i IR), mogu takođe dovesti u vezu sa efektima estradiola na aktivaciju Akt i ERK1/2 u srcu pacova.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Eksperimentalni protokol – rad sa eksperimentalnim životinjama

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



Slika 1. Eksperimentalni protokol – rad sa eksperimentalnim životinjama

Kontrole netretirane (Kontrola) i estradiolom tretirane (Estradiol) životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani sastava: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 1% kalcijuma, 0,90% lizina, 0,75% metionin+cistin, 0,5% fosfora, 0,15–0,25% natrijuma, mešavine vitamina (A 10000 IU/kg, D<sub>3</sub> 1600 IU/kg, E 25 mg/kg, B<sub>12</sub> 0,02 mg/kg), mešavine minerala (u mg/kg: cink 100, gvožđe 100, magnezijum 30, bakar 20, jod 0,5, selen 0,1), antioksidanata 100 mg/kg; digestibilna energija 11MJ/kg (D.D. “Veterinarski zavod Subotica”, Subotica, R. Srbija) tokom 10 nedelja. Eksperimentalne grupe, gojazni pacovi (Gojazni) i gojazni pacovi tretirani estradiolom (Gojazni + Estradiol) su tokom narednih 10 nedelja imale slobodan pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani obogaćenju sa 42% masti (suncokretovo ulje) (Slika 1).

Životinje su tokom trajanja eksperimenta čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima. Grupe od 2–3 jedinice su bile smeštene u kavezima od pleksiglasa sa poklopcem od nerđajuće čelične žice i podlogom od piljevine koja je menjana dva-tri puta nedeljno. Prostorije u kojima su životinje čuvane su provetravane sistemom ventilacije. Temperatura je bila u opsegu 21 °–24 °C, dok je vlažnost vazduha bila 60–70%. Dnevno noćni ritam imitiran je pomoću veštačkog osvetljenja, 12 sati svetla odnosno 12 sati mraka.

Polovina normalno uhranjenih (Kontrola + Estradiol) i gojaznih pacova (Gojazni +Estradiol) 24 sata pre žrtvovanja tretirana je intraperitonealno estradiolom 40 µg/kg (Sigma, E8875) rastvorenim u 1% etanolu u fiziološkom rastvoru. Doza od 40 µg/kg estradiola utiče na regulaciju različitih proteina (Akt, ERK1/2, endotelna azot—monoksid sintaza, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza) kao i unutarćelijske signalne puteve što je pokazano u našim ranijim eksperimentima (Koricanac i sar., 2011). Druga polovina normalno uhranjenih (Kontrola) i gojaznih pacova (Gojazni) tretirana je intraperitonealno istom količinom 1% etanola u fiziološkom rastvoru, radi eliminisanja efekata stresa injekcijom (Slika 1). Tokom žrtvovanja pacovi su donošeni u kavezima pojedinačno, kako se ne bi stresirale žrtvovanjem prethodnih životinja. U dubokoj anesteziji, izazvanoj etrom, životinje su žrtvovane iskrvarenjem. Krv je sakupljena i odmah prebacivana u vakutajnere za izolovanje seruma i plazme. Srca su izolovana, postavljena na filter papir, radi uklanjanja viška krvi i potom je merena njihova masa. Delovi tkiva srca su sečeni i odvajani za izolaciju proteina ćelijskih membrana, odnosno izolaciju ukupnih proteina ćelijskih lizata. Tkiva su trenutno zamrzavana u tečnom azotu, a potom čuvana na -70 °C, do daljih analiza. Delovi tkiva srca u predelu vrha srca su sečeni i stavljani u 4% neutralno

pufervisani formaldehid radi daljih histohemijskih i morfometrijskih analiza tkiva i ćelija srca.

Korišćenje i rad sa eksperimentalnim životinjama za izradu ove doktorske disertacije je odobren od Etičkog komiteta za rad sa oglednim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

#### **3.2. Izolovanje seruma i plazme iz krvi pacova**

Polovina prikupljene krvi pacova prebacivana je u vakutajner koji ne sadrži antikoagulanase i služi za izolovanje seruma, dok je druga polovina krvi prebacivana u vakutajner koji sadrži EDTA i služi za izolovanje plazme.

Serumi su izolovani inkubiranjem krvi 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je krv centrifugirana 15 minuta na 3500 rpm. Dobijeni supernatanti (serumi) su alikvotirani na manje zapremine i čuvani na -20 °C za dalje biohemijske analize krvi.

Plazme su izolovane tako što je krv inkubirana 60 minuta na ledu, a potom je centrifugirana 15 minuta na 4000 rpm. Dobijeni supernatanti (plazme) su alikvotirani na manje zapremine i čuvani na -20 °C za dalje biohemijske analize krvi.

#### **3.3. Određivanje koncentracije glukoze (Glu) u serumu pacova**

Koncentracija Glu u serumu pacova je merena standardizovanom GLUC-PAP metodom (Randox, Crumlin, Velika Britanija) u Rx Daytona automatskom biohemijskom analizatoru (Randox, Velika Britanija). Princip metode zasniva se na oksidaciji Glu u glukonsku kiselinu i vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) u prisustvu enzima glukoza oksidaze. Tako nastali  $H_2O_2$  reaguje u prisustvu peroksidaze sa 4-aminofenazonom i fenolom, gradeći iminohinon i vodu. Stvaranje iminohinona dovodi do promene boje reakcione smeše koja je određivana merenjem apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 505 nm. Intenzitet nastale iminohinonske boje direktno je proporcionalan koncentraciji Glu u uzorku čija je koncentracija izražavana u mmol/l.

#### **3.4. Određivanje koncentracije insulina (INS) u serumu**

Koncentracija INS u serumu pacova je merena radioimunološkom (RIA; *engl. Radioimmunoassay*) metodom uz korišćenje RIA INS (PEG) komercijalnog kompleta (INEP, Zemun, R.Srbija). Princip metode se zasniva na kompetitivnom vezivanju INS iz uzorka ili standarda i radioaktivno obeleženog INS ( $J^{125}$ -INS) za određeni broj epitopa na



specifičnim anti-INS antitelima, pri čemu nastaju radioaktivno obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Ukoliko ima više INS u uzorku, utoliko se manje obeleženog kompleksa formira. Nastali kompleksi se talože uz pomoć imunoadsorbenta (30 min na sobnoj temperaturi), koji predstavlja kompleks vezan za sekundarno antitelo, polietilenglikola, dok slobodni INS (obeleženi i neobeleženi), kao i slobodna antitela zaostaju u tečnoj fazi. Radioaktivnost taloga meri se u gama-scintilacionom brojaču. Istovremeno sa uzorcima, tretiraju se i standardi poznate koncentracije INS, koji služe za konstrukciju standardne krive na osnovu koje se određuju koncentracije INS u uzorcima seruma. Koncentracija INS izražava se u mIU/l seruma.

Postupak je izvođen prema uputstvu proizvođača: u 50 µl seruma krvi dodavano je 50 µl J<sup>125</sup>-INS i 50 µl anti-INS-antiseruma. Sadržaj je mešan na vorteksu i inkubiran na sobnoj temperaturi 20 sati, nakon čega je dodavano 250 µl imunoadsorbenta, mešano na vorteksu i ostavljano na sobnoj temperaturi 30 minuta, potom je vršeno centrifugiranje 25 minuta na 3000 g. Supernatant je uklanjan, a u talogu merena radioaktivnost na gama-scintilacionom brojaču 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter (LKB, Belgija).

### 3.5. Određivanje indeksa rezistencije na INS (HOMA-IR) i sekrecije INS (HOMA-β)

HOMA (*engl.* Homeostasis Model Assessment Index) je matematički metod koji se koristi za određivanje rezistencije na INS (IR; *engl.* insulin resistance) kao i sekrecije β-ćelija pankreasa (Matthews i sar., 1985). Na osnovu vrednosti Glu i INS ili C-peptida, moguće je odrediti indeks IR (HOMA-IR), kao i funkcionalni kapacitet sekrecije β-ćelija pankreasa, izračunavanjem indeksa sekrecije INS (HOMA-β) (Matthews i sar., 1985).

HOMA IR indeks je izračunavan prema formuli:

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

HOMA-β indeks izračunavan je prema formuli:

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

### 3.6. Određivanje koncentracije leptina u serumu pacova

Koncentracija leptina u serumu pacova određivana je ELISA (*engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) metodom koja se zasniva na principu "sendviča antitela", pomoću ELISA kompleta (ab100581, Abcam) prema uputstvu proizvođača.

Posle nanošenja standarda/uzoraka u mikrotitar ploču obloženu primarnim "hvatač" anti-leptin antitelom i inkubiranja, leptin iz uzoraka se vezivao za dato antitelo. Posle ispiranja dodavano je primarno antitelo specifično za detekciju leptina konjugovano biotinom koje se vezuje za različite epitope leptina kompletirajući ELISA "sendvič". Nakon ispiranja kojim je uklonjano nevezano antitelo dodavan je reagens za detekciju, u ovom slučaju peroksidaza rena (HRP; *engl. HoRseradish Peroxidase*) vezana za streptavidin koji se specifično vezuje za biotin. Posle ispiranja mikrotitarske ploče dodavan je rastvor supstrata tetrametilbenzidin (TMB) – vodonik—peroksida ( $H_2O_2$ ), koji je supstrat za HRP i razvijana plava boja proporcionalna količini vezanog proteina, tj. leptina. Reakcija je prekidana sumpornom kiselinom pri čemu je boja rastvora prelazila u žutu, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji leptina. Vrednosti apsorbanci za leptin očitavane su na talasnoj dužini od 450 nm korišćenjem ELISA čitača (WALLAC 1420 VICTOR, Perkin-Elmer). Koncentracija leptina određivana je na osnovu standardne krive konstruisane pomoću standardnih rastvora leptina (Hosoda i sar., 1996) i izražavana je u ng/ml.

### 3.7. Određivanje koncentracije C—reaktivnog (CRP) proteina u serumu pacova

Koncentracija CRP u serumu pacova određivana je imunoturbidimetrijskim testom, pomoću kompleta reagenasa za kvantitativno određivanje CRP u serumu (System reagent for the quantitative determination of C-Reactive Protein in human serum) u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA) prema uputstvu proizvođača. Princip metode zasniva se na tome da molekuli CRP precipitiraju sa čovečjim anti CRP antitelima imobilisanim na lateks česticama. Nastali imuno kompleksi povećavaju rasipanje svetlosti, odnosno smanjuje se intenzitet propuštene svetlosti što je proporcionalno koncentraciji CRP u serumu. Rasipanje svetlosti meri se čitanjem zamućenosti (*engl. turbidity*) na 570 nm. Koncentracija CRP je određivana na osnovu

standardne krive konstruisane na osnovu serije CRP standarda poznate koncentracije. Koncentracija CRP izražavana je u mg/l.

### **3.8. Određivanje koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF) u plazmi pacova**

Koncentracija digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF; *engl. Digoxin Like Immunoreactive Factor(s)*) u plazmi pacova određivana je metodom fluorescentne imunoesej polarizacije (*engl. Fluorescence Polarization ImmunoAssay*, FPIA), pomoću kompleta reagenasa za kvantitativno određivanje digoksina u serumu (TDx/TDxFLx Digoxin II assay) u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA), prema uputstvu proizvođača (Pudek i sar., 1983; Wutzler i sar., 2013). Princip metode se zasniva na vezivanju i izdvajanju digoksina iz uzorka na imobilisanim anti-digoksin antitelima i merenju količine fluorescentnog jedinjenja koji nastaje nakon dodavanja specifičnog reagensa (*engl. digoxin fluorescin tracer*) u inkubacionu smešu. Koncentracija DLIF izražavana je u mmol/l.

### **3.9. Određivanje koncentracije natrijuma (Na<sup>+</sup>) i kalijuma (K<sup>+</sup>) u serumu pacova**

Koncentracija Na<sup>+</sup> je određivana indirektnom potenciometrijom korišćenjem dve staklene Na<sup>+</sup> elektrode (Synchron<sup>®</sup> System, Beckman Coulter, USA), od kojih jedna služi za merenje koncentracije Na<sup>+</sup>, dok druga predstavlja referentnu elektrodu (Jobsis, 1977). Na<sup>+</sup> elektroda je napravljena od litijum-natrijum-aluminijum-silikatnog stakla i važno je da spoljašnji sloj elektrode bude adekvatno hidratisan. Kada se elektroda uroni u rastvor sa uzorkom dolazi do razmene Na<sup>+</sup> iz uzorka sa Na<sup>+</sup> iz hidratisanog dela elektrode. Kao posledica ove razmene jona dolazi do promene potencijala elektrode. Ove promene potencijala elektrode očitavaju se pomoću referentne elektrode, a potom preračunavaju u koncentraciju Na<sup>+</sup>.

Koncentracija K<sup>+</sup> jona je određivana indirektnom potencijometrijom korišćenjem K<sup>+</sup>-selektivne elektrode (Synchron Sistem, Beckman Coulter, USA), i Na<sup>+</sup>-referentne elektrode (Jobsis, 1977). K<sup>+</sup> selektivna elektroda sastoji se od valinomicin PVC membrane, čija je fizička struktura takva da su pore približno jednake dijametru K<sup>+</sup>, što omogućava da K<sup>+</sup> joni nagrađe kompleks sa valinomicinom (Treasure i sar., 1986). Kada se elektroda

uroni u rastvor sa uzorkom dolazi do reakcije  $K^+$  jona valinomicinom što dovodi do promene potencijala elektrode. Ove promene potencijala elektrode očitavaju se pomoću referentne  $Na^+$ -elektrode, a potom preračunavaju u koncentraciju jona  $Na^+$ .

### **3.10. Određivanje koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu pacova**

Koncentracija ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu pacova određivana je standardizovanom metodom enzimskog bojenja (*engl. enzymatic colour test*), korišćenjem komercijalnih kitova za HOL (*engl. cholesterol oxidase-peroxidase*) i Tg (*engl. lipase/glycerol phosphate oxidase/peroxidase*) u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA), prema uputstvu proizvođača. Koncentracije HOL i Tg su izražavane u mmol/l.

### **3.11. Određivanje koncentracije fosfolipida u plazmi pacova**

Koncentracija fosfolipida u plazmi pacova određivana je kolorimetrijskom metodom po Stjuartu (Stewart, 1980). Prednost ove metode u odnosu na druge, jeste što prisustvo neorganskih fosfata ne utiče na rezultate ovog eseja, tako da se mogu koristiti puferi koji u sebi sadrže fosfate. Princip Stjuartovog eseja se zasniva na tome da ekstrahovani fosfolipidi u prisustvu reagensa (vodeni rastvor gvožđe(III)hlorida heksihidrata  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  i amonijum tiocianata  $NH_4SCN$ ) grade kompleks sa amonijumferotiocijanatom, koji ima maksimum apsorpcije svetlosti na 485 nm.

Postupak je izvođen tako što je u 100  $\mu$ l plazme pacova dodavano 200  $\mu$ l smeše hloroform : metanol u odnosu 2 : 1. Dobijena smeša je mućkana 20 sekundi, a potom centrifugirana 3 minuta na 3000 rpm. U donji (hloroformski) sloj, u kom se nalaze ekstrahovani fosfolipidi dodavan je hloroform do 500  $\mu$ l, a potom i 500  $\mu$ l reagensa. Dobijena smeša je mućkana 20 sekundi, a potom centrifugirana 10 minuta na 1000 rpm. Nakon uklanjanja gornjeg sloja merena je optička gustina uzorka i standarda prema slepoj probi korišćenjem spektrofotometra (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer) na 485 nm. Koncentracija fosfolipida je izražavana u mg/ml.

### 3.12. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina (SMK) u plazmi pacova

Koncentracija SMK u plazmi pacova određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Dunkombu (Duncombe, 1964). Princip metode se zasniva na tome da ekstrahovane SMK u hloroformu u prisustvu odgovarajućeg reagensa grade soli bakra, koje u kontaktu sa dietilditiokarbamatom (DDC) grade kompleksno jedinjenje žute boje, koje ima maksimum apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm.

Postupak je izvođen tako što je u 45  $\mu$ l plazme dodavano 225  $\mu$ l reagensa (vodeni rastvor  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  kome je dodat trietanolamin (TEA) pH 7.8) i kratko mućkano. U dobijenu smešu dodavano je 1125  $\mu$ l hloroforma i snažno mućkano 20 minuta. Zatim je inkubaciona smeša centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi. Nakon uklanjanja gornjeg plavo—zelenog sloja, donjoj hloroformskoj fazi koja sadrži ekstrahovane SMK dodavano je 45  $\mu$ l 0,2% DDC. Nakon snažnog mućkanja uzorci su inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka i standarda je merena prema slepoj probi u spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer) na 436 nm. Za konstruisanje standardne krive korišćene su vrednosti apsorbaneci očitavanih za seriju rastvora palmitinske kiseline poznate koncentracije. Koncentracija fosfolipida je izražavana u mmol/l.

### 3.13. Izolovanje plazma membrana iz srca pacova

Proteini plazma membrana srca pacova su izolovani prema protokolu Luikena i saradnika (2002). Količina od oko 200 mg tkiva istih delova srca pacova, prethodno sitnjenih pomoću skalpela, inkubirana je u 1 ml preinkubacionog pufera (pH 7,4) koji je sadržao 2 M NaCl, 20 mM HEPES i 5 mM  $\text{NaN}_3$ , 30 minuta na +4 °C. Nakon inkubiranja, uzorci su centrifugirani 5 min na 1000 x g u centrifugi (Beckman, J21). Dobijeni talog je resuspendovan a potom i homogenizovan u 1ml TES pufera za izolovanje proteina (pH 7,4) koji je sadržao 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoze, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka), uz dodatak 1 mM natrijum-ortovanadata, inhibitora tirozinskih proteinskih fosfataza, pomoću homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax, IKA.Werke, Nemačka). Rezultujući homogenat je centrifugiran 5 minuta na 1000 x g, a nakon toga dobijeni talog je homogenizovan u 1 ml TES pufera. Dobijeni homogenat je spajan sa supernatantom iz

prethodnog centrifugiranja i centrifugiran 10 minuta na 100 x g. Supernatanti su pipetirani a potom centrifugirani 10 minuta na 5000 x g. Dobijeni talog (T2) je resuspendovan u 300  $\mu$ l TES pufera i ostavljan na -70 °C. Prema protokolu Luikena i saradnika (2002), u resuspendovanom talogu T2 se nalazi frakcija proteina plazma membrana.

### 3.14. Izolovanje ukupnih proteina iz srca pacova

Tkiva istih delova srca pacova količine od oko 200 mg su sitnjena pomoću skalpela, a potom resuspendovana u 1 ml pufera za liziranje (pH 7,4) koji je sadržavao 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 1% Triton X-100, 10% glicerola, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka), uz dodatak 1 mM Na-ortovanadata, inhibitora tirozinskih proteinskih fosfataza. Tkiva srca pacova su homogenizovana korišćenjem homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax IKA.Werke, Nemačka), na +4 °C. Nakon homogenizacije, homogenati su sonifikovani dva puta po pet sekundi u sonifikatoru (Sonifier B-12, Branson Sonic power company, USA), a potom inkubirani 1 sat na +4 °C, uz rotaciju. Potom su uzorci centrifugirani 20 minuta na 14000 rpm i temperaturi od +4 °C (Beckman, J21). Supernatant je alikvotiran i zamrzavan na -70 °C do dalje upotrebe.

### 3.15. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana spektrofotometrijskom metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na merenju apsorbance svetlosti dva obojena kompleksa, biuretskog koji se formira između jona bakra i azota peptidnih veza u baznoj sredini, i redukovanog Folin-Chialteau-ov reagensa (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) pomoću bočnih ostataka aminokiselina tirozina, triptofana i cisteina, na 750 nm. Intenzitet boje proporcionalan je broju peptidnih veza i koncentraciji redukujućih grupa.

Zapremina od 10  $\mu$ l homogenata je razblaživana sa 990  $\mu$ l dejonizovane vode, a zatim je 25  $\mu$ l razblaženja dodatno razblaživano sa 75  $\mu$ l dejonizovane vode. U epruvete sa 100  $\mu$ l razblaženog homogenata dodavano je 100  $\mu$ l rastvora 2% natrijum dodecil sulfata (SDS; *engl. Sodium Dodecyl Sulphate*), a nakon mućkanja dodavano je po 1 ml 1% rastvora Na-K tartarata u 0,5%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , koji je prethodno 25 puta razblaživan u 2% rastvoru  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH. Nakon mućkanja sadržaj epruvete je inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Zatim je u inkubacionu smešu dodavano 100  $\mu$ l Folin-Chicalteau reagensa (1:2), sadržaj epruveta ponovo mućkan i inkubiran u mraku 20

minuta. Nakon toga je merena apsorbancija na 750 nm na spektrofotometru (Ultrospec 2000, Pharmacia, Biotech). Koncentracija proteina je određivana na osnovu standardne krive konstruisane prema vrednostima apsorbancije očitavanih za seriju rastvora albumina iz seruma govečeta (BSA; *engl. Bovine Serum Albumin*) poznatih koncentracija. Intenzitet dobijene boje je proporcionalan koncentraciji proteina i izražavan u  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 3.16. Određivanje aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca pacova

Određivanje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u membranskoj frakciji proteina srca pacova rađeno je modifikovanom spektrofotometrijskom metodom (Katz i Epstein, 1967). Princip metode zasniva se na određivanju relativne aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, koja predstavlja razliku u količini  $\text{P}_i$  u uzorcima koji sadrže totalnu inkubacionu smešu bez oubaina, specifičnog inhibitora  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i uzoraka koji sadrže totalnu inkubacionu smešu sa oubainom. Oslobođeni  $\text{P}_i$  reaguju sa amonijum molibdatom u kiselj sredini i formiraju heteropoli kiselinu (*engl. heteropoly acid*), fosfomolibdensku kiselinu. U prisustvu kalaja, nastaje kalaj molibdofosforna kiselina, jedinjenje plave boje, čiji je maksimum apsorpcije na 690 nm (Taras i sar., 1971).

Postupak je izvođen u dva seta epruveta u ukupnom volumenu od 200  $\mu\text{l}$ . U prvi set je dodavano po 50  $\mu\text{l}$  totalne inkubacione smeše koja je sadržala 200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 400 mM NaCl, 80 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\mu\text{l}$  uzorka proteina koncentracije 1 mg/ml i 105  $\mu\text{l}$  dejonizovane vode. U drugi set epruveta je dodavano 50  $\mu\text{l}$  totalne inkubacione smeše, 25  $\mu\text{l}$  uzorka proteina koncentracije 1mg/ml, 20  $\mu\text{l}$  20 mM oubain-a i 85  $\mu\text{l}$  dejonizovane vode. Reakcija je pokretana inkubacijom uzoraka 15 minuta na 37 °C sa 20  $\mu\text{l}$  20 mM ATP, a zaustavljena dodavanjem 22  $\mu\text{l}$  3 M perhlorne kiseline i hlađenjem uzoraka na ledu. Nakon toga dodavano je 200  $\mu\text{l}$  0,02 M amonijum molibdata u 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i jedne kapi kalaj hlorida ( $\text{SnCl}_2$ ) rastvorenog u glicerinu. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, očitavane su vrednosti apsorbancije na 690 nm na spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer). Koncentracija fosfata je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbancije očitavanih za seriju rastvora  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  poznate koncentracije. Aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze izražavana je u mmol $\text{P}_i$ /min/mg proteina.

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

Nivo ekspresije analiziranih proteina u frakcijama proteina ćelijskih membrana i ukupnom ćelijskom lizatu određivan je u dva koraka: metodom diskontinuirane poliakrilamid gel elektroforeze u prisustvu deterdženta SDS (SDS-PAGE; *engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970), a potom Western blot analizom (Towbin i sar., 1979; Burnette, 1981).

Elektroforetsko razdvajanje proteinskih frakcija izvedeno je na osnovu njihove molekulske mase u puferu alkalnog pH, pri čemu se negativno naelektrisani proteini, disocirani i denaturisani pomoću SDS-a kreću od katode ka anodi. Uzorci proteina su razblaživani do koncentracije 5 mg/ml odgovarajućim puferom, a potom do finalnih 4 mg/ml dodavanjem 1/5 od ukupne zapremine 5 x Laemli pufera (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2-β-mercaptoetanol, 0,1% bromfenol plavo). Ovako pripremljeni uzorci kuvani su 5 minuta na 95 °C, hlađeni na sobnoj temperaturi i skladišteni na -20 °C, do daljeg rada. Za razdvajanje proteina korišćen je sistem gradijentnog gela: 4% gel za koncentrovanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H<sub>2</sub>O) i 10% gel za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H<sub>2</sub>O) kao i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H<sub>2</sub>O). Lokalizovanje ispitivanih proteina određivano je prema molekulskoj masi korišćenjem proteinskog markera koji se sastojao od devet proteina poznatih molekulskih masa (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa-marker PageRegular<sup>TM</sup>Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Litvanija). Uzorci su nanošeni u bunariće gela u volumenu od 12,5 µl (50 µg ukupnih proteina) i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom prvo 20 minuta pri naponu od 100 V, a zatim 60 minuta pri naponu od 170V. Elektroforeza je izvedena u aparaturi za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell electrophoresis, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD).

### 3.18. Western blot

Western blot metodom se proteini sa poliakrilamidnog gela prenose na poliviniliden fluorid membranu (PVDF) ili nitroceluloznu membranu, a potom se proteini detektuju radi korišćenjem specifičnih antitela na ispitivani protein. Transfer razdvojenih



proteinskih frakcija sa gelova na PVDF membranu (Immobilon-P membrana, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corporation, USA), vršen je tokom sat vremena pri konstantnoj struji limitiranoj na 250 mA na +4  $^{\circ}\text{C}$ , u aparatu za mokri transfer (Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD), u transfer puferu (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicin i 20% metanol). Efikasnost transfera proteina proveravana je bojenjem membrana sa rastvorom PonsoS (0,1% rastvor Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, koji je razblaživan sa istom zapreminom TBS-T pufera koji je sadržao 25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 8.3), nakon transfera u trajanju od jednog minuta, a potom su membrane inkubirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBS-T), kako bi se onemogućilo nespecifično vezivanje antitela za membranu.

Nakon blokiranja, membrane su inkubirane preko noći na +4  $^{\circ}\text{C}$  sa specifičnim primarnim antitelima na  $\alpha 1$ -subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, fosfo  $\alpha 1$ -subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Ser<sup>23</sup>) i  $\beta$ -aktin kada su za detekciju proteina korišćene frakcije plazma membrana, odnosno sa antitelima na fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>), Akt, fosfo ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), ERK1/2 i  $\beta$ -aktin, kada su traženi proteini određivani iz ćelijskih lizata. Kao kontrola nanošenja jednake količine uzoraka na gel (*engl. loading control*), u svim uzorcima frakcije plazma membrana ili ćelijskih lizata korišćena su antitela na  $\beta$ -aktin, Akt ili ERK1/2. Antitela su razblaživana do odgovarajućih koncentracija u 5% nemasnom mleku ili 5% BSA u TBS-T. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 x 5 minuta TBS-T puferom na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sat vremena, uz mešanje na sobnoj temperaturi, sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (anti—mišijim, anti—kozijim ili anti—zečijim) konjugovanim sa ALP ili antitelom konjugovanim sa HRP, razblaživanim do odgovarajuće koncentracije u 5% nemasnom mleku ili 5% BSA u TBS-T. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima membrane su, takođe, ispirane tri puta po 5 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom. Analizirani proteini u uzorku su vizualizovani bojenom reakcijom na samoj membrani nanošenjem supstrat za alkalnu fosfatazu (BCIP/NBT) ili supstrata za peroksidazu rena (ECL, *engl. Enhanced ChemiLuminescence*).

U slučaju kada su sekundarna antitela bila vezana sa ALP, na membrane je dodavan BCIP/NBT (BCIP; *engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate*; NBT; *engl. Nitro Blue Tetrazolium Chloride*; sc-2498, Santa Cruz biotechnology, inc.) reagens, koji predstavlja supstrat za delovanje ALP. Postupak je izvođen tako što je membrana inkubirana na sobnoj temperaturi, u mraku uz blago mešanje u 9,8 ml pufera (0,1 M Tris-

HCl, pH 9,5, 0.1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>) kome je dodavano 200 µl reagensa NBT/BCIB, do razvijanja boje. Nakon pojavljivanja signala u vidu plavo-ljubičastih traka na membranama, koje odgovaraju analiziranim proteinima, membrane su ispirane vodom, sušene, a potom su signali kvantifikovani.

U slučaju kada su sekundarna antitela bila vezana sa HRP, na membranu je dodavan ECL reagens, a analizirani proteini su potom detektovani pomoću autoradiografskog filma. Metoda se zasniva na tome da peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola, pri čemu nastalo intermedijarno jedinjenje emituje svetlost (luminiscencija), koja potom osvetljava film. Postupak je izvođen tako što je membrana inkubirana u reagensu dobijenom mešanjem istih zapremina rastvora luminol i p-kumariče kiseline rastvorenih u Tris-HCl, pH 8,5 i rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u Tris-HCl, pH 8,5, u trajanju od 1 minuta. Membrane su zatim sušene i postavljane u kasetu za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD), a preko membrane je stavljan rentgen film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija). Vreme ekspozicije variralo je i trajalo je od nekoliko sekundi do nekoliko minuta.

Intenzitet signala dobijenog na membrani tokom ALP metode ili na filmu tokom ECL metode odgovara količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima i određivan je denzitometrijskom analizom korišćenjem računarskog programa Image J 1.45s (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov>). Izmerene vrednosti za optičku gustinu (*engl. optical density*) signala izražavane su u arbitrarnim jedinicama (AJ) i dobijene vrednosti su predstavljane u odnosu na kontrolu.

### **3.19. Histoheмиjska i morfometrijska analiza tkiva i ćelija srca pacova**

Analizirani su poprečni preseци u predelu vrha srca pacova, sa vidljivim slobodnim zidom lumena leve i desne komore, kao i interventrikularnim septumom. Tkiva su fiksirana imerzionim postupkom, u 4% neutralno puferisanom formaldehidu tokom 24 sata najmanje. Potom je tkivo dehidratirano alkoholima rastućih koncentracija, prosvetljavano u ksilolu i kalupljeno u Paraplastu aparatom za kalupljenje (Tissue Tech II Tissue Embedding Center). Kalupi tkiva su serijski sečeni mikrotomom (Leica Reinhart Austria i Leica SM 2000 R) na isečke debljine 5 µm. Najpre su pravljene preseци za histoheмиjska bojenja, a potom za imunohistoheмиjsku analizu. Isečki su bojeni hematoksilinom i eozinom, Masonovim trihromnim bojenjem (Masson trichrome) i PTAH tehnikom

(hematoksilin i fosfovolframova kiselina) (Labudovic Borovic i sar., 2010; Ballotta i sar., 2010).

Ovako pripremljeni isecci tkiva analizirani su korišćenjem različitih uveličanja na optičkom mikroskopu (Olympus BX 41) uz pomoć digitalne kamere (Olympus C-5060 wide zoom) i računarskog programa (Olympus DP-soft Image Analyzer). Pored opšte analize tkiva srca mereni su transversalni prečnici ćelija srca u nivou jedra na najmanje deset mernih tačaka ravnomerno raspoređenih duž isečka tkiva srca.

### 3.20. Imunohistohemijska detekcija $\alpha_1$ subjedinice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Parafinski kalupi tkiva prethodno pripremljeni za histohemijsku i morfometrijsku analizu korišćeni su i za imunohistohemijsku analizu  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Isecci za imunohistohemijsku analizu su deparafinisani i ispirani TBS-Tween puferom (Tris buffer saline) pH 7,4 tokom 10 minuta. Potom je vršeno demaskiranje antigena u citratnom puferu, pH 6,0, tokom 21 minuta u mikrotalasnoj pećnici podešenoj na maksimalnu jačinu (800 W). Razblaženje koncentrovanih primarnih antitela specifičnih na  $\alpha_1$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze vršeno je korišćenjem komercijalno dostupnog diluenta (Large Volume UltraAb Diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD). Optimalno razblaženje utvrđeno je na bazi prethodno uspostavljenog imunohistohemijskog eseja. Testirana su razblaženja 1:50, 1:100, 1:200 i 1:300. Utvrđeno optimalno razblaženje za  $\alpha_1$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPazu je 1: 100.

Delovanje endogene peroksidaze blokirano je komercijalnim preparatom (Large Volume Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-HP) u toku 5 do 15 minuta. Potom je nanošen komercijalni rastvor (UltraV Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-UB) u trajanju od 10 minuta, radi blokiranja nespecifičnog bojenja.

Pri razvijanju reakcije sistemom UltraVision (Thermo Scientific LabVision, TL-060-HL) primenjivana je sledeća procedura. Nakon ispiranja pomoću TBS-T, na isečke je dodavano primarno antitelo specifično na  $\alpha_1$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Isecci su inkubirani sa primarnim antitelom preko noći, na sobnoj temperaturi, a potom ispirani TBS-T puferom i inkubirani sa sekundarnim, biotinizovanim antitelom u trajanju od 30 minuta, na sobnoj temperaturi. U trećem koraku, tkivo je tretirano streptavidin peroksidaznim obeleživačem u trajanju od 30 minuta. Isecci su ponovo ispirani TBS-T puferom i izlagani delovanju rastvora hromogena: DAB (diaminobenzidin) u trajanju 10–30 minuta. Potom su isecci ispirani TBS-T puferom i kontrastno bojani Majerovim

(Mayer) hematoksilinom (Merck, 1092490500) 30 sekundi. Isečci su dehidratirani alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljivani ksilolom i pokriveni pomoću DPX-a.

Sva imunohistohemijska bojenja izvedena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja, korišćenjem pozitivnih i negativnih kontrola. Negativne kontrole dobijane su izostavljanjem primarnog antitela i nanošenjem TBS-T pufera umesto primarnog antitela. Reakcija je proveravana i praćenjem bojenja glatkih mišićnih ćelija koronarnih krvnih sudova i isečaka humane unutrašnje torakalne arterije na koje je nanoseno primarno antitelo (pozitivna kontrola). Sve promene praćene su na slobodnom zidu leve komore i septumu uporedo. Svi upoređivani isečci bojani su istovremeno i pod istim uslovima.

#### **3.21. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata**

Dobijeni rezultati prikazivani su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Značajnost razlika ispitivanih parametara između kontrolnih i gojaznih grupa određivana je pomoću Student-ovog t-testa primenom Excel PC programa. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. *In vivo* efekti estradiola na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca pacova

Budući da je u literaturi malo podataka o efektima estradiola na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca, pacovi su tretirani ovim hormonom i nakon 24 sata žrtvovani.

#### 4.1.1 Mase tela, mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i pacova tretiranih estradiolom

U **Tabeli 1.** su prikazane vrednosti mase tela, mase srca, odnosa mase tela i mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih pacova kao i pacova tretiranih estradiolom. Mase pacova iz obe grupe životinja, izmerene su pre žrtvovanja i nisu se statistički značajno razlikovale. Mase srca izolovane iz obe eksperimentalne grupe životinja nisu se statistički značajno razlikovale. Takođe nije uočena statistički značajna razlika u odnosima mase srca i mase tela pacova, dok je tretman estradiolom doveo do statistički značajnog povećanja (\*\*\*) p < 0,01) ukupne koncentracije proteina u lizatima izolovanih srca pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

<b>Eksperimentalne grupe</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Estradiol</b>
<b>Masa tela [g]</b>	371 ± 12 n = 7	360 ± 9 n = 7
<b>Masa srca [g]</b>	1,14 ± 0,03 n = 6	1,15 ± 0,47 n = 7
<b>Srce/telo odnos</b>	0,0031 ± 8,9 x 10 <sup>-5</sup> n = 7	0,0032 ± 5,77 x 10 <sup>-5</sup> n = 7
<b>Ukupni proteini iz srca [µg/µl/mg tkiva]</b>	0,098 ± 0,006 n = 5	0,151 ± 0,003 *** n = 5

**Tabela 1. Mase tela, mase srca, odnosi mase tela i mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i estradiolom tretiranih pacova.** Masa tela – merena neposredno pre žrtvovanja. Mase tela i srca su izražene u g. Koncentracije ukupnih proteina iz srca pacova su izražene u µg/µl/mg tkiva i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*\*\*p<0.001).

#### **4.1.2. Koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma (Na<sup>+</sup>) i kalijuma (K<sup>+</sup>) u plazmi i serumu kontrolnih i pacova tretiranih estradiolom**

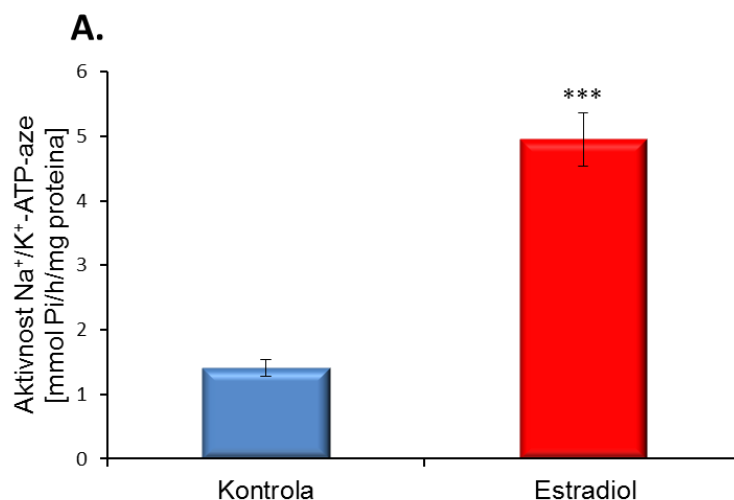
Merenjem koncentracije DLIF u plazmi pacova pokazano je da su njihove vrednosti statistički značajno smanjene (\*\*p < 0,01) u grupi životinja tretiranih estradiolom u poređenju sa vrednostima dobijenim kod kontrolnih životinja ( **Tabela 2.**). Koncentracija Na<sup>+</sup> u serumu pacova tretiranih estradiolom je neznatno, ali statistički značajno smanjena u iznosu od 5% (\*\*\*p < 0,01) u poređenju sa kontrolnim vrednostima, dok estradiol nije doveo do statistički značajnih razlika u vrednostima koncentracije K<sup>+</sup> ( **Tabela 2.**).

<b>Eksperimentalne grupe</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Estradiol</b>
<b>DLIF [mmol/l]</b>	3,77 ± 0,08 n = 3	1,97 ± 0,01 *** n = 3
<b>Na<sup>+</sup> [mmol/l]</b>	144,3 ± 1.11 n = 4	138,9 ± 0,39 ** n = 5
<b>K<sup>+</sup> [mmol/l]</b>	5,58 ± 0,14 n = 5	5,48 ± 0,38 n = 4

**Tabela 2. Koncentracije digoksinu slični imunoreaktivni faktori (DLIF), natrijum (Na<sup>+</sup>) i kalijum (K<sup>+</sup>) u serumu i plazmi kontrolnih i estradiolom tretiranih pacova.** Rezultati za DLIF, Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

### 4.1.3. Regulacija aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ekspresije i fosforilacije $\alpha 1$ subjedinice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca pacova pod delovanjem estradiola

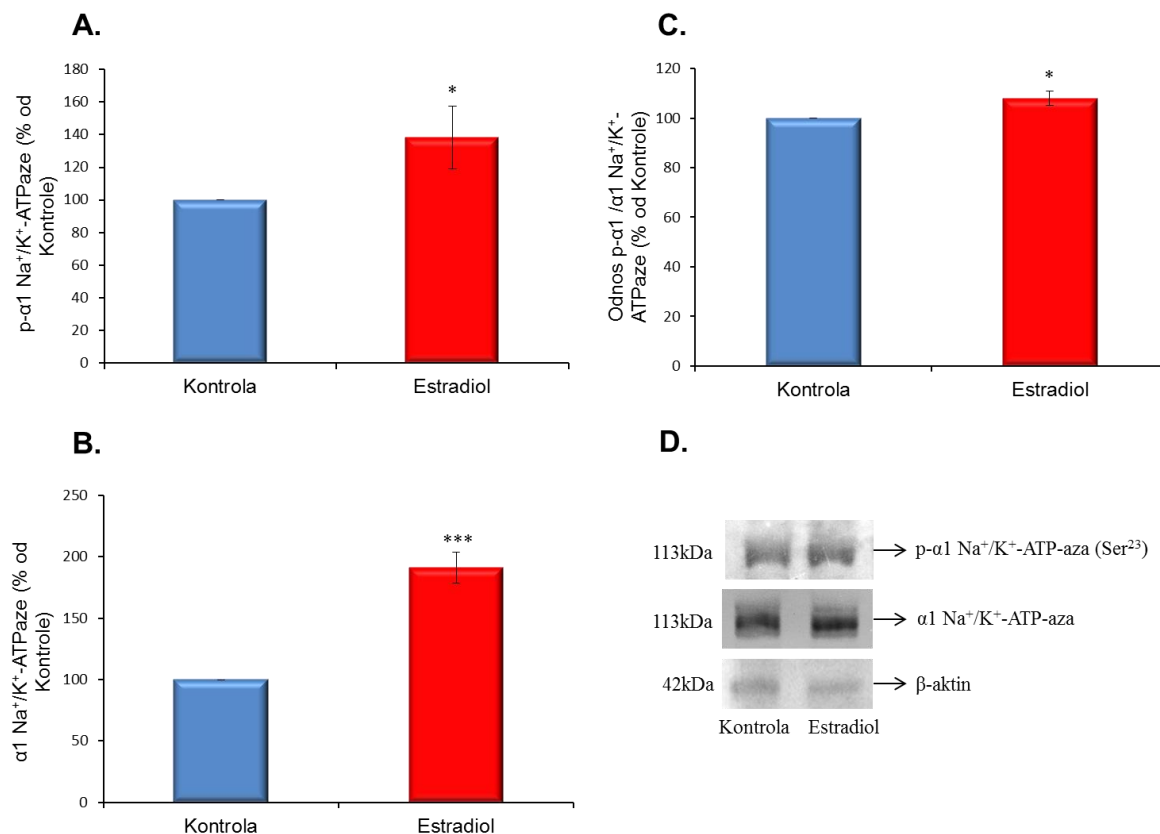
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza je membranski protein, stoga smo u eksperimentima u okviru kojih smo izučavali efekte estradiola na regulaciju aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i ekspresije ove pumpe koristili izolovane membrane kardiomiocita pacova tretiranih estradiolom, kao i kontrolnih, netretiranih životinja. Kod tretiranih životinja estradiol dovodi do statistički značajnog povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u iznosu od 249%, u poređenju sa izmerenom aktivnošću kod kontrolnih, netretiranih pacova (Kontrola =  $1,42 \pm 0,13$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina; Estradiol =  $4,95 \pm 0,41$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina; \*\*\* $p < 0,001$ ; Slika 1.).



**Slika 1. Efekti estradiola na regulaciju aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani kardiomiocita pacova.** Rezultati dobijeni za aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze izraženi su u mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (n = 5), (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

Efekti estradiola na ekspresiju  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod normalno uhranjenih pacova tretiranih estradiolom analiziran je određivanjem nivoa fosforilacije na Ser<sup>23</sup>, ukupnom nivou, kao i odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa proteina  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Slika 2. A-D). Estradiol *in vivo* dat dovodi do statistički značajnog povećanja fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice za 38% (Kontrola = 100%; Estradiol =  $138 \pm 19\%$ ; \* $p < 0,05$ ) i ekspresije katalitičke subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze za 91% u poređenju sa vrednostima dobijenim u grupi kontrolnih životinja (Kontrola = 100%; Estradiol =  $191 \pm 13\%$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Rezultati dobijeni analizom odnosa fosforilisane

forme  $\alpha 1$  subjedinice i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice, pokazuju da estradiol svojim delovanjem dovodi do umerenog ali statistički značajnog povećanja fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice u srcu pacova u iznosu od 8% (Kontrola = 100%; Estradiol =  $108 \pm 3\%$ ;  $*p < 0,05$ ).

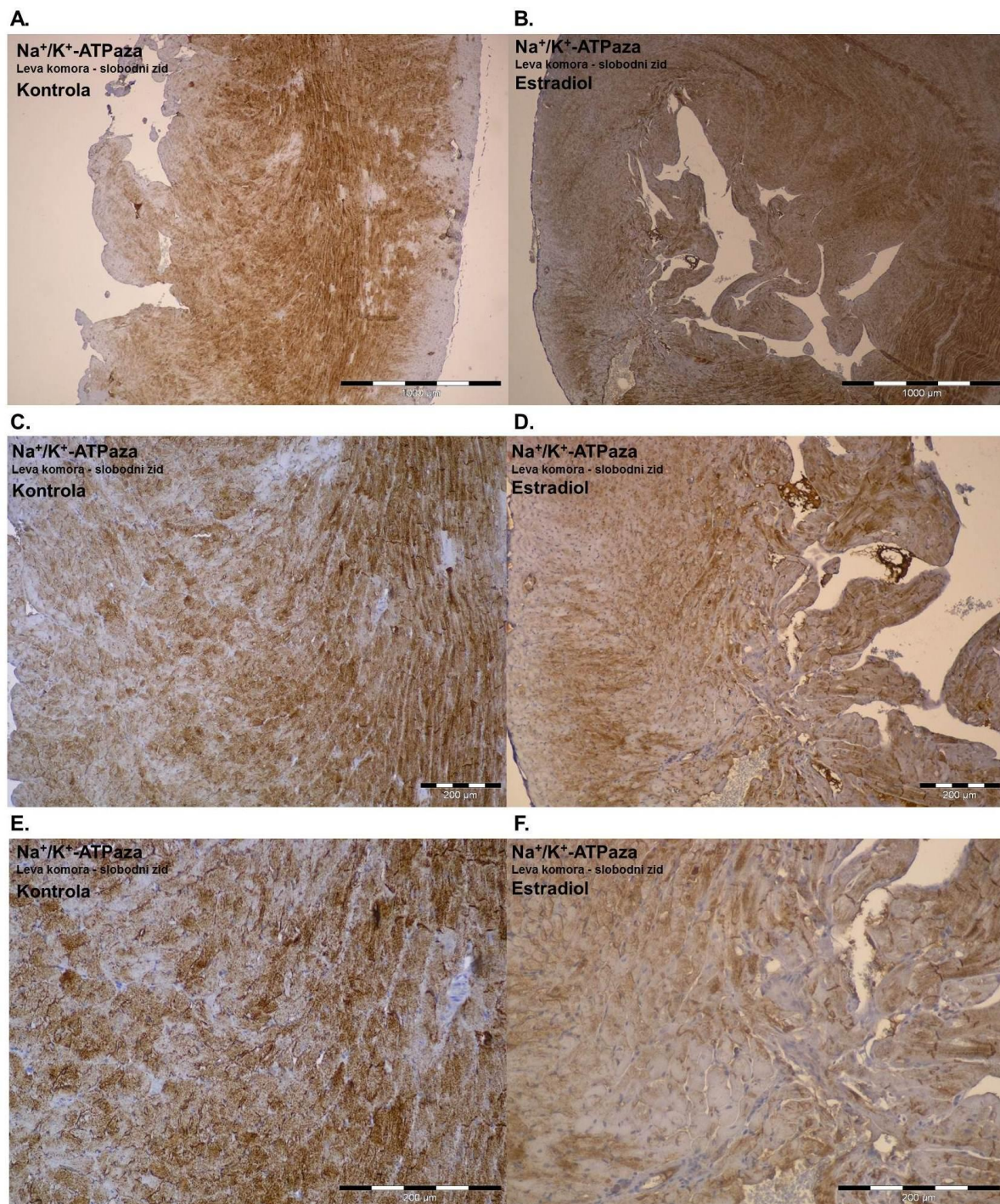


**Slika 2. Efekti estradiola na nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice na amino kiselinu Ser<sup>23</sup> i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membrani kardiomiocita pacova.** A. Fosforilacija  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na Ser<sup>23</sup> (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 4). B. Ekspresija  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze ( $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 7). C. Odnos fosforilisane forme  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na Ser<sup>23</sup> i ukupne  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze ( $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze /  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 4). D. Reprezentativni western blot fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na amino kiselinu Ser<sup>23</sup> i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu (Kontrola=100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM ( $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$ ).



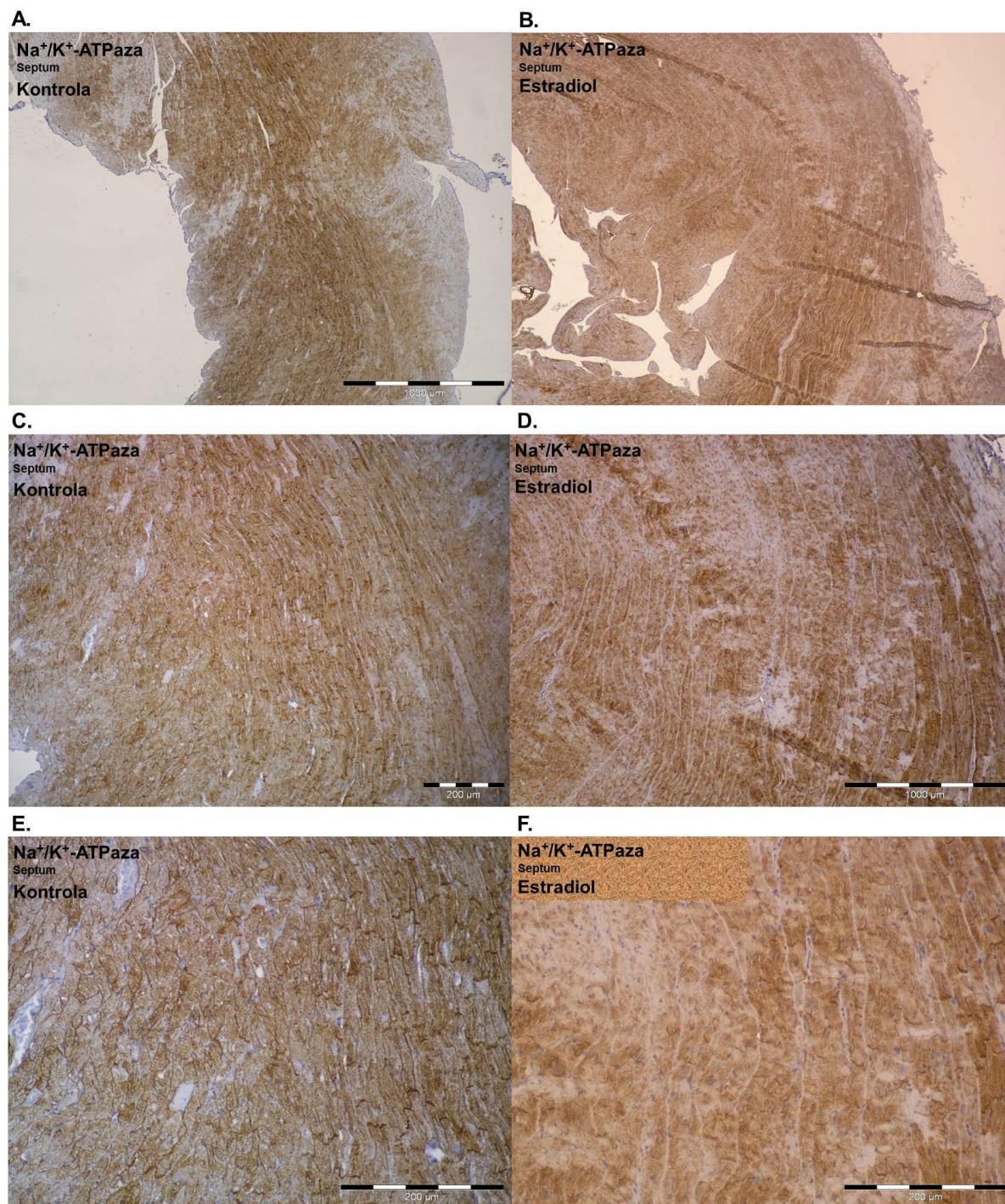
#### **4.1.4. Imunohistohemijska detekcija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu kontrolnih i estradiolom tretiranih pacova**

Isečci srca pacova iz obe eksperimentalne grupe, kontrolne i estradiolom tretirane, istovremeno su bojeni pod istim uslovima kako bi se eventualne greške u radu svele na minimum, a poređenje dobijenih rezultata je vršeno među isečcima bojenim istim koncentracijama primarnog antitela specifičnog na  $\alpha 1$  subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Imunoreaktivnost na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu je membranskog tipa i najizraženija u središnjim delovima zida srca, uključujući slobodni zid leve komore i septuma, dok je slabije izražena subendokardno i subepikardno u obe eksperimentalne grupe (**Slika 3. A, B** i **Slika 4. A, B**).



**Slika 3. Efekti estradiola na lokalizaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u predelu slobodnog zida leve komore srca pacova. (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x) Kontrola - kontrolni pacovi (A, C, E); Estradiol – pacovi tretirani estradiolom (B, D, F).**



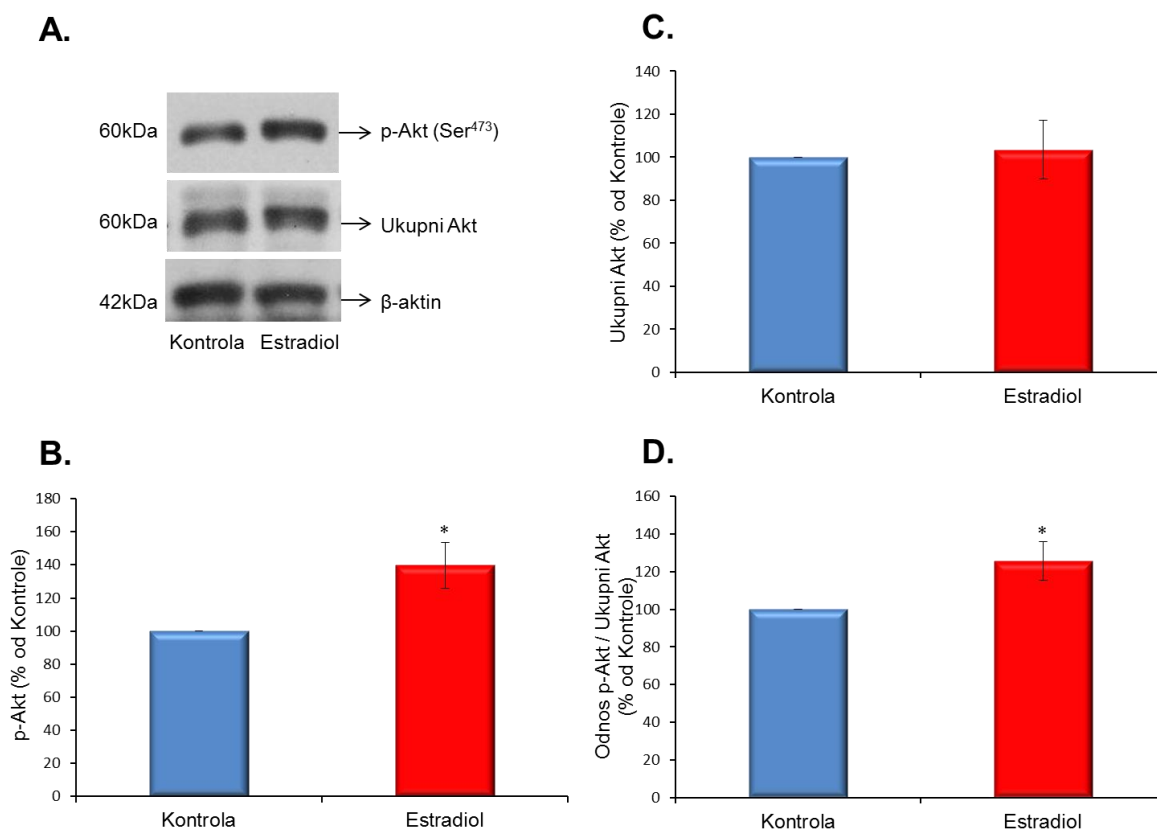


**Slika 4. Efekti estradiola na lokalizaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u predelu septuma srca pacova.** (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x) Kontrola - kontrolni pacovi (A, C, E); Estradiol- pacovi tretirani estradiolom (B, D, F).

#### **4.1.5. Fosforilacija i nivo proteina za Akt i ERK1/2 pod delovanjem estradiola u srcu pacova**

##### **4.1.5.1. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo Akt kinaze u srcu pacova**

*In vivo* efekat estradiola na Akt kinazu analiziran je određivanjem nivoa fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>, nivoa ukupnog, tj. bazalnog nivoa Akt proteina, kao i odnosa između fosforilisane forme Akt i njenog ukupnog proteina. Rezultati sve tri analize su prikazani na **Slici 5. A-D**. *In vivo* davanje estradiola dovodi do statistički značajnog povećanja fosforilacije Akt na amino kiselini Ser<sup>473</sup> (Kontrola = 100%; Estradiol = 139 ± 14%; \*p < 0,05), ali ne menja nivo ekspresije ukupnog Akt proteina (Kontrola = 100%; Estradiol = 103 ± 13%) u srcu. Rezultati dobijeni izračunavanjem odnosa fosforilisane forme Akt na Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt, potvrđuju da davanje estradiola dovodi do statistički značajnog povećanja fosforilacije Akt (Kontrola = 100%; Estradiol = 124 ± 9%; \*p < 0,05).

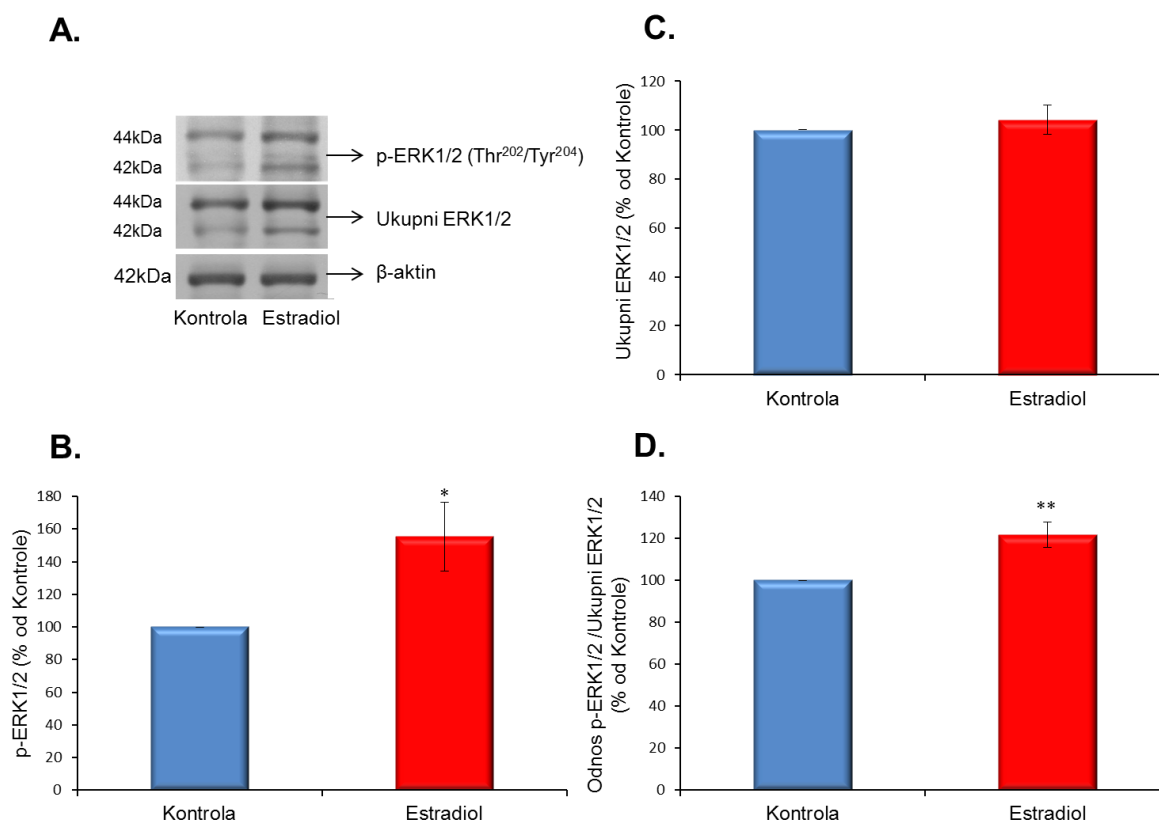


**Slika 5. Efekti estradiola na regulaciju fosforilacije Akt na amino kiselinu Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt proteina u srcu pacova.** A. Reprezentativni western blot Akt fosforilacije; B. Nivo fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> (p- Akt); (n = 7). C. Nivo ukupnog Akt (Ukupan - Akt); (n = 7). D. Odnos vrednosti p-Akt i ukupnog Akt (p-Akt /Ukupan Akt); (n = 7). Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*p<0,05).

#### 4.1.5.2. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo ERK1/2 kinaze u srcu pacova

Efekti *in vivo* datog estradiola na ERK1/2 kinaze analiziran je određivanjem nivoa fosforilacije ERK1/2 na amino kiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, nivoa ukupnog ERK1/2 proteina, kao i odnosa fosforilisane forme ERK1/2 i njegovog ukupnog proteina **Slika 6. A-D.** Estradiol dovodi do statistički značajnog povećanja fosforilacije ERK 1/2 za 55% u poređenju sa nivoom fosforilacije izmerenim u grupi kontrolnih životinja (Kontrola = 100%; Estradiol = 155 ± 21%; \*p < 0,05), ali ne i do statistički značajnih promena u nivou ukupnog ERK 1/2 (Kontrola = 100%; Estradiol = 104 ± 6%). Rezultati dobijeni analizom odnosa fosforilisane forme ERK1/2 i ukupnog ERK1/2 proteina, potvrđuju da estradiol

svojim delovanjem statistički značajno povećava fosforilaciju ERK1/2 u srcu pacova (Kontrola = 100%; Estradiol = 122 ± 6%; \*\*p < 0,01).



**Slika 6. Efekti estradiola na regulaciju fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> i ukupnog ERK1/2 proteina u srcu pacova.** A. Reprezentativni western blot ERK 1/2 fosforilacije; B. Nivo fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (p-ERK1/2); (n = 7). C. Nivo ukupnog ERK 1/2 (Ukupni ERK1/2); (n = 7). D. Odnos p-ERK1/2 i ukupnog ERK1/2 (p-ERK1/2 /Ukupni ERK1/2); (n =7). Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM; (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

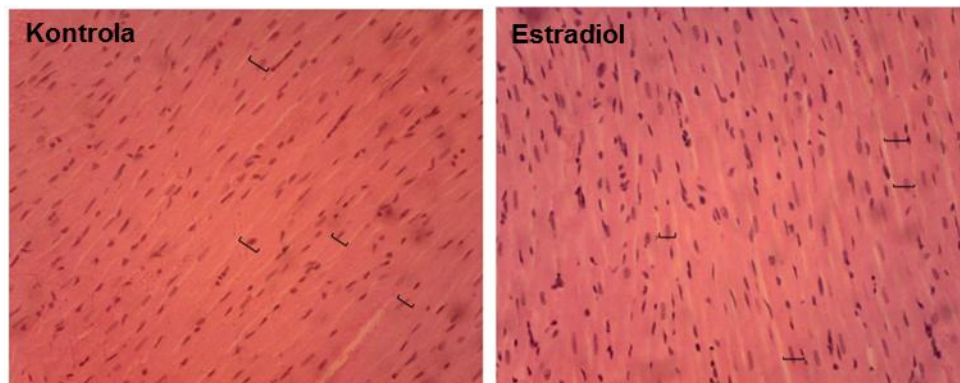
#### 4.1.6. *In vivo* efekti estradiola na transverzalni dijametar kardiomiocita pacova

Korišćenjem preparata poprečnih preseka u predelu vrha srca pacova, sa vidljivim slobodnim zidom, lumenom leve i desne komore i interventrikularnim septumom, pored opšte analize tkiva srca mereni su transverzalni dijometri kardiomiocita u nivou jedra na najmanje deset mernih tačaka ravnomerno raspoređenih duž isečka tkiva srca. Rezultati prikazani na **Slici 7. A i B.**, pokazuju da davanje estradiola nije dovelo do statistički

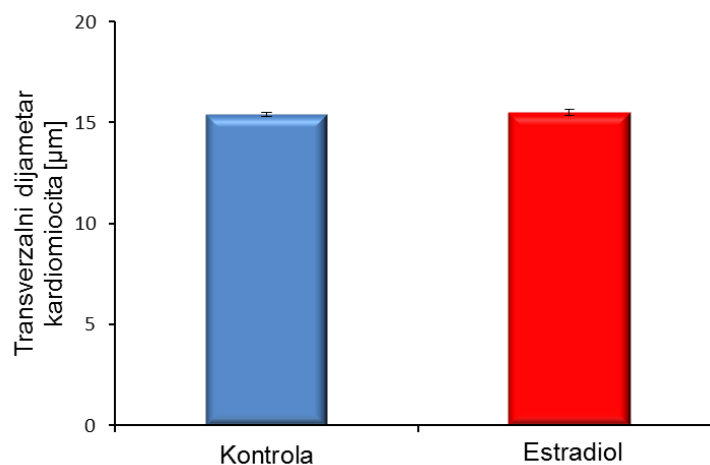


značajnih promena u dijimetru kardiomiocita u poređenju sa vrednostima izmerenim u grupi kontrolnih životinja (Kontrola =  $15,40 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ; Estradiol =  $15,50 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ;

**A.**



**B.**



**Slika 7. Efekti estradiola na transverzalni dijametar kardiomiocita pacova. A.** Uporedni prikaz transverzalnih dijametara kardiomiocita na isečcima tkiva srca. **B.** Transverzalni dijametri kardiomiocita u nivou jedra izraženi su u  $\mu\text{m}$  i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM; ( $n = 300$ ).

## **4.2. Efekti ishrane bogate masima na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca**

Jedan od postavljenih ciljeva u okviru ove doktorske disertacije bio je i izučavanje efekata ishrane bogate mastima na regulaciju ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu pacova i morfologiju srca. Polazeći od postavljenih ciljeva u ovom poglavlju biće prikazani rezultati dobijeni u eksperimentima u kojima su korišćeni pacovi, kod kojih su gojaznost i IR indukovani ishranom bogatom mastima.

### **4.2.1. Mase tela, mase srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i gojaznih pacova**

U **Tabeli 3.** su prikazane vrednosti mase tela i srca, odnosa mase tela i srca i koncentracije ukupnih proteina iz srca u grupi kontrolnih i gojaznih pacova. Pacovi iz obe grupe nisu imali statistički značajno različite inicijalne mase tela. Nakon 10 nedelja, finalne mase gojaznih pacova su povećane u odnosu na finalne mase pacova kontrolnih, normalno uhranjenih životinja ali dobijene razlike nisu statistički značajne. Razlike finalne i inicijalne mase tela su statistički značajno povećane kod gojaznih pacova u odnosu na kontrole (\*p < 0,05). Mase srca izolovanih posle žrtvovanja su statistički značajno povećane kod gojaznih pacova u odnosu na mase srca normalno uhranjenih pacova (\*\*p < 0,01). Vrednosti dobijene izračunavanjem odnosa mase srca i tela, nisu bile statistički značajno različite između gojaznih i kontrolnih grupa pacova. Merenja koncentracije ukupnih proteina iz srca pacova su pokazala da su njihove vrednosti statistički značajno povećane kod gojaznih životinja u odnosu na vrednosti izmerene za kontrolne, normalno hranjene pacove (\*\*\*p < 0,001).



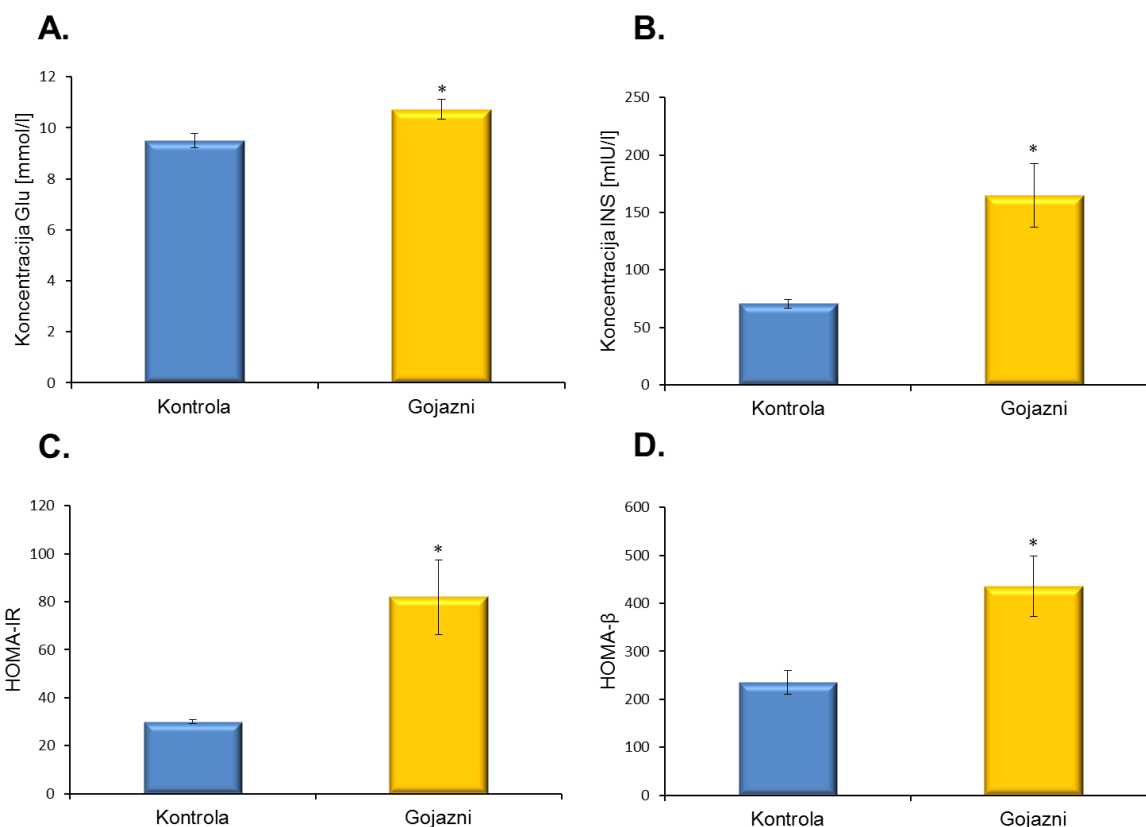
<b>Eksperimentalne grupe</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Gojazni</b>
<b>Inicijalna masa tela [g]</b>	200 ± 3 N = 7	198 ± 3 n = 7
<b>Finalna masa tela [g]</b>	371 ± 12 N = 7	396 ± 12 n = 7
<b>Razlika finalne i inicijalne mase tela [g]</b>	165 ± 8 N = 6	198 ± 10 * n = 7
<b>Masa srca [g]</b>	1,14 ± 0,03 N = 6	1,29 ± 0,02 ** n = 5
<b>Srce / telo odnos</b>	0,0031 ± 8,9 x 10 <sup>-5</sup> N = 7	0,0032 ± 5,49 x 10 <sup>-5</sup> n = 6
<b>Ukupni proteini iz srca [µg/µl/mg tkiva]</b>	0,098 ± 0,006 N = 5	0,145 ± 0,005 *** n = 5

**Tabela 3.** Telesne mase, mase srca, odnosi mase tela i srca, kao i koncentracije ukupnih proteina iz srca kontrolnih i gojaznih pacova. Inicijalna masa - masa tela na početku eksperimenta; finalna masa - masa tela nakon 10 nedelja, neposredno pre žrtvovanja. Rezultati za telesne mase i mase srca su izraženi u g, dok su za koncentracije ukupnih proteina iz srca izražene u µg/µl/mg tkiva i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

#### **4.2.2. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju glukoze (Glu), insulina (INS), i indekse rezistencije na INS ( HOMA-IR) i sekrecije β-ćelija (HOMA-β) u serumu pacova**

Rezultati ispitivanja efekata ishrane bogate mastima na koncentraciju Glu, INS i indekse HOMA-IR i HOMA-β prikazani su na **Slici 8. A-D**. Rezultati pokazuju da su koncentracije Glu i INS statistički značajno povećane u serumu gojaznih pacova u odnosu na vrednosti izmerene u serumu kontrolnih životinja. (**Glu:** Kontrola = 9,50 ± 0,28 mmol/l, Gojazni = 10,73 ± 0,38 mmol/l, \*p < 0,05; **INS:** Kontrola = 71 ± 4 mIU/l, Gojazni = 165 ± 28 mIU/l, \*p < 0,05).

Izračunate vrednosti za oba indeksa HOMA-IR (**Slika 8. C**) i HOMA-β (**Slika 8. D**), su statistički značajno povećane kod gojaznih, u poređenju sa kontrolnim životinjama (**HOMA-IR:** Kontrola = 29,9 ± 0,9, Gojazni = 81,8 ± 15,5, \*p < 0,05; **HOMA-β:** Kontrola = 235,4 ± 24,5, Gojazni = 435,0 ± 62,8, \*p < 0,05).



**Slika 8.** Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju INS (B) i Glu (A) u serumu pacova, kao i indekse HOMA-IR (C) i HOMA-β (D). Koncentracija INS izražena je u mIU/l i predstavlja srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n = 5); Koncentracija Glu izražena je u mmol/l i predstavlja srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n = 7); Rezultati dobijeni za HOMA-IR i HOMA-β su dobijeni korišćenjem formula datih u poglavlju Materijal i metode i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (n = 5); (\*p<0,05).

#### 4.2.3. Efekti ishrane bogate mastima na koncentracije leptina, C–reaktivnog proteina (CRP), digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma (Na<sup>+</sup>) i kalijuma (K<sup>+</sup>) u serumu i plazmi pacova

Kao što je očekivano koncentracija leptina je značajno veća (\*\*p < 0,001) u serumu gojaznih pacova u odnosu na kontrolne (Tabela 4.). Osim toga, koncentracija CRP u serumu pacova je statistički značajno veća (\*\*p < 0,001), a koncentracija DLIF statistički manja (\*\*p < 0,001) kod životinja koje su bile na režimu ishrane bogate mastima u odnosu na kontrolne vrednosti (Tabela 4.). Koncentracije Na<sup>+</sup> u serumu gojaznih pacova je statistički značajno smanjena (\*\*p < 0,01) u poređenju sa kontrolnim

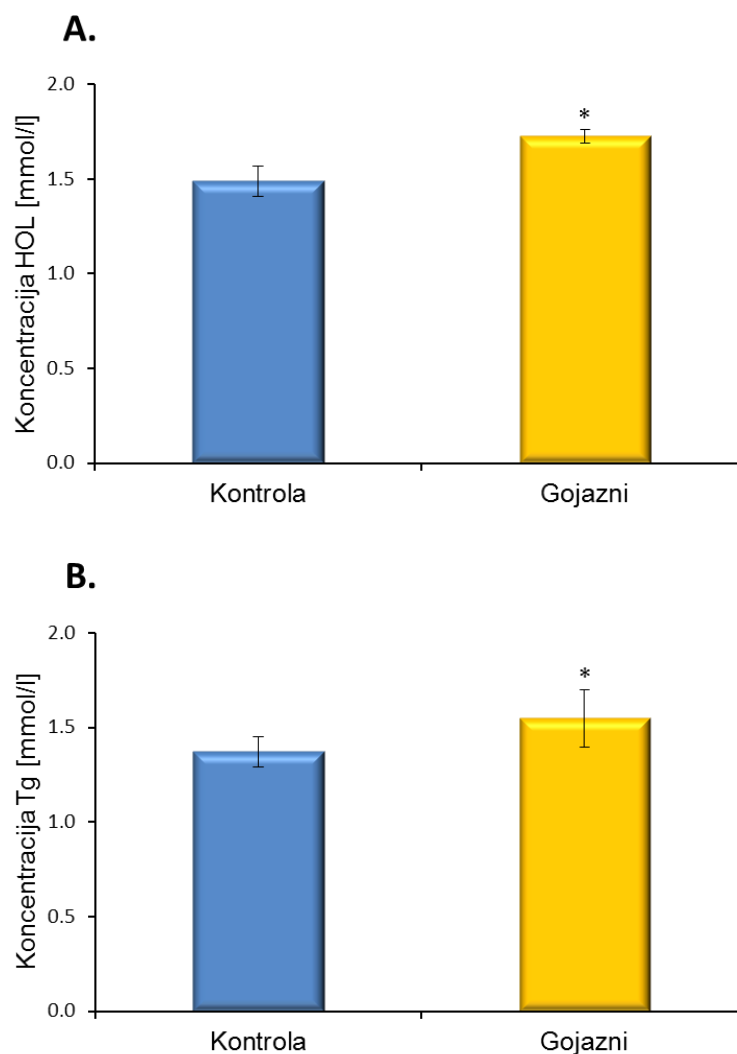
vrednostima, dok ishrana bogata mastima nije dovela do statistički značajnih razlika u vrednostima koncentracije  $K^+$  u serumu pacova ( **Tabela 4.**).

<b>Eksperimentalne grupe</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Gojazni</b>
<b>Leptin [ng/ml]</b>	0,06 ± 0,01 n = 3	0,20 ± 0,01*** n = 3
<b>CRP [mg/l]</b>	43,18 ± 1,01 n = 5	60,20 ± 2,37 *** n = 5
<b>DLIF [mmol/l]</b>	3,77 ± 0,08 n = 3	1,81 ± 0,05 *** n = 4
<b>Na<sup>+</sup> [mmol/l]</b>	144,3 ± 1,11 n = 4	137,8 ± 0,58 ** n = 5
<b>K<sup>+</sup> [mmol/l]</b>	5,58 ± 0,14 n = 5	5,55 ± 0,30 n = 6

**Tabela 4.** Leptin, C–reaktivni protein (CRP), digoksinu slični imunoreaktivni faktori (DLIF), natrijum (Na<sup>+</sup>) i kalijum (K<sup>+</sup>) u serumu i plazmi kontrolnih i gojaznih pacova. Koncentracija leptina izražena je u ng/ml, CRP u mg/l, dok su koncentracije DLIF, Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> izražene u mmol/l. Prikazani rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

#### **4.2.4. Efekti ishrane bogate mastima na koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i tiglicerida (Tg) kod kontrolnih i gojaznih pacova**

Kao što se može videti na slici **Slika 9. A** koncentracija ukupnog holesterola (HOL) je statistički značajno veća u serumu gojaznih pacova u odnosu na kontrole (Kontrola = 1,49 ± 0,08; Gojazni = 1,72 ± 0,04 mmol/l; \*p < 0,05;). Rezultati dobijeni merenjem koncentracije triglicerida (Tg) u serumu pacova su pokazali da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog povećanja njihove vrednosti kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne vrednosti (Kontrola = 1,27 ± 0,07; Gojazni = 1,64 ± 0,14 mmol/l; \*p<0,05; **Slika 9. B**).

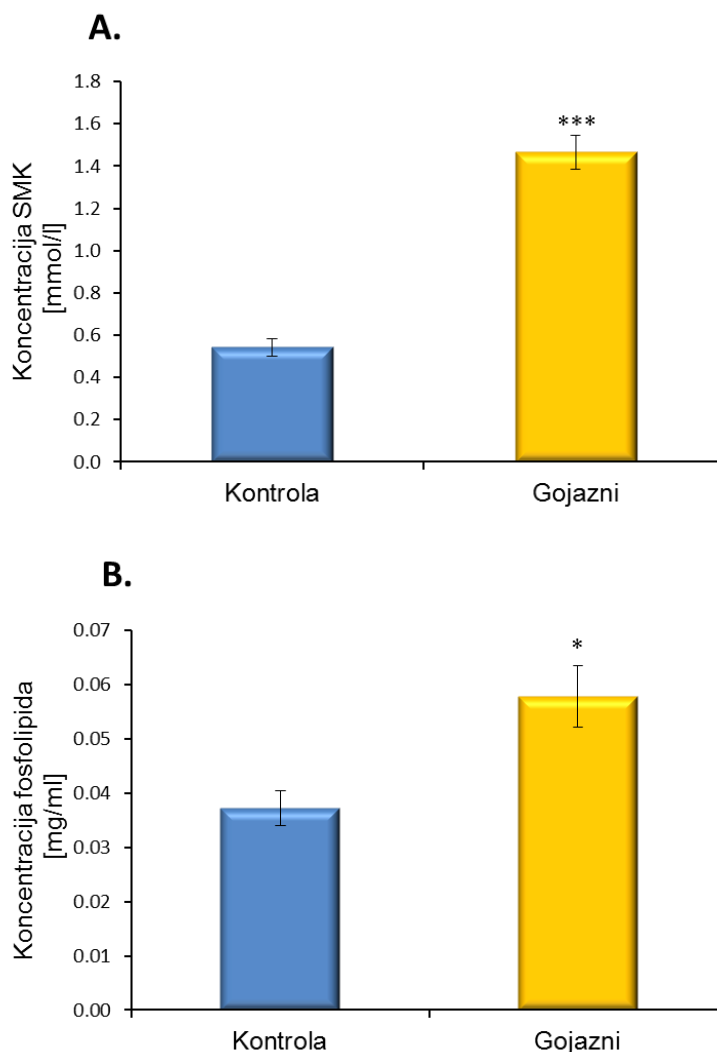


**Slika 9.** Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju (A), ukupnog holesterola (HOL) i (B) triglicerida (Tg) u serumu pacova. Koncentracije HOL (n = 7) i Tg (n = 5) su izražene u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM; (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju slobodnih masnih kiselina (SMK) i fosfolipida u plazmi pacova

Rezultati merenja koncentracije SMK i fosfolipida u plazmi gojaznih i kontrolnih pacova su prikazani na **Slici 10**. Dobijeni rezultati pokazuju da su koncentracije SMK (**Slika 10. A.**) kao i fosfolipida (**Slika 10. B.**) statistički značajno povećane u plazmi gojaznih pacova u odnosu na vrednosti izmerene u plazmi normalno hranjenih, kontrolnih životinja (SMK: Kontrola =  $0,54 \pm 0,04$ ; Gojazni =  $1,47 \pm 0,08$  mmol/l; \*\*\* $p < 0,001$ ;

**Fosfolipidi:** Kontrola =  $0,037 \pm 0,003$  mmol/l; Gojazni =  $0,058 \pm 0,006$  mmol/l; \* $p < 0,05$ ).

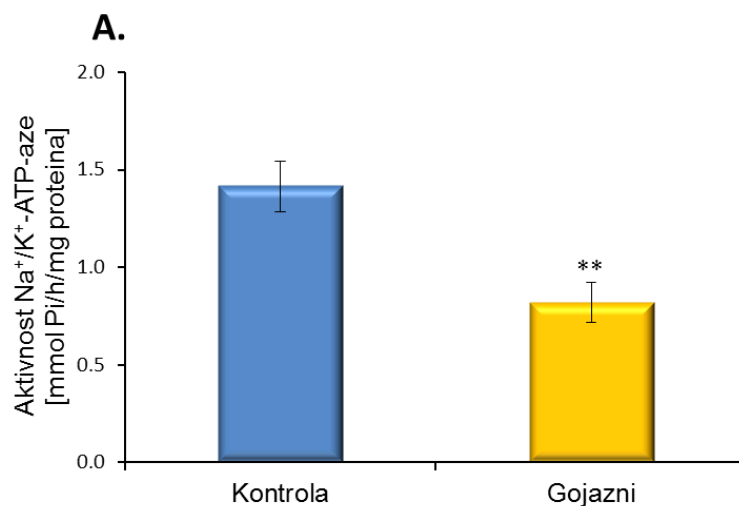


**Slika 10. Efekti ishrane bogate mastima na koncentraciju SMK (A) i fosfolipida (B) u plazmi pacova.** A. Koncentracije SMK su izražene u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (n = 5-6); B. Koncentracije fosfolipida su izražene u mg/ml i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (n = 5-6); (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.2.6. Efekti ishrane bogate mastima na regulaciju aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ekspresiju i fosforilaciju $\alpha 1$ subjedninice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca pacova

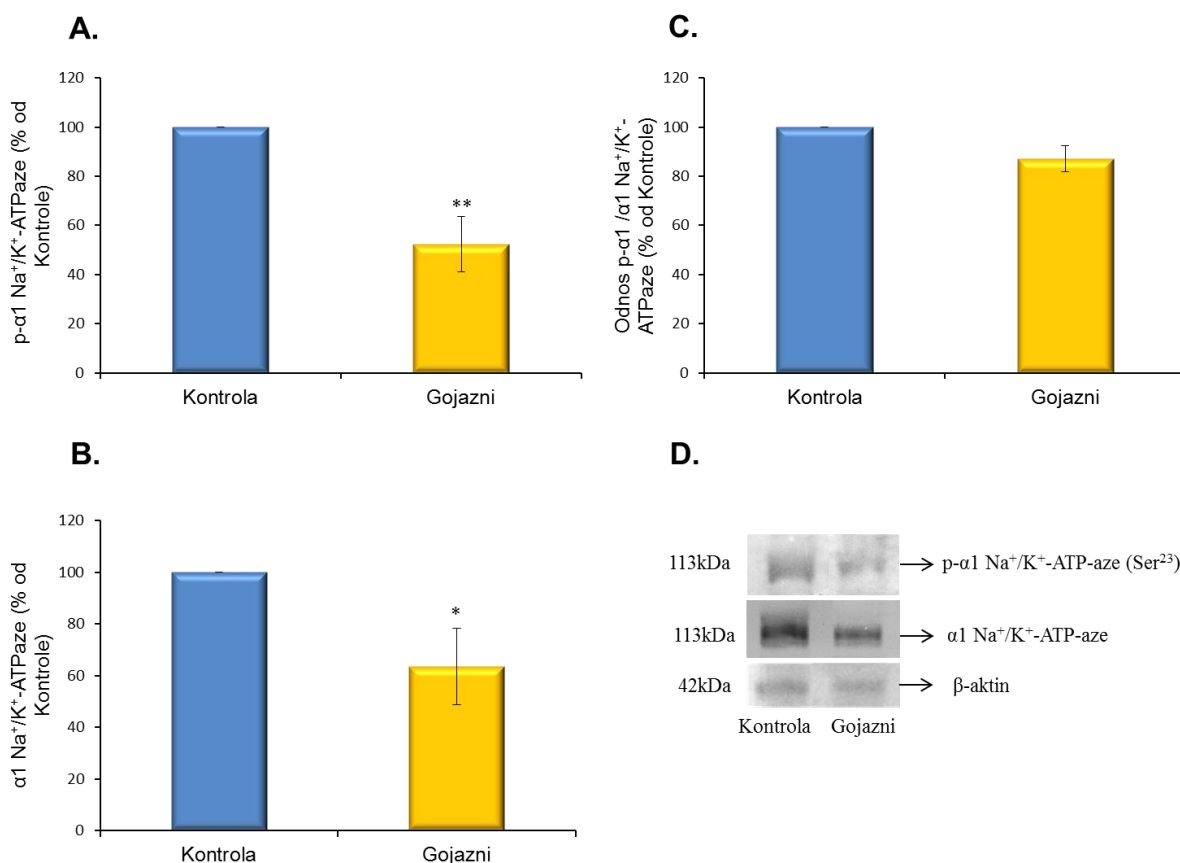
U eksperimentima u okviru kojih smo izučavali efekte ishrane bogate mastima na regulaciju aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, koristili smo izolovane membrane kardiomiocita pacova. Kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj mastima, pokazano je

da dolazi do statistički značajnog smanjenja u aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u iznosu od 42%, u poređenju sa izmerenom aktivnosti u kontrolnim pacovima (Kontrola =  $1,42 \pm 0,13$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina; Gojazni =  $0,82 \pm 0,10$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina;  $**p < 0,01$ ) ( **Slika 11. A**).



**Slika 11.** Efekti ishrane bogate mastima na regulaciju aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani kardiomiocita gojaznih pacova. A. Aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze izražena je u mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina i predstavlja srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (n = 5), ( $**p < 0,01$ ).

Efekti ishrane bogate mastima na ekspresiju  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod gojaznih pacova analizirani su određivanjem nivoa fosforilacije na  $\text{Ser}^{23}$ , ukupnom nivou, kao i odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa proteina  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 12. A-D**). Fosforilacija  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na  $\text{Ser}^{23}$  i ekspresija proteina za katalitičku  $\alpha 1$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze dobijeni primenom metode Western blota, statistički značajno je smanjena. Kod gojaznih pacova fosforilacije je smanjena za 48% (Kontrola = 100%; Gojazni =  $52 \pm 11\%$ ;  $**p < 0,01$ ), a ekspresija katalitičke  $\alpha 1$  subjedinice za 37% u poređenju sa vrednostima dobijenim u grupi kontrolnih životinja (Kontrola = 100%; Gojazni =  $63 \pm 15\%$ ;  $*p < 0,05$ ). Izračunavanjem odnosa fosforilisane forme  $\alpha 1$  subjedinice i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice, pokazano je da ishrana bogata mastima dovodi do smanjenja fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice u iznosu od 13%, ali bez statističke značajnosti (Kontrola = 100%; Gojazni =  $87 \pm 5\%$ ;  $p = 0,06$ ).



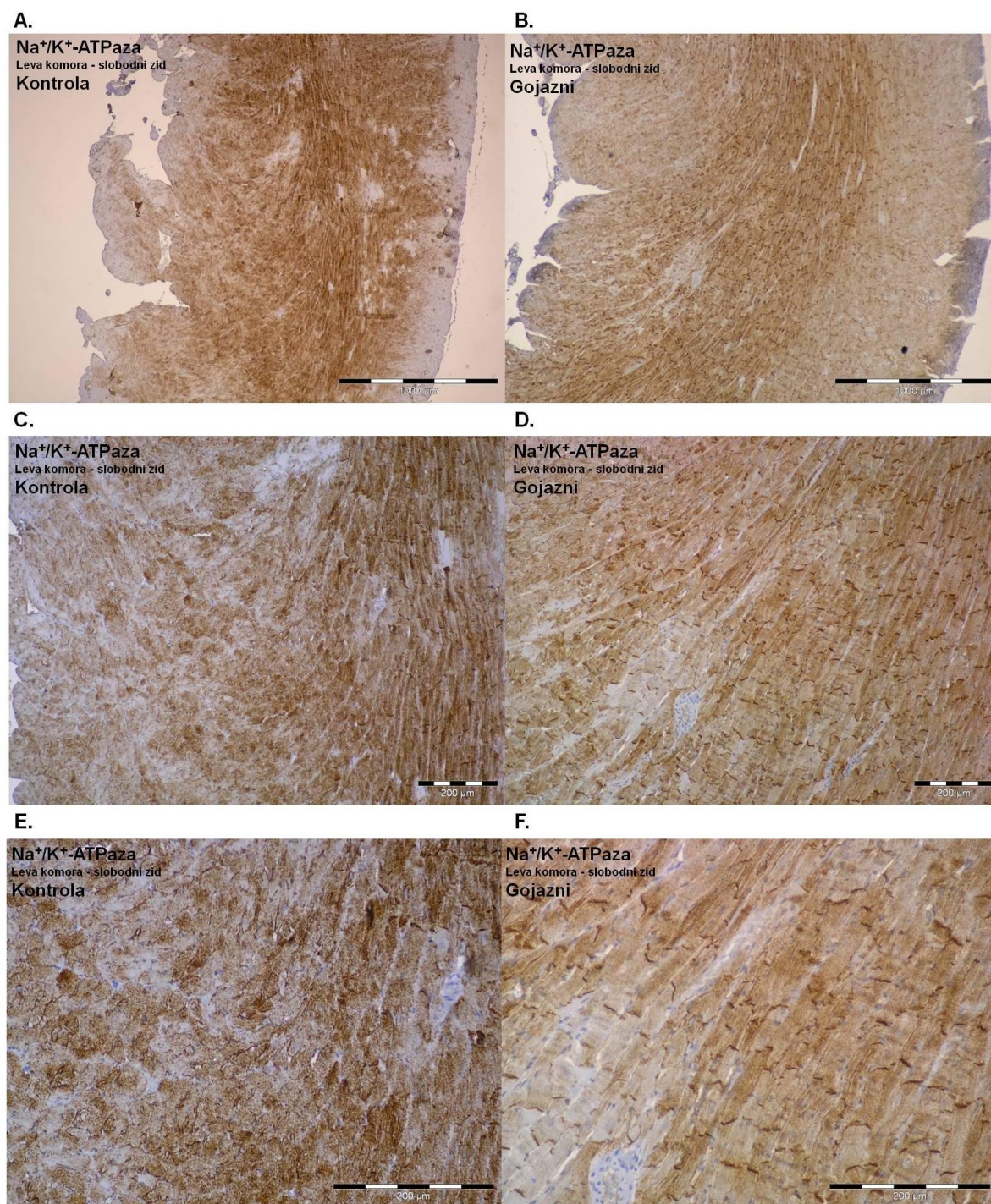
**Slika 12.** Efekti ishrane bogate mastima na nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na amino kislini Ser<sup>23</sup> i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membrani kardiomiocita gojaznih pacova. A. Nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na Ser<sup>23</sup> (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 4-3). B. Ekspresija  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 7-4). C. Rezultati dobijeni izračunavanjem odnosa fosforilisane forme  $\alpha 1$  i ukupne  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze /  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 4-3). D. Reprerativni western blot fosforilacije na Ser<sup>23</sup> i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu (Kontrola=100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

#### 4.2.7. Imunohistohemijska detekcija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih i kontrolnih pacova

Imunoreaktivnost na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu u srcu gojaznih i kontrolnih pacova su prikazani u predelu slobodnog zida leve komore na **Slici 13. A-F** i u predelu septuma na **Slici 14. A-F**. Kako se na slikama može videti imunoreaktivnost na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu je membranskog tipa i najizraženija u središnjim delovima zida srca, uključujući slobodni zid

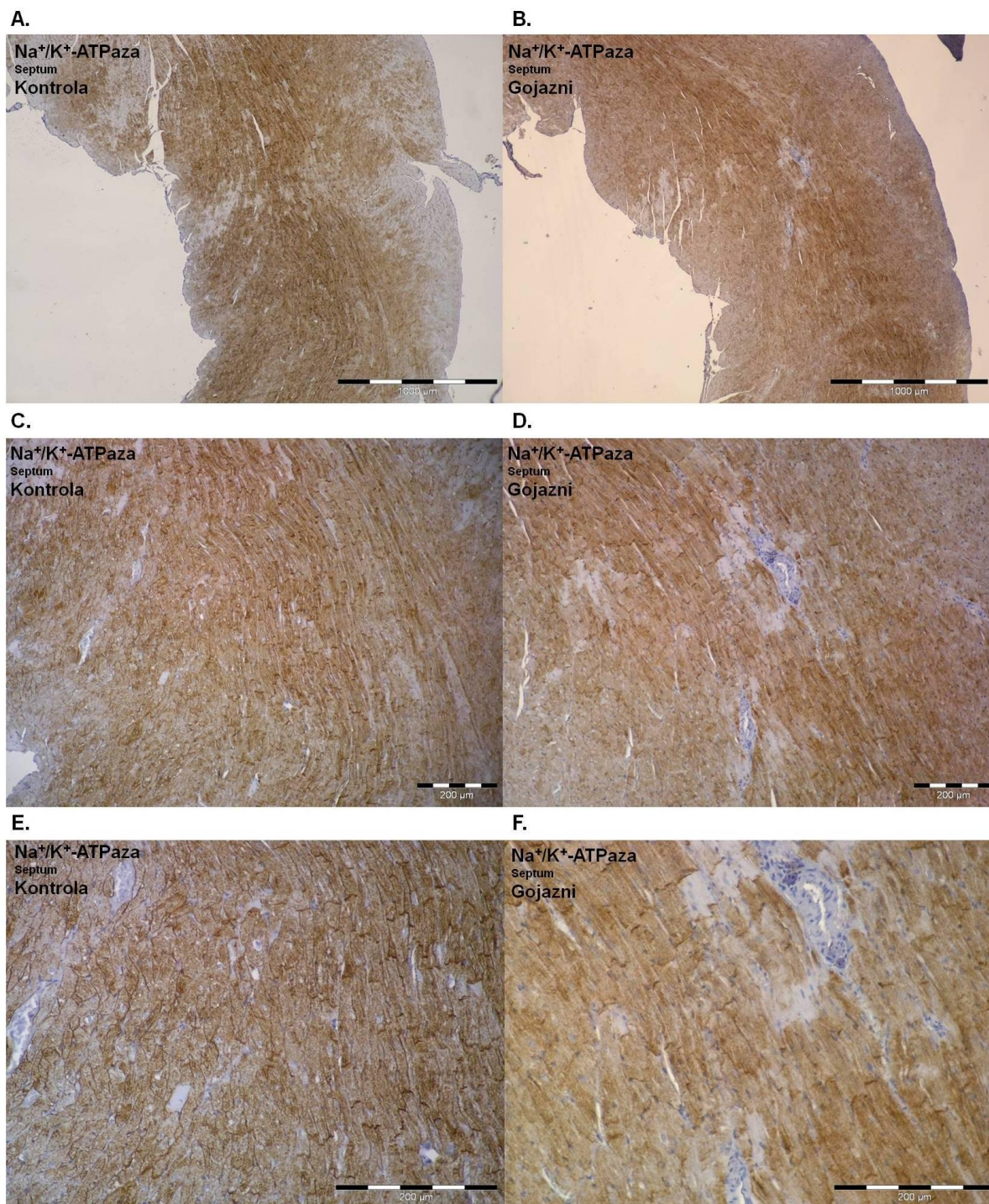


leve komore (Slika 13. A, B) i septuma (Slika 14. A, B), dok je slabije izražena subendokardno i subepikardno u obe eksperimentalne grupe.



**Slika 13. Imunohistohemijsko bojenje na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu u predelu slobodnog zid leve komore.** (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x) Kontrola – kontrolni pacovi (A, C, E); Gojazni – gojazni pacovi (B, D, F).



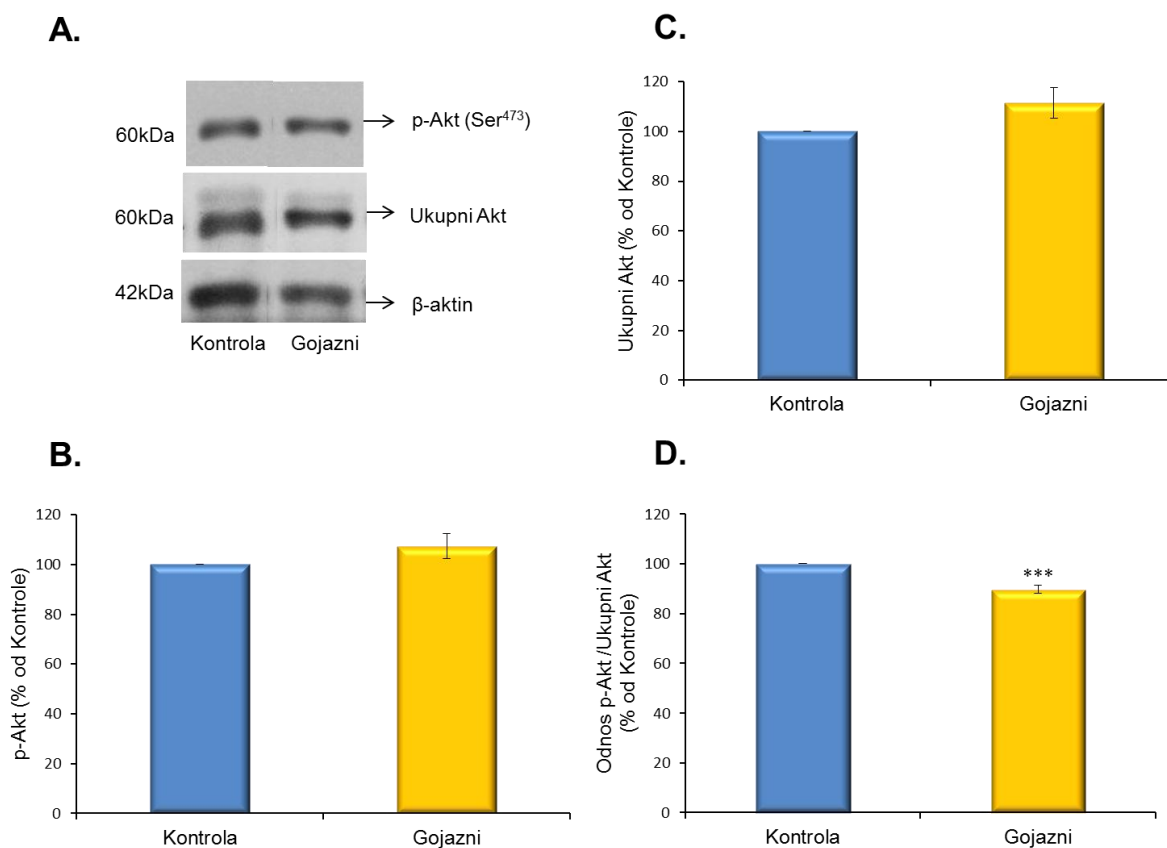


**Slika 14. Imunohistohemijsko bojenje na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu u predelu septuma.** (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x) Kontrola – kontrolni pacovi (A, C, E); Gojazni – gojazni pacovi (B, D, F).

#### **4.2.8. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo proteina Akt i ERK1/2 kinaza u srcu pacova**

##### **4.2.8.1. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo Akt kinaze u srcu pacova**

Uticaj ishrane bogate mastima na aktivnost Akt kinaze analiziran je određivanjem nivoa fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup>, nivoa ukupnog Akt, kao i odnosa fosforilisane forme i ukupnog proteina. Rezultati sve tri analize su prikazani na **Slici 15. A-D**. Pokazano je da ishrana bogata mastima ne dovodi do statistički značajnih promena u nivou fosforilacije Akt na amino kiselini Ser<sup>473</sup> (Kontrola = 100%; Gojazni = 107 ± 5%), kao i nivoa ukupnog Akt (Kontrola = 100%; Gojazni = 111 ± 6%;) kod gojaznih pacova u odnosu na pacove iz kontrolne grupe. Međutim, analiza odnosa između fosforilisane forme Akt na Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt, pokazuje da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog smanjenja ove vrednosti u odnosu na kontrolne (Kontrola = 100%; Gojazni = 90 ± 2%; \*\*\*p < 0,001).

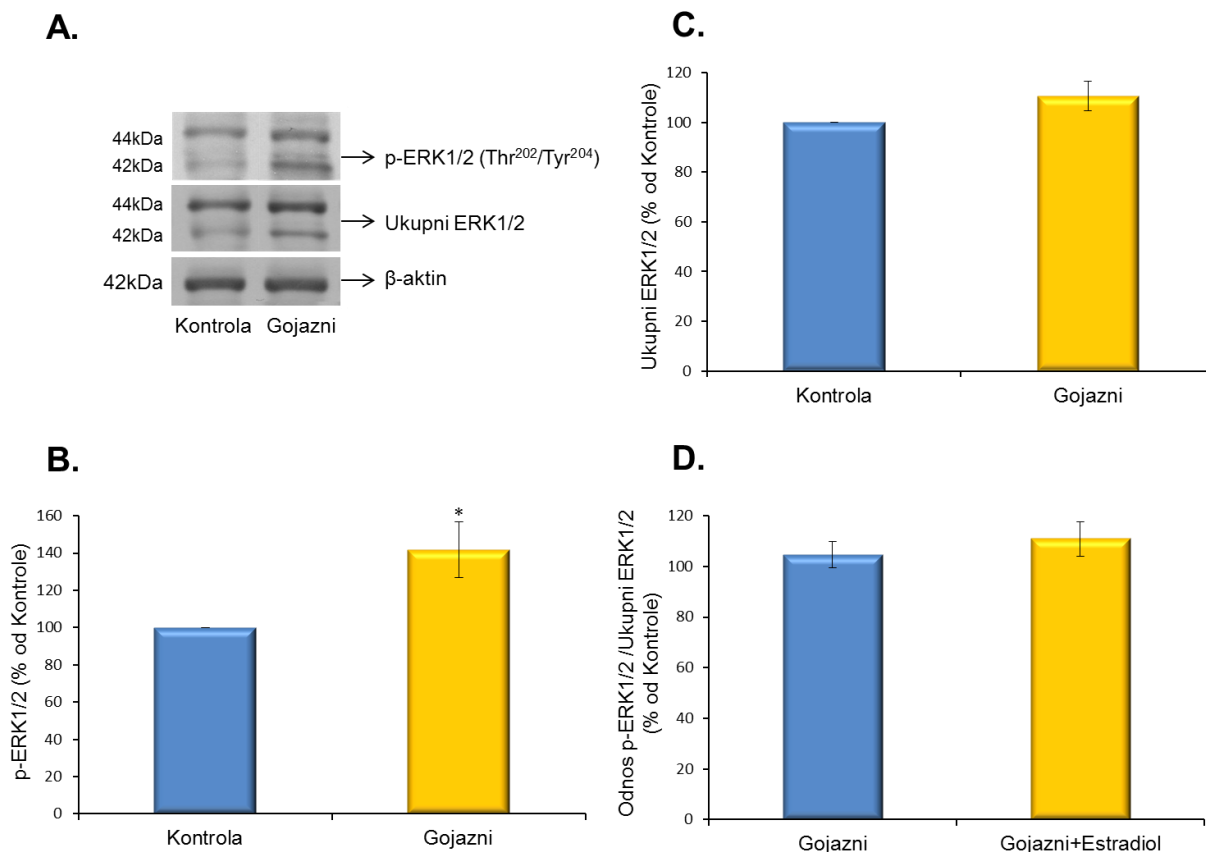


**Slika 15. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju Akt na amino kiselinu Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt proteina u srcu.** **A.** Reprezentativni western blot Akt fosforilacije; **B.** Nivo fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> (p-Akt); (n = 6). **C.** Nivo ukupnog Akt (Ukupni Akt); (n = 6). **D.** Odnos vrednosti p-Akt i ukupnog Akt (p-Akt/ Ukupni Akt); (n = 5). Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (\*\*\*)p<0,001).

#### 4.2.8.2. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilaciju i nivo ERK1/2 kinaze u srcu pacova

Rezultati merenja fosforilacije i nivoa proteina za ERK1/2 kinazu u srcu pacova su prikazani na **Slici 16. A-D.** Uticaj ishrane bogate mastima na ERK1/2 analiziran je određivanjem: nivoa fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, nivoa ukupnog ERK1/2 proteina, kao i odnosa fosforilisane forme i ukupnog proteina. Pokazano je da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa fosforilacije ERK1/2 (Kontrola = 100%; Gojazni = 141 ± 14%; \*p < 0,05), ali ne i ukupnog ERK1/2 (Kontrola = 100%; Gojazni = 111 ± 6%) kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne

vrednosti. Odnos fosforilisane forme ERK1/2 i ukupnog ERK1/2 pokazao je da ishrana bogata mastima ne dovodi do statistički značajnih promena (Kontrola = 100%; Gojazni =  $108 \pm 5\%$ );).



**Slika 16. Efekti ishrane bogate mastima na fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> i nivo ukupnog ERK1/2 proteina u srcu pacova. A.** Reprezentativni western blot ERK1/2 fosforilacije; **B.** Nivo fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (p-ERK1/2); (n = 7). **C.** Nivo ukupnog ERK1/2 (Ukupni ERK1/2); (n = 7). **D.** Odnos p-ERK 1/2 i ukupnog ERK1/2 (p-ERK1/2 /Ukupni ERK1/2); (n = 6). Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM; (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

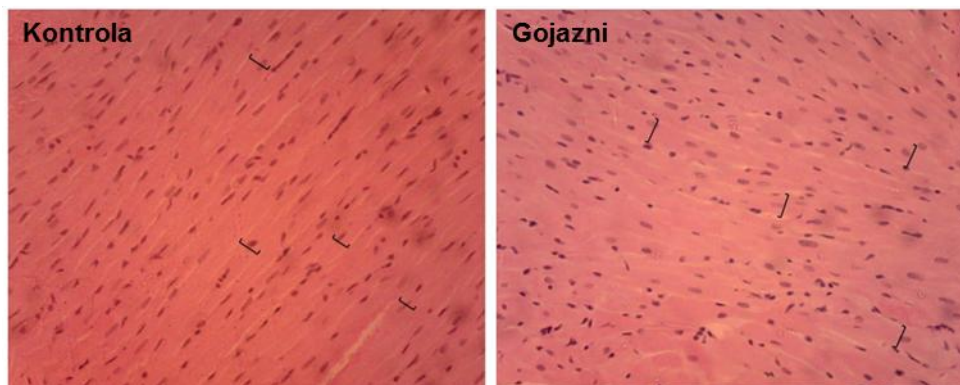
#### 4.2.9. Efekti ishrane bogate mastima na transversalni dijаметar kardiomiocita pacova

Rezultati dobijeni izučavanjem efekata ishrane bogate mastima na transversalni dijаметar ćelija srca pacova prikazani su na **Slici 17. A i B.** Pokazano je da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog povećanja transversalnog dijametra kardiomiocita

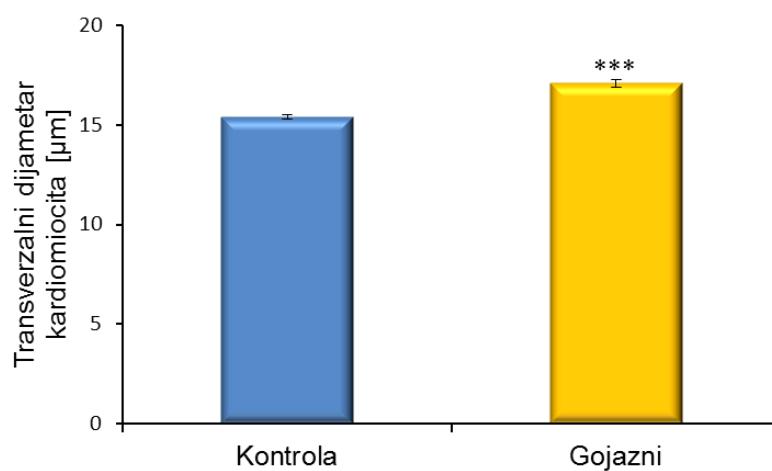


kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne pacove (Kontrola =  $15,40 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ; Gojazni =  $17,10 \pm 0,18 \mu\text{m}$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

**A.**



**B.**



**Slika 17. Efekti ishrane bogate mastima na transverzalni dijаметar kardiomiocita pacova. A.** Uporedni prikaz transverzalnih dijametara kardiomiocita na isečcima tkiva srca. **B.** Rezultati dobijeni merenjem transverzalnog dijametara ćelija srca u nivou jedra izraženi su u  $\mu\text{m}$  i predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  SEM (  $n = 300$ ); (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

### **4.3. Promene u regulaciji $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologije srca pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih, insulin rezistentnih pacova**

Budući da smo pokazali da je kod gojaznih pacova smanjena aktivnost i ekspresija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, i izražena hipertrofija srca, u skladu sa postavljenim ciljevima želeli smo da ispitamo efekat estradiola na pomenute parametre, stoga smo gojazne pacove tretirali estradiolom i nakon 24 sata žrtvovali. Vrednosti dobijene za sve izučavane parametre u grupi gojaznih životinja tretiranih estradiolom su poređene sa vrednostima dobijenim za gojazne životinje kako bi se dobio uvid u efekte koje estradiol ostvaruje u uslovima gojaznosti i IR.

#### **4.3.1 Masa tela i srca, kao i koncentracija ukupnih proteina u srcu gojaznih i estradiolom tretiranih gojaznih pacova**

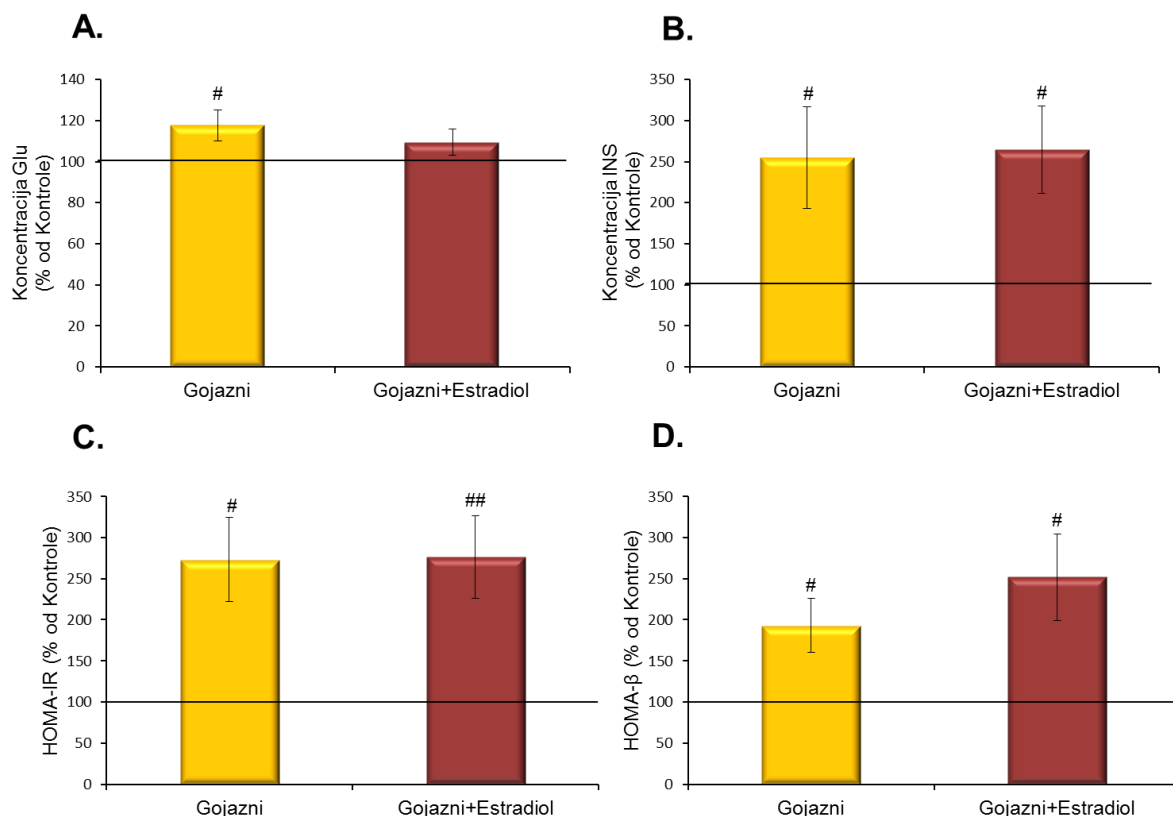
U predhodno datim tabelama **Tabela 1.** i **Tabela 2** prikazane su mase tela i srca, kao i koncentracije ukupnih proteina u srcu normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom inicijalne, finalne mase tela i razlike finalnih i inicijalnih masa tela nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na gojazne, ne tretirane pacove (**Tabela 5.**). Međutim, statistički značajno je manja masa srca kod gojaznih pacova kojima je injeciran estradiol u odnosu na gojazne netretirane pacove (\* $p < 0,05$ ), a takođe je i vrednost odnosa mase srca i mase tela pacova značajno smanjen kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom u odnosu na gojazne pacove (\* $p < 0,05$ ). Koncentracija ukupnih proteina u srcima gojaznih pacova tretiranih estradiolom je povećana u odnosu na vrednosti detektovane u srcima gojaznih životinja, ali zapaženo povećanje nije statistički značajno (**Tabela 5.**).

Eksperimentalne grupe	Gojazni (%)	Gojazni+Estradiol (%)
Inicijalna masa tela	99 ± 3 n = 7	91 ± 4 <sup>#</sup> n = 7
Finalna masa tela	107 ± 4 n = 7	108 ± 7 n = 7
Razlika finalne i inicijalne mase tela	117 ± 7 <sup>#</sup> n = 7	131 ± 13 <sup>#</sup> n = 7
Masa srca	111 ± 2 <sup>###</sup> n = 6	99 ± 4 <sup>*</sup> n = 5
Srce /telo odnos	104 ± 4 n = 6	92 ± 3 <sup>* #</sup> n = 5
Ukupni proteini iz srca	149 ± 4 <sup>####</sup> n = 5	156 ± 7 <sup>####</sup> n = 5

**Tabela 5. Telesna masa, masa srca, odnosi mase tela i mase srca, kao i koncentracije ukupnih proteina u srcu gojaznih i estradiolom tretiranih gojaznih pacova.** Inicijalna masa— masa tela na početku eksperimenta; finalna masa— masa tela neposredno pre žrtvovanja. Rezultati su predstavljani kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni \*p<0,05; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola<sup>#</sup>p<0,05, <sup>##</sup>p<0,01, <sup>###</sup>p<0,001).

#### 4.3.2. Efekti estradiola na koncentraciju glukoze (Glu), insulina (INS), i indekse rezistencije na INS (HOMA-IR) i sekrecije β-ćelija (HOMA-β) u serumu gojaznih pacova

Tretman gojaznih pacova estradiolom nije doveo do statistički značajnih promena koncentracije Glu (Gojazni = 117 ± 7%, Gojazni+Estradiol = 109 ± 6%; **Slika 18. A**), INS (Gojazni = 255 ± 62%, Gojazni+Estradiol = 265 ± 53%; **Slika 18. B**) u serumu, kao ni HOMA-IR (Gojazni = 273 ± 51%, Gojazni+Estradiol = 277 ± 50%; **Slika 18. C**) i HOMA-β (Gojazni = 193 ± 33%, Gojazni+Estradiol = 252 ± 53%; **Slika 18. D**) u poređenju sa gojaznim netretiranim pacovima.



**Slika 18. Efekti estradiola na koncentraciju Glu (A) i INS (B), kao i indekse HOMA-IR (C) i HOMA-β (D) u serumu gojaznih pacova.** Koncentracije Glu (n = 7), INS (n = 5) u serumu, kao i HOMA-IR (n = 5) i HOMA-β (n = 5) su izraženi kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu #p<0,05, ##p<0,01).

#### 4.3.3. Efekti estradiola na koncentraciji leptina, C–reaktivnog proteina (CRP), digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora (DLIF), natrijuma (Na<sup>+</sup>) i kalijuma (K<sup>+</sup>) u serumu i plazmi gojaznih pacova

Rezultati merenja koncentracije leptina u serumu pacova su pokazali da estradiol ne dovodi do statistički značajne razlike u koncentraciji leptina kod gojaznih pacova u odnosu na gojazne pacove koji nisu tretirani estradiolom (Tabela 6.). Izmerene i prikazane vrednosti za CRP u serumu pacova jasno pokazuju da davanje estradiola gojaznim životinjama dovodi do statistički značajnog smanjenja njegove vrednosti u poređenju sa vrednostima koncentracije CRP u serumu netretiranih, gojaznih pacova (\*\*\*p < 0,001), dok tretman estradiolom ne dovodi do statistički značajnog efekta na koncentraciju DLIF (Tabela 6.). Merenja koncentracije Na<sup>+</sup> u serumu gojaznih pacova su pokazala da je



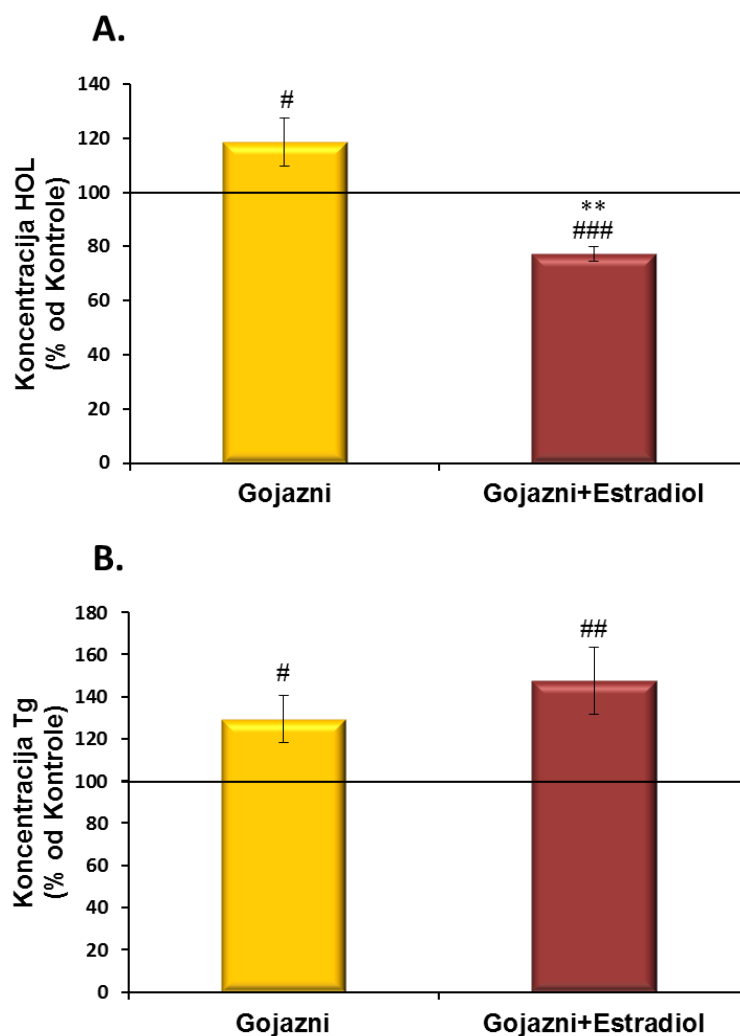
njegova koncentracija statistički značajno povećana kod estradiolom tretiranih gojaznih životinja u odnosu na vrednosti koncentracije  $\text{Na}^+$  kod gojaznih, netretiranih životinja (\*\*p < 0,01), dok tretman estradiolom nije doveo do statistički značajnih razlika u koncentraciji  $\text{K}^+$  u poređenju sa izmerenim vrednostima kod gojaznih pacova (**Tabela 6**).

<b>Eksperimentalne grupe</b>	<b>Gojazni (%)</b>	<b>Gojazni+Estradiol (%)</b>
<b>Leptin</b>	394 ± 109 <sup>###</sup> n = 3	457 ± 53 <sup>###</sup> n = 3
<b>CRP</b>	140 ± 8 <sup>###</sup> n = 5	100 ± 3 <sup>***</sup> n = 5
<b>DLIF</b>	49 ± 1 <sup>###</sup> n = 3	49 ± 2 <sup>###</sup> n = 3
<b>Na<sup>+</sup></b>	96 ± 1 <sup>##</sup> n = 5	101 ± 0 <sup>**</sup> n = 5
<b>K<sup>+</sup></b>	104 ± 5 n = 6	116 ± 8 n = 6

**Tabela 6. Koncentracije C–reaktivnog proteina (CRP), digoksinu slični imunoreaktivni faktora (DLIF), natrijuma ( $\text{Na}^+$ ) i kalijuma ( $\text{K}^+$ ) u serumu kontrolnih i estradiolom tretiranih pacova.** Koncentracije leptina, CRP, DLIF,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  su izražene kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola ##p<0,01, ###p<0,001).

#### **4.3.4. Efekti estradiola na koncentraciju ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu gojaznih pacova tretiranih estradiolom**

Na **Slici 19. A-B** su prikazani rezultati dobijeni merenjem koncentracije ukupnog holesterola (HOL) i triglicerida (Tg) u serumu gojaznih pacova, kao i u serumu gojaznih pacova tretiranih estradiolom. Tretman gojaznih pacova estradiolom dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije HOL u poređenju sa vrednostima dobijenim za gojazne pacove (HOL: Gojazni 119 ± 9%, Gojazni+Estradiol = 77 ± 3%, \*\*p < 0,01), a ne dovodi do značajnijih promena u koncentraciji Tg (Gojazni = 129 ± 10%, Gojazni+Estradiol = 148 ± 11%).

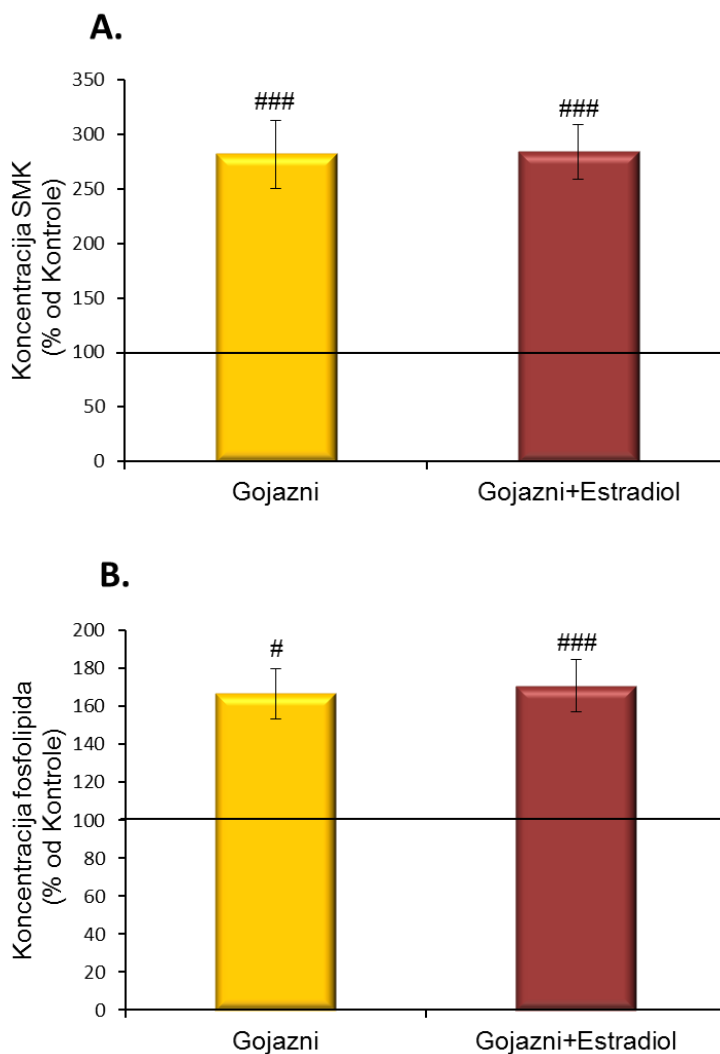


**Slika 19. Efekat estradiola na koncentraciju (A) ukupnog holesterola (HOL) i (B) triglicerida (Tg) u serumu gojaznih pacova.** Koncentracija HOL (n = 7-6) i Tg (n = 5) izražena je kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavlja srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni  $**p < 0,01$ ; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola  $\#p < 0,05$ ,  $##p < 0,01$ ,  $###p < 0,001$ ).

#### 4.3.5. Efekti estradiola na koncentraciju slobodnih masnih kiselina (SMK) i fosfolipida u plazmi gojaznih pacova

Rezultati dobijeni iz eksperimenata u kojima je izučavan efekat estradiola na koncentraciju SMK i fosfolipida u plazmi gojaznih pacova su prikazani na **Slici 20. A i B.** Davanje estradiola gojaznim životinjama ne dovodi do promene koncentracije SMK i fosfolipida u odnosu na vrednosti dobijene za ova dva analizirana parametra u serumu

gojaznih pacova (**SMK:** Gojazni =  $282 \pm 31\%$ , Gojazni+Estradiol =  $284 \pm 25\%$ ;  
**Fosfolipidi:** Gojazni =  $167 \pm 13\%$ , Gojazni+Estradiol =  $171 \pm 14\%$ ).

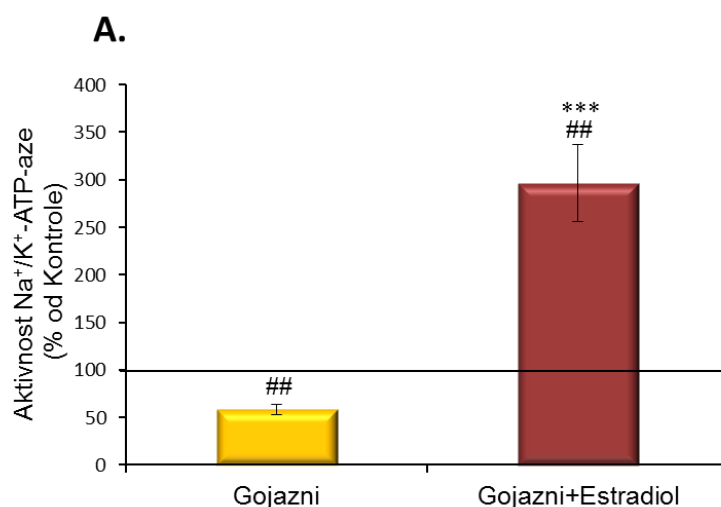


**Slika 20. Koncentracija SMK (A) i fosfolipida (B) u plazmi gojaznih pacova tretiranih estradiolom.** Koncentracije SMK (n = 5) i fosfolipida (n = 6-5) su izražene kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM (Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola: #p<0,05, ###p<0,001).

#### 4.3.6. Regulacija aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i ekspresije $\alpha 1$ subjedinice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova

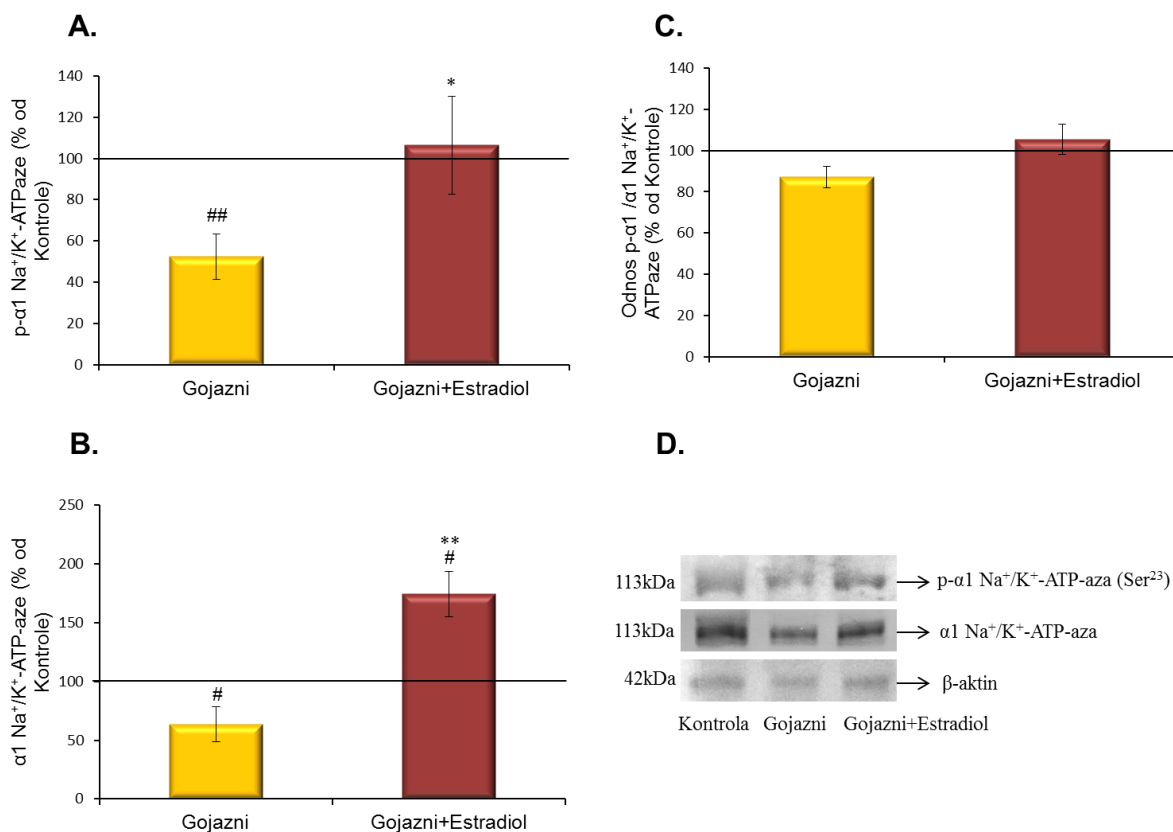
Rezultati merenja efekata estradiola na aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca gojaznih pacova su prikazani na **Slici 21**. Tretman estradiolom dovodi do statistički značajnog povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod gojaznih pacova u odnosu na vrednosti izmerene

kod gojaznih netretiranih pacova (Gojazni =  $58 \pm 5\%$ , Gojazni+Estradiol =  $296 \pm 41\%$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Slika 21. Efekti estradiola na regulaciju aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membrani kardiomiocita gojaznih pacova.** Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze izražena je u mmol P<sub>i</sub>/h/mg proteina i predstavlja srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (n = 5), (\*\*\* $p < 0,001$ ).

Efekt estradiola na ekspresiju  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom analiziran je određivanjem nivoa fosforilacije na Ser<sup>23</sup>, ukupnom nivou, kao i odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa proteina  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (**Slika 22. A-D**). Tretman kod gojaznih pacova estradiolom dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa fosforilacije (Gojazni =  $52 \pm 11\%$ , Gojazni+Estradiol =  $107 \pm 24\%$ , \* $p = 0,05$ ) i nivoa proteina za katalitičku  $\alpha 1$  subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Gojazni =  $63 \pm 15\%$ , Gojazni+Estradiol =  $174 \pm 19\%$ , \*\* $p < 0,01$ ) u poređenju sa vrednostima dobijenim u grupi gojaznih pacova koji nisu tretirani estradiolom. Izračunavanjem odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze pokazano je da kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom nije došlo do statistički značajnog povećanja ove vrednosti u odnosu na gojazne netretirane pacove (Gojazni =  $87 \pm 5\%$ , Gojazni+Estradiol =  $105 \pm 7\%$ ).



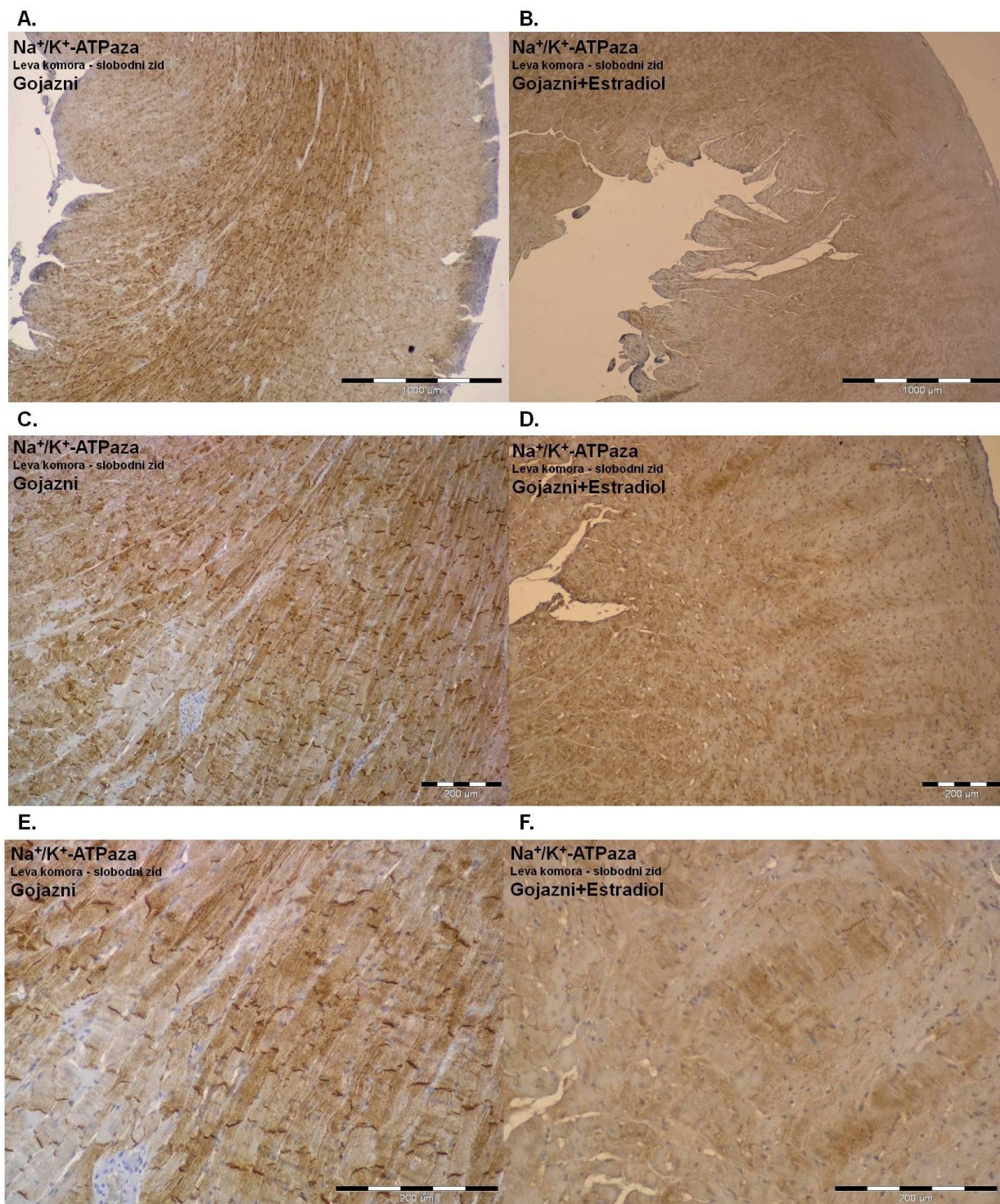
**Slika 22.** Efekti estradiola na nivo fosforilacije na amino kiselinu Ser<sup>23</sup> i ekspresiju  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membrani kardiomiocita gojaznih pacova. A. Nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na Ser<sup>23</sup> (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 3-4). B. Nivo ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 4-5). C. Odnos fosforilisane forme na Ser<sup>23</sup> i ukupne  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (p- $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze /  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); (n = 3-4). D. Reprezentativni western blot fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na amino kiselinu Ser<sup>23</sup> i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Rezultati su izraženi kao procenat od vrednosti dobijene za kontrolu (Kontrola=100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni \*p<0,05, \*\*p<0,01; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrolu #p<0,05, ##p<0,01).

#### 4.3.7. Imunohistohemijska detekcija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih i kontrolnih pacova

Imunoreaktivnost na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom, kao i netretiranih gojaznih pacova prikazana je u predelu slobodnog zida leve komore (Slici 23. A-F) i u predelu septuma (Slici 24. A-F). Dobijeni rezultati pokazuju da nije

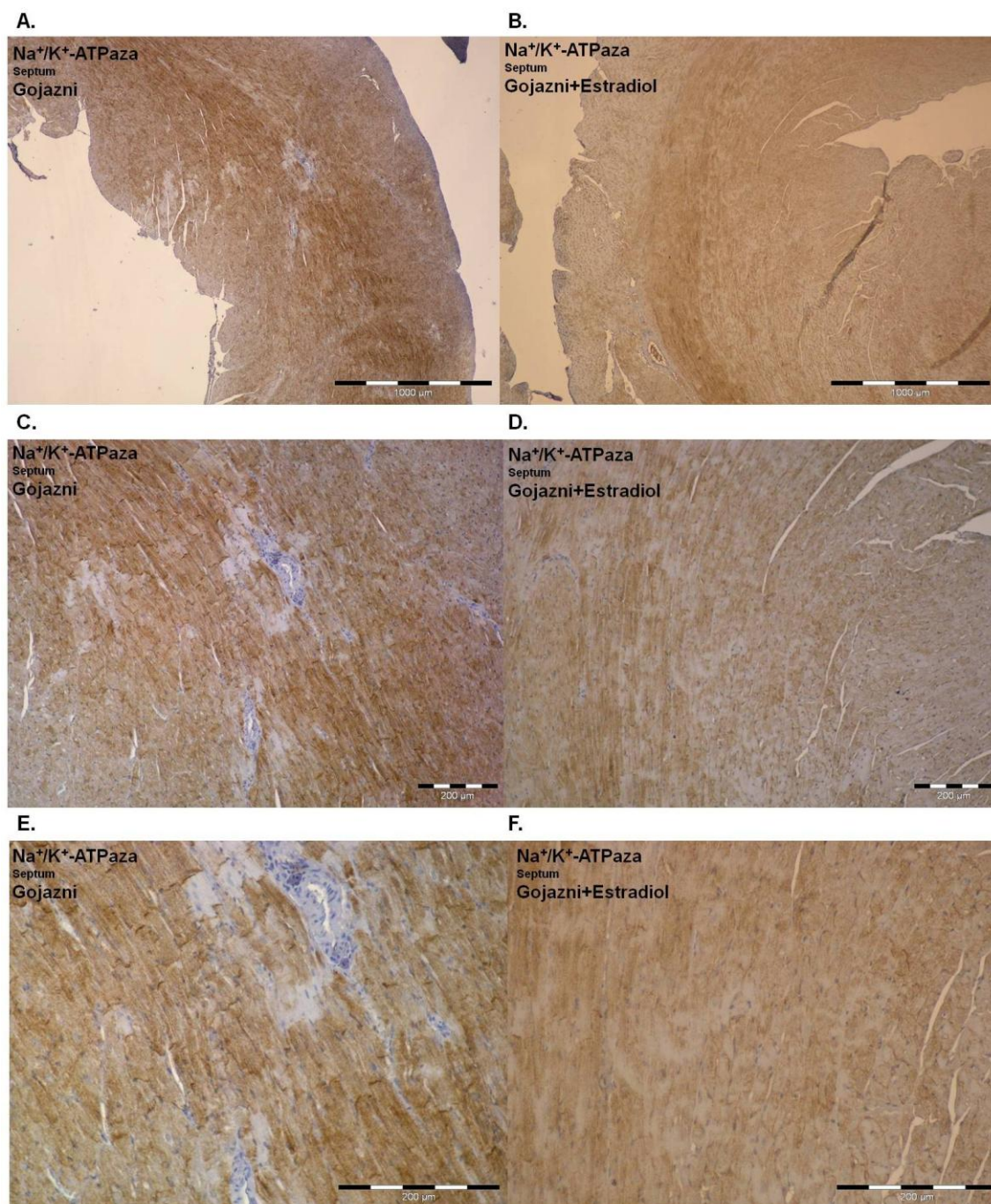


zapžena promena u imunoreaktivnosti na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu između ispitivanih grupa pacova.



**Slika 23.** Imunohistohemijsko bojenje na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu u predelu slobodnog zida leve komore. (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x) Gojazni – gojazni pacovi (A, C, E); Gojazni+Estradiol – gojazni pacovi tretirani estradiolom (B, D, F).





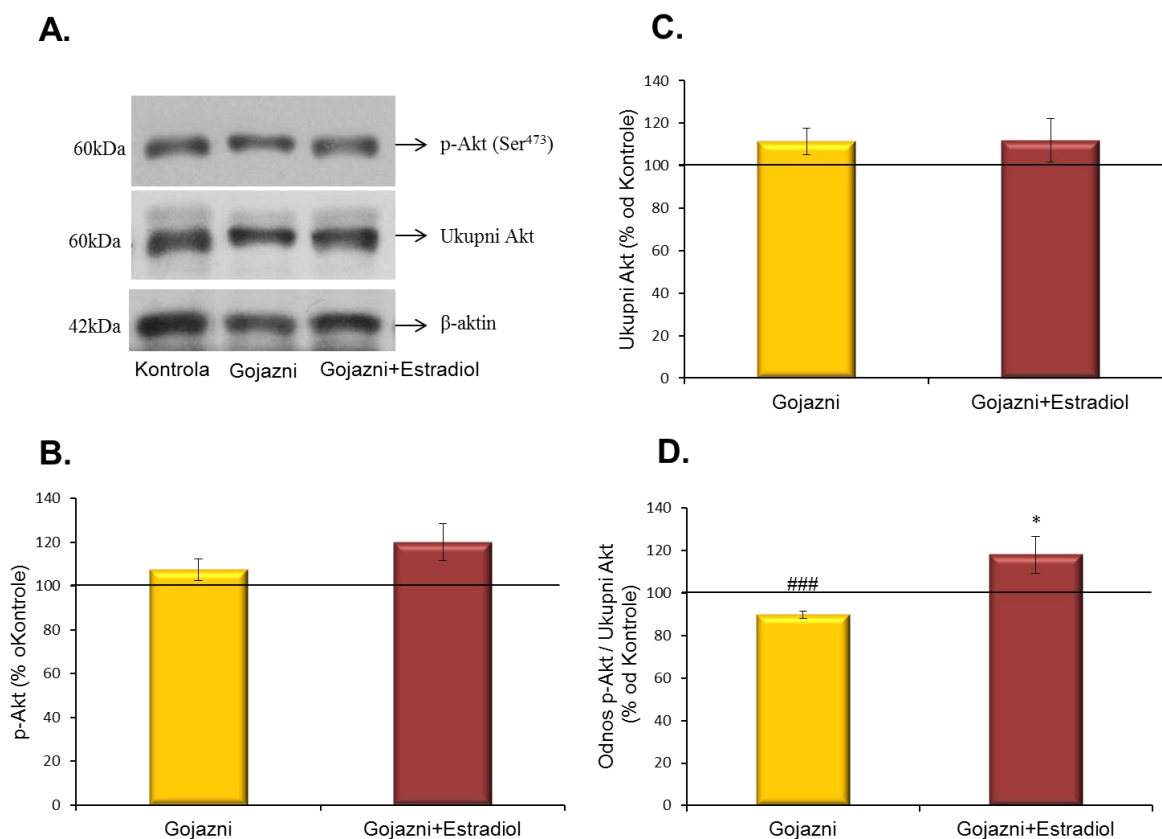
**Slika 24. Imunohistohemijsko bojenje na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu u predelu septuma.** (UltraVision/DAB; uveličanja: A i B-40x, C i D-100x, E i F-200x). Gojazni pacovi (Slika 25. A, C, E); Gojazni+Estradiol pacovi (Slika 25. B, D, F).

### **4.3.8. Fosforilacija i nivo proteina za Akt i ERK1/2 pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova**

#### **4.3.8.1. Efekti estradiola na fosforilaciju i nivo proteina za Akt kinazu u srcu gojaznih pacova**

Efekat estradiola na Akt kinazu u srcu gojaznih pacova analiziran je određivanjem nivoa fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup>, nivoa ukupnog, tj. bazalnog nivoa Akt proteina, kao i odnosa između fosforilisane forme Akt i njenog ukupnog proteina. Rezultati sve tri analize su prikazani na **Slici 25. A-D**. Može se uočiti da estradiol kod gojaznih pacova ne menja fosforilaciju (Gojazni =  $107 \pm 5\%$ , Gojazni+Estradiol =  $120 \pm 8\%$ ), kao i nivo ukupnog Akt proteina (Gojazni =  $111 \pm 6\%$ , Gojazni+Estradiol =  $112 \pm 10\%$ ) u poređenju sa vrednostima dobijenim u grupi gojaznih, netretiranih pacova. Odnos fosforilisane forme Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt pokazao je da kod gojaznih pacova koji su tretirani estradiolom dolazi do statistički značajnog povećanja ove vrednosti u odnosu na gojazne, estradiolom netretirane pacove (Gojazni =  $90 \pm 2\%$ , Gojazni+Estradiol =  $118 \pm 9\%$ , \* $p < 0,05$ ).



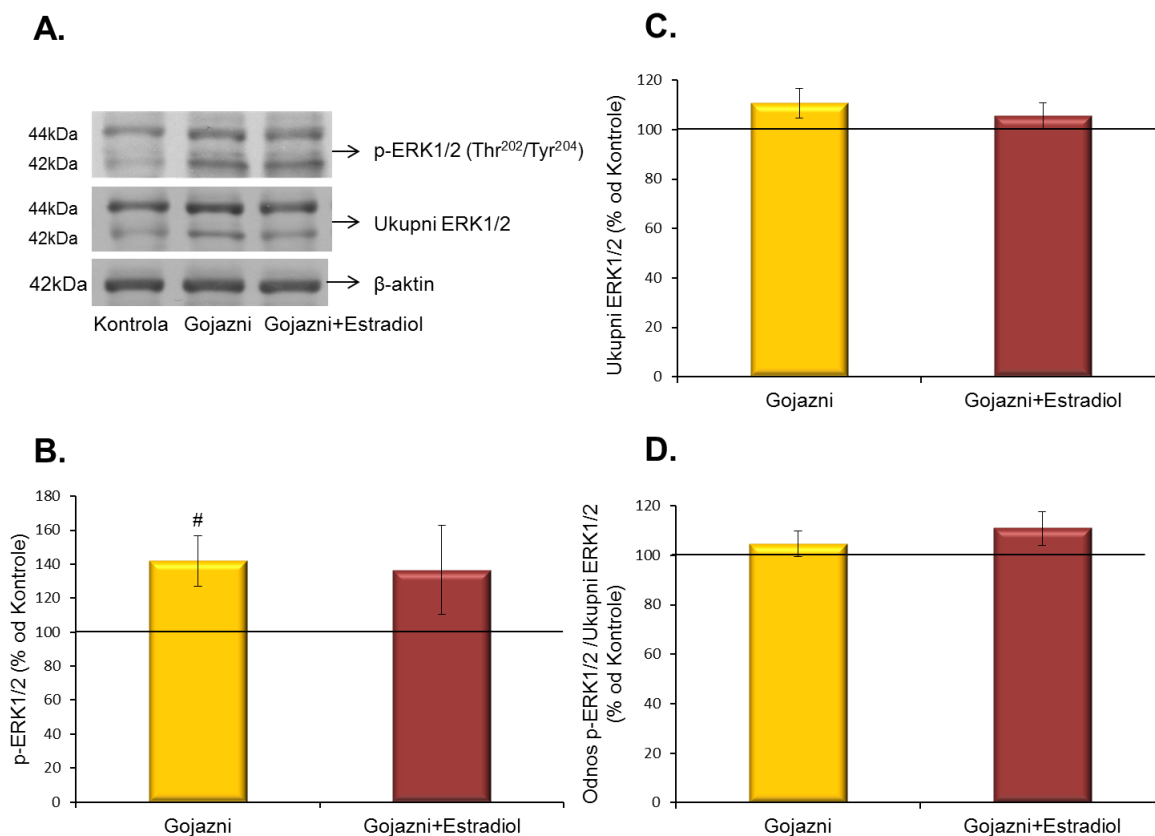


**Slika 25.** Efekat estradiola na nivo fosforilacije Akt na amino kiselinu Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt proteina u srcu gojaznih pacova tretiranih estradiolom. **A.** Reprezentativni western blot Akt fosforilacije; **B.** Nivo fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> (p-Akt); (n = 6). **C.** Nivo ukupnog Akt (Ukupni Akt); (n = 6). **D.** Odnos vrednosti p-Akt i ukupnog Akt (p-Akt/Ukupni Akt); (n = 5). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni \*p<0,05; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola ### p<0,001).

#### 4.3.8.2. Fosforilacija i nivo proteina za ERK1/2 kinazu pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih pacova

Efekti koje estradiol ostvaruje na ERK1/2 kinaze u srcu gojaznih pacova analiziran je određivanjem nivoa fosforilacije ERK1/2 na amino kiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, nivoa ukupnog ERK1/2 proteina, kao i iz odnosa fosforilisane forme ERK1/2 i njegovog ukupnog proteina. Rezultati prikazani na **Slici 26.** (A-D) pokazuju da tretman estradiolom nije doveo do statistički značajnih promena u nivou fosforilacije (Gojazni =  $142 \pm 15\%$ , Gojazni+Estradiol =  $136 \pm 26\%$ ) i ekspresije ukupnog ERK1/2 kod gojaznih pacova u

odnosu na netretirane gojazne pacove (Gojazni =  $111 \pm 6\%$ , Gojazni+Estradiol =  $105 \pm 5\%$ ). Odnos fosforilisane forme ERK1/2 i ukupne ERK1/2 pokazao je da tretman estradiolom ne dovodi do statistički značajnih razlika ove vrednosti kod gojaznih pacova u odnosu na gojazne pacove koji nisu tretirani estradiolom (Gojazni =  $105 \pm 5\%$ , Gojazni+Estradiol =  $111 \pm 7\%$ ).



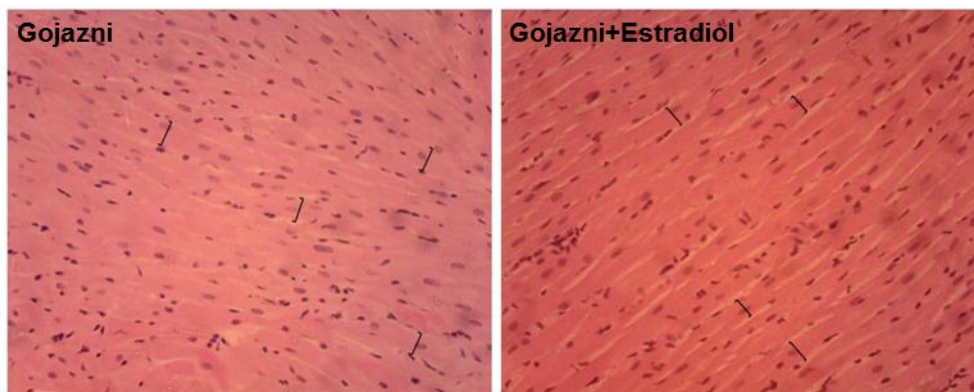
**Slika 26. Efekti estradiola na regulaciju fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> i ukupnog ERK1/2 proteina u srcu gojaznih pacova. A.** Reprezentativni western blot ERK1/2 fosforilacije; **B.** Nivo fosforilacije ERK 1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (p-ERK1/2); (n = 7). **C.** Nivo ukupnog ERK1/2 (Ukupni ERK1/2); (n = 7). **D.** Odnos p-ERK1/2 i ukupnog ERK1/2 (p-ERK1/2 /Ukupni ERK1/2); (n = 5). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontrola<sup>#</sup> p<0,05).

#### 4.3.9. Uticaj estradiola na transverzalni dijametar kardiomiocita gojaznih pacova

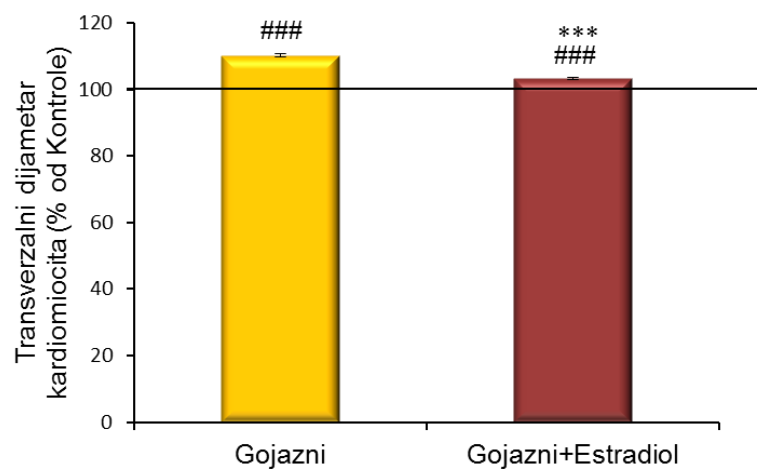
Rezultati merenja transverzalnog dijametra kardiomiocita gojaznih pacova tretiranih estradiolom, u nivou jedra su prikazani na **Slici 27. A i B.** Iz prikazanih rezultata jasno se

može uočiti da tretman estradiolom dovodi do statistički značajnog smanjenja transverzalnog dijametra kardiomiocita kod gojaznih pacova u odnosu na gojazne, netretirane životinje (Gojazni =  $110,1 \pm 0,5\%$ ; Gojazni+Estradiol =  $103,2 \pm 0,3\%$ ;  $***p < 0,001$ ).

**A.**



**B.**



**Slika 27. Efekat estradiola na transverzalni dijamentar kardiomiocita gojaznih pacova.** **A.** Uporedni prikaz transverzalnih dijametara kardiomiocita na isečcima tkiva srca. **B.** Rezultati dobijeni merenjem transveralnog dijametara kardiomiocita u nivou jedra ( $n = 300$ ) su izraženi kao procenat u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (Kontrola = 100%) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost  $\pm$  SEM (Gojazni+Estradiol prema Gojazni  $***p < 0,001$ ; Gojazni, Gojazni+Estradiol prema Kontroli  $###p < 0,001$ ).

## 5. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija zasnovana je na hipotezi da estradiol *in vivo* utiče na morfologiju ćelija srca i reguliše aktivnost i ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze mehanizmom koji uključuje učešće Akt i ERK1/2 u srcu normalnih pacova. Takođe je postavljeno da u patofiziološkim stanjima kao što je stanje gojaznosti, često združeno sa IR (Gomez-Perez i sar., 2008; Riant i sar., 2009), u kojem su aktivnost i ekspresija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze smanjene (Iannello i sar., 1994; Iannello i sar., 2007), a hipertrofija ćelija srca izražena (Rajapurohitam i sar., 2003; Ouwens i sar., 2005; Leopoldo i sar., 2010), estradiol dovodi do povećanja aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i ublažavanja hipertrofije ćelija srca. Do sada su izučavani *in vitro* efekti estradiola na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Isenovic i sar., 2002; Sudar i sar., 2008) na različitim ćelijskim linijama (Li i sar., 2011; Gracelli i sar., 2012) i kulturama (Sudar i sar., 2008; Laube i sar., 2011), dok su njegovi efekti na morfologiju ćelija srca, kako u normalnim tako i u patofiziološkim uslovima, nedovoljno dokumentovani u literaturi. Takođe, ne postoje podaci koji povezuju promene u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze sa promenama u morfologiji ćelija srca pod delovanjem estradiola u normalnim i patofiziološkim uslovima. Nedovoljno je poznato nekoliko ključnih pitanja u *in vivo* efektima estradiola u mehanizmima njegovog delovanja na regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologiju srca. Stoga su za proučavanje uloge: Glu, INS, CRP, DLIF, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, SMK, fosfolipida, aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, Akt i ERK1/2 i njihovih međusobnih odnosa u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologije srca, pod *in vivo* delovanjem estradiola u okviru ove doktorske disertacije korišćeni eksperimenti koji su obuhvatili tretmane normalno uhranjenih i gojaznih pacova estradiolom u dozi od 40µg/kg injeciranom 24 sata pre žrtvovanja.

Takođe, ne postoje literaturni podaci koji povezuju *in vivo* efekte estradiola na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu i morfologiju srca sa aktivnošću Akt i ERK1/2, stoga je takođe jedan od

ciljeva ove doktorske disertacije bio i izučavanje povezanosti aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologije srca, sa efektima estradiola na aktivaciju Akt/ ERK1/2 signalnog puta u srcu normalnih i gojaznih pacova.

Za izučavanje gore navedenih parametara u okviru ove doktorske disertacije korišćeni su mužjaci Wistar pacova, kako bi se izbegle cirkardijalne varijacije nivoa estradiola. Osim toga korišćenje ženki pacova zahteva bilateralnu ovarijektomiju, čime se uklanja endogeni estradiol i sledstveno dovodi do razvoja IR, gojaznosti, inflamacije i različitih kardiovaskularnih komplikacija (Kumagai i sar., 1993; Wagner i sar., 1998; Hao i sar., 2010; Stubbins i sar., 2012; Handgraaf i sar., 2013; Zhu i sar., 2013). Takođe, pokazano je da tretman mužjaka pacova estradiolom smanjuje remodelovanje srca (Gardner i sar., 2010), a da su ženke pacova zaštićene od bolesti srca jer njihove ćelije poseduju zaštitni fenotip.

Doza apliciranog estradiola je izabrana na osnovu naših ranijih eksperimenata (Koricnac i sar., 2011), kao i literaturnih podataka drugih autora (Barbacanne i sar., 1999; Ren i sar., 2003; Wu i sar., 2008). Poznato je da estradiol dovodi do morfoloških promena u srcu (Gardner i sar., 2010; Janicki i sar., 2013) i da je 24 sata nakon *in vivo* aplikacije postignuta dovoljna kocentracija estradiola u cirkulaciji da ostvari kardioprotektivne efekte (Duncan i sar., 2002). Stoga su nakon 24 sata životinje žrtvovane.

### **5.1. *In vivo* efekti estradiola na regulaciju $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologiju srca pacova**

Za izučavanje *in vivo* efekata estradiola u fiziološkim uslovima, koji svojim delovanjem ostvaruje kardioprotektivne efekte, u okviru ove doktorske disertacije korišćene su dve grupe pacova uhranjenih standardnom laboratorijskom hranom tokom 10 nedelja, i 24 sata pre žrtvovanja pacovima iz jedne grupe davan je estradiol intraperitonealno, dok je pacovima iz druge grupe davana ista količina 1% etanola u fiziološkom rastvoru. Radi utvrđivanja efekata estradiola na morfologiju srca u normalnim fiziološkim uslovima upoređivane su mase srca, odnosi mase srca i mase tela pacova, transverzalni dijometri kardiomiocita i koncentracije ukupnih proteina u lizatima srca. Vrednosti mase srca, odnosa mase srca i mase tela pacova (**Tabela 1.**), kao i transverzalni dijometri kardiomiocita (**Slika 7. A i B**) nisu se značajno razlikovale kod pacova tretiranih estradiolom u odnosu na netretirane pacove, što ukazuje da estradiol u fiziološkim

uslovima ne dovodi do značajnih promena u morfologiji ćelija srca. Međutim, tretman estradiolom doveo je do statistički značajnog povećanja ukupne koncentracije proteina u lizatima izolovanih srca pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima (**Tabela 1.**), što je u saglasnosti sa podacima iz literature, koji pokazuju da estradiol svojim delovanjem dovodi do povećanja ekspresije različitih proteina u srcu (Liu i sar., 2007; Tepavcevic i sar., 2011).

Mnogobrojni literaturni podaci ukazuju na važnost regulacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u različitim patološkim stanjima srca (Shamraj i sar., 1993; Schwinger i sar., 2003; Liu i sar., 2012). Tokom hipertrofije srca dolazi do smanjenja ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Zahler i sar., 1996; Schwinger i sar., 2003), što može da dovede do ozbiljnijih komplikacija poput srčane insuficijencije (Norgaard i sar., 1988; Schwinger i sar., 2003; Nadal-Ginard i sar., 2003). Nedavno su Liu i saradnici pokazali da smanjenje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u tkivu srca, indukovano marinobufageninom, dovodi do aktivacije apoptotičnog puta u kardiomiocitima i njihove smrti, što za posledicu ima razvoj hipertrofije (Liu i sar., 2012). Kardioprotektivne efekte estradiol ostvaruje i regulacijom aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u KVS (Dzurba i sar., 1997; Isenovic i sar., 2002; Li i sar., 2011). U našim eksperimentima smo pokazali da tretman pacova estradiolom dovodi do značajnog povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 1.**) i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 2. B**) u srcu pacova. Takođe smo pokazali da estradiol dovodi do značajnog povećanja nivoa fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na aminokiselinskom ostatku  $\text{Ser}^{23}$ , kao i vrednosti odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne pacove (**Slika 2. A i C**). Imunohistohemijским bojenjem tkiva srca se uočava da je imunoreaktivnost na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu membranskog tipa (**Slika 3. i 4.**), što ukazuje da je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza više zastupljena na plazma membranama kardiomiocita, kao i da ne postoji značajna razlika u intezitetu bojenja u obe eksperimentalne grupe. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa našim ranijim radovima u kojima smo pokazali da tretman ćelija *in vitro* estradiolom dovodi do značajnog povećanja ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Sudar i sar., 2008). Radovi drugih autora takođe ukazuju da estradiol pozitivno reguliše aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Tako su, Laube i saradnici (2011) pokazali da estradiol *in vitro* utiče na značajno povećanje aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, u epitelnim ćelijama alveola izolovanim iz fetusa pacova, Palacios i saradnici (2004) da estradiol *in situ* dovodi do povećanja ekspresije  $\alpha 2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i iRNK  $\alpha 2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPaze u aorti izolovanoj iz mužjaka pacova, a Dzubra i saradnici (1997) da tretman ovarijektomisanih ženki pasa estradiolom dovodi do značajnog povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Nedavno su Gracielli i saradnici (2012) ispitivali *in vivo* efekte estradiola na ekspresiju i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u kori bubrega ovarijektomisanih ženki pacova Wistar soja i pokazali da su aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i ekspresija  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze vraćeni na isti nivo kao kod kontrolnih pacova, za razliku od ovarijektomisanih netretiranih ženki kod kojih su oba ova parametra značajno smanjena u odnosu na kontrolu (Gracelli i sar., 2012). Takođe, *in vitro* eksperimenti u istoj studiji (Gracelli i sar., 2012) su pokazali da tretman ćelija estradiolom u toku 24 sata, dovodi do značajnog povećanja ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put ukazuju da estradiol davan mužjacima pacova u fiziološkim uslovima povećava aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu i na taj način ispoljava kardioprotektivne efekte. Brza promena aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze koja nastaje pod uticajem različitih hormona ili faktora sredine ukazuje na postojanje mehanizma brze regulacije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Pokazano je da pod uticajem hormona dolazi do brze translokacije novosintetisanih subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze iz citoplazme na membranu i povećanja njene aktivnosti (Hundal i sar., 1992; Al-Khalili i sar., 2003; Al-Khalili i sar., 2004; Efendiev i sar., 2007). Takođe je pokazano da kardijačni glikozidi u malim koncentracijama, nakon vezivanja za vanćelijski deo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze mogu da iniciraju signalnu kaskadu unutar ćelije aktivacijom inozitol 1,4,5-trisfosfat receptora na endoplazmatskom retikulumu (Aizman i sar., 2001; Aperia 2007) ili Src kinaze (Tian i sar., 2006). Direktna fosforilacija i defosforilacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze koje su prisutne na membrani posredstvom protein kinaza i fosfataza je dokumentovana u literaturi, ali fosforilacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kao mehanizam regulacije njene aktivnosti još uvek je kontroverzan (Chibalin i sar., 1998; Chibalin i sar., 1999; Therien i Blostein 2000; Fuller i sar., 2013). To ne znači da fosforilacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kao mehanizam regulacije njene aktivnosti nema fiziološku značajnost, već ukazuje na postojanje mnogo kompleksnijeg mehanizma njene regulacije. S obzirom da mnogi hormoni utiču na aktivnost protein kinaza i fosfataza, reverzibilna fosforilacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze može predstavljati još jedan način regulacije njene aktivnosti.

U cilju izučavanja *in vivo* efekata estradiola na aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, u daljem radu nas je interesovalo da li estradiol svojim delovanjem dovodi do promena u koncentraciji DLIF i koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona u plazmi i serumu pacova.

DLIF su potentni endogeni kardijačni steroidi i predstavljaju inhibitore aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Vezivanjem DLIF za vanćelijski deo  $\alpha$  subjedinice na mestu gde se vezuje  $\text{K}^+$  dovodi do blokiranja transporta jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , što za uzrok ima narušavanje asimetrične distribucije  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u i van ćelije. U cilju uspostavljanja normalnog rada srca digoksin se često prepisuje u terapiji kod pacijenata koji imaju kongestivnu srčanu insuficijenciju, kao i pacijenata sa nekim tipovima aritmija srca (Gheorghide i sar., 1995; Group 1997). Budući da ima pozitivan inotropni efekat i da visoke doze povećavaju smrtnost kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom digoksin se daje u niskim dozama (Rathore i sar., 2003). Kardijačni glikozidi i endogeni kardiotonični steroidi nakon vezivanja za  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu u veoma malim koncentracijama dovode do aktivacije signalnih puteva (Aperia 2007; Bagrov i sar., 2009). Merenjem koncentracije DLIF u plazmi u našim eksperimentima pokazano je da *in vivo* tretman estradiolom dovodi do značajnog smanjenja koncentracije DLIF u odnosu na kontrolne vrednosti (**Tabela 2.**). U nedostatku literaturnih podataka koji ukazuju na uticaj estradiola na koncentraciju DLIF, može se pretpostaviti da davanje estradiola dovodi do smanjenja sinteze DLIF na taj način što estradiol smanjuje koncentraciju holesterola, zajedničkog prekursora za sintezu kako DLIF (Lichtstein i sar., 1998; Bagrov i sar., 2009), tako i estradiola. Imajući u vidu da je osnovna uloga  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze izbacivanje  $\text{Na}^+$  iz ćelije, a ubacivanje  $\text{K}^+$  u ćeliju, što je neophodno za normalno odvijanje procesa u ćeliji, u daljem radu smo merili nivo  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  pod delovanjem estradiola. Dobijeni rezultati pokazuju da je tretman estradiolom značajno smanjio nivo  $\text{Na}^+$ , dok nije doveo do promena koncentracije  $\text{K}^+$  u serumu pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima (**Tabela 2.**). S obzirom, da sledeći rezultati pokazuju da su aktivnost i ekspresija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze značajno povećane kod pacova tretiranih estradiolom, a da su koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u okviru referentnih vrednosti (referentne vrednosti za Wistar pacova:  $\text{K}^+ = 5,2-7,8 \text{ mM}$ ,  $\text{Na}^+ = 141-150 \text{ mM}$ ), zajedno ovi rezultati ukazuju da nije narušena homeostaza  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona, kao i da je malo sniženje koncentracije  $\text{Na}^+$  kod pacova tretiranih estradiolom možda odgovor na stres.

Estradiol utiče na aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze aktivacijom višestrukih signalnih puteva kao što su Akt, PKA, PKC i ERK 1/2 (Ewart i Klip, 1995; Isenovic i sar., 2003; Levin 2005; Sudar i sar., 2008). Međutim, retki su radovi u kojima je pokazan da estradiol dovodi do aktivacije i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze estradiolom, signalnim putem koji uključuje PI3K i Akt (Isenovic i sar., 2002; Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008) u srcu. Aktivacija PI3K/Akt signalnog puta je bitna za ostvarivanje efekta estradiola u srcu,



što je i pokazano u našim ranijim radovima (Koricanac i sar., 2009), kao i radovima drugih autora (Camper-Kirby i sar., 2001; Patten i sar., 2004). Izučavajući *in vivo* efekte estradiola u okviru ove doktorske disertacije pokazali smo da ne dolazi do statistički značajnih promena u nivou ekspresije ukupnog Akt proteina u srcu (**Slika 5. C**), što je u saglasnosti sa našim ranijim radovima (Koricanac i sar., 2009). Međutim, estradiol dovodi do aktivacije signalnog puta koji uključuje fosforilaciju i aktivaciju PI3K, a potom i PDK1 kinaze koja fosforiliše Akt na aminokiselinskom ostatku Thr<sup>308</sup> što je polovično aktivira (Alessi i Cohen, 1998; Manning i Cantley, 2007). Za potpunu aktivaciju Akt neophodna je fosforilacija i na drugom aminokiselinskom ostatku Ser<sup>473</sup> (Alessi i Cohen, 1998; Sarbassov i sar., 2005). Potpuna aktivacija Akt dovodi do fosforilacije različitih supstrata u citoplazmi i jedru, koji potom regulišu različite ćelijske procese (Hemmings i Restuccia, 2012). Tako da smo u daljem radu izučavali efekte estradiola na aktivnost Akt, određivanjem fosforilacije Akt na aminokiselinskom ostatku Ser<sup>473</sup>, i dobijeni rezultati pokazuju da estradiol dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa fosforilacije Akt na amino kiselinu Ser<sup>473</sup>, u poređenju sa fosforilacijom Akt u grupi netretiranih pacova (**Slika 5. B i D**). Ovako dobijeni rezultati su u saglasnosti sa našim ranijim radovima (Isenovic i sar., 2003; Sudar i sar., 2008), kao i radovima drugih autora (Ren i sar., 2003; Sovershaev i sar., 2006). *In vitro* tretman kardiomiocita estradiolom ili genestinom povećava nivo fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) u jedru (Camper-Kirby i sar., 2001; Huang i Kaley, 2004). Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu koju Akt, aktivirana pod delovanjem estradiola ima u srcu, tj. u regulaciji funkcije i preživljavanja ćelija srca (Huang i Kaley 2004; Matsui i Rosenzweig 2005).

Pored Akt, pokazano je da su i ERK1/2 kinaze uključene u regulaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Al-Khalili i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008; Lei i sar., 2008) i da je za punu aktivnost ERK1/2 kinaza neophodna fosforilacija na aminokiselinskim ostacima Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (Payne i sar., 1991; Kehat i Molkenin, 2010). U ranijim eksperimentima u kojima smo koristili PD98059, specifični inhibitor ERK1/2, pokazali smo da dolazi do smanjenja aktivnosti Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze, što ukazuje da su ERK1/2 uključene u signalni put regulacije Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze (Isenovic i sar., 2004). Kasnije smo pokazali da estradiol *in vitro* dovodi do povećanja fosforilacije ERK1/2, što je u korelaciji sa povećanjem ekspresije  $\alpha$ 1 subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Sudar i sar., 2008). Al-Khalili i saradnici (2003) su pokazali da nakon aktivacije ERK1/2 kinaza dolazi do fosforilacije  $\alpha$  subjedinice Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze u citoplazmi što dovodi do translokacije ove pumpe na plazma

membranu. Međutim, ovi rezultati po prvi put ukazuju na *in vivo* efekat estradiola na ERK1/2 kinaze, kao i povezanost aktivnosti ERK1/2 sa aktivnošću i ekspresijom Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze kod mužjaka pacova. Pokazali smo da estradiol dovodi do značajnog povećanja fosforilacije ERK1/2 na amino kiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, kao i da je odnos fosforilisane forme ERK1/2 i ukupnog ERK1/2 proteina značajno povećan, u poređenju sa kontrolnim pacovima, dok je bazalni, odnosno ukupni nivo ERK1/2 kinaza ostao nepromenjen (**Slika 6. A-D**). Dobijeni rezultati ukazuju da je aktivacija obe kinaze Akt i ERK1/2, neophodan korak u ostvarivanju efekata estradiola na povećanje aktivnosti i membranskog sadržaja Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu pacova. Iako se Akt i ERK1/2 kinaze aktiviraju različitim signalnim putevima i učestvuju u različitim ćelijskim procesima u fiziološkim uslovima, u našim ranijim eksperimentima (Isenovic i sar., 2004; Isenovic i sar., 2009), kao i u radovima drugih autora (Campbell i sar., 2004; Deschamps i Murphy, 2009; Niba i sar., 2013) je pokazano da su u ostvarivanju svojih efekata Akt i ERK1/2 kinaze povezane i da specifična inhibicija jedne kinaze umanjuje efekat druge. Ovi podaci dodatno usložnjavaju signalne puteve delovanja estradiola u ćeliji i takođe ukazuju na kompleksnost mehanizma regulacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, pod delovanjem estradiola preko signalnog puta u kome su jedni od aktera Akt i ERK1/2.

## **5.2. Promene u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologije srca u eksperimentalnim uslovima gojznosti i insulinske rezistencije**

Sledeća serija eksperimenata bila je usmerena na izučavanja promena u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologije srca pacova koji su bili na ishrani bogatoj mastima. Ishrana obogaćena mastima, priznat je metod razvoja gojznosti združene sa IR, koja dovodi do kompleksnih i multifaktorijalnih posledica u KVS (Woods i sar., 2003; Aguila i Mandarim-de-Lacerda 2003; Buettner i sar., 2006). Još su Samuels i saradnici (1942) uočili da se kod pacova hranjenih hranom kod koje 70% energije potiče od masti razvija gojznost, praćena brojnim komplikacijama, a Masek i Fabry su 1959 uveli termin HF ishrana (Masek i Fabry 1959; Buettner i sar., 2006). U literaturi postoji veliki broj različitih tipova HF ishrane u kojima se koriste masti biljnog ili životinjskog porekla, dok udeo masti varira između 20–60% (Buettner i sar., 2007). Način pripremanja nebalansirane hrane bogate mastima može podrazumevati zamenu ugljenih hidrata ili proteina mastima, ili jednostavno dodavanjem masti standardnoj laboratorijskoj hrani

(Buettner i sar., 2007). Eksperimenti u okviru ove doktorske disertacije dizajnirani su na modelu gojaznosti. Merenjem telesnih masa na početku eksperimenta i nakon 10 nedelja, ustanovili smo da primenjeni režim HF ishrane dovodi do razvoja gojaznosti. Finalne mase tela, izmerene neposredno pre žrtvovanja su bile veće kod gojaznih pacova, ali se nisu statistički značajno razlikovale, za razliku od razlike finalne i inicijalne mase koje su bile statistički značajno veće kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne, što je potvrda da je primenjen režim HF ishrane sa 42% masti, u našim eksperimentima indukovao razvoj gojaznosti (**Tabela 3.**).

Pored razvoja gojaznosti i IR, HF ishrana indukuje razvoj brojnih patofizioloških komplikacija kao što su bolesti srca. Naime, u stanju gojaznosti postepeno dolazi do različitih promena u srcu, kao što su promene u intersticijalnom tkivu, uključujući vezivno tkivo i krvne sudove gde dolazi do nakupljanja lipida, povećanja kolagenih vlakana i proliferacije fibroblasta, dok u kardiomiocitima dolazi do pojave vakuolizacije citoplazme, odsustva i/ili dezorganizacije miofilamenata, proširenja sarkoplazmatskog retikuluma, promena na mitohondrijama (Abel i sar., 2008; Leopoldo i sar., 2010). Sve ove promene dovode do strukturnih i funkcionalnih promena u srcu, koje dovode do pojave ishemijske kardiomiopatije, a koje se u početnoj fazi manifestuju hipertrofijom kardiomiocita LK (Abel i sar., 2008; Gray i Kim, 2011). Pokazano je da kod Wistar pacova koji su sedam nedelja bili na HF ishrani sa 50,4% masti, dolazi do razvoja gojaznosti i hipertrofije srca (Ouwens i sar., 2005). Do sličnih rezultata došli su Leopoldo i saradnici (2010), koji su Wistar pacove podvrgnuli HF ishrani sa 42,5% masti u trajanju od 15 nedelja. Radi utvrđivanja uticaja gojaznosti na razvoj patoloških stanja srca gojaznim pacovima kao i pacovima iz kontrolne grupe, merili smo mase srca, određivali odnose mase srca i tela pacova, merili transverzalne dijometre kardiomiocita i koncentraciju ukupnih proteina u lizatima izolovanih srca. Mase srca (**Tabela 3.**) i transverzalni dijametar kardiomiocita (**Slika 17.**) značajno su povećani kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne, dok se odnosi mase srca i tela pacova nisu značajno razlikovali (**Tabela 3.**). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da HF ishrana i gojaznost združena sa IR dovode do hipertrofije LK srca (Ouwens i sar., 2005; Leopoldo i sar., 2010; Tian i sar., 2012) i razvoja hipertenzije, usled sistemske i lokalne aktivacije sistema renin-angiotenzin. To za posledicu ima hronično oslobađanje angiotenzina II (ANG II), hormona koji deluje kao vazokonstriktor, inicijator rasta i inflamacije (de Kloet i sar., 2010; Kotsis i sar., 2010; Ha i sar., 2011), što dodatno utiče na nastanak hipertrofije srca. Određivanjem

ukupne koncentracije proteina u lizatima izolovanih srca pacova pokazali smo da su koncentracije proteina značajno povećane kod gojaznih pacova u poređenju sa kontrolnim (**Tabela 3.**). Ovakav rezultat se može dovesti u vezu sa razvojem hipertrofije srca koju prati povećana ekspresija strukturnih proteina (Rajapurohitam i sar., 2003). Rajapurohitam i saradnici (2003) su u *in vitro* eksperimentima na kardiomiocitima pokazali da leptin, koji je značajno povećan u stanju gojaznosti, dovodi do razvoja hipertrofije kardiomiocita i do značajnog povećanja ekspresije  $\alpha$ -aktina i miozina. Osim toga pokazali smo da je nivo leptina, u serumu, kod gojaznih pacova bio značajno povećan u poređenju sa normalno hranjenim pacovima (**Tabela 4.**).

Više puta je naglašeno da je gojaznost često združena sa IR. U fiziološkim uslovima INS nakon vezivanja za svoj receptor aktivira nishodnu signalnu kaskadu, odnosno fosforilaciju signalnih proteina, poput PI3K i Akt (Abel i sar., 2012). Potom, dolazi do Akt-indukovane translokacije GLUT transportera iz unutarćelijskih depoa do plazma membrane što omogućava ulazak Glu u ćelije (Bertrand i sar., 2008). Međutim, u stanju gojaznosti dolazi do smanjenja senzitivnosti ćelija na INS, tako da pankreas pojačano luči INS kako bi se postigle fiziološke funkcije, što tokom dužeg vremenskog perioda dovodi do poremećaja funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa i nastanka IR (Morisco i sar., 2006). U našim eksperimentima smo pokazali da ishrana bogata mastima dovodi do značajnog povećanja koncentracije Glu i INS u serumu gojaznih pacova u odnosu na koncentracije u serumu kontrolnih životinja (**Slika 8. A i B**), što je u skladu sa našim ranijim rezultatima (Sudar 2011), kao i rezultatima drugih autora (Riant i sar., 2009; Akamine i sar., 2010; Yonezawa i sar., 2012). Pored koncentracije Glu i INS računali smo indekse HOMA-IR i HOMA- $\beta$  kako bi smo potvrdili da je došlo do razvoja IR. Statistički značajno povećanje u vrednostima HOMA-IR ukazuje da je došlo do smanjenja senzitivnosti ćelija na INS kod gojaznih pacova, dok povećanje HOMA- $\beta$  ukazuje na smanjenje sposobnosti  $\beta$  ćelija pankreasa da luče INS (**Slika 8. C i D**) i ovi rezultati su u saglasnosti sa našim ranijim rezultatima (Sudar, 2011), kao i rezultatima drugih autora (Chen i sar., 2010; Wilson i Islam, 2012; Beaudry i sar., 2013; Gomez-Perez i sar., 2008).

Iako se razgradnjom SMK stvara više molekula ATP po gramu supstrata u odnosu na Glu ili laktat, Glu i laktat proizvode više ATP po molu kiseonika (Shiojima i Walsh, 2006; Chaanine i Hajjar, 2011), što je posebno bitno u stanjima ishemije srca, kada je nivo dostupnog kiseonika ograničen (Chaanine i Hajjar, 2011). Odnos koncentracije SMK i Glu kao supstrata za proizvodnju ATP u srcu zavisi od više faktora kao što su: energetske

potrebe srca, koncentracije supstrata u cirkulaciji, dostupnog kiseonika i hormona (Pulakat i sar., 2011). Srce se brzo prilagođava na fluktuacije u koncentraciji dostupnih supstrata, na različite načine što mu omogućava metaboličku fleksibilnost tokom povećane fizičke aktivnosti, prekomerne ishrane i gladovanja (Gertz i sar., 1988; Wisneski i sar., 1990; Abel i sar., 2012) ali i patoloških stanja poput gojaznosti (Pulakat i sar., 2011). Koncentracija SMK u cirkulaciji je strogo regulisana i predstavlja balans između SMK nastalih razgradnjom Tg u masnom tkivu posredstvom lipaze, i sinteze SMK preko glicerolfosfat aciltransferaze (Bing i sar., 1954; Rider i sar., 2013). Tokom gladovanja ili prekomerne fizičke aktivnosti snadbevanje ćelija Glu je smanjeno, što dovodi do hormonske aktivacije lipaze, povećanja koncentracije SMK u krvi i povećanog preuzimanja SMK od strane kardiomiocita (Bing i sar., 1954; Lopaschuk i sar., 1994; Rider i sar., 2013). SMK i Glu ulaze u kardiomiocite preko membranskih proteina (McArthur i sar., 1999). Mehanizam preuzimanja SMK u kardiomiocitima je posredovan SMK translokazom CD36 (FAT/CD36: *engl. Fatty Acid Translocase CD36*) (Luiken i sar., 1997; Luiken i sar., 2003) i SMK vezujućim proteinima na plazma membrani (Pulakat i sar., 2011). Međutim za razliku od Glu za čiji je ulazak u ćelije neophodan INS, ulazak SMK se dešava i pod uticajem kontrakcija ćelija srca (Luiken i sar., 2003; Pulakat i sar., 2011). Kontrakcije kardiomiocita dovode do translokacije FAT/CD36 i preuzimanja SMK preko aktivirane AMPK kinaze (Luiken i sar., 2003) koje zatim podležu  $\beta$ -oksidaciji (Luiken i sar., 2002). Na ovaj način se preuzimaju SMK poreklom od lipoproteina veoma male gustine (VLDL; *engl. Very-Low-Density Lipoprotein*) (Bharadwaj i sar., 2010). Pored toga, SMK u kardiomiocite mogu da uđu i pasivnim transportom preko hilomikrona (Bharadwaj i sar., 2010). SMK nastale hidrolizom VLDL pomoću lipoprotein lipaze (LpL; *engl. Lipoprotein Lipase*) uglavnom se koriste u stanjima gladovanja, dok SMK nastale LpL–posredovanom hidrolizom hilomikrona se koriste uglavnom u nakon obroka (Pulakat i sar., 2011). U citoplazmi SMK mogu biti podvrgnute  $\beta$ -oksidaciji i proizvodnji ATP ili esterifikaciji do Tg i fosfolipida (Distel i sar., 1992; van der Vusse i sar., 1992). U patološkim stanjima, poput gojaznosti i IR dolazi do smanjenja lipolize, što ima za posledicu povećanje nivoa lipida u plazmi (Abel i sar., 2012). Tokom dijabetesa, usled kombinovanog efekta IR i visoke koncentracije cirkulišućih SMK, miokard skoro isključivo koristi SMK za sintezu ATP (Wall i Lopaschuk 1989; Rider i sar., 2013). Dakle, povećava se metabolizam SMK, a smanjuje metabolizam Glu, što je pokazano u humanim (Koutsari i Jensen 2006) i animalnim studijama (Lopaschuk i Russell 1991; Boudina i sar., 2005; Rider i sar., 2013).

Ovakav sled dešavanja nastaje usled poremećaja metabolizma Glu u stanju gojaznosti i IR, na različitim nivoima kao što su: smanjenje translokacije GLUT transportera na plazma membranu pod uticajem INS, smanjenje glikolize, smanjenje aktivnosti piruvat dehidrogenaze (PDH), što sve dovodi do smanjenja oksidacije Glu (Rider i sar., 2013). Pokazano je da je u stanju dijabetesa (Schroeder i sar., 2008), kao i kod životinja na HF ishrani (Atherton i sar., 2011) smanjena aktivnost PDH. Pored toga, na plazma membranama kardiomiocita, gojaznih Zucker pacova, prisutno je više FAT/CD36 (Distel i sar., 1992; van der Vusse i sar., 1992), u poređenju sa kontrolnim Zucker pacovima (Luiken i sar., 2001). Pošto kod gojaznih Zucker pacova translokacija FAT/CD36 nije posredovana INS, povećanje FAT/CD36 na sarkolemama može se objasniti permanentnom translokacijom FAT/CD36 na membranu u srcu, što takođe omogućava akumulaciju Tg usled povećanog preuzimanja SMK (Coort i sar., 2004). Dakle, u stanjima gojaznosti i IR, kada je smanjena translokacija GLUT posredstvom INS, a povećano prisustvo FAT/CD36 na plazma membrani dolazi do povećanog preuzimanja SMK od strane ćelija (Coort i sar., 2004; Rider i sar., 2013). Povećan nivo leptina u stanju gojaznosti (Considine i sar., 1996), takođe utiče na povećanje metabolizma SMK u miokardu, odnosno smanjenje metabolizma Glu (Rider i sar., 2013). Povećanje oksidacije SMK javlja se nezavisno od promena u signalnom putu INS i regulacije transkripcije posredstvom PPAR $\alpha$  – receptor  $\alpha$  aktiviranim proliferatorom peroksizoma (PPAR $\alpha$  engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$* ), i dovodi se u vezu sa povećanjem FAT/CD36 na plazma membrani (Lopaschuk i sar., 2007).

Određivanjem lipida, odnosno koncentracija HOL, Tg, SMK i fosfolipida u cirkulaciji u našem eksperimentalnom modelu hteli smo da pokažemo da HF ishrana i posledično razvijanje gojaznosti kao i IR, dovode do poremećaja metabolizma lipida i povećane koncentracija u cirkulaciji. Dobijeni rezultati nedvosmisleno ukazuju da je kod gojaznih pacova došlo do narušavanja normalnih vrednosti lipida i do povećanja koncentracije HOL, Tg, SMK i fosfolipida u cirkulaciji u odnosu na kontrole. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima brojnih studija. Tako su Tian i saradnici (2012) pokazali da HF ishrana (66%) dovodi do značajnog povećanja SMK i Tg u krvi, a Kumara i saradnici (2012) da dolazi do značajnog povećanja HOL i Tg u serumu. U studiji Stubbinsa i saradnika (2012) je pokazano da HF ishrana kod ovarijektomisanih ženki miševa dovodi do povećanja koncentracije SMK i Tg u serumu. Takođe, u studiji Sivabalana i saradnika

(2008) je pokazano da HF ishrana dovodi do značajnog povećanja SMK, HOL i Tg u plazmi u odnosu na kontrole.

Povećanje lipida u cirkulaciji vremenom dovodi do smanjene sposobnosti adipocita da skladište velike količine Tg, što za posledicu ima njihovu akumulaciju u drugim tkivima primarno neprilagođenim za skladištenje lipida, poput mišića i jetre (Abel i sar., 2012), ali i srca. Tako je u stanju gojaznosti i IR pokazana pozitivna korelacija između povećane koncentracije SMK i Tg u cirkulaciji i njihovog nakupljanja u miokardu (Lopaschuk i sar., 1994; de Vries i sar., 1997; Miller i sar., 2005; Okere i sar., 2006; Lopaschuk i sar., 2007; Wende i Abel, 2010; Tian i sar., 2012). Dakle, uticaj HF ishrane i razvoj gojaznosti združene sa IR dovodi do brojnih metaboličkih, strukturnih i funkcionalnih promena u srcu (Bugger i Abel, 2009), što je u skladu sa našim rezultatima (**Tabela 3., Slika 8., Slika 17.**). U početnim stanjima IR srce se prilagođava povećanoj koncentraciji Glu i lipida u cirkulaciji tako što povećava ekspresiju gena uključenih u oksidaciju SMK, kao što su PPAR- $\alpha$ , karnitin palmitoiltransferaza (CPT-1, *engl. carnitine palmitoyltransferase*), acil-koenzim A oksidaza i dekupljujući protein 3 (UCP3, *engl. uncoupling protein 3*) (Pagano i sar., 2008). Međutim, u kasnijim fazama povećana hiperglikemija i nastanak hipertenzije dovode do smanjenja ekspresije PPAR- $\alpha$ , i smanjenja oksidacije SMK u srcu (Pulakat i sar., 2011). Pokazano je da u stanju hipertenzije ANG II delujući preko svog receptora angiotenzina tipa 1 (AT1-R), dovodi do IR, i poremećaja metabolizma Glu i lipida (Braga i Leiter, 2009; Iwanami i sar., 2009; Lastra i sar., 2009). Pored toga, akumulacija lipida u tkivima dodatno smanjuje preuzimanje Glu, jer izaziva disfunkciju signalne kaskade INS tako što dovodi do aktivacije PKC $\theta$  kinaze koja inhibira aktivaciju IRS-1 i PI3K, a samim tim smanjuje translokaciju GLUT-4 na membranu (Boden i Shulman, 2002). Takođe, je pokazano da u regulaciji metabolizma Glu i SMK važnu ulogu ima AMPK kinaza (Long i Zierath, 2006; Carling i sar., 2011; Hardie 2011). Pokazano je da je u slučaju smanjene koncentracije metaboličkih supstrata Glu i SMK u cirkulaciji aktivnost AMPK povećana, suprotno tome povećan nivo cirkulišućih supstrata smanjuje aktivnost AMPK (Kraegen i sar., 2006; Saha i sar., 2010). Lindholma i saradnici (Lindholm i sar., 2013) su pokazali da HF ishrana (60% masti) kod mužjaka pacova dovodi do značajnog sniženja aktivnost obe izoforme AMPK ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ) u srcu. Povećanje koncentracije SMK koje smo detektovali u krvi gojaznih pacova (**Slika 10. A**) može se dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom leptina (**Tabela 4.**) kao i povećanjem koncentracije Glu i INS (**Slika 8.**) u cirkulaciji.

Takođe, promene u koncentraciji ostalih lipida (**Slika 9. i Slika 10. B**) i SMK (**Slika 10. A**) zapažene kod gojaznih pacova mogu se dovesti u vezu sa stanjem IR u kome je molekularni mehanizam delovanja INS na regulaciju Glu, SMK i lipida poremećan. Prekomerno nakupljanje lipida u srcu (stetoza) dovodi do lipotoksičnosti, povećanja ćelijskog stresa, smanjene funkcije mitohondrija i apoptoze ćelija (Chiu i sar., 2001; Unger i Orci, 2002; Bugger i Abel, 2008; Kusminski i sar., 2009; Zhang i Ren, 2011). Takođe, promene u signalnom putu INS, koje se dešavaju u stanju gojaznosti mogu dovesti do povećanja rizika od hipertrofije srca, remodelovanja LK ili srčane insuficijencije (Shimizu i sar., 2010; Christopher i sar., 2010). Sve ove promene dovode do strukturnih i funkcionalnih promena u srcu, koje izazivaju razne ishemijske kardiomiopatije, poput hipertrofije LK i srčane insuficijencije (Abel i sar., 2008; Gray i Kim, 2011; Tian i sar., 2012).

Gojaznost se najčešće karakteriše kao poremećaj sa hroničnim inflamatornim statusom i kao takva predstavlja direktan uzrok pojave i razvoja KVB (Wellen i Hotamisligil, 2003; Lehrke i Lazar, 2004). Jedan od pokazatelja nespecifične inflamacije je C-reaktivni protein (CRP) i određivanje njegove koncentracije se najčešće koristi za procenu stanja povreda tkiva ili postojanja inflamacije u organizmu (Pepys i Hirschfield, 2003). U nekim patološkim stanjima srca CRP se može koristiti i kao nezavisan faktor rizika (Elkind i sar., 2006; Katan i Elkind, 2011; Maravic-Stojkovic i sar., 2013). CRP se uglavnom sintetiše u hepatocitima i u akutnim fazama dostiže 100–1000 puta veće vrednosti u odnosu na bazalni nivo (Zhang i sar., 1999; Devaraj i sar., 2009). Pored hepatocita pokazano je da se CRP sintetiše i u glatkim mišićnim ćelijama, makrofagima i endotelnim ćelijama (Calabro i sar., 2003; Ciubotaru i sar., 2005; Venugopal i sar., 2005). Ekspresija CRP je predominantno kontrolisana na nivou transkripcije od strane proinflamatornih citokina IL-6, IL-1 i TNF- $\alpha$ , u jetri (Yudkin i sar., 1999; Pepys i Hirschfield 2003). I u stanju gojaznosti nivo CRP je povećan i predstavlja faktor rizika od nastanka KVB (Choi i sar., 2013), ali tačan mehanizam kojim je uključen u patogenezu KVB još nije potpuno razjašnjen. Međutim, pokazano je da CRP ima ulogu u razvoju endotelne disfunkcije, tako što povećava ekspresiju adhezionih molekula, kao i potentnog endogenog vazokonstriktora endotelina-1 (Pasceri i sar., 2000). Takođe, je pokazano da CRP povećava ekspresiju AT1-R na površini glatkih mišićnih ćelija vaskulature (Verma i sar., 2003; Wang i sar., 2003). Podaci iz literature ukazuju da su u stanju gojaznosti povećane koncentracije leptina i CRP u nezavisnoj korelaciji. Ipak leptin *in vitro* dovodi



do produkcije CRP u hepatocitima i endotelnim ćelijama, a CRP može da se veže za leptin i na taj način umanju njegovu aktivnost (Chen i sar., 2006; Hribal i sar., 2013). Rezultati naših eksperimenata ukazuju da je razvoj gojaznosti združene sa IR, verovatno doveo do razvoja inflamatornih procesa u organizmu, jer je koncentracija CRP u serumu značajno povećana, u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja (**Tabela 4.**). Budući da je kod gojaznih pacova došlo do razvoja hipertrofije srca, i da je stanje gojaznosti često praćeno hipertenzijom, indukovan CRP može predstavljati faktor rizika nastanka i razvoja hipertrofije srca. Takođe, pošto je pokazano da leptin može da deluje na produkciju CRP u hepatocitima (Chen i sar., 2006; Hribal i sar., 2013), stoga se povećana koncentracija CRP u našim eksperimentima (**Tabela 4.**) može dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom leptina, detektovanom kod gojaznih pacova (**Tabela 4.**).

Literaturni podaci ukazuju da gojaznost praćena hiperglikemijom i hiperinsulinemijom utiče na smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Iannello i sar., 1994; Iannello i sar., 2007; Galuska i sar., 2009). Inaello i saradnici (2007) su pokazali da je aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze značajno smanjena u jetri i bubrezima kod genetski gojaznih miševa, a isti trend smanjenja pokazan je i u masnom tkivu čoveka. Galuska i saradnici (2009) su koristeći Wistar ženke pacove koje su bile 4 i 12 nedelja na HF ishrani (55% kalorija poreklom od masti) pokazali da je aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u skeletnim mišićima, značajno smanjena već nakon 4 nedelje. U istoj studiji je pokazano da je ekspresija  $\alpha 1$  subjedinice značajno povećana, dok je ekspresija  $\alpha 2$  i  $\beta 1$  subjedinica značajno smanjena nakon 12 nedelja kod pacova koji su bili na HF ishrani, pri čemu je kod njih došlo do razvoja IR (Galuska i sar., 2009). Ranija istraživanja su pokazala da je u stanju gojaznosti aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze smanjena u jetri i skeletnim mišićima (Bray i Yukimura, 1978; Lin i sar., 1978; Guernsey i Morishige, 1979; Lin i sar., 1981). Međutim, prema našim saznanjima u literaturi ne postoje podaci koji ukazuju da gojaznost izaziva smanjenje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu što za posledicu ima razvoj hipertrofije srca.

Za izučavanje efekata gojaznosti na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ispitivali smo aktivnost, fosforilaciju i ekspresiju ove pumpe, kao i imunohistohemijsko bojenje isečaka srca na ovaj protein. Takođe, smo ispitivali da li su Akt i ERK1/2 kinaze uključene u mehanizme koji dovode u vezu gojaznost sa regulacijom  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Rezultati eksperimenata su pokazali da su kod gojaznih pacova značajno smanjena aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 11.**), ekspresija (**Slika 12. B**) i nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na aminokiselinskom ostatku  $\text{Ser}^{23}$  u odnosu sa kontrolnim pacovima

(**Slika 12. A**). Vrednost odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze smanjena kod gojaznih pacova u odnosu na kontrolne ( $p = 0,06$ ), ali smanjenje nije statistički značajno (**Slika 12. C**). Imunohistohemijsko bojenje isečaka srca na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu, pokazalo je da je lokalizacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, slično kontrolama uglavnom membranskog tipa (**Slika 13. i 14**). Takođe smo pokazali da je odnos fosforilisane forme Akt i ukupnog Akt značajno smanjen kod gojaznih pacova u odnosu na kontrole, dok nije došlo do značajnih promena u nivou fosforilacije Akt na  $\text{Ser}^{473}$  kao i ukupne Akt (**Slika 15.**). Ovakav rezultat može se objasniti upravo nastankom IR pri čemu dolazi do smanjenja aktivnosti Akt, što za posledicu ima redukciju aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih pacova. Naime, INS je jedan od glavnih regulatora aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Al-Khalili i sar., 2003; Chibalin 2007). Al-Khalili i saradnici (2003; 2004) su pokazali da INS povećava sadržaj  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u plazma membrani translokacijom iz citoplazme nakon fosforilacije  $\alpha$ -subjedinica, posredstvom PI3K, PKC i ERK1/2 kinaza. U različitim studijama je pokazano da HF ishrana dovodi do smanjene sposobnosti INS da aktivira unutarćelijske signalne kinaze, kao što je PI3K i Akt, što može doprineti razvoju hipertrofije LK (Mazumder i sar., 2004; Muniyappa i sar., 2007; Lee i sar., 2010), što je u skladu sa našim dobijenim rezultatima (**Tabela 3., Slika 15., Slika 17.**) Takođe, je pokazano da je u stanju hipertenzije i hipertrofije srca snižan nivo fosforilacije Akt, ali i bazalni nivo Akt (Bhuiyan i sar., 2007).

Određivanjem koncentracije DLIF,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  smo izučavali da li gojaznost utiče na promenu njihovih koncentracija i da li se te promene mogu dovesti u vezu sa efektima gojaznosti na morfologiju srca. Merenjem koncentracije DLIF u plazmi smo pokazali da je njegova koncentracija značajno snižena kod gojaznih pacova u odnosu na kontrole (**Tabela 4.**). Retki su literaturni podaci koji pokazuju vezu između koncentracija DLIF u cirkulaciji i gojaznosti. Međutim, u dve odvojene studije je pokazano da je koncentracija DLIF u serumu odnosno plazmi kod gojaznih osoba značajno veća u odnosu na kontrole (Andronico i sar., 1992; Giampietro i sar., 1992), što je i očekivano pošto biosinteza holesterola potiče od holesterola koji je značajno povećan u stanju gojaznosti (Sivabalan i sar., 2008; Kumar i sar., 2012). Međutim, neujednačenost naših rezultata sa literaturnim podacima može se objasniti time što su naše analize rađene na pacovima, ali i time što životinje nisu gladovale pre žrtvovanja. Slično DLIF i koncentracija  $\text{Na}^+$  je značajno snižena kod gojaznih pacova u odnosu na kontrole, dok koncentracija  $\text{K}^+$  nije značajno različita (**Tabela 4.**). Na osnovu radova u kojima je pokazano da hipertenzija koja je često

prisutna u stanju gojaznosti dovodi do smanjenja funkcije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, što za posledicu ima povećanje unutaćelijskog nivoa Na<sup>+</sup> jona (Blaustein i sar., 1986; Herrera i sar., 1988; Sudar i sar., 2008), može se spekulirati da je upravo smanjenje aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze kod gojaznih pacova uzrok umerenog, ali značajnog smanjenja koncentracije Na<sup>+</sup> jona.

U literaturi postoje neslaganja i kontradiktornosti o ulozi ERK1/2 kinaza u regulaciji različitih procesa u ćeliji, što se može objasniti plejotropnim osobinama ERK1/2 kinaza (Kehat i Molkentin, 2010). Naime, regulacija hipertrofije srca ERK1/2 kinazama može zavistiti od dužine i jačine delovanja signala, zatim od trenutka delovanja, interakcija sa drugim signalnim proteinima i unutarćelijske lokalizacije (Kehat i Molkentin, 2010). U kardiomiocitima u odgovoru na različite vrste stresa dolazi do aktivacije ERK1/2 kinaza (Bueno i Molkentin, 2002). Tako je pokazano da do aktivacije ERK1/2 u kardiomiocitima može doći pod uticajem ANG II ili endotelina-1 preko receptora spregnutih sa proteinima G, zatim preko receptora fibroblasta faktora rasta, citokina, slobodnih vrsta kiseonika, kao i prilikom istezanja u stanjima hipertrofije (Kehat i Molkentin, 2010; Tang i sar., 2011). Sve je ovo povezano sa razvojem hipertrofije kardiomiocita u šta su uključene ERK1/2 kinaze (Bueno i sar., 2000; Bueno i Molkentin, 2002; Purcell i sar., 2007). Međutim, u jednoj novijoj studiji je pokazano da aktivirana AMPK kinaza inicira aktivaciju PPAR $\alpha$  što dovodi do inhibicije hipertrofije srca preko aktivacije ERK1/2 kinaza u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Meng i sar., 2011). U *in vitro* eksperimentima u primarnoj kulturi kardiomiocita pacova pokazano je da dolazi do povećanja aktivnosti ERK1/2 kinaza tokom hipertrofije, a takođe je pokazano i da aktivacija ERK1/2 nije neophodna za razvoj hipertrofije srca *in vivo* kod MEK1 nokaut miševa (Bueno i sar., 2000; Kehat i Molkentin, 2010). Moguće objašnjenje za ovu kontradiktornost je u tome što je u *in vivo* uslovima aktivacija ERK1/2 nastaje kao odgovor na određene stimulse, odnosno postoje periodične aktivacije i deaktivacije ERK1/2 kinaza, (Bueno i sar., 2000; Kehat i Molkentin, 2010). Pored toga korišćenjem specifične fosfataze 6 (DUSP6; *engl. DUal-Specificity Phosphatase 6*) koja ERK1/2 defosforiliše (Fjeld i sar., 2000), pokazano je da njegova prekomerna ekspresija DUSP6 u srcu miševa dovodi do skoro potpune inaktivacije ERK1/2, odnosno svođenja na bazalni nivo, čak i nakon stimulacije povećanjem pritiska usled konstrikcije aorte ili pomoću infuzije neuroendokrinih agonista (Purcell i sar., 2007). Čak i u takvoj situaciji, tokom hronične inhibicije ERK1/2 nije došlo do smanjenja hipertrofije srca (Purcell i sar., 2007). U našim eksperimentima smo pokazali da odnos fosforilisane forme ERK1/2 i

ukupnog ERK1/2 nije značajno različit između gojaznih i kontrolnih pacova (**Slika 16. D**), iako je došlo do razvoja hipertrofije srca. Međutim, HF ishrana i razvoj gojaznosti su ipak doveli do značajno povećane fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinskim ostacima Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> u odnosu na aktin (**Slika 16. B**). Ukupni nivo ERK1/2 kinaza je takođe povećan kod gojaznih pacova u odnosu na kontrole ali ovo povećanje nije statistički značajno (**Slika 16. C**). U literaturi su retki podaci koji ukazuju na uticaj gojaznosti na aktivaciju ERK1/2 kinaza u srcu u *in vivo* uslovima. Međutim, Rajapurohitam i saradnici (2003) su u *in vitro* eksperimentima pokazali da tretman kardiomiocita leptinom dovodi do brze aktivacije p38 i ERK1/2 kinaza i posledičnog uvećanja kardiomiocita. U istoj studiji je pokazano da korišćenjem specifičnog inhibitora p38 kinaze SB203580 dolazi do inhibicije hipertrofije kardiomiocita, dok korišćenjem inhibitora ERK1/2 kinaza PD98059, nije došlo do inhibicije hipertrofije (Rajapurohitam i sar., 2003). U novijoj studiji Rajapurohitam i saradnici (2012) su pokazali da *in vitro* tretman kardiomiocita leptinom dovodi do povećanja njihovog dijametra, povećane fosforilacije p38 i ERK1/2 kinaza u citoplazmi, ali i značajnog smanjenja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Takođe je u studiji Beltowskog i saradnika (2004) ja pokazano da tretman pacova leptinom dovodi do smanjenja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u meduli bubrega, ali ne i u kori bubrega u odnosu na kontrolne pacove. Sa druge strane Marcinik i saradnici (2005) su pokazali da kratko vreme nakon tretmana leptinom dolazi do smanjenja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srži bubrega, dok nakon 3 sata do povećanja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. U studiji Kumara i saradnika (2012) je pokazano da je kod gojaznih pacova značajno povećana koncentracija leptina u serumu, dok je aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu i jetri značajno snižena. Shodno prethodno navedenim efektima leptina, smanjenje aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (**Slika 11.** i **Slika 12.**) i povećanje fosforilacije ERK1/2 kinaza u odnosu na aktin (**Slika 16. B**) kod gojaznih pacova u našim eksperimentima može se dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom leptina u cirkulaciji.

U našim ranijim radovima (Isenovic i sar., 2004; Isenovic i sar., 2009), kao i radovima drugih autora (Campbell i sar., 2004) pokazano je da su u ostvarivanju svojih efekata Akt i ERK1/2 kinaze povezane i da specifična inhibicija jedne kinaze umanjuje efekat druge. S obzirom, da je u našim eksperimentima pokazano da je došlo do značajnog smanjenja aktivacije Akt kinaze kod gojaznih pacova, može se zaključiti da je zbog interakcije između Akt i ERK1/2 kinaza, došlo do inhibicije translokacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membranu posredstvom ERK1/2 kinaza. Pored toga, u studiji Khundmiri i

saradnika (2005) je pokazano da aktivacija PKC $\alpha$  kinaze signalnim putem koji uključuje PI3K i ERK1/2 kinaze dovodi do fosforilacije  $\alpha$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na aminokiselinskom ostatku Ser i do inhibicije aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Takođe, razvoj hipertenzije dovodi do hipertrofije srca. Tako je u novijoj studiji Tiana i saradnika (2012) pokazano da HF ishrana i razvoj gojaznosti združene sa IR dovode do povećane ekspresije Ang II i AT1 receptora, što doprinosi razvoju hipertrofije srca. Ovi rezultati mogu se dovesti u vezu sa dobijenim rezultatima u okviru ove doktorske disertacije, ali i sa našim ranije objavljenim rezultatima (Sudar i sar., 2008), kao i radovima drugih autora (Vrbjar i sar., 1999; Vrbjar i sar., 2002) koji pokazuju da razvoj hipertenzije dovodi do funkcionalnih promena Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Pored smanjenja broja aktivnih molekula Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na membranama i smanjenog afiniteta Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze prema Na<sup>+</sup> jonima, u stanju hipertenzije pretpostavlja se da dolazi do konformacionih promena kod Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze koje su već prisutne na membrani ili modifikacija prilikom sinteze novih subjedinica (Vlkovicova i sar., 2005).

### **5.3. Promene u regulaciji Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i morfologije srca pod delovanjem estradiola u srcu gojaznih, insulin rezistentnih pacova**

U poglavljima 4.1.1., 4.1.3., 4.1.5. i 4.1.6. smo pokazali da estradiol davan *in vivo* normalno hranjenim pacovima, ostvaruje svoje efekte kako na regulaciju aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, posredstvom Akt i ERK1/2 kinaza kao i da ne dovodi do promena morfologije srca. U poglavljima 4.2.1., 4.2.6., 4.2.8. i 4.2.9. dobijeni rezultati su pokazali da u stanjima gojaznosti koje je indukovano HF ishranom dolazi do redukcije aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, kao i povećanja dijametra ćelija srca usled redukovane aktivnosti Akt i kao i povećane fosforilacije ERK1/2, za koju je pokazano da ima mitogene efekte kao i da je njena povećana aktivacija, jedan od uzročnika uvećanja ćelija tj. hipertrofije srca (Bueno i sar., 2000; Bueno i Molquentin, 2002; Tang i sar., 2011). U daljem radu nas je interesovalo kako u patofiziološkim stanjima kao što je stanje gojaznosti i IR, u kojem su aktivnost i ekspresija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze smanjene, a hipertrofija ćelija srca izražena, estradiol *in vivo* utiče na aktivnost i ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i dijametar ćelija srca. Gojazni, pacovi su 24 sata pre žrtvovanja tretirani estradiolom i vrednosti dobijene za sve izučavane parametre su poređene sa vrednostima dobijenim za

gojazne životinje kako bi se dobio uvid u efekte koje estradiol ostvaruje u uslovima gojaznosti i IR.

Dosadašnji podaci iz literature o protektivnoj ulozi estradiola na srce u stanjima gojaznosti su retki i uglavnom su izučavani efekti kod ovarijektomisanih ženki različitih vrsta životinja. Tako je pokazano u studiji van Eickelsa i saradnika (van Eickels i sar., 2001) da estradiol smanjuje hipertrofiju srca koja je uzrokovana povećanjem pritiska usled suženja aorte kod ženki miševa. To je u skladu sa našim rezultatima koji ukazuju da tretman estradiolom dovodi do smanjenja mase srca, odnosa mase srca i tela i transverzalnih dijametara kardiomiocita (**Tabela 5.**, **Slika 27.**). Koristeći isti model ovarijektomisanih ženki miševa sa hipertrofijom LK srca Donaldson i saradnici (2009) (Donaldson i sar., 2009) su pokazali da tretman estradiolom dovodi do značajnog smanjenja hipertrofije, i to smanjenjem ekspresije kalcijum/kalmodulin zavisne serin-treonin fosfataze, kalcineurina i smanjenje aktivnosti nishodnog nukleusnog faktora koji aktivira T ćelije (nuclear factor of activated T-cell), za koje je ranije pokazano da imaju važnu ulogu u razvoju hipertrofije (Wilkins i sar., 2004). U studiji Pattena i saradnika (2004) je pokazano da estradiol smanjuje apoptozu kardiomiocita kako u *in vivo* tako i u *in vitro* uslovima kod ženki miševa nakon infarkta miokarda izazvanog ligacijom koronarnih arterija, signalnim putem koji obuhvata učešće PI3K i Akt kinaza. Estradiol u *in vitro* eksperimentima smanjuje hipertrofiju kardiomiocita izazvanu ANG II ili endotelinom-1, i to tako što smanjuje površinu ćelija i smanjuje ekspresiju citoskeletnih proteina (Pedram i sar., 2010).

Molekularni mehanizmi kojima estradiol ostvaruje protektivne efekte na hipertrofiju srcu u stanjima gojaznosti kod mužjaka pacova, nisu do sada izučavani. Našim istraživanjima smo pokazali da je kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom značajno smanjena masa srca kao i odnos mase srca i tela u odnosu na gojazne pacove (**Tabela 5.**), što ukazuje na protektivnu ulogu estradiola. Mase tela, kao i razlike finalne i inicijalne mase tela gojaznih i gojaznih pacova tretiranih estradiolom, nisu se međusobno razlikovale nakon 10 nedelja (**Tabela 5.**), tokom kojih su bili na HF ishrani, što ukazuje na ujednačenost eksperimentalnih uslova među ispitivanim životinjama. Određivanje transverzalnog dijametra kardiomiocita, pokazuje da tretman estradiolom dovodi do umerenog, ali značajnog smanjenja ove vrednosti u odnosu na vrednosti kod gojaznih pacova (**Slika 27.**). Merenjem koncentracije ukupnih proteina u srcu, pokazali smo da estradiol kod gojaznih pacova ne dovodi do značajnih promena u odnosu na gojazne

pacove (**Tabela 5.**). Iako su koncentracije ukupnih proteina značajno povećane kod gojaznih pacova i gojaznih pacova tretiranih estradiolom u odnosu na vrednosti kod kontrolnih pacova (**Tabela 5.**), ipak je tretman estradiolom kod gojaznih pacova doveo do ublažavanja hipertrofije srca. Usled nedostatka podataka vezanih za ekspresiju drugih proteina, ovakav rezultat može se objasniti time što je kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom, došlo do značajnog povećanja aktivnosti i ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, za razliku od gojaznih pacova koji nisu tretirani estradiolom, jer povećana aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze dovodi do relaksacije i smanjenja hipertrofije srca. U prilog ovoj tvrdnji su i rezultati iz studije Pedrama i saradnika (2010) koji su pokazali da estradiol *in vitro* značajno smanjuje ekspresiju strukturnih proteina (aktina) u stanju hipertrofije kardiomiocita izazvane ANG II i endotelinom.

Protektivna uloga estradiola najbolje se ogleda u postojanju razlika između polova u učestalosti gojaznosti, IR, hipertenzije i KVB, pri čemu žene pre menopauze imaju manji rizik od ovih poremećaja u odnosu na muškarce sličnih godina (Barrett-Connor i sar., 2004; Shi i Clegg 2009). Estradiol je svojim delovanjem uključen u regulaciju: senzitivnosti ćelija na INS, transporta Glu, krvnog pritiska i balansa energije (Barrett-Connor i sar., 2004; Barros i Gustafsson, 2011; Handgraaf i sar., 2013). Studije na životinjama su pokazale da nakon ovarijektomije dolazi do povećanja masnog tkiva i lipida u cirkulaciji, smanjenja senzitivnosti ćelija na INS i smanjenja transporta Glu u ćelije, dok dodatak egzogenog estrogena normalizuje ove parametre (Barrett-Connor i sar., 2004). U studiji Manrique i saradnika (2012) je pokazano da nedostatak  $\text{ER}\alpha$  kod ženki miševa dovodi do smanjenja senzitivnosti ćelija na INS na nivou celog organizma, smanjenja transporta Glu u ćelije i povećanja oksidativnog stresa. U istoj studiji je pokazano da je aktivnost signalnih molekula u INS putu smanjena kao što je to slučaj sa Akt kinazom (Manrique i sar., 2012). Gorres i saradnici su pokazali da HF ishrana ovarijektomisanih ženki pacova dovodi do intolerancije na Glu, što je u vezi sa smanjenom ekspresijom  $\text{ER}\alpha$  i GLUT 4 (Gorres i sar., 2011).

Ispitujući efekte estradiola kod gojaznih pacova za koje smo pokazali da su IR pokazali smo da estradiolo ne dovodi do značajnih promena u koncentracijama Glu i INS (**Slika 18. A i B**), niti vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA- $\beta$ , (**Slika 18. C i D**) u odnosu na gojazne pacove. Za razliku od naših rezultata Riant i saradnici (2009) su hornično tretirali estradiolom ovarijektomisane ženke miševa koje su tokom 12 nedelja bile na HF ishrani (72% masti) i pokazali da ovaj hormon značajno smanjuje koncentraciju Glu u

plazmi već nakon 4 nedelje (trend smanjenja nastavlja se i nakon 12 nedelja), kao i koncentracija bazalno merenog INS u plazmi nakon 12 nedelja. Da bi se dokazala protektivna uloga koju estradiol ostvaruje posredstvom ER $\alpha$  na metabolizam Glu u istoj studiji su korišćene ER $\alpha^{-/-}$  ovarijektomisane ženke miševa, istovremeno tretirane estradiolom a na režimu HF ishrane (Riant i sar., 2009). Rezultati su pokazali da nakon 4 nedelje tretmana estradiolom ne dolazi do poboljšanja metabolizma Glu kod ER $\alpha^{-/-}$  ženki za razliku od ER $\alpha^{+/+}$  ovarijektomisanih ženki kod kojih je Glu značajno snižena (Riant i sar., 2009). Do sličnih rezultata došli su Bryzgalova i saradnici (2006), koji su pokazali da nedostatak ER $\alpha$ , ali ne i ER $\beta$  dovodi do razvoja intolerancije na Glu i smanjenja senzitivnost na INS. I druga studija istih autora je pokazala da HF ishrana miševa dovodi do razvoja gojaznosti, snižene tolerancije na Glu i IR, a da dugotrajni tretman miševa estradiolom (u koncentraciji od 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  po danu) reguliše metabolizam Glu i vraća INS na normaln nivo (Bryzgalova i sar., 2008). Zhu i saradnici (2013) su pokazali da hronično davanje estradiola ovarijektomisanim ženkama miševa na HF ishrani značajno smanjuje koncentraciju INS u odnosu na ovarijektomisane ženke koje nisu tretirane estradiolom, dok koncentracija Glu u plazmi ostaje nepromenjana. U već pomenutoj studiji, Riant i saradnici (2009) su ispitujući efekte estradiola na ovarijektomisanim ženkama miševa koje su bila na HF ishrani tokom 12 nedelja pokazali da hronično davanje estradiola smanjuje razvoj IR izazvanog HF ishranom za 50 % i dovodi do poboljšanja INS signalnog puta, tako što je povećana fosforilacije Akt na oba aminokiselinska ostatka Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>, što je u skladu sa našim rezultatima.

Iako je u našim eksperimentima pokazano da estradiol značajno povećava fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> kod gojaznih pacova, što ukazuje na pozitivne efekte estradiola na molekule signalnog puta INS, ipak nije došlo do normalizacije metabolizma Glu i smanjenja koncentracije INS u cirkulaciji. Različitost naših rezultata u odnosu na rezultata drugih autora može se objasniti na više načina. Za razliku od većine rezultata drugih autora koji su ispitivanja efekata estradiola radili u *in vitro* ili *in vivo* uslovima na ženkama pacova prethodno ovarijektomisanim, a potom hranjenim HF hranom mi smo ispitivali efekat estradiola *in vivo* kod mužjaka pacova koji su bili na HF ishrani. Pored toga pacovi u našim eksperimentima su tretirani samo jednom dozom estradiola, a potom žrtvovani nakon 24 sata. U našim ranijim radovima na ovarijektomisanim ženkama pacova pokazano je da tretman estradiolom dovodi do značajnog smanjenja koncentracije Glu i INS ali u znatno kraćim vremenskim intervalima (Koricanac i sar., 2009).



Pored smanjene osetljivosti ćelija na INS i poremećenog metabolizma Glu u stanju gojaznosti i IR dolazi do poremećaja metabolizma lipida i njihove akumulacija u različitim tkivima, što dovodi do lipotoksičnosti, inflamacije, povećanog oksidativnog stresa i poremećene funkcije mitohondrija (Roden 2005; Samuel i sar., 2010; Hotamisligil 2010; Jelenik i Roden, 2013; Jelenik i Roden, 2013). U stanju IR dolazi do narušavanja srčane funkcije, što je između ostalog uzrokovano nakupljanjem lipida u miokardu (Christoffersen i sar., 2003; Zib i sar., 2007; Tian i sar., 2012). Tačan mehanizam kojim povećan nivo lipida u miokardu dovodi do disfunkcije LK još nije potpuno razjašnjen, ali je pokazano da u ovom stanju dolazi do oksidativnog stresa, stresa ER i indukcije apoptoze (Zhou i sar., 2000; Tian i sar., 2012), dok primenom adekvatne terapije koja snižava nivo Tg dolazi do normalizacije funkcije srca (Coort i sar., 2004; Tian i sar., 2012). Pozitivan efekata estradiola na KVS ispoljava se pre svega uticajem na smanjenje lipida u krvi, tako što svojim delovanjem povećava lipolitičku aktivnost u adipoznom tkivu, odnosno smanjuje lipogenezu (Hewitt i sar., 2004; Jelenik i Roden, 2013; Resanovic i sar., 2013). Tako je pokazano da estrogeni mogu smanjiti sintezu i povećati oksidaciju SMK u stanju hiperinsulinemije i to preko aktivacije AMPK koja promovise oksidaciju SMK (Musatov i sar., 2007; Gorres i sar., 2011). Takođe je pokazano da estradiol može dovesti do povećanja nivoa FAT/CD36 na plazma membranama kardiomiocita (Hsieh i sar., 2006; Tepavcevic i sar., 2011; Koricanac i sar., 2012), što dodatno povećava oksidaciju SMK. Korišćenjem transgenih miševa kod kojih je inaktiviran enzim aromataza, esencijalna za sintezu estradiola, Jones i saradnici (Jones i sar., 2000) su pokazali da nedostatak estradiola nakon godinu dana dovodi do povećanja koncentracije HOL i Tg u serumu. Dok nedostatak estrogena kod muškaraca izazvan korišćenjem antagonista aromataze (testolakton) ne dovodi do promene u koncentraciji Tg (Bagatell i sar., 1994). Zheng i saradnici (Zheng i sar., 2012) su kod muškaraca kod kojih je utvrđena koronarna bolest srca i kod kojih je koncentracija endogenog estradiola značajno snižena, pokazali da su koncentracije HOL i Tg bile značajno povećane u poređenju sa zdravim kontrolama. Pretpostavlja se da leptin ima važnu ulogu u zaštiti srca od lipotoksičnosti, povećavajući skladištenje viška lipida u adipocitima, dok istovremeno limitira skladištenje lipida u miocitima i ostalim tkivima (Unger i sar., 1999). Pokazano je da estradiol reguliše senzitivnost na leptin, tako što povećava ekspresiju receptora za leptin (Rocha i sar., 2004; Bryzgalova i sar., 2008). U našim rezultatima je pokazano da estradiol ne dovodi do

značajnih promena u koncentraciji leptina kod gojaznih pacova u odnosu na gojazne pacove koji nisu tretirani estradiolom (**Tabela 6.**).

Naši rezultati ukazuju da tretman gojaznih životinja estradiolom dovodi do značajnog smanjenja koncentracije HOL u serumu (**Slika 19. A**), dok su koncentracije Tg u serumu (**Slika 19. B**), odnosno SMK i fosfolipida u plazmi (**Slika 20. A i B**), bez značajnih razlika u odnosu na gojazne netretirane pacove. Slično našim rezultatima, Liu i Bachmann (1998) su pokazali da estradiol, kao i njegovi metaboliti efikasno snižavaju nivo HOL u serumu kod ovarijektomisanih ženki pacova. Takođe, El-Nasr i saradnici (2011) su koristeći ovarijektomisane ženke pacova kod kojih je izazvan dijabetes streptozotocinom, a potom tretirani estradiolom (50µg/kg/po danu) tokom četiri nedelje, pokazali da estradiol dovodi do smanjenja nivoa HOL, ali i Tg, u odnosu na dijabetične netretirane pacove. Riant i saradnici (2009) su pokazali da hronično davanje estradiola ovarijektomisanim miševima koji su bili na HF ishrani tokom 12 nedelja, dovodi do povećanja koncentracije SMK i Tg u serumu u poređenju sa netretiranim ovarijektomisanim miševima, ali povećanje nije značajno. U drugoj studiji je pokazano da tretman ovarijektomisanih ženki miševa estradiolom koje su bile na HF ishrani značajno smanjuje koncentraciju HOL u odnosu na ovarijektomisane ženke koje nisu tretirane, dok ovakav tretman ne dovodi do promena u nivou Tg u plazmi (Zhu i sar., 2013). U studiji Stubbinsa i saradnika (2012) je pokazano da HF ishrana ovarijektomisanih ženki miševa dovodi do povećanja koncentracije SMK i Tg u serumu, dok tretman estradiolom smanjuje koncentraciju Tg, ali povećava koncentraciju SMK.

Različitost rezultata dobijenih u našim kao i u eksperimentima drugih autora ukazuje da estradiol iako dovodi do snižavanja koncentracije lipida u cirkulaciji, ipak ne reguliše metabolizma lipida u potpunosti, naročito kada tretman estradiolom nije hroničan, već jednokratno. Konstantan unos velike količine lipida HF ishranom i mala potrošnja dovode do akumulacije lipida u različitim tkivima pa je za normalizaciju metabolizma lipida potreban duži tretman estradiolom. Estradiol nije normalizovao nivo leptina u krvi gojaznih pacova, što ukazuje da je došlo do razvoja rezistencije na leptin. Pored toga u našim eksperimentima pacovi nisu bili podvrgnuti standardnom gladovanju pre žrtvovanja, tako da su pacovi imali slobodan pristup hrani i nakon tretmana estradiolom.

Estradiol svojim delovanjem ispoljava antiinflamatorne efekte (Wang i sar., 2006). Tako je u *in vitro* eksperimentima u kojima je ispitivan efekat estradiola na produkciju CRP pokazano da tretman ćelija estradiolom kod kojih je stimulirana produkcija CRP

korišćenjem humanog rekombinovanog CRP, ne dovodi do smanjenja njegove ekspresije, dok pre tretman ćelija estradiolom značajno smanjuje njegovu ekspresiju (Cossette i sar., 2013). U već pomenutoj studiji Zheng i saradnici (2012) su pokazali da je koncentracija CRP značajno povećana kod pacijenata sa koronarnom bolesti srca, kod kojih je nivo estradiola bio značajno snižen. Rezultati naših eksperimenata takođe ukazuju na antiinflamatorne efekte estradiola. Kod gojaznih pacova je povećana koncentracija CRP (**Tabela 4.**) dok tretman estradiolom dovodi do smanjenja koncentracije CRP u serumu (**Tabela 6.**). CRP može predstavljati faktor rizika nastanka i razvoja hipertrofije srca, pa tretman estradiolom ostvaruje svoje protektivne efekte i posredstvom CRP.

Izučavanje mehanizama kojima estradiol reguliše aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu je od velikog značaja posebno u patološkim stanjima, kao što je stanje gojaznosti praćeno hipertrofijom srca. Međutim, do sada nisu ispitivani *in vivo* efekti estradiola na aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih pacova. Rezultati naših ranijih istraživanja (Isenovic i sar., 2002; Sudar i sar., 2008), kao i drugih autora (Dzurba i sar., 1997; Palacios i sar., 2004) pokazali su da je estradiol jedan od bitnih regulatora  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu, i da bi mogao regulisati funkciju ove pumpe i u stanju gojaznosti i na taj način redukovati štetne efekte gojaznosti na srce. Određivanjem efekta estradiola na aktivnost, kao i nivo proteina za katalitičku  $\alpha 1$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze srca gojaznih pacova pokazali smo statistički značajno povećanje ovih parametara u odnosu na gojazne pacova koji nisu tretirani estradiolom (**Slika 21.** i **Slika 22. B**). Tretman gojaznih pacova estradiolom značajno povećava nivo fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na aminokiselinskom ostatku  $\text{Ser}^{23}$  u poređenju sa vrednostima kod gojaznih pacova, dok je vrednost odnosa fosforilisane forme i ukupnog nivoa  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, bez statističke značajnosti (**Slika 22. A** i **C**). Imunohistohemijskim bojenjem isečaka tkiva srca na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom, pokazano je da je lokalizacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze slično ostalim eksperimentalnim grupama uglavnom membranskog tipa (**Slika 23.** i **24.**).

Ispitivanjem efekata estradiola na koncentracije DLIF  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , pokazali smo da tretman gojaznih pacova nema efekta na koncentraciju DLIF i  $\text{K}^+$  jona u poređenju sa izmerenim vrednostima kod gojaznih pacova, dok je koncentracija  $\text{Na}^+$  u serumu značajno povećana u odnosu na gojazne, netretirane životinje (**Tabela 6**). Iako su izmerene koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona u okviru referentnih vrednosti za Wistar pacove, ipak se značajno povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  jona kod gojaznih pacova tretiranih estradiolom

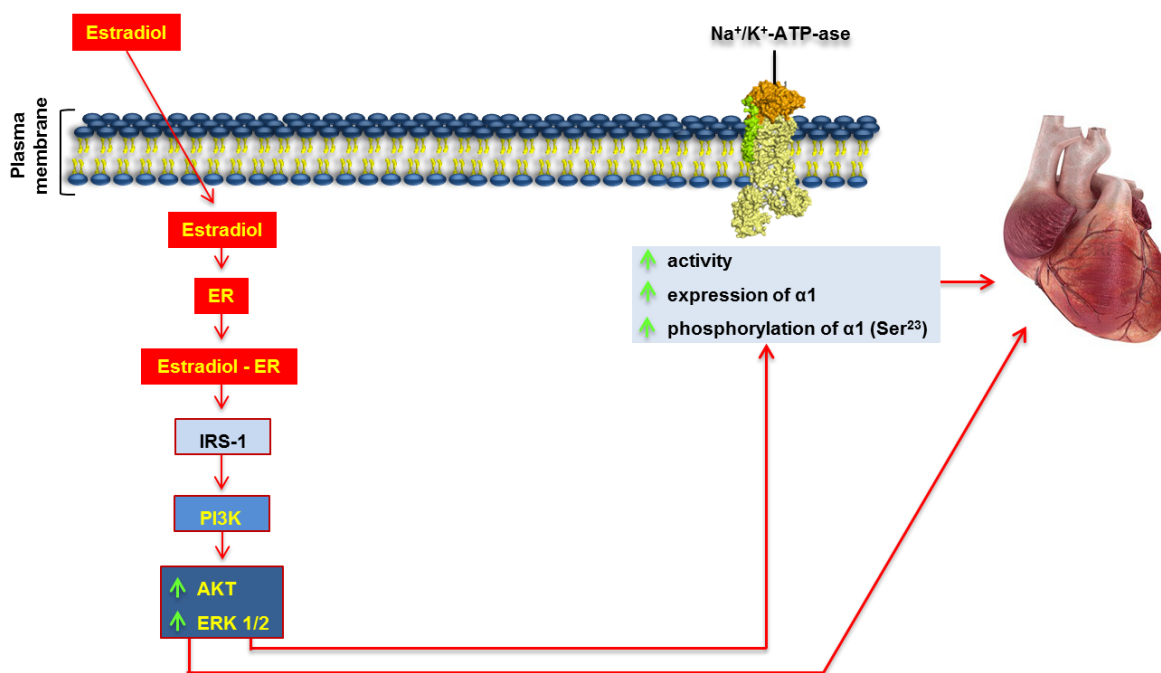
može objasniti povećanjem aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, koja je kod gojaznih pacova smanjena. Kao što je već napomenuto u stanjima hipertenzije koja je često prisutna kod gojaznih pacova dolazi do smanjenja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, i do povećanja koncentracije Na<sup>+</sup> u ćelijama (Vrbjar i sar., 1999; Vrbjar i sar., 2002). Međutim pošto je u našim eksperimentima pokazano da estradiol dovodi do značajnog povećanja aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, može se pretpostaviti da je kao posledica toga došlo do izbacivanja viška Na<sup>+</sup> iz ćelija i povećanja njegove koncentracije u odnosu na gojazne netretirane pacove.

Pored toga ispitivali smo i uticaj estradiola na signalne kinaze Akt i ERK1/2 u stanju gojaznosti i IR. Rezultati su pokazali da je odnos fosforilisane forme Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt kod gojaznih pacova koji su tretirani estradiolom značajno povećan u odnosu na gojazne, estradiolom netretirane pacove, dok nije došlo do značajnih promena u fosforilaciji Akt, kao i ukupnog nivoa Akt u odnosu na aktin (**Slika 25.**). Povećanje fosforilacije Akt ukazuje da estradiol svojim delovanjem u patološkom stanju kao što je gojaznost združena sa IR dovodi do normalizacije signalnih proteina INS puta i na taj način ublažava nastalo stanje IR. Takođe je u okviru ove doktorske disertacije pokazana veza između aktivacije Akt kinaze i povećane aktivnosti i ekspresije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, što je u skladu sa našim ranijim rezultatima (Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008).

Davanje estradiola gojaznim pacovima nije dovelo do značajnih razlika u nivou fosforilacije ERK1/2 kinaze, ukupnog nivoa ERK1/2 kinaza i odnosa fosforilisane forme ERK1/2 i ukupnog nivoa ERK1/2 kinaza u odnosu na gojazne netretirane pacove (**Slika 26.**), iako je došlo do smanjenja hipertrofije srca. Slično našim rezultatima u studiji van Eickelsa i saradnika (van Eickels i sar., 2001) je pokazano da estradiol ne dovodi do promena u nivou fosforilacije ERK1/2 kinaza, iako dovodi do smanjenja hipertrofije srca koja je uzrokovana povećanjem pritiska usled suženja aorte kod ženki miševa, za razliku od našeg modela gde je hipertrofija srca izazvana gojaznoscu. Takođe, je ranije pokazano da aktivacija ERK1/2 kinaza dovodi do translokacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na plazma membranu i povećanja njene funkcije (Al-Khalili i sar., 2004). Međutim, kao što je već ranije spomenuto, izostanak aktivacije ERK1/2 kinaza može se objasniti time što je u *in vivo* uslovima aktivacija ERK1/2 ciklična, odnosno postoje periodične aktivacije i deaktivacije ERK1/2 kinaza (Bueno i sar., 2000; Kehat i Molkentin, 2010).

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije po prvi put ukazuju da estradiol davan *in vivo* kako u normalnim tako i u patofiziološkim uslovima gojaznosti i

IR, reguliše aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu i ublažava njegovu hipertrofiju indukovanu gojaznošću. Estradiol ove efekte ostvaruje preko signalnih puteva u koje su uključeni Akt i ERK1/2 kinaze kod normalno uhranjenih pacova, dok kod gojaznih pacova estradiol ostvaruje svoje efekte preko signalnog puta u koji je uključena aktivacija samo Akt kinaze (**Slika 28.**).



**Slika 28.** Predloženi mehanizam *in vivo* efekata estradiola na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i srca u fiziološkim uslovima. ER– receptor za estrogen; IRS-1– supstrat receptora za insulin 1; PI3K– fosfatidilinozitol-3 kinaza; Akt– protein kinaza B; ERK1/2– ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2; Ser<sup>23</sup>– serin<sup>473</sup>; ↑– fiziološko povećanje; Figura  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze preuzeta i modifikovana iz (Shinoda i sar., 2009).

## 6. ZAKLJUČCI

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

1. Estradiol *in vivo* kod normalno uhranjenih pacova dovodi do:

- povećanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ekspresije i fosforilacije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani kardiomiocita pacova, aktivnosti Akt i ERK1/2 kinaza, koncentracije ukupnih proteina u lizatima srca,
- smanjenja koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora i  $\text{Na}^+$  u krvi pacova.

2. Ishrana bogata mastima dovodi do:

- povećanja mase tela, mase srca, koncentracije ukupnih proteina u lizatima srca, transverzalnog dijametra kardiomiocita, koncentracije glukoze i insulina, leptina, C-reaktivnog proteina, holesterola i triglicerida u serumu, slobodnih masnih kiselina i fosfolipida u plazmi, kao i fosforilacije ERK1/2 kinaza.
- smanjenja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani kardiomiocita pacova i aktivnosti Akt kinaze, koncentracije digoksinu sličnih imunoreaktivnih faktora u plazmi i koncentracije  $\text{Na}^+$  u serumu.

3. Estradiol *in vivo* kod gojaznih pacova dovodi do:

- povećanja koncentracije  $\text{Na}^+$  u serumu pacova, aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i ekspresije  $\alpha 1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membrani kardiomiocita pacova i povećanja aktivnosti Akt kinaze;
- smanjenja mase srca, odnosa mase srca i tela, transverzalnog dijametra kardiomiocita, koncentracije C-reaktivnog proteina i holesterola u serumu.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put ukazuju da estradiol davan *in vivo* u fiziološkim uslovima reguliše aktivnost i ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu, molekularnim mehanizmom koji uključuju učešće Akt i ERK1/2 kinaza. Takođe, po prvi put je pokazano da estradiol davan *in vivo* gojaznim, IR pacovima kod kojih su aktivnost i ekspresija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze smanjene, povećava ove parametre mehanizmom koji uključuje učešće Akt kinaze. Pored uticaja na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu, estradiol utiče i na morfologiju ćelija srca gojaznih pacova koji su razvili IR i dovodi do smanjenja gojaznošću indukovane hipertrofije srca. Promene u morfologiji ćelija srca pod delovanjem estradiola u patofiziološkim uslovima mogu se dovesti u vezu sa promenama u regulaciji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze.

Kao jedan od potencijalnih naučnih doprinosa rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije je, između ostalog, upoznavanje molekularnih mehanizama delovanja estradiola, kako u fiziološkim tako i u patofiziološkim stanjima kao što je to npr. stanje gojaznosti združeno sa stanjem IR u kome regulacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kao i promene u morfologiji srca imaju jednu od ključnih uloga. Izučavanja usmerena u pravcu rasvetljenja molekularnih mehanizma kojima estradiol ostvaruje svoje efekte na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i morfologije srca su od izuzetne važnosti za razumevanje uloge estradiola u kardiovaskularnim oboljenjima u cilju razvijanja novih terapijskih strategija za tretman kardiovaskularnih oboljenja.

## 7. LITERATURA

1. Abel, E. D., Litwin, S. E. and Sweeney, G. (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 88(2): 389-419.
2. Abel, E. D., O'Shea, K. M. and Ramasamy, R. (2012) Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(9): 2068-2076.
3. Agabiti-Rosei, E. and Muiesan, M. L. (2002) Left ventricular hypertrophy and heart failure in women. *J Hypertens Suppl.* 20(2): S34-38.
4. Aguila, M. B. and Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003) Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months. *Nutrition.* 19(4): 347-352.
5. Aizman, O., Uhlen, P., Lal, M., Brismar, H., et al. (2001) Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23): 13420-13424.
6. Akamine, E. H., Marcal, A. C., Camporez, J. P., Hoshida, M. S., et al. (2010) Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *J Endocrinol.* 206(1): 65-74.
7. Akera, T. and Brody, T. M. (1977) The role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol Rev.* 29(3): 187-220.
8. Al-Khalili, L., Kotova, O., Tsuchida, H., Ehren, I., et al. (2004) ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 279(24): 25211-25218.
9. Al-Khalili, L., Yu, M. and Chibalin, A. V. (2003) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase trafficking in skeletal muscle: insulin stimulates translocation of both alpha 1- and alpha 2-subunit isoforms. *FEBS Lett.* 536(1-3): 198-202.
10. Alessi, D. R. and Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* 8(1): 55-62.
11. Alexander, J. K. (1985) The cardiomyopathy of obesity. *Prog Cardiovasc Dis.* 27(5): 325-334.
12. Alpert, M. A. (2001) Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci.* 321(4): 225-236.
13. Alpert, M. A., Lambert, C. R., Panayiotou, H., Terry, B. E., et al. (1995) Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol.* 76(16): 1194-1197.
14. Anderson, G. L., Limacher, M., Assaf, A. R., Bassford, T., et al. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 291(14): 1701-1712.



15. Andjelkovic, M., Maira, S. M., Cron, P., Parker, P. J., et al. (1999) Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol Cell Biol.* 19(7): 5061-5072.
16. Andronico, G., Mule, G., Mangano, M. T., Piazza, G., et al. (1992) Insulin resistance and endogenous digoxin-like factor in obese hypertensive patients with glucose intolerance. *Acta Diabetol.* 28(3-4): 203-205.
17. Aperia, A. (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 261(1): 44-52.
18. Appel, C., Gloor, S., Schmalzing, G., Schachner, M., et al. (1996) Expression of a Na,K-ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. *J Neurosci Res.* 46(5): 551-564.
19. Artham, S. M., Lavie, C. J., Patel, H. M. and Ventura, H. O. (2008) Impact of obesity on the risk of heart failure and its prognosis. *J Cardiometab Syndr.* 3(3): 155-161.
20. Atherton, H. J., Schroeder, M. A., Dodd, M. S., Heather, L. C., et al. (2011) Validation of the in vivo assessment of pyruvate dehydrogenase activity using hyperpolarised <sup>13</sup>C MRS. *NMR Biomed.* 24(2): 201-208.
21. Avila, J., Alvarez de la Rosa, D., Gonzalez-Martinez, L. M., Lecuona, E., et al. (1998) Structure and expression of the human Na,K-ATPase beta 2-subunit gene. *Gene.* 208(2): 221-227.
22. Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., et al. (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res.* 56: 127-155.
23. Bagatell, C. J., Knopp, R. H., Rivier, J. E. and Bremner, W. J. (1994) Physiological levels of estradiol stimulate plasma high density lipoprotein2 cholesterol levels in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 78(4): 855-861.
24. Bagrov, A. Y., Shapiro, J. I. and Fedorova, O. V. (2009) Endogenous cardiostericoids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 61(1): 9-38.
25. Ballotta, E., Saladini, M., Gruppo, M., Mazzalai, F., et al. (2010) Predictors of electroencephalographic changes needing shunting during carotid endarterectomy. *Ann Vasc Surg.* 24(8): 1045-1052.
26. Barbacanne, M. A., Rami, J., Michel, J. B., Souchard, J. P., et al. (1999) Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 41(3): 672-681.
27. Barrett-Connor, E., Giardina, E. G., Gitt, A. K., Gudat, U., et al. (2004) Women and heart disease: the role of diabetes and hyperglycemia. *Arch Intern Med.* 164(9): 934-942.
28. Barros, R. P. and Gustafsson, J. A. (2011) Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab.* 14(3): 289-299.
29. Barta, E., Strec, V., Styk, J., Okolicany, J., et al. (1989) Protective effect of oestradiol on the heart of rats exposed to acute ischaemia. *Physiol Bohemoslov.* 38(3): 193-200.
30. Beaudry, J. L., D'Souza, A., Teich, T., Tsushima, R., et al. (2013) Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and

- hyperinsulinemia and limit islet glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*.
31. Beggah, A. T., Jaunin, P. and Geering, K. (1997) Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 272(15): 10318-10326.
  32. Beltowski, J., Marciniak, A. and Wojcicka, G. (2004) Leptin decreases renal medullary Na(+), K(+)-ATPase activity through phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism. *J Physiol Pharmacol*. 55(2): 391-407.
  33. Berry, R. G., Despa, S., Fuller, W., Bers, D. M., et al. (2007) Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha1 and alpha2 subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. *Cardiovasc Res*. 73(1): 92-100.
  34. Bertorello, A. M. and Katz, A. I. (1993) Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol*. 265(6 Pt 2): F743-755.
  35. Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C. and Vanoverschelde, J. L. (2008) Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 79(2): 238-248.
  36. Bharadwaj, K. G., Hiyama, Y., Hu, Y., Huggins, L. A., et al. (2010) Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem*. 285(49): 37976-37986.
  37. Bhuiyan, M. S., Shioda, N. and Fukunaga, K. (2007) Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293(6): E1606-1614.
  38. Bing, R. J., Siegel, A., Ungar, I. and Gilbert, M. (1954) Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med*. 16(4): 504-515.
  39. Blanco, G. and Mercer, R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 275(5 Pt 2): F633-650.
  40. Blaustein, M. P., Ashida, T., Goldman, W. F., Wier, W. G., et al. (1986) Sodium/calcium exchange in vascular smooth muscle: a link between sodium metabolism and hypertension. *Ann N Y Acad Sci*. 488: 199-216.
  41. Blaustein, M. P., Juhaszova, M. and Golovina, V. A. (1998) The cellular mechanism of action of cardiotoxic steroids: a new hypothesis. *Clin Exp Hypertens*. 20(5-6): 691-703.
  42. Blostein, R., Pu, H. X., Scanzano, R. and Zouzoulas, A. (2003) Structure/function studies of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci*. 986: 420-427.
  43. Boden, G. and Shulman, G. I. (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 32 Suppl 3: 14-23.
  44. Booth, E. A. and Lucchesi, B. R. (2008) Estrogen-mediated protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Toxicol*. 8(3): 101-113.
  45. Boudina, S., Sena, S., O'Neill, B. T., Tathireddy, P., et al. (2005) Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation*. 112(17): 2686-2695.
  46. Braga, M. F. and Leiter, L. A. (2009) Role of renin-angiotensin system blockade in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 104(6): 835-839.

47. Bray, G. A. and Yukimura, Y. (1978) Activity of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase in the liver of animals with experimental obesity. *Life Sci.* 22(18): 1637-1642.
48. Brower, G. L., Gardner, J. D. and Janicki, J. S. (2003) Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem.* 251(1-2): 89-95.
49. Brummer, T., Schmitz-Peiffer, C. and Daly, R. J. (2010) Docking proteins. *FEBS J.* 277(21): 4356-4369.
50. Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J. R., et al. (2006) Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia.* 49(3): 588-597.
51. Bryzgalova, G., Lundholm, L., Portwood, N., Gustafsson, J. 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(4): E904-912.
52. Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., et al. (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19(23): 6341-6350.
53. Bueno, O. F. and Molkentin, J. D. (2002) Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 91(9): 776-781.
54. Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., et al. (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 36(3): 485-501.
55. Buettner, R., Scholmerich, J. and Bollheimer, L. C. (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 15(4): 798-808.
56. Bugger, H. and Abel, E. D. (2008) Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 114(3): 195-210.
57. Bugger, H. and Abel, E. D. (2009) Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech.* 2(9-10): 454-466.
58. Buja, L. M. and Vela, D. (2008) Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol.* 17(6): 349-374.
59. Bulayeva, N. N., Gametchu, B. and Watson, C. S. (2004) Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids.* 69(3): 181-192.
60. Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112(2): 195-203.
61. Calabro, P., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. (2003) Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation.* 108(16): 1930-1932.
62. Campbell, M., Allen, W. E., Sawyer, C., Vanhaesebroeck, B., et al. (2004) Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circ Res.* 95(4): 380-388.
63. Camper-Kirby, D., Welch, S., Walker, A., Shiraishi, I., et al. (2001) Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res.* 88(10): 1020-1027.

64. Cantrell, D. A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* 114(Pt 8): 1439-1445.
65. Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J. and Gambelin, S. J. (2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol.* 7(8): 512-518.
66. Carroll, J. F., Zenebe, W. J. and Strange, T. B. (2006) Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 48(1): 65-72.
67. Cavaşin, M. A., Sankey, S. S., Yu, A. L., Menon, S., et al. (2003) Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(5): H1560-1569.
68. Chaanine, A. H. and Hajjar, R. J. (2011) AKT signalling in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 13(8): 825-829.
69. Chen, G., Liu, C., Yao, J., Jiang, Q., et al. (2010) Overweight, obesity, and their associations with insulin resistance and beta-cell function among Chinese: a cross-sectional study in China. *Metabolism.* 59(12): 1823-1832.
70. Chen, G., Yang, X., Alber, S., Shusterman, V., et al. (2011) Regional genomic regulation of cardiac sodium-calcium exchanger by oestrogen. *J Physiol.* 589(Pt 5): 1061-1080.
71. Chen, K., Li, F., Li, J., Cai, H., et al. (2006) Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med.* 12(4): 425-432.
72. Chen, L. S., Lo, C. F., Numann, R. and Cuddy, M. (1997) Characterization of the human and rat phospholemman (PLM) cDNAs and localization of the human PLM gene to chromosome 19q13.1. *Genomics.* 41(3): 435-443.
73. Chibalin, A. V. (2007) Regulation of the Na,K-ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology.* 14(3-4): 153-158.
74. Chibalin, A. V., Ogimoto, G., Pedemonte, C. H., Pressley, T. A., et al. (1999) Dopamine-induced endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem.* 274(4): 1920-1927.
75. Chibalin, A. V., Pedemonte, C. H., Katz, A. I., Feraille, E., et al. (1998) Phosphorylation of the catalytic alpha-subunit constitutes a triggering signal for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase endocytosis. *J Biol Chem.* 273(15): 8814-8819.
76. Chiu, H. C., Kovacs, A., Ford, D. A., Hsu, F. F., et al. (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 107(7): 813-822.
77. Choi, J., Joseph, L. and Pilote, L. (2013) Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 14(3): 232-244.
78. Christoffersen, C., Bollano, E., Lindgaard, M. L., Bartels, E. D., et al. (2003) Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology.* 144(8): 3483-3490.
79. Christopher, B. A., Huang, H. M., Berthiaume, J. M., McElfresh, T. A., et al. (2010) Myocardial insulin resistance induced by high fat feeding in heart failure is associated with preserved contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(6): H1917-1927.
80. Ciubotaru, I., Potempa, L. A. and Wander, R. C. (2005) Production of modified C-reactive protein in U937-derived macrophages. *Exp Biol Med (Maywood).* 230(10): 762-770.
81. Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., et al. (1999) Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax

- and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*. 99(23): 3071-3078.
82. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 334(5): 292-295.
  83. Coort, S. L., Hasselbaink, D. M., Koonen, D. P., Willems, J., et al. (2004) Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes*. 53(7): 1655-1663.
  84. Cossette, E., Cloutier, I., Tardif, K., DonPierre, G., et al. (2013) Estradiol inhibits vascular endothelial cells pro-inflammatory activation induced by C-reactive protein. *Mol Cell Biochem*. 373(1-2): 137-147.
  85. Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C., et al. (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J Biol Chem*. 275(3): 1976-1986.
  86. Cummings, P. M., Le, B. H. and Lopes, M. B. (2007) Postmortem findings in morbidly obese individuals dying after gastric bypass procedures. *Hum Pathol*. 38(4): 593-597.
  87. de Kloet, A. D., Krause, E. G. and Woods, S. C. (2010) The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*. 100(5): 525-534.
  88. de Simone, G., Devereux, R. B., Daniels, S. R. and Meyer, R. A. (1995) Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension*. 26(6 Pt 1): 979-983.
  89. de Vries, J. E., Vork, M. M., Roemen, T. H., de Jong, Y. F., et al. (1997) Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res*. 38(7): 1384-1394.
  90. Deng, Y., Yao, L., Chau, L., Ng, S. S., et al. (2003) N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer*. 106(3): 342-347.
  91. Deschamps, A. M. and Murphy, E. (2009) Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(5): H1806-1813.
  92. Deschamps, A. M., Murphy, E. and Sun, J. (2010) Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*. 20(3): 73-78.
  93. Devaraj, S., Singh, U. and Jialal, I. (2009) The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem*. 55(2): 229-238.
  94. Dirksen, E., Schwenk, R. W., Glatz, J. F., Luiken, J. J., et al. (2011) High fat diet induced diabetic cardiomyopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 85(5): 219-225.
  95. Distel, R. J., Robinson, G. S. and Spiegelman, B. M. (1992) Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 267(9): 5937-5941.
  96. Donaldson, C., Eder, S., Baker, C., Aronovitz, M. J., et al. (2009) Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circ Res*. 104(2): 265-275, 211p following 275.
  97. Dostanic-Larson, I., Lorenz, J. N., Van Huysse, J. W., Neumann, J. C., et al. (2006) Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290(3): R524-528.

98. Downward, J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10(2): 262-267.
99. Drenick, E. J. and Fisler, J. S. (1988) Sudden cardiac arrest in morbidly obese surgical patients unexplained after autopsy. *Am J Surg.* 155(6): 720-726.
100. Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Jackson, E. K. and Keller, P. J. (1998) 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* 31(1 Pt 2): 522-528.
101. Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Zacharia, L. C., Rosselli, M., et al. (2002) Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* 39(2 Pt 2): 412-417.
102. Duncan, A.C., Petrie, J.R., Brosnan, M.J., Devlin, A.M., et al. (2002) Is estradiol cardioprotection a nitric oxide-mediated effect? *Hum Reprod.* 17(7):1918-1924.
103. Duncombe, W. G. (1964) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta.* 9: 122-125.
104. Dzurba, A., Ziegelhoffer, A. and Vrbjar, N. (1983). Influence of estradiol on sarcolemmal (Na,K)-ATPase of the myocardium. *Proceedings of the International Symposium on Hormones and Cardiovascular System.* Purkyne. Prague, Czechoslovak Medical Society, . p. 21. .
105. Dzurba, A., Ziegelhoffer, A., Vrbjar, N., Styk, J., et al. (1997) Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem.* 176(1-2): 113-118.
106. Efendiev, R., Das-Panja, K., Cinelli, A. R., Bertorello, A. M., et al. (2007) Localization of intracellular compartments that exchange Na,K-ATPase molecules with the plasma membrane in a hormone-dependent manner. *Br J Pharmacol.* 151(7): 1006-1013.
107. Eisele, L. E., Mesfin, F. B., Bennett, J. A., Andersen, T. T., et al. (2001) Studies on analogs of a peptide derived from alpha-fetoprotein having antigrowth properties. *J Pept Res.* 57(6): 539-546.
108. El-Nasr, A., Diab, F., Bahgat, N., Ahmed, M., et al. (2011) Metabolic effects of estrogen and / or insulin in ovariectomized experimentally diabetic rats. *Journal of American Science.* 7(2): 432-444.
109. Elkind, M. S., Tai, W., Coates, K., Paik, M. C., et al. (2006) High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med.* 166(19): 2073-2080.
110. Ewart, H. S. and Klip, A. (1995) Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol.* 269(2 Pt 1): C295-311.
111. Fjeld, C. C., Rice, A. E., Kim, Y., Gee, K. R., et al. (2000) Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem.* 275(10): 6749-6757.
112. Forbush, B., 3rd, Kaplan, J. H. and Hoffman, J. F. (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry.* 17(17): 3667-3676.
113. Franck, D., Grichois, M. L., Dagher, G., Brossard, M., et al. (1984) In vivo modulation of outward Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> cotransport by oestradiol and progesterone in rat red cells. *Biomed Biochim Acta.* 43(6): S91-93.
114. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 275(5300): 665-668.

115. Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N. and Hill, J. A. (2004) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 109(13): 1580-1589.
116. Fuller, W., Tulloch, L. B., Shattock, M. J., Calaghan, S. C., et al. (2013) Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell Mol Life Sci*. 70(8): 1357-1380.
117. Galuska, D., Kotova, O., Barres, R., Chibalina, D., et al. (2009) Altered expression and insulin-induced trafficking of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297(1): E38-49.
118. Gao, J., Wymore, R., Wymore, R. T., Wang, Y., et al. (1999) Isoform-specific regulation of the sodium pump by alpha- and beta-adrenergic agonists in the guinea-pig ventricle. *J Physiol*. 516 ( Pt 2): 377-383.
119. Garcia, M. P., Gimenez, J., Serna, M., Salom, M. G., et al. (2006) Effect of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause*. 13(3): 397-403.
120. Gardner, J. D., Brower, G. L. and Janicki, J. S. (2002) Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail*. 8(2): 101-107.
121. Gardner, J. D., Brower, G. L., Voloshenyuk, T. G. and Janicki, J. S. (2008) Cardioprotection in female rats subjected to chronic volume overload: synergistic interaction of estrogen and phytoestrogens. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(1): H198-204.
122. Gardner, J. D., Murray, D. B., Voloshenyuk, T. G., Brower, G. L., et al. (2010) Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298(2): H497-504.
123. Garrington, T. P. and Johnson, G. L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 11(2): 211-218.
124. Garty, H. and Karlish, S. J. (2006) Role of FXYD proteins in ion transport. *Annu Rev Physiol*. 68: 431-459.
125. Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 17(5): 526-532.
126. Geering, K., Beggah, A., Good, P., Girardet, S., et al. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the beta subunit with the alpha subunit. *J Cell Biol*. 133(6): 1193-1204.
127. Gertz, E. W., Wisneski, J. A., Stanley, W. C. and Neese, R. A. (1988) Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest*. 82(6): 2017-2025.
128. Gheorghide, M., Hall, V. B., Jacobsen, G., Alam, M., et al. (1995) Effects of increasing maintenance dose of digoxin on left ventricular function and neurohormones in patients with chronic heart failure treated with diuretics and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 92(7): 1801-1807.
129. Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M. and Pangborn, W. (2009) Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457(7226): 219-223.
130. Giampietro, O., Clerico, A., Penno, G., Gregori, G., et al. (1992) Endogenous digitalis-like factors (EDLF) in obese individuals: preliminary results. *J Nucl Biol Med*. 36(1): 41-45.
131. Gomez-Perez, Y., Amengual-Cladera, E., Catala-Niell, A., Thomas-Moya, E., et al. (2008) Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem*. 22(5-6): 539-548.

132. Gorres, B. K., Bomhoff, G. L., Morris, J. K. and Geiger, P. C. (2011) In vivo stimulation of oestrogen receptor alpha increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *J Physiol.* 589(Pt 8): 2041-2054.
133. Gracelli, J. B., Souza-Menezes, J., Barbosa, C. M., Ornellas, F. S., et al. (2012) Role of estrogen and progesterone in the modulation of CNG-A1 and Na/K+-ATPase expression in the renal cortex. *Cell Physiol Biochem.* 30(1): 160-172.
134. Grandi, A. M., Venco, A., Barzizza, F., Scalise, F., et al. (1992) Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals. *Cardiology.* 81(1): 8-13.
135. Gray, S. and Kim, J. K. (2011) New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 22(10): 394-403.
136. Grodstein, F., Clarkson, T. B. and Manson, J. E. (2003) Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy. *N Engl J Med.* 348(7): 645-650.
137. Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K. and Vetter, H. (1998) Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol.* 156(2): R1-7.
138. Group, T. D. I. (1997) The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. The Digitalis Investigation Group. *N Engl J Med.* 336(8): 525-533.
139. Grupp, I., Im, W. B., Lee, C. O., Lee, S. W., et al. (1985) Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *J Physiol.* 360: 149-160.
140. Guernsey, D. L. and Morishige, W. K. (1979) Na<sup>+</sup> pump activity and nuclear T3 receptors in tissues of genetically obese (ob/ob) mice. *Metabolism.* 28(6): 629-632.
141. Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., et al. (1999) Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res.* 85(9): 856-866.
142. Ha, K. S., Yoo, K. H., Yim, H. E., Jang, G. Y., et al. (2011) Cellular and RAS changes in the hearts of young obese rats. *Pediatr Cardiol.* 32(5): 659-666.
143. Hale, S. L., Birnbaum, Y. and Kloner, R. A. (1997) Estradiol, Administered Acutely, Protects Ischemic Myocardium in Both Female and Male Rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2(1): 47-52.
144. Handgraaf, S., Riant, E., Fabre, A., Waget, A., et al. (2013) Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERalpha activation function-2 (ERalphaAF-2), whereas ERalphaAF-1 is dispensable. *Diabetes.*
145. Hao, L., Wang, Y., Duan, Y. and Bu, S. (2010) Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. *Eur J Appl Physiol.* 109(5): 879-886.
146. Harada, N., Sasano, H., Murakami, H., Ohkuma, T., et al. (1999) Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res.* 84(11): 1285-1291.
147. Hardie, D. G. (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr.* 93(4): 891S-896.
148. Haunstetter, A. and Izumo, S. (1998) Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 82(11): 1111-1129.
149. Hemmings, B. A. and Restuccia, D. F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(9): a011189.



150. Henttu, P. M., Kalkhoven, E. and Parker, M. G. (1997) AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 17(4): 1832-1839.
151. Herrera, V. L., Chobanian, A. V. and Ruiz-Opazo, N. (1988) Isoform-specific modulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene expression in hypertension. *Science.* 241(4862): 221-223.
152. Hewitt, K. N., Pratis, K., Jones, M. E. and Simpson, E. R. (2004) Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology.* 145(4): 1842-1848.
153. Horstman, A. M., Dillon, E. L., Urban, R. J. and Sheffield-Moore, M. (2012) The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67(11): 1140-1152.
154. Hosoda, K., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Miyawaki, T., et al. (1996) Development of radioimmunoassay for human leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 221(2): 234-239.
155. Hotamisligil, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 140(6): 900-917.
156. Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., et al. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell.* 71(2): 335-342.
157. Hribal, M. L., Fiorentino, T. V. and Sesti, G. (2013) Role of C Reactive Protein (CRP) in Leptin Resistance. *Curr Pharm Des.*
158. Hsieh, Y. C., Choudhry, M. A., Yu, H. P., Shimizu, T., et al. (2006) Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *FASEB J.* 20(8): 1109-1117.
159. Hu, X. L., Liu, X. P., Deng, Y. C., Lin, S. X., et al. (2006) Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. *Cell Tissue Res.* 325(1): 67-76.
160. Huang, A. and Kaley, G. (2004) Gender-specific regulation of cardiovascular function: estrogen as key player. *Microcirculation.* 11(1): 9-38.
161. Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., et al. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA.* 280(7): 605-613.
162. Hundal, H. S., Marette, A., Mitumoto, Y., Ramlal, T., et al. (1992) Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem.* 267(8): 5040-5043.
163. Iacobellis, G. (2004) True uncomplicated obesity is not related to increased left ventricular mass and systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 44(11): 2257; author reply 2258.
164. Iacobellis, G. and Leonetti, F. (2005) Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(11): 6300-6302.
165. Iacobellis, G., Leonetti, F., Singh, N. and A, M. S. (2007) Relationship of epicardial adipose tissue with atrial dimensions and diastolic function in morbidly obese subjects. *Int J Cardiol.* 115(2): 272-273.
166. Iacobellis, G., Ribaldo, M. C., Leto, G., Zappaterreno, A., et al. (2002) Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes Res.* 10(8): 767-773.

167. Iacobellis, G., Ribaldo, M. C., Zappaterreno, A., Iannucci, C. V., et al. (2004) Adapted changes in left ventricular structure and function in severe uncomplicated obesity. *Obes Res.* 12(10): 1616-1621.
168. Iannello, S., Campione, R., Volpicelli, G., Prestipino, M., et al. (1994). Na,K-Adenosine triphosphatase in mouse and human obesity and diabetes, as related to insulin, NEFA and hypertension. *Diabetologia Catania, Italy.* 37: A133.
169. Iannello, S., Milazzo, P. and Belfiore, F. (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev.* 8(3): 231-251.
170. Iannello, S., Milazzo, P. and Belfiore, F. (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am J Med Sci.* 333(1): 1-9.
171. Isenovic, E. R., Divald, A., Milivojevic, N., Grgurevic, T., et al. (2003) Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells. *Metabolism.* 52(4): 482-487.
172. Isenovic, E. R., Fretaud, M., Koricanac, G., Sudar, E., et al. (2009) Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 117(5): 214-219.
173. Isenovic, E. R., Jacobs, D. B., Kedeas, M. H., Sha, Q., et al. (2004) Angiotensin II regulation of the Na<sup>+</sup> pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 145(3): 1151-1160.
174. Isenovic, E. R., Meng, Y., Jamali, N., Milivojevic, N., et al. (2004) Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na<sup>+</sup>, K(+)-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* 13(6): 915-922.
175. Isenovic, E. R., Sha, Q., Milivojevic, N. M. and Sowers, J. R. (2002). Ang II inhibits E2-induced nitric oxide production and gene expression of the catalytic subunit of the sodium pump in VSMC. *Proceedings of 62nd Scientific Sessions. Diabetes, Moscone Center, San Francisco, Supplement 2, San Francisco, Diabetes.* pA573, 2368-PO.
176. Iwanami, J., Mogi, M., Iwai, M. and Horiuchi, M. (2009) Inhibition of the renin-angiotensin system and target organ protection. *Hypertens Res.* 32(4): 229-237.
177. James, P. F., Grupp, I. L., Grupp, G., Woo, A. L., et al. (1999) Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell.* 3(5): 555-563.
178. Janicki, J. S., Spinale, F. G. and Levick, S. P. (2013) Gender differences in non-ischemic myocardial remodeling: are they due to estrogen modulation of cardiac mast cells and/or membrane type 1 matrix metalloproteinase. *Pflugers Arch.* 465(5): 687-697.
179. Jelenik, T. and Roden, M. (2013) How estrogens prevent from lipid-induced insulin resistance. *Endocrinology.* 154(3): 989-992.
180. Jelenik, T. and Roden, M. (2013) Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 19(3): 258-268.
181. Jensen, E. V. and Jacobson, H. I. (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm. Res.,* 18: 318-414.
182. Jewell, E. A. and Lingrel, J. B. (1991) Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J Biol Chem.* 266(25): 16925-16930.

183. Jewell, E. A., Shamraj, O. I. and Lingrel, J. B. (1992) Isoforms of the alpha subunit of Na,K-ATPase and their significance. *Acta Physiol Scand Suppl.* 607: 161-169.
184. Jobsis, F. F. (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science.* 198(4323): 1264-1267.
185. Johnson, B. D., Zheng, W., Korach, K. S., Scheuer, T., et al. (1997) Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol.* 110(2): 135-140.
186. Jones, M. E., Thorburn, A. W., Britt, K. L., Hewitt, K. N., et al. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23): 12735-12740.
187. Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. and Karlsh, S. J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 65: 817-849.
188. Juhaszova, M. and Blaustein, M. P. (1997) Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5): 1800-1805.
189. Kan, W. H., Hsu, J. T., Ba, Z. F., Schwacha, M. G., et al. (2008) p38 MAPK-dependent eNOS upregulation is critical for 17beta-estradiol-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294(6): H2627-2636.
190. Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71: 511-535.
191. Kasper, E. K., Hruban, R. H. and Baughman, K. L. (1992) Cardiomyopathy of obesity: a clinicopathologic evaluation of 43 obese patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 70(9): 921-924.
192. Katan, M. and Elkind, M. S. (2011) Inflammatory and neuroendocrine biomarkers of prognosis after ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 11(2): 225-239.
193. Katsiki, N., Mikhailidis, D. P., Gotzamani-Psarrakou, A., Didangelos, T. P., et al. (2011) Effects of improving glycemic control with insulin on leptin, adiponectin, ghrelin and neuropeptidey levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Open Cardiovasc Med J.* 5: 136-147.
194. Katz, A. I. and Epstein, F. H. (1967) The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. *J Clin Invest.* 46(12): 1999-2011.
195. Kaur, G., Sharma, P. and Bhardwaj, S. (1997) GABA agonists and neurotransmitters metabolizing enzymes in steroid-primed OVX rats. *Mol Cell Biochem.* 167(1-2): 107-111.
196. Kawamura, M. and Noguchi, S. (1991) Possible role of the beta-subunit in the expression of the sodium pump. *Soc Gen Physiol Ser.* 46: 45-61.
197. Kehat, I. and Molkentin, J. D. (2010) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 1188: 96-102.
198. Kelly, M. J. and Levin, E. R. (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 12(4): 152-156.
199. Kenchaiah, S., Evans, J. C., Levy, D., Wilson, P. W., et al. (2002) Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 347(5): 305-313.
200. Kim, J. K. and Levin, E. R. (2006) Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nucl Recept Signal.* 4: e013.

201. Kim, J. W., Lee, Y., Lee, I. A., Kang, H. B., et al. (1997) Cloning and expression of human cDNA encoding Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase gamma-subunit. *Biochim Biophys Acta.* 1350(2): 133-135.
202. Knowlton, A. A. and Lee, A. R. (2012) Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 135(1): 54-70.
203. Koksoy, A. (2002) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: A Review. *Journal of Ankara Medical School.* Vol 24( No 2): 73-82.
204. Koricanac, G., Milosavljevic, T., Stojiljkovic, M., Zakula, Z., et al. (2009) Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart. *Cell Biochem Funct.* 27(2): 102-110.
205. Koricanac, G., Tepavcevic, S., Romic, S., Zivkovic, M., et al. (2012) Estradiol enhances effects of fructose rich diet on cardiac fatty acid transporter CD36 and triglycerides accumulation. *Eur J Pharmacol.* 694(1-3): 127-134.
206. Koricanac, G., Tepavcevic, S., Zakula, Z., Milosavljevic, T., et al. (2011) Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase. *Eur J Pharmacol.* 655(1-3): 23-30.
207. Kortelainen, M. L. (1996) Association between cardiac pathology and fat tissue distribution in an autopsy series of men without premortem evidence of cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 20(3): 245-252.
208. Kortelainen, M. L. (2002) Myocardial infarction and coronary pathology in severely obese people examined at autopsy. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(1): 73-79.
209. Kotsis, V., Stabouli, S., Papakatsika, S., Rizos, Z., et al. (2010) Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res.* 33(5): 386-393.
210. Koutsari, C. and Jensen, M. D. (2006) Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res.* 47(8): 1643-1650.
211. Kraegen, E. W., Saha, A. K., Preston, E., Wilks, D., et al. (2006) Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(3): E471-479.
212. Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., et al. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12): 5925-5930.
213. Kumagai, S., Holmang, A. and Bjorntorp, P. (1993) The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. *Acta Physiol Scand.* 149(1): 91-97.
214. Kumar, V., Bhandari, U., Tripathi, C. D. and Khanna, G. (2012) Evaluation of antiobesity and cardioprotective effect of *Gymnema sylvestre* extract in murine model. *Indian J Pharmacol.* 44(5): 607-613.
215. Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., et al. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5): 311-317.
216. Kusminski, C. M., Shetty, S., Orci, L., Unger, R. H., et al. (2009) Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 14(12): 1484-1495.
217. Labudovic Borovic, M., Borovic, S., Peric, M., Vukovic, P., et al. (2010) The internal thoracic artery as a transitional type of artery: a morphological and morphometric study. *Histol Histopathol.* 25(5): 561-576.
218. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-685.

219. Lagranha, C. J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C., et al. (2010) Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 106(11): 1681-1691.
220. Lakhani, M. and Fein, S. (2011) Effects of obesity and subsequent weight reduction on left ventricular function. *Cardiol Rev.* 19(1): 1-4.
221. Larsen, O. A., Lassen, N. A. and Quaade, F. (1966) Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol Scand.* 66(3): 337-345.
222. Lastra, G., Habibi, J., Whaley-Connell, A. T., Manrique, C., et al. (2009) Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression. *Endocrinology.* 150(6): 2561-2568.
223. Laube, M., Kuppers, E. and Thome, U. H. (2011) Modulation of sodium transport in alveolar epithelial cells by estradiol and progesterone. *Pediatr Res.* 69(3): 200-205.
224. Lavie, C. J. and Messerli, F. H. (1986) Cardiovascular adaptation to obesity and hypertension. *Chest.* 90(2): 275-279.
225. Lee, J., Xu, Y., Lu, L., Bergman, B., et al. (2010) Multiple abnormalities of myocardial insulin signaling in a porcine model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(2): H310-319.
226. Lehrke, M. and Lazar, M. A. (2004) Inflamed about obesity. *Nat Med.* 10(2): 126-127.
227. Lei, J., Mariash, C. N., Bhargava, M., Wattenberg, E. V., et al. (2008) T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(4): L749-754.
228. Leinwand, L. A. (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest.* 112(3): 302-307.
229. Leopoldo, A. S., Sugizaki, M. M., Lima-Leopoldo, A. P., do Nascimento, A. F., et al. (2010) Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 26(8): 423-429.
230. Lesser, G. T. and Deutsch, S. (1967) Measurement of adipose tissue blood flow and perfusion in man by uptake of <sup>85</sup>Kr. *J Appl Physiol.* 23(5): 621-630.
231. Levin, E. R. (2001) Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol.* 91(4): 1860-1867.
232. Levin, E. R. (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol.* 19(8): 1951-1959.
233. Levin, E. R. (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 20(10): 477-482.
234. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B., et al. (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322(22): 1561-1566.
235. Li, D., Sweeney, G., Wang, Q. and Klip, A. (1999) Participation of PI3K and atypical PKC in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *Am J Physiol.* 276(6 Pt 2): H2109-2116.
236. Li, Y., Yang, J., Li, S., Zhang, J., et al. (2011) N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* 286(37): 32289-32299.

237. Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., et al. (2001) The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 21(21): 7460-7469.
238. Lichtstein, D., Steinitz, M., Gati, I., Samuelov, S., et al. (1998) Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as possible precursor. *Life Sci.* 62(23): 2109-2126.
239. Lifshitz, Y., Lindzen, M., Garty, H. and Karlsh, S. J. (2006) Functional interactions of phospholemman (PLM) (FXVD1) with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Purification of alpha1/beta1/PLM complexes expressed in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem.* 281(23): 15790-15799.
240. Lifshitz, Y., Petrovich, E., Haviv, H., Goldshleger, R., et al. (2007) Purification of the human alpha2 Isoform of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris*. Stabilization by lipids and FXVD1. *Biochemistry.* 46(51): 14937-14950.
241. Lim, W. K., Wren, B., Jepson, N., Roy, S., et al. (1999) Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 83(7): 1132-1134, A1139.
242. Lin, M. H., Romsos, D. R., Akera, T. and Leveille, G. A. (1981) Functional correlates of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in lean and obese (ob/ob) mice. *Metabolism.* 30(5): 431-438.
243. Lin, M. H., Romsos, D. R., Akera, T. and Leveille, G. A. (1978) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme units in skeletal muscle from lean and obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 80(2): 398-404.
244. Lindholm, C. R., Ertel, R. L., Bauwens, J. D., Schmuck, E. G., et al. (2013) A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *J Physiol Biochem.* 69(2): 165-175.
245. Ling, S., Komesaroff, P. and Sudhir, K. (2006) Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond).* 111(2): 107-118.
246. Lingrel, J. B. (2010) The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 72: 395-412.
247. Lingrel, J. B. and Kuntzweiler, T. (1994) Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* 269(31): 19659-19662.
248. Liu, C., Bai, Y., Chen, Y., Wang, Y., et al. (2012) Reduction of Na/K-ATPase potentiates marinobufagenin-induced cardiac dysfunction and myocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 287(20): 16390-16398.
249. Liu, C. G., Xu, K. Q., Xu, X., Huang, J. J., et al. (2007) 17Beta-oestradiol regulates the expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beta1-subunit, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase iv in H9C2 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(10): 998-1004.
250. Liu, D. and Bachmann, K. A. (1998) An investigation of the relationship between estrogen, estrogen metabolites and blood cholesterol levels in ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 286(1): 561-568.
251. Long, Y. C. and Zierath, J. R. (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 116(7): 1776-1783.
252. Lopaschuk, G. D., Belke, D. D., Gamble, J., Itoi, T., et al. (1994) Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1213(3): 263-276.

253. Lopaschuk, G. D., Collins-Nakai, R., Olley, P. M., Montague, T. J., et al. (1994) Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia. *Am Heart J.* 128(1): 61-67.
254. Lopaschuk, G. D., Folmes, C. D. and Stanley, W. C. (2007) Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 101(4): 335-347.
255. Lopaschuk, G. D. and Russell, J. C. (1991) Myocardial function and energy substrate metabolism in the insulin-resistant JCR:LA corpulent rat. *J Appl Physiol.* 71(4): 1302-1308.
256. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-275.
257. Luiken, J. J., Arumugam, Y., Dyck, D. J., Bell, R. C., et al. (2001) Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J Biol Chem.* 276(44): 40567-40573.
258. Luiken, J. J., Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., et al. (2003) Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes.* 52(7): 1627-1634.
259. Luiken, J. J., Koonen, D. P., Willems, J., Zorzano, A., et al. (2002) Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes.* 51(10): 3113-3119.
260. Luiken, J. J., van Nieuwenhoven, F. A., America, G., van der Vusse, G. J., et al. (1997) Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J Lipid Res.* 38(4): 745-758.
261. Madani, S., De Girolamo, S., Munoz, D. M., Li, R. K., et al. (2006) Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 69(3): 716-725.
262. Malcolm, D. D., Burns, T. L., Mahoney, L. T. and Lauer, R. M. (1993) Factors affecting left ventricular mass in childhood: the Muscatine Study. *Pediatrics.* 92(5): 703-709.
263. Mandusic, V., Radak, D., Markicevic, M., Perovic, M., et al. (2011) Role of estrogen and estrogen receptors in cancer pathology. *Endocrinology Studies* 1(e5): 19-23.
264. Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 129(7): 1261-1274.
265. Manrique, C., Lastra, G., Habibi, J., Mugerfeld, I., et al. (2012) Loss of Estrogen Receptor alpha Signaling Leads to Insulin Resistance and Obesity in Young and Adult Female Mice. *Cardiorenal Med.* 2(3): 200-210.
266. Maravic-Stojkovic, V., Lausevic-Vuk, L. J., Obradovic, M., Jovanovic, P., et al. (2013) Copeptin Level After Carotid Endarterectomy and Perioperative Stroke. *Angiology.*
267. Marciniak, A., Jamroz-Wisniewska, A., Borkowska, E. and Beltowski, J. (2005) Time-dependent effect of leptin on renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Acta Biochim Pol.* 52(4): 803-809.
268. Martini, F. H., Timmons, M. J. and Tallitsch, R. B. (2007). *Human Anatomy* Pearson, Inc. publishing as Pearson Benjamin Cummings.
269. Masek, J. and Fabry, P. (1959) High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia.* 15: 444-445.

270. Matsui, T. and Rosenzweig, A. (2005) Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 38(1): 63-71.
271. Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28(7): 412-419.
272. Mauro, L., Salerno, M., Panno, M. L., Bellizzi, D., et al. (2001) Estradiol increases IRS-1 gene expression and insulin signaling in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 288(3): 685-689.
273. Mazumder, P. K., O'Neill, B. T., Roberts, M. W., Buchanan, J., et al. (2004) Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes.* 53(9): 2366-2374.
274. McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., et al. (1999) Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res.* 40(8): 1371-1383.
275. Melis, M. G., Troffa, C., Manunta, P., Pinna Parpaglia, P., et al. (1990) [Effect of menstrual cycle hormones on cation transport in the red-cell membrane]. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 66(7): 679-684.
276. Meng, R., Pei, Z., Zhang, A., Zhou, Y., et al. (2011) AMPK activation enhances PPARalpha activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Arch Biochem Biophys.* 511(1-2): 1-7.
277. Messerli, F. H. (1986) Cardiopathy of obesity--a not-so-Victorian disease. *N Engl J Med.* 314(6): 378-380.
278. Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., et al. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15(6): 1292-1300.
279. Milani, R. V., Lavie, C. J., Mehra, M. R., Ventura, H. O., et al. (2006) Left ventricular geometry and survival in patients with normal left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol.* 97(7): 959-963.
280. Miller, T. A., LeBrasseur, N. K., Cote, G. M., Trucillo, M. P., et al. (2005) Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 336(1): 309-315.
281. Miya, Y., Sumino, H., Ichikawa, S., Nakamura, T., et al. (2002) Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women. *Hypertens Res.* 25(2): 153-159.
282. Moriarty, K., Kim, K. H. and Bender, J. R. (2006) Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology.* 147(12): 5557-5563.
283. Morisco, C., Lembo, G. and Trimarco, B. (2006) Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med.* 16(6): 183-188.
284. Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sorensen, T. L., et al. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature.* 450(7172): 1043-1049.
285. Muller-Ehmsen, J., Juvvadi, P., Thompson, C. B., Tumyan, L., et al. (2001) Ouabain and substrate affinities of human Na(+)-K(+)-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(4): C1355-1364.
286. Muniyappa, R., Montagnani, M., Koh, K. K. and Quon, M. J. (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 28(5): 463-491.



287. Murphy, E. (2011) Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res.* 109(6): 687-696.
288. Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D. W., Mobbs, C. V., et al. (2007) Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7): 2501-2506.
289. Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. and Anversa, P. (2003) Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 92(2): 139-150.
290. Niba, E. T., Nagaya, H., Kanno, T., Tsuchiya, A., et al. (2013) Crosstalk between PI3 Kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK Pathways Downstream PDGF Receptor. *Cell Physiol Biochem.* 31(6): 905-913.
291. Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (2002) Estrogen receptor action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 12(4): 237-257.
292. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81(4): 1535-1565.
293. Norgaard, A., Bagger, J. P., Bjerregaard, P., Baandrup, U., et al. (1988) Relation of left ventricular function and Na,K-pump concentration in suspected idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 61(15): 1312-1315.
294. Oberg, B. and Rosell, S. (1967) Sympathetic control of consecutive vascular sections in canine subcutaneous adipose tissue. *Acta Physiol Scand.* 71(1): 47-56.
295. Ohtsubo, M., Noguchi, S., Takeda, K., Morohashi, M., et al. (1990) Site-directed mutagenesis of Asp-376, the catalytic phosphorylation site, and Lys-507, the putative ATP-binding site, of the alpha-subunit of *Torpedo californica* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1021(2): 157-160.
296. Oishi, K., Zheng, B. and Kuo, J. F. (1990) Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem.* 265(1): 70-75.
297. Okere, I. C., Chandler, M. P., McElfresh, T. A., Rennison, J. H., et al. (2006) Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(1): H38-44.
298. Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Corradi, D., et al. (1996) Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 28(7): 1463-1477.
299. Ouwens, D. M., Boer, C., Fodor, M., de Galan, P., et al. (2005) Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia.* 48(6): 1229-1237.
300. Pagano, C., Calcagno, A., Granzotto, M., Calabrese, F., et al. (2008) Heart lipid accumulation in obese non-diabetic rats: effect of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18(3): 189-197.
301. Palacios, J., Marusic, E. T., Lopez, N. C., Gonzalez, M., et al. (2004) Estradiol-induced expression of N<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5): H1793-1800.
302. Pasceri, V., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 102(18): 2165-2168.

303. Paspala, I., Katsiki, N., Kapoukranidou, D., Mikhailidis, D. P., et al. (2012) The role of psychobiological and neuroendocrine mechanisms in appetite regulation and obesity. *Open Cardiovasc Med J.* 6: 147-155.
304. Patten, R. D., Pourati, I., Aronovitz, M. J., Baur, J., et al. (2004) 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res.* 95(7): 692-699.
305. Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., et al. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10(4): 885-892.
306. Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Lubahn, D., et al. (2010) Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol.* 24(11): 2152-2165.
307. Pelicci, G., Dente, L., De Giuseppe, A., Verducci-Galletti, B., et al. (1996) A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene.* 13(3): 633-641.
308. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Salcini, A. E., Romano, A., et al. (1995) Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene.* 11(5): 899-907.
309. Pepys, M. B. and Hirschfield, G. M. (2003) C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111(12): 1805-1812.
310. Pierre, S., Bats, A. S. and Coumoul, X. (2011) Understanding SOS (Son of Sevenless). *Biochem Pharmacol.* 82(9): 1049-1056.
311. Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., et al. (2006) Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 113(6): 898-918.
312. Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., et al. (1999) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 277(1 Pt 1): C1-9.
313. Pudek, M. R., Seccombe, D. W., Jacobson, B. E. and Whitfield, M. F. (1983) Seven different digoxin immunoassay kits compared with respect to interference by a digoxin-like immunoreactive substance in serum from premature and full-term infants. *Clin Chem.* 29(11): 1972-1974.
314. Pulakat, L., DeMarco, V. G., Ardhanari, S., Chockalingam, A., et al. (2011) Adaptive mechanisms to compensate for overnutrition-induced cardiovascular abnormalities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301(4): R885-895.
315. Purcell, N. H., Wilkins, B. J., York, A., Saba-El-Leil, M. K., et al. (2007) Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(35): 14074-14079.
316. Rajapurohitam, V., Gan, X. T., Kirshenbaum, L. A. and Karmazyn, M. (2003) The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 93(4): 277-279.
317. Rathore, S. S., Curtis, J. P., Wang, Y., Bristow, M. R., et al. (2003) Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure. *JAMA.* 289(7): 871-878.
318. Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L., et al. (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol.* 18(12): 2854-2865.

319. Ren, J., Hintz, K. K., Roughead, Z. K., Duan, J., 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(5): H1800-1807.
320. Resanovic, I., Rizzo, M., Zafirovic, S., Bjelogrljic, P., et al. (2013) Anti-atherogenic Effects of 17beta-Estradiol. *Horm Metab Res.*
321. Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J. F., et al. (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology.* 150(5): 2109-2117.
322. Ricci, E., Smallwood, S., Chouabe, C., Mertani, H. C., et al. (2006) Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obesity (Silver Spring).* 14(5): 778-786.
323. Rider, O. J., Cox, P., Tyler, D., Clarke, K., et al. (2013) Myocardial substrate metabolism in obesity. *Int J Obes (Lond).* 37(7): 972-979.
324. Rocha, M., Bing, C., Williams, G. and Puerta, M. (2004) Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem.* 15(6): 328-334.
325. Roden, M. (2005) Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond).* 29 Suppl 2: S111-115.
326. Rodrigo, R., Bachler, J. P., Araya, J., Prat, H., et al. (2007) Relationship between (Na + K)-ATPase activity, lipid peroxidation and fatty acid profile in erythrocytes of hypertensive and normotensive subjects. *Mol Cell Biochem.* 303(1-2): 73-81.
327. Rojas, J. M., Oliva, J. L. and Santos, E. (2011) Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes Cancer.* 2(3): 298-305.
328. Rolfe, D. F. and Brown, G. C. (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 77(3): 731-758.
329. Saha, A. K., Xu, X. J., Lawson, E., Deoliveira, R., et al. (2010) Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 59(10): 2426-2434.
330. Sale, E. M. and Sale, G. J. (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci.* 65(1): 113-127.
331. Salpeter, S. R., Walsh, J. M., Ormiston, T. M., Greyber, E., et al. (2006) Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab.* 8(5): 538-554.
332. Samuel, V. T., Petersen, K. F. and Shulman, G. I. (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet.* 375(9733): 2267-2277.
333. Samuels, L., Reinecke, R. and HA., B. (1942) Effect of diet on glucose tolerance and liver and muscle glycogen of hypophysectomized and normal rats. *Endocrinology.* 31(1): 42-45.
334. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307(5712): 1098-1101.
335. Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., et al. (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem.* 275(8): 5379-5387.
336. Scheid, M. P., Marignani, P. A. and Woodgett, J. R. (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol.* 22(17): 6247-6260.

337. Schmidt, T. A., Allen, P. D., Colucci, W. S., Marsh, J. D., et al. (1993) No adaptation to digitalization as evaluated by digitalis receptor (Na,K-ATPase) quantification in explanted hearts from donors without heart disease and from digitalized recipients with end-stage heart failure. *Am J Cardiol.* 71(1): 110-114.
338. Schmidt, T. A., Hasselbalch, S., Larsen, J. S., Bundgaard, H., et al. (1996) Reduction of cerebral cortical [3H]ouabain binding site (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase density in dementia as evaluated in fresh human cerebral cortical biopsies. *Brain Res Cogn Brain Res.* 4(4): 281-287.
339. Schmidt, T. A., Larsen, J. S. and Kjeldsen, K. (1992) Quantification of rat cerebral cortex Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: effect of age and potassium depletion. *J Neurochem.* 59(6): 2094-2104.
340. Schroeder, M. A., Cochlin, L. E., Heather, L. C., Clarke, K., et al. (2008) In vivo assessment of pyruvate dehydrogenase flux in the heart using hyperpolarized carbon-13 magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(33): 12051-12056.
341. Schwinger, R. H., Bundgaard, H., Muller-Ehmsen, J. and Kjeldsen, K. (2003) The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 57(4): 913-920.
342. Schwinger, R. H., Wang, J., Frank, K., Muller-Ehmsen, J., et al. (1999) Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity but unchanged Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation.* 99(16): 2105-2112.
343. Shah, A. and Shannon, R. P. (2003) Insulin resistance in dilated cardiomyopathy. *Rev Cardiovasc Med.* 4 Suppl 6: S50-57.
344. Shamraj, O. I., Grupp, I. L., Grupp, G., Melvin, D., et al. (1993) Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovasc Res.* 27(12): 2229-2237.
345. Shamraj, O. I., Melvin, D. and Lingrel, J. B. (1991) Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 179(3): 1434-1440.
346. Shaul, Y. D. and Seger, R. (2007) The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 1773(8): 1213-1226.
347. Shi, H. and Clegg, D. J. (2009) Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav.* 97(2): 199-204.
348. Shibata, H., Spencer, T. E., Onate, S. A., Jenster, G., et al. (1997) Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 52: 141-164; discussion 164-145.
349. Shimizu, I., Minamino, T., Toko, H., Okada, S., et al. (2010) Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest.* 120(5): 1506-1514.
350. Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F. and Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* 459(7245): 446-450.
351. Shiojima, I. and Walsh, K. (2006) Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 20(24): 3347-3365.
352. Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., et al. (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 15(3): 342-355.
353. Sivabalan, S., Renuka, S. and Menon, V. P. (2008) Fat feeding potentiates the diabetogenic effect of dexamethasone in Wistar rats. *Int Arch Med.* 1(1): 7.
354. Skou, J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.* 23(2): 394-401.

355. Song, R. X., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., et al. (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER $\alpha$ -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 16(1): 116-127.
356. Sovershaev, M. A., Egorina, E. M., Andreassen, T. V., Jonassen, A. K., et al. (2006) Preconditioning by 17 $\beta$ -estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(4): H1554-1562.
357. Stewart, J. C. (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 104(1): 10-14.
358. Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., et al. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science.* 277(5325): 567-570.
359. Stubbins, R. E., Najjar, K., Holcomb, V. B., Hong, J., et al. (2012) Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* 14(1): 58-66.
360. Sudar, E. (2011). Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom. *Faculty of Biology.* Belgrade, Belgrade. PhD.
361. Sudar, E., Dobutovic, D., Milosavljevic, T., Putnikovic, B., et al. (2009) Interactive effects of insulin and  $\beta$ -estradiol on protein kinase B phosphorylation in adult rat cardiomyocytes. *Acta Chim. Slov.* 56: 723-728.
362. Sudar, E., Velebit, J., Gluvic, Z., Zakula, Z., et al. (2008) Hypothetical mechanism of sodium pump regulation by estradiol under primary hypertension. *J Theor Biol.* 251(4): 584-592.
363. Sugden, P. H. and Clerk, A. (2001) Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res.* 88(10): 975-977.
364. Sweadner, K. J. and Rael, E. (2000) The FXDY gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics.* 68(1): 41-56.
365. Szalay, L., Shimizu, T., Suzuki, T., Yu, H. P., et al. (2006) Estradiol improves cardiac and hepatic function after trauma-hemorrhage: role of enhanced heat shock protein expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(3): R812-818.
366. Tang, W., Wei, Y., Le, K., Li, Z., et al. (2011) Mitogen-activated protein kinases ERK 1/2- and p38-GATA4 pathways mediate the Ang II-induced activation of FGF2 gene in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol.* 81(4): 518-525.
367. Taras, M. J., Greenberg, A. E., Hoak, R. D. and Rand, M. C. (1971). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington, DC American Public Health Association.
368. Tepavcevic, S., Koricanac, G., Zakula, Z., Milosavljevic, T., et al. (2011) Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters. *Horm Metab Res.* 43(8): 524-530.
369. Therien, A. G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(3): C541-566.
370. Thum, T. and Borlak, J. (2002) Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J.* 16(12): 1537-1549.
371. Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., et al. (2006) Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell.* 17(1): 317-326.
372. Tian, Y. Q., Li, S. S., Su, X. D., Zhang, G. Z., et al. (2012) Effects of pioglitazone on high-fat-diet-induced ventricular remodeling and dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 17(2): 223-228.

373. Tokhtaeva, E., Clifford, R. J., Kaplan, J. H., Sachs, G., et al. (2012) Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase alpha-beta heterodimers. *J Biol Chem.* 287(31): 26115-26125.
374. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9): 4350-4354.
375. Treasure, J. L., Ploth, D. W. and Treasure, T. (1986) Measurement of potassium concentration on-line with an ion-specific electrode during hemodialysis. *Miner Electrolyte Metab.* 12(3): 161-164.
376. Unger, R. H. and Orci, L. (2002) Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1585(2-3): 202-212.
377. Unger, R. H., Zhou, Y. T. and Orci, L. (1999) Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5): 2327-2332.
378. Uydu, H. A., Yildirmis, S., Orem, C., Calapoglu, M., et al. (2012) The effects of atorvastatin therapy on rheological characteristics of erythrocyte membrane, serum lipid profile and oxidative status in patients with dyslipidemia. *J Membr Biol.* 245(11): 697-705.
379. van der Vusse, G. J., Glatz, J. F., Stam, H. C. and Reneman, R. S. (1992) Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev.* 72(4): 881-940.
380. van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., et al. (2001) 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 104(12): 1419-1423.
381. Venugopal, S. K., Devaraj, S. and Jialal, I. (2005) Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol.* 166(4): 1265-1271.
382. Verma, S., Wang, C. H., Weisel, R. D., Badiwala, M. V., et al. (2003) Hyperglycemia potentiates the proatherogenic effects of C-reactive protein: reversal with rosiglitazone. *J Mol Cell Cardiol.* 35(4): 417-419.
383. Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294(5545): 1299-1304.
384. Vlkovicova, J., Javorkova, V., Pechanova, O. and Vrbjar, N. (2005) Gender difference in functional properties of Na,K-ATPase in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 76(9): 971-982.
385. Voloshenyuk, T. G. and Gardner, J. D. (2010) Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(2): R683-693.
386. Vrbjar, N., Bernatova, I. and Pechanova, O. (1999) Functional alterations of cardiac (Na,K)-ATPase in L-NAME induced hypertension. *Gen Physiol Biophys.* 18 Suppl 1: 10-12.
387. Vrbjar, N., Wachalova, K., Sipola, M. and Vapaatalo, H. (2002) Sodium and ATP affinities of the cardiac Na(+),K(+)-ATPase in spontaneously hypertensive rats. *Gen Physiol Biophys.* 21(3): 303-313.
388. Wagner, J. D., Thomas, M. J., Williams, J. K., Zhang, L., et al. (1998) Insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in ovariectomized monkeys with estradiol alone or combined with norgestrel acetate. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(3): 896-901.
389. Wall, S. R. and Lopaschuk, G. D. (1989) Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1006(1): 97-103.

390. Wang, C. H., Li, S. H., Weisel, R. D., Fedak, P. W., et al. (2003) C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*. 107(13): 1783-1790.
391. Wang, H., Jessup, J. A., Lin, M. S., Chagas, C., et al. (2012) Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2.Lewis rats. *Cardiovasc Res*. 94(1): 96-104.
392. Wang, M., Tsai, B. M., Reiger, K. M., Brown, J. W., et al. (2006) 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 40(2): 205-212.
393. Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(11): 875-885.
394. Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S. (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112(12): 1785-1788.
395. Wende, A. R. and Abel, E. D. (2010) Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1801(3): 311-319.
396. Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 118(Pt 5): 843-846.
397. Whiteman, E. L., Cho, H. and Birnbaum, M. J. (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 13(10): 444-451.
398. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. 79(1): 143-180.
399. Wiley, J. S. and Shaller, C. C. (1977) Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes. *J Clin Invest*. 59(6): 1113-1119.
400. Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., et al. (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 94(1): 110-118.
401. Wilson, R. D. and Islam, M. S. (2012) Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep*. 64(1): 129-139.
402. Wisneski, J. A., Stanley, W. C., Neese, R. A. and Gertz, E. W. (1990) Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. *J Clin Invest*. 85(5): 1648-1656.
403. Woo, A. L., James, P. F. and Lingrel, J. B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 275(27): 20693-20699.
404. Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., et al. (2003) A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 133(4): 1081-1087.
405. Wu, Q., Zhao, Z., Sun, H., Hao, Y. L., et al. (2008) Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol*. 93(9): 1034-1043.
406. Wutzler, A., Nee, J., Boldt, L. H., Kuhnle, Y., et al. (2013) Improvement of cerebral oxygen saturation after successful electrical cardioversion of atrial fibrillation. *Europace*.
407. Xie, Z., Wang, Y., Liu, G., Zolotarjova, N., et al. (1996) Similarities and differences between the properties of native and recombinant Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases. *Arch Biochem Biophys*. 330(1): 153-162.
408. Xu, F. P., Chen, M. S., Wang, Y. Z., Yi, Q., et al. (2004) Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation*. 110(10): 1269-1275.

409. Yonezawa, R., Wada, T., Matsumoto, N., Morita, M., et al. (2012) Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(4): E445-456.
410. Yu, H. P. and Chaudry, I. H. (2009) The role of estrogen and receptor agonists in maintaining organ function after trauma-hemorrhage. *Shock.* 31(3): 227-237.
411. Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J. and Coppack, S. W. (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(4): 972-978.
412. Zahler, R., Gilmore-Hebert, M., Sun, W. and Benz, E. J. (1996) Na, K-ATPase isoform gene expression in normal and hypertrophied dog heart. *Basic Res Cardiol.* 91(3): 256-266.
413. Zhang, Y. and Ren, J. (2011) Role of cardiac steatosis and lipotoxicity in obesity cardiomyopathy. *Hypertension.* 57(2): 148-150.
414. Zhang, Y. X., Cliff, W. J., Schoefl, G. I. and Higgins, G. (1999) Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 145(2): 375-379.
415. Zheng, H., Li, Y., Dai, W., Wei, C., et al. (2012) Role of endogenous estrogen on the incidence of coronary heart disease in men. *Angiology.* 63(8): 591-596.
416. Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., et al. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(4): 1784-1789.
417. Zhu, L., Brown, W. C., Cai, Q., Krust, A., et al. (2013) Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes.* 62(2): 424-434.
418. Zib, I., Jacob, A. N., Lingvay, I., Salinas, K., et al. (2007) Effect of pioglitazone therapy on myocardial and hepatic steatosis in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *J Investig Med.* 55(5): 230-236.



## 8. BIOGRAFIJA

Milan M. Obradović, rođen 19. februara 1983. godine u mestu Gračac, Lika, Republika Hrvatska, završio je Biološki fakultet, smer profesor biologije i hemije, Univerziteta u Beogradu, 2007. godine, odbranivši diplomski rad 21.09.2007. godine.

Od 2010. upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Iste godine zaposlen je u Institutu "Vinča" u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, department „Molekularna endokrinologija i bolesti metabolizma“, gde je kao istraživač saradnik, u potpunosti uradio eksperimentalni deo teze.

Doktorska disertacija pod naslovom „Efekti estradiola na regulaciju natrijum-kalijumove pumpe i morfologiju srca normalno uhranjenih i gojaznih pacova“ prihvaćena je na Univerzitetu u Beogradu 07.12.2012. godine.

Trenutno je angažovan na projektu: „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja“ (br. 173033), čiji je rukovodilac dr Esma R. Isenović, Naučni savetnik. Takođe je bio i saradnik na projektima internacionalne saradnje COST ACTION BM 0602 i CM 0602.

U svom dosadašnjem radu bio je saradnik na 22 publikacije objavljene u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na 5 radova saopštenih na skupu međunarodnog i domaćeg značaja.

Glavna oblast naučno-istraživačkog rada mu je: molekularna endokrinologija, dijabetes, gojaznost i kardiovaskularne bolesti.

## 9. PRILOZI

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Обрадовић М. Милан \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3039/2010 \_\_\_\_\_

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Ефекти естрадиола на регулацију натријум-калијумове пумпе и**

**морфологију срца нормално ухрањених и гојазних пацова**

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

Потпис докторанта

У Београду, \_\_\_\_\_ 23.10.2013. \_\_\_\_\_

*Милан Обрадовић*

## Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**Име и презиме аутора Обрадовић М. МиланБрој индекса Б3039/2010Студијски програм Биологија: Анимална и хумана физиологијаНаслов рада Ефекти естрадиола на регулацију натријум-калијумове пумпе  
и морфологију срца нормално ухрањених и гојазних пацова

Ментор

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

Потписани/а Обрадовић М. Милан

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 докторанта

У Београду, 23.10.2013.

## Прилог 3.

**Изјава о коришћењу**

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

**Ефекти естрадиола на регулацију натријум-калијумове пумпе и**

**морфологију срца нормално ухрањених и гојазних пацова**

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у 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 докторанта**

У Београду, \_\_\_\_\_ 23.10.2013.

*Милан Орадовић*