

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana D. Vasiljević

**ULOGA GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA  
U REGULACIJI ENERGETSKOG  
METABOLIZMA I INFLAMACIJE U JETRI  
PACOVA NAKON ISHRANE OBOGAĆENE  
FRUKTOZOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana D. Vasiljević

**THE ROLE OF GLUCOCORTICOID  
HORMONES IN REGULATION OF ENERGY  
METABOLISM AND INFLAMMATION IN THE  
LIVER OF FRUCTOSE-FED RAT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

## MENTORI

dr Nataša Veličković, naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## KOMISIJA

dr Nataša Veličković, naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Korićanać, naučni savetnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Beograd

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

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beograd, u okviru projekta „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma-molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“ (br. 41009) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Hvala,*

*Dr Nataši Veličković, mojoj mentorki, na svemu što me je naučila i podstakla da naučim, na energiji i trudu koji je uložila u realizaciju ove teze, na strpljenju dok je radila sa mnom i za mene, na nesebično pruženim savetima, na upornom preispitivanju, na spremnosti da me sasluša i uvaži moje mišljenje, na prijateljskim razgovorima i inspiraciji da budem bolji čovek.*

*Dr Gordani Matić na ukazanom poverenju i pruženoj prilici za rad u nauci, na uspešnom osmišljavanju tematike projekta u okviru koga je urađena ova disertacija, na posvećenosti, dobronamernim savetima i velikoj podršci.*

*Dr Goranu Korićancu na eksperimentima koji su urađeni u njegovoj laboratoriji, na nesebično ustupljenim antitelima, na inspirativnim pitanjima i savetima koji su unapredili ovu disertaciju.*

*Dr Ani Đorđević na nepresušnoj energiji kojom nas je podsticala da težimo ka višem i boljem, na velikoj i nesebičnoj pomoći, na kreativnosti i vedrini koju je unosila u svakodnevni laboratorijski život.*

*Dr Danijeli Vojnović Milutinović na detaljnim protokolima i prvim eksperimentalnim koracima, na brizi, savetima, prijatnim razgovorima i osećaju da na nju uvek možemo da računamo.*

*Dr Jadranki Dunderski što nam je ustupila kancelariju i time poboljšala uslove za rad.*

*Bilji Bursać, sa kojom sam zakoračila u svet nauke, na svim eksperimentima koje smo uradile uz smeh, na podeli bremena pripremanja ispita, na bodrenju i veri da uvek možemo više, na poverenju i pravom drugarstvu.*

*Marini Nikolić na inspirativnim razgovorima i prijatnoj radnoj atmosferi.*

*Koleginicama, Ivani, Jeci i Sanji, na toleranciji i pomoći koju su mi pružile tokom izrade ove disertacije.*

*Mom Žekanu na ljubavi, bodrenju, razumevanju, strpljenju i pomoći, na tome što mi je bio oslonac i dao smisao mojim uspesima.*

*Mojim dragim roditeljima, Milenki i Dušanu, što su verovali u mene i uvek sve razumeli, na trudu, požrtvovanju, istrajnosti i velikoj emotivnoj, moralnoj i finansijskoj podršci. Ovu disertaciju posvećujem njima.*

# **Uloga glukokortikoidnih hormona u regulaciji energetskeg metabolizma i inflamacije u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom**

## **Rezime**

Jedan od najznačajnijih uzroka razvoja metaboličkog sindroma je moderan način ishrane bogate fruktozom koja u jetri pokreće *de novo* lipogenezu, glukoneogenezu i hroničnu inflamaciju, što kumulativno vodi razvoju insulinske rezistencije. Glukokortikoidni hormoni su važni regulatori energetskeg metabolizma, koji deluju antagonistički u odnosu na insulin i mogu da doprinesu patofiziologiji metaboličkog sindroma. Metabolički efekti glukokortikoida u jetri najčešće se pripisuju njihovoj povećanoj lokalnoj regeneraciji što ukazuje na značaj enzima koji učestvuju u njihovom prereceptorskom metabolizmu. Ipak, za regulaciju procesa glukoneogeneze, sinteze triglicerida i metaboličke inflamacije, neophodna je aktivacija glukokortikoidnog receptora i regulacija ekspresije ciljnih gena. Polazeći od tih saznanja, cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uloga signalnog puta glukokortikoida u razvoju simptoma metaboličkog sindroma, deregulaciji energetskeg metabolizma i razvoju inflamacije povezane sa metaboličkim sindromom u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom.

Tokom izrade ove studije primenjena su dva režima ishrane, što je bio preduslov za ispitivanje vrste i stepena metaboličkih promena izazvanih rastvorima fruktoze različite koncentracije (10% i 60%). Kombinovanjem molekularno-bioloških i biohemijskih metoda analizirani su efekti devetonedeljne ishrane obogaćene fruktozom na morfološke karakteristike i biohemijske parametre mužjaka Wistar pacova. Glukokortikoidna signalizacija u jetri je praćena na nivou prereceptorskog metabolizma, kao i na nivou ekspresije i aktivacije glukokortikoidnog receptora. Posebna pažnja je posvećena ispitivanju lipidnog metabolizma, metaboličke inflamacije i stepena insulinske osetljivosti.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da dugotrajna ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja koncentracije triglicerida u krvi pacova, ali ne i do hiperglikemije, hiperinsulinemije, niti povećanja telesne mase. Ipak, ishrana 60% rastvorom fruktoze dovodi do razvoja visceralne gojaznosti i povećanja relativne mase jetre. Ishrana

obogaćena fruktozom, bez obzira na koncentraciju, utiče na prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri pacova, ali ne i na koncentraciju tkivnog kortikosterona, što je u skladu sa odsustvom promena u aktivaciji glukokortikoidnog receptora i transkripciji njegovih ciljnih gena. Nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze stimulisana je sinteza triglicerida, ali se paralelno odigrava i mitohondrijalna  $\beta$ -oksidacija kao vrsta adaptivnog mehanizma na povećan nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. Sa druge strane, 60% fruktoza je veliko energetske opterećenje za metaboličke procese u jetri, što rezultira stimulisanom *de novo* lipogenezom i inhibiranom  $\beta$ -oksidacijom. Primenjene koncentracije fruktoze u jetri pacova dovode do razvoja metaboličke inflamacije i posledičnog slabljenja insulinske signalne kaskade.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da nepromenjen signalni put glukokortikoida predstavlja deo regulatornog mehanizma u jetri koji teži da ograniči posledice disbalansa između povećanog kalorijskog unosa izazvanog ishranom obogaćenom fruktozom i energetske potreba organizma. Razlike u količini fruktoze prisutne u ishrani najviše se odražavaju na metabolizam lipida u jetri, ali taj efekat nije posredovan glukokortikoidima. Rezultati ove disertacije daju doprinos boljem razumevanju kompleksne veze između molekularnih mehanizama delovanja glukokortikoidnih hormona i kliničkih manifestacija metaboličkog sindroma.

**Ključne reči:** glukokortikoidni hormoni, 11 $\beta$ HSD1, *de novo* lipogeneza, inflamacija, insulinska rezistencija, fruktoza, jetra

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biohemija i molekularna biologija

**UDK broj:** 577.175.5:[577.126 + 612.017]:[636.028:591.436]:577.114.3 (043.3)

# **The role of glucocorticoid hormones in regulation of energy metabolism and inflammation in the liver of fructose-fed rat**

## **Abstract**

One of the major causes of metabolic syndrome development is modern diet rich in fructose. Fructose-enriched diet initiates *de novo* lipogenesis, gluconeogenesis and chronic inflammation in the liver, which cumulatively lead to progress of insulin resistance. Glucocorticoid hormones are important regulators of energy metabolism that act antagonistically to insulin and may contribute to metabolic syndrome pathophysiology. Metabolic effects of glucocorticoids in the liver are usually attributed to their increased local regeneration, pointing to the importance of enzymes involved in prereceptor glucocorticoid metabolism. However, glucocorticoid receptor activation and modulation of its target genes expression are required for the regulation of gluconeogenesis, triglyceride synthesis and metabolic inflammation. The aim of this doctoral dissertation was to investigate the role of glucocorticoid signaling pathway in development of the metabolic syndrome symptoms, deregulation of energy metabolism and development of metabolic syndrome-associated inflammation in the liver of fructose-fed rat.

In this study, two diet regimes were applied as a prerequisite for testing the type and degree of metabolic changes induced by different concentrations of fructose solution (10% and 60%). Morphological characteristics and biochemical alterations in the liver of male Wistar rats upon the nine-week fructose-rich diets were analyzed by combining standard experimental methods of biochemistry and molecular biology. Glucocorticoid signaling in the liver was examined at the level of prereceptor metabolism and the level of expression and activation of glucocorticoid receptor. Special attention was paid at investigation of lipid metabolism, metabolic inflammation and changes in insulin sensitivity.

The results of this study showed that the long-term diets enriched in fructose (10% and 60%) led to increased circulating triglyceride concentration, but not to hyperglycemia, hyperinsulinemia or increase in body weight. However, only consumption of 60% fructose solution led to visceral obesity and an increase of relative liver mass. Fructose-enriched diet, regardless of concentration, affected prereceptor glucocorticoid metabolism in the rat liver,



without changes in the concentration of corticosterone within the tissue, which is consistent with the absence of alterations in the glucocorticoid receptor activation and transcription of its target genes. Upon consumption of 10% fructose solution, both triglyceride synthesis and mitochondrial  $\beta$ -oxidation were stimulated in the liver, probably as an adaptive mechanism to increased levels of free fatty acids in the circulation. On the other hand, consumption of 60% fructose solution appeared to be a great burden for the metabolic processes in the liver, resulting in a stimulation of *de novo* lipogenesis and inhibition of  $\beta$ -oxidation. Both applied fructose-enriched diets led to development of metabolic inflammation and subsequent attenuation of insulin signaling in the rat liver.

According to the results presented in this study it can be concluded that unaltered glucocorticoid signaling pathway is a part of hepatic regulatory mechanism that tends to limit the consequences of the imbalance between increased energy intake caused by fructose-enriched diet and energy requirements of the body. Differences in the amount of dietary fructose are mainly reflected in the hepatic lipid metabolism, but the effects of fructose are not mediated by glucocorticoids. The results of this dissertation contribute to better understanding of the complex relationship between molecular mechanisms of glucocorticoid actions and clinical manifestations of metabolic syndrome.

**Keywords:** glucocorticoid hormones, 11 $\beta$ HSD1, *de novo* lipogenesis, inflammation, insulin resistance, fructose, liver

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Biochemistry and molecular biology

**UDC number:** 577.175.5:[577.126 + 612.017]:[636.028:591.436]:577.114.3 (043.3)

## SKRAĆENICE

|            |  |
|------------|--|
| ACAA       | acetil-CoA aciltransferaza (eng. <i>acetyl-CoA acyltransferase</i> )   |
| ACC        | acetil-CoA karboksilaza (eng. <i>acetyl-CoA carboxylase</i> )  |
| ACD        | acil-CoA dehidrogenaza (eng. <i>acyl-CoA dehydrogenase</i> )   |
| Acetil-CoA | acetil-koenzim A (eng. <i>acetyl-coenzyme A</i> )  |
| ACTH       | adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i> )  |
| AGPAT      | acilglicerol-3-fosfat aciltransferaza (eng. <i>acylglycerol-3-phosphate acyltransferase</i> )  |
| AMPK       | proteinska kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (eng. <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> )                              |
| AP-1       | transkripcioni regulator AP-1 (eng. <i>activator protein-1</i> )   |
| apoB 100   | apolipoprotein B 100   |
| C/EBP      | transkripcioni regulator koji se vezuje za pojačivač CCAAT (eng. <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i> )                                       |
| cAMP       | ciklični adenzin monofosfat (eng. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )  |
| ChREBP     | protein koji se vezuje za regulatorne sekvence koje odgovaraju na ugljene hidrate (eng. <i>carbohydrate response element binding protein</i> ) |
| CPT1       | karnitin palmitoil transferaza 1 (eng. <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i> )   |
| CRH        | kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>corticotropin-releasing hormone</i> )   |
| CRP        | C-reaktivni protein  |
| DAG        | diacilglicerol   |
| DAGT       | diacilglicerol aciltransferaza (eng. <i>diacylglycerol acyltransferase</i> )   |
| ECH        | enol-CoA hidrataza (eng. <i>enoyl-CoA hydratase</i> )  |
| ELOVL6     | elongaza masnih kiselina   |
| FABP       | protein koji vezuje masne kiseline (eng. <i>fatty acid binding protein</i> )   |
| FAS        | sintaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid synthase</i> )   |
| FAT        | translokaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid translocase</i> )  |
| FATP       | transportni protein masnih kiselina (eng. <i>fatty acid transporter protein</i> )  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| FOXO1                | transkripcijski regulator bitan za efekte insulina na glukoneogenezu i glikogenolizu (eng. <i>forkhead box protein O1</i> ) |
| G6PT                 | glukoza-6-fosfatni transporter (eng. <i>glucose-6-phosphate transporter</i> )   |
| GLUT                 | glukoza transporter   |
| GPAT                 | glicerol-3-fosfat aciltransferaza (eng. <i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i> )                                       |
| GR                   | glukokortikoidni receptor   |
| GRE                  | sekvence DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. <i>glucocorticoid response elements</i> )                             |
| H6PDH                | heksoza-6-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>hexose-6-phosphate dehydrogenase</i> )  |
| HADH                 | 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza (eng. <i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i> )   |
| HHA osa              | hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalna osa   |
| 11 $\beta$ HSD1      | 11 $\beta$ hidroksisteroid dehidrogenaza (eng. <i>11<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</i> )                   |
| IKK                  | kinaza koja fosforiliše I $\kappa$ B (eng. <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> )  |
| IL                   | interleukin   |
| IPGT test            | intraperitonealni test tolerancije na glukozu (eng. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i> )                         |
| IR                   | insulinski receptor   |
| IRS-1                | supstrat 1 insulinskog receptora (eng. <i>insulin receptor substrate 1</i> )  |
| I $\kappa$ B         | inhibitorski protein $\kappa$ B (eng. <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i> )  |
| JNK                  | kinaza N-terminalnog domena proteina c-Jun (eng. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> )  |
| LXR                  | receptor X jetre (eng. <i>liver X receptor</i> )  |
| MAPK                 | proteinske kinaze aktivirane mitogenima (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )                                     |
| MAPKK                | MAPK kinaza (eng. <i>mitogen-activated protein kinase kinases</i> )   |
| mTOR                 | ciljni protein rapamicina kod sisara (eng. <i>mammalian target of rapamycin</i> )   |
| MTP                  | mikrozomalni protein koji transportuje trigliceride (eng. <i>microsomal triglyceride transfer protein</i> )                 |
| NADP <sup>+</sup> /H | oksidovano/redukovani nikotinamid dinukleotid fosfat  |
| NAFLD                | nealkoholna masna bolest jetre (eng. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> )  |
| NASH                 | nealkoholni steatohepatitis   |
| NF $\kappa$ B        | nuklearni faktor $\kappa$ B   |
| NLS                  | signal za jedarnu lokalizaciju (eng. <i>nuclear localization signal</i> )   |

|                  |  |
|------------------|--|
| NO               | azot-monoksid (eng. <i>nitric oxide</i> )  |
| PAP              | fosfatidat fosfataza (eng. <i>phosphatidic acid phosphatase</i> )  |
| PDK              | kinaza zavisna od 3-fosfoinozitida (eng. <i>3-phosphoinositide-dependent kinase</i> )  |
| PEPCK            | fosfoenol piruvat karboksikinaza (eng. <i>phosphoenol pyruvate carboxykinase</i> )   |
| PGC-1            | koaktivator 1 receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i> ) |
| PI3K             | fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )   |
| PIP <sub>3</sub> | fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (eng. <i>phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i> )  |
| PKC              | protein kinaza C   |
| POMC             | Proopiomelanokortin (eng. <i>proopiomelanocortin</i> )   |
| PPAR $\alpha$    | receptor $\alpha$ aktiviran peroksizomalnim proliferatorom (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i> )         |
| PTP1B            | proteinska tirozin fosfataza 1B  |
| SCD              | steroil-CoA desaturaza   |
| SIRT             | sirtuin  |
| SOCS3            | supresor signalnog puta citokina 3 (eng. <i>supressor of cytokine signaling-3</i> )  |
| SOD2             | dismutaza 2 superoksida  |
| SREBP-1c         | protein 1c koji se vezuje za sterol regulatorni element (eng. <i>sterol regulatory element binding protein 1c</i> )                              |
| STAT             | protein koji prenosi signal i aktivira transkripciju (eng. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )                             |
| TLR              | Toll receptor (eng. <i>Toll-like receptors</i> )   |
| TNF $\alpha$     | faktor nekroze tumora $\alpha$ (eng. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )  |
| VLDL             | lipoprotein veoma niske gustine (eng. <i>very low-density lipoprotein</i> )  |

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| 1.1. Gojaznost i metabolički sindrom .....   | 2  |
| 1.2. Ishrana obogaćena fruktozom i razvoj životinjskog modela metaboličkog sindroma..... | 4  |
| 1.3. Jetra – centar metaboličkih procesa .....   | 6  |
| 1.4. Metabolizam fruktoze u jetri.....   | 9  |
| 1.5. Signalni putevi insulina.....   | 11 |
| 1.5.1. Razvoj insulinske rezistencije .....  | 13 |
| 1.6. Glukokortikoidni hormoni .....  | 15 |
| 1.6.1. Sinteza glukokortikoidnih hormona .....   | 16 |
| 1.6.1.1. Tkivno-specifični prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona ...      | 16 |
| 1.6.1.1.2. <i>Regulacija aktivnosti i ekspresije enzima 11βHSD1</i> .....                | 19 |
| 1.6.2. Mehanizam delovanja glukokortikoidnih hormona .....                               | 20 |
| 1.7. Metabolizam lipida u jetri .....  | 23 |
| 1.7.1. Preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije .....                        | 24 |
| 1.7.2. <i>De novo</i> lipogeneza u jetri.....  | 25 |
| 1.7.2. β-Oksidacija masnih kiselina .....  | 29 |
| 1.7.3. Uloga lipina-1 u regulaciji lipidnog metabolizma.....                             | 30 |
| 1.7.4. Sekretija triglicerida iz jetre.....  | 33 |
| 1.8. Razvoj metaboličke inflamacije.....   | 34 |
| 1.8.1. Signalni putevi regulisani metaboličkom inflamacijom.....                         | 36 |
| 1.8.1.1. Proinflamatorni citokin TNFα .....  | 36 |
| 1.8.1.2. Proinflamatorni medijator NFκB.....   | 38 |
| 1.8.2. Uloga glukokortikoida u regulaciji inflamatornih procesa.....                     | 38 |

|  |    |
|--|----|
| <b>2. CILJ RADA</b> .....  | 40 |
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....   | 43 |
| 3.1. Tretman životinja u studiji.....  | 44 |
| 3.2. Sakupljanje krvi, priprema krvne plazme i izolovanje jetre i masnog tkiva.....                                      | 46 |
| 3.3. Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara.....  | 47 |
| 3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze i triglicerida u krvi.....  | 47 |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi.....   | 47 |
| 3.3.3. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi i tkivu.....  | 47 |
| 3.3.4. Određivanje koncentracije insulina u plazmi.....  | 48 |
| 3.3.5. Procena insulinske osetljivosti.....  | 49 |
| 3.4. Priprema ćelijskih frakcija jetre.....  | 50 |
| 3.4.1. Priprema citoplazmatične, jedarne i mikrozomalne frakcije.....  | 50 |
| 3.4.2. Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta.....   | 51 |
| 3.5. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim ekstraktima.....   | 51 |
| 3.6. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....  | 52 |
| 3.7. <i>Western blot</i> i detekcija proteina na <i>blotu</i> .....  | 52 |
| 3.8. Semi-kvantitativna analiza imunoreaktivnih traka na membranama.....   | 54 |
| 3.9. Izolovanje, određivanje koncentracije i procena kvaliteta RNK.....  | 55 |
| 3.10. Reakcija reverzne transkripcije.....   | 56 |
| 3.11. Izbor odgovarajuće endogene kontrole i lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu ( <i>Real-time PCR</i> )..... | 56 |
| 3.12. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom relativne kvantifikacije.....  | 58 |
| 3.13. Histološka analiza jetre.....  | 59 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.14. Statističke analize.....  | 60        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>  | <b>61</b> |
| 4.1. Energetski unos i masa tela, jetre i masnog tkiva nakon ishrane obogaćene fruktozom.....         | 62        |
| 4.2. Efekat ishrane obogaćene fruktozom na biohemijske i fiziološke parametre.....                    | 64        |
| 4.3. Histološka analiza jetre nakon ishrane obogaćene fruktozom.....                                  | 66        |
| 4.4. Metabolizam glukokortikoida u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom.....                | 68        |
| 4.4.1. Nivo iRNK i proteina 11 $\beta$ HSD1.....  | 68        |
| 4.4.2. Nivo iRNK i proteina H6PDH.....  | 69        |
| 4.4.3. Koncentracija iRNK i unutarćelijska distribucija GR-a.....                                     | 71        |
| 4.4.4. Koncentracija iRNK za PEPCCK.....  | 74        |
| 4.5. Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na nivo molekula uključenih u metabolizam lipida u jetri..... | 75        |
| 4.5.1. Nivo proteina uključenih u <i>de novo</i> sintezu masnih kiselina.....                         | 75        |
| 4.5.1.1. Nivo proteina SREBP-1.....   | 75        |
| 4.5.1.2. Nivo iRNK za FAS.....  | 76        |
| 4.5.2. Unutarćelijska distribucija lipina-1.....  | 76        |
| 4.5.3. Nivo proteina uključenih u $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina.....                            | 79        |
| 4.5.3.1. Unutarćelijska distribucija proteina PPAR $\alpha$ .....                                     | 79        |
| 4.5.3.2. Unutarćelijska distribucija proteina PGC-1.....  | 80        |
| 4.5.3.3. Koncentracija proteina CPT1.....   | 82        |
| 4.6. Efekat ishrane obogaćene fruktozom na razvoj metaboličke inflamacije u jetri pacova.....         | 83        |
| 4.6.1. Unutarćelijska distribucija proteina NF $\kappa$ B.....  | 83        |
| 4.6.2. Odnos između nivoa fosforilisane forme i ukupne koncentracije proteina I $\kappa$ B.....       | 84        |
| 4.6.3. Koncentracija iRNK za TNF $\alpha$ .....   | 85        |
| 4.6.4. Nivo inhibitorne fosforilacije proteina IRS-1 na Ser <sup>307</sup> .....                      | 86        |
| <b>5. DISKUSIJA.....</b>  | <b>88</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1. Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na morfološke i biohemijske parametre Wistar pacova .....            | 90         |
| 5.2. Metabolizam glukokortikoidnih hormona u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom.....                    | 94         |
| 5.3. Metabolizam lipida u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom.....                                       | 101        |
| 5.4. Metabolička inflamacija i razvoj insulinske rezistencije u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom..... | 110        |
| <b>6. ZAKLJUČCI.....</b>   | <b>116</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b>  | <b>120</b> |





# 1. UVOD

---

## 1.1. Gojaznost i metabolički sindrom

Tehnološki napredak i poboljšani ekonomski status savremenog društva doveli su do promena osnovnih životnih navika, naročito u pogledu ishrane. Povećan unos kalorija i smanjena fizička aktivnost su postali osnovni uzročnici gojaznosti koja poprima epidemijske razmere (Rutledge i Adeli, 2007). Svetska zdravstvena organizacija je objavila statističke podatke koji predviđaju da će 2015. godine u svetu biti oko 2,3 milijarde prekomerno uhranjenih i oko 700 miliona gojaznih osoba (Chan i Woo, 2010). Najviše zabrinjava porast broja gojazne dece, koja najčešće ostaju gojazna i u odraslom dobu i sklona su metaboličkim poremećajima koji pogoršavaju kvalitet života i smanjuju očekivani životni vek (Lakshman i sar., 2012).

Povećana prevalenca gojaznosti poklapa se sa sve učestalijim poremećajima metabolizma koji udruženo dovode do razvoja metaboličkog sindroma. Pored abdominalne gojaznosti, metabolički sindrom obuhvata insulinsku rezistenciju, hiperglikemiju, dislipidemiju<sup>1</sup>, povišen krvni pritisak i stanje hronične inflamacije niskog intenziteta. Navedeni poremećaji ozbiljno narušavaju metaboličku ravnotežu čiji ishod može biti razvoj kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa tipa 2 (Eckel i sar., 2005).

Nastanku metaboličkog sindroma doprinose kako nasledni tako i razvojni faktori, ali se još uvek ne zna osnovni mehanizam koji je odgovoran za patofiziologiju oboljenja. Iako je očigledna korelacija između porasta prevalenci gojaznosti i metaboličkog sindroma, uloga gojaznosti ostaje nerazjašnjena, s obzirom da nemaju sve gojazne osobe dijagnozu metaboličkog sindroma, niti su sve osobe sa sindromom gojazne (Ruderman i sar., 1998). Sa druge strane, kod većine obolelih je primećeno smanjenje insulinske osetljivosti,

---

<sup>1</sup> Dislipidemija – povećan nivo triglicerida i lipoproteina niske gustine (LDL, eng. *low-density lipoprotein*), uz smanjen nivo lipoproteina visoke gustine (HDL, eng. *high-density lipoprotein*).

odnosno potreba za većim nivoom insulina da bi se postigao normalan fiziološki odgovor. Zbog toga se smatra da je insulinska rezistencija najznačajnija karakteristika metaboličkog sindroma, odnosno da predstavlja i uzrok i posledicu razvoja većine metaboličkih poremećaja povezanih sa oboljenjem (Tran i sar., 2009).

Glavna veza između gojaznosti i insulinske rezistencije je povećan nivo slobodnih masnih kiselina poreklom iz lipolitičkih procesa koji se odvijaju u visceralnom masnom tkivu (Rutledge i Adeli, 2007). Slobodne masne kiseline mogu da podstaknu razvoj insulinske rezistencije na sistemskom i lokalnom nivou, narušavanjem insulinske signalizacije u ćelijama ciljnih tkiva. Smanjena insulinska osetljivost je povezana sa nagomilavanjem lipida u jetri pa se pojava hipertrigliceridemije smatra važnim kriterijumom za dijagnostifikovanje metaboličkog sindroma (Eckel i sar., 2005; Abdulla i sar., 2011).

Važna karakteristika metaboličkog sindroma je hronična inflamacija niskog intenziteta povezana sa gojaznošću (Sutherland i sar., 2004). Pretpostavlja se da makrofagi masnog tkiva imaju ključnu ulogu u razvoju inflamacije jer proizvode citokine i druge proinflamatorne medijatore kao odgovor na prekomerno skladištenje masti u visceralnom masnom tkivu (Schenk i sar., 2008). U prilog tome ide činjenica da gojazne osobe imaju povećan nivo faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukina-6 (IL-6), IL-1 i C-reaktivnog proteina (CRP) u cirkulaciji (Wellen i Hotamisligil, 2003).

Glukokortikoidni hormoni, koji su poznati po svom anti-insulinskom dejstvu, imaju važnu ulogu u patofiziologiji metaboličkog sindroma. Oni se oslobađaju u odgovoru na stres i utiču na veliki broj metaboličkih, inflamatornih i kardiovaskularnih procesa (Wang, 2005). Povećanje nivoa glukokortikoida u cirkulaciji je preduslov za razvoj Kušingovog sindroma, oboljenja koje obuhvata gojaznost, hipertenziju, hiperlipidemiju i hiperglikemiju, poremećaje koji su karakteristični i za metabolički sindrom (Arnaldi i sar., 2003; Wang, 2005). S obzirom da se kod većine gojaznih osoba koncentracija glukokortikoida u cirkulaciji nalazi u okviru fizioloških granica, smatra se da bi njihova patofiziološka uloga

mogla da se pripiše povećanoj lokalnoj regeneraciji aktivnih oblika hormona u tkivima (Walker, 2006).

Bez obzira na veliki broj postojećih naučnih radova, još uvek se velika pažnja posvećuje istraživanjima vezanim za metabolički sindrom, pre svega zbog njegove kompleksne patofiziologije i rastuće prevalence. Očekuje se da će to doprineti boljem razumevanju mehanizama koji se nalaze u osnovi razvoja metaboličkih poremećaja, kao i preciznijem definisanju faktora rizika.

## **1.2. Ishrana obogaćena fruktozom i razvoj životinjskog modela metaboličkog sindroma**

Novija epidemiološka i biohemijska istraživanja ukazuju da povećan unos fruktoze može biti uzrok razvoja većine karakteristika metaboličkog sindroma. Iako je poznata kao voćni šećer, sve veće prisustvo fruktoze u ishrani je posledica konzumiranja hrane i napitaka koji obiluju saharozom (50% fruktoze) i kukuruznim sirupom obogaćenim fruktozom (42-90% fruktoze) (Basciano i sar., 2005). Smatra se da su metaboličke promene koje nastaju nakon prekomernog unosa fruktoze posledica njenih lipogenih svojstava koja se najviše odražavaju na jetru i masno tkivo. U studiji Le-a i saradnika je pokazano da nakon četiri nedelje ishrane obogaćene fruktozom, kod ljudi dolazi do porasta nivoa triglicerida (36%) i leptina<sup>2</sup> (48%) u cirkulaciji, dok koncentracije insulina i glukoze, kao i telesna težina ostaju nepromenjeni (Le i Tappy, 2006).

Prilikom proučavanja uticaja fruktoze na metaboličke poremećaje kod ljudi postoje određena ograničenja koja su podstakla razvoj odgovarajućih životinjskih eksperimentalnih modela. Iako su modeli koji se baziraju na manipulaciji genetičkim materijalom naročito korisni za upotpunjavanje znanja o ulozi naslednih faktora, signalnih puteva i neuroendokrinih medijatora u nastanku metaboličkih poremećaja, u najširoj upotrebi su

---

<sup>2</sup> Leptin – hormon masnog tkiva (adipokin) koji utiče na smanjenje apetita posredstvom odgovarajućih receptora u hipotalamusu.

protokoli koji podrazumevaju podvrgavanje životinja visokokalorijskim dijetama obogaćenim šećerima ili mastima, jer najvernije oslikavaju etiologiju gojaznosti i metaboličkog sindroma kod ljudi (Tschop i Heiman, 2001; Rutledge i Adeli, 2007).

Najuočljivija karakteristika životinja koje su hranjene fruktozom je povećanje energetskog unosa za oko 10-20% u odnosu na životinje na standardnoj dijeti (Kanarek i Orthen-Gambill, 1982). Brojne studije su pokazale da povećan unos kalorija poreklom iz fruktoze može, ali i ne mora dovesti do povećanja telesne mase (Kasim-Karakas i sar., 1996; D'Angelo i sar., 2005). Jedno od mogućih objašnjenja za dobijanje oprečnih rezultata jeste upotreba laboratorijskih životinja različite starosti. Pokazano je da se mlađe životinje odlikuju intenzivnijim prirastom telesne mase nakon ishrane obogaćene fruktozom (Huynh i sar., 2008). Pored toga, fruktoza može u različitoj meri da dovede do razvoja leptinske rezistencije što dodatno povećava kalorijski unos (Shapiro i sar., 2008). Takođe, ishrana obogaćena fruktozom dovodi do pojave hipertrigliceridemije, što nije karakteristično za druge ugljene hidrate. Kaumi i saradnici (Kaumi i sar., 1996) su izmerili da se kod Wistar pacova koji su hranjeni 10% rastvorom fruktoze nivo triglicerida u krvi uvećava za 86%, dok je hipertigliceridemija izostala kod pacova koji su konzumirali glukozu iste koncentracije.

Životinje hranjene fruktozom predstavljaju dobar model za proučavanje hronične inflamacije koja se razvija kao posledica metaboličkog disbalansa. Takve životinje se karakterišu povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina i citokina TNF $\alpha$  u cirkulaciji koji udruženo pokreću glavne proinflamatorne signalne puteve (Spruss i sar., 2009). Ovakvi događaji su dalje praćeni povećanom sintezom triglicerida, smanjenom  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina, kao i narušavanjem insulinske signalizacije u jetri (Qin i sar., 2008; Tsai i sar., 2009).

Kako bi kod eksperimentalnih životinja bio podstaknut razvoj različitih karakteristika metaboličkog sindroma, moguće je manipulirati koncentracijom i načinom unosa fruktoze, kao i dužinom trajanja tretmana. U praksi se najčešće primenjuje ishrana 10% ili 20% rastvorom fruktoze jer predstavlja najbolji pandan modernom načinu ishrane u

zapadnim zemljama (Dai i McNeill, 1995; Abdulla i sar., 2011). Takav tretman dovodi do insulinske rezistencije (Fortino i sar., 2007), hiperlipidemije (Reaven i sar., 1990), visceralne gojaznosti (Jurgens i sar., 2005) i hipertenzije kod pacova, hrčaka, pasa i određenih mišjih sojeva (Havel, 2005). Pored toga, u eksperimentima se primenjuje i 60% fruktoza, bilo u hrani (Gersch i sar., 2007) ili u vodi (Wong i Johns, 1999), što omogućava praćenje poremećaja koji su posledica ozbiljnije narušenog energetskog metabolizma (Sanchez-Lozada i sar., 2007).

### **1.3. Jetra – centar metaboličkih procesa**

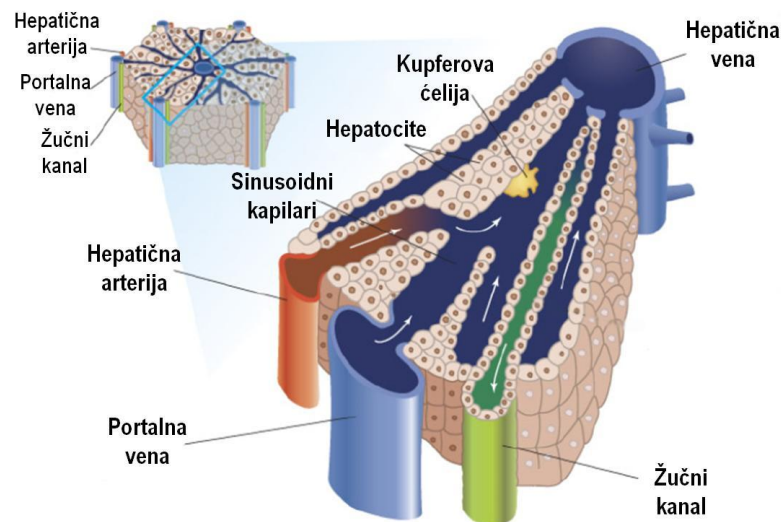
Uz preciznu nervnu i endokrinu kontrolu, jetra funkcioniše kao energetski depo organizma jer je prvi organ do koga portalnom venom stižu nutrijenti apsorbirani iz hrane. U njoj se intenzivno odvija metabolizam osnovnih energetskih supstrata, ugljenih hidrata i lipida, zbog čega se smatra centrom metaboličkih procesa.

Ključna uloga jetre u energetskom metabolizmu se, pre svega, ostvaruje kroz održavanje ravnoteže između skladištenja glukoze u formi glikogena (glikogeneza) i njene sinteze putem glikogenolize i glukoneogeneze. Na taj način se kod zdravih jedinki koncentracija šećera u krvi održava konstantnom što je od vitalnog značaja za mnoga tkiva kojima je glukoza jedini izvor energije, poput mozga, bubrega i krvnih ćelija (Choukem i Gautier, 2008). U regulaciji metabolizma glukoze najvažniju ulogu imaju insulin i glukagon, hormoni koji u jetru dospevaju iz pankreasa putem portalne vene. Dok se insulin oslobađa u uslovima visoke koncentracije glukoze u cirkulaciji i odgovoran je za skladištenje glukoze u formi glikogena, glukagon stimuliše oslobađanje glukoze u krv prilikom gladovanja, putem pokretanja procesa glikogenolize i glukoneogeneze. Važnu ulogu u regulaciji nivoa šećera u krvi imaju i glukokortikoidni hormoni, koji deluju antagonistički u odnosu na insulin i stimulišu proces glukoneogeneze.

Što se tiče metabolizma lipida, jetra iz cirkulacije preuzima slobodne masne kiseline koje zatim bivaju oksidovane ili esterifikovane. Oksidacija masnih kiselina predstavlja za

jetru osnovni izvor energije, dok esterifikacija ima za posledicu sintezu triglicerida koji se upućuju u masno tkivo ili skladište u jetri, što je posebno izraženo u pojedinim patofiziološkim stanjima (Browning i Horton, 2004). Kao i metabolizam ugljenih hidrata, i ovi procesi su pod kontrolom insulina koji stimuliše lipogenezu, dok je posledica njegove niske koncentracije pojačana  $\beta$ -oksidacija u mitohondrijama. Prilikom metabolizma lipida u jetri takođe postoji antagonističko delovanje insulina i glukokortikoidnih hormona, mada je njihova interakcija manje poznata nego u masnom tkivu (Macfarlane i sar., 2008).

Metabolički putevi u jetri su podržani odgovarajućom histološkom građom (Slika 1.1.). Hepatocite su organizovane u lobuse heksagonalnog oblika međusobno odvojene sinusoidnim kapilarima koji povezuju ogranke hepatične arterije i portalne vene smeštene na periferiji i hepatične vene u centru lobusa. Unutar lobusa postoje specifične zone koje se ne razlikuju samo po položaju ćelija već su za njih vezane i odgovarajuće metaboličke funkcije. Bliže hepatičnoj veni se nalaze perivenozne ćelije u kojima se uglavnom odvija glikoliza, dok se periportalne ćelije na periferiji lobusa odlikuju intenzivnom



**Slika 1.1. Histološka građa jetre.**

(preuzeto sa: <http://www.thestudentroom.co.uk>)

Hepatocite su organizovane u lobuse heksagonalnog oblika međusobno odvojene sinusoidnim kapilarima koji povezuju ogranke hepatične arterije i portalne vene smeštene na periferiji i hepatične vene u centru lobusa. Portalna vena dovodi vensku krv iz creva, pankreasa i slezine, dok hepatična arterija doprema arterijsku krv zasićenu kiseonikom.

glukoneogenezom. Metabolizam lipida takođe ukazuje na prostornu odvojenost hepatičnih procesa, s obzirom da se *de novo* lipogeneza odvija u perivenoznim ćelijama, dok je  $\beta$ -oksidacija vezana za periportalne ćelije (Guzman i Castro, 1989). Uprkos tome, svaka lobularna zona je dimanična i može da prilagodi metabolički profil trenutnim energetskeim zahtevima organizma (Frayn, 2003).

Imajući u vidu značaj održavanja energetske ravnoteže jasno je da su poremećaji katabolizma i anabolizma ugljenih hidrata, kao i povećana lipogeneza, ključni događaji u razvoju metaboličkog sindroma. Kao posledica promene energetskeg metabolizma može doći do nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD, eng. *nonalcoholic fatty liver disease*), koja se sve češće ubraja u karakteristike metaboličkog sindroma i naročito je povezana sa gojaznošću i dijabetesom tipa 2. Kod gojaznih osoba, prevalenca NAFLD-a je vrlo visoka i varira od 50% do 90% (Serfaty i Lemoine, 2008). Pod NAFLD-om se podrazumeva čitav spektar patofizioloških promena, od benigne hepatične steatoze, preko ozbiljnije forme nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) praćene inflamacijom i nekrozom, do fibroze i ciroze koje imaju lošu prognozu (Postic i Girard, 2008). Osnovni uzrok razvoja NAFLD-a je nagomilavanje triglicerida u formi masnih kapi u hepatocitima, što se lako uočava na mikroskopskim preseccima tkiva (Paradis i Bedossa, 2008). Poreklo deponovanih masti je složeno i još uvek nedovoljno objašnjeno. Smatra se da najveći deo čine trigliceridi koji nastaju esterifikacijom slobodnih masnih kiselina poreklom iz lipolitičkih procesa koji se odvijaju u visceralnom masnom tkivu. Važnu ulogu u regulaciji ovog procesa imaju insulin i glukokortikoidni hormoni u jetri i masnom tkivu. Masti se mogu sintetisati i u jetri tokom procesa *de novo* lipogeneze, dok najmanji udeo čine slobodne masne kiseline poreklom iz creva (Postic i Girard, 2008). Inluks slobodnih masnih kiselina u jetru može da podstakne razvoj insulinske rezistencije, što je osnovna karakteristika NAFLD-a (Marchesini i sar., 1999). Narušavanje signalnog puta insulina prilikom razvoja NAFLD-a rezultira inhibiranom glikogenezom i povećanim oslobađanjem glukoze iz jetre, dok *de novo* lipogeneza postaje intenzivnija zbog regulatornih procesa koji ne zavise od prenosa insulinskog signala nizvodno od receptora već su direktno stimulisani insulinom (Shimomura i sar., 1999).



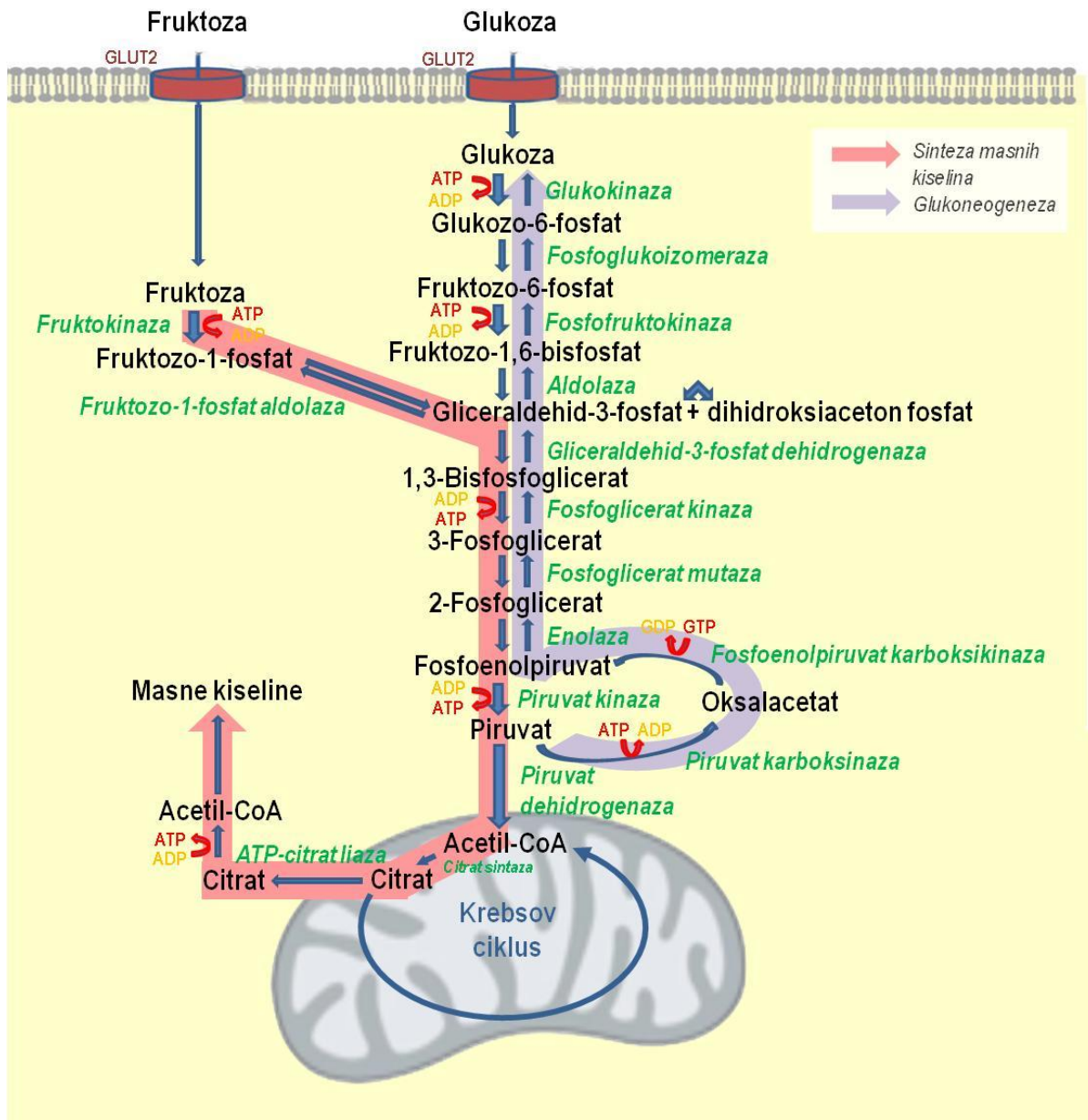
## 1.4. Metabolizam fruktoze u jetri

Fruktoza je monosaharid koji se, kao i ostali ugljeni hidrati, uglavnom metaboliše u jetri. Njena apsorpcija iz digestivnog trakta se odvija putem glukoznog transportera 5 (GLUT5) (Corpe i sar., 1999), dok fruktozu iz portalnog krvotoka preuzima jetra pomoću GLUT2 (Cheeseman, 1993). U hepatocitima fruktoza se razgrađuje do piruvata kroz proces glikolize (**Slika 1.2.**).

Metabolizam fruktoze u jetri se značajno razlikuje od metabolizma glukoze i ta razlika se nalazi u osnovi lipogenih svojstava fruktoze i razvoja karakteristika metaboličkog sindroma. Pre svega, koncentracija glukoze u cirkulaciji je regulisana insulinom putem povratne sprege, što nije slučaj sa fruktozom. Takođe, katabolizam glukoze je regulisan glukokinazom i fosfofruktokinazom, enzimima koji deluju kao senzori koncentracije glukoze u krvi (Iynedjian, 1993) i energetskeg statusa hepatocita (Teff i sar., 2004). Prilikom razgradnje i uključivanja fruktoze u glikolitički put, kontrolne reakcije glikolize bivaju preskočene, što onemogućava regulaciju razgradnje fruktoze pomenutim enzimima. Naime, glukokinaza ima veoma mali afinitet za fruktozu pa se po ulasku u ćelije jetre njena fosforilacija do fruktozo-1-fosfata odvija uz pomoć fruktokinaze. Nakon toga, fruktozo-1-fosfat se prevodi u intermedijere glikolitičkog puta, dihidroksiaceton-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Dakle, katabolizam fruktoze je brz proces, nezavisan od insulina i glikemije, koji narušava energetske balans ćelije (**Slika 1.2.**) (Bruynseels i sar., 1999; Cortez-Pinto i sar., 1999).

Najveći udeo fruktoznih metabolita se konvertuje u glukozu i glikogen, procesima glukoneogeneze i glikogeneze (Bode i sar., 1981; Koo i sar., 2008). Većina reakcija u glukoneogenezi je katalizovana enzimima uključenim u glikolizu. Razlika postoji u poslednjoj reakciji katabolizma glukoze pa je enzim koji katalizuje prvi korak glukoneogeneze, karboksikinaza fosfoenol piruvata (PEPCK, eng. *phosphoenol pyruvate carboxykinase*) ključni regulator ovog biohemijskog puta (**Slika 1.2.**) (Postic i sar., 2004). Treba naglasiti da glukoneogeneza stimulisana fruktozom najčešće nije praćena hiperglikemijom jer je otpuštanje glukoze iz jetre strogo regulisan proces (Tounian i sar.,

1994). Na taj način se nivo glukoze u krvi održava u fiziološkim granicama, što je fruktozu okarakterisalo kao pogodan šećer u ishrani dijabetičara.



**Slika 1.2. Metabolizam fruktoze u jetri.**

Fruktoza u jetru ulazi pomoću glukoznog transportera GLUT2 i brzo se metaboliše do piruvata, zaobilazeći glavne kontrolne reakcije glikolize. Fruktozni metaboliti se potom mogu konvertovati u glukozu procesom glukoneogeneze ili mogu predstavljati supstrat za sintezu masnih kiselina tokom *de novo* lipogeneze.

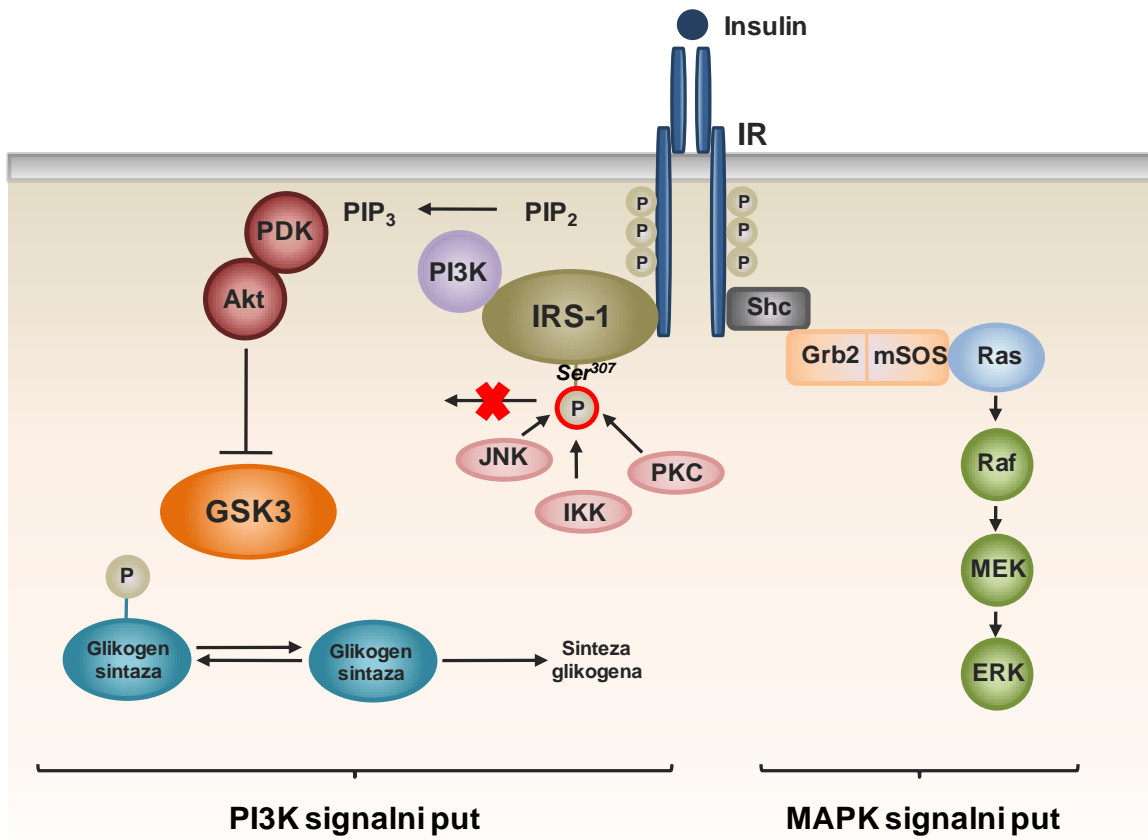
Pored učešća u procesu glukoneogeneze, fruktozni metaboliti mogu predstavljati supstrat za sintezu masnih kiselina *de novo* lipogenezom u jetri. Ovaj biohemijski put počinje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata do acetil-CoA kao prekursora za sintezu masnih kiselina. Dobro je proučen zahvaljujući radioaktivno obeleženim molekulima <sup>14</sup>C-fruktoze, čiji se C atomii *in vivo* (Bar-On i Stein, 1968) i *in vitro* intenzivno ugrađuju u lipide (Topping i Mayes, 1972; Clark i sar., 1974). Istovremeno sa stimulacijom *de novo* lipogeneze, fruktoza inhibira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina u jetri čime se favorizuje esterifikacija masnih kiselina i sinteza triglicerida (Topping i Mayes, 1972). Nakon pakovanja u lipoproteine veoma niske gustine (VLDL, eng. *very low-density lipoprotein*), dolazi do oslobađanja triglicerida iz jetre u krvotok i njihove hidrolize lipoproteinskom lipazom do slobodnih masnih kiselina i monoacilglicerola. Nastale metabolite preuzima masno tkivo u kome dolazi do ponovne sinteze triglicerida, što ide u prilog lipogenih svojstava fruktoze, koja povećava nivo slobodnih masnih kiselina i triglicerida (Rutledge i Adeli, 2007).

## 1.5. Signalni putevi insulina

Hormon insulin je protein/polipeptid kojeg sintetišu i izlučuju  $\beta$  ćelije pankreasa. Ima važnu ulogu u pokretanju anabolizma ugljenih hidrata i lipida, a samim tim utiče i na održavanje energetskeg balansa. Sekretacija insulina je prvenstveno regulisana koncentracijom glukoze u cirkulaciji. Glavni organi u kojima insulin ispoljava svoje delovanje su jetra, masno tkivo i skeletni mišići (Saltiel i Kahn, 2001).

Signalni put insulina obuhvata kaskadu molekula koji prenose signal nizvodno od insulinskog receptora (IR). Vezivanje insulina za IR pokreće njegovu tirozin-kinaznu aktivnost usled čega dolazi do autofosforilacije receptora (White i Kahn, 1994). Aktivirani IR-1 pokreće dve glavne signalne kaskade: put regulisan kinazom fosfatidilinozitola 3 (PI3K, eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i put regulisan proteinskim kinazama aktiviranim mitogenima (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*) (**Slika 1.3.**). Put PI3K usmerava insulinski signal uglavnom ka regulaciji metaboličkih procesa u ćeliji, dok

je MAPK kaskada odgovorna za regulaciju genske ekspresije i preživljavanje ćelija (Le Roith i Zick, 2001). Signalni put PI3K počinje fosforilacijom tirozina na supstratu 1 insulinskog receptora (IRS-1, eng. *insulin receptor substrate 1*) od strane aktiviranog IR-1. Interakcija fosforilisanog IRS-1 i PI3K dovodi do prelaska kinaze iz citoplazme u ćelijsku membranu i aktivacije njene katalitičke subjediniice p85. Primarna funkcija PI3K je sinteza malog lipidnog molekula fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PIP<sub>3</sub>, eng. *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*).



**Slika 1.3. Signalni putevi insulina.**

Put regulisan PI3K usmerava insulinski signal uglavnom ka regulaciji metaboličkih procesa u ćeliji, dok je MAPK kaskada odgovorna za regulaciju genske ekspresije i preživljavanje ćelija. Na slici je prikazano kako aktivacija signalnog puta PI3K pokreće sintezu glikogena. Prenos insulinskog signala može biti prekinut inhibitornom fosforilacijom IRS-1 na Ser<sup>307</sup> koju katalizuju kinaze čija je aktivnost povećana u stanju insulinske rezistencije.

PIP<sub>3</sub> deluje kao sekundarni glasnik i aktivira kinaze kao što su Akt i kinaza zavisna od fosfoinozitida-3 (PDK, eng. *3-phosphoinositide-dependent kinase*). Krajnji ishod ovih događaja je fosforilacija i aktivacija kinaze Akt koja menja aktivnost enzima uključenih u metabolizam glukoze (Miranda i sar., 2005; Shepherd, 2005). Primera radi, Akt fosforiliše kinazu glikogen sintaze (GSK3) i na taj način inhibira njenu aktivnost (**Slika 1.3.**). To omogućava delovanje odgovarajuće fosfataze (GSP, eng. *glycogen synthase phosphatase*), odnosno defosforilaciju i aktivaciju glikogen sintaze. Na taj način je podstaknuto korišćenje glukoze za sintezu glikogena, što je jedna od osnovnih fizioloških uloga insulina. Fosforilacijom transkripcionog regulatora FOXO1 (eng. *forkhead box protein O1*) Akt reguliše i procese glukoneogeneze i lipolize na nivou ekspresije gena (Sale i Sale, 2008; Siddle, 2011).

### 1.5.1. Razvoj insulinske rezistencije

Poremećaji u delovanju insulina imaju za posledicu narušavanje metaboličke ravnoteže, razvoj insulinske rezistencije i pojavu dijabetesa tipa 2. Insulinska rezistencija se definiše kao fiziološko stanje u kome određena koncentracija insulina u krvi pokreće slabiji biološki odgovor od normalnog. Takvo stanje je praćeno hiperglikemijom i posledičnom hiperinsulinemijom jer glukoza stimuliše β ćelije pankreasa da luče insulin. Na molekularnom nivou, insulinska rezistencija može nastati zbog smanjenja broja receptora ili njihovog afiniteta prema insulinu, kao i zbog promena signalnih molekula nishodno od receptora koje dovode do prekida u prenosu insulinskog signala (Kahn, 1978).

Preduslov za aktivaciju IR-a je fosforilacija na tirozinskim ostacima, tako da su osnovni regulatori njegove aktivnosti tirozin fosfataze. Fosforilaciju receptora mogu vršiti i neke izoforme protein kinaze C (PKC), koje se aktiviraju pri akumulaciji lipida i lipidnog intermedijera diacilglicerola (DAG), ili u stanju hiperglikemije (Idris i sar., 2002). Suprotno njima, enzimi tirozin fosfataze inaktiviraju IR defosforilacijom njegovih tirozinskih ostataka. U regulaciji ekspresije i funkcije receptora učestvuju sam insulin i drugi faktori, kao što su hormoni, citokini i hranljivi sastojci.

Kao i IR, proteini IRS se aktiviraju fosforilacijom tirozinskih ostataka, ali je njihova aktivnost regulisana i fosforilacijom serinskih ostataka, koje mogu biti i aktivirajuće i inhibirajuće (Boura-Halfon i Zick, 2009). Najčešća inhibitorna fosforilacija se odvija na serinu 307 (Ser<sup>307</sup>) IRS-1, stimulisana je u stanju insulinske rezistencije i predstavlja mehanizam negativne regulacije funkcije IRS od strane proinflamatornih citokina i slobodnih masnih kiselina (Paz i sar., 1997). Enzimi koji katalizuju ovu inhibitornu fosforilaciju su: kinaza N-terminalnog domena proteina c-Jun (JNK, eng. *c-Jun N-terminal kinases*), kinaza koja fosforiliše inhibitor transkripcionog regulatora NFκB (IKK, eng. *IκB kinase*), kao i PKC (**Slika 1.3.**) (Gual i sar., 2005; Boura-Halfon i Zick, 2009). Fosforilaciju IRS-1 na serinu mogu katalizovati i različite kinaze aktivirane insulinom, što ukazuje na značaj negativne povratne sprege u regulaciji prenosa insulinskog signala (Zick, 2003). Pored toga, hiperinsulinemija smanjuje nivo IRS-1, ograničavanjem njegove sinteze i pokretanjem degradacije (Huang i sar., 2002).

Glavna veza između gojaznosti i insulinske rezistencije u jetri je povećan nivo slobodnih masnih kiselina poreklom iz stimulisane lipolize u visceralnom masnom tkivu (Rutledge i Adeli, 2007). Povišene slobodne masne kiseline inhibiraju tirozinsku fosforilaciju IRS-1 i smanjuju kinaznu aktivnost PI3K, najčešće putem aktivacije PKC, što nishodno dovodi do oštećenja insulinskog signalnog puta (Lam i sar., 2002).

Generalno, u razvoju insulinske rezistencije veći značaj ima poremećaj PI3K signalnog puta, jer učestvuje u regulaciji metaboličkih procesa, dok MAPK kaskada može ostati funkcionalna što je praćeno aktivacijom mitogena i ćelijskom proliferacijom. Primena antagonista serin kinaza može poboljšati osetljivost ćelija na insulin i uspostaviti ravnotežu između signalnih puteva regulisanih PI3K i MAPK (Cusi i sar., 2000).

## 1.6. Glukokortikoidni hormoni

Glukokortikoidni hormoni, kortizol kod ljudi i kortikosteron kod glodara, pripadaju klasi steroidnih hormona. Glukokortikoidi su uključeni u skoro sve metaboličke procese u organizmu i imaju ključnu ulogu u regulaciji rasta, reprodukcije, inflamacije, kao i u funkcionisanju kardiovaskularnog i centralnog nervnog sistema (Galon i sar., 2002; Chrousos i sar., 2004). Pored toga, poznati su i kao hormoni stresa jer je njihova sekrecija povećana u uslovima poremećene homeostaze.

Najpoznatiji i najbolje proučeni metabolički efekti glukokortikoida se odnose na stimulaciju katabolizma ugljenih hidrata. Oni regulišu nekoliko procesa koji učestvuju u održavanju koncentracije glukoze u cirkulaciji (Smith i Vale, 2006). Najznačajniji metabolički efekat glukokortikoida u jetri je stimulacija transkripcije gena koji kodiraju enzime uključene u glukoneogenezu (PEPCK). Pored toga, glukokortikoidi pojačavaju efekat glukagona i adrenalina kada je smanjena dostupnost glukoze ćelijama i istovremeno inhibiraju efekat insulina na energetske metabolizam. Ovaj anti-insulinski efekat se ostvaruje smanjenjem afiniteta insulinskih receptora prema insulinu i inhibicijom fosforilacije glukoze, što je naročito izraženo u mišićima i masnom tkivu (Nechushtan i sar., 1987; Morgan i sar., 2009). Navedeni procesi u kombinaciji sa povećanom proizvodnjom glukoze u jetri mogu doprineti nastanku hiperglikemije (Nechushtan i sar., 1987). Glukokortikoidi u jetri regulišu i metabolizam lipida tako što stimulišu sintezu triglicerida i VLDL-a (Taskinen i sar., 1983; Dolinsky i sar., 2004).

Pored metaboličkih efekata, glukokortikoidni hormoni ispoljavaju značajna anti-inflamatorna i imunosupresivna dejstva (Barnes, 2006b). Oni inhibiraju sve tipove inflamatornih reakcija tako što stabilizuju membrane lizozoma, smanjuju propustljivost kapilara i inhibiraju sintezu arahidonske kiseline, faktora aktivacije trombocita, citokina TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 i IL-8, kao i faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF, eng. *macrophage migration inhibitory factor*) (Rhen i Cidlowski, 2005; Barnes, 2006a). Zbog izraženog imunosupresivnog dejstva, glukokortikoidi imaju široku

farmakološku primenu i koriste se u terapiji inflamatornih oboljenja i lečenju autoimunskih bolesti (Gross i Cidlowski, 2008).

Iako su glukokortikoidi neophodni za adaptaciju organizma na povećane energetske zahteve, produženo delovanje ovih hormona može negativno da utiče na mnoge metaboličke procese. Kušingov sindrom, koji se odlikuje povećanom sekrecijom kortizola, karakteriše se razvojem hipertenzije, abdominalne gojaznosti, insulinske rezistencije i dislipidemije, iz čega se može zaključiti da glukokortikoidi zauzimaju centralno mesto u patofiziologiji metaboličkog sindroma (Wang, 2005; Newell-Price, 2008).

### **1.6.1. Sinteza glukokortikoidnih hormona**

Glukokortikoidni hormoni se sintetišu iz holesterola u unutrašnjim zonama kore nadbubrežne žlezde nakon aktiviranja hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalne (HHA) ose. Kada nastupi potreba za stimulacijom kataboličkih procesa, u hipotalamusu se produkuje kortikotropin-osobađajući hormon (CRH, eng. *corticotropin-releasing hormone*) koji stimuliše lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH, eng. *adrenocorticotropic hormone*) iz prednjeg režnja hipofize. Kao odgovor na ACTH stimulaciju iz adrenalnog korteksa se izlučuju glukokortikoidni hormoni. U normalnim fiziološkim uslovima HHA osa je regulisana negativnom povratnom spregom jer porast nivoa kortizola u cirkulaciji inhibira dalje oslobađanje CRH i ACTH. Prisustvo direktne negativne povratne sprege je od ključnog značaja za očuvanje kapaciteta HHA ose za postizanje adekvatnog fiziološkog odgovora i održavanje relativno konstantne koncentracije kortizola u cirkulaciji.

#### **1.6.1.1. Tkivno-specifični prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona**

Unutarćelijski nivo glukokortikoida zavisi ne samo od nivoa glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji, već i od prereceptorskog metabolizma glukokortikoida koji je regulisan aktivnošću enzima  $11\beta$  hidrosisteroid dehidrogenaze. Opisane su dve izoforme ovog enzima ( $11\beta$ HSD1 i  $11\beta$ HSD2) koje se nalaze u membrani endoplazmatičnog



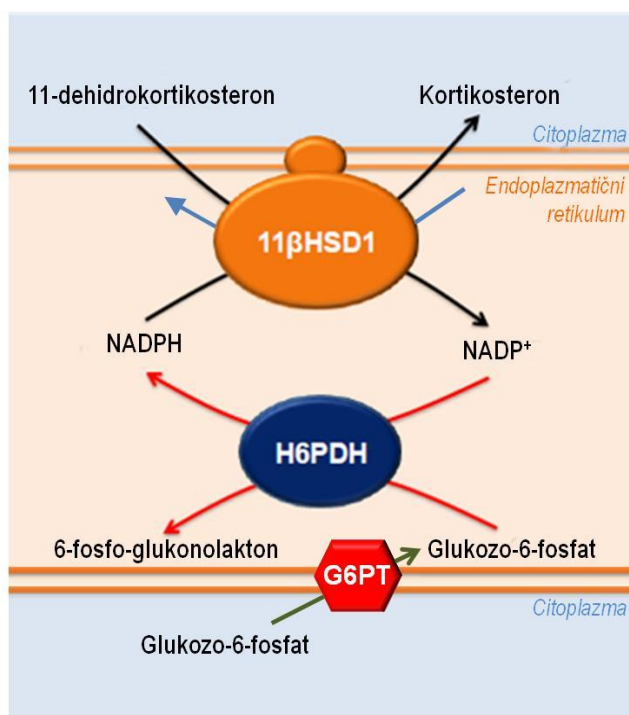
retikuluma, a razlikuju se po izboru supstrata i kofaktora, tkivnoj rasprostranjenosti i fiziološkoj ulozi (Krozowski i sar., 1999). Izoforma 11 $\beta$ HSD2 funkcioniše isključivo kao dehidrogenaza i katalizuje prevođenje aktivnih u neaktivne glukokortikoide. Kao kofaktor koristi nikotinamid dinukleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>), a najviše je zastupljena u bubrezima, tankom crevu, placenti, pljuvačnim i znojnim žlezdama. Fiziološki smisao aktivnosti enzima 11 $\beta$ HSD2 u navedenim tkivima je uklanjanje kortizola koji bi se mogao vezati za mineralokortikoidne receptore i izazvati niz poremećaja vezanih za balans soli u organizmu i krvni pritisak (Seckl, 1993; Sandeep i Walker, 2001).

Izoforma 11 $\beta$ HSD1 u određenim uslovima *in vitro* može da funkcioniše kao dehidrogenaza, ali *in vivo* ona gotovo isključivo funkcioniše kao reduktaza i prevodi kortizon u kortizol kod ljudi, odnosno 11-dehidrokortikosteron u kortikosteron kod glodara (Slika 1.4.). Za odvijanje ove reakcije neophodno je prisustvo redukovane forme NADP<sup>+</sup>-a (NADPH) kao kofaktora, koji se regeneriše u endoplazmatičnom retikulumu (Seckl i Walker, 2001). 11 $\beta$ HSD1 je predominantno eksprimirana u jetri, masnom tkivu, plućima, mozgu, skeletnim mišićima i gonadama (Sandeep i Walker, 2001; Tomlinson i sar., 2004). Imajući u vidu da je koncentracija glukokortikoida u cirkulaciji relativno konstantna, fiziološka uloga enzima 11 $\beta$ HSD1 je održavanje odgovarajućeg stepena aktivacije glukokortikoidnog receptora u skladu sa energetske zahtevima tkiva u datom trenutku (Walker i sar., 1995). Treba napomenuti da promene nivoa tkivnih glukokortikoida ne zavise samo od enzima 11 $\beta$ HSD1, već i od ravnoteže između aktivnosti 11 $\beta$ HSD izoformi i aktivnosti drugih enzima kao što su 5 $\alpha$ - i 5 $\beta$ -reduktaze (Stewart i sar., 1999).

Povećana aktivnost 11 $\beta$ HSD1 ima za posledicu povećanje koncentracije glukokortikoida u jetri i masnom tkivu, što može dovesti do razvoja karakteristika metaboličkog sindroma. U prilog tome idu brojni eksperimenti na genetički modifikovanim sojevima miševa kao i terapijski pristupi koji se zasnivaju na selektivnoj inhibiciji 11 $\beta$ HSD1 (Xiang i sar., 2005). Primera radi, 11 $\beta$ HSD1 *knock-out*<sup>3</sup> miševi koji imaju nizak nivo glukokortikoida u tkivima i nepromenjen nivo hormona u cirkulaciji (Harris i sar.,

<sup>3</sup> *Knock-out* životinja – životinja kod koje je primenom genetičkog inženjeringa gen od interesa inaktiviran.

2001) ne postaju dislipidemični, hiperglikemični, niti gojazni nakon ishrane obogaćene mastima (Kotelevtsev i sar., 1997; Morton i sar., 2004a). Sa druge strane, transgeni<sup>4</sup> miševi sa povećanom ekspresijom 11 $\beta$ HSD1 u masnom tkivu imaju gotovo sve karakteristike metaboličkog sindroma, uključujući gojaznost i hipertenziju (Masuzaki i sar., 2001; Masuzaki i sar., 2003). Miševi sa povećanom ekspresijom 11 $\beta$ HSD1 u jetri razvijaju insulinsku rezistenciju, dislipidemiju i hipertenziju, ali ne postaju gojazni (Paterson i sar., 2004). Stepenn metaboličkih poremećaja je u korelaciji sa tkivno-specifičnom promenom aktivnosti 11 $\beta$ HSD1, s obzirom da je uočeno da patofiziološkom stanju više doprinosi poremećena regulacija enzima u masnom tkivu nego u jetri (Atanasov i Odermatt, 2007).



**Slika 1.4. Sinteza glukokortikoidnih hormona.**

(preuzeto sa: <https://www.era.lib.ed.ac.uk>)

Enzim 11 $\beta$ HSD predominantno funkcioniše kao reduktaza i prevodi neaktivni 11-dehidrokortikosteron u aktivni kortikosteron kod glodara. Za njegovu reduktaznu aktivnost je neophodno prisustvo kofaktora NADPH kojeg obezbeđuje enzim pentozo-fosfatnog puta, H6PDH. Supstrat ovog enzima, glukozo-6-fosfat, se doprema u lumen endoplazmatičnog retikuluma pomoću transportera G6PT, što ukazuje na učešće nutritivnog statusa ćelije u regulaciji prereceptorskog metabolizma glukokortikoidnih hormona.

<sup>4</sup> Transgena životinja – životinja koja u svojim germinativnim ćelijama sadrži gen koji potiče iz drugog organizma.

#### 1.6.1.1.2. Regulacija aktivnosti i ekspresije enzima 11 $\beta$ HSD1

Najvažniji faktor koji reguliše aktivnost enzima 11 $\beta$ HSD1 je dostupnost kofaktora NADPH (Hewitt i sar., 2005). U produkciji NADPH ključnu ulogu ima heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (H6PDH, eng. *hexose-6-phosphate dehydrogenase*), enzim čiji katalitički domen direktno interaguje sa katalitičkim domenom 11 $\beta$ HSD1 u lumenu endoplazmatskog retikuluma. H6PDH katalizuje prve dve reakcije pentozo-fosfatnog puta i prevodi NADP<sup>+</sup> u NADPH (**Slika 1.4.**) (Banhegyi i sar., 2004). Fizička i funkcionalna interakcija 11 $\beta$ HSD1 i H6PDH je ključna za aktivaciju glukokortikoida jer omogućava redukciju hormona u inače oksidativnim uslovima u endoplazmatskom retikulumu. Naime, *in vitro* izolovani enzim 11 $\beta$ HSD1 može da ima dvojnju funkciju reduktaze i dehidrogenaze, dok je *in vivo* favorizovana njegova reduktazna aktivnost. Smer reakcije pre svega zavisi od dostupnosti odgovarajućeg kofaktora i zbog toga H6PDH ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između aktivne i neaktivne forme glukokortikoida u ćelijama u kojima je enzim 11 $\beta$ HSD1 ekspimiran (Czegle i sar., 2006; Piccirella i sar., 2006). Ova hipoteza je potvrđena brojnim eksperimentima koji su pokazali da mutacije u genu koji kodira H6PDH dovode do narušavanja reduktazne aktivnosti enzima 11 $\beta$ HSD1 (Draper i sar., 2003). U jetri H6PDH *knock-out* miševa dolazi do inaktivacije glukokortikoida što se, pre svega, odražava na nivo glukoze u cirkulaciji. Pored izražene hipoglikemije i stimulisane sinteze glikogena, ove životinje se odlikuju i gubitkom telesne težine, poboljšanom osetljivošću na insulin kao i povećanjem nivoa kortikosterona u plazmi zbog izostanka negativne povratne regulacije HHA ose (Lavery i sar., 2007).

Pored H6PDH i 11 $\beta$ HSD1, transporter glukoze-6-fosfata (G6PT, eng. *glucose-6-phosphate transporter*) je ključan za odvijanje pentozo-fosfatanog puta u ćelijama jetre, masnog tkiva i granulocita. Trijada G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 funkcioniše kao nutritivni senzor i ima mogućnost da reguliše nivo aktivnih glukokortikoida u skladu sa energetske bilansom. Naime, porast nivoa glukoze-6-fosfata u ćeliji stimuliše aktivnost G6PT-a koji je lokalizovan u membrani endoplazmatskog retikuluma (**Slika 1.4.**). G6PT obezbeđuje supstrat za H6PDH što podstiče sintezu aktivnih glukokortikoida (Czegle i sar., 2012). Pored ishrane obogaćene ugljenim hidratima, i ishrana mastima može da dovede do

porasta koncentracije glukoze-6-fosfata. Naime, oksidacijom slobodnih masnih kiselina u mitohondrijama sintetišu se acetyl-CoA i NADPH koji inhibiraju aktivnost piruvat dehidrogenaze. Takođe, povećan nivo citrata dalje sprečava aktivaciju fosfofruktokinaze što za posledicu ima zaustavljenje glikolize i povećanje nivoa glukoze-6-fosfata, što rezultira aktivacijom trijade G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 (Randle, 1998). Eksperimentalno je potvrđeno da povećan nivo slobodnih masnih kiselina kod ljudi dovodi do akutnog povećanja aktivnosti enzima 11 $\beta$ HSD1 u masnom tkivu (Wake i sar., 2006).

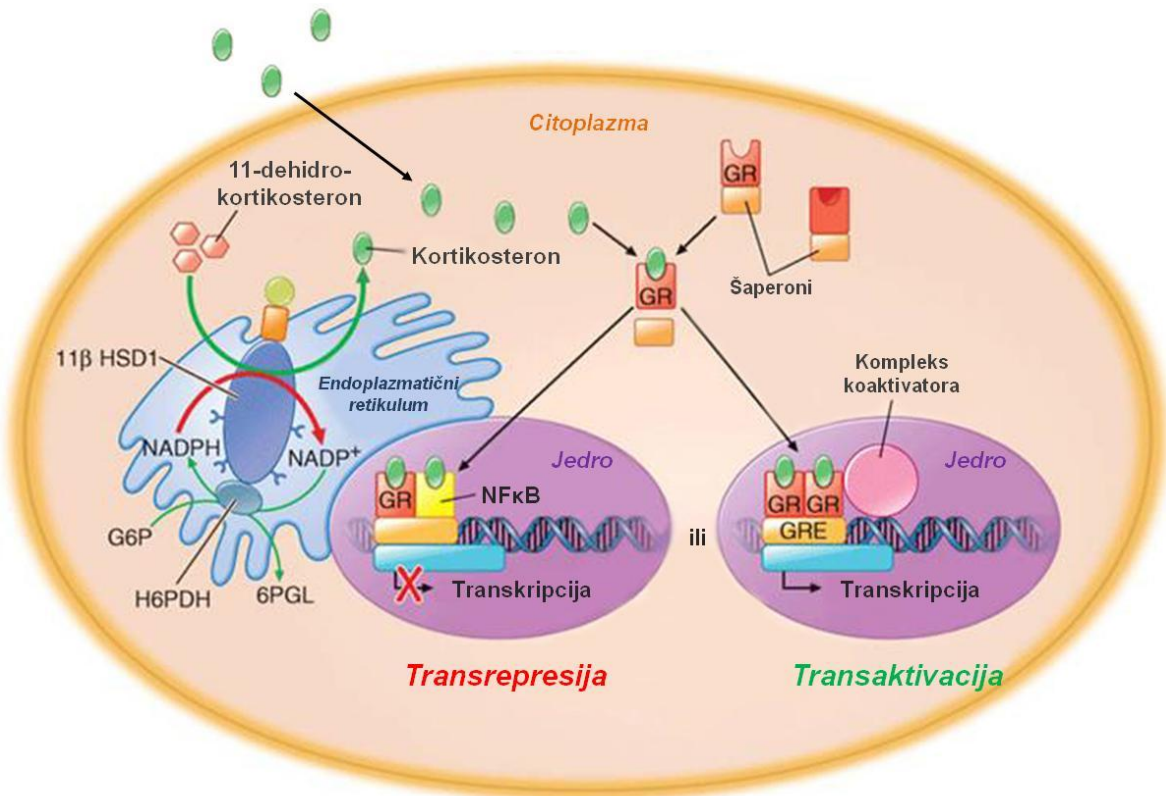
Iako se smatra da način ishrane predominantno utiče na aktivnost 11 $\beta$ HSD1, nisu retki eksperimenti koji potvrđuju promene i u njegovoj ekspresiji. Ishrana obogaćena fruktozom nakon samo 24 h povećava nivo 11 $\beta$ HSD1 u jetri i visceralnom masnom tkivu pacova (London i Castonguay, 2011). Prisustvo masti u hrani može da menja predispoziciju za razvoj gojaznog fenotipa putem uticaja na ekspresiju 11 $\beta$ HSD1 kod miševa (Morton i sar., 2004b). Zbog toga se smatra da je jedna od glavnih uloga enzima 11 $\beta$ HSD1 adaptacija na određen način ishrane i da je poremećaj ovog regulatornog mehanizma povezan sa povećanim nivoom 11 $\beta$ HSD1 u masnom tkivu gojaznih osoba (Walker i Andrew, 2006).

### 1.6.2. Mehanizam delovanja glukokortikoidnih hormona

Glukokortikoidi svoje efekte na različite ćelijske procese ostvaruju kroz interakciju sa specifičnim intracelularnim proteinom, glukokortikoidnim receptorom (GR). GR pripada familiji steroidnih jedarnih receptora koji funkcionišu kao transkripcioni regulatori, aktiviraju se vezivanjem liganda i regulišu širok spektar fizioloških procesa. U odsustvu hormona, GR se nalazi u citoplazmi u neaktivnom stanju, kao deo složenog heterooligomernog proteinskog kompleksa. Svi članovi kompleksa - različiti proteini, šaperoni i košaperoni, učestvuju u regulaciji sinteze i savijanja GR-a, njegovog sazrevanja, transporta u jedro, vezivanja za DNK i degradacije (Hutchison i sar., 1993).

Glukokortikoidi se reverzibilno vezuju za receptore što rezultira formiranjem aktivnog hormon-receptor kompleksa (**Slika 1.5.**). Kao direktna posledica ove interakcije, receptor prolazi kroz alosterične promene označene kao aktivacija ili transformacija.

Tokom procesa aktivacije dolazi do disocijacije receptora od kompleksa, fosforilacije, oslobađanja signala za jedarnu lokalizaciju (NLS, eng. *nuclear localization signal*) i domena za vezivanje za DNK, kao i do translokacije GR-a u jedro (Carrigan i sar., 2007). Nakon toga, GR sa vezanim hormonom prepoznaje specifične DNK sekvence (GRE, eng. *glucocorticoid response element*) u promotorskim regionima ciljnih gena i/ili stupa u interakcije sa drugim transkripcionim regulatorima.



**Slika 1.5. Mehanizam delovanja glukokortikoidnih hormona.**

(preuzeto sa: <http://www.uptomed.ir>)

Glukokortikoidi se reverzibilno vezuju za GR što rezultira formiranjem aktivnog hormon-receptor kompleksa koji prelazi u jedro. GR sa vezanim hormonom prepoznaje GRE sekvence u promotorskim regionima ciljnih gena i/ili stupa u interakcije sa drugim transkripcionim regulatorima. Na slici su dati primeri direktne transaktivacije i transrepreseije nakon vezivanja za proinflamatorni medijator NFκB.

GR može da reguliše ekspresiju gena na dva načina: direktno, vezivanjem za DNK i indirektno, putem protein-protein interakcija sa drugim transkripcionim regulatorima i

kofaktorima. U oba slučaja, GR može dovesti do stimulacije (transaktivacije) ili inhibicije (transrepresije) transkripcije ciljnih gena (**Slika 1.5.**) (Beato i Sanchez-Pacheco, 1996).

Prema modelu transaktivacije, GR se u obliku homodimera vezuje za palindromske GRE sekvence i stimuliše transkripciju (Nicolaidis i sar., 2010). Brojni geni su pozitivno regulisani glukokortikoidima, uključujući i one čiji proteinski produkti učestvuju u osnovnim metaboličkim procesima. Regulacijom transkripcije gena koji kodira ključni enzim glukoneogeneze, PEPCK (Opherk i sar., 2004), glukokortikoidi podstiču mobilizaciju glukoze iz jetre u druga tkiva prilikom povećanih energetske zahteva. Smatra se čak da se stimulacija transkripcije gena za PEPCK nalazi u osnovi razvoja dijabetesa koji je praćen visokim nivoom glukoze u krvi, kao i odsustvom inhibicije njene sinteze u jetri (Friedman i sar., 1993). Dakle, povećana transaktivaciona aktivnost GR-a može da rezultira ne samo hiperglikemijom, već i uspostavljanjem insulinske rezistencije.

Pored transaktivacije, GR može direktnim vezivanjem za DNK da inhibira transkripciju ciljnih gena, vezujući se za negativne GRE (nGRE) sekvence. Ovaj oblik regulacije transkripcije posredovane glukokortikoidima je uključen u povratnu inhibiciju HHA ose. Naime, u hipotalamusu i adenohipofizi glukokortikoidi inhibiraju transkripciju gena za CRH i proopiomelanokortin (POMC, eng. *proopiomelanocortin*) vezujući se za nGRE u promotorima ovih gena (Nakai i sar., 1991; Malkoski i Dorin, 1999).

GR može da moduliše transkripciju gena i interakcijom sa drugim proteinima, koji takođe mogu biti transkripcioni regulatori. Na ovaj način glukokortikoidi inhibiraju ili stimulišu njihovu transkripcionu aktivnost. Poznato je da glukokortikoidi svoje anti-inflamatorne efekte ostvaruju inhibicijom signalnih puteva proinflamatornih transkripcionih regulatora, kao što su nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) i aktivacioni protein-1 (AP-1) (Rhen i Cidlowski, 2005). Interakcija između GR-a i NF $\kappa$ B se odvija preko DNK-vezujućeg domena receptora i p65 subjedinice NF $\kappa$ B. Na taj način GR fizički sprečava vezivanje NF $\kappa$ B za DNK, a ukoliko je do njega već došlo, GR deluje tako što narušava formiranje transkripcionog kompleksa (Smoak i Cidlowski, 2004).

## 1.7. Metabolizam lipida u jetri

Jedno od glavnih patofizioloških obeležja metaboličkog sindroma je povećano deponovanje masti u jetri koje je povezano sa insulinskom rezistencijom, gojaznošću, hiperglikemijom i hipertenzijom (Browning i sar., 2004). Pored toga, nagomilavanje masti je osnovni faktor rizika za razvoj NAFLD-a, lipotoksičnosti, inflamacije, kao i endoplazmatskog stresa usled povećane sinteze reaktivnih vrsta kiseonika (Sanyal i sar., 2001; Farrell i Larter, 2006; Neuschwander-Tetri, 2010). Svaki korak lipidnog metabolizma je precizno regulisan udruženom aktivnošću hormona, nuklearnih receptora, unutarćelijskih signalnih puteva i transkripcionih regulatora (Bechmann i sar., 2012). Bez obzira na kompleksnost lipidnog metabolizma u jetri, on se može podeliti u nekoliko osnovnih procesa koji mogu da se odigravaju paralelno: preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije, *de novo* lipogeneza, mitohondrijalna  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina i sinteza i sekrecija triglicerida.

Mehanizmi koji dovode do nagomilavanja masti u jetri su (Nagle i sar., 2009):

1. Povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina u hepatocitima zbog intenzivne apsorpcije masti u crevima, stimulisane lipolize triglicerida u masnom tkivu i *de novo* lipogeneze u jetri;
2. Povećan intenzitet sinteze triglicerida u jetri;
3. Inhibicija procesa  $\beta$ -oksidacije u mitohondrijama hepatocita;
4. Poremećena sekrecije triglicerida u formi VLDL-a iz jetre.

Iako insulin ima važnu ulogu u metabolizmu masti u jetri, još uvek je nejasno da li je povećana sinteza triglicerida uzrok ili posledica narušavanja insulinske signalne kaskade. Sa jedne strane, insulinska rezistencija je stanje praćeno poremećenom lipolizom u masnom tkivu i povećanim nivoom slobodnih masnih kiselina, glukoze i insulina u plazmi što je uzrok nastanka masne jetre zbog stimulisane *de novo* lipogeneze ili inhibirane  $\beta$ -oksidacije (Sanyal i sar., 2001). Sa druge strane, nagomilavanje intermedijera lipidnog metabolizma, DAG-a i ceramida, može negativno da utiče na prenos signala nizvodno od insulinskog receptora dovodeći do rezistencije (Samuel i sar., 2010). U prilog tome idu rezultati

eksperimenata koji pokazuju da ishrana mastima može da dovede do razvoja insulinske rezistencije u jetri bez uticaja na nivo insulina na sistemskom nivou (Hamaguchi i sar., 2005).

Pored insulina i glukokortikoidni hormoni regulišu metabolizam lipida u jetri i njihova povećana koncentracija doprinosi nastanku steatoze (Lewis i sar., 2002). Pokazano je da primena glukokortikoida kod pacova stimuliše sintezu triglicerida, a inhibira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina. Pored toga, uočeno je da i u izolovanim hepatocitima dolazi do povećane sinteze i akumulacije triglicerida, kao i sinteze i sekrecije VLDL-a, nakon njihovog izlaganja glukokortikoidima (Cole i sar., 1982; Giudetti i Gnoni, 1998). Primena *antisense* oligonukleotida<sup>5</sup> koji onemogućavaju ekspresiju gena za GR kod gojaznih pacova sa dijabetesom, može da snizi nivo triglicerida i slobodnih masnih kiselina nakon ishrane obogaćene mastima (Watts i sar., 2005). Primećeno je i da GR *knock-out* miševi imaju snižen nivo triglicerida u plazmi (Opherk i sar., 2004). Za razliku od dobro opisane uloge u metabolizmu glukoze, još uvek postoje izvesne nepoznanice kada je u pitanju mehanizam delovanja glukokortikoida na metabolizam masti. Pojava masne jetre nakon aktivacije GR-a je najverovatnije posledica transrepresije gena čiji su proteinski produkti uključeni u lipolizu triglicerida i  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, kao i stimulacije preuzimanja i skladištenja masnih kiselina (Lemke i sar., 2008).

### 1.7.1. Preuzimanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije

Deo slobodnih masnih kiselina koje predstavljaju osnovne prekursore za sintezu triglicerida jetra preuzima iz cirkulacije. U fiziološkim uslovima, ovaj pul masnih kiselina nastaje u masnom tkivu nakon aktivacije hormon-senzitivne lipaze, ključnog enzima lipolitičkog procesa. Prilikom visokokalorijske ishrane lipoliza je inhibirana insulinom koji ograničava sekreciju masnih kiselina i pokreće lipogenezu u masnom tkivu. Zbog toga je kod gojaznih osoba sa insulinskom rezistencijom lipoliza intenzivirana, a koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi povećana (Delarue i Magnan, 2007). Važnu ulogu u

<sup>5</sup> *Antisense* oligonukleotid – jednolančani fragment molekula RNK (ili DNK) koji se vezuje za komplementarnu iRNK i onemogućava sintezu proteina.



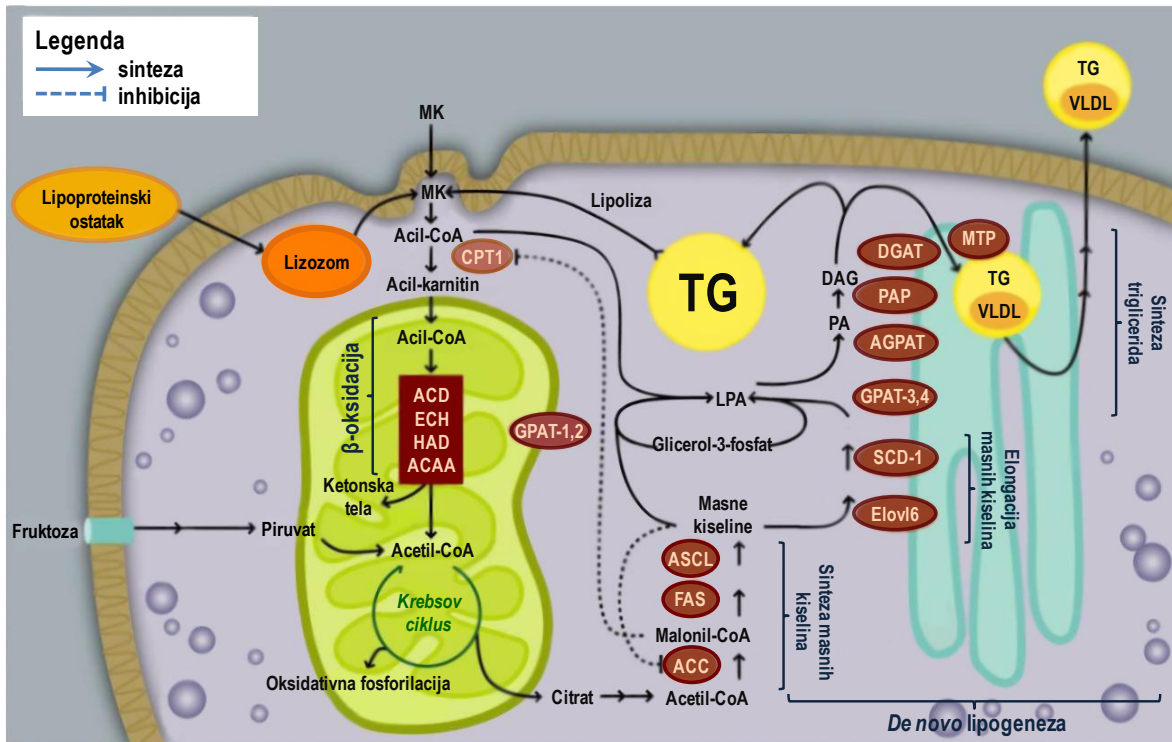
stimulaciji lipolize ima i lokalno povećanje glukokortikoidnih hormona u masnom tkivu, kao posledica ishrane bogate fruktozom (Bursac i sar., 2013) ili mastima (Morton i sar., 2004a).

Transport slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije se ostvaruje kroz ćelijsku membranu hepatocita pomoću specifičnih familija proteina: transportera (FATP, eng. *fatty acid transporter protein*), kaveolina, translokaza (FAT/CD36, eng. *fatty acid translocase*) i proteina koji vezuju masne kiseline (FABP, eng. *fatty acid binding protein*) (Koo, 2013). Značaj transportera su potvrdili eksperimenti na FATP i kaveolin *knock-out* miševima koji su otporni na razvoj steatoze i gojaznosti nakon ishrane obogaćene mastima (Doege i sar., 2006; Fernandez i sar., 2006). Sa druge strane, translokaza FAT/CD36 nije visoko ekspimirana u hepatocitima, ali je primećeno da je njen nivo u pozitivnoj korelaciji sa nivoom triglicerida u jetri osoba sa NAFLD-om (Greco i sar., 2008).

### **1.7.2. De novo lipogeneza u jetri**

*De novo* lipogeneza u jetri je složen metabolički proces koji obuhvata sintezu i elongaciju masnih kiselina i formiranje triglicerida od produkata katabolizma ugljenih hidrata (**Slika 1.6.**) (Koo, 2013). Prvi korak ovog procesa podrazumeva sintezu masnih kiselina nakon povećanog unosa ugljenih hidrata. Naime, u procesu glikolize monosaharidi bivaju razgrađeni do piruvata koji u mitohondrijama podleže oksidativnoj dekarboksilaciji do acetil-CoA. Acetil-CoA se zatim posredstvom citrata transportuje u citoplazmu gde ga karboksilaza acetil-CoA (ACC, eng. *acetyl-CoA carboxylase*) prevodi u malonil-CoA (Kawano i Cohen, 2013). Aktivnost enzima ACC je regulisana energetskim statusom ćelije, insulinom i prisustvom kofaktora NADPH (Byrne i sar., 2009). Pored procesa *de novo* lipogeneze, ACC reguliše i  $\beta$ -oksidaciju, s obzirom da je malonil-CoA inhibitor transferaze karnitin palmitoila 1 (CPT1, eng. *carnitine palmitoyltransferase 1*), enzima koji omogućava transport masnih kiselina u mitohondrije (**Slika 1.6.**) (Munday, 2002; Abu-Elheiga i sar., 2005). Poslednji korak u sintezi zasićenih masnih kiselina katalizuje sintaza masnih kiselina (FAS, eng. *fatty acid synthase*) koja na malonil-CoA dodaje dva ugljenikova atoma (Nagle

i sar., 2009; Kawano i Cohen, 2013). Iako je FAS ključni enzim lipogeneze, FAS *knock-out* miševi nisu zaštićeni od razvoja hepatične steatoze, najverovatnije zbog višestrukog povećanja nivoa malonil-CoA koji potom inhibira  $\beta$ -oksidaciju (Chakravarthy i sar., 2005).



**Slika 1.6. Metabolizam lipida u jetri.**

(preuzeto iz Nagle i sar., 2009)

Jetra iz cirkulacije preuzima slobodne masne kiseline koje se nakon aktivacije transportuju u mitohondrije i ulaze u proces  $\beta$ -oksidacije. Nastali acetil-CoA ulazi u Krebsov ciklus. Masne kiseline mogu i da se esterifikuju sa glicerol-3-fosfatom i uključe u proces sinteze triglicerida. U slučaju ishrane fruktozom, acetil-CoA se prevodi u citrat koji se transportuje u citoplazmu i predstavlja supstrat za *de novo* lipogenezu. Ovaj proces podrazumeva sintezu masnih kiselina, njihovu elongaciju i formiranje triglicerida. Trigliceridi se zatim deponuju u jetri ili se pakuju u VLDL i oslobađaju u cirkulaciju. MK - masne kiseline; TG - trigliceridi; LPA – lizofosfatidat; PA - fosfatidat.

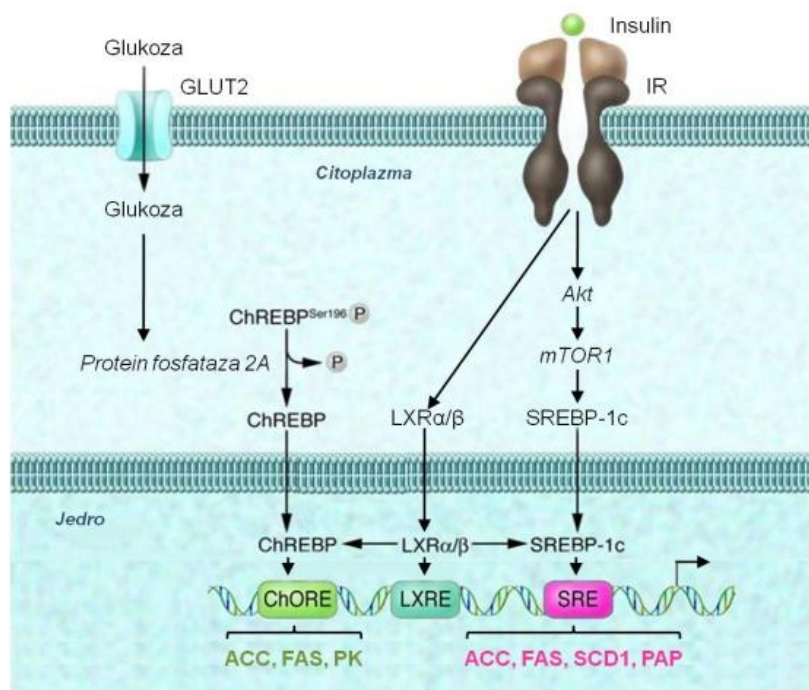
Sledeći korak u procesu *de novo* lipogeneze podrazumeva aktivaciju zasićenih masnih kiselina, koje mogu postati supstrat za specifične enzime u membrani endoplazmatskog retikuluma, elongazu (ELOVL6) i desaturazu steroil-CoA (SCD) (Slika 1.6.) ili mogu ući u proces sinteze membranskih fosfolipida i holesterol estara (Nagle i sar.,

2009). SCD *knock-out* miševi ne samo da su zaštićeni od razvoja gojaznog fenotipa, masne jetre i insulinske rezistencije nakon ishrane obogaćene mastima i ugljenim hidratima (Ntambi i sar., 2002), već je kod njih zapažena i smanjena ekspresija gena za ACC i FAS (Miyazaki i sar., 2007).

Masne kiseline nastale tokom desaturacije predstavljaju glavni prekursor sinteze triglicerida, trećeg koraka *de novo* lipogeneze. Ovaj proces se odvija na citoplazmatičnoj strani mitohondrijalne membrane i membrane endoplazmatičnog retikuluma uz pomoć dve aciltransferaze, GPAT (eng. *glycerol-3-phosphate acyltransferase*) i AGPAT (eng. *acylglycerol-3-phosphate acyltransferase*), i fosfataze fosfatidne kiseline (PAP, eng. *phosphatidic acid phosphatase*) koja katalizuje sintezu DAG-a (**Slika 1.6.**). Poslednji korak sinteze triglicerida u jetri podrazumeva acilaciju DAG-a pomoću DAG aciltransferaze (DGAT, eng. *diacylglycerol acyltransferase*) i njihovo deponovanje u vidu masnih kapi u citoplazmi (Nagle i sar., 2009; Kawano i Cohen, 2013).

Regulacija *de novo* lipogeneze se uglavnom odvija na nivou transkripcije uz učešće dva transkripciona regulatora, proteina koji se vezuje za sterol regulatorni element 1c (SREBP-1c, eng. *sterol regulatory element binding protein 1c*) i proteina koji se vezuje za regulatorne sekvence koje odgovaraju na ugljene hidrate (ChREBP, eng. *carbohydrate response element binding protein*) (**Slika 1.7.**). SREBP-1c pripada familiji proteina čiji su prekursori ukotvljeni u membranu endoplazmatičnog retikuluma. Njihova aktivacija se odvija kada je energetska bilans u ćeliji pozitivan i podrazumeva dve sukcesivne proteolitičke reakcije nakon transporta u Goldži aparat (Koo, 2013). SREBP-1c funkcioniše kao transaktivator gena za ACC i FAS i narušavanje njegove regulatorne aktivnosti može biti uzrok patofizioloških promena karakterističnih za NAFLD (Ahmed i Byrne, 2007). Povećan nivo proteina SREBP-1c kod transgenih životinja značajno stimuliše sintezu masnih kiselina i njihovo skladištenje u jetri. Pored toga što utiče na ekspresiju gena za ACC i FAS, SREBP-1c reguliše transkripciju gena za enzime koji su uključeni u elongaciju masnih kiselina (SCD1) i sintezu triglicerida (PAP) (Byrne i sar., 2009). Aktivacija transkripcije gena za SREBP-1c se odvija u prisustvu povećanog nivoa zasićenih masnih kiselina nakon visokokalorijske ishrane (Shimomura i sar., 1998; Yahagi i sar., 1999).

Osnovni regulator ovog procesa je insulin koji može da deluje na dva načina: putem aktivacije receptora LXR (eng. *liver X receptor*) ili aktiviranjem signalnog puta mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) (Chen i sar., 2004; Porstmann i sar., 2008). Insulin aktivira SREBP-1c koji pokreće lipogenezu i nagomilavanje triglicerida u jetri čiji ishod može biti razvoj insulinske rezistencije (Nagle i sar., 2009). Sa druge strane, prilikom gladovanja, smanjena sekrecija insulina, povećana koncentracija glukagona, kao i aktivnost određenih kinaza ograničavaju ekspresiju SREBP-1c što inhibitorno deluje na lipogenezu u jetri (Matsuda i sar., 2001; Lu i Shyy, 2006). Uprkos gore navedenom, pokazano je da aktivnost SREBP-1c nije dovoljna za potpunu regulaciju *de novo* lipogeneze jer se u jetri SREBP-1c *knock-out* miševa ipak odvija sinteza masnih kiselina, mada manjim intenzitetom (Liang i sar., 2002).



**Slika 1.7. Transkripciona regulacija *de novo* lipogeneze.**

(preuzeto sa: <http://www.lucastafur.com>)

Insulin aktivira transkripcioni regulator SREBP-1c preko receptora LXR i aktiviranjem signalnog puta mTOR. Nakon vezivanja za specifične DNK sekvence, SREBP-1c pokreće transkripciju gena koji su uključeni u sintezu i elongaciju masnih kiselina i sintezu triglicerida. Transkripcioni regulator ChREBP se aktivira pri povećanom nivou glukoze, koja stimuliše njegovu defosforilaciju, translokaciju u jedro i vezivanje za promotorske sekvence ciljnih gena. P - fosfatna grupa.

Važnu ulogu u regulaciji lipogeneze ima transkripcioni regulator ChREBP. On na svojstven način povezuje metabolizam ugljenih hidrata i lipida jer njegova aktivacija zavisi od koncentracije glukoze (**Slika 1.7.**). Povećanje nivoa glukoze u hepatocitima stimuliše defosforilaciju ChREBP-a, njegovu translokaciju u jedro i vezivanje za promotorske sekvence ciljnih gena. Na taj način se pokreće transkripcija gena za ACC i FAS i obezbeđuje supstrat za sintezu masnih kiselina (piruvat kinaza) (Uyeda i Repa, 2006; Cohen i sar., 2011).

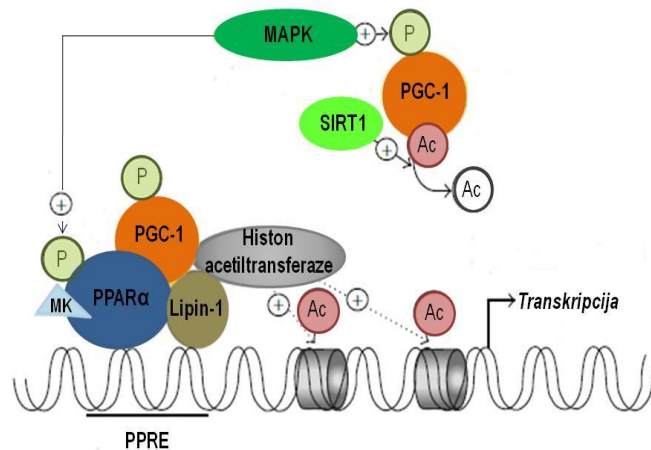
### 1.7.2. $\beta$ -Oksidacija masnih kiselina

$\beta$ -Oksidacija predstavlja mitohondrijalni proces razgradnje masnih kiselina do acetil-CoA koji ulazi u Krebsov ciklus (**Slika 1.6.**), ili se koristi za sintezu ketonskih tela ako je prisutan u višku (Eaton i sar., 1996). Tokom prvog koraka  $\beta$ -oksidacije, masne kiseline se aktiviraju formiranjem acil-CoA, a zatim transportuju iz citoplazme u mitohondrije. Transport zavisi od prisustva karnitina jer je mitohondrijalna membrana nepropustljiva za masne kiseline. Prebacivanje aktivirane masne kiseline na karnitin katalizuje enzim CPT1 koji se nalazi na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Acil-karnitin kompleks se zatim transportuje kroz međumembranski prostor pomoću translokaze, dok enzim CPT2 na unutrašnjoj membrani oslobađa acil-CoA iz kompleksa (Koo, 2013). Proces  $\beta$ -oksidacije se odigrava u mitohondrijalnom matriksu u četiri koraka. Prvu reakciju katalizuje jedna od četiri vrste acil-CoA dehidrogenaze (ACD, eng. *acyl-CoA dehydrogenase*) koje se razlikuju po specifičnosti za različite dužine lanaca masnih kiselina, dok specifična hidrataza (ECH, eng. *enoyl-CoA hydratase*), dehidrogenaza (HADH, eng. *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*) i tiolaza (ACAA, eng. *acetyl-CoA acyltransferase*) katalizuju prevođenje acil-CoA estara u krajnji proizvod  $\beta$ -oksidacije, acetil-CoA (Kawano i Cohen, 2013; Koo, 2013).

Jedna od najvažnijih kontrolnih tačaka  $\beta$ -oksidacije je reakcija koju katalizuje CPT1. U uslovima gladovanja, oksidacija masnih kiselina je vrlo intenzivna jer je CPT1 oslobođen inhibitornog dejstva malonil-CoA (Munday, 2002). Naime, kalorijska restrikcija

je praćena povećanim oslobađanjem glukagona koji aktivacijom određene kinaze stimuliše fosforilaciju i posledićnu inaktivaciju enzima ACC (Foster, 2012). Suprotno dejstvo ima insulin jer aktivira SREBP-1c, pozitivni regulator transkripcije gena za ACC. Pored toga, insulin inhibira lipolizu u masnom tkivu i ogranićava nivo supstrata za  $\beta$ -oksidaciju (Sidossis i sar., 1996; Kawano i Cohen, 2013).

$\beta$ -Oksidacija moēe biti stimulisana na nivou transkripcije gena za enzime koji ućestvuju u razgradnji masnih kiselina, ukljućujući i CPT1 (Slika 1.8). Centralno mesto u ovom procesu ima receptor aktiviran peroksizomalnim proliferatorom  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , eng. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ), transkripcioni regulator koji pripada familiji nuklearnih receptora zavisnih od liganda. Nakon aktivacije PPAR $\alpha$  regutuje koaktivator 1 $\alpha$  receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom  $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$  eng. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$* ) i pokreće transkripciju ciljnih gena (Reddy i Hashimoto, 2001; Mandard i sar., 2004).



**Slika 1.8. Transkripciona regulacija  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina.**

(preuzeto sa: <http://www.hindawi.com>)

Nakon postranslacionih modifikacija i ligand zavisne aktivacije, transkripcioni regulator PPAR $\alpha$  formira kompleks sa koaktivatorima (PGC-1, lipin-1) i histon acetiltransferazama i pokreće transkripciju gena ĉiji proteinski produkti ućestvuju u  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina.

### 1.7.3. Uloga lipina-1 u regulaciji lipidnog metabolizma

Povećan nivo slobodnih masnih kiselina u jetri moēe pokrenuti dva biohemijska puta –  $\beta$ -oksidaciju u mitohodrijama ili sintezu i deponovanje masnih kiselina u formi

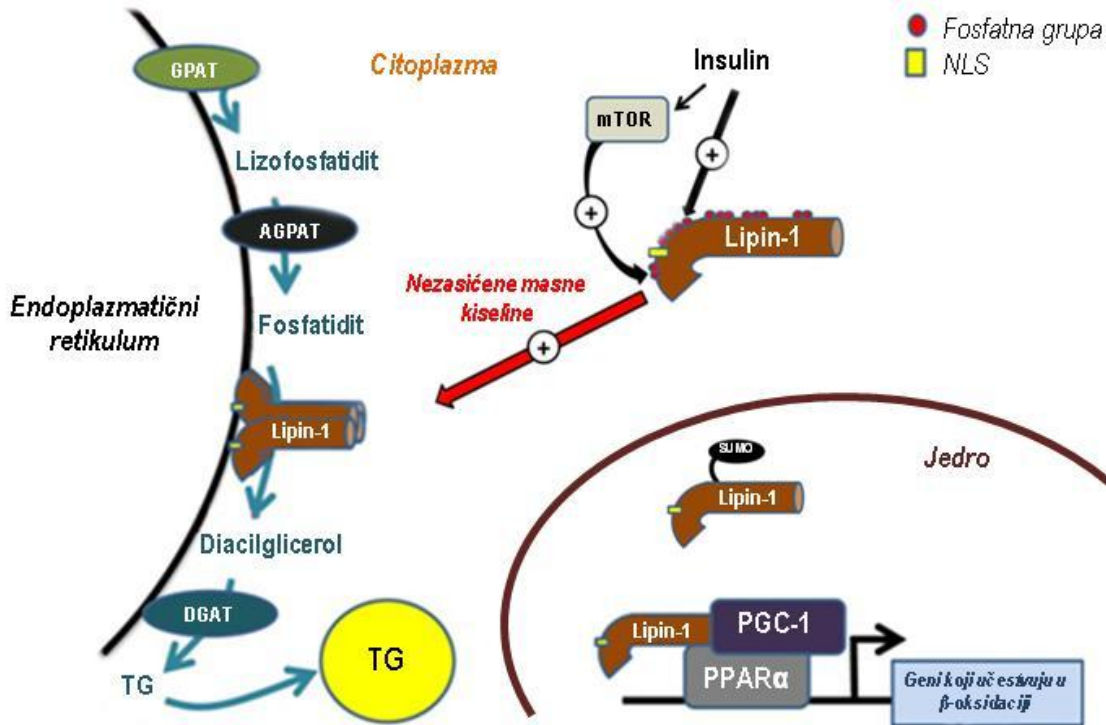
triglicerida. Ovi procesi se međusobno dopunjavaju s obzirom da novonastali masni depoi mogu predstavljati izvor masnih kiselina za  $\beta$ -oksidaciju. Centralno mesto u održavanju ravnoteže između ova dva metabolička puta ima lipin-1, koji može da funkcioniše i kao enzim PAP i kao transkripcioni koaktivator koji pozitivno reguliše ekspresiju gena uključenih u  $\beta$ -oksidaciju. Njegova aktivnost je precizno regulisana na nivou transkripcije, kao i posttranslacionim modifikacijama i unutarćelijskom distribucijom (Reue i Brindley, 2008; Banke i sar., 2010).

Lipinska familija proteina obuhvata tri člana koji imaju važnu ulogu u lipidnom metabolizmu. Svi imaju zajedničke strukturne karakteristike i PAP enzimsku aktivnost, ali se razlikuju po tkivnoj rasprostranjenosti. Do sada je najbolje proučen protein lipin-1, koji je najzastupljeniji u masnom tkivu i mišićima, mada nije zanemarljiv ni njegov nivo u jetri, bubrezima, plućima i mozgu (Peterfy i sar., 2001; Donkor i sar., 2007). Smanjena aktivnost lipina-1 dovodi do lipodistrofije, dok je njegova povećana ekspresija u masnom tkivu kod transgenih miševa uzrok razvoja gojaznog fenotipa (Reue i Zhang, 2008). Pored lipina-1, u jetri su visoko zastupljena i preostala dva člana lipinske familije proteina, naročito lipin-2 (Bou Khalil i sar., 2009). Odsustvo lipina-1 u jetri genetički modifikovanih miševa ne dovodi do smanjenja sinteze i sekrecije triglicerida tokom ishrane obogaćene mastima, najverovatnije zbog kompenzatorne stimulacije enzimske aktivnosti lipina-2 i lipina-3 (Langner i sar., 1989; Donkor i sar., 2007).

Enzimska aktivnost lipina-1 podrazumeva njegovo učešće u završnoj fazi sinteze triglicerida putem katalizovanja reakcije defosforilacije fosfatidne kiseline do DAG-a (**Slika 1.9.**). Lipin-1 je jedini enzim ovog biohemijskog puta koji je lokalizovan u citoplazmi, dok su aciltransferaze integralni membranski proteini. To znači da se lipin-1 mora translocirati na membranu endoplazmatičnog retikuluma da bi obezbedio supstrat i mogao da ostvari PAP enzimsku aktivnost (Reue i Brindley, 2008; Brindley i sar., 2009). Nezasićene masne kiseline i povećan nivo acetil-CoA su glavni pokretači prelaska i oligomerizacije lipina-1 u membrani endoplazmatičnog retikuluma (Hopewell i sar., 1985). Na taj način je uspostavljen važan autoregulatorni mehanizam koji štiti ćelije od

lipotoksičnosti, s obzirom da masne kiseline posredstvom lipina-1 promovišu sopstveno skladištenje i sintezu triglicerida.

Najvažniji mehanizam regulacije lipina-1 su posttranslacione modifikacije. Insulin može da pokrene njegovu fosforilaciju na nekoliko serinskih i treoninskih ostataka uz učešće mTOR signalnog puta (Slika 1.9.). Fosforilacija ne inhibira PAP enzimsku aktivnost *per se*, već favorizuje citoplazmatsku lokalizaciju lipina-1 i na taj način indirektno utiče na njegovu fiziološku ulogu (Harris i sar., 2007).



**Slika 1.9. Regulacija lokalizacije i uloge lipina-1 u metabolizmu lipida.**

(preuzeto sa: <http://lipidlibrary.aocs.org>)

Nezasićene masne kiseline pokreću prelazak lipina-1 u membranu endoplazmatskog retikuluma gde funkcioniše kao enzim fosfataza fosfatidata i katalizuje sintezu diacilglicerola. Otkrivanje NLS sekvence i sumoilacija su signali koji pokreću prelazak lipina-1 u jedro gde se ostvaruje njegova uloga koaktivatora transkripcije gena koji su uključeni u β-oksிடaciju. Citoplazmatska lokalizacija lipina-1 je uslovljena fosforilacijom koju pokreće insulin uz učešće signalnog puta mTOR.



Otkrivanje NLS sekvence i sumoilacija su signali koji pokreću prelazak lipina-1 u jedro gde se ostvaruje njegova uloga transkripcionog koaktivatora (**Slika 1.9.**) (Gareau i Lima, 2010). Pokretanje transkripcije gena čiji produkti učestvuju u  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina je posledica formiranja složenog kompleksa u kome su pored lipina prisutni transkripcioni regulator PPAR $\alpha$  i koaktivator PGC-1 $\alpha$ , kao i histon acetiltransferaze (**Slika 1.8.**). *In vitro* analize su potvrdile da lipin-1 može da ostvari interakciju i sa drugim transkripcionim regulatorima, poput PPAR $\delta$  i GR-a, što ukazuje na širok dijapazon njegovih fizioloških aktivnosti (Finck i sar., 2006).

Narušavanje metaboličke ravnoteže prilikom stresa, hipoksije ili insulinske rezistencije je praćeno povećanom sintezom glukokortikoidnih hormona koji stimulišu transkripciju i enzimsku aktivnost lipina-1. U promotorskom regionu gena za lipin-1 nalazi se regulatorna sekvenca GRE za koju se vezuje aktivirani GR (Pittner i sar., 1985; Reue i Brindley, 2008). Na taj način lipin-1 sprovodi patofiziološke efekte glukokortikoida koji se ogledaju u povećanoj sintezi i nagomilavanju masti u jetri, stimulisanju sekreciji VLDL-a i dislipidemiji (Bou Khalil i sar., 2009). Pretpostavlja se da glukagon i cAMP (eng. *cyclic 3',5'-adenosine monophosphate*), čije je oslobađanje takođe stimulirano u stresnim uslovima, mogu delovati sinergistički sa glukokortikoidima i pojačati njihov uticaj na ekspresiju lipina-1 (Manmontri i sar., 2008). Suprotno tome, insulin ima antagonističko dejstvo kada je u pitanju PAP enzimsku aktivnost lipina-1, ali može stimulisati njegovu transkripciju preko SREBP-a (Ishimoto i sar., 2009). Pored hormona, brojni signalni putevi i transkripcioni regulatori mogu uticati na nivo i aktivnost lipina-1 ukazujući na kompleksnost njegove uloge u održavanju ravnoteže između osnovnih biohemijskih puteva prometa energije.

#### **1.7.4. Sekrecija triglicerida iz jetre**

Završni stupanj metabolizma lipida u jetri predstavlja sekrecija triglicerida u obliku VLDL-a što omogućava njihov transport do masnog tkiva, skeletnih mišića i srca kada su energetske potrebe organizma povećane. VLDL imaju hidrofobno jezgro u kome su

upakovani trigliceridi i hidrofilni fosfolipidni omotač koji sadrži apolipoprotein B 100 (apoB 100). Njihovo formiranje počinje u endoplazmatičnom retikulumu tokom translacije apoB 100 uz pomoć proteina MTP (eng. *microsomal triglyceride transfer protein*) i nastavlja se u Goldžijevom aparatu gde se odvija završna faza pakovanja lipoproteina i započinje egzocitoza (Hussain i sar., 2003; Kawano i Cohen, 2013).

Insulin je važan regulator sekrecije masti iz jetre. Iako stimuliše *de novo* lipogenezu i sintezu triglicerida, neto efekat njegovog delovanja je ograničavanje sekrecije VLDL-a. Insulin podstiče degradaciju apoB 100, najverovatnije stimulacijom autofagije, i inhibira transkripciju gena za proteine koji su uključeni u proces pakovanja triglicerida (Koo i Montminy, 2006; Ginsberg i Fisher, 2009). Narušavanje ovih regulatornih mehanizama tokom razvoja insulinske rezistencije dovodi do intenzivnog oslobađanja triglicerida. Zbog toga su stanja poremećene metaboličke ravnoteže, poput NAFLD-a i metaboličkog sindroma, praćena istovremenim povećanjem nivoa triglicerida u jetri i u cirkulaciji (Choi i Ginsberg, 2011).

## 1.8. Razvoj metaboličke inflamacije

Hronična inflamacija niskog intenziteta ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkih poremećaja, uključujući insulinsku rezistenciju i dijabetes tipa 2, i predstavlja važnu karakteristiku metaboličkog sindroma. Ovakva inflamacija je poznata i pod nazivom *metabolička inflamacija* ili *metainflamacija* i može se definisati kao dugotrajni inflamatorni proces koji je pokrenut hranljivim materijama i narušavanjem metaboličke ravnoteže (Hotamisligil, 2006). U metaboličkoj inflamaciji učestvuju molekuli koji su prisutni i u klasičnoj inflamaciji, ali mogu delovati i kao regulatori energetskeg metabolizma.

Povećanje nivoa proinflamatornih medijatora u cirkulaciji se najčešće dovodi u vezu sa gojaznošću, odnosno nagomilavanjem lipida u visceralnom masnom tkivu koje je praćeno hipertrofijom<sup>6</sup> i hiperplazijom<sup>7</sup> adipocita. U ovom procesu najvažniju ulogu imaju

---

<sup>6</sup> Hipertrofija – uvećanje tkiva zbog prekomernog rasta i povećanja obima ćelija.

infiltrirajući makrofagi jer se ponašaju kao senzori lipidne akumulacije i oštećenja ćelija i predstavljaju glavni izvor proinflammatoryh citokina (Solinas i Karin, 2010). Pored toga, proliferacija adipocita je praćena i povišenom koncentracijom slobodnih masnih kiselina, što može izazvati stres endoplazmatičnog retikuluma i aktivaciju proinflammatoryh signalnih puteva (Zhang i Kaufman, 2008). Razvoju inflamacije doprinosi i oksidativni stres, budući da tokom oksidacije masti i ugljenih hidrata u mitohondrijama nastaju reaktivne vrste kiseonika koje stimulišu aktivnost inflamatornih kinaza (Korshunov i sar., 1997; Kamata i sar., 2005).

Kada hipertrofija i hiperplazija adipocita prevaziđu kapacitet skladištenja lipida, nastaju hipoksični uslovi i dolazi do masovne nekroze ćelija u masnom tkivu. Posledica nekroze je oslobađanje proinflammatoryh citokina i slobodnih masnih kiselina, koji putem krvotoka dospevaju u druga tkiva, pre svega jetru i pankreas. Najčešći citokini (adipokini) koje izlučuje hipertrofirano i inflamacijom zahvaćeno masno tkivo su TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CRP i leptin, dok je sinteza anti-inflamatornog i insulin-osetljivog adiponektina smanjena (Ouchi i sar., 2011). Kao što je već pomenuto, važnu ulogu u stimulaciji lipolitičkih procesa u masnom tkivu imaju glukokortikoidni hormoni, za razliku od insulina koji pokreće lipogenezu (Jensen i sar., 1989; Sanyal, 2005). Zbog toga je nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji ključni metabolički parametar i predstavlja najvažniju vezu između gojaznosti, inflamacije i insulinske rezistencije.

Pored masnog tkiva, jetra ima važnu ulogu u razvoju metaboličke inflamacije. Ulazak masnih kiselina u jetru dovodi do aktivacije proinflammatoryh signalnih puteva i aktivacije hepatičnih makrofaga, takozvanih Kupferovih ćelija, što ima za posledicu lokalno oslobađanje citokina i pogoršanje inflamacije (Solinas i Karin, 2010). Ovi citokini, zajedno sa povećanim nivoom masnih kiselina, imaju važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije i nagomilavanju masti u jetri (Choi i Diehl, 2005). Kako je steatoza praćena povećanim oslobađanjem proinflammatoryh citokina praktično je nemoguće prekinuti ciklični proces koji sve ozbiljnije narušava metaboličku ravnotežu.

---

<sup>7</sup> Hiperplazija – uvećanje tkiva zbog prekomerne deobe ćelija.

### 1.8.1. Signalni putevi regulisani metaboličkom inflamacijom

Postoje dva osnovna signalna puta koja su regulisana metaboličkom inflamacijom: JNK1 signalni put i IKK $\beta$  signalni put. Faktori koji dovode do aktivacije proinflamatornih signalnih puteva su: TNF $\alpha$ , IL-1, Fas ligand, slobodne masne kiseline, lipidni metaboliti (DAG i ceramidi), insulin, azot-monoksid i drugi (Solinas i Karin, 2010). Njihovo delovanje se ostvaruje vezivanjem za specifične receptore na površini ćelije ili aktivacijom molekula koji učestvuju u inflamatornoj signalnoj kaskadi.

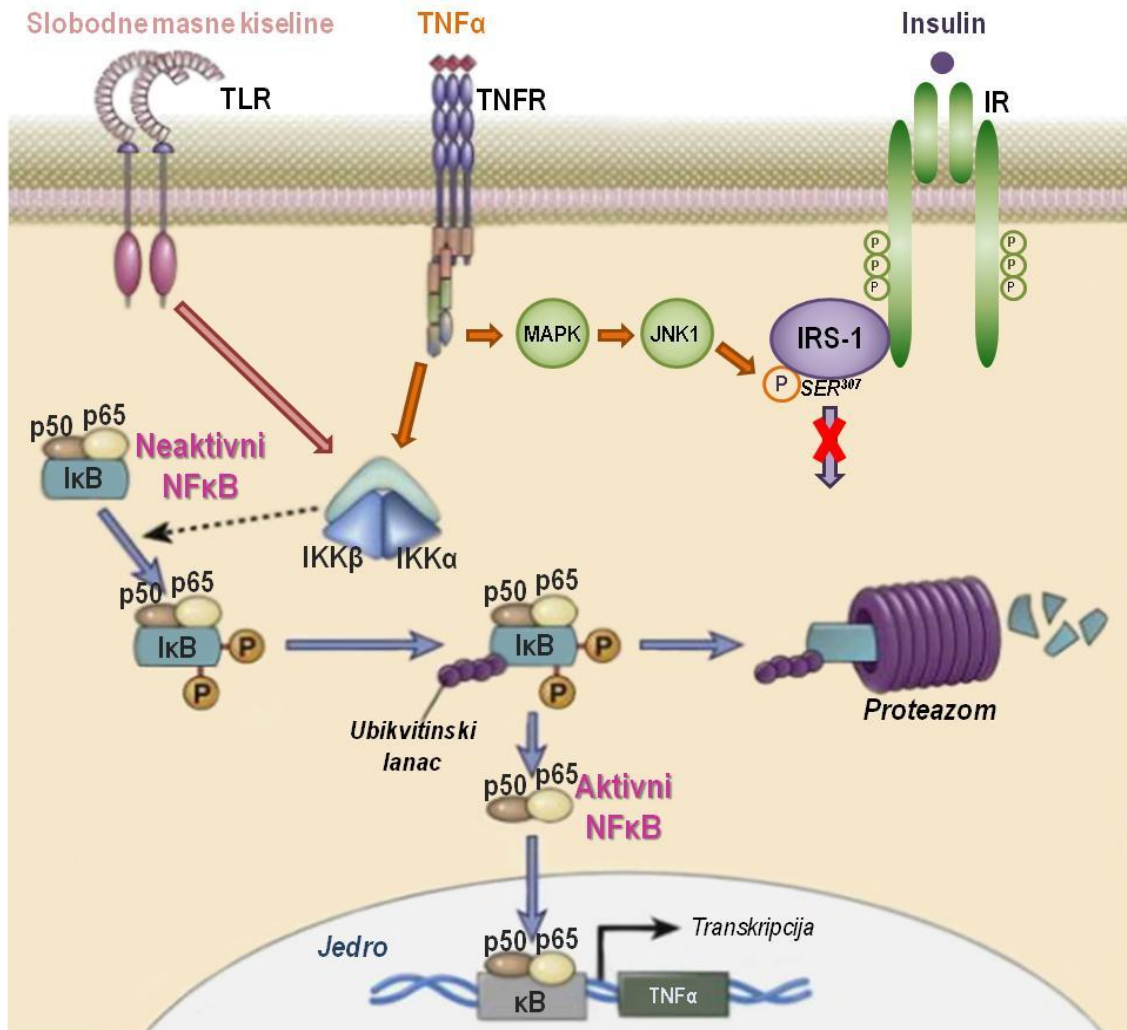
#### 1.8.1.1. Proinflamatorni citokin TNF $\alpha$

Jedan od najpoznatijih citokina uključenih u metaboličku inflamaciju je TNF $\alpha$ . Pokazano je da se nakon visokokalorijske ishrane povećava njegova koncentracija u plazmi, kao i nivo iRNK u jetri miševa (Spruss i sar., 2009; Haub i sar., 2010). Sa druge strane, kod miševa koji nemaju funkcionalan citokin ili TNF $\alpha$  receptore (TNFR-1, -2), ne dolazi do razvoja insulinske rezistencije (Uysal i sar., 1997). Vezivanje TNF $\alpha$  za receptor je praćeno konformacionim promenama receptora koje podrazumevaju trimerizaciju i formiranje kompleksa sa odgovarajućim tirozin kinazama i adapterskim proteinima. Ove promene dalje dovode do fosforilacije i istovremene aktivacije kinaza JNK1 i IKK $\beta$  (**Slika 1.10.**) (Liu i sar., 1996; Matsuzawa i sar., 2008).

JNK1 pripada familiji serin/treonin kinaza, uzvodno je regulisana MAP kinazama, a nishodno dovodi do fosforilacije i aktivacije transkripcionog faktora c-Jun, što za krajnji rezultat ima transaktivaciju proinflamatornih gena (Davis, 2000). Njena aktivnost je naročito podstaknuta u jetri, masnom tkivu i skeletnim mišićima gojaznih miševa (Hirosumi i sar., 2002). Posledica aktivacije JNK1 može biti fosforilacija IRS-1 na Ser<sup>307</sup> i zaustavljenje prenosa insulinskog signala (**Slika 1.10.**) (Aguirre i sar., 2000). Interesantno je da JNK1, za razliku od JNK2, ima ulogu u regulaciji osetljivosti na insulin o čemu svedoče rezultati dobijeni na JNK1/JNK2 *knock-out* miševima (Hirosumi i sar., 2002).

IKK $\beta$  predstavlja jednu od dve katalitičke subjedinice IKK kompleksa koji je odgovoran za aktivaciju proinflamatornog transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B (**Slika 1.10.**).

Stimulacijom ovog signalnog puta pokreće se transkripcija gena koji imaju ulogu u inflamatornom odgovoru, ćelijskoj proliferaciji i apoptozi (Senftleben i Karin, 2002; Hacker i Karin, 2006).



**Slika 1.10. Proinflamatorni signalni putevi.**

(preuzeto sa: <http://www.studyblue.com>)

Nakon vezivanja za specifični receptor, citokin TNFα pokreće dva proinflamatorna signalna puta, IKK i JNK1. Posledica aktivacije JNK1 može biti fosforilacija IRS-1 na Ser<sup>307</sup> i zaustavljenje prenosa insulinskog signala. Pored TNFα, slobodne masne kiseline mogu pokrenuti IKK signalnu kaskadu. To dovodi do fosforilacije IκB, njegove ubikvitinacije i degradacije u proteazomima, što rezultira oslobađanjem transkripcionog regulatora NFκB. Nakon prelaska u jedro, NFκB se vezuje za κB regulatorne DNK sekvence i stimuliše transkripciju gena za proinflamatorne citokine. P - fosfatna grupa.

### 1.8.1.2. Proinflamatorni medijator NFκB

NFκB je važan medijator metaboličke inflamacije. Predstavlja dimerni DNK vezujući protein koji se sastoji od članova NFκB/Rel familije: p50, p52, p65, Rel B i c-Rel. U bazalnim uslovima NFκB se nalazi u citoplazmi vezan za inhibitorski protein κB (IκB, eng. *inhibitor of κB*) koji maskira NLS domen i tako sprečava njegovu aktivaciju i prelazak u jedro. Vezivanje proinflamatornih citokina za odgovarajući receptor dovodi do aktivacije IKK kompleksa koji vrši fosforilaciju proteina IκB (**Slika 1.10.**). Taj proces pokreće ubikvitinaciju IκB, što dalje vodi ka njegovoj proteolitičkoj degradaciji i aktivaciji NFκB (Ghosh i sar., 1998). Slobodne masne kiseline takođe mogu aktivirati NFκB jer stimulišu β-oksidaciju u jetri tokom koje dolazi do oslobađanja peroksida. Ovaj reaktivni molekul kiseonika može da aktivira IKKβ što vodi oslobađanju proteina NFκB iz inhibitorskog kompleksa (Boden i sar., 2005).

Nakon prelaska u jedro, NFκB se vezuje za κB regulatorne DNK sekvence i stimuliše transkripciju gena za proinflamatorne citokine kao što su TNFα, IL-1β i IL-6. Dakle, povećanje nivoa TNFα može biti i uzrok i posledica aktiviranog NFκB signalnog puta. Smatra se da aktivacija NFκB nishodno dovodi do stimulacije JNK1 i do inhibitorne fosforilacije IRS-1 na Ser<sup>307</sup>, što rezultira slabljenjem insulinske signalizacije (Arkan i sar., 2005). Eksperimenti na transgenim životinjama su potvrdili da povećana aktivnost NFκB dovodi do razvoja insulinske rezistencije u jetri, za razliku od miševa kod kojih je proinflamatorni medijator bio inaktiviran. Ključni posrednik u ovom procesu je IKKβ, jer kod transgenih miševa koji imaju mutacije u genu za IKKβ dolazi do poboljšanja osetljivosti ćelija jetre na insulin (Yuan i sar., 2001; Cai i sar., 2005). Zbog toga se smatra da zajednička aktivnost proteina NFκB i enzima JNK1 ima ključnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije u jetri.

### 1.8.2. Uloga glukokortikoida u regulaciji inflamatornih procesa

Povećan nivo proinflamatornih citokina tokom dužeg vremenskog perioda može dovesti do ozbiljnog narušavanja metaboličke ravnoteže. Zbog toga su razvijeni mehanizmi

koji imaju zadatak da ograniče njihovo delovanje. Stimulusi koji pokreću otpuštanje citokina, kao što su slobodne masne kiseline ili reaktivne vrste kiseonika, mogu delovati i kao stresori koji aktiviraju HHA osu. Citokini  $TNF\alpha$ , IL-1 i IL-6 direktno regulišu HHA osu, odnosno otpuštanje glukokortikoidnih hormona u cirkulaciju (McCann i sar., 1995; Turnbull i Rivier, 1999). Pored toga,  $TNF\alpha$  i IL-1 $\beta$  mogu stimulisati ekspresiju enzima 11 $\beta$ HSD1 i lokalnu sintezu hormona u različitim tipovima ćelija (Staab i Maser, 2010). To znači da se pro- i antiinflamatorni signalni putevi uporedo aktiviraju i njihova interakcija je neophodna za održavanje metaboličke homeostaze.

Glukokortikoidni hormoni svoju anti-inflamatornu ulogu ostvaruju aktivacijom GR-a što vodi smanjenju nivoa proinflamatornih citokina. Treba naglasiti da geni koji kodiraju citokine nemaju nGRE sekvence u promotorima i GR ne može da zaustavi njihovu transkripciju direktnim vezivanjem za promotore. Anti-inflamatorna uloga glukokortikoida se ostvaruje kroz interakciju sa proinflamatornim transkripcionim regulatorima, pre svega sa NF $\kappa$ B. Postoji nekoliko mehanizama interakcije GR-a i NF $\kappa$ B-a:

1. Direktna protein-protein interakcija - GR fizički interaguje sa NF $\kappa$ B u citoplazmi ćelije što onemogućava vezivanje oba transkripciona regulatora za DNK i pokretanje transkripcije ciljnih gena (Ray i Prefontaine, 1994);

2. Kompeticija za zajedničke koaktivatore - za punu transkripcionu aktivnost NF $\kappa$ B i GR zahtevaju interakciju sa istim kofaktorom čija je količina u ćeliji ograničena (Shibata i sar., 1997);

3. Vezivanje aktiviranog GR-a za GRE sekvence u promotorima gena čiji proteinski produkti negativno regulišu NF $\kappa$ B (npr. I $\kappa$ B), najčešće putem protein-protein interakcija koje onemogućavaju prelazak NF $\kappa$ B-a u jedro (Scheinman i sar., 1995).

Dakle, dok NF $\kappa$ B pokreće transkripciju gena uključenih u inflamatorni odgovor, GR funkcioniše kao potentni anti-inflamatorni transkripcioni regulator i imunosupresor. Balans između ova dva signalna puta predstavlja kontrolni mehanizam kojim se organizam bori protiv nekontrolisane sinteze proinflamatornih citokina, a samim tim i protiv metaboličke inflamacije.



## **2. CILJ RADA**

---



Moderan način ishrane bogat fruktozom izaziva niz poremećaja kao što su insulinska rezistencija, dislipidemija i hronična inflamacija niskog intenziteta, koji predstavljaju karakteristike metaboličkog sindroma (Dekker i sar., 2010). Poznato je da su glukokortikoidni hormoni važni regulatori energetskeg metabolizma i inflamacije i da njihova povećana regeneracija u tkivima može da doprinese patofiziologiji metaboličkog sindroma (Wang, 2005). Na osnovu ovih argumenata postavljena je hipoteza da glukokortikoidni hormoni imaju važnu ulogu u sprovođenju efekata ishrane obogaćene fruktozom na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma.

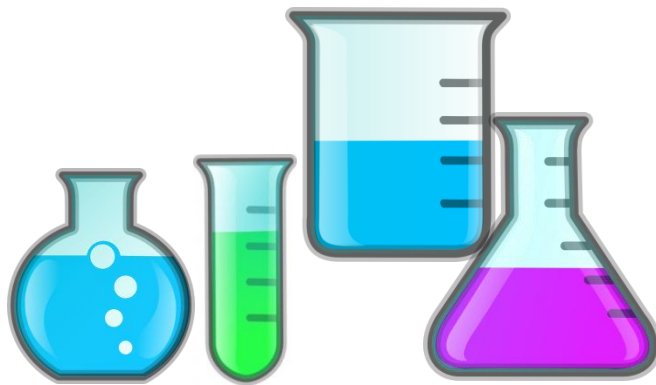
Cilj ove doktorske disertacije jeste da se doprinese boljem razumevanju uticaja izmenjenog metabolizma glukokortikoidnih hormona na pojavu simptoma metaboličkog sindroma, deregulaciju energetskeg metabolizma i razvoj inflamacije povezane sa metaboličkim sindromom u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom.

Bolje razumevanje kompleksne veze između molekularnih mehanizama delovanja glukokortikoidnih hormona i kliničkih manifestacija metaboličkog sindroma je preduslov za razvijanje novih terapijskih protokola za lečenje ovog složenog poremećaja koji je osnovni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa.

Polazeći od cilja ove studije, postavljeni su specifični zadaci koji su sukcesivno realizovani:

1. Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara, kao i praćenje morfoloških promena u jetri pacova nakon ishrane 10% i 60% rastvorom fruktoze;
2. Ispitivanje prereceptorskog metabolizma glukokortikoidnih hormona putem analize ekspresije 11 $\beta$ HSD1 i H6PDH, kao i merenjem sistemskog i tkivnog kortikosterona;

3. Praćenje unutarćelijske raspodele i aktivacije GR-a, kao i ekspresije molekula koji su transkripciono regulisani GR-om i imaju važnu ulogu u metabolizmu glukoze i lipida (PEPCK i lipin-1);
4. Ispitivanje uticaja različitih koncentracija fruktoze na *de novo* lipogenezu (SREBP-1 i FAS), kao i na ravnotežu između sinteze triglicerida i  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (PPAR $\alpha$ , PGC-1, lipin-1 i CPT1) u jetri pacova;
5. Ispitivanje metaboličke inflamacije u jetri putem analize proinflamatornog citokina TNF $\alpha$  i transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B;
6. Određivanje molekularnog markera insulinske rezistencije (fosfo-Ser<sup>307</sup>-IRS-1), čije promene mogu biti kumulativna posledica nagomilavanja masti i razvoja inflamacije u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom.



# **3. MATERIJIJAL I METODE**

---

### 3.1. Tretman životinja u studiji

Studija se sastoji iz dva vremenski odvojena eksperimenta podjeljena prema koncentraciji fruktoze zastupljene u ishrani. U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar, starosti 21 dan. Na početku devetonedeljnih tretmana životinje su bile podjeljene u dve grupe prema načinu ishrane (**Tabela 3.1.**).

**Tabela 3.1. Način ishrane eksperimentalnih životinja.**

| Eksperiment | Grupe životinja          | Standardna hrana | Voda za piće | 10% rastvor fruktoze | 60% rastvor fruktoze |
|-------------|--------------------------|------------------|--------------|----------------------|----------------------|
| I           | Kontrolna grupa          | +                | +            | -                    | -                    |
|             | Grupa hranjena fruktozom | +                | -            | +                    | -                    |
| II          | Kontrolna grupa          | +                | +            | -                    | -                    |
|             | Grupa hranjena fruktozom | +                | +            | -                    | +                    |

U oba eksperimenta, pacovima koji su pili fruktozu je komercijalno nabavljena hrana (Veterinarski institut, Subotica, Srbija) bila dostupna *ad libitum*. Tokom prvog eksperimenta, ova grupa je pila 10% rastvor fruktoze (API-PEK, Bečej, Srbija), dok su tokom drugog eksperimenta životinjama istovremeno bili ponuđeni 60% rastvor fruktoze i voda za piće. U oba eksperimenta kontrolnim grupama su standardna hrana i voda bile dostupne *ad libitum*. Detaljan sadržaj hranljivih materija prisutnih u ishrani životinja je predstavljen u **Tabeli 3.2.**

Tabela 3.2. Sadržaj hranljivih materija u ishrani eksperimentalnih životinja.

| Hemijski sastav               | Kontrolna ishrana | Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze        | Ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze         |
|-------------------------------|-------------------|---|--|
| <b>Energetska vrednost</b>    | 11000 kJ/kg       | 11000 kJ/kg hrane + 1720 kJ/L rastvora fruktoze | 11000 kJ/kg hrane + 10320 kJ/L rastvora fruktoze |
| <b>Proteini</b>               | 20%               | 20%   | 20%  |
| <b>Rastvor fruktoze</b>       | 0                 | 100 g/L   | 600 g/L  |
| <b>Vlažnost</b>               | 13 %              | 13 %  | 13 %   |
| <b>Pepeo</b>                  | 10 %              | 10 %  | 10 %   |
| <b>Celuloza</b>               | 8 %               | 8 %   | 8 %  |
| <b>Kalcijum</b>               | 1 %               | 1 %   | 1 %  |
| <b>Lizin</b>                  | 0.90 %            | 0.90 %  | 0.90 %   |
| <b>Metionin + cistein</b>     | 0.75 %            | 0.75 %  | 0.75 %   |
| <b>Fosfor</b>                 | 0.50 %            | 0.50 %  | 0.50 %   |
| <b>Natrijum</b>               | 0.15-0.25 %       | 0.15-0.25 %                                     | 0.15-0.25 %                                      |
| <b>Vitamin A</b>              | 10 000 IU/kg      | 10 000 IU/kg                                    | 10 000 IU/kg                                     |
| <b>Vitamin D<sub>3</sub></b>  | 1600 IU/kg        | 1600 IU/kg                                      | 1600 IU/kg                                       |
| <b>Vitamin E</b>              | 25 mg/kg          | 25 mg/kg  | 25 mg/kg   |
| <b>Vitamin B<sub>12</sub></b> | 0.02 mg/kg        | 0.02 mg/kg                                      | 0.02 mg/kg                                       |
| <b>Cink</b>                   | 100 mg/kg         | 100 mg/kg                                       | 100 mg/kg  |
| <b>Gvožđe</b>                 | 100 mg/kg         | 100 mg/kg                                       | 100 mg/kg  |
| <b>Mangan</b>                 | 30 mg/kg          | 30 mg/kg  | 30 mg/kg   |
| <b>Bakar</b>                  | 20 mg/kg          | 20 mg/kg  | 20 mg/kg   |
| <b>Jod</b>                    | 0.5 mg/kg         | 0.5 mg/kg                                       | 0.5 mg/kg  |
| <b>Selen</b>                  | 0.1 mg/kg         | 0.1 mg/kg                                       | 0.1 mg/kg  |
| <b>Antioksidant</b>           | 100 mg/kg         | 100 mg/kg                                       | 100 mg/kg  |

Na početku tretmana životinje iz kontrolne grupe i grupe hranjene fruktozom su bile ujednačene po telesnoj masi. Masa životinja je merana jednom nedeljno, dok su unos hrane i tečnosti mereni svakodnevno. Kalorijski unos životinja koje su pile rastvore fruktoze je izračunat kao zbir kalorija poreklom iz hrane i iz fruktoze, dok je u slučaju kontrolne grupe kalorijski unos izračunat na osnovu unosa hrane.

Sve životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima, na konstantnoj temperaturi (22°C) u svetlosnom režimu 12 h svetlo/12 h mrak, počev od 07:00 h. Životinje su gajene u grupama po tri u kavezu kako bi se izbegao izolacioni stres (Djordjevic i sar., 2009). Oba eksperimenta su ponovljena, svaki put sa novom grupom mužjaka, a svaku eksperimentalnu grupu je činilo po 9 životinja. Studija je urađena u skladu sa etičkim načelima Evropske komisije za zaštitu životinja (86/609/EEC) i odobrena od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (No 2-20/10).

### **3.2. Sakupljanje krvi, priprema krvne plazme i izolovanje jetre i masnog tkiva**

Po završetku tretmana životinje su preko noći bile lišavane hrane i rastvora fruktoze nakon čega bi usledilo žrtvovanje brzom dekapitacijom pomoću giljotine uvek u isto vreme (09:00-10:00 h). Krv iz trupa je brzo sakupljana u falkone obložene etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) uz lagano mućkanje i korišćena je za merenje koncentracije glukoze i triglicerida. Krvna plazma je izolovana centrifugiranjem prikupljene krvi (1600 g, 15 min, 22°C, Eppendorf 5804/R), nakon čega je čuvana na -70°C da bi bila upotrebljena za ostale biohemijske i fiziološke analize.

Odmah nakon prikupljanja krvi, jetre eksperimentalnih životinja su perfundovane *in situ* hladnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl) kroz portalnu venu. Jetre i masna tkiva su zatim pažljivo odstranjeni i izmereni. Deo jetre je sačuvan u 3,5% rastvoru formaldehida za

histološku analizu dok je ostatak trenutno smrznut i čuvan u tečnom azotu do izolacije RNK i proteina.

### **3.3. Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara**

#### **3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze i triglicerida u krvi**

Koncentracije glukoze i triglicerida u krvi prikupljenoj iz trupa su izmerene odmah nakon žrtvovanja pomoću automatskih analizatora (MultiCare strips, Biochemical Systems International, Italia).

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

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi određena je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Duncombe-u (Duncombe, 1964). Standardna kriva je konstruisana na osnovu merenja apsorbance rastvora palmitinske kiseline poznatih koncentracija (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 mM). Nakon dodavanja odgovarajućeg reagensa (trietanolaminski pufer sa  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,8) i hloroforma u epruvete sa krvnom plazmom, uzorci su intenzivno mešani 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 10 min na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehtnica LC-321, Slovenija). Vodena faza (gornji plavozeleni sloj) je uklonjena, a hloroformskoj fazi sa ekstrahovanim masnim kiselinama je dodat 0,2% dietilditiokarbamat. Nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi očitana je apsorbance na 436 nm pomoću spektrofotometra (LKB Ultrospec II, SAD).

#### **3.3.3. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi i tkivu**

Koncentracija kortikosterona u krvnoj plazmi i citoplazmatičnoj frakciji ćelija jetre je merana enzimskim imunoesejem velike osetljivosti (*Corticosterone HS EIA*,

Immunodiagnostic Systems Ltd). Esej predstavlja kompetitivni ELISA test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) u kome je poliklonsko antitelo za kortikosteron vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Standardi, kontrolni uzorci i nepoznati razblaženi uzorci (plazma – 1:20, citoplazmatična frakcija – 1:4) su najpre zagrevani 30 min na 80°C, a zatim u duplikatu naneti na ploču i inkubirani četiri sata na sobnoj temperaturi sa antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom rena (HRP). Ploča je zatim sukcesivno ispirana i dodat je hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji dovodi do razvijanja boje. Enzimska reakcija je prekinuta dodavanjem 0,5 M HCl, nakon čega je apsorbancu očitavana na 450 i 650 nm (korekciona OD) pomoću spektrofotometra (Multiskan Spectrum, Thermo Eelectron Corporation, Finska). Intenzitet boje je bio obrnuto proporcionalan koncentraciji kortikosterona u uzorku. Vrednosti koje su očitane sa semilogaritamske standardne krive (4PL kriva, GraphPad Prism 5) su izražene u ng/ml. Osetljivost eseja je bila 0,72 ng/ml, a unutar- i međuesejske varijacije ispod 5,9%, odnosno 8,9%.

### 3.3.4. Određivanje koncentracije insulina u plazmi

Koncentracije insulina u plazmi su izmerene radioimunoesejem (RIA kit, INEP, Zemun, Srbija) koji se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka ili standarda i radioaktivno obeleženog insulina ( $^{125}\text{I}$ -insulin, aktivnosti oko 85 kBq po bočici) za vezujuća mesta na antitelima za insulin. Nakon 20 h inkubacije na sobnoj temperaturi formiraju se radioaktivno obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Ukoliko ima više insulina u uzorku plazme, utoliko se manje obeleženog kompleksa formira. Po završenoj reakciji svi nastali kompleksi u uzorcima su 30 min taloženi imunoadsorbentom na sobnoj temperaturi i centrifugirani 25 min na 3000 g (Eppendorf 5804/R). Talog je predstavljao kombinaciju sekundarnih antitela i vezanog insulina, dok su slobodni insulin (obeleženi i neobeleženi), kao i slobodna antitela zaostala u tečnoj fazi. Radioaktivnost taloga je merena brojačem (LKB Wallac 1219 RackBeta Liquid Scintillation Counter, SAD) u toku 1 min. Koncentracije insulina u plazmi su izračunate pomoću standardne krive konstruisane na



osnovu rastvora insulina poznatih koncentracija (0,3, 3, 10, 30, 100 i 300 mIU insulina/l). Osetljivost eseja je iznosila 0,6 mIU/l, a koeficijent varijacije unutar eseja 5,24%.

### 3.3.5. Procena insulinske osetljivosti

Insulinska osetljivost je određena izračunavanjem HOMA indeksa (eng. *Homeostasis model assessment*), kao i pomoću intraperitonealnog testa tolerancije na glukozu (IPGT test).

HOMA indeks je izračunat na osnovu izmerenih koncentracija glukoze u krvi i insulina u plazmi pomoću formule (Matthews i sar., 1985):

$$\text{Insulin (mIU/l)} \times [\text{glukoza (mmol/l)/22.5}].$$

IPGT test je realizovan tri dana pre završetka eksperimenta. Životinjama je tokom noći pre merenja bila oduzeta hrana dok je rastvor fruktoze bio privremeno zamenjen vodom za piće. Količina intraperitonealno injecirane glukoze je iznosila 2 g po kilogramu telesne mase. Anestezija nije korišćena kako bi bio izbegnut njen uticaj na nivo i kinetiku uklanjanja šećera iz krvi. Koncentracija glukoze u krvi uzetoj iz vrha repa je merena pomoću automatskog analizatora (MultiCare strips, Biochemical Systems International, Italia) u vremenskim tačkama 0, 15, 30, 60, 90 i 120 min nakon injeciranja. Po pravilu, injeciranje glukoze dovodi do naglog porasta glikemije, što je praćeno pojačanom sintezom i lučenjem insulina. Nakon dostizanja maksimalnih vrednosti (pikovi), koncentracije glukoze i insulina se postepeno smanjuju i stabilizuju na početne vrednosti. Izmenjena kinetika uklanjanja glukoze iz cirkulacije je pokazatelj stanja insulinske osetljivosti. Parametar koji je korišćen za njenu procenu je površina ispod krive (AUC, eng. *area under the curve*) koja prikazuje nivo glukoze u funkciji vremena (koncentracija glukoze, 0–120 min, mmol/l vs. vreme, min).

## 3.4. Priprema ćelijskih frakcija jetre

### 3.4.1. Priprema citoplazmatične, jedarne i mikrozomalne frakcije

Deo zamrznute jetre svake životinje je izmeren i homogenizovan pomoću električnog homogenizera pri brzini od 8000 obrtaja u minuti (30 s/30 s pauza/30 s, Janke-Kunkel T25) u četiri zapremine hladnog homogenizacionog pufera (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 1 mM EGTA- $\text{Na}_2$ , 10% glicerol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 20mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g/ml}$  antipain, 5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 5 mM  $\text{Na}_4\text{O}_2\text{P}_7$ , 20mM  $\beta$ -glicerofosfat i 25 mM NaF). Homogenati su filtrirani kroz gazu i centrifugirani (2000 g, 15 min, 4°C, Eppendorf 5804/R). Dobijeni supernatanti su iskorišćeni za pripremu citoplazmatičnih i mikrozomalnih frakcija, dok su talozi upotrebljeni za pripremu jedarnih frakcija. Supernatanti su centrifugirani 30 min na 10000 g, Sorvall SS-34 rotor, 4°C a zatim 90 min na 200000 g, Beckman ultracentrifuga L7-55, 4°C. Nakon uklanjanja površinskog sloja masti, supernatanti su zamrznuti na -70°C i korišćeni kao citoplazmatična frakcija. Talozi su resuspendovani u 100 mM natrijum pirofosfatu, pH 7,4 i centrifugirani pomoću Beckman ultracentrifuge L7-55, 60 min na 4°C. Supernatanti su odliveni, a talozi resuspendovani u puferu za čuvanje mikrozoma (50 mM  $\text{KPO}_4$  pH 7,4, 0,1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 10% glicerol i 0,1 mM DTT), sonifikovani tri puta po 5 s sa pauzama od 30 s (1A/50/60 Hz/30% amplituda, Hielscher Ultrasound Processor) i sačuvani kao mikrozomalne frakcije na -70°C.

Kako bi se pripremile jedarne frakcije, talozi dobijeni nakon prvog centrifugiranja su dva puta isprani resuspendovanjem u četiri zapremine HEPES pufera (25 mM HEPES pH 7,6, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 1 mM EGTA- $\text{Na}_2$ , 10% glicerol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 20mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g/ml}$  antipain, 5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 5 mM  $\text{Na}_4\text{O}_2\text{P}_7$ , 20mM  $\beta$ -glicerofosfat i 25 mM NaF) i centrifugiranjem (4000 g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804/R). Talozi su zatim inkubirani 90 min na ledu u istoj zapremini NUN pufera (25 mM HEPES pH 7,6, 1 M urea, 300 mM

NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM DTT, 20mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 5 mM Na<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P<sub>7</sub>, 20mM β-glicerofosfat i 25 mM NaF). Tokom inkubacije uzorci su često intenzivno mešani na vibracionoj mešalici. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani (8000 g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804/R) i dobijeni supernatanti su zamrznuti na -70°C i korišćeni kao jedarna frakcija.

### 3.4.2. Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta

Deo zamrznute jetre svake životinje je izmeren i homogenizovan pomoću ručnog homogenizera (30 zaveslaja) u pet zapremina hladnog RIPA pufera (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% natrijum deoksiholat, 2 mM DTT, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 2,5 mM Na<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P<sub>7</sub> i 10 mM NaF). Homogenati su zatim sonifikovani tri puta po 5 s sa pauzama od 30 s (1A, 50/60 Hz, 30% amplituda, Hielscher Ultrasound Processor) i inkubirani 60 min na ledu uz intenzivno mešanje na vibracionoj mešalici. Sonifikati su centrifugirani (16000 g, 20 min, 4°C, Eppendorf 5804/R), a dobijeni supernatanti koji predstavljaju ukupne ćelijske ekstrakte jetre su čuvani na -70°C do upotrebe.

### 3.5. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim ekstraktima

Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim ekstraktima urađeno je kolorimetrijskom metodom po Spektor-u (Spector, 1978). Standardna kriva je konstruisana na osnovu merenja apsorbance rastvora albumina goveđeg seruma poznatih koncentracija (BSA, Sigma-Aldrich). Na mikrotitar pločama od 96 mesta, na 20 µl adekvatno razblaženog uzorka dodato je 180 µl Spektorovog reagensa (0,01% Coomassie brilliant blue G, 4,8% etanola i 8,5% fosforne kiseline) i nakon 5 min inkubacije očitana je apsorbance na 595 nm pomoću spektrofotometra (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska).

### 3.6. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteini ćelijskih ekstrakata su razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama denaturišući elektroforezom na 7,5% i 10% poliakrilamidnim gelovima po metodi Laemmli-ja (Laemmli, 1970) u aparaturi Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija). Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem 5 min na 100°C u jednakoj zapremini redukujućeg pufera za pripremu uzorka (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol i 10% 2-merkaptometanol) sa brom-fenol plavom bojom. Uzorci (40 µg proteina) su nanošeni na gel za sabijanje (3% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8) koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (7,5%/10% akrilamid / 0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijum persulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare sastojao se od 0,192 M glicina, 0,1% SDS i 0,025 M Tris-HCl pH 8,3. Elektroforeze su trajale 90 min pri konstantnom naponu od 120 V i na temperaturi od 4°C. Nakon elektroforeze gelovi su korišćeni za *Western blot* analizu. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 170 kDa; PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Litvanija).

### 3.7. *Western blot* i detekcija proteina na *blotu*

Nakon elektroforeze poliakrilamidni gelovi su inkubirani 30 min uz mešanje, na sobnoj temperaturi, u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris pH 8,3). Poliviniliden difluoridne membrane (Immobilon-P, Millipore Corporation, SAD) su nakon aktivacije metanolom, inkubirane u puferu za transfer pod istim uslovima kao i gelovi. Prenos proteina sa poliakrilamidnih gelova na membranu odvijao se preko noći, pri konstantnoj struji od 135 mA po gelu, na 4°C u odgovarajućoj aparaturi (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija). Da bi se proverila efikasnost transfera proteina membrane su bojene 1% rastvorom Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini. Nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama su blokirana inkubiranjem

u 5% rastvoru odmašćenog mleka u PBS puferu (1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl, pH 7,2), u trajanju od 90 min na sobnoj temperaturi. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na 4°C uz blago mešanje, izuzev inkubacije sa antitelima na β-aktin i kalneksin koja je trajala 60 min na sobnoj temperaturi. Antitela koja su korišćena za detekciju ispitivanih proteina su prikazana u **Tabeli 3.3.**

**Tabela 3.3. Karakteristike antitela korišćenih u *Western blot* analizi.**

| Ciljni protein                         | Molekulska masa (kDa) | Poreklo | Klonalnost   | Razblaženje | Identifikacioni broj i proizvođač     |
|--|-----------------------|---------|--------------|-------------|---------------------------------------|
| <b>11βHSD1</b>                         | 34                    | Zec     | Poliklonalno | 1:1000      | ab393364<br>Abcam                     |
| <b>H6PDH</b>                           | 89                    | Zec     | Poliklonalno | 1:500       | sc-67394<br>Santa Cruz Biotechnology  |
| <b>GR</b>                              | 94                    | Zec     | Poliklonalno | 1:1000      | PA1-511<br>Affinity Bioreagents       |
| <b>Lipin-1</b>                         | 130                   | Zec     | Poliklonalno | 1:500       | sc-98450<br>Santa Cruz Biotechnology  |
| <b>SREBP-1</b>                         | 65                    | Zec     | Poliklonalno | 1:500       | sc-366<br>Santa Cruz Biotechnology    |
| <b>PPARα</b>                           | 55                    | Zec     | Poliklonalno | 1:250       | sc-9000<br>Santa Cruz Biotechnology   |
| <b>PGC-1</b>                           | 90                    | Zec     | Poliklonalno | 1:250       | sc-13067<br>Santa Cruz Biotechnology  |
| <b>CPT1</b>                            | 90                    | Zec     | Poliklonalno | 1:500       | sc-139482<br>Santa Cruz Biotechnology |
| <b>NFκB/p65</b>                        | 65                    | Zec     | Poliklonalno | 1:1000      | sc-372<br>Santa Cruz Biotechnology    |
| <b>IκB-α</b>                           | 38                    | Zec     | Poliklonalno | 1:500       | sc-371<br>Santa Cruz Biotechnology    |
| <b>Fosfo-IκB-α</b>                     | 40                    | Zec     | Poliklonalno | 1:200       | sc-8404<br>Santa Cruz Biotechnology   |
| <b>Fosfo-IRS-1 (Ser<sup>307</sup>)</b> | 180                   | Zec     | Poliklonalno | 1:1000      | 07-247<br>Millipore Upstate           |

Kao kontrola za jednako nanošenje proteina na gel korišćeno je mišje monoklonsko antitelo za β-aktin (43 kDa, 1 : 10000, AC-15, Sigma-Aldrich) za citoplazmatičnu, jedarnu i ukupnu ćelijsku frakciju, dok je za mikrozomalnu frakciju korišćeno zečje poliklonsko

antitelo na kalneksin (90 kDa, 1:10000, ab22595, Abcam). Pre inkubacije sa odgovarajućim sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa alkalnom fosfatazom (1 : 20000, 90 min, sobna temperatura, Amersham Biosciences) membrane su isprane četiri puta sa 0,1% Tween 20 u PBS puferu. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom membrane su inkubirane sa ECF supstratom za alkalnu fosfatazu (Amersham Biosciences). Alkalna fosfataza katalizuje konverziju ECF supstrata u fluorescentni proizvod koji je detektovan pomoću skenera za fluorescenciju (STORM, Amersham Bioscience). Pobuđeni proizvod enzimske reakcije emituje fluorescentnu svetlost talasne dužine od 540 nm do 560 nm, a aparat meri intenzitet ove svetlosti koji je proporcionalan koncentraciji ciljnog proteina u uzorku. Relativna optička gustina imunoreaktivnih traka na membranama određena je upotrebom programa *ImageQuant* (GE Healthcare). Nakon detekcije svakog proteina membrane su potapane u 0,2 M NaOH u trajanju od 10 min kako bi se uklonilo vezano antitelo, potom blokirane sa odmašćenim mlekom i inkubirane sa narednim primarnim antitelom.

### **3.8. Semi-kvantitativna analiza imunoreaktivnih traka na membranama**

Tokom kvantitativne analize intenzitet svake imunoreaktivne trake je normalizovan prema intenzitetu trake  $\beta$ -aktina, odnosno kalneksina, u istom uzorku, kako bi se neutralisale razlike u količini nanetih proteina. Normalizovani intenziteti traka su zatim podeljeni sa srednjom vrednošću kontrolnih uzoraka sa date membrane kako bi promene koje su uzrok tretmana bile izražene u odnosu na kontrolne uzorke. Na ovaj način je postignuta kompenzacija varijacija u efikasnosti prenosa proteina sa gela na membranu i vezivanja antitela, tako da je intenzitet trake ciljnog proteina bio isključivo rezultat koncentracije tog proteina u uzorku. Kvantitativno određivanje relativne optičke gustine traka na membranama urađeno je pomoću programa *Image Quant* (GE Healthcare) i rezultati su izraženi kao promena u odnosu na jediničnu vrednost kontrole.

### 3.9. Izolovanje, određivanje koncentracije i procena kvaliteta RNK

Ukupna RNK je izolovana iz dela jetre koji je homogenizovan u deset zapremina trizola (TRIreagent<sup>®</sup>, AmBion Inc., SAD) pomoću staklo-teflon homogenizera. Homogenati su centrifugirani (12000g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804/R) nakon čega je u supernatante dodato 0,2 zapremine hloroforma u odnosu na početnu zapreminu trizola uz ponovno centrifugiranje (12000g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804/R). Svaki korak, izuzev poslednjeg centrifugiranja, je bio praćen inkubacijom uzoraka 5 min na 30°C. Nakon centrifugiranja u mikrotubama su razdvojene tri faze: donja, organska faza (hloroform), interfaza (fenol) i gornja, vodena faza. RNK se nalazi u gornjoj fazi, dok proteini i DNK ostaju u donjoj i interfazi. U odnosu na pažljivo izmerenu zapreminu vodene faze dodata je 0,1 zapremina 3 M Na-acetata, pH 5, a zatim 0,5 zapremina izopropanola u odnosu na početnu zapreminu trizola. Nakon snažnog mućkanja, uzorci su ostavljeni na -20°C. Posle prekonoćne inkubacije uzorci su centrifugirani (12000g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804/R) i talog RNK je resuspendovan u 1 ml 75% etanola (rastvorenog u 0,1% dietilpirokarbonatnoj vodi - DEPC, Serva) uz snažno mućkanje. Uzorci su ponovo centrifugirani (12000g, 5 min, 4°C, Eppendorf 5804/R), etanol je odliven, a dobijeni talog je sušen na vazduhu 10-15 min. Osušeni talog je resuspendovan u 0,1% DEPC vodi i ostavljen preko noći na -20°C. Jedan alikvot je ostavljen za određivanje koncentracije, dok je ostatak izolovane RNK čuvan na -70°C do upotrebe.

Koncentracija RNK je određena merenjem apsorbanca na talasnoj dužini od 260, 280 i 230 nm na spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf). Aparat automatski izračunava koncentraciju RNK prema formuli  $c = (40 \times A_{260} \times \text{faktor razblaženja})$ , polazeći od toga da apsorbanca od jedne optičke jedinice na 260 nm odgovara količini od 40 µg/ml RNK u uzorku. Odnosi izmerenih apsorbanca  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  i  $A_{260}/A_{230} > 1.8$  smatrani su zadovoljavajućim u pogledu čistoće RNK, odnosno ukazivali su da uzorak nije kontaminiran proteinima, ugljenim hidratima, fenolima, aromatičnim jedinjenjima i drugim nečistoćama.

U cilju provere kvaliteta izolovana RNK je razdvojena horizontalnom elektroforezom na gelu koji sadrži 2% agaroze u 5 x TBE puferu (1,1 M Tris-HCl pH 8,3, 900 mM borna kiselina i 25 mM EDTA), uz dodatak etidijum bromida. U bunare na gelu je naliveno 2 µg RNK rastvorene u 0,1% DEPC vodi sa bojom (6 x *Loading buffer* – 1 x TBE, 60% glicerol, 0,3% brom fenol plavo). Elektroforeza je trajala 30 min pri naponu od 100 V nakon čega su trake na gelu snimljene kamerom sa UV svetlošću (GelDoc XR system, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija).

### 3.10. Reakcija reverzne transkripcije

Za postupak reverzne transkripcije koji podrazumeva sintezu komplementarnog lanca molekula DNK (cDNK, eng. *complementary DNA*) na osnovu RNK kao matrice, korišćen je komplet *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) sa nasumičnim heksamerima. U uzorak RNK dodata je reakciona smeša, u zapremini od 50 µl, koja se sastojala od smeše četiri dezoksiribonukleozidtrifosfata (100 mM 25 x dNTP Mix), nasumičnih prajmera (10 x RT Primers), reverzne transkriptaze (250 IJ, MultiScraBe Reverse Transcriptase) i reakcionog pufera (10 x TaqMan RT Buffer). Reakcija reverzne transkripcije odvijala se po sledećem temperaturnom profilu: 10 min na 25°C, potom 120 min na 37°C i zaustavljena je zagrevanjem 5 min na 85°C. Ovako dobijena cDNK je razblažena do finalne koncentracije od 0.01 µg/µl odgovarajućom vodom za PCR i čuvana na -70°C do dalje upotrebe.

### 3.11. Izbor odgovarajuće endogene kontrole i lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (*Real-time PCR*)

Kako bi se metodom *Real-time PCR* dobili pouzdani rezultati prvo je urađena validacija adekvatne endogene kontrole. Upotreba endogene kontrole omogućila je normalizaciju ekspresije ciljnog u odnosu na ekspresiju referentnog gena, kao i eliminaciju razlika koje potiču od nejednakih količina cDNK unetih u reakciju. Kao endogene kontrole



korišćeni su geni koji se konstitutivno eksprimiraju u svim ćelijama (eng. *housekeeping genes*) i čija je ekspresija stabilna, odnosno ne menja se pod različitim uslovima, tretmanima i u patofiziološkim stanjima. Prajmeri za ispitivane endogene kontrole su kupljeni od proizvođača Applied Biosystems (Assay-on-Demand Gene Expression Products) i prikazani su u **Tabeli 3.4.**

**Tabela 3.4. Identifikacioni brojevi eseja endogenih kontrola ispitivanih metodom *Real-time* PCR.**

| Oznaka eseja | Ciljni gen                            | Identifikacioni broj eseja |
|--------------|---------------------------------------|----------------------------|
| <b>Actb</b>  | β-aktin                               | Rn00667869_m1              |
| <b>B2m</b>   | β-2-mikroglobulin                     | Rn00560865_m1              |
| <b>18S</b>   | 18S rRNK                              | Hs66666661_sl              |
| <b>Hprt1</b> | hipoksantin fosforiboziltransferaza 1 | Rn01527840_m1              |
| <b>Tbp</b>   | TATA-vezujući protein                 | Rn01455646_m1              |

*Real-Time* PCR je urađen u aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Reakcionu smešu za umnožavanje gena endogenih kontrola, ukupne zapremine 25 µl, sačinjavali su: 1×TaqMan Universal Master Mix, 1×TaqMan Gene Expression Assay Mix i 10 ng cDNK matrice. Uslovi odvijanja PCR reakcije su bili: 2 min na 50°C za aktivaciju enzima uracil-N-glikozilaze, potom 10 min na 95°C za aktivaciju AmpliTaq Gold DNK polimeraze, 40 ciklusa od po 15 s na 95°C za denaturaciju dimera i 60 s na 60°C u toku kojih dolazi do hibridizacije i umnožavanja. Sve reakcije su izvedene u triplikatu na mikrotitar pločama od 96 mesta.

Efikasnost umnožavanja tokom PCR reakcije svakog eseja je procenjivana na osnovu podataka dobijenih iz standardne krive prema sledećoj formuli:  $E = (10^{-1/\text{nagib}} -$

1) x 100. Standardne krive su konstruisane iz serija razblaženja odabrane cDNK za ciljnih gen kao i za svaku od ispitivanih endogenih kontrola.

Validacija potencijalnih endogenih kontrola je urađena korišćenjem programa *GeNorm* (Vandesompele i sar., 2002) i *NormFinder* (Andersen i sar., 2004). Ovi programi na osnovu količine RNK transkripata izračunavaju stabilnost genske ekspresije, intergrupnu i intragrupnu varijabilnost, kao i najstabilniju kombinaciju endogenih kontrola.

### 3.12. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom relativne kvantifikacije

Nakon izbora *Hprt1* kao odgovarajuće endogene kontrole (Djordjevic i sar., 2012), određen je nivo ekspresije gena metodom relativne kvantifikacije. Na ovaj način meri se relativno povećanje ili smanjenje nivoa ekspresije gena u odnosu na referentni uzorak. Za PCR su korišćeni komercijalno dostupni eseji proizvođača Applied Biosystems (Assay-on-Demand Gene Expression Products) prikazani u **Tabeli 3.5.**

**Tabela 3.5. Identifikacioni brojevi eseja ciljnih gena ispitivanih metodom *Real-time* PCR.**

| Oznaka eseja   | Ciljni gen      | Identifikacioni broj eseja |
|----------------|-----------------|----------------------------|
| <b>Hsd11b1</b> | 11 $\beta$ HSD1 | Rn00567167_m1              |
| <b>H6pd</b>    | H6PDH           | Rn01519771_m1              |
| <b>Nr3c1</b>   | GR              | Rn00561369_m1              |
| <b>Pck1</b>    | PEPCK           | Rn01529014_m1              |
| <b>Fasn</b>    | FAS             | Rn 01463550_m1             |
| <b>Tnfa</b>    | TNF $\alpha$    | Rn01525859_g1              |

Reakciona smeša kao i temperaturni profil PCR-a bili su isti kao i u reakcijama validacije. Sve reakcije su izvedene u triplikatu na mikrotitar pločama od 96 mesta. Da bi

bilo moguće porediti rezultate sa različitih mikrotitar ploča na svaku ploču je nanošen uvek isti uzorak cDNK koji je služio kao interna kontrola, odnosno kao kalibrator za dalja poređenja. Za procenu čistoće reakcionih komponenti na svaku ploču je nanošena negativna kontrola za svaki esej, koja je sadržala sve reagense za PCR izuzev cDNK.

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena primenjena je komparativna  $\Delta\Delta C_t$  metoda ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) prema kojoj je količina iRNK za ispitivane gene normalizovana prema iRNK endogene kontrole Hprt1 i prema iRNK kalibratora (Livak i Schmittgen, 2001). Dobijeni rezultati su analizirani pomoću programskog paketa Sequence Detection RQ Study Add ON za 7000 System SDS, verzija 1.2.3 (Applied Biosystem), sa intervalom poverenja od 95% ( $p < 0.05$ ).

### 3.13. Histološka analiza jetre

U cilju očuvanja čelijske morfologije, neposredno nakon žrtvovanja i perfundovanja mali lobus jetre je fiksiran u 3,5% formaldehidu 24 h na 4°C. Pre kalupljenja u parafinu, vršena je dehidratacija tkiva u seriji etanola rastuće koncentracije: 30% etanol (2x30 min), 50% etanol (2x30 min), 70% etanol (5 dana), 96% etanol (18 h) i 100% etanol (2x1 h), na sobnoj temperaturi. Da bi se omogućila impregnacija tkiva parafinom, etanol je zamenjen ksilolom (2x5 min), agensom koji ne sadrži vodu i u kome se parafin rastvara. Tkivo je zatim prebačeno u posudice sa rastopljenim parafinom (52-57°C) koji sadrži 7% voska i ostavljeno u termostatu 210 min (sa jednom promenom parafina nakon 90 min). Napravljeni parafinski blokovi sa tkivom su oblikovani i lepljeni za drvene nosače koji su pričvršćeni za odgovarajući deo rotacionog mikrotoma (Lameris, SAD). Isečeni preseći debljine 5  $\mu\text{m}$  su postavljeni na želatinom (1%) prekrivena predmetna stakla i deparafinizirani ksilolom (2x5 min). Preparati su zatim tretirani serijom alkohola opadajuće koncentracije: 100% etanol (5 min), 96% etanol (5 min), 70% etanol (5 min), 50% etanol (5 min) i voda (5 min).

Rutinska histološka analiza parafinskih preseka jetre urađena je nakon bojenja preparata 1% hematoksilin-eozinom. Bojenje se sastojalo iz serije potapanja praćenih ispiranjem vodom: 1% hematoksilin (2 min), voda (2x1 min), 0,3% NH<sub>4</sub>OH (2x2 s), voda (2x1 min), 1% eosin (1 min), voda (3x1 min). Preseci su zatim dehidratirani serijom alkohola rastuće koncentracije: 50% etanol (1 min), 70% etanol (1 min) 96% etanol (3x1 min) i 100% etanol (3 min) i prosvetljeni ksilolom (1x2 min).

Morfološka analiza tkiva, uz određivanje obima i analizu preseka ćelija jetre, vršena je na odgovarajućem radnom polju uz pomoć mikroskopa (Olympus, BX-51, Olympus Corp., Japan) opremljenog sa CCD kamerom (eng. *Charge-coupled device*, PixeLINK, Kanada). Kontrola sistema je vršena pomoću *NewCAST* softvera (Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0, Visiopharm, Nemačka). Obim i analiza preseka ćelija su vršeni za 100 hepatocita po radnom polju. Histološka analiza je urađena za pet životinja po eksperimentalnoj grupi i na tri radna polja obojenog preseka jetre svake životinje.

### 3.14. Statističke analize

Sve statističke analize urađene su korišćenjem statističkog programa *OriginPro* (verzija 8.0724, OriginLab Corp., SAD). Rezultati koji se odnose na kalorijski unos, morfološke, biohemijske i fiziološke parametre su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{X} \pm SD$ ). Rezultati koji se odnose na *Western blot* i *qPCR* su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $\bar{X} \pm SEM$ ). Normalnost raspodele ispitana je *Shapiro-Wilk* testom koji se koristi za proveru tipa distribucije podataka kada je u analiziranoj grupi manje od 50 subjekata. Dokaz postojanja normalne raspodele u grupi je  $p > 0,05$ . Poređenja između grupa su urađena parametarskim Studentovim t-testom, a statistički značajnima su smatrane vrednosti  $p < 0,05$ .



## **4. REZULTATI**

---

Jedan od najznačajnijih uzroka razvoja karakteristika metaboličkog sindroma je moderan način ishrane bogat fruktozom koja u jetri pokreće *de novo* lipogenezu, glukoneogenezu i hroničnu inflamaciju, što kumulativno vodi razvoju insulinske rezistencije (Rutledge i Adeli, 2007). Iako su glukokortikoidni hormoni važni regulatori energetskeg metabolizma podaci iz literature još uvek nedovoljno opisuju njihovu ulogu u regulaciji metaboličke ravnoteže pod pritiskom prevelikog unosa fruktoze.

Smisao svih radnih zadataka postavljenih u ovoj studiji je bio poređenje ključnih metaboličkih promena između kontrolne grupe i grupe životinja hranjenih 10% odnosno 60% rastvorom fruktoze tokom devet nedelja tretmana. Dva režima ishrane su nam omogućila da uočimo razlike u metaboličkim promenama koje nastaju kao posledica različitog opterećenja fruktozom.

#### **4.1. Energetski unos i masa tela, jetre i masnog tkiva nakon ishrane obogaćene fruktozom**

Unos hrane i tečnosti eksperimentalnih životinja su mereni svakodnevno, dok je energetski unos, izražen u kJ po danu i po životinji, izračunat putem formule:

$$\text{Ukupan kalorijski unos} = \text{grami hrane} \times 11 + \text{mililitri fruktoze} \times 1.72 \times 6.$$

Kao što je prikazano u **Tabeli 4.1.**, životinje koje su pile rastvor fruktoze su značajno manje konzumirale hranu u odnosu na kontrolnu grupu (\* $p < 0,05$ ). Sa druge strane, životinje koje su pile 10% rastvor fruktoze su unosile znatno više tečnosti u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). Kod životinja iz drugog eksperimenta, analiza je bila složenija jer je tretirana grupa mogla slobodno da pije vodu s obzirom da izuzetno visoka koncentracija fruktoze

može da dovede do hipertrofije bubrega, glomerularne hipertenzije i kortikalne vazokonstrikcije (Sanchez-Lozada i sar., 2007). Na taj način je izbegnut poremećaj elektrolitskog balansa u našoj eksperimentalnoj grupi, što je pokazano odsustvom razlika u osmolarnosti plazme pacova koji su pili 60% rastvor fruktoze ( $319,80 \pm 10,42$  mmol/L) i kontrolne grupe životinja ( $319,30 \pm 7,29$  mmol/L). U svakom slučaju, energetski unos životinja koje su pile fruktozu je bio značajno veći u odnosu na kontrole, naročito u grupi koja je pila 60% rastvor fruktoze (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

**Tabela 4.1. Kalorijski unos, telesna težina, masa jetre i masnog tkiva pacova.**

| Eksperiment                               | I<br>(10% fruktoza) |                         | II<br>(60% fruktoza) |  |
|---|---------------------|-------------------------|----------------------|--|
|   | Kontrola            | Fruktoza                | Kontrola             | Fruktoza                                 |
| Unos hrane<br>(g/dan/životinja)           | 20,57 ± 2,63        | <b>14,20 ± 2,01 *</b>   | 21,73 ± 0,73         | <b>16,99 ± 2,71 *</b>                    |
| Unos tečnosti<br>(ml/dan/životinja)       | 49,33 ± 5,39        | <b>74,10 ± 11,36 *</b>  | 36,82 ± 4,05         | <b>24,79 ± 3,76 ●*</b><br>13,32 ± 1,66 ○ |
| Kalorijski unos<br>(kJ/dan/životinja)     | 226,23 ± 28,90      | <b>283,65 ± 24,51 *</b> | 239,05 ± 8,05        | <b>324,39 ± 23,79 **</b>                 |
| Telesna masa (g)                          | 338,89 ± 40,45      | 311,25 ± 37,58          | 333,5 ± 32,34        | 345,64 ± 32,95                           |
| Masa jetre (g)                            | 12,48 ± 1,82        | 10,77 ± 1,46            | 11,37 ± 1,57         | 12,80 ± 1,40                             |
| Odnos mase<br>jetre/težina (x1000)        | 36,50 ± 2,64        | 34,99 ± 3,94            | 34,00 ± 1,98         | <b>37,05 ± 3,21 *</b>                    |
| Masa masnog tkiva (g)                     | 2,59 ± 1,14         | 3,16 ± 1,80             | 4,37 ± 1,73          | <b>6,26 ± 1,62 *</b>                     |
| Odnos mase masnog<br>tkiva/težina (x1000) | 7,48 ± 2,84         | 10,06 ± 4,81            | 13,26 ± 5,10         | <b>18,21 ± 4,64 *</b>                    |

Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SD$ . Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). ● – unos 60% rastvora fruktoze; ○ - unos vode.

Telesna masa životinja na početku eksperimenata, kao i prirast mase koja je merena jednom nedeljno tokom tretmana su bili ujednačeni. Masa je poslednji put izmerena pred žrtvovanje i njene vrednosti su prikazane u **Tabeli 4.1**. Prema datim podacima životinje koje su pile fruktozu nisu imale gojazan fenotip s obzirom da je njihova masa bila nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, uočeno je značajno povećanje mase visceralnog masnog tkiva kod životinja koje su konzumirale 60% fruktozu (\* $p < 0,05$ ), kao i povećanje odnosa mase masnog tkiva i ukupne telesne težine (\* $p < 0,05$ ). Masa jetre nije bila promenjena kod životinja koje su pile rastvore fruktoze, ali je izračunato da je odnos mase jetre prema težini tela bio statistički značajno povećan kod životinja koje su pile rastvor fruktoze veće koncentracije (\* $p < 0,05$ , **Tabela 4.1**).

## **4.2. Efekat ishrane obogaćene fruktozom na biohemijske i fiziološke parametre**

Koncentracije glukoze i triglicerida su merene automatskim analizatorima u krvi pacova odmah nakon žrtvovanja. Ishrana obogaćena fruktozom nije dovela do promena u nivou glukoze u odnosu na kontrolne grupe (**Tabela 4.2**). Koncentracija triglicerida kod životinja iz oba eksperimenta je bila statistički značajno povećana, sa napomenom da je promena bila izraženija kod pacova koji su pili 60% rastvor fruktoze (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , **Tabela 4.2**). Nivo slobodnih masnih kiselina je meren u plazmi eksperimentalnih životinja kolorimetrijskom metodom. Iz prikazanih rezultata se vidi da je koncentracija slobodnih masnih kiselina bila statistički značajno povećana kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze (\* $p < 0,05$ ), dok nije bilo promene u njihovoj koncentraciji kod pacova koji su konzumirali 60% rastvor (**Tabela 4.2**).



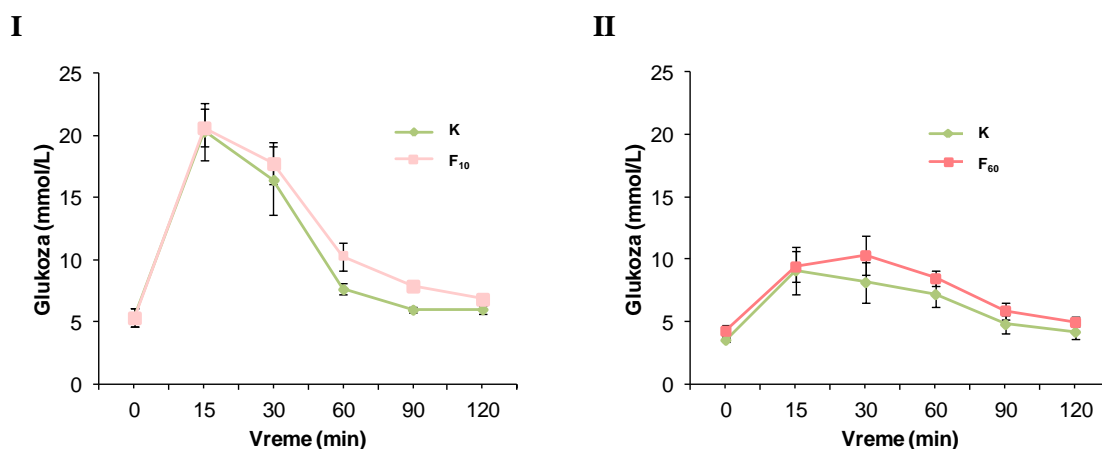
Tabela 4.2. Biohemijski i fiziološki parametri eksperimentalnih životinja

| Eksperiment                      | I<br>(10% fruktoza) |                          | II<br>(60% fruktoza) |                      |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
|                                  | Kontrola            | Fruktoza                 | Kontrola             | Fruktoza             |
| Glukoza (mmol/L)                 | 5,20 ± 0,42         | 4,84 ± 0,62              | 4,08 ± 0,30          | 3,88 ± 0,24          |
| Trigliceridi (mmol/L)            | 1,63 ± 0,30         | <b>2,07 ± 0,27*</b>      | 1,13 ± 0,25          | <b>1,55 ± 0,32**</b> |
| Slobodne masne kiseline (mmol/L) | 0,61 ± 0,07         | <b>0,70 ± 0,07*</b>      | 0,69 ± 0,18          | 0,70 ± 0,32          |
| Kortikosteron u plazmi (ng/ml)   | 177,45 ± 117,50     | 238,38 ± 183,46          | 74,76 ± 39,63        | 68,05 ± 45,82        |
| Kortikosteron u jetri (ng/mg)    | 0,53 ± 0,41         | 0,35 ± 0,12              | 0,44 ± 0,29          | 0,22 ± 0,17          |
| Insulin (mIU/L)                  | 12,68 ± 6,33        | 7,51 ± 4,94              | 17,12 ± 6,63         | 18,35 ± 11,10        |
| HOMA indeks                      | 2,94 ± 1,49         | 1,72 ± 1,29              | 3,11 ± 1,28          | 3,13 ± 1,87          |
| IPGT test (AUC)                  | 1214,34 ± 237,18    | <b>1395,82 ± 165,29*</b> | 771,18 ± 78,93       | 912,38 ± 69,06       |

Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm SD$ . Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

U **Tabeli 4.2.** prikazani su nivoi kortikosterona i insulina kao endokrinološki parametri, kao i HOMA indeksi i rezultati IPGT testa (**Tabela 4.2., Slika 4.1.**) koji su upotrebljeni za procenu insulinske osetljivosti. Koncentracija kortikosterona je merena

pomoću komercijalnog ELISA testa u plazmi i citoplazmatičnoj frakciji jetre pacova. Nije bilo statistički značajne promene u nivou kortikosterona u plazmi, niti u tkivu životinja koje su pile rastvore fruktoze u odnosu na kontrolne grupe. Takođe, ishrana obogaćena fruktozom nije uticala na promenu koncentracije insulina u plazmi, kao ni na promenu HOMA indeksa u odnosu na kontrolne životinje. IPGT test je pokazao statistički značajno veću AUC vrednost kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze (\* $p < 0,05$ ), što je jedan od parametara razvoja insulinske rezistencije na sistemskom nivou. Sa druge strane, kod životinja iz drugog eksperimenta AUC vrednost je bila nepromenjena.



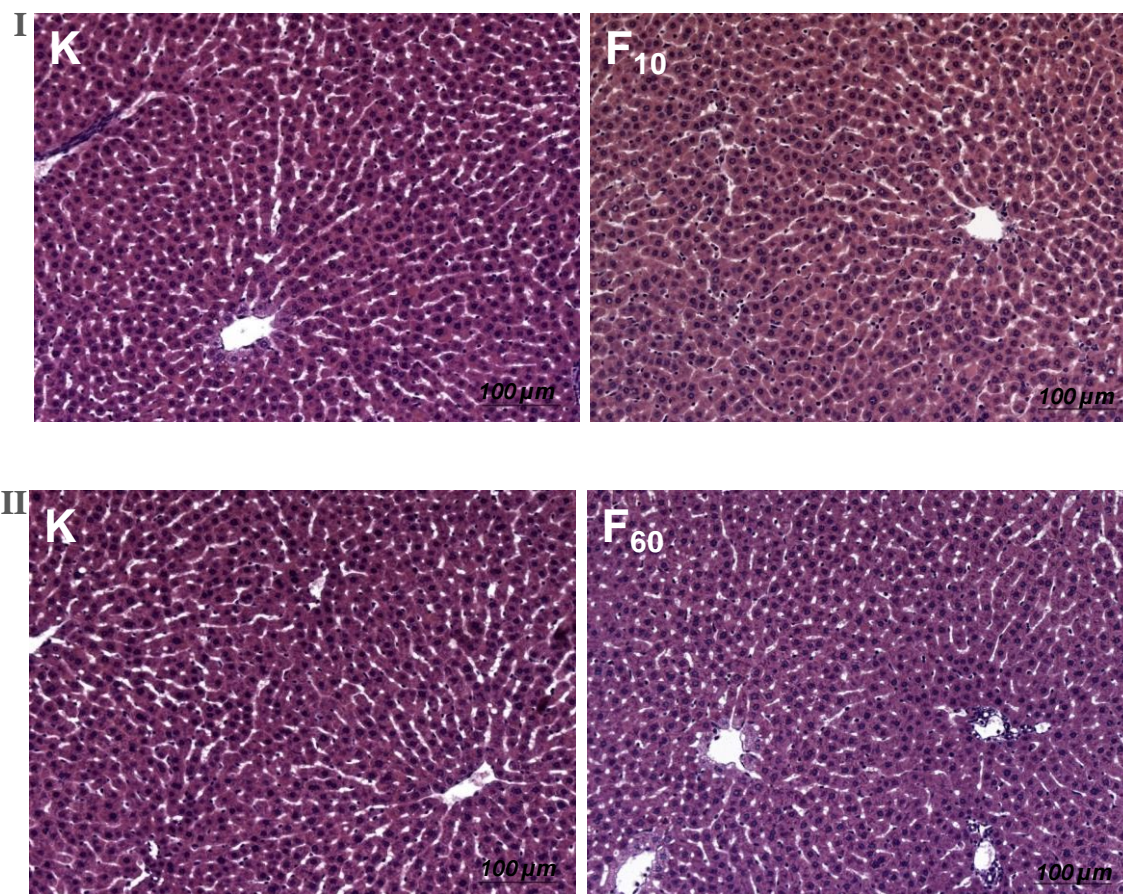
**Slika 4.1. Rezultati IPGT testa urađenog na životinjama koje su pile 10% (I) i 60% rastvor fruktoze (II).**

Nakon određivanja koncentracije glukoze našte, životinjama je intraperitonealno injecirana glukoza u koncentraciji 2g/kg telesne mase. Koncentracija glukoze u krvi je merena neposredno pre injeciranja (0) i 15, 30, 60, 90 i 120 min nakon injeciranja. Svaka tačka predstavlja  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  koncentracije glukoze za 9 eksperimentalnih životinja. K - odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

### 4.3. Histološka analiza jetre nakon ishrane obogaćene fruktozom

Histološka analiza je pokazala da dugotrajno konzumiranje 10% i 60% rastvora fruktoze ne dovodi do patoloških promena u jetri u odnosu na kontrolne grupe (Slika 4.2.). Naime, posmatranjem preseka tkiva pod mikroskopom uočena je jasna lobularna građa sa

venom u lobularnom centru. Svi hepatociti su poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme sa centralno ili paracentralno postavljenim jedrom. U ćelijama se mestimično mogu uočiti masne kapi čije prisustvo nakon ishrane obogaćene fruktozom nije izraženije nego kod kontrolnih životinja. Prema tome, steatoza, nekroza hepatocita, kao i infiltracija inflamatornih ćelija nisu zapažene u jetri životinja koje su pile rastvore fruktoze.



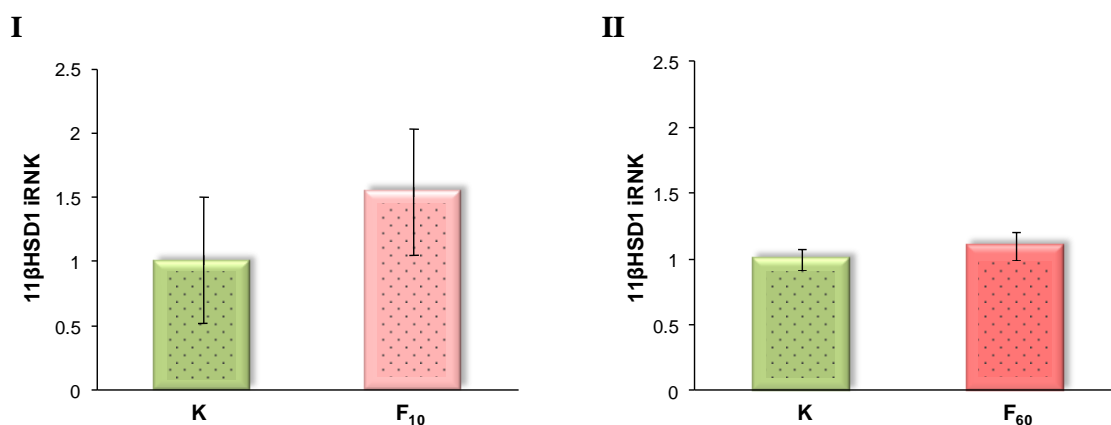
**Slika 4.2. Preseci tkiva jetre.**

Prikazane su reprezentativne mikrografije hematoksilin-eozinom obojenih preseka jetre Wistar pacova nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze. K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

## 4.4. Metabolizam glukokortikoida u jetri pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom

### 4.4.1. Nivo iRNK i proteina 11 $\beta$ HSD1

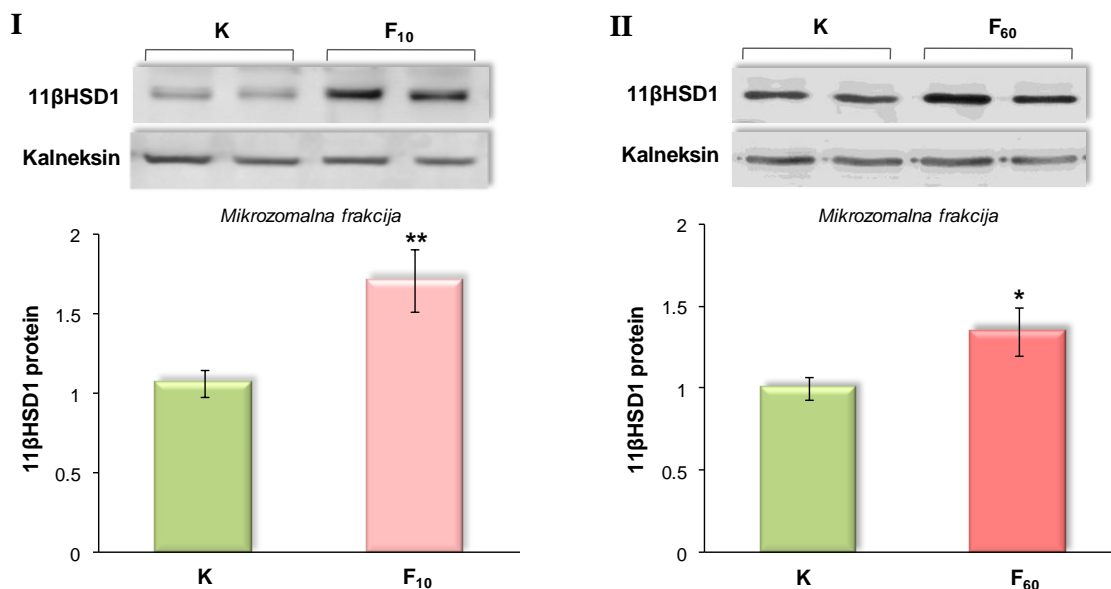
Protein 11 $\beta$ HSD1 katalizuje aktivaciju kortikosterona i predstavlja ključni enzim prereseptorskog metabolizma glukokortikoida. Rezultati relativne kvantifikacije iRNK za 11 $\beta$ HSD1 u jetri pacova su pokazali da nivo analiziranih iRNK nije statistički značajno promenjen nakon ishrane obogaćene fruktozom (Slika 4.3.).



**Slika 4.3. Koncentracija iRNK za 11 $\beta$ HSD1 u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi su kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K - odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

S obzirom da je enzim 11 $\beta$ HSD1 lokalizovan u lumenu endoplazmatskog retikuluma, njegova koncentracija je merena u mikrozomalnoj frakciji jetre pomoću *Western blot* metode. Kod životinja koje su pile rastvore fruktoze izmeren je znatno veći nivo proteina u odnosu na kontrolne grupe, s napomenom da je ta promena većeg intenziteta kod pacova koji su pili 10% (\*\*p<0,01, Slika 4.4.I) u odnosu na 60% rastvor fruktoze (\*p<0,05, Slika 4.4.II).

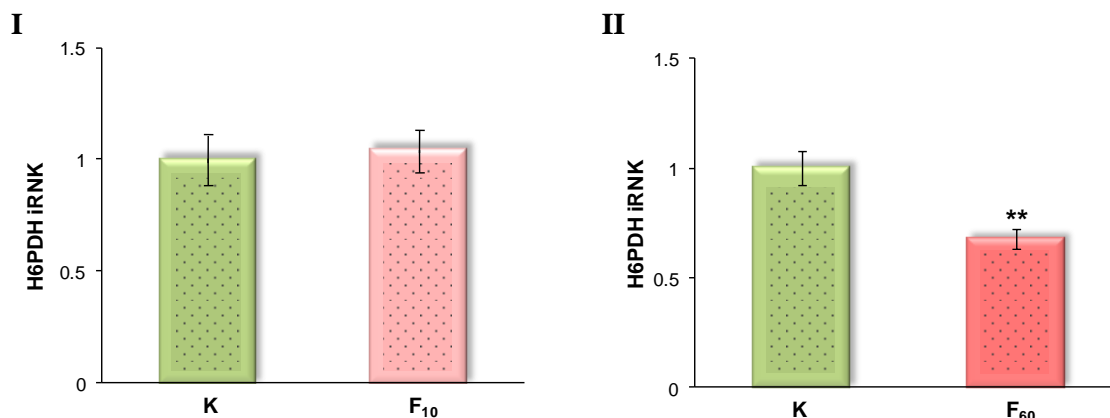


**Slika 4.4. Koncentracija proteina 11βHSD1 u mikrozomalnoj frakciji ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi. Kalneksin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina na gel. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina 11βHSD1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K - odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.4.2. Nivo iRNK i proteina H6PDH

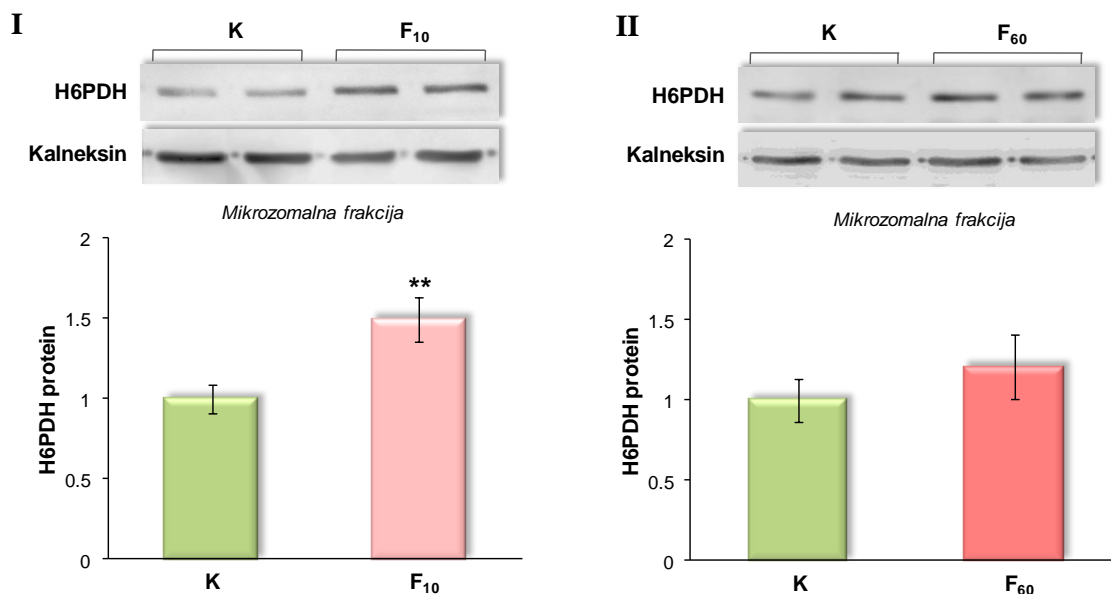
Kada se proučava prereceptorski metabolizam glukokortikoida, važno je odrediti nivo H6PDH, enzima koji obezbeđuje kofaktor neophodan za enzimsku atktivnost 11βHSD. Nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze nije uočena promena u koncentraciji iRNK za H6PDH (Slika 4.5.I), dok je njen nivo bio značajno smanjen kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze (\*\* $p < 0,01$ , Slika 4.5.II).



**Slika 4.5. Koncentracija iRNK za H6PDH u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

Kako su proteini 11 $\beta$ HSD1 i H6PDH kolokalizovani, koncentracija H6PDH proteina je takođe merena u mikrozomalnoj frakciji ćelija jetre. Kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze, nivo H6PDH je bio statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu (\*\* $p < 0,01$ , **Slika 4.6.I**). S druge strane, nije uočena značajna promena kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze (**Slika 4.6.II**).



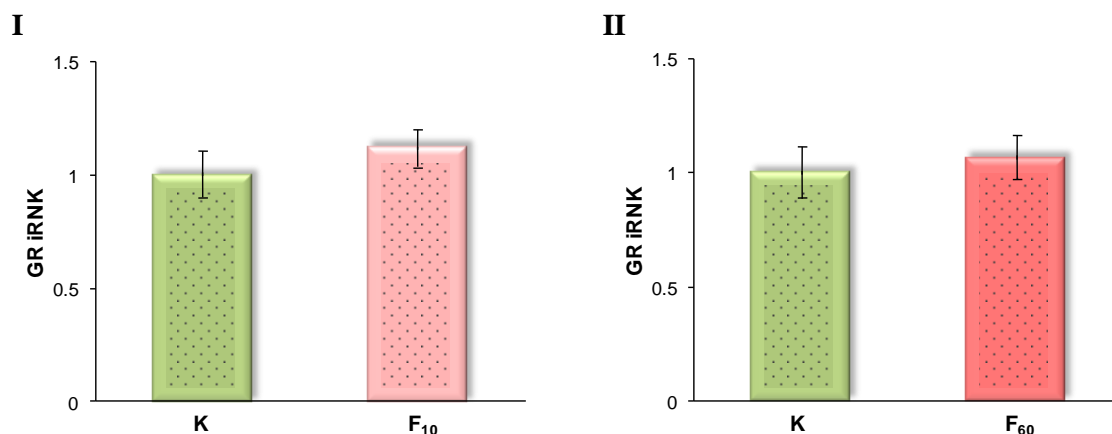
**Slika 4.6. Koncentracija proteina H6PDH u mikrozomalnoj frakciji ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi. Kalneksin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju koncentracije proteina H6PDH. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.4.3. Koncentracija iRNK i unutarćelijska distribucija GR-a

Delovanje glukokortikoidnih hormona je posredovano unutarćelijskim receptornim proteinom GR. Nakon aktivacije, dimerizacije i tranlokacije u jedro, dolazi do vezivanja GR-a za specifične sekvence na DNK i pokretanja i/ili inhibiranja transkripcije ciljnih gena. Iz toga proizilazi da je unutarćelijska raspodela GR-a, odnosno translokacija u jedro, od primarne važnosti za transaktivacionu sposobnost receptora.

Tretman fruktozom bez obzira na koncentraciju nije doveo do promena u nivou iRNK za GR u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (Slika 4.7.).

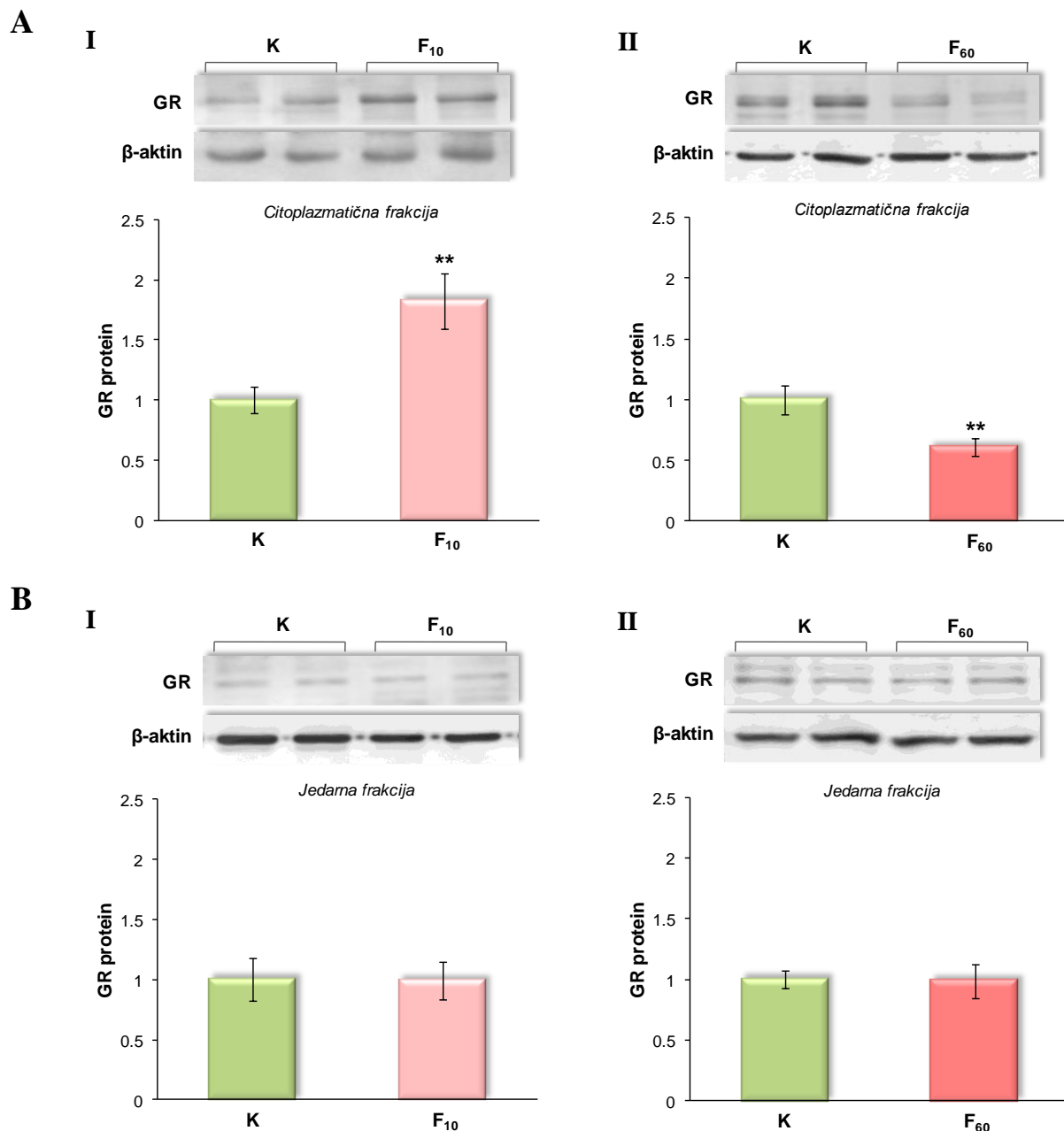


**Slika 4.7. Koncentracija iRNK za GR u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi su kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

Koncentracija proteina GR u citoplazmi jetre pacova je bila značajno povećana nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze (\*\*p<0,01, **Slika 4.8.A-I**), za razliku od ishrane 60% fruktozom koja je dovela do izrazitog smanjenja nivoa GR-a (\*\*p<0,01, **Slika 4.8.A-II**). Iako su u citoplazmi uočene promene proteina GR-a, ishrana rastvorima fruktoze nije uticala na nivo receptora u jedrima (**Slika 4.8.B**), što indirektno ukazuje da ne dolazi do njegove aktivacije, a u saglasnosti je sa neizmenjenom koncentracijom kortikosterona u jetri životinja iz oba eksperimenta.



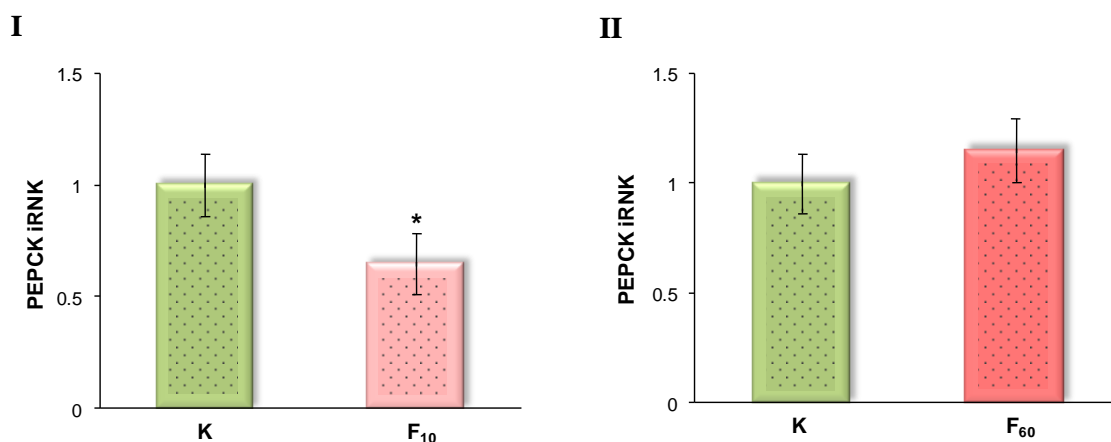


**Slika 4.8. Unutarćelijska distribucija proteina GR između citoplazmatične (A) i jedarne (B) frakcije ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina GR. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.4.4. Koncentracija iRNK za PEPCK

Jedan od gena čiju transkripciju pokreće aktivirani GR je PEPCK, pa je povećana koncentracija glukokortikoida u jetri povezana sa stimulacijom glukoneogeneze i eventualnim povećanjem nivoa glukoze u krvi. U skladu sa nepromenjenim koncentracijama GR-a u jedrima, nivo iRNK za PEPCK u jetri životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze je bio smanjen (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.9.I**), dok je nakon ishrane 60% fruktozom bio nepromenjen u odnosu na odgovarajuće kontrole (**Slika 4.9.II**).



**Slika 4.9. Koncentracija iRNK za PEPCK u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). K – odgovarajuća kontrola, F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

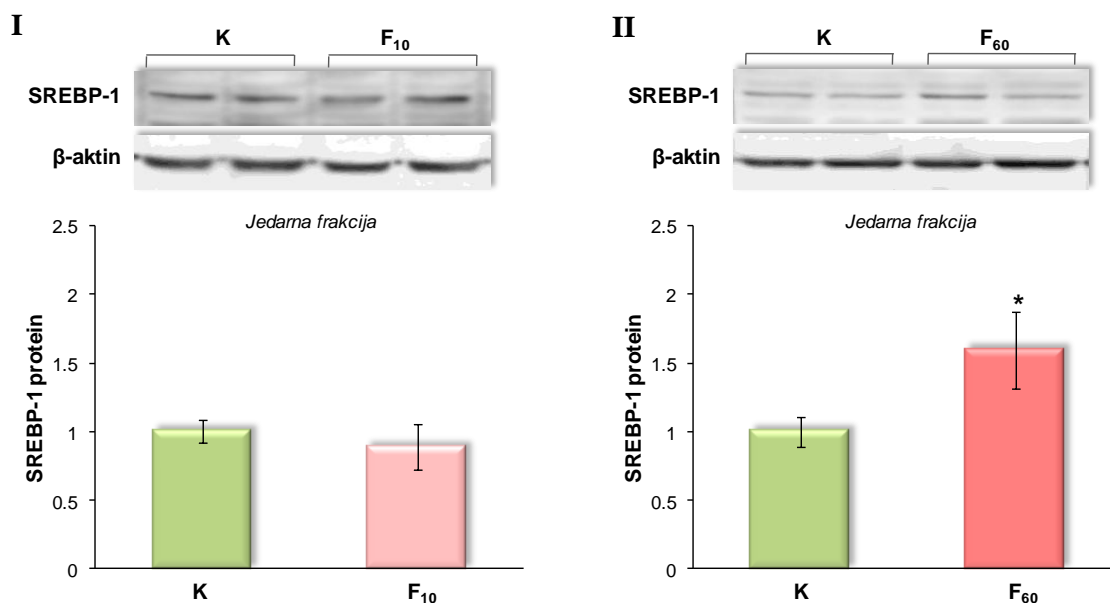
## 4.5. Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na nivo molekula uključenih u metabolizam lipida u jetri

### 4.5.1. Nivo proteina uključenih u *de novo* sintezu masnih kiselina

*De novo* lipogeneza je regulisana proteinom SREBP-1. Njegova aktivacija podrazumeva prelazak u jedro gde ima ulogu transkripcionog regulatora koji pokreće transkripciju gena za FAS, čiji proteinski produkt katalizuje sintezu masnih kiselina.

#### 4.5.1.1. Nivo proteina SREBP-1

Koncentracija proteina SREBP-1 je određena u jedarnoj frakciji ćelija jetre pacova. Dok ishrana 10% rastvorom fruktoze nije uticala na njegovu koncentraciju (Slika 4.10.I), uočeno je statistički značajno povećanje nakon ishrane fruktozom veće koncentracije (\* $p < 0,05$ , Slika 4.10.II).

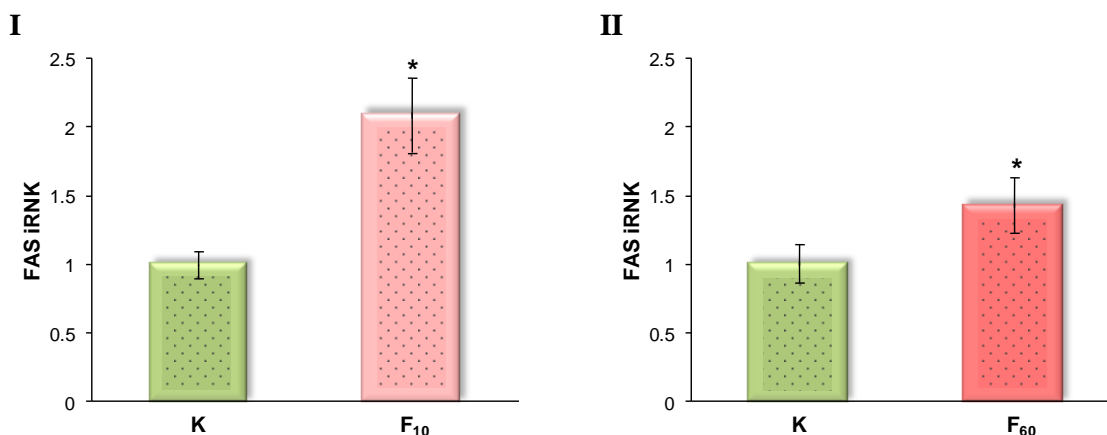


**Slika 4.10. Koncentracija proteina SREBP-1 u jedrima ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina SREBP-1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.5.1.2. Nivo iRNK za FAS

Uprkos rezultatima dobijenim za transkripcioni regulator SREBP-1, nivo iRNK za FAS je bio povećan u jetri životinja iz prvog eksperimenta (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.11.I**). Ishrana 60% rastvorom fruktoze je takođe dovela do značajnog povećanje njene koncentracije u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.11.II**).



**Slika 4.11. Koncentracija iRNK za FAS u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

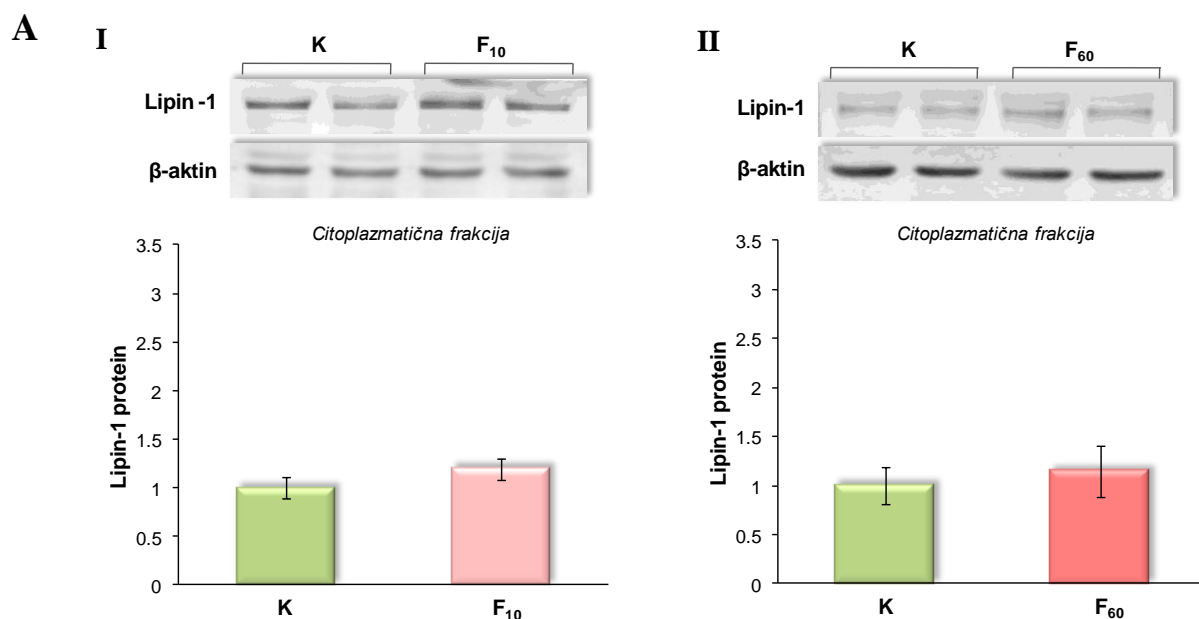
#### 4.5.2. Unutarćelijska distribucija lipina-1

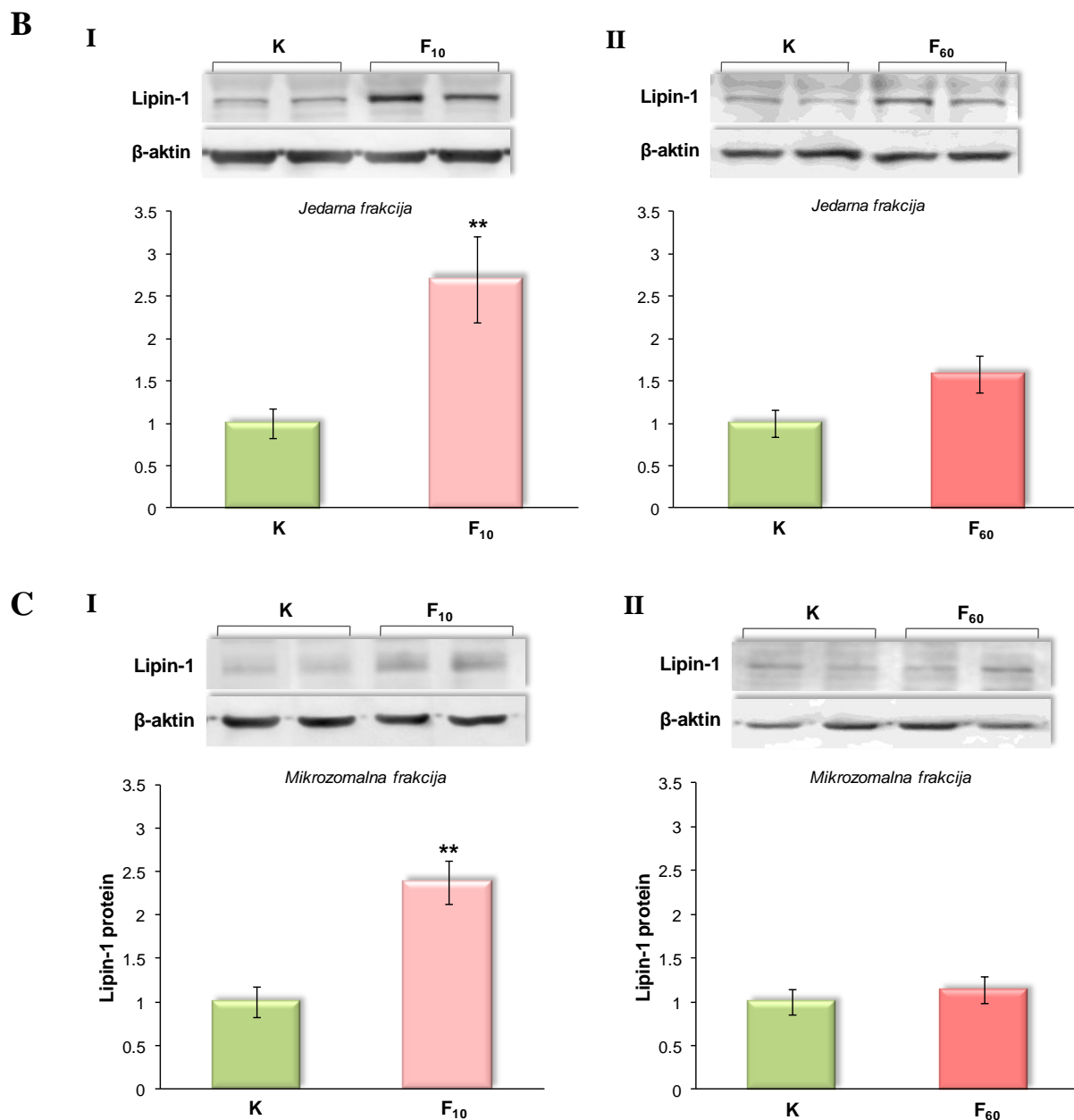
Lipin-1 ima centralnu ulogu u hepatičnoj lipogenezi jer predstavlja kontrolnu tačku u održavanju ravnoteže između sinteze triglicerida i mitohondrijalne  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina. Njegova aktivnost zavisi od posttranslacionih modifikacija koje diktiraju raspodelu proteina između odgovarajućih ćelijskih kompartmana.

Ishrana obogaćena rastvorima fruktoze nije dovela do promena u koncentraciji lipina-1 u citoplazmatičnim frakcijama ćelija jetre eksperimentalnih životinja (**Slika 4.12.A**).

Kada se lipin-1 nađe u jedarnoj frakciji dolazi do izražaja njegova aktivnost transkripcionog koaktivatora koji je uključen u  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina. U jedrima hepatocita pacova uočeno je statistički značajno povećanje koncentracije lipina-1 kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze (\*\* $p < 0,01$ , **Slika 4.12.B-I**), dok je njegov nivo bio nepromenjen nakon ishrane 60% fruktozom (**Slika 4.12.B-II**).

U mikrozomalnoj frakciji lipin-1 deluje kao enzim PAP i promoviše sintezu i akumulaciju triglicerida i fosfolipida. Kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze uočeno je značajno povećanje nivoa lipina-1 u mikrozomima u odnosu na odgovarajuće kontrole (\*\* $p < 0,01$ , **Slika 4.12.C-I**). Sa druge strane, njegova koncentracija u pomenutoj frakciji nije bila promenjena nakon ishrane 60% rastvorom fruktoze (**Slika 4.12.C-II**).





**Slika 4.12. Unutarćelijska distribucija proteina lipin-1 između citoplazmatične (A), jedarne (B) i mikrozomalne (C) frakcije ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentivni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju koncentracije lipina-1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SEM$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

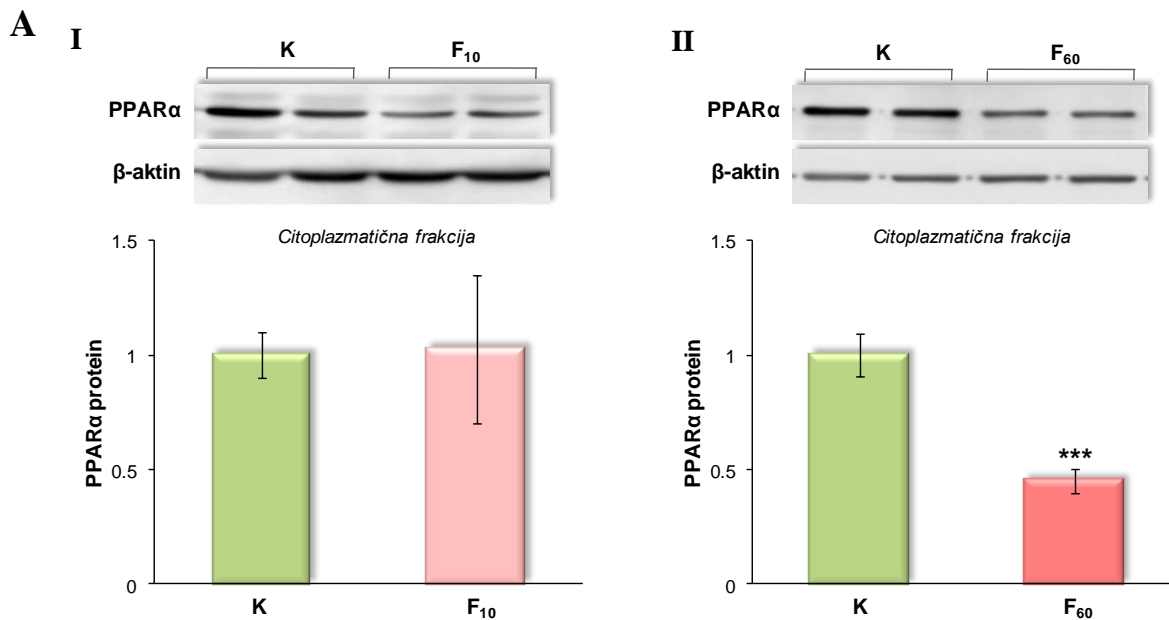
### 4.5.3. Nivo proteina uključenih u $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina

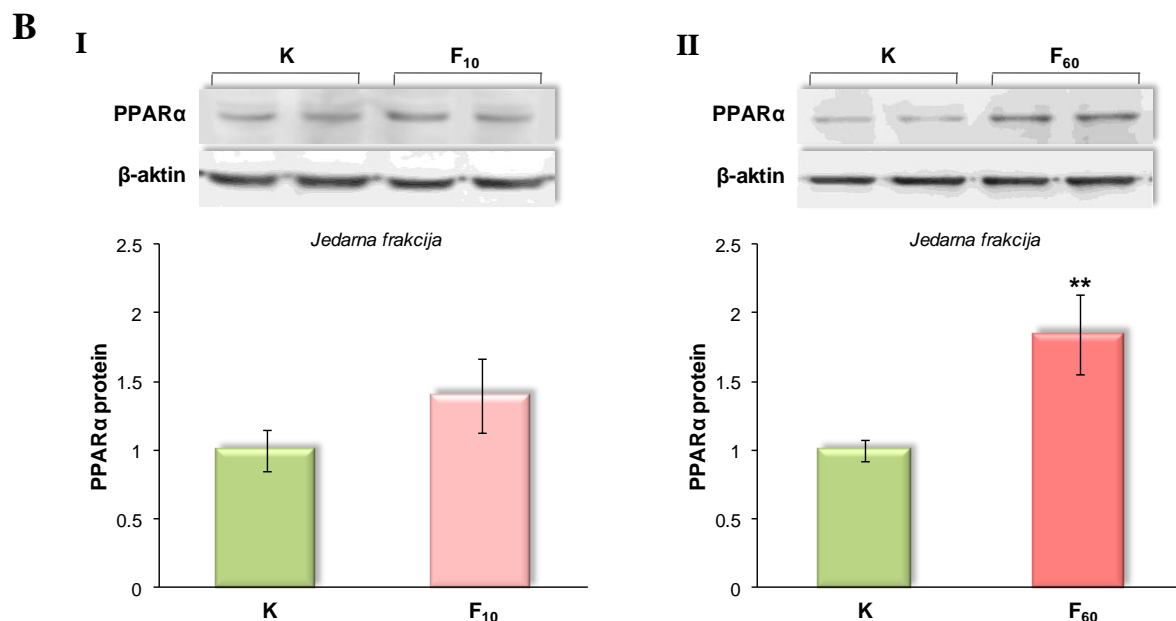
Jedan od indikatora stimulacije transkripcije gena čiji su proteinski produkti uključeni u  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina je povećan nivo lipina-1 u jedrima uz obavezno prisustvo transkripcionog regulatora PPAR $\alpha$  i koaktivatora PGC-1. Kako bi se ispitalo da li fruktoza dovodi do aktivacije ovih regulatora, praćena je njihova koncentracija, kao i raspodela izmedju citoplazmatske i jedarne frakcije ćelija jetre.

#### 4.5.3.1. Unutarćelijska distribucija proteina PPAR $\alpha$

Nivo transkripcionog regulatora PPAR $\alpha$  u citoplazmi ćelija jetre nije bio promenjen kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze (Slika 4.13.A-I), za razliku od njegovog izraženog smanjenja nakon ishrane 60% fruktozom (\*\*p<0,001, Slika 4.13.A-II).

Iako je koncentracija proteina PPAR $\alpha$  u jedarnim frakcijama životinja iz prvog eksperimenta bila povišena, statističke analize nisu ukazale na značajnost promene (Slika 4.13.B-I). Sa druge strane njegov nivo je bio statistički značajno povećan kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze (\*\*p<0,01, Slika 4.13.B-II).



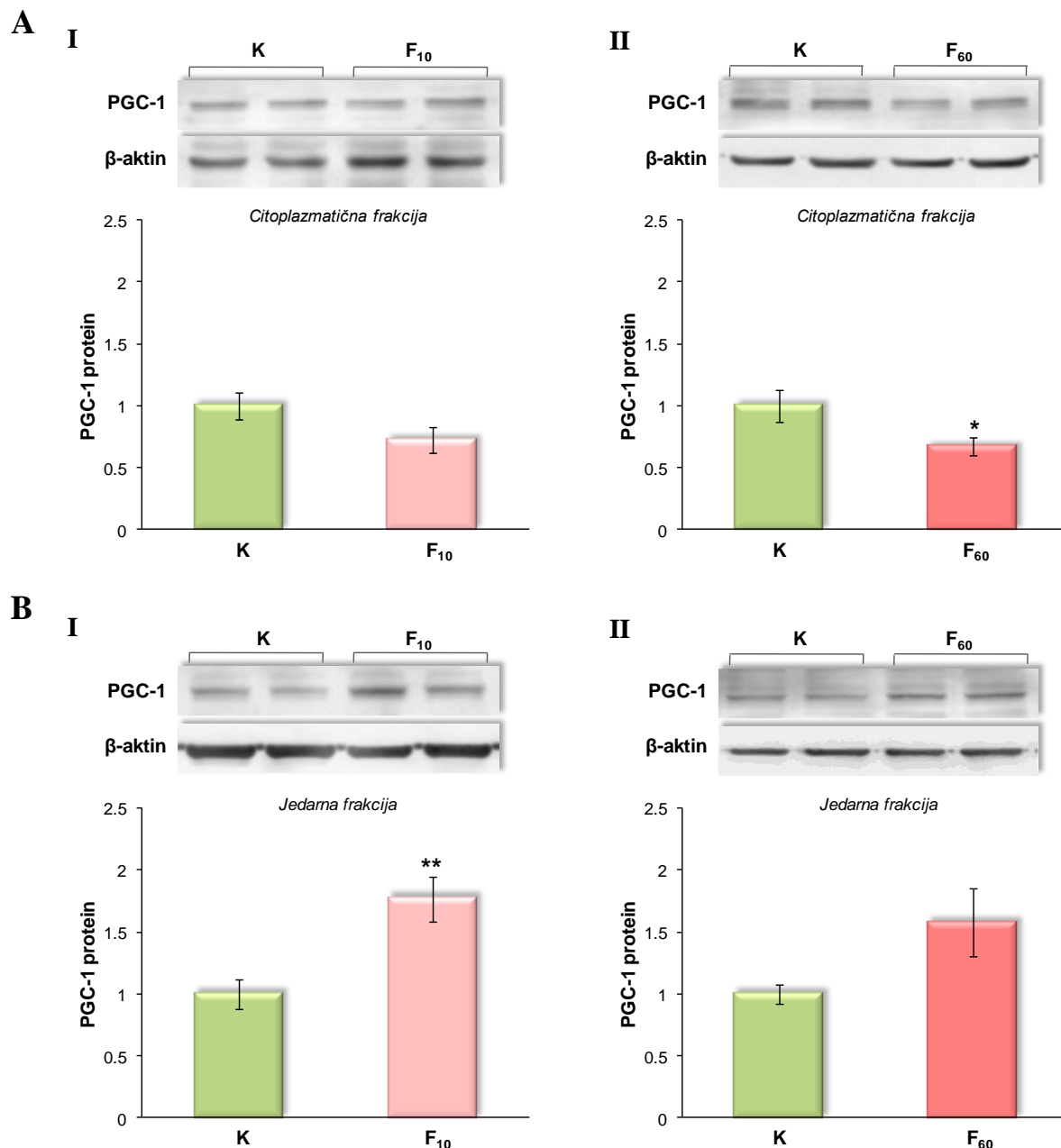


**Slika 4.13. Unutarćelijska distribucija proteina PPAR $\alpha$  između citoplazmatične (A) i jedarne (B) frakcije ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.** Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju koncentracije proteina PPAR $\alpha$ . Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.5.3.2. Unutarćelijska distribucija proteina PGC-1

Bez obzira na nepromenjen nivo proteina PGC-1 u citoplazmi (Slika 4.14.A-I), tretman 10% fruktozom dovodi do njegove aktivacije, s obzirom na statistički značajno povećanje koncentracije proteina u jedrima (\*\* $p < 0,01$ , Slika 4.14.B-I). Sa druge strane, smanjenje nivoa PGC-1 u citoplazmi (\* $p < 0,05$ , Slika 4.14.A-II) nije bilo praćeno značajnim povećanjem njegove koncentracije u jedarnoj frakciji ćelija jetre životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze (Slika 4.14.B-II).



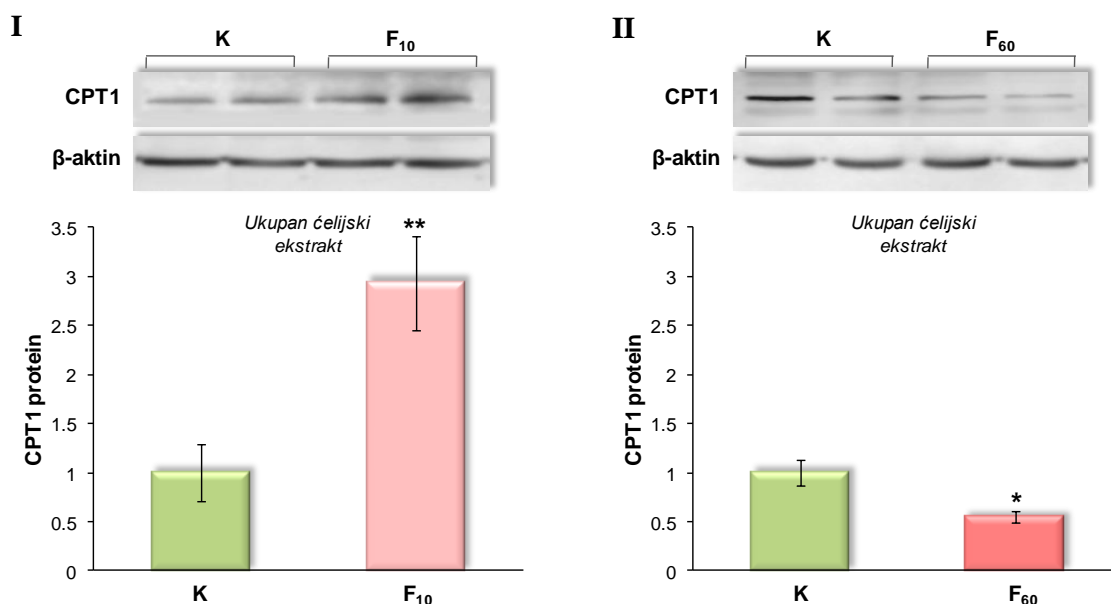


**Slika 4.14. Unutarćelijska distribucija proteina PGC-1 između citoplazmatične (A) i jedarne (B) frakcije ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.** Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina PGC-1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

### 4.5.3.3. Koncentracija proteina CPT1

Ključni događaj koji pokreće  $\beta$ -oksidaciju je transport slobodnih masnih kiselina iz citoplazme u mitohondrije. Ovaj proces je posredovan specifičnim transporterom CPT1 koji se nalazi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Da bismo ispitali da li je  $\beta$ -oksidacija zaista stimulisana u jetri životinja koje su pile fruktozu, merili smo koncentraciju proteina CPT1 u ukupnom ćelijskom ekstraktu hepatocita.

Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovela je do značajnog povećanja koncentracije enzima CPT1 (\*\* $p < 0,01$ , **Slika 4.15.I**), dok je njegova koncentracija u jetri pacova koji su pili 60% fruktozu bila značajno smanjena u odnosu na odgovarajuću kontrolu (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.15.II**).



**Slika 4.15. Koncentracija proteina CPT1 u ukupnom ekstraktu ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

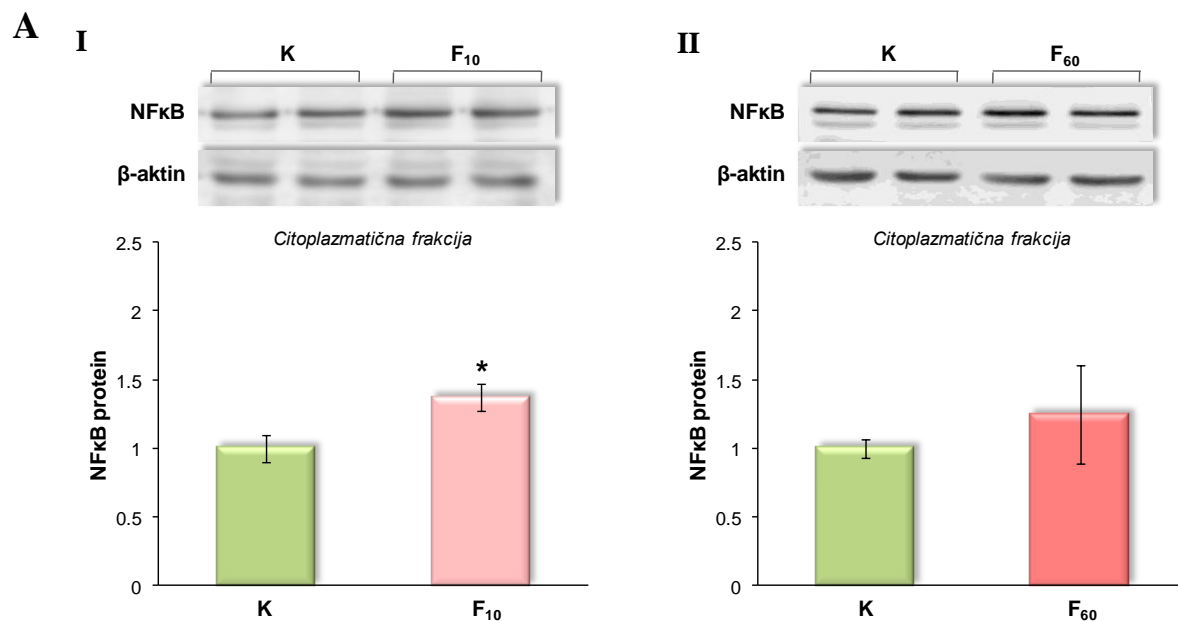
Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina CPT1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K - odgovarajuća kontrola, F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

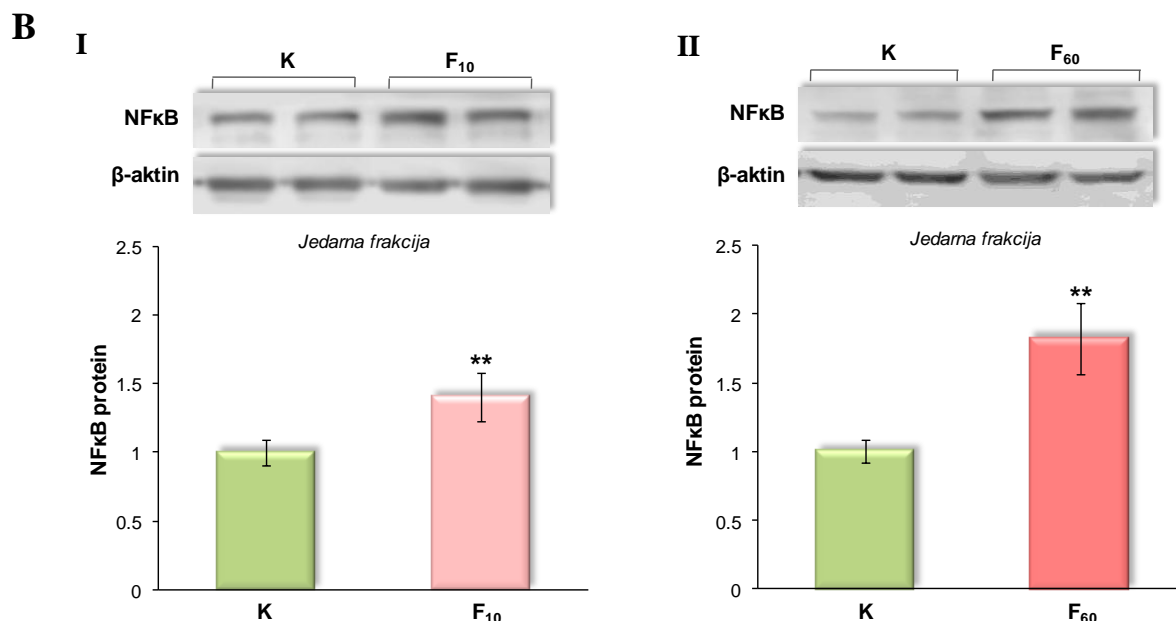
## 4.6. Efekat ishrane obogaćene fruktozom na razvoj metaboličke inflamacije u jetri pacova

Akumulacija masti u jetri je obično praćena povećanim oslobađanjem proinflamatornih citokina, što predstavlja osnovu za razvoj hronične inflamacije niskog intenziteta. Sa druge strane, glukokortikoidni hormoni imaju važnu ulogu u regulisanju metaboličke inflamacije putem inhibiranja citokina TNF $\alpha$ , što ostvaruju regulacijom proinflamatornog transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B.

### 4.6.1. Unutarćelijska distribucija proteina NF $\kappa$ B

Aktivacija NF $\kappa$ B podrazumeva njegov prelazak iz citoplazme u jedro. Nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze uočeno je povećanje njegove koncentracije kako u citoplazmatskoj (\*p<0,05, **Slika 4.16.A-I**) tako i u jedarnoj frakciji ćelija jetre pacova (\*\*p<0,01, **Slika 4.16.B-I**). I kod životinja koje su pile 60% fruktozu NF $\kappa$ B je bio aktiviran, s tim da je njegov nivo bio nepromenjen u citoplazmi (**Slika 4.16.A-II**), a značajno povećan u jedrima (\*\*p<0,01, **Slika 4.16.B-II**).





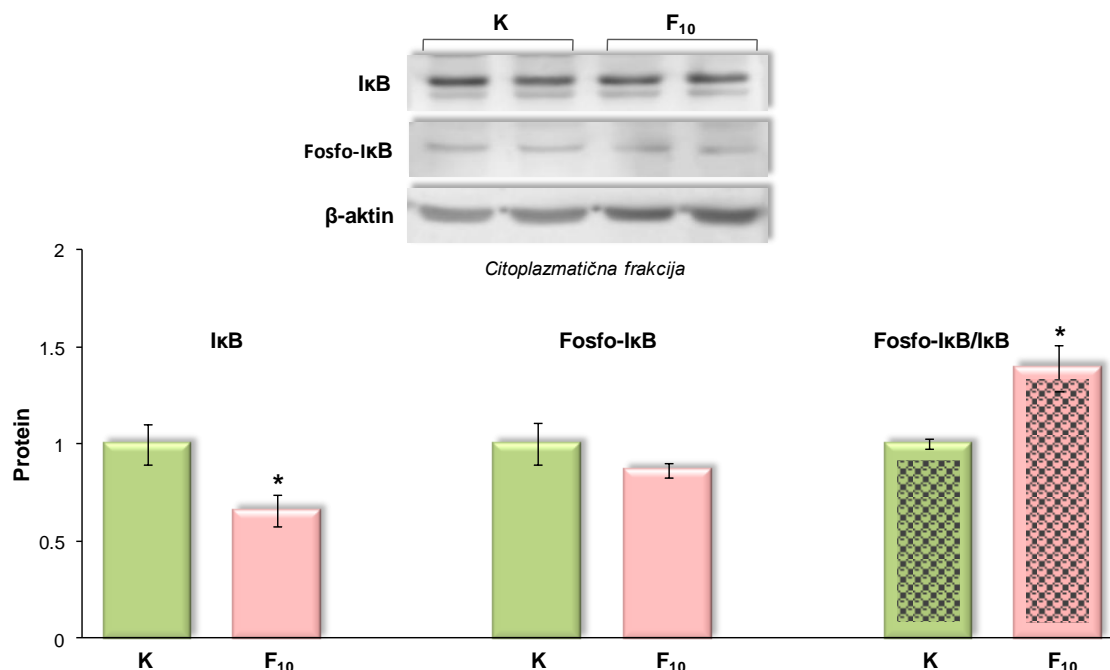
**Slika 4.16. Unutarćelijska distribucija proteina NFκB između citoplazmatične (A) i jedarne (B) frakcije ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi. β-Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju koncentracije proteina NFκB. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.6.2. Odnos između nivoa fosforilisane forme i ukupne koncentracije proteina IκB

Da bi se utvrdilo da li je povećana koncentracija proteina NFκB u citoplazmi ćelija jetre pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze u skladu sa njegovom aktivacijom, izmerena je koncentracija inhibitornog proteina IκB i nivo njegove fosforilacije. Uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije proteina IκB nakon tretmana (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.17.**), dok nivo njegove fosforilisane forme nije bio promenjen u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ipak, odnos koncentracije fosforilisane forme prema ukupnoj koncentraciji proteina IκB je

bio značajno povećan (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.17.**), što ukazuje da je u jetri pacova koji su pili 10% fruktozu stimulirana njeno degradacija u proteazomima.

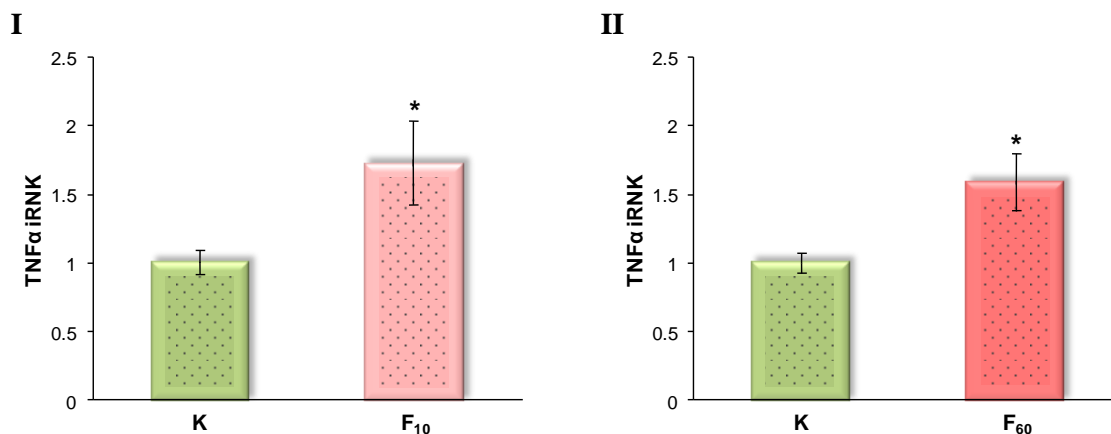


**Slika 4.17. Odnos između fosforilirane forme i ukupnog proteina IκB u citoplazmi ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi. β-Aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafik prikazuje relativnu kvantifikaciju nivoa proteina IκB i fosfo-IκB i njihov odnos. Rezultati su prikazani kao  $\bar{X} \pm SEM$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). K - odgovarajuća kontrola, F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

### 4.6.3. Koncentracija iRNK za TNFα

U skladu sa promenama u koncentracijama proteina NFκB nakon ishrane obogaćene fruktozom, nivo iRNK za proinflamatorni citokin TNFα je bio značajno povećan u hepatocitima jetre pacova koji su pili 10% (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.18.I**), odnosno 60% rastvor fruktoze (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.18.II**).

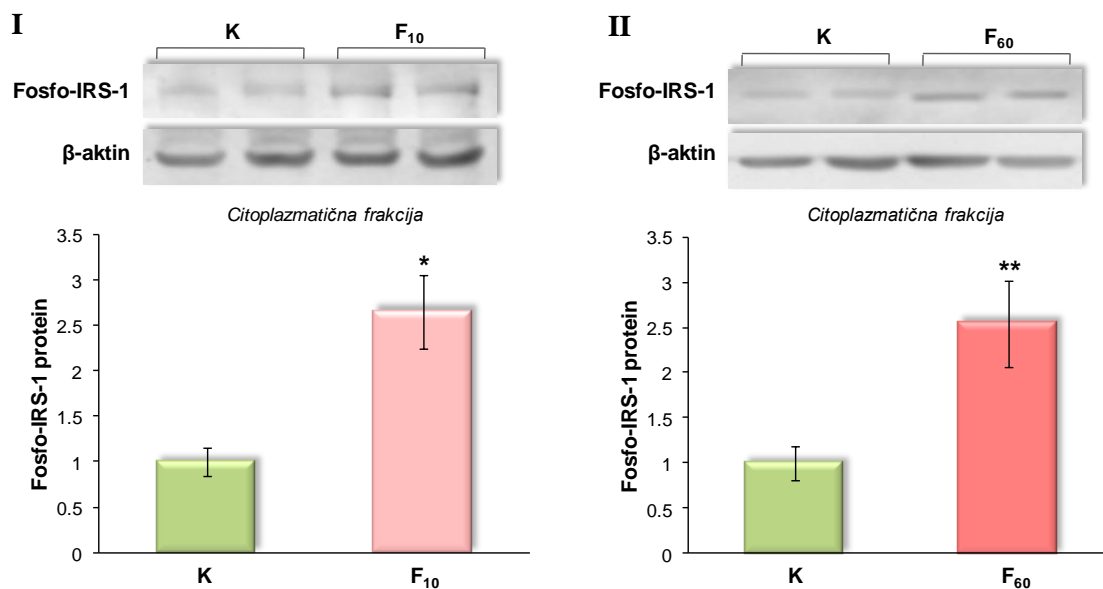


**Slika 4.18. Koncentracija iRNC za TNF $\alpha$  u jetri Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNC za Hprt1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.

#### 4.6.4. Nivo inhibitorne fosforilacije proteina IRS-1 na Ser<sup>307</sup>

Najčešća posledica inflamacije, kao i izmenjenog metabolizma glukokortikoida i lipogeneze u jetri je narušavanje insulinske osetljivosti. Da bi se ispitalo da li fruktoza utiče na insulinsku signalizaciju praćen je nivo inhibitorne fosforilacije proteina IRS-1 na Ser<sup>307</sup> u citoplazmi ćelija jetre eksperimentalnih životinja. Pokazano je da je koncentracija fosforilisane forme povećana kod životinja koje su pile 10% (\* $p < 0,05$ , **Slika 4.19.I**), odnosno 60% rastvor fruktoze (\*\* $p < 0,01$ , **Slika 4.19.II**) u odnosu na odgovarajuće kontrole.



**Slika 4.19. Koncentracija fosforilisane forme proteina IRS-1 na Ser<sup>307</sup> u citoplazmi ćelija jetre Wistar mužjaka nakon ishrane 10% (I) i 60% (II) rastvorom fruktoze.**

Na gornjem delu slike prikazani su reprezentativni *Western blot*-ovi.  $\beta$ -aktin je korišćen kao kontrola jednakog nanošenja proteina. Grafici prikazuju relativnu kvantifikaciju nivoa proteina fosfo-IRS-1. Rezultati su prikazani kao  $\bar{x} \pm SEM$  i izraženi kao promena u odnosu na srednju vrednost kontrola sa odgovarajućeg blota. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). K – odgovarajuća kontrola; F<sub>10</sub> - 10% fruktoza; F<sub>60</sub> - 60% fruktoza.



# **5. DISKUSIJA**

---



Metabolički sindrom obuhvata niz poremećaja kao što su gojaznost, insulinska rezistencija, dislipidemija, hiperglikemija i hipertenzija. Jedan od bitnih etioloških faktora u njegovom razvoju je ishrana obogaćena fruktozom, o čemu svedoči korelacija između povećane prevalence sindroma i upotrebe fruktoze u prehrambenoj industriji (Rutledge i Adeli, 2007).

Iako imaju istu hemijsku formulu ( $C_6H_{12}O_6$ ), metabolizam fruktoze se značajno razlikuje od metabolizma glukoze. Fruktozu iz krvotoka uglavnom preuzima jetra, nakon čega se ona brzo metaboliše i prevodi u glukozu, glikogen, laktat i lipide. Dugo je smatrano da je fruktoza pogodan šećer za ishranu dijabetičara zbog toga što ima mali efekat na povećanje koncentracije glukoze u krvi i što njen katabolizam ne zavisi od insulina. Iako su još 80-tih godina postojale sumnje da je fruktoza odgovorna za razvoj različitih metaboličkih poremećaja (Hallfrisch i sar., 1983; Hallfrisch i sar., 1986), ubedljivi dokazi za takve pretpostavke nisu postojali. Eksperimenti na pacovima su pokazali da dugotrajna ishrana fruktozom vodi razvoju hepatične (i ekstrahepatične) insulinske rezistencije, gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i visokog krvnog pritiska. Dokazi su manje uverljivi kod ljudi, ali je ipak uočena jasna veza između unosa velike količine fruktoze, s jedne strane, i dislipidemije i razvoja insulinske rezistencije u jetri, s druge. *De novo* lipogeneza i lipotoksičnost, oksidativni stres i hronična inflamacija niskog intenziteta su predloženi kao osnovni mehanizmi odgovorni za metaboličke poremećaje u jetri izazvane fruktozom (Tappy i Le, 2010).

Glukokortikoidni hormoni su važni regulatori energetskeg metabolizma koji deluju antagonistički u odnosu na insulin i mogu da doprinesu patofiziologiji metaboličkog sindroma. Metabolički efekti glukokortikoida se najčešće pripisuju povećanoj lokalnoj regeneraciji aktivnih oblika hormona u ciljnim tkivima, čiji je katalizator mikrozomalni enzim 11 $\beta$ HSD1, koji pripada familiji NADPH-zavisnih reduktaza i zavisi od aktivnosti

enzima H6PDH (Staab i Maser, 2010). Glukokortikoidi u jetri deluju kao važni modulatori glukoneogeneze, s obzirom da pozitivno regulišu ekspresiju gena za PEPCK, što može da utiče na glikemiju (Wang, 2005). Takođe, oni stimulišu sintezu DAG-a posredstvom lipina-1, što dovodi do povećanja koncentracije triglicerida i nastanka hepatosteatoze (Reue i Brindley, 2008). Glukokortikoidni hormoni imaju važnu ulogu i u regulaciji metaboličke inflamacije, putem inhibiranja sinteze citokina TNF $\alpha$  i IL-6, što ostvaruju putem negativne regulacije transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B (Staab i Maser, 2010).

Primenom različitih molekularno-bioloških i biohemijskih metoda u ovoj studiji je ispitana uloga glukokortikoida u ostvarivanju efekata ishrane obogaćene fruktozom na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma kod pacova. Posebna pažnja je posvećena morfološkoj i biohemijskoj karakterizaciji eksperimentalnog modela, ispitivanju prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, kao i analizi molekula koji su transkripciono regulisani GR-om i imaju važnu ulogu u regulaciji energetskeg metabolizma i inflamacije u jetri.

## **5.1. Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na morfološke i biohemijske parametre Wistar pacova**

Rezultati skorijih epidemioloških istraživanja su pokazali da unos velike količine fruktoze ima za posledicu pozitivan energetske bilans i može biti okidač za razvoj nekoliko ozbiljnih metaboličkih poremećaja, uključujući gojaznost, insulinsku rezistenciju i metabolički sindrom (Gross i sar., 2004; Havel, 2005). Promene u energetske balansu izazvane fruktozom su, pre svega, posledica povećanog unosa kalorija.

Životinje iz ove studije koje su pile rastvore fruktoze unosile su više tečnosti u odnosu na kontrolne životinje koje su pile vodu. To se može objasniti činjenicom da se životinje radije opredeljuju za konzumiranje rastvora fruktoze koji ima prijatan ukus i izuzetan hedonistički efekat (Moran, 2009). U isto vreme, pacovi koji su pili fruktozu unosili su manje hrane, što najverovatnije predstavlja kompenzatorni mehanizam kojim se

ograničava unos energije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koji ukazuju da ishrana obogaćena fruktozom smanjuje unos hrane, mada manje efikasno u odnosu na druge šećere poput glukoze ili saharoze (Lindqvist i sar., 2008; London i Castonguay, 2011).

Bez obzira na smanjen unos hrane, energetske unos pacova u našim eksperimentima je bio povećan zbog velikog unosa fruktoze, o čemu svedoči podatak da je energetske unos bio veći kod životinja koje su pile rastvor veće koncentracije fruktoze. Ključni regulator energetske homeostaze je adipokin leptin, čiji je nivo u našoj studiji bio povećan u plazmi pacova iz oba eksperimenta (Bursac i sar., 2013). Slični rezultati su dobijeni u studiji Shapiro i saradnika koji su hranili pacove 60% fruktozom (Shapiro i sar., 2008). S obzirom da hiperleptinemija nije u skladu sa povećanim energetske unosom, pretpostavljeno je da fruktoza inhibira prenos leptinskog signala i dovodi do razvoja rezistencije na leptin. Ova pretpostavka je potkrepljena rezultatima iz naše laboratorije koji pokazuju smanjenje koncentracije receptora za leptin u ćelijskom ekstraktu hipotalamusa pacova koji su hranjeni fruktozom (Bursac i sar., 2014). Ishrana fruktozom može da dovede i do razvoja lokalne leptinske rezistencije u jetri pacova zbog povećanja koncentracije SOCS-3 (eng. *supressor of cytokine signaling-3*) i smanjenja fosforilacije serinskih i treoninskih ostataka proteina koji učestvuju u leptinskom signalnom putu (Vila i sar., 2008). S obzirom da leptin u jetri učestvuje u mobilizaciji masnih kiselina i njihovom usmeravanju u proces  $\beta$ -oksidacije, razvoj hepatične leptinske rezistencije može doprineti patogenezi NAFLD-a nakon ishrane fruktozom (Vila i sar., 2008). Iz toga proizilazi da leptin može imati važnu ulogu u regulaciji energetske metabolizma u jetri i predstavlja dobrog kandidata za buduća istraživanja vezana za visokokalorijsku ishranu.

Razvoj leptinske rezistencije i povećan kalorijski unos su osnovni faktori koji dovode do gojaznosti. Ipak, efekti ishrane obogaćene fruktozom na telesnu masu su kontradiktorni kod različitih životinjskih modela (Kasim-Karakas i sar., 1996; D'Angelo i sar., 2005). U našim eksperimentima, pacovi hranjeni rastvorima fruktoze nisu imali povećanu težinu nakon 9 nedelja tretmana, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima su životinje konzumirale 10% rastvor fruktoze (Roglans i sar., 2007) ili 60%

fruktozu u hrani (Kelley i sar., 2004). Pretpostavka je da fruktoza dovodi do porasta telesne mase tek nakon dužeg vremenskog perioda. Primera radi, kada pacovi konzumiraju masnu hranu, nakon šestomesečne ishrane 60% fruktozom, dolazi najpre do razvoja leptinske rezistencije, a zatim i do visceralne gojaznosti i značajnog povećanja telesne mase (Shapiro i sar., 2008). Sa druge strane, ishrana fruktozom tokom kraćeg vremenskog perioda (3-6 nedelja) dovodi do hipertrigliceridemije i razvoja insulinske rezistencije, ali ne i do porasta telesne mase (Luo i sar., 1995; Axelsen i sar., 2010b).

U skladu sa nepromenjenom telesnom masom, kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze apsolutne i relativne mase jetre i masnog tkiva su bile nepromenjene. Odsustvo visceralne gojaznosti u ovom slučaju je najverovatnije rezultat aktivacije regulatornih mehanizama koji treba da ograniče posledice pozitivnog energetskeg bilansa. Naime, povećan unos kalorija može biti odgovoran za pokretanje inflamatornih procesa zbog nagomilavanja metabolita ugljenih hidrata i masnih kiselina (Havel, 2005). Razvoj inflamacije u masnom tkivu predstavlja lokalni povratni signal za potrošnju energije, koji sprečava rast i diferencijaciju adipocita. Lokalni odgovor može biti proširen oslobađanjem citokina i slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju, što podstiče potrošnju energije i na sistemskom nivou (Ye i Keller, 2010). Međutim, aktivacija ovih kompenzatornih mehanizama ima i negativnu stranu jer može da podstakne lipogenezu u jetri i razvoj insulinske rezistencije.

Rezultati iz naše laboratorije pokazali su da je u masnom tkivu pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze stimulisana lipoliza zbog intenzivne lokalne sinteze glukokortikoidnih hormona (Bursac i sar., 2013). Stimulisana lipoliza dovodi do povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju, što je u skladu sa rezultatima ove studije. Slobodne masne kiseline uglavnom preuzima jetra i koristi u procesu lipogeneze, što je u skladu sa značajnim povećanjem nivoa triglicerida u krvi pacova nakon ishrane 10% fruktozom. I drugi autori su pokazali da ishrana fruktozom iste koncentracije dovodi do povećanja slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji pacova i hrčaka (Yoshino i sar., 1992; Kasim-Karakas i sar., 1996). Dakle, fruktoza najverovatnije ne dovodi do gojaznosti *per se*, već menjajući energetske balans stimuliše lipogenezu i deponovanje masti u jetri.

Uočene morfološke promene kod životinja koje su konzumirale 60% rastvor fruktoze su ukazale da ishrana fruktozom veće koncentracije može da dovede do ozbiljnijih metaboličkih poremećaja. Naime, kod ovih životinja je došlo do povećanja mase visceralnog masnog tkiva, kao i mase ovog tkiva u odnosu na telesnu težinu, što ukazuje na postojanje visceralne gojaznosti. Pretpostavka je da kompenzatorni mehanizmi za potrošnju energije u ovom slučaju ne mogu da se izbore sa velikim energetske unosom, tako da dolazi do lipogeneze u masnom tkivu, odnosno hipertrofije i hiperplazije adipocita (Bursac i sar., 2014). Lipogeneza u masnom tkivu može da ograniči otpuštanje masnih kiselina u cirkulaciju, što je u saglasnosti sa njihovom nepromenjenom koncentracijom u plazmi pacova koji su pili 60% rastvor fruktoze. Pojava visceralne gojaznosti kod ovih životinja se može posmatrati i kao zaštitni mehanizam koji ograničava priliv slobodnih masnih kiselina u jetru i rasterećuje već uznapredovali proces *de novo* lipogeneze. Naime, nakon ishrane 60% fruktozom masa jetre nije bila promenjena, ali je bio povećan odnos mase jetre prema telesnoj težini, što je najverovatnije posledica intenzivne sinteze i nagomilavanja triglicerida (Kawasaki i sar., 2009). To je podržano intenzivnijim povećanjem koncentracije triglicerida u cirkulaciji u odnosu na porast izmeren kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji ukazuju na pojavu hiperlipidemije i ćelijskog stresa usled energetske disbalansa u jetri pacova koji su hranjeni 60% fruktozom (Kelley i sar., 2004).

Ishrana rastvorima fruktoze nije dovela do promene nivoa glukoze u cirkulaciji u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Ranije je pokazano da fruktoza zapravo ima mali uticaj na glikemiju (Foster-Powell i Miller, 1995), jer je stimulacija glukoneogeneze najverovatnije kompenzovana smanjenim intenzitetom glikogenolize. Na taj način se otpuštanje glukoze iz jetre, kao ni glikemija, ne menjaju značajno nakon ishrane fruktozom (Paquot i sar., 1996).

Nivo insulina u plazmi pacova iz ove studije nije bio promenjen što je u skladu sa činjenicom da su transport fruktoze u ćelije jetre i početne reakcije njenog katabolizma nezavisne od insulina (Tappy i Le, 2010). Zaman i saradnici su, takođe, pokazali da ishrana obogaćena fruktozom nakon 10 nedelja ne dovodi do promene koncentracije insulina kod

pacova (Zaman i sar., 2011). Ipak, lipogeni efekti fruktoze mogu biti uzrok razvoja insulinske rezistencije, koja se najčešće dovodi u vezu sa povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina u plazmi (Shulman, 2000). Kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze i kod kojih je bila podstaknuta lipoliza u masnom tkivu, rezultati IPGT testa su pokazali smanjenu toleranciju na glukozu. Sa druge strane, stimulirana lipogeneza u masnom tkivu je, po pravilu, povezana sa ograničenim oslobađanjem slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju i samim tim sa poboljšanom insulinskom osetljivošću, tako da su merenja kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze ukazala na odsustvo insulinske rezistencije na sistemskom nivou.

Na osnovu analize morfoloških i biohemijskih karakteristika Wistar pacova možemo zaključiti da dugotrajna ishrana fruktozom nije dovela do hiperglikemije, hiperinsulinemije, niti povećanja njihove telesne mase. Ipak, primena fruktoze veće koncentracije je bila uzrok razvoja visceralne gojaznosti, najverovatnije zbog velikog opterećenja energetskeg metabolizma. Nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji se takođe razlikovao u zavisnosti od primenjene koncentracije fruktoze i bio je u skladu sa promenama lipidnog metabolizma u masnom tkivu. Najuočljivija karakteristika životinja iz oba eksperimenta je bila povećana koncentracija triglicerida u krvi, što ide u prilog lipogenih svojstava fruktoze i ukazuje na intenzivnu *de novo* lipogeneze u jetri.

## **5.2. Metabolizam glukokortikoidnih hormona u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom**

Povećanje energetskeg unosa kod Wistar pacova tokom ishrane obogaćene fruktozom može dovesti do poremećaja energetskeg metabolizma, naročito u ćelijama jetre u kojima se fruktoza metaboliše. Glukokortikoidni hormoni učestvuju u regulaciji ključnih metaboličkih procesa i imaju izuzetno važnu ulogu u ovakvim, inače stresnim, uslovima za ćeliju. U centralnom nervnom sistemu, glukokortikoidi mogu direktno uticati na kalorijski unos jer stimulišu apetit delujući antagonistički u odnosu na insulin i leptin (Strack i sar., 1995; Schwartz i sar., 2000). Iako u perifernim tkivima glukokortikoidni hormoni imaju

prvenstveno kataboličku ulogu, u jetri dolaze do izražaja i njihova anabolička svojstva, s obzirom da stimulišu glukoneogenezu, sintezu triglicerida i sekreciju lipoproteina (Taskinen i sar., 1983; Nechushtan i sar., 1987; Dolinsky i sar., 2004).

Povećana akumulacija lipida u jetri predstavlja jednu od karakteristika metaboličkog sindroma i usko je povezana sa povećanim nivoom glukokortikoida (Lemke i sar., 2008; Li i sar., 2011). Brojne studije su pokazale da se pacijenti sa Kušingovim sindromom odlikuju visceralnom gojaznošću, dislipidemijom, insulinskom rezistencijom i hiperglikemijom (Bjorntorp i Rosmond, 2000). Ovi poremećaji su karakteristični i za brojne životinjske modele za proučavanje gojaznosti kod kojih je stimulisana sinteza glukokortikoida (Livingstone i sar., 2000). Ipak, metabolički sindrom se ne karakteriše povećanim nivoom glukokortikoida u cirkulaciji, što je u saglasnosti sa našim rezultatima, već tkivno-specifičnim promenama na nivou njihovog prereceptorskog metabolizma (Wang, 2005).

Jedan od glavnih zadataka ove studije je bio da se odredi da li ishrana obogaćena fruktozom utiče na regeneraciju i signalni put glukokortikoida u jetri, procese koji se mogu nalaziti u osnovi razvoja ključnih karakteristika metaboličkog sindroma, uključujući hiperglikemiju i insulinsku rezistenciju. Dobijeni rezultati su pokazali da fruktoza, nezavisno od primenjene koncentracije, dovodi do povećanja koncentracije proteina 11 $\beta$ HSD1 u mikrozomima jetre, dok transkripcija gena za 11 $\beta$ HSD1 ostaje nepromenjena nakon tretmana. Prethodna istraživanja su pokazala da je glavna posledica povećanja koncentracije 11 $\beta$ HSD1 stimulisana sinteza lipida i smanjena insulinska osetljivost (Atanasov i Odermatt, 2007), s obzirom da 11 $\beta$ HSD1 transgeni miševi razvijaju rezistenciju na insulin, postaju dislipidemični, ali ne i gojazni (Paterson i sar., 2004). Novija studija je upotrebom selektivnih inhibitora pokazala da 11 $\beta$ HSD1 može da ima direktan uticaj na prenos insulinskog signala putem učešća u transrepresiji gena za IRS-1 i inhibitornoj fosforilaciji njegovog proteinskog produkta u skeletnim mišićima (Morgan i sar., 2009). Ipak, Lavery i saradnici nisu uočili značajne metaboličke promene kod miševa deficijentnih za hepatični 11 $\beta$ HSD1 nakon ishrane obogaćene mastima što ukazuje da povećana regeneracija glukokortikoida u jetri nije ključni događaj u razvoju karakteristika

metaboličkog sindroma, kao što su hiperglikemija i poremećaj lipidne homeostaze u jetri (Lavery i sar., 2012).

Smatra se da se aktivnost i ekspresija enzima 11 $\beta$ HSD1, kao i 5 $\alpha$ - i 5 $\beta$ -reduktaza, mogu prilagoditi nutritivnom statusu, što ide u prilog hipotezi da prereceptorski metabolizam glukokortikoida zavisi od načina ishrane (Johnstone i sar., 2004). Na primer, mnoge studije su pokazale da su enzimska aktivnost, kao i nivo iRNK za 11 $\beta$ HSD1 smanjeni, dok je aktivnost 5 $\alpha$ -reduktaza povećana u jetri gojaznih ljudi (Livingstone i sar., 2000; Stimson i Walker, 2007) i *ob/ob* miševa<sup>8</sup> (Liu i sar., 2003), što ukazuje da je smanjen nivo aktivnih glukokortikoida karakterističan za gojazni fenotip. Suprotno gojaznim miševima, životinjski modeli za proučavanje insulinske rezistencije imaju povećan nivo iRNK za 11 $\beta$ HSD1 u jetri (Aoki i sar., 2001) što je praćeno povećanjem nivoa proteina i iRNK za GR (Liu i sar., 2005). Iz tih rezultata proizilazi da je razvoj insulinske rezistencije povezan sa stimulisanim prereceptorskim metabolizmom glukokortikoida. Sa druge strane, hranjenje Wistar pacova 16% rastvorom fruktoze tokom 24h vodi ka povećanju nivoa proteina i iRNK za 11 $\beta$ HSD1, dok produžetak istog tretmana na jednu nedelju dovodi do smanjenja nivoa ovog enzima, kao i nivoa H6PDH (London i Castonguay, 2011). Smanjen prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri nakon jednonedeljne ishrane fruktozom može biti način adaptacije organizma na visok energetske unos (Drake i sar., 2005) i najverovatnije predstavlja kompenzatorni mehanizam koji ograničava razvoj metaboličkih poremećaja povezanih sa gojaznošću (Alberts i sar., 2005). Produžena ishrana fruktozom primenjena u našoj studiji, koja dovodi do povećanja kalorijskog unosa, koncentracije triglicerida u cirkulaciji i pokretanja inflamatornih procesa, može predstavljati preveliko opterećenje u metaboličkom smislu koje pomera ravnotežu ka povećanju enzimske aktivnosti 11 $\beta$ HSD1 (Ahmed i sar., 2012). Ovakvo stanje se odlikuje stimulisanom *de novo* lipogenezom i akumulacijom masti u jetri (Ahmed i sar., 2012) kao i smanjenom insulinskom osetljivošću (Drake i sar., 2005), što ukazuje na kompleksnu ulogu enzima 11 $\beta$ HSD1 u metaboličkim procesima u jetri. Ova pretpostavka je potkrepljena rezultatima istraživanja koji ukazuju da inhibicija 11 $\beta$ HSD1 može da smanji nivo triglicerida u plazmi

<sup>8</sup> *ob/ob* miševi – miševi koji imaju mutaciju u genu za leptin i odlikuju se nekontrolisanim unosom hrane.



pacova na visokokalorijskoj dijeti (Berthiaume i sar., 2007), dok je njegova povećana ekspresija u jetri praćena razvojem insulinske rezistencije i dislipidemije (Paterson i sar., 2004). S obzirom da je većina ovih poremećaja primećena i u našim eksperimentima kod pacova hranjenih fruktozom, možemo pretpostaviti da stimulisan prereceptorski metabolizam glukokortikoida može pojačati efekte ishrane obogaćene fruktozom na lipogenezu i insulinski signalni put u jetri.

Pored metaboličke, 11 $\beta$ HSD1 ima važnu funkciju i u regulaciji anti-inflamatornih svojstava glukokortikoida (Ignatova i sar., 2009). Nekoliko studija je pokazalo da je ekspresija 11 $\beta$ HSD1, kao i oksidoreduktazna aktivnost ovog enzima, pozitivno regulisana citokinima TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u različitim tipovima ćelija, uključujući hepatocite, adipocite i mezenhimske ćelije (Escher i sar., 1997; Tomlinson i sar., 2001; Ignatova i sar., 2009). Još uvek nije poznat tačan mehanizam kojim inflamacija pokreće transkripciju gena za 11 $\beta$ HSD1. Mogući kandidat je transkripcioni regulator C/EBP (eng. *CCAAT/enhancer-binding protein*), jer učestvuje u regulaciji ekspresije velikog broja gena uključenih u metabolizam glukokortikoida. Dodatno, C/EBP- $\alpha$  *knock-out* miševi imaju smanjen nivo enzima 11 $\beta$ HSD1 u jetri (Williams i sar., 2000). Ignatova i saradnici su pokazali da C/EBP- $\alpha$  i - $\beta$  regulišu transkripciju gena za 11 $\beta$ HSD1 u normalnim fiziološkim uslovima, dok C/EBP- $\beta$  učestvuje u stimulaciji njegove ekspresije u HepG2 ćelijama nakon tretmana citokinom TNF $\alpha$  (Ignatova i sar., 2009). Pored toga, TNF $\alpha$  može uticati na nivo 11 $\beta$ HSD1 putem aktivacije AP-1, transkripcionog regulatora koji učestvuje u akutno-faznom inflamatornom odgovoru (Iwasaki i sar., 2008). Aktivacija enzima 11 $\beta$ HSD1 pokrenuta citokinima se može smatrati važnim regulatornim mehanizmom koji ograničava inflamaciju jer vodi stimulaciji sinteze aktivnih glukokortikoida koji imaju izraženo anti-inflamatorno dejstvo. Međutim, novije studije su pokazale da nakon stimulisane ekspresije 11 $\beta$ HSD1 od strane TNF $\alpha$  može doći do pojačanog oslobađanja proinflamatornih medijatora, dok selektivna inhibicija enzima ima suprotan efekat (Ishii-Yonemoto i sar., 2010). Ovakvi rezultati su doveli do postavljanja intrigantne hipoteze prema kojoj bi stimulisan prereceptorski metabolizam glukokortikoida mogao delovati u pravcu aktivacije proinflamatornih procesa. Da bi se objasnila ova paradoksalna situacija

potrebno je imati u vidu razliku između farmakoloških doza egzogenih glukokortikoida koji suprimiraju akutnu inflamaciju i fiziološkog nivoa endogenih hormona koji ostvaruju dejstvo na hroničnu inflamaciju niskog intenziteta, karakterističnu za metabolički sindrom (Saklatvala, 2002). Na primer, pokazano je da glukokortikoidi u makrofagima i adipocitima mogu pokrenuti ekspresiju proinflamatornih citokina, kao što su osteopontin (Wang i sar., 2000) i MIF (Calandra i sar., 1995; Velickovic i sar., 2013), ili da povećan nivo enzima 11 $\beta$ HSD1 u preadipocitima može pojačati lučenje citokina TNF $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  (Ishii i sar., 2007; Ishii-Yonemoto i sar., 2010). Ipak, pretpostavlja se da povećan nivo 11 $\beta$ HSD1 ne može da izazove inflamaciju *per se*, već samo da pojača prethodno uspostavljeno proinflamatorno stanje (Ishii-Yonemoto i sar., 2010). Povećana koncentracija 11 $\beta$ HSD1 u našoj studiji je najverovatnije posledica uznapredovalih inflamatornih procesa, jer povišena koncentracija iRNK za TNF $\alpha$  korelira sa nivoom proteina 11 $\beta$ HSD1 u mikrozomima. Imajući u vidu kompleksnost njegovog delovanja, 11 $\beta$ HSD1 se može smatrati ključnim proteinom preko koga se ostvaruje interakcija između metabolizma glukokortikoida i inflamacije, kao i insulinskog signalnog puta nakon ishrane obogaćene fruktozom.

Povećanje koncentracije proteina 11 $\beta$ HSD1 u ovoj studiji nije bilo praćeno povećanom koncentracijom kortikosterona u jetri nakon ishrane fruktozom, čak je uočena tendencija smanjenja nivoa hormona kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da regeneracija aktivnih glukokortikoida više zavisi od enzimske aktivnosti nego od količine proteina ili iRNK za 11 $\beta$ HSD1. Takođe, visokokalorijska ishrana često dovodi do povećane aktivnosti 11 $\beta$ HSD1 u masnom tkivu, dok je ona smanjena u jetri, što rezultira tkivno-specifičnom promenom nivoa aktivnih glukokortikoida (Livingstone i sar., 2000; Czegle i sar., 2008). Porast koncentracije kortikosterona u masnom tkivu je uočen i na našem eksperimentalnom modelu (Bursac i sar., 2013). Ključni faktor koji određuje aktivnost enzima i smer reakcije koju katalizuje 11 $\beta$ HSD1 je odnos između kofaktora NADPH/NADP<sup>+</sup> u ćeliji (Dzykanchuk i sar., 2009). Ovaj odnos je dinamičan, zavisi od reduktazne aktivnosti enzima H6PDH i posredstvom pentozo-fosfatnog puta je u direktnoj korelaciji sa načinom ishrane, oksidativnim statusom i energetskim potrebama organizma (London i sar., 2007; Czegle i sar., 2012). U našoj

studiji je koncentracija iRNK za H6PDH nakon ishrane 60% fruktozom bila smanjena, što može rezultirati smanjenjem dostupnosti kofaktora i stimulacijom dehidrogenazne aktivnosti 11 $\beta$ HSD1. Sa druge strane, koncentracija proteina H6PDH u jetri je bila značajno povećana kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze, ali to takođe nije praćeno povećanim nivoom kortikosterona u jetri. U tom slučaju je moguće da sintetisani NADPH bude iskorišćen za sintezu masnih kiselina ili u drugim metaboličkim procesima, pre nego za reduktaznu aktivnost 11HSD1.

Nepromenjen nivo kortikosterona u jetri pacova hranjenih fruktozom može biti posledica ravnoteže između njegove sinteze i klirensa koji katalizuju 5 $\alpha$ - i 5 $\beta$ -reduktaze (Seckl i Walker, 2001). Dakle, povećana aktivnost reduktaza može stimulisati razlaganje glukokortikoida do odgovarajućih metabolita i na taj način kompenzovati aktivnost enzima 11 $\beta$ HSD1. Ova pretpostavka je podržana studijama koje su pokazale da je aktivnost reduktaza u jetri povećana kod gojaznih ljudi i glodara, što je praćeno povećanim izlučivanjem glukokortikoidnih metabolita (Andrew i sar., 1998; Livingstone i sar., 2005). Takođe, *knock-out* miševi sa inaktiviranim genom za 5 $\alpha$ -reduktazu imaju hiperglikemiju i masnu jetru (Livingstone, 2008). Najviše zastupljeni metaboliti glukokortikoida koji nastaju aktivnošću 5 $\alpha$ -reduktaza kod pacova su 5 $\alpha$ -dihidro- i 5 $\alpha$ -tetrahidro-kortikosteron (Nixon i sar., 2012). Zanimljivo je da ovi metaboliti imaju anti-inflamatorna svojstva i ograničavaju lučenje proinflamatornih citokina, mada manje efikasno od glukokortikoida (Yang, 2009). Pored toga, oni se mogu vezati za GR, ali ne mogu dovesti do njegove dimerizacije niti transaktivacije gena čija je ekspresija regulisana glukokortikoidima, poput PEPCK-a i I $\kappa$ B $\alpha$  (Yang, 2009; (McInnes i sar., 2004). Uočeno je i da ovi metaboliti imaju inhibitorno dejstvo na sintezu kortikosterona na sistemskom nivou kod glodara, najverovatnije putem negativne povratne sprege (McInnes i sar., 2004; Yang i sar., 2011). Dakle, imajući u vidu ulogu glukokortikoidnih hormona u metaboličkim procesima, moguće je da njihov povećan klirens predstavlja adaptivni mehanizam u jetri pacova hranjenih fruktozom, kako bi se tkivo zaštitilo od prevelikog kalorijskog unosa i poremećaja energetskog metabolizma.

Sledeći korak u metabolizmu glukokortikoida je aktivacija GR-a, koja je praćena njegovom translokacijom u jedro i stimulacijom ili inhibicijom transkripcije brojnih gena.

Kada se analizira unutarćelijska distribucija GR-a u našoj studiji, uočava se da je koncentracija proteina GR-a povećana u citoplazmatičnoj frakciji jetre životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze, odnosno smanjena nakon ishrane 60% fruktozom. Nasuprot tome, koncentracija iRNK za GR nije bila promenjena. Nivo iRNK ne mora da bude u korelaciji sa koncentracijom proteina GR u citoplazmi, s obzirom da ona zavisi i od intenziteta proteinske sinteze i/ili degradacije (Guo i sar., 2008). Takođe, nivo proteina GR može zavisiti od aktivacije proinflamatornog medijatora NF $\kappa$ B, jer je poznato da on interferira sa translokacijom GR-a iz citoplazme u jedro (Adcock i Caramori, 2001; Velickovic i sar., 2013). Međutim, bez obzira na vrstu tretmana, koncentracija receptora je bila nepromenjena u jedrima, što ukazuje na odsustvo njegove aktivacije i u saglasnosti je sa nepromenjenom koncentracijom kortikosterona.

Važan ciljni gen koji je transkripciono regulisan GR-om je gen za PEPCK koji kodira ključni enzim glukoneogeneze (Cassuto i sar., 2005). U ovoj studiji je pokazano da je koncentracija iRNK za PEPCK smanjena kod pacova hranjenih 10% fruktozom, dok je nepromenjena kod životinja koje su pile 60% fruktozu. To je u saglasnosti sa izostankom aktivacije GR-a, kao i sa nepromenjenom glikemijom. Takođe, ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su uočili da je nivo iRNK za PEPCK nepromenjen ili smanjen nakon ishrane fruktozom (Roglans i sar., 2007; Axelsen i sar., 2010a). Pretpostavlja se da smanjenje koncentracije iRNK za PEPCK može biti posledica povećanog nivoa citokina TNF $\alpha$  u jetri koji inhibira ekspresiju gena za PEPCK (Feingold i sar., 2012).

Rezultati diskutovani u ovom poglavlju ukazuju da ishrana obogaćena fruktozom, bez obzira na primenjenu koncentraciju, dovodi do promena na nivou enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, koje nisu praćene promenama koncentracije kortikosterona, niti aktivacijom GR-a. Na osnovu toga može se zaključiti da ishrana obogaćena fruktozom ne menja prenos glukokortikoidnog signala. Iako ishrana fruktozom ne menja glukokortikoidnu signalnu kaskadu u jetri, ona ima snažan efekat na procese regulisane glukokortikoidima u masnom tkivu. Ovi rezultati su u saglasnosti sa zapažanjem Lavery-a i saradnika da je metabolizam glukokortikoida fleksibilniji u ekstrahepatičnim

tkivima i da ima veći uticaj na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma (Lavery i sar., 2012). Ograničena aktivacija glukokortikoida u jetri najverovatnije predstavlja adaptivni mehanizam koji štiti osetljivost ćelija na insulin kako bi se održao normalan nivo glukoze i triglicerida u krvi pod pritiskom velikog energetskeg unosa.

### 5.3. Metabolizam lipida u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom

Rezultati prvih studija uticaja ishrane obogaćene fruktozom na metabolizam lipida su pokazali da fruktoza povećava nivo triglicerida u krvi zdravih osoba, kao i pacijenata sa insulinskom rezistencijom i dijabetesom tipa 2 (Crapo i Kolterman, 1984; Bantle i sar., 1986). Kasnije je potvrđeno da je fruktoza lipogeni šećer i da tokom njene razgradnje u jetri nastaju triofo-fosfati, prekursori glicerola i masnih kiselina koje se esterifikuju i ulaze u sastav VLDL-a (Chong i sar., 2007; Parks i sar., 2008). Pored toga što utiče na dislipidemiju, fruktoza stimuliše i ektopičnu<sup>9</sup> akumulaciju masti u ćelijama jetre, što vodi razvoju NAFLD-a (Unger, 2003). Rezultati brojnih studija na ljudima i pacovima su pokazali da slobodne masne kiseline iz masnog tkiva čine značajan udeo (oko 60%) prekursora za sintezu triglicerida u jetri (Lewis i sar., 2002; Donnelly i sar., 2005). S druge strane, u normalnim fiziološkim uslovima, udeo masnih kiselina poreklom iz *de novo* lipogeneze u jetri je manji od 5% (Diraison i Beylot, 1998), ali se značajno povećava prilikom velikog energetskeg unosa i narušene energetske ravnoteže (Postic i Girard, 2008).

Prilikom histološke analize jetre životinja iz ove studije, nije uočeno nagomilavanje masti u hepatocitama, bez obzira na koncentraciju fruktoze prisutne u ishrani. Mogući razlog može biti nepodesan uzorak tkiva koji je uzet za histološku analizu jer jetra pokazuje zonalnu organizaciju kada je u pitanju proces *de novo* lipogeneze (Guzman i Castro, 1989). Takođe, smatra se da morfološkim promenama prethode promene na molekularnom nivou,

<sup>9</sup> Ektopična akumulacija masti – nagomilavanje triglicerida van ćelija masnog tkiva, najčešće u citoplazmi hepatocita, mišićnih i endokrinih ćelija.

koje mogu narušiti regulaciju osnovnih procesa lipidnog metabolizma (Janevski i sar., 2012).

Kao što je već navedeno, povećan ulazak fruktoze u jetru može dovesti do pokretanja *de novo* lipogeneze u kojoj centralnu ulogu ima transkripcioni regulator SREBP-1c. Ishrana 10% rastvorom fruktoze nije uticala na njegovu aktivaciju u jetri pacova iz ove studije, što je bilo u skladu sa nepromenjenim nivoom insulina u plazmi i koncentracijom proteina PPAR $\alpha$  u jedrima. Naši rezultati ne isključuju mogućnost da se u jetri ovih životinja ipak odvija neki od koraka *de novo* lipogeneze. Naime, u ovoj studiji je koncentracija iRNK za FAS bila povećana (**Slika 5.1.A**), što nije u skladu sa nepromenjenom koncentracijom proteina SREBP-1c u jedru. To je u saglasnosti sa rezultatima studije Janevski i saradnika koji su pokazali da ishrana fruktozom dovodi do povećanja ekspresije gena za ACC, FAS i ChREBP, dok nivo iRNK za SREBP-1c ostaje nepromenjen (Janevski i sar., 2012). Upotrebom *antisense* oligonuleotida je dokazano da ChREBP ima ključnu ulogu u usmeravanju fruktoznih metabolita u trigliceride (Erion i sar., 2013), tako da povećanje nivoa iRNK za FAS može biti posledica specifične aktivacije ovog transkripcionog regulatora.

Pored *de novo* sinteze masnih kiselina, jetra intenzivno preuzima slobodne masne kiseline oslobođene tokom lipolize u masnom tkivu pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze (**Slika 5.1.A**) (Fabbrini i sar., 2009; Bursac i sar., 2013). U zavisnosti od energetskog statusa i metaboličke ravnoteže, preuzete masne kiseline se mogu esterifikovati sa glicerol-3-fosfatom što dalje vodi sintezi triglicerida ili mogu biti oksidovane u mitohondrijama pri čemu se oslobađa energija (Bechmann i sar., 2012). Fiziološki smisao oba procesa je sprečavanje akumulacije slobodnih masnih kiselina koja je osnovni uzrok razvoja lipotoksičnosti u jetri (Neuschwander-Tetri, 2010). Jedan od najvažnijih enzima uključenih u sintezu triglicerida je lipin-1, čija je translokacija u mikrozone povezana sa pokretanjem njegove PAP enzimske aktivnosti, a regulisana je nivoom slobodnih masnih kiselina (Hopewell i sar., 1985; Bou Khalil i sar., 2009). U mikrozomalnoj frakciji ćelija jetre pacova iz prvog eksperimenta koncentracija lipina-1 je bila povećana (**Slika 5.1.A**), što ukazuje na intenzivnu sintezu DAG-a nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze. Ovo je u

skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da je nivo DAG-a povećan u mišićima životinja koje su hranjene fruktozom (Donnelly i sar., 1994), kao i sa značajnom akumulacijom ceramida i DAG-a u jetri pacova hranjenih fruktozom (Vila i sar., 2008). Povećanje koncentracije DAG-a može dovesti do aktivacije PKC, koja dalje fosforiliše IRS-1 na Ser<sup>307</sup>, sprečava aktivaciju PI3K i dalji prenos insulinskog signala (Yu i sar., 2002). Dakle, može se zaključiti da je PAP aktivnost lipina-1 ključna u razvoju insulinske rezistencije u jetri, preko stimulacije sinteze lipidnih intermedijera i posledične inhibitorne fosforilacije proteina IRS-1. Treba napomenuti da intenzivna sinteza triglicerida nije praćena samo njihovim deponovanjem u jetri, već i sekrecijom u formi VLDL-a (**Slika 5.1.A**), što je u skladu sa hipertrigliceridemijom uočenom kod životinja iz ovog eksperimenta. Novija istraživanja su pokazala da za razliku od akumulacije lipidnih metabolita tokom *de novo* lipogeneze, deponovanje masti u jetri usled smanjene sekrecije triglicerida nije povezano sa razvojem insulinske rezistencije, što ukazuje da se masti koje ulaze u sastav VLDL-a nalaze u posebnom ćelijskom pulu koji ne utiče na prenos insulinskog signala (Minehira i sar., 2008).

Pored povećane koncentracije lipina-1 u mikrozomima, kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze uočeno je povećanje njegove koncentracije i u jedarnoj frakciji. To može ukazivati da je pored sinteze triglicerida u jetri ovih životinja aktivirana i  $\beta$ -oksidacija u mitohondrijama (Harris i Finck, 2011). Naime, pokazano je da mutacije u genu za lipin-1 dovode do razvoja steatoze u jetri, smanjene  $\beta$ -oksidacije i hiperlipidemije (Reue, 2009). Lipin-1 pokreće razgradnju masnih kiselina do acetil-CoA tako što gradi interaktivni kompleks sa transkripcionim regulatorima i koaktivatorima, od kojih je najpoznatiji nuklearni receptor PPAR $\alpha$  (Finck i sar., 2006; Moreno i sar., 2010). Uloga PPAR $\alpha$  u regulaciji mitohondrijalne  $\beta$ -oksidacije je pokazana u mnogim životinjskim modelima nakon visokokalorijske ishrane (Ye i sar., 2001; Roglans i sar., 2007). Osnovni ligand za PPAR $\alpha$  su slobodne masne kiseline. Novije studije ukazuju da ulogu senzora nivoa masnih kiselina u cirkulaciji zapravo ima PPAR $\delta$ , dok aktivacija proteina PPAR $\alpha$  zavisi od nivoa masnih kiselina sintetisanih tokom *de novo* lipogeneze u jetri (Sanderson i sar., 2009). Takođe, transkripciona aktivnost PPAR $\alpha$  je regulisana fosforilacijom od strane kinaza MAPK i

AMPK (eng. *AMP-activated protein kinase*) (Shalev i sar., 1996; Leff, 2003), što ukazuje da posttranslacione modifikacije imaju važnu ulogu u regulaciji transkripcije gena koji učestvuju u  $\beta$ -oksidaciji.

Iako je koncentracija slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji bila povišena, nije uočena promena u nivou proteina PPAR $\alpha$  u citoplazmi, niti u jedrima pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze. Slično našim rezultatima, studija Roglans i saradnika je pokazala da je nivo proteina PPAR $\alpha$  nepromenjen u jetri pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze tokom 5 nedelja. Štaviše, kod ovih životinja je uočeno smanjenje koncentracije iRNK za PPAR $\alpha$ , njegove transaktivacione i transrepresivne aktivnosti, kao i intenziteta  $\beta$ -oksidacije (Roglans i sar., 2007). Smanjenje oksidativnih procesa je jedan od indikatora mitohondrijalne disfunkcije koja je povezana sa ektopičnom akumulacijom masti, razvojem steatoze i insulinske rezistencije (Petersen i sar., 2003; Qatanani i Lazar, 2007). Ipak, ovakvi rezultati su paradoksalni jer inhibicija oksidacije u mitohondrijama nije u saglasnosti sa povećanjem nivoa reaktivnih vrsta kiseonika koje je karakteristično za ishranu fruktozom (Tappy, 2012). Zbog toga možemo pretpostaviti da se u početnim fazama narušavanja energetske ravnoteže odvija  $\beta$ -oksidacija kao vrsta adaptivnog mehanizma na intenzivan priliv masnih kiselina iz cirkulacije. To je u skladu sa rezultatima iz naše laboratorije koji pokazuju da je u jetri životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze povećan nivo proteina za dismutazu 2 superoksida (SOD2). Naime, SOD2 uklanja superoksid anjon radikale koji nastaju u procesu oksidativne fosforilacije, što podržava tvrdnju da je proces  $\beta$ -oksidacije stimulisan nakon ovog režima ishrane.

Pretpostavka da je u jetri pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze stimulisana  $\beta$ -oksidacija podržana je povećanom koncentracijom proteina PGC-1 u jedarnoj frakciji. Naime, PGC-1 je ključni koaktivator za ostvarivanje transkripcione aktivnosti jedarnog receptora PPAR $\alpha$ . U prisustvu liganda, PPAR $\alpha$  se vezuje za N-terminalni kraj PGC-1, što vodi acetilaciji hromatina i smanjenju njegove kondenzacije (Onate i sar., 1995; Gelman i sar., 1999; Heinlein i sar., 1999). Neophodnost interakcije proteina PPAR $\alpha$  i PGC-1 za transkripcionu aktivaciju PPAR $\alpha$  je dokazana u PGC-1 *knock-out* miševima kod kojih ne dolazi do transaktivacije gena uključenih u mitohondrijalnu  $\beta$ -oksidaciju (Lin i sar., 2005).

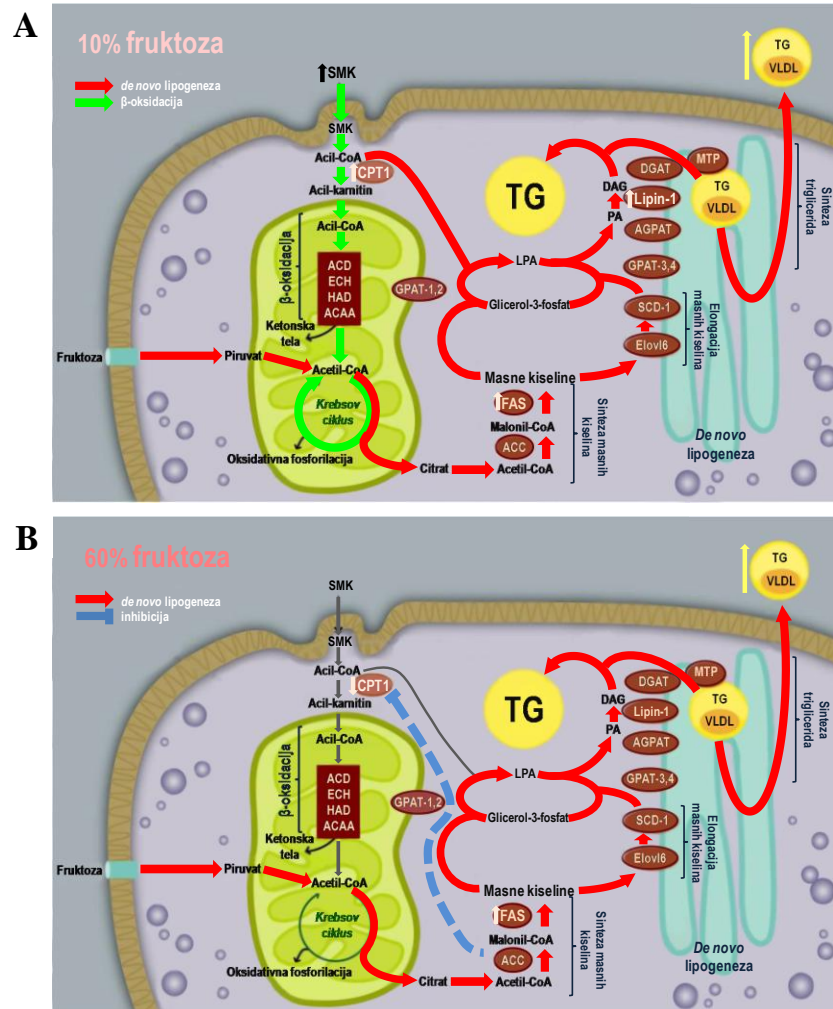


Pored toga što ima ulogu u regulaciji biogeneze mitohondrija i oksidacije masnih kiselina, PGC-1 učestvuje u glukoneogenezi i lipogenezi zahvaljujući interakciji sa širokim spektrom transkripcionih regulatora (Fernandez-Marcos i Auwerx, 2011). Zbog toga bi povećan nivo proteina PGC-1 mogao imati ključnu ulogu u sprovođenju efekata ishrane obogaćene fruktozom na oksidaciju masnih kiselina, razvoj hiperlipidemije i insulinske rezistencije (Sugden i sar., 2010).

Iako PGC-1 može da pokrene transkripciju sopstvenog gena u skladu sa nutritivnim statusom, najvažniji nivo regulacije njegove ekspresije su posttranslacione modifikacije poput reverzibilne acetilacije, fosforilacije i metilacije (Moreno i sar., 2010; Fernandez-Marcos i Auwerx, 2011). Primera radi, SIRT1 pokreće transkripcionu aktivnost PPAR $\alpha$  putem deacetilacije PGC-1, ali nema uticaja na formiranje kompleksa PPAR $\alpha$ -PGC-1-lipin-1. U jetri SIRT1 *knock-out* životinja PGC-1 se vezuje za PPAR $\alpha$ , ali ostaje acetilovan i ne može da pokrene transkripciju gena koji učestvuju u  $\beta$ -oksidaciji (Purushotham i sar., 2009). Fosforilacije putem kinaza MAPK i AMPK takođe mogu da stabilizuju aktivnu formu PGC-1 (Puigserver i sar., 2001; Irrcher i sar., 2009). S druge strane, fosforilacija pomoću kinaze Akt, uključene u prenos insulinskog signala, direktno inhibira PGC-1 i formiranje transkripcionog kompleksa (Li i sar., 2007). Iz ovoga proizilazi da je fina regulacija kooperativnog delovanja brojnih regulatora, koaktivatora i korepresora, osnovni faktor koji određuje nivo transkripcije gena regulisanih receptorom PPAR $\alpha$ .

Nakon formiranja aktivnog kompleksa, PPAR $\alpha$  pokreće ekspresiju gena za CPT1, MCAD (eng. *medium-chain acil-CoA dehydrogenase*), peroksizomalnu acil-CoA oksidazu i druge enzime uključene u proces oksidacije masnih kiselina (Sugden i sar., 2010). U prilog stimulisane transkripcione aktivnosti PPAR $\alpha$  u našoj studiji ide i povećanje koncentracije proteina CPT1 kod životinja koje su pile 10% fruktozu (**Slika 5.1.A**). Naime, CPT1 je ključni enzim koji omogućava transport slobodnih masnih kiselina u mitohondrije i preko koga se održava ravnoteža između  $\beta$ -oksidacije i *de novo* lipogeneze (Munday, 2002).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da se u jetri pacova nakon ishrane 10% rastvorom fruktoze paralelno odvijaju procesi  $\beta$ -oksidacije i sinteze triglicerida, što može predstavljati zaštitni mehanizam čiji je smisao očuvanje metaboličkih procesa u jetri od citotoksičnog delovanja slobodnih masnih kiselina i intermedijera lipidnog metabolizma.



**Slika 5.1. Razlike u metabolizmu lipida u jetri Wistar pacova nakon ishrane rastvorima fruktoze različite koncentracije.**

**A** – ishrana 10% rastvorom fruktoze dovodi do intenzivne *de novo* sinteze masnih kiselina ( $\uparrow$  FAS) i triglicerida ( $\uparrow$  lipin-1). U isto vreme, iz cirkulacije preuzete slobodne masne kiseline ulaze u proces mitohondrijalne  $\beta$ -oksidacije ( $\uparrow$  CPT1) pri čemu se oslobađa energija ili se esterifikuju sa glicerol-3-fosfatom što vodi sintezi triglicerida. **B** – ishrana 60% rastvorom fruktoze stimuliše *de novo* lipogenezu ( $\uparrow$  FAS), dok je  $\beta$ -oksidacija inhibirana intermedijerima sinteze masnih kiselina u jetri ( $\downarrow$  CPT1) i odsustvom priliva slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije. Oba rastvora fruktoze dovode do povećanja koncentracije triglicerida u krvi.

Za razliku od 10% rastvora, ishrana 60% fruktozom je dovela do značajnog povećanja koncentracije proteina SREBP-1 u jedarnoj frakciji jetre pacova. Miyazaki i saradnici su takođe pokazali da ishrana 60% fruktozom dovodi do aktivacije SREBP-1, kao i do stimulacije ekspresije gena za FAS, ACC i SCD u jetri miševa (Miyazaki i sar., 2004). Ekspresija gena za SREBP-1c je pod kontrolom nutritivnog statusa, koncentracije insulina, LXR i mnogih drugih faktora (Cagen i sar., 2005). Iako precizan mehanizam koji pokreće njegovu transkripciju još uvek nije poznat, poznato je da zasićene masne kiseline povećavaju nivo proteina SREBP-1c, najverovatnije putem aktivacije inflamatornih procesa u jetri (Shimano, 2009). Leclercq i saradnici su pokazali da proinflamatorni citokin TNF $\alpha$  može da aktivira SREBP-1c, što rezultira povećanom *de novo* sintezom masnih kiselina (Leclercq i sar., 2007). Iako je ekspresija gena za SREBP-1c stimulisana insulinom, primena streptozotocina<sup>10</sup>, koji prekida prenos insulinskog signala, može da dovede do povećanja nivoa SREBP-1c prilikom ishrane glukozom, fruktozom i saharozom. Iz toga proizilazi da lipogeneza u jetri može biti nezavisna od insulina prilikom povećanog unosa fruktoze (Matsuzaka i sar., 2004). Mogući posrednik u pokretanju lipogeneze prilikom razvoja insulinske rezistencije je proteinska tirozin fosfataza 1B (PTP1B) (Shimizu i sar., 2003). Kod pacova hranjenih fruktozom koji su rezistentni na insulin uočena je korelacija u nivou ekspresije PTP1B i iRNK za SREBP-1c (Nagai i sar., 2002).

Najvažniji enzim *de novo* lipogeneze čija je transkripcija pod kontrolom SREBP-1c je FAS. Ishrana fruktozom može dvojako da utiče na njegovu ekspresiju, stimulacijom transkripcije odgovarajućeg gena i povećanjem stabilnosti iRNK (Katsurada i sar., 1990). Rezultati ove studije su pokazali da je koncentracija iRNK za FAS u skladu sa koncentracijom SREBP-1c, odnosno da je povećana kod pacova koji su pili 60% rastvor fruktoze (**Slika 5.1.B**). To je u saglasnosti sa rezultatima studije Janevski i saradnika koji su uočili povećan nivo proteina SREBP-1, iRNK za FAS i ACC u jetri nakon 28 dana hranjenja pacova 60% fruktozom (Janevski i sar., 2012). Zanimljivo je da pored transaktivacije gena uključenih u *de novo* sintezu masnih kiselina, SREBP-1c reguliše i sintezu triglicerida, kao i njihovo deponovanje u hepatocitima (Shimano i sar., 1997;

<sup>10</sup> Streptozotocin – organsko jedinjenje koje se zbog toksičnog efekta na  $\beta$  ćelije pankreasa koristi za indukovanje dijabetesa kod eksperimentalnih životinja.

Yahagi i sar., 2002). Za razliku od nivoa ovog transkripcionog regulatora, mikrozomalna koncentracija lipina-1, koja je povezana sa stimulacijom sinteze prekursora triglicerida, nije bila promenjena u jetri pacova koji su pili 60% fruktozu. To je u skladu sa nepromenjenom koncentracijom slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, koje su glavni okidač za translokaciju lipina-1 u mikrozome, za razliku od produkata *de novo* sinteze masnih kiselina koje imaju mali uticaj na ovaj proces. Izostanak efekta 60% fruktoze na sistemski nivo masnih kiselina se može objasniti stimulisanom lipogenezom u masnom tkivu koja ograničava oslobađanje slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju (Bursac i sar., 2014). Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da 60% fruktoza pokreće razvoj steatoze putem stimulacije ekspresije SREBP-1c i *de novo* sinteze masnih kiselina u jetri (Stanhope i Havel, 2008).

Lipidni intermedijeri koji nastaju tokom intenzivne sinteze masnih kiselina su potentni inhibitori  $\beta$ -oksidacije u mitohondrijama. To je potvrđeno značajno smanjenom koncentracijom proteina CPT1 u ćelijama jetre pacova koji su pili 60% fruktozu (**Slika 5.1.B**), dok su koncentracije lipina-1 i koaktivatora PGC-1 u jedarnoj frakciji bile nepromenjene. Usled smanjene aktivnosti CPT1, transport slobodnih masnih kiselina u mitohondrije je ograničen, tako da je esterifikacija i sinteza triglicerida dominantan metabolički put kojim se uklanja višak masnih kiselina tokom povišenog kalorijskog unosa (Akkaoui i sar., 2009).

Uprkos smanjenom intenzitetu oksidacije masnih kiselina, koncentracija proteina PPAR $\alpha$  je bila povećana u jedarnoj frakciji jetre pacova koji su pili 60% fruktozu. To se može objasniti kompleksnom ulogom ovog nuklearnog receptora u metabolizmu lipida (Rakhshandehroo i sar., 2009). Pokazano je da primena PPAR $\alpha$  aktivatora stimuliše ne samo transkripciju gena koji su uključeni u  $\beta$ -oksidaciju, već i gena koji učestvuju u *de novo* lipogenezi (Knight i sar., 2005). Kod PPAR $\alpha$  *knock-out* miševa nivo iRNK za SREBP-1c je smanjen (Patel i sar., 2001), dok je kod PPAR $\alpha$  deficijentnih životinja neophodna veća koncentracija insulina za pokretanje transkripcije gena za SREBP-1c i FAS (Sugden i sar., 2002). PPAR $\alpha$  može na dva načina da aktivira SREBP-1c, stimulacijom proteolize proteina do aktivne forme (Knight i sar., 2005) i pokretanjem

transkripcije gena za SREBP-1c nakon vezivanja za regulatorne sekvence u okviru promotora (Fernandez-Alvarez i sar., 2011). Povećana aktivnost SREBP-1c dovodi do promene unutarćelijskog pula lipida nezavisno od influksa masnih kiselina, što dovodi do povećanja zasićenih i polizasićenih masnih kiselina, eikozanoida i fosfolipida koji predstavljaju ligande jedarnog receptora PPAR $\alpha$  (Forman i sar., 1997; Krey i sar., 1997). Sličan mehanizam pozitivne povratne sprege postoji i u regulaciji ekspresije gena za FAS, koja je stimulisama proteinom PPAR $\alpha$  (Chakravarthy i sar., 2009). Zbog toga PPAR $\alpha$  funkcionise kao senzor energetske ravnoteže koji može da odgovori na povećan nivo masnih kiselina tako što stimuliše njihovo uklanjanje, bilo putem  $\beta$ -oksidacije ili putem *de novo* lipogeneze. U ovoj studiji ishrana pacova obogaćena 60% fruktozom je dovela do aktivacije PPAR $\alpha$  i do stimulacije *de novo* sinteze masnih kiselina, dok je putem negativne povratne sprege inhibirana  $\beta$ -oksidacija što je uzrok nagomilavanja lipida u hepatocitima.

Iz predstavljenih rezultata se može zaključiti da su primenjeni rastvori fruktoze u ovoj studiji imali različite efekte na metabolizam lipida u jetri pacova (**Slika 5.1.**). Ishrana 10% rastvorom fruktoze je stimulisala sintezu triglicerida, ali i  $\beta$ -oksidaciju kao vrstu adaptivnog mehanizma na povećan nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. S druge strane, 60% fruktoza je bila veliko energetske opterećenje za metaboličke procese u jetri, što je dovelo do intenzivne *de novo* lipogeneze i pogoršanja lipidnog profila tkiva. S obzirom da je nivo kortikosterona u jetri bio nepromenjen, uticaj fruktoze na lipidni metabolizam najverovatnije nije bio posredovan glukokortikoidima. Eksperimenti na transgenim miševima koji imaju povećan nivo 11 $\beta$ HSD1 i dislipidemiju ukazuju na učešće ovog enzima u metabolizmu triglicerida (Masuzaki i sar., 2001; Paterson i sar., 2004). Takođe, uočeno je da upotreba specifičnih inhibitora 11 $\beta$ HSD značajno poboljšava lipidni profil kod više životinjskih modela (Wang i sar., 2006; Berthiaume i sar., 2007), dok mutacije u genu za 11 $\beta$ HSD1 stimulišu ekspresiju gena koji učestvuju u oksidaciji masnih kiselina (Morton i sar., 2001). Takođe, tretman glukokortikoidima u izolovanim hepatocitima dovodi do povećane sinteze i akumulacije triglicerida, kao i sinteze i sekrecije VLDL-a (Cole i sar., 1982; Giudetti i Gnoni, 1998). Ipak, u ovoj studiji nije uočena direktna veza između izmenjenog prereceptorskog metabolizma glukokortikoida i

metabolizma masti u jetri. S druge strane, regeneracija kortikosterona u visceralnom masnom tkivu bi mogla da utiče na lipogenezu u jetri putem regulacije lipolitičnih procesa koji određuju nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. To je u skladu sa hipotezom Lavery i saradnika da regeneracija glukokortikoida u jetri nije ključna za metaboličke poremećaje, dok je metabolizam glukokortikoida u masnom tkivu povezan sa razvojem karakteristika metaboličkog sindroma (Lavery i sar., 2012).

#### **5.4. Metabolička inflamacija i razvoj insulinske rezistencije u jetri nakon ishrane obogaćene fruktozom**

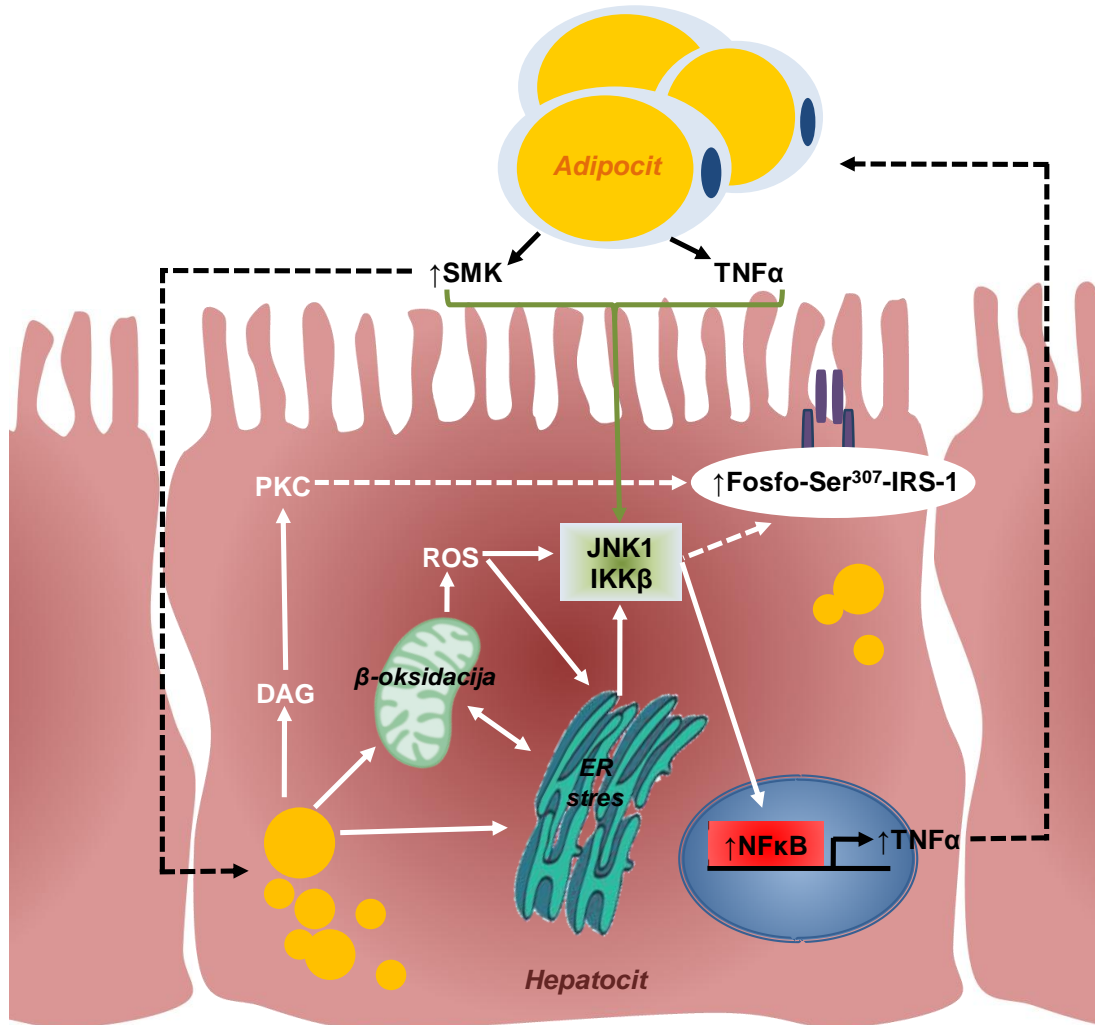
Ishrana obogaćena fruktozom je još od ranije poznata kao faktor koji pokreće razvoj hronične inflamacije niskog intenziteta i narušava insulinsku signalnu kaskadu, što uslovljava kompenzatornu hiperinsulinemiju i pojavu insulinske rezistencije (Rutledge i Adeli, 2007; Ruiz-Nunez i sar., 2013). Jetra je ključni organ u razvoju metaboličke inflamacije i pojavi insulinske rezistencije, jer se u njoj odvija većina procesa vezanih za energetske metabolizam (Rutledge i Adeli, 2007).

Razvoj inflamacije u jetri može biti posledica povećanog oslobađanja citokina i slobodnih masnih kiselina iz hipertrofiranog masnog tkiva (**Slika 5.2.**) (Solinas i Karin, 2010). Takođe, fruktoza može da stimuliše rast bakterija u tankom crevu i apsorpciju njihovih endotoksina (lipopolisaharida) iz portalnog krvotoka (Thuy i sar., 2008). Lipopolisaharidi i slobodne masne kiseline zatim pokreću proinflamatorni signalni put preko receptora TLR-4 (eng. *Toll-like receptor 4*) na površini hepatocita i Kupferovih ćelija, što vodi sintezi citokina TNF $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  (Kawai i Akira, 2007; Rivera i sar., 2007). Inflamacija može biti i posledica poremećenog energetskog metabolizma u jetri, što može biti uzrok nagomilavanja metabolita masti i ugljenih hidrata, reaktivnih vrsta kiseonika i razvoja stresa endoplazmatičnog retikuluma (**Slika 5.2.**). Zbog toga se inflamacija smatra događajem, koji prethodi razvoju insulinske rezistencije i doprinosi progresiji NAFLD-a (Bizeau i Pagliassotti, 2005; Nomura i Yamanouchi, 2012).

Razvoj metaboličke inflamacije kod životinja iz ove studije je potvrđen aktivacijom proinflamatornog transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B, o kojoj svedoči povećanje nivoa transkripciono aktivne subjedinice p65 u jedarnoj frakciji ćelija jetre pacova koji su pili rastvore fruktoze. Aktivacija NF $\kappa$ B je u skladu sa nepromenjenim nivoom kortikosterona, odnosno sa odsustvom aktivacije GR-a i anti-inflamatorne signalne kaskade. U slučaju životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze protein NF $\kappa$ B je bio povećan i u citoplazmatičnoj frakciji jetre, što ukazuje na povećanu sintezu proteina. Aktivacija NF $\kappa$ B je potvrđena značajnim smanjenjem koncentracije I $\kappa$ B u citoplazmi ćelija jetre pacova koji su pili 10% fruktozu, kao i povećanim odnosom fosforilisanе prema nefosforilisanoj formi I $\kappa$ B, što ukazuje na stimulisanu degradaciju inhibitornog proteina (Velickovic i sar., 2013). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su ukazali na aktivaciju proteina NF $\kappa$ B u jetri pacova nakon konzumiranja 10% rastvora fruktoze (Roglans i sar., 2007) ili hrčaka nakon ishrane 60% fruktozom (Tsai i sar., 2009). Ipak, precizan mehanizam koji dovodi do aktivacije transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B nakon ishrane fruktozom još uvek nije jasan. Moguće je da povećan oksidativni stres nakon ishrane obogaćene 10% fruktozom, odnosno stimulisani metabolizam masti i nagomilavanje triglicerida u jetri pacova hranjenih 60% rastvorom fruktoze dovode do sinteze metabolita koji stimulišu IKK $\beta$  (Gloire i sar., 2006; Lumeng i Saltiel, 2011), uzvodnu kinazu NF $\kappa$ B proinflamatornog signalnog puta.

Proinflamatorne kinaze JNK1 i IKK $\beta$  su mesta ukrštanja metaboličke inflamacije i insulinskog signalnog puta, jer sinergistička aktivacija ovih kinaza dovodi do razvoja metaboličke inflamacije i inhibicije prenosa insulinskog signala. Postoje brojni signali koji dovode do aktivacije signalnih puteva JNK1 i IKK $\beta$ . Tako, povećan ulazak slobodnih masnih kiselina u jetru stimuliše  $\beta$ -oksidaciju u mitohondrijama i dovodi do razvoja oksidativnog stresa (Brose i Rosenmund, 2002; Dekker i sar., 2010). Jedan od signalnih molekula koji nastaje kao posledica oksidativnog stresa je azot-monoksid (NO, eng. *nitric oxide*) (Sugita i sar., 2005). Mehanizam dejstva NO na insulinski signalni put u jetri podrazumeva smanjenje aktivnosti Akt kinaze putem S-nitrozilacije specifičnih cisteinskih ostataka (Yasukawa i sar., 2005). Novija istraživanja su pokazala da kod *knock-out* miševa

za NO sintazu ne dolazi do promene nivoa fosforilacije I $\kappa$ B, aktivacije NF $\kappa$ B, niti povećanja koncentracije TNF $\alpha$  u jetri nakon ishrane fruktozom (Spruss i sar., 2011).



**Slika 5.2. Mogući mehanizmi razvoja insulinske rezistencije u jetri.**

Slobodne masne kiseline i TNF $\alpha$  oslobođeni iz masnog tkiva aktiviraju proinflatorne signalne puteve JNK1 i IKK $\beta$  koji vrše inhibitornu fosforilaciju na Serinu<sup>307</sup> IRS-1. Pomenute kinaze aktiviraju transkripcijski regulator NF $\kappa$ B, što rezultira povećanom transkripcijom gena za citokine i pogoršanjem inflamatornog stanja. Inflamacija može biti posledica poremećenog energetskog metabolizma koji se odvija u jetri i uzrok je nagomilavanja metabolita masti, reaktivnih vrsta kiseonika i razvoja stresa endoplazmatičnog retikuluma. SMK – slobodne masne kiseline; ROS – reaktivne vrste kiseonika; ER – endoplazmatični retikulum.



Povećan unos kalorija i poremećen energetska metabolizam su praćeni povećanom sintezom intermedijera lipidnog metabolizma, DAG i ceramida, koji mogu da stupe u direktnu interakciju sa JNK1 i IKK $\beta$ , kao i sa kinazom PKC, što vodi razvoju metaboličke inflamacije i inhibicije prenosa insulinskog signala (**Slika 5.2.**) (Brose i Rosenmund, 2002; Dekker i sar., 2010). Slobodne masne kiseline mogu i direktno da aktiviraju NF $\kappa$ B u ćelijama jetre jer pokreću translokaciju proteina Bax u lizosome. Destabilizovani lizozomi zatim otpuštaju cistein proteazu, katepsin B, u citoplazmu i aktiviraju kinazu IKK $\beta$  (Feldstein i sar., 2004). Poremećen energetska metabolizam je praćen ne samo nagomilavanjem triglicerida, već i povećanom sintezom proteina koja može dovesti do stresa endoplazmatskog retikuluma (Wei i sar., 2006). Novije studije su pokazale da endoplazmatski stres može da aktivira kinazu JNK1 (**Slika 5.2.**), kao i da smanji translaciju I $\kappa$ B i stimuliše NF $\kappa$ B signalni put (Su i sar., 2009; Logue i sar., 2013). Dakle, proinflamatorni signalni putevi su usko povezani sa lipogenim procesima u jetri i najčešći ishod njihovog udruženog delovanja je narušavanje prenosa insulinskog signala u hepatocitima i razvoj insulinske rezistencije.

Eksperimenti na genetički modifikovanim miševima su pokazali da aktivacija NF $\kappa$ B u jetri dovodi do razvoja insulinske rezistencije, dok je kod životinja sa inhibiranom aktivnošću NF $\kappa$ B osetljivost na insulin bila očuvana (Arkan i sar., 2005; Cai i sar., 2005). Glavni medijator u razvoju insulinske rezistencije je kinaza IKK $\beta$ , što je podržano studijama koje su pokazale da se miševi koji ekspimiraju samo jednu kopiju gena za IKK $\beta$  odlikuju poboljšanom insulinskom osetljivošću (Yuan i sar., 2001). Razvoj insulinske rezistencije u jetri, koja nastaje kao posledica aktivacije transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B, je praćen povećanom ekspresijom gena za TNF $\alpha$ , IL-6 i IL-1 (**Slika 5.2.**) (Lazar, 2006). Proinflamatorni citokini oslobođeni iz hepatocita mogu delovati parakrino i stimulisati lokalni razvoj insulinske rezistencije, dok je njihov efekat na druga tkiva zanemarljiv u odnosu na efekat citokina iz mijeloidnih ćelija (Rohl i sar., 2004; Arkan i sar., 2005).

Uočeni razvoj inflamacije je potvrđen povećanjem koncentracije iRNK za TNF $\alpha$  u jetri pacova koji su pili rastvore fruktoze. I druge studije su pokazale da se nakon ishrane obogaćene fruktozom povećava njegova koncentracija u plazmi, kao i nivo iRNK u jetri

miševa (Spruss i sar., 2009; Haub i sar., 2010). Eksperimenti na životinjskim modelima za ispitivanje gojaznosti su pokazali da TNF $\alpha$  ima važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije (Uysal i sar., 1997). Primena neutrališućih antitela za TNF $\alpha$  kod pacova koji su konzumirali masnu hranu pozitivno utiče na inflamaciju u jetri, steatozu i insulinski signalni put (Barbuio i sar., 2007). Dodatno, nivo TNF $\alpha$  u jetri pozitivno koreliše sa stepenom oštećenja tkiva kod pacijenata sa NAFLD-om, kao i sa razvojem dijabetesa tipa 2 (Crespo i sar., 2001; Manco i sar., 2007).

Na molekularnom nivou, TNF $\alpha$  i slobodne masne kiseline dovode do insulinske rezistencije putem inhibitorne fosforilacije serina na IRS-1 (**Slika 5.2.**) (Paz i sar., 1997). U našoj studiji je nivo fosforilacije IRS-1 na Ser<sup>307</sup> u jetri životinja koje su pile rastvore fruktoze bio povećan, naročito nakon ishrane 60% fruktozom. Ove rezultate podržavaju studije drugih autora koji su ukazali na ulogu inflamacije u narušavanju insulinskog signalnog puta u jetri gojaznih pacova (Hotamisligil i sar., 1993) ili životinja koje su hranjene fruktozom ili mastima (Boden i sar., 2005; Dekker i sar., 2010). Aktivacija signalnog puta NF $\kappa$ B i povećan nivo TNF $\alpha$  utiču na razvoj insulinske rezistencije u jetri aktivacijom proinflamatorne kinaze JNK1 (Hotamisligil, 2006). Brojne studije su pokazale da ishrana fruktozom i oksidativni stres mogu pokrenuti njenu aktivaciju (Kelley i sar., 2004; Wei i Pagliassotti, 2004). Akutna izloženost kultivisanih ćelija jetre pacova rastvoru fruktoze dovodi do aktivacije JNK, povećanja nivoa fosforilacije na Ser<sup>307</sup> i smanjenja stimulatorne fosforilacije na tirozinu proteina IRS-1, dok primena inhibitora kinaze JNK poboljšava osetljivost na insulin (Wei i Pagliassotti, 2004). Ipak, akutna primena fruktoze *in vivo* ili na hepatocyte u kulturi ne dovodi do razvoja insulinske rezistencije, niti povećane sinteze VLDL partikula (Taghibiglou i sar., 2000). To ukazuje da su bar neki efekti fruktoze indirektni i zahtevaju hroničnu aktivaciju proinflamatornih signalnih puteva. Sa druge strane, hranjenje mužjaka pacova fruktozom tokom 2 nedelje dovodi do aktivacije JNK1, pojave oksidativnog stresa, hipertrigliceridemije i insulinske rezistencije (Kelley i sar., 2004). Zbog toga je pretpostavljeno da akutna primena fruktoze može da aktivira kinazu JNK1, ali tek njena hronična upotreba može da dovede do povećanja nivoa

slobodnih masnih kiselina i inflamacije niskog intenziteta, što kumulativno vodi razvoju insulinske rezistencije.

Iako stepen metaboličkih poremećaja u jetri nakon ishrane fruktozom zavisi od primenjene koncentracije i trajanja tretmana, može se zaključiti da aktivacija proinflamatornih signalnih puteva predstavlja ranu i jednu od najvažnijih posledica poremećene energetske ravnoteže. Kod Wistar pacova iz ove studije ishrana fruktozom je dovela do razvoja metaboličke inflamacije u jetri, koja se karakteriše aktivacijom transkripcionog regulatora NF $\kappa$ B i povećanom ekspresijom TNF $\alpha$ , što je u skladu sa nepromenjenim signalnim putem glukokortikoida. Primećene promene na nivou prereptorskog metabolizma glukokortikoida najverovatnije predstavljaju posledicu uznapredovalih inflamatornih procesa, s obzirom da citokin TNF $\alpha$  ima stimulatívni efekat na ekspresiju gena za 11 $\beta$ HSD1. Kao krajnji rezultat razvoja inflamacije i povećane koncentracije 11 $\beta$ HSD1 dolazi do razvoja insulinske rezistencije u jetri, što je potvrđeno povećanjem nivoa inhibitorne fosforilacije koja narušava prenos insulinskog signala nizvodno od receptora.



## **6. ZAKLJUČCI**

---

Polazna hipoteza ove studije je bila da glukokortikoidni hormoni u jetri posreduju u ostvarivanju efekata ishrane obogaćene fruktozom na poremećaje energetskeg metabolizma. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci koji podržavaju testiranu hipotezu:

1. Dugotrajna ishrana Wistar pacova 10% rastvorom fruktoze dovodi do pojave hipertrigliceridemije i povećanog nivoa slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, što nije praćeno promenama u koncentraciji glukoze i insulina, niti povećanjem telesne mase. Apsolutne i relativne mase jetre i visceralnog masnog tkiva su takođe bile nepromenjene. Odsustvo visceralne gojaznosti kod ovih životinja je najverovatnije rezultat aktivacije regulatornih mehanizama koji ograničavaju posledice povećanog energetskeg unosa.

2. Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze utiče na prereceptorski metabolizam glukokortikoida u jetri pacova, o čemu svedoči povećana koncentracija proteina H6PDH i 11 $\beta$ HSD1. Te promene nisu praćene povećanjem nivoa kortikosterona u jetri, što je verovatno posledica aktivnosti  $\alpha$ -reduktaza koje povećavaju klirens glukokortikoida. U skladu sa nepromenjenim nivoom glukokortikoida nije stimulisana aktivacija, niti prelazak GR-a u jedro, dok je ekspresija njegovog ciljnog gena, gena za PEPCCK, smanjena.

3. Metabolizam lipida u jetri pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze se karakteriše povećanom ekspresijom enzima uljučenih u sintezu triglicerida, ali i stimulisanom  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina u mitohondrijama, što može predstavljati mehanizam očuvanja metaboličkih procesa u jetri prilikom povećanog priliva slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije.

4. Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovodi do razvoja metaboličke inflamacije u jetri pacova, što se ogleda u stimulisanoj aktivaciji NF $\kappa$ B i povećanoj ekspresiji gena za TNF $\alpha$ . Povećan nivo TNF $\alpha$  stimuliše negativnu fosforilaciju na Ser<sup>307</sup> IRS-1, koja narušava prenos insulinskog signala nizvodno od receptora i ukazuje na početnu fazu razvoja insulinske rezistencije. Prema rezultatima IPGT testa, razvoj lokalne insulinske rezistencije u jetri ovih životinja praćen je i smanjenjem insulinske osetljivosti na sistemskom nivou.

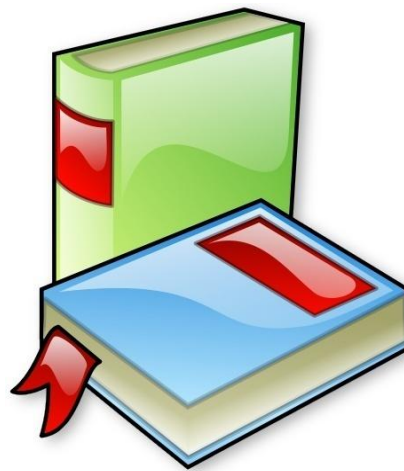
5. Kod životinja koje su hranjene 60% rastvorom fruktoze uočena je hipertrigliceridemija, ali bez promene u nivou slobodnih masnih kiselina, glukoze i insulina u cirkulaciji. Iako telesna masa nije bila izmenjena, 60% fruktoza je dovela do razvoja visceralne gojaznosti, što je posledica velikog kalorijskog unosa i opterećenja energetskog metabolizma ovakvim režimom ishrane.

6. Slično efektima 10% fruktoze, ishrana obogaćena 60% fruktozom dovodi do promena na nivou prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, koje nisu praćene povećanom lokalnom regeneracijom aktivnih glukokortikoida, aktivacijom GR-a, niti transkripcionom aktivacijom njegovog ciljnog gena, gena za PEPCK.

7. Ishrana 60% rastvorom fruktoze rezultira povećanom ekspresijom SREBP-1c i FAS-a i smanjenom koncentracijom CPT1, što ukazuje na stimulisanu *de novo* lipogenezu i inhibiranu  $\beta$ -oksidaciju u jetri pacova. Ti rezultati su u skladu sa intenzivnijim povećanjem nivoa triglicerida u cirkulaciji u odnosu na pacove koji su pili fruktozu niže koncentracije.

8. Kao i prilikom konzumiranja 10% fruktoze, kod pacova koji su pili 60% rastvor fruktoze došlo je do razvoja metaboličke inflamacije u jetri, koja se neometano razvija u uslovima kada glukokortikoidna signalizacija nije pojačana. Kao rezultat aktiviranih proinflamatornih signalnih puteva i *de novo* lipogeneze dolazi do izraženog narušavanja insulinske signalizacije, što je potvrđeno povećanjem nivoa inhibitorne fosforilacije IRS-1.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do promena na nivou prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, što je najverovatnije posledica razvoja metaboličke inflamacije. Te promene nisu praćene regeneracijom aktivnih glukokortikoida u jetri, niti aktivacijom glukokortikoidnog receptora. Nepromenjen signalni put glukokortikoida predstavlja adaptivni mehanizam koji ima zadatak da očuva normalan nivo glukoze u krvi pod uslovima povećanog energetskeg unosa. Metabolizam lipida u jetri je nivo na kome se najviše odražavaju razlike u količini fruktoze prisutne u ishrani i taj efekat najverovatnije nije posredovan glukokortikoidnim hormonima. U uslovima stimulisane sinteze triglicerida, izražene dislipidemije, hronične inflamacije i narušene insulinske osetljivosti koji nastaju kao posledica dugotrajne ishrane fruktozom, metabolizam glukokortikoida u jetri se može posmatrati kao deo regulatornog miljea koji posreduje između povećanog energetskeg unosa i metaboličkih zahteva organizma.



# 7. LITERATURA

---



- Abdulla MH, Sattar MA, Abdullah NA, Hye Khan MA, Anand Swarup KR & Johns EJ. The contribution of alpha1B-adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose-fed Sprague-Dawley rats. *Eur J Nutr.* 2011; 50. 251-260.
- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z & Wakil SJ. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102. 12011-12016.
- Adcock IM & Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79. 376-384.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R & White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem.* 2000; 275. 9047-9054.
- Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, Brown C, Guest P, Bujalska IJ, Doig C, Newsome PN, Hubscher S, Elias E, Adams DH, Tomlinson JW & Stewart PM. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2012; 7. e29531.
- Ahmed MH & Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today.* 2007; 12. 740-747.
- Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, Lenoir V, Sournac M, Girard J & Prip-Buus C. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J.* 2009; 420. 429-438.
- Alberts P, Ronquist-Nii Y, Larsson C, Klingstrom G, Engblom L, Edling N, Lidell V, Berg I, Edlund PO, Ashkzari M, Sahaf N, Norling S, Berggren V, Bergdahl K, Forsgren M & Abrahamson L. Effect of high-fat diet on KKAY and ob/ob mouse liver and adipose tissue corticosterone and 11-dehydrocorticosterone concentrations. *Horm Metab Res.* 2005; 37. 402-407.
- Andersen CL, Jensen JL & Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64. 5245-5250.
- Andrew R, Phillips DI & Walker BR. Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83. 1806-1809.
- Aoki K, Homma M, Hirano T, Oka K, Satoh S, Mukasa K, Ito S & Sekihara H. mRNA and enzyme activity of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are elevated in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci.* 2001; 69. 2543-2549.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J & Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2005; 11. 191-198.
- Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A & Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88. 5593-5602.
- Atanasov AG & Odermatt A. Readjusting the glucocorticoid balance: an opportunity for modulators of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2007; 7. 125-140.
- Axelsen LN, Lademann JB, Petersen JS, Holstein-Rathlou NH, Ploug T, Prats C, Pedersen HD & Kjolbye AL. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with

- severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010a; 298. R1560-1570.
- Axelsen LN, Pedersen HD, Petersen JS, Holstein-Rathlou NH & Kjolbye AL. Metabolic and cardiac changes in high cholesterol-fructose-fed rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010b; 61. 292-296.
- Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R & Senesi S. Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2004; 279. 27017-27021.
- Banke NH, Wende AR, Leone TC, O'Donnell JM, Abel ED, Kelly DP & Lewandowski ED. Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPARalpha. *Circ Res.* 2010; 107. 233-241.
- Bantle JP, Laine DC & Thomas JW. Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. *JAMA.* 1986; 256. 3241-3246.
- Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ & Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol.* 2007; 194. 539-550.
- Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J.* 2006a; 27. 413-426.
- Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol.* 2006b; 148. 245-254.
- Bar-On H & Stein Y. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J Nutr.* 1968; 94. 95-105.
- Basciano H, Federico L & Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond).* 2005; 2. 5.
- Beato M & Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev.* 1996; 17. 587-609.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M & Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol.* 2012; 56. 952-964.
- Berthiaume M, Laplante M, Festuccia WT, Cianflone K, Turcotte LP, Joanisse DR, Olivecrona G, Thieringer R & Deshaies Y. 11beta-HSD1 inhibition improves triglyceridemia through reduced liver VLDL secretion and partitions lipids toward oxidative tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293. E1045-1052.
- Bizeau ME & Pagliassotti MJ. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism.* 2005; 54. 1189-1201.
- Bjorntorp P & Rosmond R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24 Suppl 2. S80-85.
- Bode C, Durr HK & Bode JC. Effect of fructose feeding on the activity of enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate shunt in the liver and jejunal mucosa of rats. *Horm Metab Res.* 1981; 13. 379-383.
- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z & Ruderman N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* 2005; 54. 3458-3465.
- Bou Khalil M, Sundaram M, Zhang HY, Links PH, Raven JF, Manmontri B, Sariahmetoglu M, Tran K, Reue K, Brindley DN & Yao Z. The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J Lipid Res.* 2009; 50. 47-58.
- Boura-Halfon S & Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296. E581-591.

- Brindley DN, Pilquill C, Sariahmetoglu M & Reue K. Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791. 956-961.
- Brose N & Rosenmund C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*. 2002; 115. 4399-4411.
- Browning JD & Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004; 114. 147-152.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM & Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40. 1387-1395.
- Bruynseels K, Bergans N, Gillis N, van Dorpen F, Van Hecke P, Stalmans W & Vanstapel F. On the inhibition of hepatic glycogenolysis by fructose. A <sup>31</sup>P-NMR study in perfused rat liver using the fructose analogue 2,5-anhydro-D-mannitol. *NMR Biomed*. 1999; 12. 145-156.
- Bursac BN, Djordjevic AD, Vasiljevic AD, Milutinovic DD, Velickovic NA, Nestorovic NM & Matic GM. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem*. 2013; 24. 1166-1172.
- Bursac BN, Vasiljevic AD, Nestorovic NM, Velickovic NA, Milutinovic DV, Matic GM, Djordjevic AD. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats - do glucocorticoids play a role? *J Nutr Biochem*. 2014; doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.12.005
- Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR & Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116. 539-564.
- Cagen LM, Deng X, Wilcox HG, Park EA, Raghov R & Elam MB. Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem J*. 2005; 385. 207-216.
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J & Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005; 11. 183-190.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A & Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995; 377. 68-71.
- Carrigan A, Walther RF, Salem HA, Wu D, Atlas E, Lefebvre YA & Hache RJ. An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2007; 282. 10963-10971.
- Cassuto H, Kochan K, Chakravarty K, Cohen H, Blum B, Olswang Y, Hakimi P, Xu C, Massillon D, Hanson RW & Reshef L. Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem*. 2005; 280. 33873-33884.
- Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J & Semenkovich CF. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*. 2009; 138. 476-488.
- Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J & Semenkovich CF. "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab*. 2005; 1. 309-322.
- Chan RS & Woo J. Prevention of overweight and obesity: how effective is the current public health approach. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7. 765-783.
- Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology*. 1993; 105. 1050-1056.

- Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL & Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101. 11245-11250.
- Choi S & Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005; 21. 702-707.
- Choi SH & Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22. 353-363.
- Chong MF, Fielding BA & Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85. 1511-1520.
- Choukem SP & Gautier JF. How to measure hepatic insulin resistance? *Diabetes Metab*. 2008; 34. 664-673.
- Chrousos GP, Charmandari E & Kino T. Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89. 563-564.
- Clark DG, Rognstad R & Katz J. Lipogenesis in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1974; 249. 2028-2036.
- Cohen JC, Horton JD & Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011; 332. 1519-1523.
- Cole TG, Wilcox HG & Heimberg M. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. *J Lipid Res*. 1982; 23. 81-91.
- Corpe CP, Burant CF & Hoekstra JH. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28. 364-374.
- Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A & Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA*. 1999; 282. 1659-1664.
- Crapo PA & Kolterman OG. The metabolic effects of 2-week fructose feeding in normal subjects. *Am J Clin Nutr*. 1984; 39. 525-534.
- Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC & Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001; 34. 1158-1163.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawat T, DeFronzo RA, Kahn CR & Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 2000; 105. 311-320.
- Czegle I, Csala M, Mandl J, Benedetti A, Karadi I & Banhegyi G. G6PT-H6PDH-11betaHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World J Hepatol*. 2012; 4. 129-138.
- Czegle I, Margittai E, Senesi S, Benedetti A & Banhegyi G. Different expression and distribution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Acta Physiol Hung*. 2008; 95. 419-424.
- Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R & Benedetti A. Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 248. 24-25.
- Dai S & McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33. 101-107.
- D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM & Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2005; 46. 806-811.
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000; 103. 239-252.

- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC & Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299. E685-694.
- Delarue J & Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10. 142-148.
- Diraison F & Beylot M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *Am J Physiol.* 1998; 274. E321-327.
- Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J & Radojicic MB. Stress type dependence of expression and cytoplasmic-nuclear partitioning of glucocorticoid receptor, hsp90 and hsp70 in Wistar rat brain. *Neuropsychobiology.* 2009; 59. 213-221.
- Djordjevic A, Vojnovic Milutinovic D, Tanic N, Bursac B, Vasiljevic A, Velickovic N, Elakovic I, Matic G. (2012) Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies in Tissues from Fructose-Fed Rats. *Adv Sci Lett.* 2012; 5, 560-5.
- Doerge H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE & Stahl A. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology.* 2006; 130. 1245-1258.
- Dolinsky VW, Douglas DN, Lehner R & Vance DE. Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem J.* 2004; 378. 967-974.
- Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN & Reue K. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem.* 2007; 282. 3450-3457.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD & Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005; 115. 1343-1351.
- Donnelly R, Reed MJ, Azhar S & Reaven GM. Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. *Endocrinology.* 1994; 135. 2369-2374.
- Drake AJ, Livingstone DE, Andrew R, Seckl JR, Morton NM & Walker BR. Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology.* 2005; 146. 913-919.
- Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, Malunowicz E, White PC, Hewison M, Mason PJ, Connell JM, Shackleton CH & Stewart PM. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet.* 2003; 34. 434-439.
- Duncombe WG. The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta.* 1964; 9. 122-125.
- Dzykanchuk AA, Balazs Z, Nashev LG, Amrein KE & Odermatt A. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP(+) and is stimulated by extracellular glucose. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 301. 137-141.
- Eaton S, Bartlett K & Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J.* 1996; 320 ( Pt 2). 345-357.
- Eckel RH, Grundy SM & Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 365. 1415-1428.
- Erion DM, Popov V, Hsiao JJ, Vatner D, Mitchell K, Yonemitsu S, Nagai Y, Kahn M, Gillum MP, Dong J, Murray SF, Mancham VP, Bhanot S, Cline GW, Shulman GI & Samuel VT. The role of the carbohydrate response element-binding protein in male fructose-fed rats. *Endocrinology.* 2013; 154. 36-44.

- Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM & Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med.* 1997; 186. 189-198.
- Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A & Klein S. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106. 15430-15435.
- Farrell GC & Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43. S99-S112.
- Feingold KR, Moser A, Shigenaga JK & Grunfeld C. Inflammation inhibits the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and adipose tissue. *Innate Immun.* 2012; 18. 231-240.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ & Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 2004; 40. 185-194.
- Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG & Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science.* 2006; 313. 1628-1632.
- Fernandez-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, Cucarella C, Muntane J & Casado M. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem.* 2011; 286. 21466-21477.
- Fernandez-Marcos PJ & Auwerx J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93. 884S-890.
- Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC, Jr. & Kelly DP. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 2006; 4. 199-210.
- Forman BM, Chen J & Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94. 4312-4317.
- Fortino MA, Lombardo YB & Chicco A. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition.* 2007; 23. 489-497.
- Foster DW. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J Clin Invest.* 2012; 122. 1958-1959.
- Foster-Powell K & Miller JB. International tables of glycemic index. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62. 871S-890S.
- Frayn KN. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31. 1115-1119.
- Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM & Hanson RW. Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem.* 1993; 268. 12952-12957.
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP & Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.* 2002; 16. 61-71.
- Gareau JR & Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11. 861-871.
- Gelman L, Zhou G, Fajas L, Raspe E, Fruchart JC & Auwerx J. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem.* 1999; 274. 7681-7688.

- Gersch MS, Mu W, Cirillo P, Reungjui S, Zhang L, Roncal C, Sautin YY, Johnson RJ & Nakagawa T. Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293. F1256-1261.
- Ghosh S, May MJ & Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16. 225-260.
- Ginsberg HN & Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl. S162-166.
- Giudetti AM & Gnoni GV. Short-term effect of dexamethasone on fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem Mol Biol Int*. 1998; 44. 515-521.
- Gloire G, Legrand-Poels S & Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72. 1493-1505.
- Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, Laitinen S, Kolak M, Fisher RM, Hamsten A, Auvinen P & Yki-Jarvinen H. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294. G1281-1287.
- Gross KL & Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19. 331-339.
- Gross LS, Li L, Ford ES & Liu S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79. 774-779.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y & Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005; 87. 99-109.
- Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S & Deng H. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40. 426-436.
- Guzman M & Castro J. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J*. 1989; 264. 107-113.
- Hacker H & Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006; 2006. re13.
- Hallfrisch J, Ellwood K, Michaelis OEt, Reiser S & Prather ES. Plasma fructose, uric acid, and inorganic phosphorus responses of hyperinsulinemic men fed fructose. *J Am Coll Nutr*. 1986; 5. 61-68.
- Hallfrisch J, Reiser S & Prather ES. Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose. *Am J Clin Nutr*. 1983; 37. 740-748.
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J & Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005; 143. 722-728.
- Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR & Holmes MC. Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11beta-HSD-1-deficient mice. *Endocrinology*. 2001; 142. 114-120.
- Harris TE & Finck BN. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22. 226-233.
- Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A & Lawrence JC, Jr. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem*. 2007; 282. 277-286.
- Haub S, Kanuri G, Volynets V, Brune T, Bischoff SC & Bergheim I. Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 298. G335-344.

- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* 2005; 63. 133-157.
- Heinlein CA, Ting HJ, Yeh S & Chang C. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 1999; 274. 16147-16152.
- Hewitt KN, Walker EA & Stewart PM. Minireview: hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Endocrinology.* 2005; 146. 2539-2543.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M & Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002; 420. 333-336.
- Hopewell R, Martin-Sanz P, Martin A, Saxton J & Brindley DN. Regulation of the translocation of phosphatidate phosphohydrolase between the cytosol and the endoplasmic reticulum of rat liver. Effects of unsaturated fatty acids, spermine, nucleotides, albumin and chlorpromazine. *Biochem J.* 1985; 232. 485-491.
- Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259. 87-91.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444. 860-867.
- Huang X, Vaag A, Hansson M & Groop L. Down-regulation of insulin receptor substrates (IRS)-1 and IRS-2 and Src homologous and collagen-like protein Shc gene expression by insulin in skeletal muscle is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87. 255-259.
- Hussain MM, Shi J & Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003; 44. 22-32.
- Hutchison KA, Scherrer LC, Czar MJ, Stancato LF, Chow YH, Jove R & Pratt WB. Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 684. 35-48.
- Huynh M, Luiken JJ, Coumans W & Bell RC. Dietary fructose during the suckling period increases body weight and fatty acid uptake into skeletal muscle in adult rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16. 1755-1762.
- Idris I, Gray S & Donnelly R. Insulin action in skeletal muscle: isozyme-specific effects of protein kinase C. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967. 176-182.
- Ignatova ID, Kostadinova RM, Goldring CE, Nawrocki AR, Frey FJ & Frey BM. Tumor necrosis factor- $\alpha$  upregulates 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by CCAAT/enhancer binding protein- $\beta$  in HepG2 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296. E367-377.
- Irrcher I, Ljubcic V & Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296. C116-123.
- Ishii T, Masuzaki H, Tanaka T, Arai N, Yasue S, Kobayashi N, Tomita T, Noguchi M, Fujikura J, Ebihara K, Hosoda K & Nakao K. Augmentation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages--role of 11 $\beta$ -HSD1 in pro-inflammatory properties in macrophages. *FEBS Lett.* 2007; 581. 349-354.
- Ishii-Yonemoto T, Masuzaki H, Yasue S, Okada S, Kozuka C, Tanaka T, Noguchi M, Tomita T, Fujikura J, Yamamoto Y, Ebihara K, Hosoda K & Nakao K. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NF- $\kappa$ B and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298. E930-940.
- Ishimoto K, Nakamura H, Tachibana K, Yamasaki D, Ota A, Hirano K, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T & Doi T. Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *J Biol Chem.* 2009; 284. 22195-22205.



- Iwasaki Y, Takayasu S, Nishiyama M, Tsugita M, Taguchi T, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M & Hashimoto K. Is the metabolic syndrome an intracellular Cushing state? Effects of multiple humoral factors on the transcriptional activity of the hepatic glucocorticoid-activating enzyme (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1) gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 285. 10-18.
- Iynedjian PB. Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J.* 1993; 293 ( Pt 1). 1-13.
- Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D & Lewandowski P. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food Funct.* 2012; 3. 141-149.
- Jensen MD, Caruso M, Heiling V & Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes.* 1989; 38. 1595-1601.
- Johnstone AM, Faber P, Andrew R, Gibney ER, Elia M, Lobley G, Stubbs RJ & Walker BR. Influence of short-term dietary weight loss on cortisol secretion and metabolism in obese men. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150. 185-194.
- Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, Dombrowski F, Otto B, Nawrocki AR, Scherer PE, Spranger J, Ristow M, Joost HG, Havel PJ & Tschop MH. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res.* 2005; 13. 1146-1156.
- Kahn CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 1978; 27. 1893-1902.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H & Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* 2005; 120. 649-661.
- Kanarek RB & Orthen-Gambill N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr.* 1982; 112. 1546-1554.
- Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC & Goodman MN. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med.* 1996; 128. 208-213.
- Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T & Tanaka T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. *Eur J Biochem.* 1990; 190. 427-433.
- Kaumi T, Hirano T, Odaka H, Ebara T, Amano N, Hozumi T, Ishida Y & Yoshino G. VLDL triglyceride kinetics in Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM: effects of dietary fructose alone or in combination with pioglitazone. *Diabetes.* 1996; 45. 806-811.
- Kawai T & Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007; 19. 24-32.
- Kawano Y & Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013; 48. 434-441.
- Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T & Yamanouchi T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr.* 2009; 139. 2067-2071.
- Kelley GL, Allan G & Azhar S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology.* 2004; 145. 548-555.
- Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD & Gibbons GF. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J.* 2005; 389. 413-421.
- Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH & Nakamura MT. Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782. 341-348.

- Koo SH & Montminy M. Fatty acids and insulin resistance: a perfect storm. *Mol Cell*. 2006; 21. 449-450.
- Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013; 19. 210-215.
- Korshunov SS, Skulachev VP & Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997; 416. 15-18.
- Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR & Mullins JJ. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94. 14924-14929.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG & Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 1997; 11. 779-791.
- Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T & Sheppard KE. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999; 69. 391-401.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227. 680-685.
- Lakshman R, Elks CE & Ong KK. Childhood obesity. *Circulation*. 2012; 126. 1770-1779.
- Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG & Giacca A. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283. E682-691.
- Langner CA, Birkenmeier EH, Ben-Zeev O, Schotz MC, Sweet HO, Davisson MT & Gordon JI. The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J Biol Chem*. 1989; 264. 7994-8003.
- Lavery GG, Hauton D, Hewitt KN, Brice SM, Sherlock M, Walker EA & Stewart PM. Hypoglycemia with enhanced hepatic glycogen synthesis in recombinant mice lacking hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology*. 2007; 148. 6100-6106.
- Lavery GG, Zielinska AE, Gathercole LL, Hughes B, Semjonous N, Guest P, Saqib K, Sherlock M, Reynolds G, Morgan SA, Tomlinson JW, Walker EA, Rabbitt EH & Stewart PM. Lack of significant metabolic abnormalities in mice with liver-specific disruption of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology*. 2012; 153. 3236-3248.
- Lazar MA. The humoral side of insulin resistance. *Nat Med*. 2006; 12. 43-44.
- Le KA & Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006; 9. 469-475.
- Le Roith D & Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001; 24. 588-597.
- Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N & Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol*. 2007; 47. 142-156.
- Leff T. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31. 224-227.
- Lemke U, Kronen-Herzig A, Berriel Diaz M, Narvekar P, Ziegler A, Vegiopoulos A, Cato AC, Bohl S, Klingmuller U, Sreaton RA, Muller-Decker K, Kersten S & Herzig S. The glucocorticoid receptor controls hepatic dyslipidemia through Hes1. *Cell Metab*. 2008; 8. 212-223.

- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K & Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23. 201-229.
- Li G, Hernandez-Ono A, Crooke RM, Graham MJ & Ginsberg HN. Effects of antisense-mediated inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 on hepatic lipid metabolism. *J Lipid Res.* 2011; 52. 971-981.
- Li X, Monks B, Ge Q & Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature.* 2007; 447. 1012-1016.
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL & Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem.* 2002; 277. 9520-9528.
- Lin J, Handschin C & Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005; 1. 361-370.
- Lindqvist A, Baelemans A & Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept.* 2008; 150. 26-32.
- Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T & Friedman TC. Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes.* 2003; 52. 1409-1416.
- Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Sakurai R, Tripathi PV, Lutfy K & Friedman TC. Increased glucocorticoid receptor and 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes.* 2005; 54. 32-40.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV & Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996; 87. 565-576.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25. 402-408.
- Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ & Walker BR. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology.* 2000; 141. 560-563.
- Livingstone DE, McInnes KJ, Walker BR & Andrew R. Increased A-ring reduction of glucocorticoids in obese Zucker rats: effects of insulin sensitization. *Obes Res.* 2005; 13. 1523-1526.
- Logue SE, Cleary P, Saveljeva S & Samali A. New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis.* 2013; 18. 537-546.
- London E & Castonguay TW. High fructose diets increase 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral adipose in rats within 24-h exposure. *Obesity (Silver Spring).* 2011; 19. 925-932.
- London E, Lala G, Berger R, Panzenbeck A, Kohli AA, Renner M, Jackson A, Raynor T, Loya K & Castonguay TW. Sucrose access differentially modifies 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *J Nutr.* 2007; 137. 2616-2621.
- Lu M & Shyy JY. Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290. C1477-1486.
- Lumeng CN & Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011; 121. 2111-2117.
- Luo J, Rizkalla SW, Lerer-Metzger M, Boillot J, Ardeleanu A, Bruzzo F, Chevalier A & Slama G. A fructose-rich diet decreases insulin-stimulated glucose incorporation into lipids but not glucose transport in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr.* 1995; 125. 164-171.

- Macfarlane DP, Forbes S & Walker BR. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2008; 197. 189-204.
- Malkoski SP & Dorin RI. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol.* 1999; 13. 1629-1644.
- Manco M, Marcellini M, Giannone G & Nobili V. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127. 954-960.
- Mandard S, Muller M & Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61. 393-416.
- Manmontri B, Sariahmetoglu M, Donkor J, Bou Khalil M, Sundaram M, Yao Z, Reue K, Lehner R & Brindley DN. Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *J Lipid Res.* 2008; 49. 1056-1067.
- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G & Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999; 107. 450-455.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR & Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science.* 2001; 294. 2166-2170.
- Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MG, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR & Flier JS. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest.* 2003; 112. 83-90.
- Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS & Shimomura I. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* 2001; 15. 1206-1216.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J & Yamada N. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes.* 2004; 53. 560-569.
- Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E & Karin M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science.* 2008; 321. 663-668.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28. 412-419.
- McCann SM, Lyson K, Karanth S, Gimeno M, Belova N, Kamat A & Rettori V. Mechanism of action of cytokines to induce the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771. 386-395.
- McInnes KJ, Kenyon CJ, Chapman KE, Livingstone DE, Macdonald LJ, Walker BR & Andrew R. 5alpha-reduced glucocorticoids, novel endogenous activators of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 2004; 279. 22908-22912.
- Minehira K, Young SG, Villanueva CJ, Yetukuri L, Oresic M, Hellerstein MK, Farese RV, Jr., Horton JD, Preitner F, Thorens B & Tappy L. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 2008; 49. 2038-2044.
- Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM & Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J.* 2005; 149. 33-45.

- Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim HJ & Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2004; 279. 25164-25171.
- Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Oztelberger C, Liu X & Ntambi JM. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab.* 2007; 6. 484-496.
- Moran TH. Fructose and satiety. *J Nutr.* 2009; 139. 1253S-1256S.
- Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A & de Lange P. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res.* 2010; 2010.
- Morgan SA, Sherlock M, Gathercole LL, Lavery GG, Lenaghan C, Bujalska IJ, Laber D, Yu A, Convey G, Mayers R, Hegyi K, Sethi JK, Stewart PM, Smith DM & Tomlinson JW. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes.* 2009; 58. 2506-2515.
- Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ & Seckl JR. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem.* 2001; 276. 41293-41300.
- Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, Walker BR, Flier JS, Mullins JJ & Seckl JR. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes.* 2004a; 53. 931-938.
- Morton NM, Ramage L & Seckl JR. Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease. *Endocrinology.* 2004b; 145. 2707-2712.
- Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30. 1059-1064.
- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R & Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282. E1180-1190.
- Nagle CA, Klett EL & Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl. S74-79.
- Nakai Y, Usui T, Tsukada T, Takahashi H, Fukata J, Fukushima M, Senoo K & Imura H. Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 40. 301-306.
- Nechushtan H, Benvenisty N, Brandeis R & Reshef L. Glucocorticoids control phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specific manner. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15. 6405-6417.
- Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 2010; 52. 774-788.
- Newell-Price J. Cushing's syndrome. *Clin Med.* 2008; 8. 204-208.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP & Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010; 75. 1-12.
- Nixon M, Upreti R & Andrew R. 5alpha-Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *J Endocrinol.* 2012; 212. 111-127.
- Nomura K & Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2012; 23. 203-208.

- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM & Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99. 11482-11486.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1995; 270. 1354-1357.
- Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmuller D, Schulze A, Schmid W & Schutz G. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*. 2004; 18. 1346-1353.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ & Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11. 85-97.
- Paquot N, Schneiter P, Jequier E, Gaillard R, Lefebvre PJ, Scheen A & Tappy L. Effects of ingested fructose and infused glucagon on endogenous glucose production in obese NIDDM patients, obese non-diabetic subjects, and healthy subjects. *Diabetologia*. 1996; 39. 580-586.
- Paradis V & Bedossa P. Definition and natural history of metabolic steatosis: histology and cellular aspects. *Diabetes Metab*. 2008; 34. 638-642.
- Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT & Dingfelder CS. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J Nutr*. 2008; 138. 1039-1046.
- Patel DD, Knight BL, Wiggins D, Humphreys SM & Gibbons GF. Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR alpha-deficient mice. *J Lipid Res*. 2001; 42. 328-337.
- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR & Mullins JJ. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101. 7088-7093.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H & Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997; 272. 29911-29918.
- Peterfy M, Phan J, Xu P & Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet*. 2001; 27. 121-124.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW & Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*. 2003; 300. 1140-1142.
- Piccirella S, Czeglé I, Lizak B, Margittai E, Senesi S, Papp E, Csala M, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A & Banhegyi G. Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum. Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J Biol Chem*. 2006; 281. 4671-4677.
- Pittner RA, Fears R & Brindley DN. Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidate phosphohydrolase, tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. *Biochem J*. 1985; 225. 455-462.
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL & Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*. 2008; 8. 224-236.
- Postic C & Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*. 2008; 34. 643-648.
- Postic C, Dentin R & Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab*. 2004; 30. 398-408.

- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB & Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*. 2001; 8. 971-982.
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X & Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009; 9. 327-338.
- Qatanani M & Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007; 21. 1443-1455.
- Qin B, Anderson RA & Adeli K. Tumor necrosis factor-alpha directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294. G1120-1129.
- Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Muller M & Kersten S. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One*. 2009; 4. e6796.
- Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 1998; 14. 263-283.
- Ray A & Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91. 752-756.
- Reaven GM, Ho H & Hoffman BB. Effects of a fructose-enriched diet on plasma insulin and triglyceride concentration in SHR and WKY rats. *Horm Metab Res*. 1990; 22. 363-365.
- Reddy JK & Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21. 193-230.
- Reue K & Brindley DN. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2008; 49. 2493-2503.
- Reue K & Zhang P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS Lett*. 2008; 582. 90-96.
- Reue K. The lipin family: mutations and metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20. 165-170.
- Rhen T & Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005; 353. 1711-1723.
- Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M & Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2007; 47. 571-579.
- Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M & Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology*. 2007; 45. 778-788.
- Rohl M, Pasparakis M, Baudler S, Baumgartl J, Gautam D, Huth M, De Lorenzi R, Krone W, Rajewsky K & Bruning JC. Conditional disruption of IkappaB kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004; 113. 474-481.
- Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X & Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*. 1998; 47. 699-713.
- Ruiz-Nunez B, Pruijboom L, Dijck-Brouwer DA & Muskiet FA. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. *J Nutr Biochem*. 2013; 24. 1183-1201.
- Rutledge AC & Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev*. 2007; 65. S13-23.
- Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res*. 2002; 4. 146-150.

- Sale EM & Sale GJ. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65. 113-127.
- Saltiel AR & Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414. 799-806.
- Samuel VT, Petersen KF & Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet.* 2010; 375. 2267-2277.
- Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J & Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292. F423-429.
- Sandeep TC & Walker BR. Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12. 446-453.
- Sanderson LM, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Muller M & Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol.* 2009; 29. 6257-6267.
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML & Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001; 120. 1183-1192.
- Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005; 2. 46-53.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK & Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 1995; 270. 283-286.
- Schenk S, Saberi M & Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008; 118. 2992-3002.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ & Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000; 404. 661-671.
- Seckl JR & Walker BR. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology.* 2001; 142. 1371-1376.
- Seckl JR. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms and their implications for blood pressure regulation. *Eur J Clin Invest.* 1993; 23. 589-601.
- Senftleben U & Karin M. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med.* 2002; 30. S18-S26.
- Serfaty L & Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab.* 2008; 34. 634-637.
- Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW & Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology.* 1996; 137. 4499-4502.
- Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ & Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295. R1370-1375.
- Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand.* 2005; 183. 3-12.
- Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 1997; 52. 141-164; discussion 164-145.
- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS & Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.* 1997; 99. 846-854.



- Shimano H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.* 2009; 276. 616-621.
- Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, Egawa K, Nishio Y, Yoshizaki T, Shi K, Nagai Y, Morino K, Nemoto K, Nakamura T, Bryer-Ash M & Kashiwagi A. Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression. *J Biol Chem.* 2003; 278. 43095-43101.
- Shimomura I, Bashmakov Y & Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 1999; 274. 30028-30032.
- Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y & Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* 1998; 273. 35299-35306.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106. 171-176.
- Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol.* 2011; 47. R1-10.
- Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD & Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J Clin Invest.* 1996; 98. 2244-2250.
- Smith SM & Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci.* 2006; 8. 383-395.
- Smoak KA & Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev.* 2004; 125. 697-706.
- Solinas G & Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010; 24. 2596-2611.
- Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem.* 1978; 86. 142-146.
- Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC & Bergheim I. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14. 2121-2135.
- Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC & Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology.* 2009; 50. 1094-1104.
- Staab CA & Maser E. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 119. 56-72.
- Stanhope KL & Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2008; 19. 16-24.
- Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM & Shackleton CH. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84. 1022-1027.
- Stimson RH & Walker BR. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol.* 2007; 32. 141-159.
- Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW & Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol.* 1995; 268. R142-149.
- Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, Santha M & Adeli K. Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. *Hepatology.* 2009; 50. 77-84.

- Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Knight BL & Holness MJ. Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochem J.* 2002; 364. 361-368.
- Sugden MC, Caton PW & Holness MJ. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *J Endocrinol.* 2010; 204. 93-104.
- Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA & Kaneki M. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2005; 280. 14203-14211.
- Sutherland JP, McKinley B & Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord.* 2004; 2. 82-104.
- Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF & Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem.* 2000; 275. 8416-8425.
- Tappy L & Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010; 90. 23-46.
- Tappy L. Q&A: 'toxic' effects of sugar: should we be afraid of fructose? *BMC Biol.* 2012; 10. 42.
- Taskinen MR, Nikkila EA, Pelkonen R & Sane T. Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes, and very low density lipoprotein triglyceride turnover in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 57. 619-626.
- Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D & Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89. 2963-2972.
- Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Konigsrainer A, Maier KP, Bischoff SC & Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr.* 2008; 138. 1452-1455.
- Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M & Stewart PM. Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology.* 2001; 142. 1982-1989.
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M & Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev.* 2004; 25. 831-866.
- Topping DL & Mayes PA. The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism. *Biochem J.* 1972; 126. 295-311.
- Tounian P, Schneiter P, Henry S, Jequier E & Tappy L. Effects of infused fructose on endogenous glucose production, gluconeogenesis, and glycogen metabolism. *Am J Physiol.* 1994; 267. E710-717.
- Tran LT, Yuen VG & McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009; 332. 145-159.
- Tsai J, Zhang R, Qiu W, Su Q, Naples M & Adeli K. Inflammatory NF-kappaB activation promotes hepatic apolipoprotein B100 secretion: evidence for a link between hepatic inflammation and lipoprotein production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296. G1287-1298.

- Tschop M & Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001; 109. 307-319.
- Turnbull AV & Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999; 79. 1-71.
- Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2003; 144. 5159-5165.
- Uyeda K & Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006; 4. 107-110.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997; 389. 610-614.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3. RESEARCH0034.
- Velickovic N, Djordjevic A, Vasiljevic A, Bursac B, Milutinovic DV & Matic G. Tissue-specific regulation of inflammation by macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoids in fructose-fed Wistar rats. *Br J Nutr*. 2013; 110. 456-465.
- Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M & Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology*. 2008; 48. 1506-1516.
- Wake DJ, Homer NZ, Andrew R & Walker BR. Acute in vivo regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity by insulin and intralipid infusions in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91. 4682-4688.
- Walker BR & Andrew R. Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1083. 165-184.
- Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ & Edwards CR. Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80. 3155-3159.
- Walker BR. Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet Med*. 2006; 23. 1281-1288.
- Wang D, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN & Gladson CL. Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene*. 2000; 19. 5801-5809.
- Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2005; 2. 3.
- Wang SJ, Birtles S, de Schoolmeester J, Swales J, Moody G, Hislop D, O'Dowd J, Smith DM, Turnbull AV & Arch JR. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reduces food intake and weight gain but maintains energy expenditure in diet-induced obese mice. *Diabetologia*. 2006; 49. 1333-1337.
- Watts LM, Manchem VP, Leedom TA, Rivard AL, McKay RA, Bao D, Neroladakis T, Monia BP, Bodenmiller DM, Cao JX, Zhang HY, Cox AL, Jacobs SJ, Michael MD, Sloop KW & Bhanot S. Reduction of hepatic and adipose tissue glucocorticoid receptor expression with antisense oligonucleotides improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rodents without causing systemic glucocorticoid antagonism. *Diabetes*. 2005; 54. 1846-1853.
- Wei Y & Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 287. E926-933.

- Wei Y, Wang D, Topczewski F & Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291. E275-281.
- Wellen KE & Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112. 1785-1788.
- White MF & Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994; 269. 1-4.
- Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR & Chapman KE. C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000; 275. 30232-30239.
- Wong PS & Johns EJ. Effect of acute saline volume loading on renal sympathetic nerve activity in anaesthetised fructose-fed and fat-fed rats. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 75. 60-69.
- Xiang J, Ipek M, Suri V, Masefski W, Pan N, Ge Y, Tam M, Xing Y, Tobin JF, Xu X & Tam S. Synthesis and biological evaluation of sulfonamidooxazoles and beta-keto sulfones: selective inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15. 2865-2869.
- Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S & Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 1999; 274. 35840-35844.
- Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S & Yamada N. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem.* 2002; 277. 19353-19357.
- Yang C, Nixon M, Kenyon CJ, Livingstone DE, Duffin R, Rossi AG, Walker BR & Andrew R. 5alpha-reduced glucocorticoids exhibit dissociated anti-inflammatory and metabolic effects. *Br J Pharmacol.* 2011; 164. 1661-1671.
- Yang, C. Investigation of the cellular and physiological effects of 5 $\alpha$ -tetrahydro reduced glucocorticoids in vitro and in vivo., University of Edinburgh. Thesis for Doctor of Philosophy. 2009.
- Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA & Kaneki M. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem.* 2005; 280. 7511-7518.
- Ye J & Keller JN. Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging (Albany NY).* 2010; 2. 361-368.
- Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ & Kraegen EW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes.* 2001; 50. 411-417.
- Yoshino G, Matsushita M, Iwai M, Morita M, Matsuba K, Nagata K, Maeda E, Furukawa S, Hirano T & Kazumi T. Effect of mild diabetes and dietary fructose on very-low-density lipoprotein triglyceride turnover in rats. *Metabolism.* 1992; 41. 236-240.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW & Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002; 277. 50230-50236.

- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M & Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001; 293. 1673-1677.
- Zaman MQ, Leray V, Le Bloc'h J, Thorin C, Ouguerram K & Nguyen P. Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. *Br J Nutr*. 2011; 106 Suppl 1. S206-210.
- Zhang K & Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008; 454. 455-462.
- Zick Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27 Suppl 3. S56-60.

## BIOGRAFIJA

Ana Vasiljević je rođena 30.12.1983. godine u Užicu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,31. Diplomski rad pod naslovom: „Hiperehogenost creva kao indikacija za prenatalnu dijagnostiku cistične fibroze” uradila je u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić” pod mentorstvom dr Danijele Radivojević i odbranila ga 20.04.2010. godine sa ocenom 10. Iste godine je započela doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota. Zvanje istraživač saradnik stiče 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za biohemiju Odeljenja za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Nataše Veličković, a u okviru projekta „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma- molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“ (br. 41009) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ana Vasiljević je do danas objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 3 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Ана Васиљевић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ М3003/2010 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога глукокортикоидних хормона у регулацији енергетског метаболизма и  
инфламације у јетри пацова након исхране обогаћене фруктозом

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Васиљевић

Број уписа М3003/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Улога глукокортикоидних хормона у регулацији енергетског  
метаболизма и инфламације у јетри пацова након исхране обogaћене фруктозом

Ментор др Наташа Величковић и др Гордана Матић

Потписани \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Улога глукокортикоидних хормона у регулацији енергетског метаболизма и инфламације у јетри пацова након исхране обогаћене фруктозом

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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