

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Александра А. Јовановић

**Сигнални путеви естрадиола укључени у регулацију  
експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-  
синтазе и натријум-калијум аденозинтрифосфатазе у  
срцу гојазних женки пацова**

Докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra A. Jovanović

**Signalni putevi estradiola uključeni u regulaciju ekspresije  
i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-  
kalijum adenzintrifosfataze u srcu gojaznih ženki pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra A. Jovanović

**Estradiol signalling pathways involved in the regulation of  
inducible nitric oxide synthase and sodium-potassium-  
ATPase in the heart of obese female rats**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata  
Aleksandre Jovanović, izabrana je u sastavu:

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

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

dr Milan Obradović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za  
nuklearne nauke „Vinča”, Beograd, Srbija

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

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

*Neizmernu zahvalnost dugujem neposrednom mentoru, dr Esmi R. Isenović, što mi je iskreno i bezrezervno pružala podršku u radu, pomagala u mojoj edukaciji i stručnom usavršavanju, kao i na sveukupnom zalaganju u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Jeleni Đorđević na velikoj stručnoj pomoći, konstruktivnim sugestijama, kao i na vremenu, trudu i energiji koju je uložila pri pregledu i oceni doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Milanu Obradoviću na svim stručnim sugestijama, prijateljskim savetima, razumevanju i profesionalnom zalaganju prilikom izrade i pregleda doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegini dr Emini Sudar Milovanović, sa kojom sam započela svoj naučni rad tokom izrade diplomskog rada, ne samo što je dala veliki doprinos u mom stručnom osposobljavanju, već i na prijateljstvu i podršci koje je pružala od samog početka našeg zajedničkog rada. Iskreno se zahvaljujem kolegama i saradnicima na projektu: dr Vladanu Bajiću, dr Sanji Soskić, dr Božidarki Zarić, dr Sonji Zafirović, dr Julijani Stanimirović, MSc Anastasiji Panić i MSc Ivani Resanović koji su svojim vedrim duhom i pozitivnim stavom doprineli lepoj radnoj atmosferi, a svoje iskustvo u struci i ogromnu radnu energiju su koristili kako bi mi na najbolji način preneli znanje.*

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

*Najtoplije se zahvaljujem mojoj porodici na безусловnoj ljubavi i podršci, a posebno bratu Oliveru i sestri Ružici, koji su mi oduvek bili glavni oslonac u životu i njima posvećujem ovaj rad.*

*Aleksandra A. Jovanović*

## **Signalni putevi estradiola uključeni u regulaciju ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-kalijum adenzinotriposfataze u srcu gojaznih ženki pacova**

### Sažetak

Gojaznost je oboljenje povezano sa nizom patoloških stanja kao što su: rezistencija na insulin (IR), kardiovaskularne bolesti (KVB) i Diabetes Mellitus tipa 2 (DMT2). Povećana ekspresija i aktivnost inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS; engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*) u srcu u stanju gojaznosti, može dovesti do apoptoze kardiomiocita i hipertrofije srca, dok sa druge strane gojaznost združena sa IR doprinosi smanjenoj aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, što dovodi do smanjenja kontraktilnosti vaskulature i razvoja sistemske hipertenzije. Endogeni estradiol svojim delovanjem sprečava nastanak IR i hiperglikemije i ostvaruje pozitivne efekte na kardiovaskularni sistem (KVS), ali sinteza i kardioprotektivni uticaj estradiola mogu biti smanjeni usled razvoja gojaznosti.

Estradiol ostvaruje kardioprotektivne tako što utiče na smanjenje ekspresije i aktivnosti iNOS, kao i povećanje ekspresije i aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, posredstvom različitih signalnih molekula i kinaza, kao što su: supstrat receptora za insulin 1 (IRS-1; engl. Insulin Receptor Substrate)/ fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K; engl. Phosphatidylinositide 3-Kinase)/ protein kinaza B (Akt; engl. Protein Kinase B), ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2; engl. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 i 2) kao i RhoA (engl. Ras homolog gene family, member A)/ROCK (engl. Rho-associated protein kinase). Pored direktnog efekta na srce, estradiol posredno reguliše i njegovu funkciju tako što utiče na metabolizam i transport glukoze i SMK, preko transportera glukoze (GLUT; engl. Glucose Transporters) i translokaze masnih kiselina (FAT; CD36 ; engl. Fatty Acid Translocase).

Za izradu ove doktorske disertacije je korišćeno 16 adultnih ženki pacova soja Wistar, podeljenih u dve eksperimentalne grupe. Prva grupa pacova je tokom 10 nedelja hranjena standardnom laboratorijskom hranom za pacove, dok je druga grupa pacova tokom 10 nedelja hranjena standardnom laboratorijskom hranom obogaćenom sa 42% masti (HF režim ishrane). Nakon 10 nedelja pacovi su žrtvovani, sakupljena je krv i izolovan je serum, a srca su ekstrahovana i delovi tkiva su korišćeni za izolovanje proteina i RNK. U serumu pacova je određivana koncentracija estradiola, dok su u lizatu srca pacova određivane koncentracije L-Arginina (L-Arg), NO i slobodnih masnih kiselina (SMK). Metodom qRT-PCR određivan je nivo iRNK iNOS u srcu pacova. Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze određivana u plazma

membranskoj frakciji proteina srca pacova. Korišćenjem Western blot metode određivan je nivo proteina iNOS, NFkB-p50, ER $\alpha$ , p85 i p110 subjedinica PI3K, NDRG2, RhoA, ROCK1 i ROCK2 u lizatima srca. Takođe je u lizatima srca određivan i nivo fosforilacije i ekspresije Akt i ERK1/2 kinaza kao i asocijacija IRS-1/PI3K. Nivo CD36, GLUT-1 i GLUT-4 određivan je u plazma membranskoj frakciji i lizatu srca pacova, dok je ekspresija  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  subjedinica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze određivana u plazma membranskoj frakciji srca pacova.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju povećanje fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>, kao i ekspresije gena za iNOS na nivou iRNK i proteina u srcu gojaznih ženki pacova. Takođe, u lizatu tkiva srca gojaznih ženki pacova došlo je povećanja sledećih proteina: NFkB-p50, CD36, NDRG2, RhoA i ROCK2, dok je u membranskim frakcijama proteina došlo do povećanja nivoa CD36 i GLUT-4 transportera. Sa druge strane, kod gojaznih ženki pacova zabeležena je smanjena koncentracija estradiola u serumu. Dalje, u lizatu tkiva srca gojaznih ženki pacova pokazana je smanjenja asocijacija IRS-1/PI3K-p85, kao i smanjen nivo ER $\alpha$  i ROCK1 proteina. Nivo  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u plazma membranskoj frakciji srca gojaznih ženki pacova je bio smanjen, dok su nivo  $\alpha_2$  subjedinice i aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze ostali nepromenjeni.

Na osnovu dobijenih i prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da kao posledica inflamacije indukovane gojaznošću, kao i usled gubitka kardioprotektivnih efekata estradiola, nastalog usled primene HF režima ishrane dolazi do povećanja ekspresije i aktivnosti iNOS i posledične aktivacije RhoA/ROCK signalnog puta u srcu ženki pacova. Aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta dovodi do smanjenja asocijacije IRS-1 sa PI3K što na kraju dovodi do smanjenja  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu ženki pacova. Kompletno razumevanje mehanizama poremećene regulacije iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze je neophodno za razvoj adekvatne terapije u patofiziološkim stanjima gojaznosti, IR i hipertenzije. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom doprinose sagledavanju molekulskih mehanizama kojima estradiol reguliše iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu u srcu ženki pacova.

Ključne reči: iNOS, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza, gojaznost, estradiol, srce

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

## **Estradiol signalling pathways involved in the regulation of inducible nitric oxide synthase and sodium-potassium-ATPase in the heart of obese female rats**

### **Abstract**

Obesity is associated with several pathological conditions such as: insulin resistance (IR), cardiovascular disease (CVD) and Diabetes Mellitus type 2 (DMT2). Obesity related inducible nitric oxide synthase (iNOS) overexpression could lead to cardiac hypertrophy, while on the other hand obesity induced IR contributes to the reduced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity, leading to vascular contractility impairment and development of systemic hypertension. Endogenous estradiol prevents IR and hyperglycaemia and has protective effects on the cardiovascular system (CVS), but the synthesis and cardioprotective effect of estradiol can be reduced due to the development of obesity.

Estradiol exerts cardioprotective effects by reducing the expression and activity of iNOS, as well as by increasing the expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by regulating the activity of signaling molecules and kinases, such as: insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt, PKB), extracellular signal regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) as well as RhoA (Ras homolog gene family, member A)/ROCK (Rho-associated protein kinase). Additionally, estradiol indirectly regulates CVS function by influencing the metabolism and transport of glucose and free fatty acids (FFA), through glucose transporter (GLUT) and FAT; CD36 (Fatty Acid Translocase).

In this doctoral dissertation 16 adult female Wistar rats were used and divided into two experimental groups. The first group of rats was fed a standard chow for laboratory rats for 10 weeks, while the second group of rats was fed a standard chow for laboratory rats enriched with 42% fat (HF diet) for 10 weeks. After 10 weeks, the rats were sacrificed, blood was collected and the serum isolated, the hearts were collected, and its tissue fragments were used to isolate proteins and RNA. The concentration of estradiol was measured in serum, while concentrations of L-Arginine (L-Arg), NO and free fatty acids (FFA) were measured in the heart lysates. qRT-PCR method was used to measure the level of iNOS mRNA in rats' hearts.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase was measured in plasma membranes of rats' hearts. Western blot was used to measure the level of the following proteins: iNOS, NFkB-p50, ER $\alpha$ , p85 and p110 subunits of PI3K, NDRG2, RhoA, ROCK1 and ROCK2 in heart lysates. The level of phosphorylation and expression of Akt and ERK1/2 kinases, as well as the IRS-1/PI3K associations, were determined in heart lysates. The levels of CD36, GLUT-1 and GLUT-4 were determined both



in plasma membranes and heart lysates, while the expression of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase was determined in the plasma membranes of the rats' hearts.

The results shown in this doctoral dissertation show an increase in the Akt phosphorylation at Ser<sup>473</sup>, as well as in the expression of the iNOS gene at the level of mRNA and protein, in the heart of obese female rats. Additionally, in the heart lysates of obese female rats, the following proteins were increased: NFkB-p50, CD36, NDRG2, RhoA and ROCK2, while in the plasma membranes there was an increase in the levels of CD36 and GLUT-4. On the other hand, serum estradiol concentration was decreased in obese female rats. Furthermore, in the heart lysates of obese female rat, there was a decrease in IRS-1/PI3K association, as well as in ER $\alpha$  and ROCK1 levels. The level of  $\alpha_1$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase was reduced in the plasma membranes of the obese female rats' hearts, while the  $\alpha_2$  subunit and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity remained unchanged.

Based on the results presented in this doctoral dissertation, it can be concluded that, because of obesity-induced inflammation, as well as due to the loss of cardioprotective effects of estradiol, iNOS expression and activity increased, which consequently led to the activation of RhoA/ROCK2 signaling cascade. Activation of RhoA/ROCK2 pathway led to the reduction of IRS-1/PI3K association which eventually leads to a decrease in  $\alpha_1$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expression in the heart of female rats. Complete understanding of the mechanisms of disturbed regulation of iNOS and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase is necessary for the development of adequate therapy in the pathophysiological conditions of obesity, IR and hypertension. Research included in this doctoral dissertation contributes to the examination of molecular mechanisms by which oestradiol regulates iNOS and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the heart of female rats.

Key words: iNOS,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, obesity, estradiol, heart

Scientific Group: Biology

Specific Area within a Group: Molecular Endocrinology

## SPISAK SKRAĆENICA

<b>ADP</b>	adenozin difosfat
<b>A.J.</b>	arbitrarna jedinica ( <i>engl. arbitrary units</i> )
<b>Akt</b>	protein kinaza B ( <i>engl. protein kinase B</i> )
<b>ALP</b>	alkalna fosfataza ( <i>engl. Alkaline Phosphatase</i> )
<b>Ang II</b>	Angiotenzin II
<b>AP1</b>	protein aktivator 1 ( <i>engl. Activator Protein-1</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BCIP/NBT</b>	reagens ( <i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i> )
<b>BH<sub>4</sub></b>	tetrahidrobiopterin ( <i>engl. tetrahydrobiopterin</i> )
<b>BMI</b>	indeks telesne mase ( <i>engl. Body Mass Index</i> )
<b>BSA</b>	albumin goveđeg seruma ( <i>engl. Bovine Serum Albumin</i> )
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	jon kalcijuma
<b>cAMP</b>	ciklični adenzin monofosfat ( <i>engl. Cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>Ct</b>	pražni ciklus ( <i>engl. threshold cycle</i> )
<b>CYP19A1</b>	aromataza, član citohrom P450 familije
<b>DUSP6</b>	specifična fosfataza 6 ( <i>engl. DUal-Specificity Phosphatase 6</i> )
<b>ECL</b>	pojačana hemiluminiscencija ( <i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i> )
<b>eNOS</b>	endotelna NOS ( <i>engl. endothelial NOS</i> )
<b>ER</b>	receptor za estrogene
<b>ERE</b>	elementi odgovora na estrogene ( <i>engl. Estrogen Responsive Elements</i> )
<b>ER<math>\alpha</math></b>	ER alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	ER beta
<b><math>\alpha</math>ERKO</b>	miševi sa specifičnom delecijom gena za ER $\alpha$ ( <i>engl. ER<math>\alpha</math> knockout</i> )
<b>ERK 1/2</b>	kinaza regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2
<b>FAT/CD36</b>	translokaza masnih kiselina ( <i>engl. fatty acid translocase</i> )
<b>GLUT</b>	familija transportera za glukozu ( <i>engl. Glucose Transporters</i> )
<b>GLUT1</b>	GLUT tipa 1 ( <i>engl. Glut Type 1</i> )

<b>GLUT4</b>	GLUT tipa 4 ( <i>engl. Glut Type 4</i> )
<b>GPER</b>	receptor spregnut sa proteinom G ( <i>engl. G-Protein coupled Estrogen Receptor</i> )
<b>HF režim ishrane</b>	ishrana obogaćena mastima ( <i>engl. High Fat Diet</i> )
<b>HNO<sub>2</sub></b>	azotna kiselina
<b>HRP</b>	peroksidaza rena ( <i>engl. Horse Radish Peroxidase</i> )
<b>Hsp</b>	proteini toplotnog stresa ( <i>engl. heat shock proteins</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon- $\gamma$
<b>IKK</b>	kinaza inhibitor NF $\kappa$ B
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	inhibitor NF $\kappa$ B ( <i>engl. Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i> )
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>iNOS</b>	inducibilna NOS ( <i>engl. inducible NOS</i> )
<b>IR</b>	rezistencija na insulin ( <i>engl. Insulin Resistance</i> )
<b>iRNK</b>	informaciona ribonukleinska kiselina
<b>IRS-1</b>	supstrat receptora za insulin 1 ( <i>engl. Insulin Receptor Substrate 1</i> )
<b>JAK</b>	janus kinaza ( <i>engl. Janus Kinase</i> )
<b>K<sup>+</sup></b>	jon kalijuma
<b>KVB</b>	kardiovaskularne bolesti
<b>KVS</b>	kardiovaskularni sistem
<b>L-Arg</b>	L-Arginin
<b>LDL</b>	lipoprotein male gustine ( <i>engl. Low-Density Lipoprotein</i> )
<b>LPS</b>	lipopolisaharidi
<b>MAPK</b>	protein kinaze aktivirane mitogenom ( <i>engl. Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
<b>MAPKK</b>	kinaze MAPK
<b>MAPKKK</b>	kinaze MAPKK
<b>MAPKAPK</b>	MAPK aktivirane protein kinaze ( <i>engl. MAPK-activated protein kinases</i> )
<b>mTORC2</b>	kompleks 2 ciljnog molekula za rapamicin kod sisara ( <i>engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2</i> )
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza</b>	natrijum-kalijum adenzotrifosfataza
<b>NDRG2</b>	N-myc-nishodno regulisan gen 2 ( <i>engl. N-myc downstream-regulated gene 2</i> )

<b>NFκB</b>	nuklearni faktor -κB ( <i>engl. Nuclear Factor-κB</i> )
<b>nNOS</b>	neuronalna NOS ( <i>engl. neuronal NOS</i> )
<b>NO</b>	azot-monoksid ( <i>engl. Nitric Oxide</i> )
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitriti
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitрати
<b>NOS</b>	azot-monoksid-sintaza ( <i>engl. Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	dinitrogen trioksid
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	superoksid anjon
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroksinitrit
<b>PKC</b>	fosfoinozidil-zavisna protein kinaza ( <i>engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase</i> )
<b>PH</b>	domeni homologi plekstrinu ( <i>engl. "Plectkstrin Homology"</i> )
<b>PI3K</b>	fosfatidil-inozitol-3-kinaza ( <i>engl. phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PIP2</b>	fosfatidilinozitol-(4,5)-difosfat ( <i>engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate</i> ).
<b>PIP3</b>	fosfatidilinozitol-(3,4,5)-trifosfat ( <i>engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate</i> )
<b>PKA</b>	protein kinaza A ( <i>engl. protein kinase A</i> )
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>PKG</b>	protein kinaza G
<b>PLA2</b>	fosfolipaza A2
<b>PMCA</b>	plazma membranske Ca <sup>2+</sup> ATPaze ( <i>engl. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase</i> )
<b>PVDF</b>	poliviniliden fluorid membrana ( <i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i> )
<b>qRT-PCR</b>	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu ( <i>engl. Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RhoA</b>	mali GTP vezujući protein ( <i>engl. Ras homolog gene family, member A</i> )
<b>ROCK</b>	RhoA–asocirana protein kinaza ( <i>engl. Rho-associated protein kinase</i> )
<b>SDS</b>	natrijum dodecil sulfat ( <i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS ( <i>engl. SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )

<b>Ser</b>	serin
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> ATPaze na sarkoplazmatičnom retikulumu ( <i>engl. Sarcoendoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase</i> )
<b>SH2</b>	domen 2 homolog Src ( <i>engl. Src Homology 2</i> )
<b>SP1</b>	stimulišući protein 1 ( <i>engl. Stimulating protein 1</i> )
<b>STAT</b>	signalni transduktor i aktivator transkripcije ( <i>engl. Signal Transducer and Activators of Transcription</i> )
<b>Tg</b>	trigliceridi
<b>Thr</b>	treonin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	faktor nekroze tumora- $\alpha$
<b>Tyr</b>	tirozin
<b>VSMC</b>	glatke mišićne ćelije vaskulature ( <i>engl. Vascular Smooth Muscle Cells</i> )

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Patofiziologija gojaznosti.....	3
1.2 Gojaznost i insulinska rezistencija.....	4
1.3. Gojaznost i kardiovaskularna oboljenja.....	5
1.4. Gojaznost kod žena .....	6
1.5. Estradiol: građa, molekularni mehanizam delovanja i funkcija u srcu .....	7
1.5.1. Estradiol u gojaznosti.....	10
1.6. Funkcija azot-monoksida i azot-monoksid sintaza .....	11
1.6.1. Funkcija azot-monoksida .....	11
1.6.2. Azot-monoksid sintaze.....	13
1.6.3. Azot-monoksid sintaze - inducibilna forma.....	17
1.6.3.1. Funkcija iNOS enzima u fiziološkim uslovima .....	19
1.6.3.2. Funkcija iNOS enzima u patofiziološkim uslovima .....	19
1.6.3.3. Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS pod delovanjem estradiola .....	20
1.7. Građa i funkcija natrijum-kalijum adenozin trifosfataze .....	23
1.7.1. Fiziološka uloga Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze .....	26
1.7.2. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza u patofiziološkim stanjima .....	27
1.7.3. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza u gojaznosti .....	28
1.7.4. Regulacija Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze pod delovanjem estradiola .....	30
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA.....	32
2.1. Hipoteza.....	32
2.2. Ciljevi rada.....	33
3. MATERIJAL I METODE .....	34

3.1. Eksperimentalne životinje.....	34
3.2. Izdvajanje seruma iz krvi pacova.....	35
3.3. Izdvajanje ukupnih proteina iz srca ženki pacova .....	36
3.4. Izdvajanje membranske frakcije proteina iz srca ženki pacova.....	36
3.5. Merenje koncentracije izolovanih proteina.....	37
3.6. Merenje nivoa estradiola u serumu ženki pacova .....	38
3.7. Određivanje nivoa NO u lizatu tkiva srca ženki pacova.....	38
3.8. Merenje nivoa L-Arginina (L-Arg) u lizatima srca ženki pacova .....	40
3.9. Merenje nivoa slobodnih masnih kiselina (SMK) u lizatima srca ženki pacova.....	41
3.10. Merenje aktivnosti Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze.....	42
3.11. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) .....	43
3.12. Imuno blot.....	44
3.13. Ko-imunoprecipitacija IRS-1 i p85 subedinice PI3K.....	47
3.14. Određivanje ekspresije iRNK za iNOS.....	48
3.14.1. Izolovanje RNK .....	48
3.14.2. Metoda revezne transkripcije-sinteza cDNK.....	49
3.14.3. Određivanje nivoa ekspresije iNOS gena .....	49
3.15. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata .....	51
4. REZULTATI.....	52
4.1. Masa srca ženki pacova .....	53
4.2. Koncentracija estradiola u serumu gojaznih ženki pacova.....	54
4.3. Količina ER $\alpha$ u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	55

4.4. Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	56
4.4.1. Količina p50 subjedinice transkripcionog faktora NFkB u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	56
4.4.2. Analiza ekspresije gena za iNOS na nivou iRNK u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	58
4.4.3. Analiza ekspresije gena za iNOS na nivou proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	59
4.4.4. Količina L-Arg u lizatima srca ženki pacova .....	60
4.4.5. Koncentracija NO u lizatima srca ženki pacova .....	61
4.5. Nivo CD36 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	62
4.6. Koncentracija SMK u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	64
4.7. Nivo GLUT-1 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	65
4.8. Nivo GLUT-4 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	67
4.9. Regulacija ekspresije i aktivnosti Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu ženki pacova .....	69
4.9.1. Efekti HF dijete na nivo fosforilacije i nivo proteina $\alpha_1$ subjedinice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu ženki pacova.....	69
4.9.2. Nivo proteina $\alpha_2$ subjedinice Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	71
4.9.3. Aktivnost Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	72
4.9.4. Količina NDRG2 proteina u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	73
4.10. Signalni putevi kojima je regulisana ekspresija i aktivnost iNOS i Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova .....	74
4.10.1. Nivo p85 i p110 subjedinica PI3K u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	74
4.10.2. Asocijacija IRS-1 i p85 subjedinice PI3K u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova	76
4.10.3. Fosforilacija i nivo Akt proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	77
4.10.4. Ekspresija i fosforilacija ERK 1/2 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	79
4.10.5. Nivo RhoA u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.....	81
4.10.6. Nivo ROCK2 u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	82
4.10.7. Nivo ROCK1 u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova .....	83



5. DISKUSIJA .....	84
6. ZAKLJUČCI.....	104
7. LITERATURA .....	106
8. BIOGRAFIJA.....	131
9. PRILOZI.....	132

## 1.UVOD

U današnje vreme je epidemija gojaznosti u sve većem porastu ne samo u svetu, već i u našoj zemlji. Gojaznost je povezana sa nizom patoloških stanja, uključujući: rezistenciju na insulin (IR), kardiovaskularne bolesti (KVB) i *Diabetes Mellitus* tipa 2 (DMT2). Literaturni podaci pokazuju da režim ishrane obogaćene mastima (HF; *engl. High Fat*) dovodi do povećanja količine masnog tkiva (Oakes i sar., 1997). U velikom broju eksperimentalnih i kliničkih studija pokazano je postojanje polno specifičnih razlika u predispoziciji za razvoj poremećaja tipa IR, DMT2 i KVB (Bogardus i sar., 1985; Bonadonna i sar., 1990; Carley i Severson, 2005; Al-Daghri i sar., 2010; Barros i Gustafsson, 2011). Rizik od komorbiditeta povezanih sa gojaznošću je jasno definisan kod muškaraca, ali ne i kod žena pre menopauze. Hormon estradiol svojim delovanjem sprečava nastanak IR i hiperglikemije, a takođe ostvaruje i pozitivne efekte na kardiovaskularni sistem (KVS) (Barros i Gustafsson, 2011). Međutim, sinteza i kardioprotektivni uticaj estradiola mogu biti smanjeni usled razvoja gojaznosti indukovane HF ishranom (Balasubramanian i sar., 2012).

Inducibilna azot-monoksid sintaza (iNOS; *engl. Inducible Nitric Oxide Synthase*) u fiziološkim uslovima se manje eksprimira u srcu, ali u stanju gojaznosti proinflamatorni citokini, slobodne masne kiseline (SMK) i glukoza povećavaju ekspresiju i aktivnost ovog enzima (Rao, 2000; Fujimoto i sar., 2005; Bai i sar., 2011). U eksperimentalnim modelima gojaznosti, takođe je pokazana povećana ekspresija i aktivnost iNOS u srcu (Cao i sar., 2011), koja može dovesti do apoptoze kardiomiocita i hipertrofije srca, što predstavlja jednu od ključnih veza između gojaznosti i KVB (Mungrue i sar., 2002; Cao i sar., 2011).

# 1. Uvod

Natrijum-kalijum adenzotriofsfataza ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza) je membranski protein čija je funkcija da održava elektrohemijski gradijent  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  jona kroz ćelijsku membranu, koristeći pri tome energiju dobijenu hidrolizom adenzotriofsfata (ATP).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza je izgrađena od  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinica. Katalitičke  $\alpha$  subjedinice su odgovorne za transport katjona i katalitička svojstva enzima, dok su regulatorne  $\beta$  subjedinice odgovorne za vezivanje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze sa plazma membranom i često se nazivaju vezujućim subjedinicama, (Rose i Valdes, 1994). Takođe,  $\gamma$  subjedinica ima ulogu u održavanju stabilnosti i kinetičkih osobina  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Ovaj tip subjedinica pripada FXDY familiji proteina, a konkretno u srcu je ekspimirana FXDY1 subjedinica ili fosfoleman (*engl. phospholemman*) (Lifshitz i sar., 2006). Do sada su otkrivene četiri izoforme  $\alpha$  subjedinica, od kojih su u srcu pacova ekspimirane  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  (Skou i Esmann, 1992; Lingrel i Kuntzweiler, 1994; Canfield i sar., 2002).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza reguliše kontraktilnost vaskulature i pretpostavlja se da je uključena u razvoj sistemske hipertenzije, jer smanjenje transsarkolemalnog gradijenta  $\text{Na}^+$  jona dovodi do hipertrofije srca (Rose i Valdes, 1994; Obradovic i sar., 2014). Takođe je pokazano da je gojaznost združena sa IR povezana sa smanjenjem aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu, jetri i skeletnim mišićima (Rose i Valdes, 1994).

U našim publikovanim rezultatima (Obradovic i sar., 2014; Sudar Milovanovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2018) je pokazano da su ekspresija i aktivnost kako iNOS, tako i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih pacova regulisana različitim signalnim molekulima i kinazama, kao što su: supstrat receptora za insulin 1 (IRS-1; *engl. Insulin Receptor Substrate*), fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K; *engl. Phosphatidylinositide 3-Kinase*), protein kinaza B (Akt; *engl. Protein Kinase B*), ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2; *engl. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 i 2*) kao i RhoA (*engl. Ras homolog gene family, member A*) i RhoA kinaza (ROCK; *engl. Rho-associated protein kinase*).

Estradiol protektivno deluje na KVS, između ostalog, i tako što reguliše ekspresiju i aktivnost iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Receptori za estrogene (ER; *engl. Estrogen Receptor*) kojima estradiol negativno reguliše transkripciju gena za inflamatorne molekule, kao što je iNOS, mogu biti smešteni u jedru, citoplazmi ili na plazma membrani (Barros i Gustafsson, 2011). Pokazano je da ER mogu interagovati sa drugim faktorima transkripcije, uključujući

# 1. Uvod

nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B; *engl. Nuclear Factor- $\kappa$ B*), sprečavajući na taj način njegovu translokaciju u jedro i pokretanje transkripcije gena za iNOS. Takođe, estradiol svojim delovanjem utiče na povećanje aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze posredstvom IRS-1/PI3K/Akt, ERK1/2 kao i RhoA/ROCK signalnih puteva i na taj način stimuliše sintezu novih  $\alpha$  subjedinica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Dzurba i sar., 1997; Palacios i sar., 2004; Palacios i sar., 2004; Sudar i sar., 2008; Obradovic i sar., 2014). Osim toga, pokazano je da estradiol pozitivno reguliše ekspresiju N-myc-nishodno regulisanog gena 2 (NDRG2; *engl. N-myc downstream-regulated gene 2*), za koga je ustanovljeno da se vezuje za  $\beta$  subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i tako sprečava njenu degradaciju posredovanu ubikvitinom (Li i sar., 2011). Osim neposrednog dejstva na srce, estradiol može uticati na funkciju KVS putem regulacije homeostaze glukoze i SMK, i to tako što ima efekte na ekspresiju i lokalizaciju transportera glukoze (GLUT; *engl. Glucose Transporters*), izoformi 1 i 4 (GLUT 1 i 4), i translokaze masnih kiselina FAT/CD36 (*engl. Fatty Acid Translocase*) (Luiken i sar., 2004).

Danas je jasno da postoji tesna veza između gojaznosti i KVB, ali molekularni mehanizmi, koji leže u osnovi ove veze još nisu dovoljno poznati, posebno kod žena. Takođe, nedovoljno su poznati efekti HF režima ishrane na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu ženki pacova, kao i mehanizmi kojima stanje gojaznosti remeti kardioprotektivne efekte estradiola. Razumevanje molekularnih mehanizama uključenih u nastanak KVB kod gojaznih žena je od izuzetne važnosti za razvoj novih strategija za lečenje KVB.

## 1.1. Patofiziologija gojaznosti

Po definiciji gojaznost je procentualno povećanje masne mase u odnosu na ukupnu masu tela, koje može dovesti do mnogobrojnih zdravstvenih komplikacija. Gojaznost nastaje kao posledica prekomernog kalorijskog unosa, bez adekvatnog utroška energije (Kojima i Kangawa, 2005; Hassouna i sar., 2010), pri čemu se višak kalorija skladišti u masnom tkivu i/ili u drugim organima kao što su skeletni mišići, jetra i srce (Snel i sar., 2012). Epidemija gojaznosti je u stalnom porastu, i predstavlja sve veći medicinski problem u savremenoj civilizaciji. Imajući u vidu da se gojaznost najčešće ne javlja izolovano od drugih poremećaja

# 1. Uvod

u organizmu i da povećava rizik za razvoj IR, KVB kao i DMT2, gojaznost je jedan od vodećih uzroka povećane stope smrtnosti u svetu (Grujic i sar., 2010; Reaven, 2011). Na osnovu podataka koje je objavila svetska zdravstvena organizacija (SZO), može se primetiti da se od 1975. do 2016. godine broj gojaznih osoba utrostručio, a procenjeno je da prekomernu telesnu masu ima 39% osoba od čega je 13% gojazno (SZO, 2016) Takođe, veći deo odraslih osoba u Srbiji (54%) ima problem povećane mase tela, od čega je 36,7% osoba u stanju predgojaznosti, a 17,3% su gojazne (Grujic i sar., 2010).

Gojaznost je povezana sa hroničnim inflamatornim stanjem, što dovodi do razvoja različitih poremećaja, a posebno disfunkcije metabolizma. Gojaznost je glavni faktor koji doprinosi poremećaju metabolizma glukoze i lipida, a pored toga doprinosi disfunkciji niza organa i organskih sistema, uključujući srce i jetru, kao i plućni, endokrini i reproduktivni sistem (Redinger, 2007). Proinflamatorni citokini poreklom iz masnog tkiva, kao što je faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nepovoljno utiču na lučenje insulina iz pankreasa, a takođe mogu uticati na razvoj KVB (Ferrari, 1999). Osim toga, gojaznost doprinosi disfunkciji imunog sistema i predstavlja glavni faktor rizika razvoja mnogih vrsta karcinoma, uključujući hepatocelularne, ezofagusne kao i karcinom debelog creva (De Pergola i Silvestris, 2013). S obzirom na sve štetne efekte gojaznosti na organizam, a pre svega njen uticaj na razvoj metaboličkog sindroma, neophodne su metode prevencije i lečenja ovog oboljenja.

## 1.2 Gojaznost i insulinska rezistencija

Rezistencija na insulin se može definisati kao poremećaj u funkcionisanju signalnog puta insulina (Pessin i Saltiel, 2000), tj. stanje u kome periferna tkiva nisu u mogućnosti da odgovore na fiziološke koncentracije insulina u cirkulaciji (Sowers i sar., 1994; Reaven i sar., 1996; Nolan i sar., 1997; Hunter i Garvey, 1998). Homeostaza glukoze zavisi od nivoa insulina u krvi, a sama sekrecija insulina varira, pri čemu u situacijama kao što su povećana masa tela, smanjena osetljivost na insulin i početni stadijumi IR, lučenje insulina je pojačano kako bi se zadovoljile potrebe organizma (Bonadonna i sar., 1990; Abel i sar., 2012). Međutim, prilikom dugotrajne hiperinsulinemije dolazi do poremećaja u transportu

# 1. Uvod

glukoze kao i do smanjene funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa, što rezultuje razvojem DMT2 (Petersen i Shulman, 2002).

Veza između gojaznosti i razvoja IR je dobro poznata, a mehanizmi kojima gojaznost doprinosi razvoju IR su mnogobrojni (Bonadonna i sar., 1990; McFarlane i sar., 2001; Reaven, 2001; Hardy i sar., 2012). Sa jedne strane, povećana stopa oksidacije SMK dovodi do inhibicije oksidacije glukoze, a kao posledica se javlja poremećaj homeostaze glukoze, kao i hiperinsulinemija i IR (Mazumder i sar., 2004; Carley i Severson, 2005). Takođe, smatra se da je oksidativni stres koji nastaje kao posledica povećane oksidacije SMK preduslov za nastanak IR, te da se IR javlja kao zaštitni mehanizam kojim se sprečava oštećenje tkiva uzrokovano oksidativnim stresom (Houstis i sar., 2006; Pospisilik i sar., 2007; Kumashiro i sar., 2008). Dalje, poznato je da masno tkivo ima i endokrinu funkciju, jer luči niz adipokina kao i inflamatornih citokina koji menjaju senzitivnost na insulin u nizu organa uključujući jetru, skeletne mišiće i srce (Kim i sar., 2004). U stanju gojaznosti se često javlja i ektopična akumulacija masti u ne-adipoznim tkivima, što rezultuje u lipotoksičnosti i povećanoj proizvodnji toksičnih proizvoda koji remete signalni put insulina (Qureshi i Abrams, 2007; Hardy i sar., 2012).

## 1.3. Gojaznost i kardiovaskularna oboljenja

Danas se smatra da je gojaznošću uzrokovana IR, jedan od prvih koraka u nastanku KVB (Kolterman i sar., 1981; Bogardus i sar., 1985; Godfrey i Barker, 2000; Morisco i sar., 2006). Iako IR nema direktan uticaj na nastanak bolesti srca, literaturni podaci pokazuju da IR doprinosi razvoju KVB, tako što uzrokuje hipertenziju, poremećaje u metabolizmu lipida kao i poremećaje u lučenju proinflamatornih adipocitokina (Young, 2010), (Shulman, 2000; Rask-Madsen i King, 2007). Pojava IR je česta kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom česta je IR (Witteles i Fowler, 2008), što opet ukazuje da bi na poremećaje rada srca mogla da utiče sistemska ili lokalna IR. Takođe, podaci iz literature ukazuju da bi poremećaji metabolizma SMK u srcu mogli biti uzrok razvoja kardiomiopatija povezanih sa gojaznošću (Lopaschuk i sar., 2007). Akumulacija lipida u srcu, koja nastaje kao posledica disbalansa između preuzimanja i oksidacije SMK, može doprineti brojnim srčanim patologijama

(Lopaschuk i sar., 2007). Pacijenti sa urođenim defektima u oksidaciji masnih kiselina često razvijaju kardiomiopatiju, hipertrofiju i remodelovanje zida leve komore, kao i srčanu insuficijenciju povezanu sa akumulacijom lipida u srcu (Kelly i Strauss, 1994; Marin-Garcia i Goldenthal, 2002). Slično tome, gojazni hiperlipidemični pacovi razvijaju kardiomiopatiju povezanu sa unutarćelijskom akumulacijom triacilglicerida (TG) i keramida, što se može sprečiti snižavanjem koncentracije TG, SMK i glukoze u cirkulaciji (Finck i sar., 2003). Takođe, kao posledica poremećaja oksidacije SMK dolazi do inhibicije oksidacije piruvata i povećane produkcije laktata, što rezultuje u nakupljanju kalcijumovih jona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) u kardiomiocitima (Liu i sar., 1996). Kako bi se ponovo uspostavila homeostaza  $\text{Ca}^{2+}$  u ćelijama, aktiviraju se  $\text{Ca}^{2+}$  ATPaze koje se nalaze na sarkoplazmatičnom retikulimu (SERCA; engl. *Sarcoendoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) i plazma membrani (PMCA; *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*), čime se povećava potrošnja ATP, što doprinosi smanjuju efikasnosti srca (Gamble i Lopaschuk, 1994).

## 1.4. Gojaznost kod žena

Iako su i muškarci i žene podložni gojaznosti, učestalost i posledice gojaznosti po zdravlje se razlikuju između polova. Muškarci i žene se razlikuju u procentu masti, distribuciji masnog tkiva, kao i u iskorišćavanju masti kao metaboličkog goriva. Ove razlike počinju rano u životu i dalje se povećavaju tokom puberteta, i delimično, mogu biti posledica dejstva estrogena, koji predstavljaju grupu steroidnih hormona sa važnom ulogom u rastu, razviću i reprodukciji (Louet i sar., 2004; Baba i sar., 2005; Power i Schulkin, 2008; Hong i sar., 2009). Takođe, poremećaji povezani sa gojaznošću, kao što su hipertenzija i IR se ređe javljaju kod osoba ženskog pola (Al-Daghri i sar., 2010; Maas i Appelman, 2010).

Pokazano je da žene, čak i pre menopauze, imaju veći procenat masnog tkiva u odnosu na muškarce, pa tako količina masnog tkiva kod žena čiji je indeks telesne mase (BMI, engl. *Body Mass Index*) između 18 i 25  $\text{kg/m}^2$  odgovara količini masnog tkiva kod gojaznih muškaraca kod kojih je  $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$  (Geer i Shen, 2009). Za žene je karakteristična periferna distribucija masnog tkiva, odnosno nagomilavanje masti na bokovima i butinama, dok se kod muškaraca češće javlja centralna (abdominalna) distribucija masnog tkiva,

# 1. Uvod

odnosno nakupljanje masti oko unutrašnjih organa (Nielsen i sar., 2004; Power i Schulkin, 2008). Takođe, kod žena je prisutna veća količina potkožnog masnog tkiva, a kod muškaraca visceralnog masnog tkiva (Power i Schulkin, 2008). Pokazano je da je centralna gojaznost posebno opasna, imajući u vidu da se u tom slučaju masti nakupljaju oko vitalnih organa, ometaju njihov rad, a takođe može doći do povećanog oslobađanja lipida u cirkulaciju. Centralna gojaznost je povezana sa povećanom učestalošću IR, DMT2, hipertenzije, dislipidemije i KVB (Karelis i sar., 2004; Goodpaster i sar., 2005; Racette i sar., 2006), dok je periferna distribucija masnog tkiva povezana sa boljom senzitivnošću na insulin (Garaulet i sar., 2000). Međutim, iako je kod žena sa prekomernom telesnom masom generalno manja učestalost metaboličkog sindroma u odnosu na muškarce, u ekstremnim slučajevima, kada je procenat masnog tkiva veći od 30% od ukupne telesne mase, čak i kod žena dolazi do nakupljanja viseralne masti i razvoja komorbiditeta povezanih sa gojaznošću (Power i Schulkin, 2008).

## **1.5. Estradiol: građa, molekularni mehanizam delovanja i funkcija u srcu**

Estrogeni su prevashodno ženski polni hormoni. Glavne forme estrogena su estron, estradiol i estriol, pri čemu je estradiol predominantna forma (Barros i sar., 2006). Estrogeni pripadaju grupi steroidnih hormona, a prekursor za njihovu sintezu je holesterol (Kumar i sar., 2018). Prvi korak u sintezi estradiola je stvaranje 4-androstenediona iz holesterola, koji naknadno enzim aromataza (CYP19A1, član citohrom P450 familije) prevodi u estron, a zatim 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza prevodi estron u estradiol. Takođe, estradiol može biti sintetisan aromatizacijom testosterona pod delovanjem aromataze (Pollow i sar., 1975; Mendoza-Hernandez i sar., 1984). Kod žena, estradiol prvenstveno sintetišu ovarijumi i placenta, dok su kod muškaraca testisi primarno mesto sinteze estradiola. Takođe, manje količine estradiola se sintetišu u jetri, nadbubrežnim žlezdama, kao i u svim tkivima u kojima je eksprimirana aromataza, uključujući i srce i krvne sudove (Harada, 1999; Kumar i sar., 2018)



# 1. Uvod

Estradiol svoje efekte ostvaruje interakcijom sa ER koji mogu biti smešteni u plazma membrani, citoplazmi ili u jedru (Kumar i sar., 2018). Prvi tip ER koji je otkriven je ER $\alpha$ , a trideset godina kasnije pokazano je postojanje i ER $\beta$  (Barros i sar., 2006; Barros i Gustafsson, 2011). Oba tipa ER su eksprimirana u srcu i pripadaju superfamiliji steroidnih receptora. Poslednjih godina otkriveno je postojanje trećeg tipa receptora za estrogene, a to je membranski receptor za estrogene spregnut sa proteinom G (GPER, *engl. G-Protein coupled Estrogen Receptor*) (Horard i Vanacker, 2003; Murphy, 2011). Estradiol može delovati genomskim i negenomskim signalnim putevima (Segars i Driggers, 2002). Genomski način delovanja estradiola je spor proces i potrebno je od 12 do 24 h kako bi bilo koji fiziološki efekat bio očigledan. Posredovan je vezivanjem estradiola za ER lokalizovane u citosolu. Vezivanje estradiola za ligand-vezujući domen (LBD; *engl. Ligand Binding Domain*) ER dovodi do promene u konformaciji ovog receptora, rezultujući u homo ili heterodimerizaciji ER. Dalje, dimer ulazi u jedro i zahvaljujući DNK-vezujućem domenu (DBD; *engl. DNA Binding Domain*) vezuje se za elemente odgovora na estrogene (ERE; *engl. estrogen response elements*) promotora ciljnih gena. Takođe, ligandom-aktiviran ER može da se veže i za ne-ERE sekvence, i to interakcijom ER sa faktorima transkripcije kao što su aktivatorski protein-1 (AP1), specifični protein-1 (SP1) ili NF $\kappa$ B (Peschon i sar., 1998; Kushner i sar., 2000).

Estradiol može delovati i brzim negenomskim putem, koji uključuje aktivaciju GPER vezanog palmitinskom kiselinom za plazma membranu. Osim toga, postoji i ligand-nezavisni signalni put, koji podrazumeva ER-indukovanu aktivaciju brojnih unutarćelijskih signalnih puteva uključujući PI3K/Akt, protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK; *engl. Mitogen-Activated Protein Kinase*), janus kinaza/signalni pretvarač i aktivator transkripcije (JAK-STAT, *engl. Janus Kinase/Signal Transducer and Activators of Transcription*), citosolnu fosfolipazu A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) i RhoA/ROCK (Moriarty i sar., 2006; Hammes i Levin, 2007). Različiti signalni putevi koji utiču na ER uzrokuju različite tkivno specifične odgovore na estradiol (Barros i sar., 2006; Barros i Gustafsson, 2011). Ovi signalni putevi ostvaruju svoj efekat putem fosforilacije ER protein kinazama, ili indirektno putem regulacije kofaktora vezanih za ER.

# 1. Uvod

Estrogeni regulišu mnogobrojne fiziološke i patofiziološke procese, kako kod žena, tako i kod muškaraca (Couse i Korach, 1999; Wu i sar., 2012). Poznato je da estradiol u velikoj meri utiče na sazrevanje i pravilnu funkciju reproduktivnog sistema kod žena, dok kod muškaraca ima važnu ulogu tokom spermatogeneze (Rosenfeld i sar., 2001; Drummond, 2006). Dobro su poznate i nereproduktivne funkcije estradiola, koje uključuju indirektno i direktne efekte na KVS (Kumar i sar., 2018). Estradiol reguliše metabolizam i homeostazu masti i glukoze, i na taj način indirektno doprinosi pravilnom funkcionisanju KVS (Vegeto i sar., 2003; Simpson i Santen, 2015). Smanjenje senzitivnosti na insulin, kao i povećana incidenca IR i DMT2 sa nastupanjem menopauze ukazuje na to da bi estrogeni mogli imati značajnu ulogu u regulaciji senzitivnosti na insulin (Hirota i sar., 1995). Takođe, estrogeni imaju antioksidativna svojstva i utvrđeno je da povećavaju otpornost na oksidativni stres kao i aktivnost antioksidativnih enzima kod miševa (Baba i sar., 2005). Osim toga, pokazano je da estradiol ima uticaj i na smanjenje nivoa kako ukupnog holesterola, tako i holesterola koji se prenosi lipoproteinima male gustine (LDL holesterol), kao i da je uključen u regulaciju energetske homeostaze (Pickar i sar., 1998; Lizcano i Guzman, 2014). Veliki broj istraživanja pokazuje da estradiol ostvaruje i direktne efekte na KVS, te se stoga estrogeni ubrajaju u hormone bitne za normalno funkcionisanje KVS (Brown i sar., 2000). Pokazano je prisustvo značajnih razlika u reaktivnosti vaskulature ženki i mužjaka goladara pod delovanjem estradiola (O'Donnell i Owen, 1994; Schwertz i Penckofer, 2001; Sader i Celermajer, 2002). Estradiol ima veoma važnu ulogu u modulaciji odgovora vaskulature na vazodilatatore (Cheng DY, 1994), kao i efekte na funkciju endotela i kontraktilnost glatkih mišićnih ćelija, koja doprinosi razlici u vaskularnom tonusu među polovima (Huang i sar., 1997; Mendelsohn i Karas, 1999). Doolen i saradnici (1999) su pokazali da endogeni estradiol poboljšava funkciju MT2 receptora za melatonin u kaudalnoj arteriji ženki pacova, i time doprinosi povećanoj vazodilataciji u odgovoru na melatonin. Estradiol doprinosi vazodilataciji i tako što povećava ekspresiju eNOS, i time utiče na sintezu NO (Resta i sar., 2001 (Darblade i sar., 2002; Desjardins i Balligand, 2006; Bian i sar., 2008). Osim toga, efekti estradiola na KVS uključuju, između ostalog i regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Darblade i sar., 2002; Palacios i sar., 2004; Zafirovic i sar., 2018). Sa jedne strane, estradiol smanjuje ekspresiju iNOS i time doprinosi smanjenju inflamacije u krvnim sudovima, dok sa druge strane utiče na povećanje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, i na taj način povoljno utiče na

funkciju KVS (Zafirović i sar., 2018, Palacios i sar., 2004, Džurba i sar., 1997). Takođe, u KVS estradiol genomskim putem utiče na smanjenje rasta glatkih mišićnih ćelija vaskulature (VSMC; *engl. Vascular Smooth Muscle Cells*) i endotelnih ćelija, kao i na smanjenje razvoja ateroskleroze (Kumar i sar., 2018).

## 1.5.1. Estradiol u gojznosti

Održavanje fiziološke koncentracije estradiola i odgovarajuće aktivnosti signalnog puta estradiola kritične su za optimalno funkcionisanje različitih fizioloških procesa. Shodno tome, povećanje ili smanjenje nivoa estradiola van fizioloških granica, kao i poremećaji signalnog puta estradiola doprinose razvoju i progresiji brojnih bolesti kao što su IR, KVB, kancer, osteoporoza i neurodegenerativne bolesti (Kumar i sar., 2018).

I pored toga što je učestalost KVB manja kod žena pre ulaska u menopauzu, u poređenju sa muškarcima, u stanjima gojznosti i IR ove polno specifične razlike se smanjuju. Gojznost utiče nepovoljno na sve funkcije tela, uključujući reprodukciju, i može izazvati poremećaje ovulacije i neplodnost (Zain i Norman, 2008). Pokazano je da HF režim ishrane smanjuje nivo estradiola kod ženki pacova (Balasubramanian i sar., 2012). Pojačano lučenje leptina, karakteristično za gojznost, može inhibirati sintezu pregnenolona, prekursora za sintezu estradiola (Zachow i Magoffin, 1997). Takođe, ekspresija aromataze, ključnog enzima koji reguliše biosintezu estradiola, značajno je smanjena u masnom tkivu ženki miševa na HF ishrani (Guo i sar., 2012). Pored toga, postoje istraživanja koja ukazuju na to da HF ishrana menja ekspresiju ER (Hilakivi-Clarke i sar., 1998; Gorres i sar., 2011; Guo i sar., 2012), odnosno može dovesti do smanjene ekspresije ER u masnom tkivu i skeletnim mišićima (Gorres i sar., 2011). Poremećaji u aktivaciji ER su implicirani u nekoliko patofizioloških stanja, uključujući DMT2, kao i KVB uzrokovane gojznošću (Couse i sar., 1997; Nilsson i Gustafsson, 2002; Ascenzi i sar., 2006). Pokazano je da su određeni polimorfizmi u okviru gena za ER $\alpha$  povezani sa povećanim rizikom za razvoj KVB (Luo i Kim, 2016). Sa druge strane, literaturni podaci koje se odnose na učešće ER $\beta$  u razvoju KVB, su ograničeni i nekonzistentni, a čak je i pokazano da je polimorfizam gena za ER $\beta$ , rs1256049, povezanam sa manjim rizikom za razvoj infarktuma miokarduma u ženskom

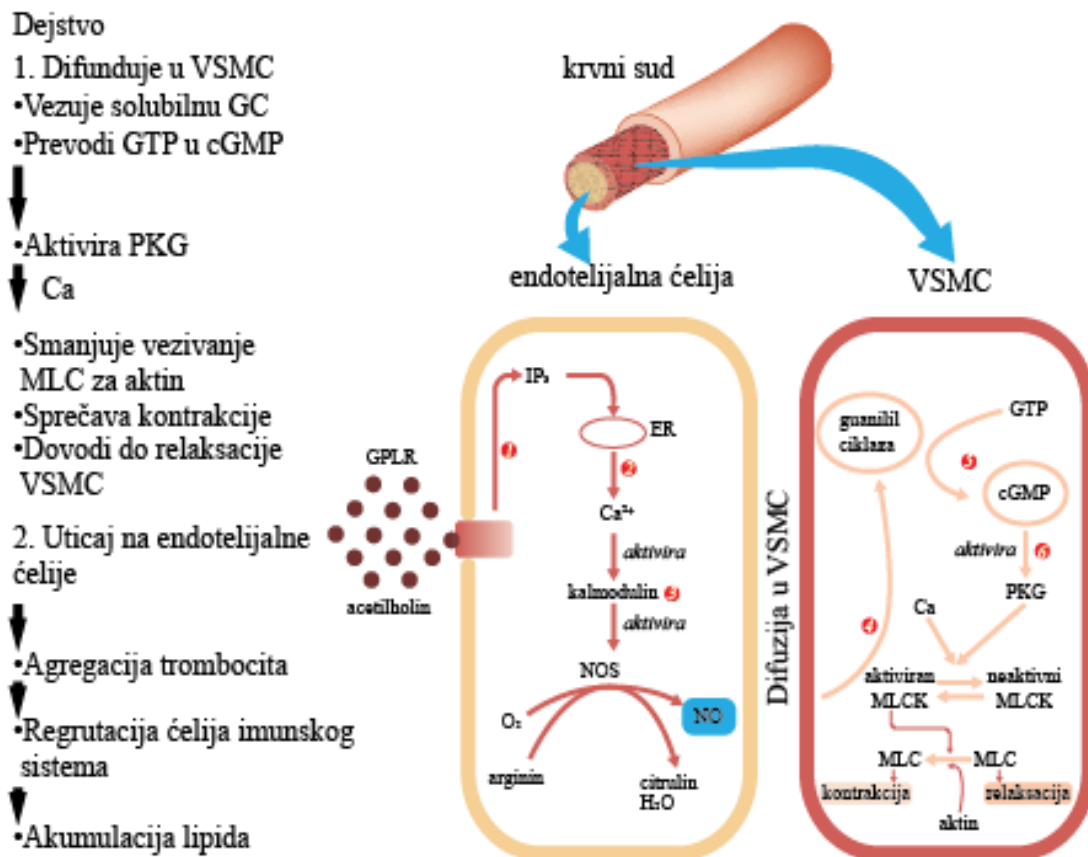
delu španske populacije (Rexrode i sar., 2007). Osim toga, kod miševa sa specifičnom delecijom gena za ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO; engl. *ER $\alpha$  knockout*) dolazi do promena u selekciji supstrata u kardiomiocitima, pri čemu dolazi do povećanja oksidacije SMK u korist smanjenja oksidacije glukoze, te je otežano održavanje homeostaze glukoze u srcu (Arias-Loza i sar., 2012). Takođe,  $\alpha$ ERKO miševi su gojazni i insulin-rezistentni čak i u odsustvu HF ishrane (Heine i sar., 2000; Riant i sar., 2009; Ribas i sar., 2010).

## 1.6. Funkcija azot-monoksida i azot-monoksid sintaza

### 1.6.1. Funkcija azot-monoksida

Azot-monoksid (NO) predstavlja važan signalni molekul, koji ima ulogu u regulaciji brojnih metaboličkih, biosintetskih i signalnih procesa u ćelijama, a pored toga utiče i na regulaciju fiziologije KVS (Mayer i Hemmens, 1997). NO održava integritet sistema krvnih sudova sprečavajući agregaciju trombocita, adheziju leukocita za endotelijum kao i proliferaciju VSMC (Favero i sar., 2014). Održavanje odgovarajućeg nivoa NO u endotelu je neophodno za normalno funkcionisanje vaskularnog sistema, dok njegova smanjena dostupnost povećava rizik za nastanak poremećaja funkcionisanja endotela i povećava verovatnoću za razvoj ateroskleroze (**Slika 1.**) (Luscher i Vanhoutte, 1990; Davignon i Ganz, 2004; Flammer i Luscher, 2010). Pokazano je da molekuli koji imaju svojstva vazodilatatora, kao što je acetilholin, dovode do relaksacije VSMC tako što povećavaju produkciju NO (Palmer i sar., 1988; Boerrigter i Burnett, 2007; Flammer i Luscher, 2010; Dobutovic i sar., 2011). NO svoje efekte ostvaruje reagujući sa nizom drugih molekula, međutim glavni put podrazumeva aktivaciju solubilne guanilat ciklaze i sintezu cikličnog guanozin monofosata (cGMP), a ceo proces je detaljno prikazan na **Slici 1.** (Mayer i sar., 1995; Hobbs, 1997; Bian i sar., 2008).

## Azot-monoksid



Slika 1. Šematski prikaz delovanja NO u endotelijumu

Na slici je prikazan mehanizam nastanka i dejstvo NO. Vezivanjem acetilholina za muskarinske receptore se pokreće sinteza IP<sub>3</sub>, kao i oslobađanje Ca<sup>2+</sup> iz sarkoplazmatičnog retikuluma. Povraćanjem unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup> aktivira kalmodulin, a posledično i NOS i sintetiše se NO. Dalje, NO difunduje u VSMC i dovodi do aktivacije sGC, koja prevodi GTP u cGMP. Kao posledica, dolazi do aktivacije PKG, koja potom aktivira MLCK, a zatim MLCK putem fosforilacije MLC reguliše kontrakciju/relaksaciju VSMC. NO-Azot-monoksid; NOS- azot-monoksid sintaze; VSMC- glatke mišićne ćelije vaskulature; sGC- solubilna guanilat ciklaza; GTP- guanozin trifosfat; cGMP- ciklični guanozin monofosfat; PKG- protein kinaza G; MLC- laki lanac miozina; IP<sub>3</sub>- inozitol trifosfat; ER- sarkoplazmatični retikulum; MLCK- MLC kinaza. (preuzeto i modifikovano sa sajta: <https://www.slideshare.net/SacredEvhul/nitric-oxide-and-its-role-in-therapeutics-59980657>)

# 1. Uvod

Pokazano je da su hipertenzija, hiperholesterolemija, DMT2, šlog kao i hronična srčana insuficijencija povezani sa smanjenom biodostupnošću NO, koja može nastati kao posledica smanjene ekspresije i aktivnosti NOS ili usled interakcije NO sa reaktivnim vrstama kiseonika (ROS) (Sarkar i sar., 1996; Sarkar i Webb, 1998; Naseem, 2005; Desjardins i Balligand, 2006; Zago i Zanesco, 2006; Earle i sar., 2009; Napoli i Ignarro, 2009; Zoccali, 2010). Mnogi drugi faktori mogu uticati na smanjenu dostupnost NO, kao što su smanjeno preuzimanje L-Arginina (L-Arg) i smanjena koncentracija kofaktora za NOS ( $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulina (CaM), tetrahidrobiopterin (BH4)) u cirkulaciji (Bogle i sar., 1992; Desjardins i Balligand, 2006; Dobutovic i sar., 2011). Osim toga, NO može interagovati sa ROS i formirati toksične intermedijere, kao što je peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), na taj način doprinoseći vaskularnom oksidativnom stresu (McDonald i sar., 1997; Forstermann, 2010; Sibal i sar., 2010; Dobutovic i sar., 2011)

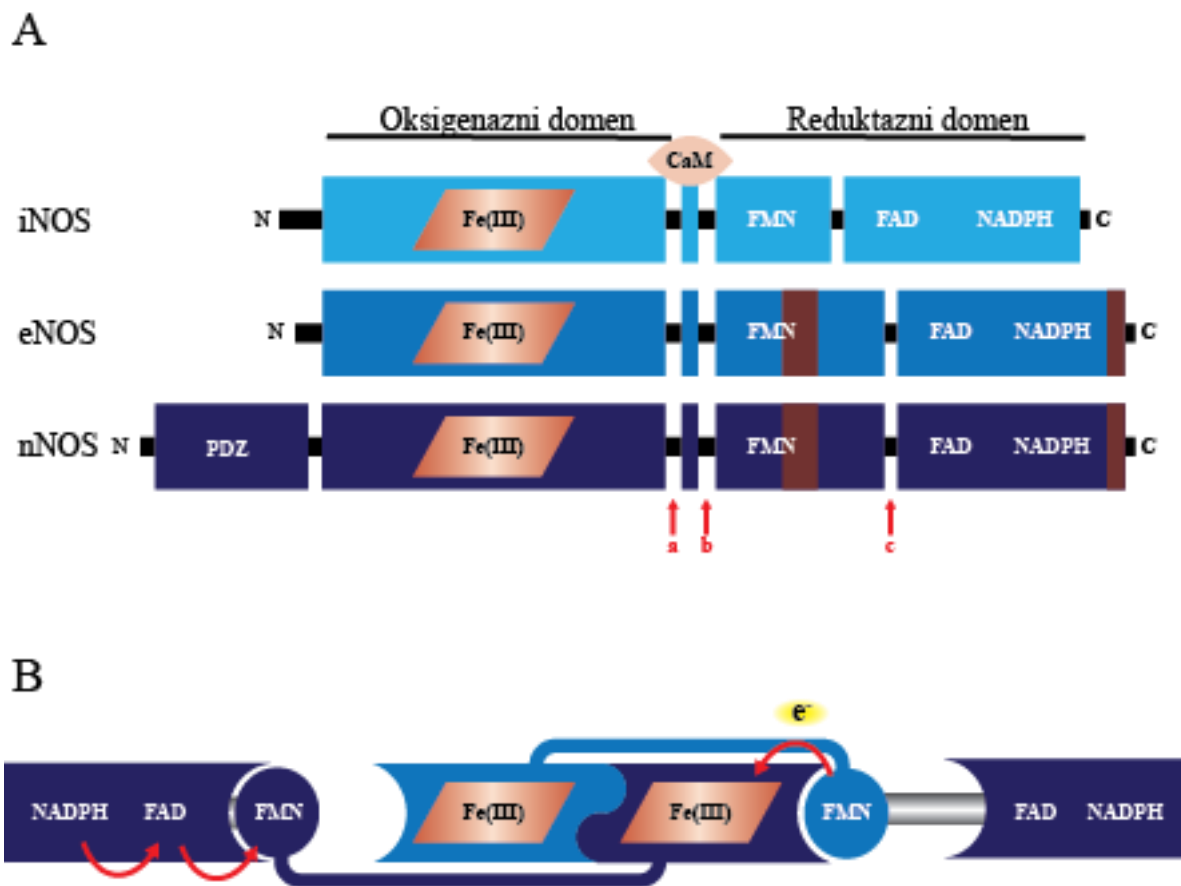
## 1.6.2. Azot-monoksid sintaze

Azot-monoksid sintaze su enzimi odgovorni za sintezu NO. Do sada su izolovane i okarakterisane tri izoforme NOS, pri čemu su konstitutivno eksprimirane neuronska NOS (nNOS; *engl. neuronal NOS*) i endotelna NOS (eNOS; *engl. endothelial NOS*), dok je iNOS eksprimirana tek nakon indukcije nizom stimulusa, a vrlo često i usled inflamacije posredovane citokinima (Bishop i Anderson, 2005). Pored ove tri izoforme NOS, u mitohodrijama je konstitutivno eksprimirana NOS izoforma koja se naziva mitohondrijalna NOS (Ghafourifar i sar., 1999; Liu i Huang, 2008).

Sve izoforme NOS imaju sličnu sekvencu aminokiselina, strukturu i funkciju, sadrže oksigenazni i reduktazni domen (**Slika 2.**). Oksigenazni domen sadrži mesta za vezivanje gvožđe protoporfirina IX (hem), BH4 i L-Arg, dok se na reduktaznom domenu nalaze mesta vezivanja flavin mononukleotida (FMN) i flavin adenin dinukleotida (FAD), koja su međusobno razdvojena kratkom aminokiselinskom sekvencom, kao i mesto vezivanja nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (Simon Daff, 2010). Takođe, FMN-vezujući domen je povezan sa oksigenaznim domenom pomoću malog polipeptidnog segmenta, dužine od oko 30 aminokiselina, a ovaj segment formira i mesto za vezivanje CaM

# 1. Uvod

(Simon Daff, 2010). nNOS na N-terminalnom domenu sadrži i produžetak od oko 200 aminokiselina, koji se naziva PDZ domen, a uključen je u regulaciju lokalizacije nNOS u okviru ćelije (Simon Daff, 2010).



**Slika 2. Šematski prikaz građe NOS (A) i transfere elektrona u NOS dimeru (B)**

*iNOS*-inducibilna NOS; *eNOS*-endotelna NOS; *nNOS*- neuronalna NOS; *FMN*-flavin mononukleotid; *FAD*- flavin adenin dinukleotid; *NADPH*-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; *Fe(III)*- hem; *PDZ*- domen od oko 200 aminokiselina na *nNOS*; (preuzeto i modificirano iz Simon Daff, 2010).

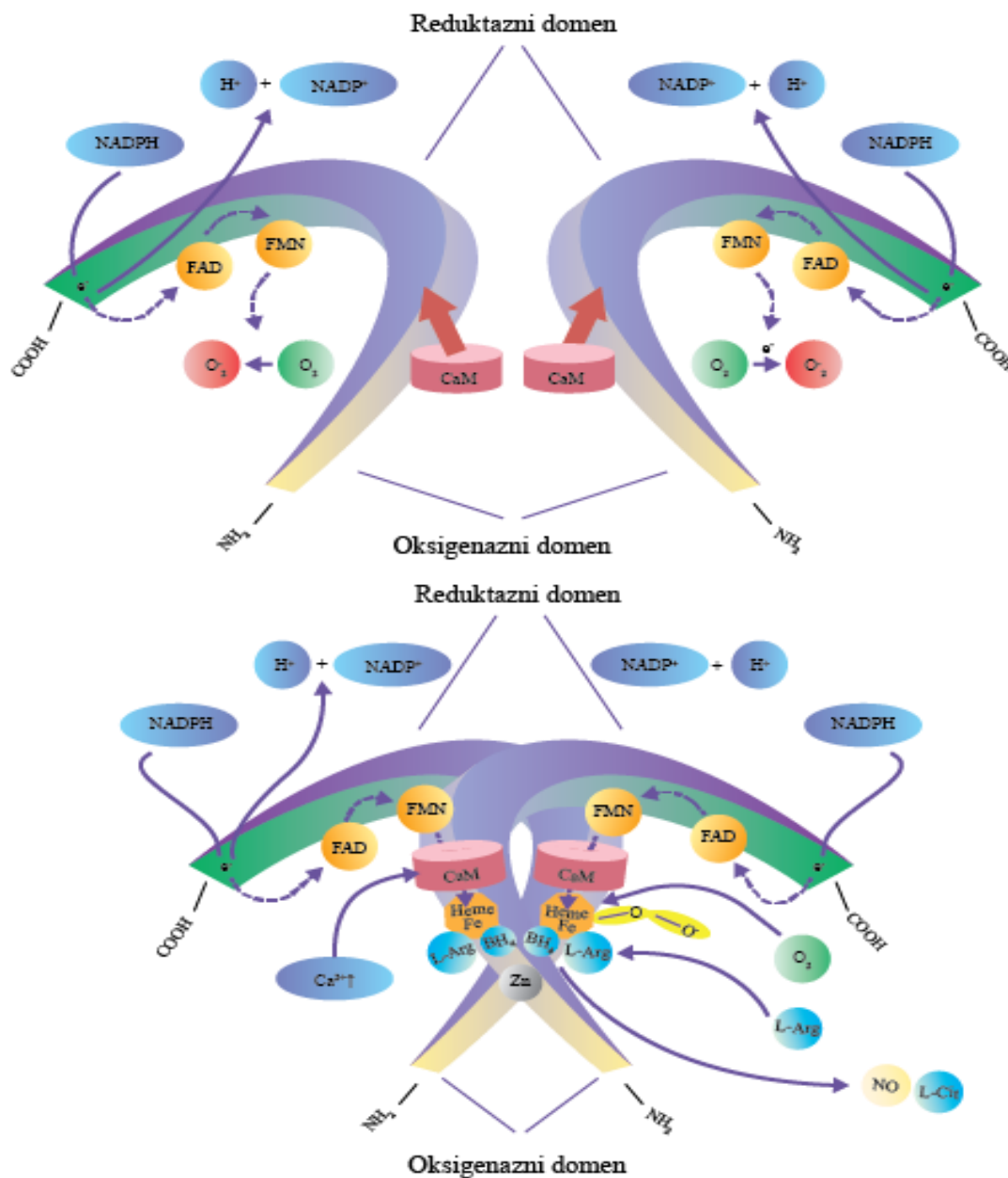
Različite izoforme NOS su proizvodi različitih gena iste funkcije (NOS 1,2,3), sa različitom regulacijom, intracelularnom lokalizacijom i osetljivošću na inhibitore (Alderton i

# 1. Uvod

sar., 2001). Geni za NOS imaju sličnu genomsku strukturu (26–29 egzona i 25–28 introna), što implicira da potiču od zajedničkog pretka gena za NOS (Alderton i sar., 2001). Osim toga, kod ljudi izoforme NOS proteina imaju veoma sličnu strukturu i dele 51–57% homologije sekvence. Svi NOS proteini postoje kao homodimeri, veličine od 135 do 160 kDa. U KVS se može eksprimirati svaka od ove tri izoforme NOS (Bishop i Anderson, 2005).

NOS enzimi katalizuju reakciju u kojoj se L-Arg prevodi u NO i L-citrullin (**Slika 3.**), i to kroz dve reakcije monooksigenacije, pri čemu nastaje intermedijer N-x-hidroxi-L-arginin (NOHA) (Knowles i Moncada, 1994). Za njihovu potpunu aktivaciju je neophodna dimerizacija kao i prisustvo niza kosupstrata i kofaktora, uključujući i FAD, FMN, NADPH, BH4 i hem (Bruckdorfer, 2005). Reakcija katalizovana NOS enzimima odvija se kroz dve reakcije monooksigenacije, i to se prvoj reakciji dva elektrona, nastala dehidrogenacijom NADPH, preko FAD i FMN transferuju do hema oksigenaznog domena. U drugoj reakciji se sintetise NO, u okviru oksigenaznog domena, a ovaj korak zahteva ne samo prisustvo supstrata (L-Arg), već i BH4, koji doprinosi stabilizaciji NOS enzima. Za sintezu NO neophodno je vezivanje CaM za NOS, za koji je pokazano da utiče na strukturu enzima (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Takođe, transfer elektrona sa FMN na hem omogućen je vezivanjem CaM za CaM -vezujući domen NOSa (Smith i sar., 2013). U slučaju konstitutivno eksprimiranih NOS, aktivnost enzima je regulisana unutarćelijskim nivoom slobodnog  $\text{Ca}^{2+}$ , koji pri visokim koncentracijama indukuje vezivanje CaM za enzim (Yetik-Anacak i Catravas, 2006). Sa druge strane, aktivnost iNOS ne zavisi od unutarćelijske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , budući da se CaM stabilno vezuje za iNOS, a najverovatnije zato se u slučaju ove NOS izoforme CaM vezuje i za delove oksigenaznog i reduktaznog domena enzima (Lee i Stuli, 2000). U slučaju smanjene dostupnosti L-Arg, kosupstrata ili kofaktora dolazi do funkcionalne razgradnje NOS dimera, pri čemu nastaju monomeri NOS, što rezultuje produkcijom superoksid anjona ( $\text{O}_2^-$ ) i  $\text{ONOO}^-$  (Knowles i Moncada, 1994). Različite NOS izoforme ostvaruju različite biološke efekte u srcu.





**Slika 3. Mehanizam sinteze NO pomoću enzima NOS**

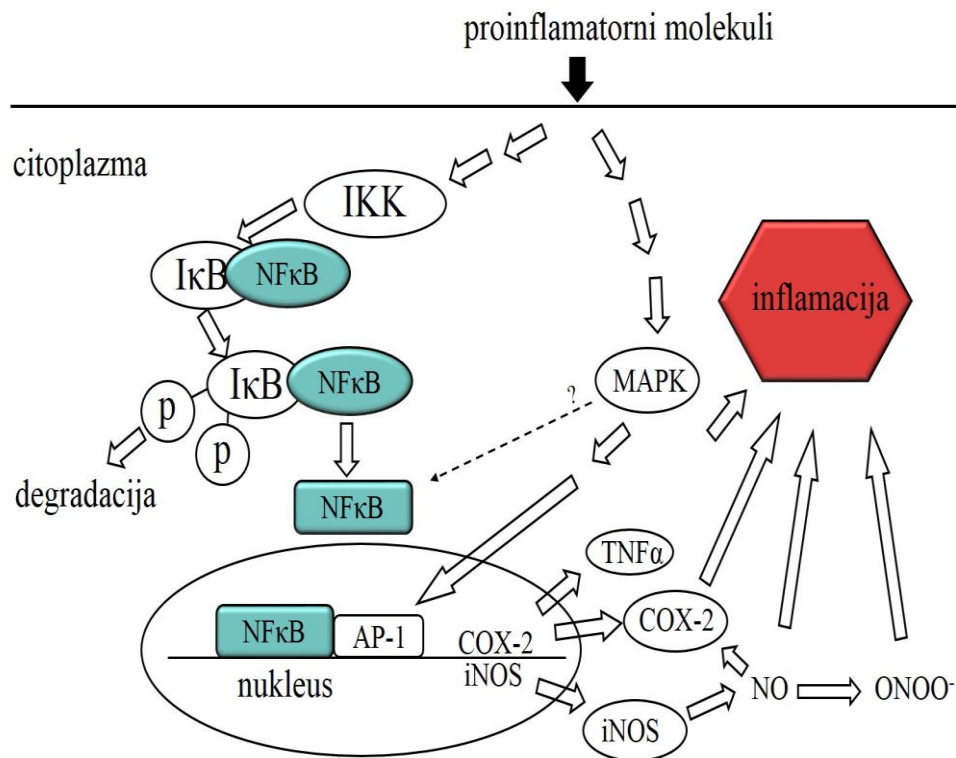
Na slici je prikazan mehanizam kojim NOS prevode L-Arg u NO i L-citrullin. NO-Azot monoksid; NOS-NO sintaza; e<sup>-</sup>-elektroni; NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; FAD- flavin adenin dinukleotid; FMN-flavin mononukleotid; BH<sub>4</sub>-tetraidrobiopterin; O<sub>2</sub><sup>-</sup> superokid anjon; CaM-kalmodulin; L-Arg- arginin; L-Cit- citrulin; COOH- karboksilni domen enzima; NH<sub>2</sub>- amino domen enzima. Preuzeto i modificirano iz (Alderton i sar., 2001).

### 1.6.3. Azot-monoksid sintaze - inducibilna forma

Enzim iNOS je prvo otkriven u makrofagima kao deo citostatičkih i citotoksičnih mehanizama u ovim ćelijama, a kasnije je pokazano da njegova ekspresija može biti stimulisana u svim ćelijama i tkivima, posredstvom proinflamatornih citokina (Forstermann, 2010). Nakon indukcije, iNOS svojim delovanjem dovodi do produkcije velike količine NO, i to 100–1000 puta veće količine u odnosu NO koji nastaje delovanjem eNOS enzima, ostaje aktivan nekoliko sati i kontinuirano oslobađa NO dok ne dođe do njene razgradnje (Morris i Billiar, 1994; Moncada i Higgs, 2006). iNOS je jedan od glavnih medijatora inflamacije i ima važnu ulogu u pravilnom funkcionisanju imunskog sistema (Balligand i sar., 1994; Hare i Stamler, 1999; Bogdan i sar., 2000).

Regulacija ekspresije iNOS enzima odvija se prevashodno na nivou transkripcije (**Slika 4.**) (Rao, 2000). iNOS može biti indukovano nizom agenasa kao što su bakterijski lipopolisaharidi (LPS), proinflamatorni citokini, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6). Regulacija ekspresije gena za iNOS zavisi od nekoliko faktora transkripcije, uključujući NF $\kappa$ B (Negi i sar., 2011). NF $\kappa$ B se u citoplazmi nalazi vezan za I $\kappa$ B i gradi neaktivni kompleks I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B (Gwinn i Vallyathan, 2006; Hou i sar., 2009). Razgradnja ovog kompleksa je neophodan korak u aktivaciji NF $\kappa$ B. Pokazano je da IKK fosforiliše I $\kappa$ B, što dovodi do disocijacije I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B kompleksa, čime je omogućena translokacija NF $\kappa$ B u jedro i pokretanje transkripcije gena za iNOS (Gwinn i Vallyathan, 2006; Hou i sar., 2009). Takođe, NF $\kappa$ B može biti aktiviran direktno od strane MAPK (Sun i sar., 2013). Kada se nađe u jedru, NF $\kappa$ B pokreće ekspresiju čitavog spektra gena odgovornih za sintezu molekula koji posreduju u razvoju inflamacije, uključujući citokine, ciklooksigenazu 2, kao i iNOS (**Slika 4.**). Stoga, vezivanje NF $\kappa$ B za promotor u okviru gena za iNOS predstavlja ključni korak u pokretanju ekspresije iNOS enzima, a signalni putevi koji su uključeni u aktivaciju ovog faktora transkripcije variraju u zavisnosti od tipa ćelija. Familiju NF $\kappa$ B čini niz Rel proteina: p50, p52, p65, p100, p105, RelB, c-Rel, koji među sobom grade homo i heterodimere, a najzastupljeniji konstitutivni i inducibilni heterodimer je p50/p65 (Meyer i sar., 1994). Važan regulator homeostaze krvnih sudova je i NF $\kappa$ B-p50, a

pokazano je da povećanje ekspresije ovog proteina kod miševa dovodi do aktivacije niza proinflamatornih gena (Pereira i Oakley, 2008; Li i sar., 2009).



**Slika 4. Regulacija ekspresije iNOS**

*NF-κB-nuklearni faktor-κB; IκB-inhibitor NFκB; IKK-kinaza inhibitor NFκB; MAPK-mitogenom-aktivirane protein kinaze; AP1- protein aktivator-1; COX-2-ciklooksigenaza 2; iNOS-inducibilna NOS; TNFα-faktor nekroze tumora α. Preuzeto i modificovano sa sajta <http://www.czytelniamedyczna.pl>.*

## 1.6.3.1. Funkcija iNOS enzima u fiziološkim uslovima

Fiziološka uloga iNOS ostvarena je, pre svega, u epitelu pluća i u debelom crevu, gde ovaj enzim proizvodi velike količine NO, i na taj način stvara barijeru koja sprečava prodor mikroorganizama kroz sluzokožu respiratornog i digestivnog sistema, dok je u većini drugih tkiva, uključujući i KVS, slabije ekspimiran (Roberts i sar., 2001).

Osim toga, iNOS ima veoma važnu ulogu u citoprotekciji, ostvaruje antioksidativne efekte, reguliše vaskularnu propustljivost, adheziju leukocita i antikoagulantnu aktivnost (Shah, 2000). Ekspresija informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) za iNOS može biti inhibirana glukokortikoidima i osteopontinom, dok cAMP, angiotenzin II, vazopresin i adrenomedulin povećavaju ekspresiju iNOS (Radomski i sar., 1990; Balligand i sar., 1994; Shah, 2000). Navedeni mehanizmi regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS, ukazuju na to da NO sintetisan na ovaj način može imati korisne i štetne efekte na KVS. Na ravnotežu između ovih efekata može posebno uticati prostorno i vremensko ograničenje ekspresije iNOS i simultani oksidativni stres (Shah, 2000).

## 1.6.3.2. Funkcija iNOS enzima u patofiziološkim uslovima

Visoka koncentracija NO, koja nastaje usled prekomerne ekspresije iNOS, može imati negativan uticaj na organizam (Heneka i sar., 1998). iNOS enzim je visoko ekspimiran u patofiziološkim stanjima, a pretpostavlja se da njegova povećana ekspresija i aktivnost predstavljaju ključnu vezu između poremećaja metabolizma uzrokovanih gojaznošću i inflamacije (Charbonneau i Murette, 2010; Stanimirovic i sar., 2015). U animalnim modelima gojaznosti je pokazano da prekomerna akumulacija masti može indukovati ekspresiju iNOS enzima u nizu metabolički aktivnih tkiva, uključujući i skeletne mišiće i masno tkivo (Perreault i Murette, 2001; Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Murette, 2010). Takođe, inhibicija sinteze iNOS može sprečiti razvoj IR, uzrokovan primenom HF režima ishrane, u skeletnim mišićima miševa, dok su kardiovaskularni poremećaji kod pacijenata sa DMT2

povezani sa patološkom ekspresijom iNOS u tkivima KVS (Fujimoto i sar., 2005; Nagareddy i sar., 2009).

U izolovanim kardiomiocitima, indukcija iNOS upotrebom različitih medijatora inflamacije, dovodi do oslobađanja velike količine NO, što ima citotoksične efekte i rezultuje u smanjenju kontraktilnosti kardiomiocita (Brady i sar., 1993). Značajno povećana ekspresija iNOS u tkivima KVS primećena je i kod gojaznih pacijenata, spontano hipertenzivnih pacova, kao i kod zečeva na HF dijeti (Perreault i Marette, 2001; Fujimoto i sar., 2005; Charbonneau i Marette, 2010). Smatra se da je hipertrofija srca, koja predstavlja nezavisni faktor rizika za koronarnu bolest, insuficijenciju srca kao i iznenadnu smrt, posledica nekontrolisane ekspresije iNOS enzima (Mungrue i sar., 2002; Gradman i Alfayoumi, 2006). Takođe, poremećaji u radu srca, koji se manifestuju u vidu smanjenja bazalne kontraktilnosti miokarduma ili smanjenja odgovora kardiomiocita na stimulaciju  $\beta$ -adrenalinskih receptora, nastaju kao posledica indukcije iNOS enzima (Tao i McKenna, 1994; Yasuda i Lew, 1997). Yasuda i saradnici (1997) su u eksperimentima na izolovanim kardiomiocitima pokazali da tretiranje kardiomiocita lipopolisaharidima (za koje se zna da povećavaju ekspresiju iNOS) smanjuje kontraktilni odgovor ovih ćelija na stimulaciju  $\beta$ -adrenalinskih receptora, što je sprečeno tretiranjem ćelija inhibitorom iNOS, L-N<sup>G</sup>-monomethyl Arginin citrat (L-NMMA). Pokazana je pozitivna korelacija između ekspresije iNOS i CD36 transportera. Posledica ovoga može biti povećano preuzimanje SMK iz cirkulacije i njihova akumulacija u tkivima KVS u vidu TG, što na kraju može dovesti do oksidativnog i nitrozativnog stresa kao i insuficijencije srca, a posebno kod gojaznih osoba i pacijenata sa dijagnostikovanom DMT2 (Christoffersen i sar., 2003; Bai i sar., 2011; Puthanveetil i sar., 2011).

### **1.6.3.3. Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS pod delovanjem estradiola**

Jedan od mehanizama kojima estradiol ostvaruje svoje kardioprotektivne efekte uključuje i regulisanje ekspresije i aktivnosti iNOS (Tamura i sar., 2000; Yeh i sar., 2011). Istraživanja na VSMC pokazuju da aktivacija ER, posredovana estradiolom, smanjuje aktivaciju NF $\kappa$ B kao i njegovu mogućnost vezivanja za DNK (Speir i sar., 2000; Sharma i sar., 2001). Ovo je omogućeno ili direktnom interakcijom ER i NF $\kappa$ B u jedru, ili inhibicijom

# 1. Uvod

signalnih puteva koji dovode do aktivacije NF $\kappa$ B u citoplazmi (Xing i sar., 2009). Murphy sa saradnicima je pokazao da estradiol dovodi do smanjenja fosforilacije i aktivacije p65 subjedinice NF $\kappa$ B, što za posledicu ima redukciju ekspresije iNOS na nivou proteina (Murphy i sar., 2010). Takođe, povećan nivo inhibitora NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B; *engl. Inhibitor of NF $\kappa$ B*) je primećen u kulturi ćelija sa prekomernom ekspresijom ER, a tretman estradiolom smanjuje aktivnost I $\kappa$ B kinaze (IKK; *engl. I $\kappa$ B Kinase*) i na taj način sprečava fosforilaciju i degradaciju I $\kappa$ B (Kalaitzidis i Gilmore, 2005). Kauser sa saradnicima (1998) je, ispitivajući na koji način estradiol *in vitro* utiče na sintezu NO, pokazao da u aortama pacova dolazi do smanjene ekspresije iNOS na nivou iRNK nakon tretmana estradiolom (Kauser i sar., 1998).

Imajući u vidu da se endogeni estradiol vezuje jednakim afinitetom i za ER $\alpha$  i za ER $\beta$ , teško je razlikovati metaboličke efekte ove dve izoforme ER. Cignarella i saradnici su pokazali da selektivni ER $\beta$  agonisti indukuju ekspresiju proinflamatornih enzima, uključujući i iNOS u VSMC pacova (Cignarella i sar., 2006). Sa druge strane, selektivni ER $\alpha$  agonisti pokazuju anti-inflamatorne efekte kako na vaskularna (Darblade i sar., 2002; Ardelt i sar., 2005), tako i na nevasularna tkiva. Osim toga, pokazano je da aktivacija ER $\alpha$  omogućava relaksaciju krvnih sudova i na taj način poboljšava funkciju KVS (Bolego i sar., 2005). Selektivni ER $\alpha$  agonist, 4,4',4''-(4-propil-[1H]-pirazole-1,3,5-triil) trisfenol (PPT), značajno smanjuje citokinima indukovanu ekspresiju iNOS proteina u VSMC aorte pacova, dok tretman estradiolom ne utiče na ekspresiju iNOS u aortama izolovanim iz  $\alpha$ ERKO miševa (Cignarella i sar., 2009).

Među signalnim putevima koji su regulisani estradiolom, a takođe su uključeni i u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS, u tkivima KVS veoma važnu ulogu imaju signalni putevi koji uključuju aktiviranje MAPK signalne kaskade. MAPK pripadaju familiji visoko konzerviranih serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinaza koje su uključene u regulaciju velikog broja fundamentalnih ćelijskih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, odgovor na stres, apoptozu i preživljavanje (Kim i Kim, 2005; Ellerhorst i sar., 2006; Isenovic i sar., 2009; Xiao i sar., 2011). U MAPK signalnu kaskadu su uključene tri kinaze, a to su: MAPK kinaza kinaza (MEKK tj. MEK kinaza, Raf), MAPK kinaza (MAPKK, MEK, MKK) i MAPK (Chang i Wang, 2001). Širok spektar vanćelijskih stimulusa, uključujući mitogene, citokine i faktore rasta, pokreću aktivaciju jedne ili više Raf, i to uz pomoć malih guanozin-

# 1. Uvod

trifosfataza (GTPaze) iz Ras familije (Yokoyama i sar., 2006). Aktivirani Ras, kome je SOS (*engl. Son of Sevenless*) izmenio GDP za GTP, regrutuje Raf iz citosola u plazma membranu, vezujući se za Ras vezujući domen, što vodi njegovoj dimerizaciji i aktivaciji. Aktivirani Raf potom fosforiliše i aktivira MEK, koja zatim aktivira i fosforiliše MAPK. Postoji više izoformi MAPK, a konvencionalne uključuju: izoforme MAPK od 42 i 44 kDa (p44/p42<sup>MAPK</sup>, tj. ERK1/2), c-Jun N-terminalne kinaze 1-3 (JNK1-3; *engl. c-Jun N-Terminal Kinases 1-3*), stresom aktivirane protein kinaze (SAPK; *engl. Stress Activated Protein kinase*), izoforme p38 kinaze (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) i ERK5. Manje izučavane, atipične MAPK obuhvataju nemu-sličnu kinazu (NLK; *engl. Nemo-Like Kinase*), Erk3/4, i Erk7/8. Aktivacija različitih MAPK izoformi vodi fosforilaciji i aktivaciji niza MAPK-aktiviranim protein kaza (MAPKAPK, *engl. MAPK-activated protein kinases*), koje dalje prenose signal i regulišu veliki broj bioloških procesa. U KVS veliki broj procesa zavisi od fosforilacije i aktivacije ERK1/2 (Isenovic i sar., 2004; Yokoyama i sar., 2006; Sudar i sar., 2008; Isenovic i sar., 2009). Kako bi došlo do potpune aktivacije ERK1/2 neophodna je fosforilacija na Thr<sup>202</sup> kao i na tirozinu (Tyr<sup>204</sup>) (Taniguchi i sar., 2006). Nakon aktiviranja, ERK1/2 može da fosforiliše niz proteina, uključujući i p90 ribozomalnu S6 kinazu (p90RSK; *engl. p90 Ribosomal S6 Kinase*), kao i transkripcioni faktor Elk1 (*engl. E Twenty-Six (ETS)-Like Transcription Factor 1*) i tako utiče na ekspresiju gena (Taniguchi i sar., 2006). Sve više istraživanja ukazuju da ERK1/2 aktivno učestvuje u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS u srcu, i to putem fosforilacije i defosforilacije signlnih molekula koji su koji utiču na regulaciju iNOS (Kim i Kim, 2005; Ellerhorst i sar., 2006; Xiao i sar., 2011).

Podaci iz literature (Cheng DY, 1994; Hattori i sar., 2003; Ghisletti i sar., 2005), kao i naši prethodno objavljeni rezultati (Isenovic i sar., 2002; Isenovic i sar., 2004; Sudar Milovanovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2018) pokazuju da je efekat estradiola na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS usko povezan sa aktiviranjem signalne kaskade koja uključuje učešće i Akt kinaze (Hattori i sar., 2003; Gwinn i Vallyathan, 2006). Akt ili protein kinaza B je Ser/Thr kinaza koja u srcu ima veoma važnu ulogu u regulaciji rasta, funkcije i metabolizma kardiomiocita (Isenovic i sar., 2004; Liu i sar., 2009; Wu i sar., 2012). Familiju Akt kinaza čine tri izoforme sa visokim stepenom homologije: Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) i Akt3 (PKB $\gamma$ ) (Bellacosa i sar., 2005). Sve tri izoforme Akt imaju N-terminalne domene homologe plekstrinu (PH; *engl. "Plectkstrin Homology"*), koji imaju važnu ulogu u

# 1. Uvod

lokalizaciji proteina u ćeliji. Pokazano je da se produkti PI3K, fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) ili fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP<sub>3</sub>), mogu vezati za PH domene Akt, omogućavajući na taj način privremenu translokaciju Akt iz citoplazme na plazma membranu, čime je omogućena fosforilacija ove kinaze (Franke i sar., 1997). Akt ima dva mesta fosforilacije, jedno na Thr<sup>308</sup> u okviru katalitičkog domena, a drugo je na Ser<sup>473</sup> koje se nalazi na C-terminalnom domenu, a u potpunosti je aktivirana pri fosforilaciji oba mesta (Yang i sar., 2002). Fosfoinozimid-zavisna protein kinaza 1 (PDK1; *engl. Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase*) fosforiliše Akt na Thr<sup>308</sup>, i time parcijalno aktivira Akt. Da bi Akt kinaza bila u potpunosti aktivirana, potrebna je i fosforilacija na Ser<sup>473</sup> fosforilisana od strane kompleksa 2 ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (mTORC2; *engl. Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) (Camper-Kirby i sar., 2002). Pored mTORC2, fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> mogu vršiti i članovi familije protein kinaza povezanih sa PI3K (PIKK, *engl. PI3K-related kinase*), uključujući i DNK zavisne protein kinaze (DNA-PK, *engl. DNA-dependent protein kinase*). Nakon aktivacije, Akt fosforiliše niz supstrata i na taj način regulše brojne procese u ćeliji, uključujući ekspresiju iNOS proteina (Hattori i sar., 2003; Gwinn i Vallyathan, 2006; Hou i sar., 2009).

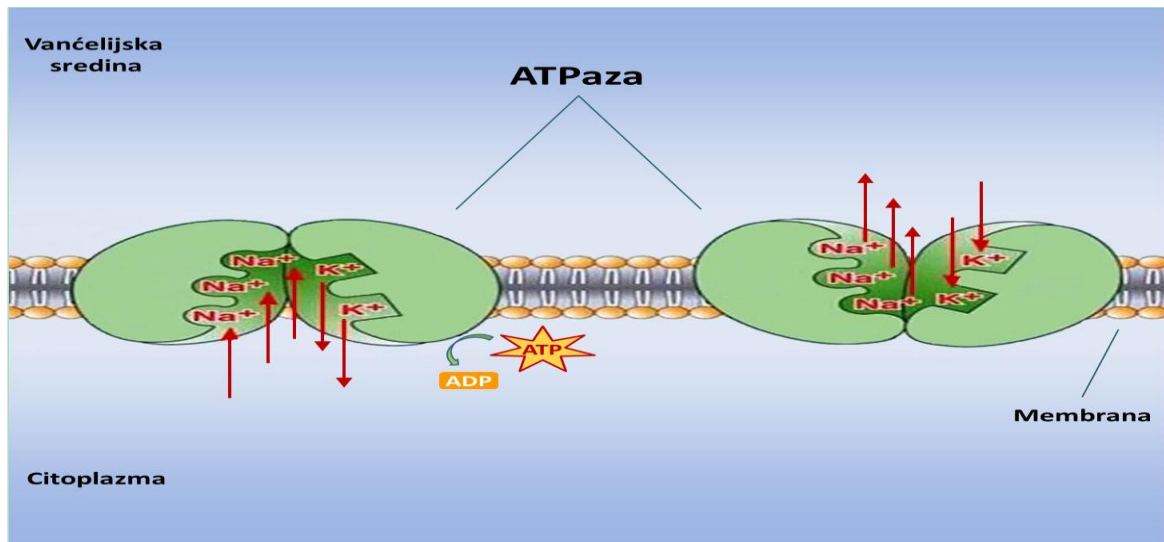
## 1.7. Građa i funkcija natrijum-kalijum adenzin trifosfataze

Enzim Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza pripada familiji p-tipa ATPaza, a otkrio je Jens Christian Skou (Skou 1957), a 1997. godine je dobio i Nobelovu nagradu za hemiju. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza je član familije katjonskih pumpi adenzin trifosfataza (ATPaza), koje koriste energiju oslobođenu hidrolizom ATP za aktivan transport katjona nasuprot njihovom hemijskom gradijentu (Jorgensen, 2003). Ovaj visoko konzervirani, integralni membranski protein, eksprimiran je u svim eukariotskim ćelijama (Axelsen i Palmgren, 1998; Jorgensen i Pedersen, 2001). Primarna funkcija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze je održavanje homeostaze kao i gradijenta Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>, između unutarćelijske i vanćelijske tečnosti, što je neophodno za održavanje tonusa i volumena ćelije kao i za normalno odvijanje procesa u ćeliji (Blaustein, 1977; Clausen i Nielsen, 1994; Blanco i Mercer, 1998). Energija potrebna za održavanje ovog procesa oslobađa se razgradnjom molekula ATP, pri čemu se hidrolizom terminalnog fosfata



# 1. Uvod

oslobađa orto fosfat, a ATP se konvertuje u ADP (**Slika 5.**). Ovaj proces je energetski veoma zahtevan, a za njegovo održavanje se, pri mirovanju, potroši između 19% i 28% ukupnog ATP iz organizma (Rolfe i Brown, 1997).



**Slika 5.** Šematski prikaz funkcije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

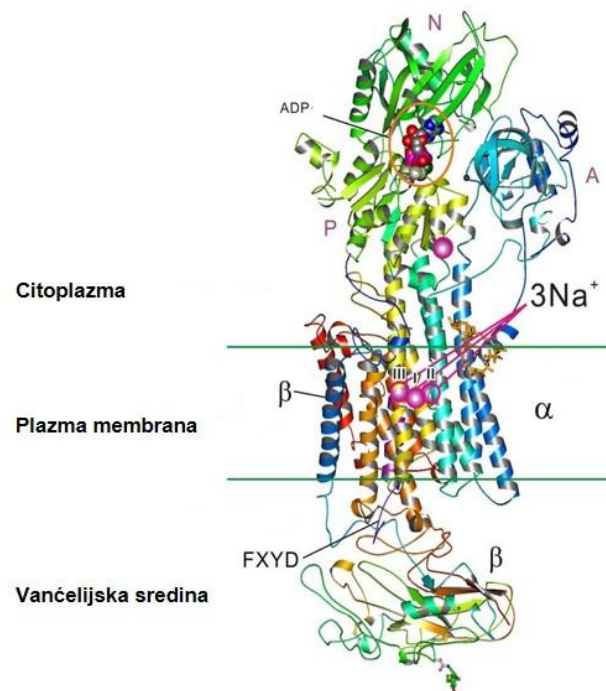
*Tri jona natrijuma iz ćelije i dva jona kalijuma u ćeliju premeštaju se nasuprot gradijentu koncentracije uz pomoć energije koja se oslobađa razgradnjom ATP na ADP i  $\text{P}_i$ , pod delovanjem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. (preuzeto i modifikovano sa sajta <http://science.halleyhosting.com/sci/ibbio/cells/notes/ch6/activeT.htm>)*

Enzim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza izgrađena je od dve  $\alpha$  i dve  $\beta$  glikolizovane subjedinice (**Slika 5.**) (Jorgensen i Andersen, 1988). Osim toga, FXYP proteini, koji se još označavaju kao  $\gamma$  subjedinice, doprinose stabilizaciji i boljoj funkciji  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Garty i Karlish, 2006).  $\alpha$  subjedinice su odgovorne za transport katjona i katalitička svojstva enzima i na njima se nalaze mesta za vezivanje:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i ATP, kao i mesta fosforilacije (Therien i Blostein, 2000). Takođe,  $\alpha$  subjedinica ima mesta za vezivanje kardiotioničnih glikozida, uključujući i ouabain, koja predstavljaju grupu organskih jedinjenja sa važnom ulogom u regulaciji snage i frekvencije kontrakcija srca (Therien i Blostein, 2000).  $\alpha$  subjedinice imaju 10 transmembranskih domena i dve intracelularne petlje, od kojih jedna služi kao mesto fosforilacije (Morth i sar., 2007; Ozdemir i sar., 2012). Subjedinica  $\alpha$  postoji u četiri različite izoforme ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ) koje pokazuju 85% homologije (Segall i sar., 2001).  $\alpha_1$  subjedinica

# 1. Uvod

ekspimirana je konstitutivno u većini tkiva,  $\alpha_2$  se pretežno nalazi u mozgu i srcu,  $\alpha_3$  u gonadama i neuronima, a  $\alpha_4$  subjedinica je ekspimirana u testisima (Jewell i Lingrel, 1991; Woo i sar., 2000; Dostanic-Larson i sar., 2006).  $\beta$  subjedinice su odgovorne za povezivanje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze sa plazma membranom i često se nazivaju vezujućim subjedinicama (*engl. docking subunit*) (Blanco i Mercer, 1998). Domene  $\beta$  subjedinica čine jedan kratki citoplazmatski rep, jedan transmembranski domen i veliki glikozilovani vanćelijski segment (Beggah i sar., 1997).  $\beta$  subjedinice postoje u tri izoforme ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) sa 45% homologije (Therien i Blostein, 2000; Kaplan, 2002). Kao i  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  subjedinica ekspimirana je konstitutivno u većini tkiva,  $\beta_2$  u mozgu i srcu, a  $\beta_3$  u plućima, testisima, skeletnim mišićima, mozgu i jetri (Crambert i sar., 2000; Canfield i sar., 2002; Schwinger i sar., 2003). FXYD su familija sedam homologih proteina (FXYD1-7) koji su dobili naziv po invarijantnom motivu FXYD u njihovom vanćeliskom domenu (Sweadner i Rael, 2000; Garty i Karlsh, 2006). Za ove proteine je pokazano da su tkivno specifične regulatorne subjedinice, koje prilagođavaju kinetiku  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze potrebama organizma (Bertorello i Katz, 1993; Blanco i Mercer, 1998; Al-Khalili i sar., 2003; Obradovic i sar., 2013).

Pokazano je da su četiri  $\alpha$  i tri  $\beta$  izoforme  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, produkti različitih gena, imaju drugačije iRNK i sintetisane su nezavisno jedna od druge (Lingrel i Kuntzweiler, 1994; Jorgensen, 2003). Izoforme se kombinuju tako da formiraju veliki broj različitih izoenzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ekspimiranih na tkivno specifičan način (Jorgensen, 2003). Koncentracija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u tkivima varira, pri čemu su najniže koncentracije nađene u eritrocitima, a najveće u kori cerebruma (Schmidt i sar., 1996). Postojanje izoformi ukazuje na to da one imaju specifičnu funkciju, različite ekspresione obrasce i različitu regulaciju. Tako je u istraživanjima u kojima su ispitivane heterologno ekspimirane izoforme  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze pokazano da ouabain ima dvostruko manji afinitet za  $\alpha_2\beta_1$  u odnosu na  $\alpha_1\beta_1$  ili  $\alpha_3\beta_1$  kombinacije izoformi (Crambert i sar., 2000; Muller-Ehmsen i sar., 2001; Schwinger i sar., 2003).



**Slika 6. Prikaz građe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze.** Slika predstavlja prikaz topološkog rasporeda subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinica –FXYP)  $\text{Na}^+$  natrijum;  $\text{K}^+$  kalijum; ADP-adenozin difosfat. Preuzeto i modifikovano iz (Ogawa i sar., 2009).

## 1.7.1. Fiziološka uloga $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze

Tokom evolucije života, većina živih ćelija održavala je sličan jonski sastav citoplazme, uključujući nizak nivo  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ , a visok nivo  $\text{K}^+$  i neutralni pH (Clausen i sar., 2017). Održavanje ovakvih koncentracija jona u unatrceljskoj sredini zahteva aktivaciju jonskih pumpi, uključujući  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu. Štaviše, gradijent jona kroz plazma membranu obezbeđuje veliki deo energije neophodne za olakšavanje sekundarnog transporta molekula (kao što su šećeri, neurotransmiteri, aminokiseline), ali i za transport drugih jona ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) (Clausen i sar., 2017). Mnogi organi koriste gradijente  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  za održavanje svojih specijalizovanih funkcija. U bubrezima je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza visoko eksprimirana, a procenjuje se da je u distalnim tubulima nefrona eksprimirano do 50 miliona Na-pumpi po ćeliji, što i

# 1. Uvod

nije iznenađujuće, budući da bubrezi koriste  $\text{Na}^+$  gradijent za filtriranje krvi, tj. za reapsorpciju glukoze i aminokiselina, kao i za održavanje fiziološkog nivoa elektrolita i pH (El Mernissi i Doucet, 1984). Takođe, mozak ima ogromnu potražnju za aktivnošću  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, jer se neuroni oslanjaju na Na-pumpu za obrtanje postsinaptičkog fluksa  $\text{Na}^+$ , odnosno za ponovno uspostavljanje membranskog potencijala, dok u astrocitima gradijent  $\text{Na}^+$  obezbeđuje energiju za preuzimanje neurotransmitera (Attwell i Laughlin, 2001).

Održavajući homeostazu  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza stvara i održava membranski potencijal i na taj način doprinosi regulaciji kontraktilnosti mišićnih ćelija (Blaustein, 1993). Ekscitacija membrane mišićnih ćelija (sarkoleme) praćena je otvaranjem kanala za  $\text{Na}^+$ , ulaskom  $\text{Na}^+$  i depolarizacijom sarkoleme. Kao posledica depolarizacije otvaraju se kanali za  $\text{Ca}^{2+}$  i ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  pokreće dodatno oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazmatičnog retikuluma u citoplazmu. Povećana koncentracija unutarćeliskog  $\text{Ca}^{2+}$  dovodi do aktivacije kontraktilnih proteina, i sledstvene kontrakcije mišićne ćelije (Fozzard i Sheets, 1985). Regulaciji kontraktilnosti mišićnih ćelija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza doprinosi izbacivanjem viška  $\text{Na}^+$  iz citoplazme čime doprinosi održavanju fiziološkog nivoa  $\text{Ca}^{2+}$  na kraju dolazi do relaksacije mišićne ćelije.

## 1.7.2. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza u patofiziološkim stanjima

Poremećaji aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze primećeni su u nizu patofizioloških stanja, uključujući gojaznost, IR i KVB (Fuller i sar., 2013). Odnos  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  je poremećen u skeletnim mišićima pacijenata sa IR (Klitgaard i Clausen, 1989), što ukazuje na smanjenu aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, dok se hiperkalemija i poremećaji tolerancije  $\text{K}^+$  javljaju kod osoba obolelih od DMT2 (Perez GO, 1977). Regulacija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je od presudnog značaja za održavanje normalnog funkcionisanja kako kardiomiocita, tako i srca u celini (Liu i sar., 2012). Povećana aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze doprinosi hiperpolarizaciji i relaksaciji srca (Akeri i Brody 1977; Blaustein i sar., 1998). Brojne studije su pokazale negativne efekte viška  $\text{Na}^+$  na arterijski krvni pritisak i razvoj hipertenzije (Iwamoto i Kita, 2006). Osim toga, održavanje homeostaze  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  ima važnu ulogu i u vazodilataciji. Dugotrajna i prekomerna inhibicija  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze povećava nivo intracelularnog  $\text{Na}^+$ , što za posledicu ima povećanje

# 1. Uvod

intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  kao i pojačanu kontraktilnost VSMC (Hill-Eubanks i sar., 2011). Smatra se da je smanjenje sposobnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze da veže  $\text{Na}^+$  odgovorno za nastanak hipertenzije, a takođe pokazano je i da sa progresijom hipertenzije afinitet  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze za  $\text{Na}^+$  smanjuje (Vlkovicova i sar., 2005). Ovo smanjenje afiniteta može nastati kao posledica konformacionih promena već postojećih molekula enzima, ili kao posledica sinteze novih, modifikovanih molekula enzima. Takođe, Somberg (1981) sa saradnicima je ustanovio da je smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze za 25% povezano sa povećanjem snage kontrakcije za 20%. Smanjena aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u VSMC, dovodi do povećane kontraktilnosti VSMC i povećanog krvnog pritiska (Herrera i sar., 1988; Arvola i sar., 1993; Sudar i sar., 2008).

## 1.7.3. $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza u gojznosti

Gojazni pacijenti, kao i gojazne eksperimentalne životinje imaju smanjenu ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Bray i Yukimura, 1978; Guernsey i Morishige, 1979; Iannello i sar., 1994; Iannello i sar., 2007). Lin i saradnici (1978, 1981) su takođe pokazali da kod gojaznih miševa dolazi do smanjenja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u jetri i skeletnim mišićima. Stanje gojznosti je karakteristiše povećana koncentracija SMK, a brojnim istraživanjima pokazano je da SMK inhibiraju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu (Kelly i sar., 1986; Swarts i sar., 1988). Rezultati ekspertimenata, rađeni *in vitro*, pokazali su da prekomerno akumuliranje SMK u plazma membranama dovodi promena u njihovoj fluidnosti, što za posledicu ima promene u konformaciji subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Stubbs i Smith, 1984). Jedna od posledica ovih konformacionih promena bi mogla biti i smanjena hidrolliza ATP, kao i posledično smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Osim toga, SMK se mogu vezivati za hidrofobne regione Na pumpe, i tako menjati afinitet ovog enzima za  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (Mead, 1984; Huang i sar., 1985). Takođe, još jedna mogućnost je da SMK vezuju  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  sprečavajući ih na taj način da se vežu za Na pumpu (Messineo i sar., 1984).

# 1. Uvod

Takođe, smanjenju ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu mogla bi doprineti aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta. RhoA je mala GTPaza, koja zajedno sa svojim nishodnim efektorom ROCK, ima veoma važnu ulogu u regulaciji ekspresije niza gena, kao i u regulaciju velikog broja ćelijskih procesa, kao što su kontrakcije, deoba i morfologija ćelija (Mutsui i sar., 2010). Takođe, aktivacija RhoA/ROCK signalne kaskade dovodi se u vezu sa velikim brojem patoloških stanja, uključujući konstrikciju krvnih sudova, pulmonarnu hipertenziju, kao i druge KVB (Mutsui i sar., 2010). ROCK su Ser/Thr kinaze koje pripadaju porodici AGC kinaza, a postoje u dve široko eksprimirane izoforme, ROCK1 (ROK $\beta$ ) i ROCK2 (ROK $\alpha$ ) (Nakagawa i sar., 1996). Obe izoforme ROCK su izgrađene iz N-terminalnog PH domena, centralnog „coiled-coil” domena, kao C-terminalnog katalitičkog domena, a aktivirane su vezivanjem RhoA za deo „coiled-coil” domena koji je bliži C-terminalnom kraju enzima (Yamaguchi i sar., 2006). Pokazano je da HF režim ishrane aktivira RhoA/ROCK signalnu kaskadu u srcu pacova (Soliman i sar., 2008). Aktivacija ovog signalnog puta zabeležena je u različitim kardiovaskularnim poremećajima, a pokazano je i da dovodi do nishodne regulacije PI3K signalizacije, kao i da može smanjiti asocijaciju IRS i PI3K (Chang i sar., 2006; Vemula i sar., 2010). Porodica PI3K obuhvata veći broj kinaza, koje su podeljene u nekoliko klasa (I, II i III), a većina efekata PI3K posredovana je fosfoinozitolima (De Meyts, 2000). Sve tri klase PI3K fosforilišu inozitol i mogu da sintetišu fosfatidilinozitol-3-fosfat, a samo klasa I sintetiše PIP3. Članovi klase I PI3K funkcionišu kao heterodimeri, koje gradi jedna od četiri izoforme katalitičke p110 subjedinice (p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ili  $\gamma$ ) i jedna od različitih izoformi regulatorne subjedinice (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\gamma$ , p101 or p84) (De Meyts, 2000). Aktivacija PI3K zahteva učešće receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću (RTK, *engl. receptor tyrosine kinases*), kao što je receptor za insulin. Vezivanje odgovarajućeg liganda za RTK dovodi do autofosforilacije ovog tipa receptora i posledičnog formiranja mesta za vezivanje proteina koji sadrže SH2 domen, kao što je IRS, nakon čega dolazi do fosforilacije IRS na Tyr aminokiselinskim ostacima. Fosforilacija je IRS na Tyr, omogućava vezivanje jedne od izoformi regulatorne subjedinice PI3K, što rezultuje u aktivaciji katalitičke subjedinice PI3K i sinteze PIP3, koje dalje preko PDK dovodi do aktivacije Akt (De Meyts, 2000). Sa druge strane, fosforilacija IRS na Ser aminokiselinskim ostacima dovodi do smanjenja asocijacije IRS/PI3K.

## 1.7.4. Regulacija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze pod delovanjem estradiola

U eksperimentalnim modelima dijabetesa, uočena je smanjena aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze kod mužjaka, ali ne i kod ženki (Bray i Yukimura, 1978; Swarts i sar., 1988) što ukazuje na ulogu estrogena u aktivaciji pumpe. Za estradiol je pokazano u različitim studijama da je važan regulator aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Sader i Celermajer, 2002). Stimulišući aktivnost pumpe, estradiol ima direktan uticaj na srce povećavajući kontrakciju/relaksaciju kardiomiocita (Forst i sar., 2000). Pokazano je da estradiol, kako genomskim, tako i negenomskim putem utiče na povećanje aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, kao i povećanje ekspresije iRNK za  $\alpha_2$  subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Palacios i sar., 2004). Džurba i saradnici (1997) su pokazali da kod ovarijektomisanih ženki pasa, estradiol povećava aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u miokardum. Takođe, tretman estradiolom aorti izolovanih iz ovarijektomisanih ženki pacova, povećava aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze do nivoa koji je primećen u aortama izolovanim iz intaktnih ženki pacova (Palacios i sar., 2004).

Još nije u potpunosti poznato na koji način estradiol doprinosi regulaciji ekspresije i aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Dosadašnji rezultati pokazuju da estradiol može uticati na ekspresiju i aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze aktiviranjem niza protein kinaza (Silfani i Freeman, 2002; Sudar i sar., 2008). Među izučavanijim mehanizmima aktivacije Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze je i PI3K/Akt signalni put (Li i sar., 1999; Al-Khalili i sar., 2003; Isenovic i sar., 2004; Palacios i sar., 2004; Sudar i sar., 2008; Obradovic i sar., 2014). Estradiol posredstvom PI3K/Akt signalnog puta dovodi do povećanja sinteze novih  $\alpha$  subjedinica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i povećanja njene aktivnosti (Palacios i sar., 2004; Sudar i sar., 2008; Obradovic i sar., 2014). Takođe, podaci iz literature ukazuju da estradiol reguliše Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu i putem ERK1/2 kinaza (Al-Khalili i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Sudar i sar., 2008). Primena specifičnog inhibitora ERK1/2, PD98059, smanjuje aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, što ukazuje da su ERK1/2 jedan od važnih regulatora ekspresije i aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Isenovic i sar., 2004).

Još jedan mehanizam kojim bi estradiol mogao uticati na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu uključuje regulaciju ekspresije NDRG2, člana NDRG familije (Deng i sar., 2003; Hu i sar., 2006), Pokazano je da je NDRG2 visoko eksprimiran u pljuvačnim žlezdama, mozgu, skeletnim mišićima i bubrezima, tj. u tkivima u kojima je visoka ekspresija Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Deng i

# 1. Uvod

sar., 2003; Hu i sar., 2006) Smatra se da NDRG2 reguliše transport i homeostazu jona (Li i sar., 2011), utiče na fibrozu jetre (Yang i sar., 2011), i štiti od lipotoksičnosti u  $\beta$  ćelijama pankreasa (Shen i sar., 2010). Prethodna istraživanja su pokazala da ekspresiju NDRG2 proteina reguliše familija Myc proteina (Zhang i sar., 2006), citokini kao što je TNF $\alpha$  (Foletta i sar., 2009), i mnogi hormoni, uključujući deksametazon, insulin, androgeni i aldosteron (Boulkroun i sar., 2002; Boulkroun i sar., 2005; Foletta i sar., 2009). Takođe, NDRG2 je visoko ekspimiran i u srcu (Hu i sar., 2006; Li i sar., 2011). Ustanovljeno je da se NDRG2 vezuje za  $\beta$  subjedinicu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze i tako sprečava njenu degradaciju posredovanu ubikvitinom (Li i sar., 2011). Postojanje ERE u okviru gena za NDRG2 pokazano je analizom promotorskog regiona tog gena, stoga se može pretpostaviti da bi estradiol mogao uticati na regulaciju ekspresije NDRG2, i na taj način uticati na aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze (Li i sar., 2011). Osim toga, tretman HeLa ćelija estradiolom povećava nivo iRNK za NDRG2, i to posredstvom ER $\beta$  receptora (Li i sar., 2011).



## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

### 2.1. Hipoteza

Osnovna hipoteza postavljena u ovoj doktorskoj disertaciji je da je endogeni estradiol jedan od važnih regulatora aktivnosti i ekspresije iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, a efekti estradiola na ove enzime podrazumevaju učešće IRS-1/PI3K/Akt, ERK1/2, NFκB i RhoA/ROCK signalnih molekula u srcu gojaznih ženki pacova.

U postavci osnovne hipoteze, pošlo se od pretpostavke da će u patološkim stanjima, kao što je gojaznost izazvana primenom ishrane obogaćene mastima, doći do smanjenja nivoa endogenog estradiola, kao i poremećaja signalnih puteva estradiola, što će poremetiti ekspresiju i aktivnost iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu ženki pacova. Naučna hipoteza predložene doktorske disertacije je da se u stanju gojaznosti gube kardioprotektivni efekti estradiola, što dovodi do povećanja ekspresije i aktivnosti iNOS i posledične aktivacije RhoA/ROCK signalnog puta u srcu ženki pacova. Aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta dovodi do povećane fosforilacije IRS-1 na aminokiselinskim ostacima Ser i smanjenja njegove asocijacije sa PI3K, što dovodi do smanjenja ekspresije i aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu ženki pacova.

## 2. Hipoteza i ciljevi rada

### 2.2. Ciljevi rada

U skladu sa postavljenom hipotezom da gojaznost dovodi do smanjenja nivoa endogenog estradiola i poremećaja signalnih puteva kojima ovaj hormon reguliše iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazu, postavljeni su ciljevi da se u srcu gojaznih ženki ispita:

1. ekspresija  $\text{ER}\alpha$ ;
2. ekspresija i aktivnost iNOS;
3. ekspresija transportera za SMK (CD36) i glukozu (GLUT-1 i GLUT-4);
4. ekspresija i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze;
5. ekspresija signalnih molekula: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2, NF $\kappa$ B i RhoA, ROCK1 i ROCK2.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

Za eksperimente u okviru ove doktorske disertacije su korišćene ženke Wistar soja pacova, starosti osam nedelja, mase između 160 i 240 g, iz odgajališta Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd. Životinje su podeljene u dve eksperimentalne grupe:

1. kontrolna grupa normalno uhranjenih ženki (Kontrola);
2. grupa gojaznih ženki (Gojazne)

Kontrolna grupa (normalno uhranjene ženke, obeležene sa Kontrola), su tokom 10 nedelja imale slobodan pristup (*ad libitum*) vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani sastava: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 1% kalcijuma, 0.90% lizina, 0.75% metionin+cistin, 0.5% fosfora, 0.15-0.25% natrijuma, mešavine vitamina (A 10000 IU/kg, D<sub>3</sub> 1600 IU/kg, E 25 mg/kg, B<sub>12</sub> 0.02 mg/kg), mešavine minerala (u mg/kg: cink 100, gvožđe 100, magnezijum 30, bakar 20, jod 0.5, selen 0.1), antioksidanata 100mg/kg; digestibilna energija 11MJ/kg (D.D. “Veterinarski zavod Subotica”, Subotica, R. Srbija).

Eksperimentalna grupa (gojazne ženke, obeležene sa Gojazne) su tokom 10 nedelja *ad libitum* dobijale vodu i standardnu laboratorijsku hranu obogaćenu sa 42% masti (HF dijeta: *engl. High Fat Diet*).

Životinje su tokom trajanja eksperimenta čuvane u grupama (dve do tri) u standardnim kavezima za laboratorijske životinje čija je osnova napravljena od pleksiglasa, a poklopac od žice od nerđajućeg čelika. Kao podloga korišćena je piljevina, koja je menjana nekoliko puta u toku nedelje. Laboratorijski uslovi tokom eksperimenta ispunjavali su

## 3. Materijal i metode

standardne zahteve: temperatura ambijenta: 21°-24 °C; relativna vlažnost vazduha: 60-70%; režim osvetljenja: 12h svetla/12h mraka, čime je omogućen dnevno/noćni ritam.

Nakon 10. nedelje životinje su žrtvovane. U eksperimentalnu salu su donošeni pacovi u kavezima pojedinačno, kako bi se nivo stresa kod narednih pacova, koji treba da budu žrtvovani, sveo na minimum. Životinje su žrtvovane iskrvarenjem, u dubokoj anesteziji izazvanoj etrom. Nakon žrtvovanja, krv je sakupljana i kasnije korišćena za izolovanje plazme i seruma. Srca su ekstrahovana, nakon čega je izmerena njihova masa. Srca su sečena na tri dela, iz kojih su naknadno izolovani proteini lizata ćelija, membranska frakcija proteina, kao i RNK. Za zamrzavanje tkiva je u prvom koraku korišćen tečni azot, a kasnije su tkiva prebačena u zamrzivač na -70 °C, do sledećih eksperimenata.

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

### 3.2. Izdvajanje seruma iz krvi pacova

Serumi su izdvajani najpre inkubiranjem krvi (bez antikoagulansa) 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su izdvajani supernatanti centrifugiranjem krvi 15 minuta pri brzini od 3500 rpm. Izolovani serumi su čuvani u zamrzivaču na -20 °C, a kasnije korišćeni za određivanje koncentracije estradiola.

## 3. Materijal i metode

### 3.3. Izdvajanje ukupnih proteina iz srca ženki pacova

Ukupni proteini izolovani su iz 200 mg tkiva srca pacova. Postupak je izvođen tako što su tkiva srca sitnjena skalpelom i resuspendovana u 1 ml pufera za liziranje (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 1% Triton X-100, 10% glicerola, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free Roche, Nemačka) i koktel inhibitora fosfataza (PhosSTOP, *EASY*pack, Roche, Nemačka), pH=7,4) nakon čega su tkiva dodatno usitnjavana homogenizerom, i to na ledu kako ne bi došlo do degradacije proteina (T10 Basic Ultra-Turrax IKA.Werke, Nemačka). Ovako dobijeni homogenati su pomoću sonifikatora (Sonifier B-12, Branson Sonic power company, USA) sonifikovani u trajanju od po nekoliko sekundi. U sledećem koraku su homogenati inkubirani u frižideru na temperaturi od +4 °C, u trajanju od sat vremena i uz konstantnu rotaciju. Nakon centrifugiranja na +4 °C i pri brzini od 14000 rpm, a u trajanju od 20 minuta, odvajani su supernatanti. Izdvojeni supernatanti su svođeni na istu koncentraciju, alikvotirani i ostavljeni u zamrzivaču na -70 °C, a naknadno su iz njih merene koncentracije NO, L-Arg, kao i nivo proteina Western blot metodom.

### 3.4. Izdvajanje membranske frakcije proteina iz srca ženki pacova

Membranske frakcije proteina izolovane su na osnovu protokola Luikena sa saradnicima (Luikena i sar., 2004). Tkivo srca pacova (približno 200 mg) usitnjavano je uz pomoć skalpela i inkubirano u preinkubacionom puferu (2M NaCl, 20mM HEPES i 5mM NaN<sub>3</sub>, pH=7.4) u trajanju od 30 minuta na temperaturi od +4 °C. Ovako pripremljeni uzorci su centrifugirani pri brzini od 1000 x g u trajanju od pet minuta u centrifugi (Beckman, J21). Rezultujući talozi su homogenizovani u puferu za izolovanje proteina (TES; 20 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 250 mM saharoza, koktel inhibitora serinskih, cisteinskih i kiselih proteaza (Complete, Ultra Mini, EDTA-free, Roche, Nemačka) i koktel inhibitora fosfataza (PhosSTOP, *EASY*pack, Roche, Nemačka), pH 7.4). Ovako dobijeni homogenati su centrifugirani pri brzini od 1000 x g u trajanju od pet minuta.

## 3. Materijal i metode

U sledećem koraku, talozi su rehomogenizovani u TES puferu i u rezultujuće homogenate su dodavani supernatanti dobijeni u prethodnom centrifugiranju. Dalje, centrifugiranjem homogenata pri brzini od 100 x g i u trajanju od 10 minuta dobijeni su supernatanti, koji su centrifugirani još jednom pri brzini od 5000 x g i u trajanju od 10 minuta. Nakon poslednjeg centrifugiranja, supernatanti su odvajani, a talozi, u kome su se nalazile membranske frakcije proteina, su resuspendovani u TES puferu i ostavljeni u zamrzivaču na -70 °C, a naknadno je iz njih merena aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze kao i nivo proteina Western blot metodom.

### 3.5. Merenje koncentracije izolovanih proteina

Koncentracije proteina merene su pomoću spektrofotometrijske metode po Lori-ju (Lowry i sar., 1951). Princip ove metode zasniva se na formiranju kompleksa jedinjenja, koja imaju maksimum apsorpcije na 750 nm. Prvi kompleks je biuretski reagens, koga u baznoj sredini formiraju joni bakra i azot u peptidnim vezama. Drugi kompleks je redukovani Folin-Šialteov reagens. Fosfomolibdenska i fosfovolframova so Folin-Šialteov reagens, koji je u oksidovanom stanju žute boje, a pri redukciji aminokiselinama tirozinom, triptofanom i cisteinom, menja boju u plavo, pa intenzitet boje zavisi od koncentracije redukujućih grupa broja peptidnih veza.

Postupak je izvođen tako što je 5 µl uzorka razblaživano dejonizovanom vodom u odnosu 1:99 (v/v), a zatim je 25 µl razblaženja dodatno razblaženo još četiri puta. Nakon toga je u 100 µl ovako razblaženih uzoraka pipetirano po 100 µl 2% rastvora SDS, a nakon mešanja na vorteksu dodavano je po 1 ml 1% rastvora Na-K tartarata u 0,5% CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, koji je prethodno 25 puta razblažen u 2% rastvoru Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1M NaOH. Nakon vorteksovanja, uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je u njih dodavano po 100 µl Folin-Šialteovog reagensa. Nakon vorteksovanja i inkubiranja uzoraka 20 minuta na temperaturi prostorije, merene su apsorbance na talasnoj dužini od 750 nm uz pomoć spektrofotometra (Ultrospec 2000, Pharmacia, Biotech).

Standardna kriva je konstruisana na osnovu vrednosti dobijenih merenjem apsorbaneci očitanih za niz razblaženja BSA poznatih koncentracija, i to: 10, 25, 50, 75, 100, 200, 400 i

## 3. Materijal i metode

800 mg/ml. Koncentracija proteina je izražavana u  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a proporcionalna je intenzitetu dobijene boje.

### 3.6. Merenje nivoa estradiola u serumu ženki pacova

Nivo estradiola u serumu meren je komercionalnom IMMULITE metodom (Immulite/Immulite 1000 Estradiol, Simens, Velika Britanija) u Immulite (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, SAD) automatskom analizatoru prema uputstvu proizvođača.

Immulite estradiola je hemiluminescentni imunoesej sa čvrstom fazom koju predstavljaju polistirenske perle (kuglice) obložene poliklonskim zečjim antitelima specifičnim za estradiol. Ova metoda je zasnovana na kompetitivnom vezivanju estradiola iz uzoraka seruma i alkalnom fosfatazom (ALP) konjugovanom estradiolom za ograničen broj vezujućih mesta na antitelima koja su vezana za polistirenske perle. Višak uzorka i nevezanog analita odstranjuju se ispiranjem i centrifugiranjem. Nakon toga se dodaje hemiluminescentni substrat, fosfatni ester adamantil dioksetana, koji se u prisustvu enzima ALP hidrolizuje i nastaje nestabilni anjon, pri čijoj razgradnji se emituju fotoni (svetlost). Intenzitet emitovane svetlosti se meri pomoću Immulite instrumenta i generiše se signal proporcionalan količini vezanog ALP konjugovanog sa estradiolom, obrnuto proporcionalanog koncentracijama estradiola u uzorcima seruma i izražavan je kao pg/ml.

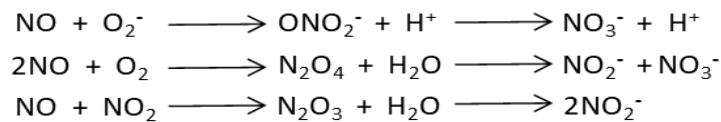
### 3.7. Određivanje nivoa NO u lizatu tkiva srca ženki pacova

Nivo NO u serumu određivan je korišćenjem komercijalnog  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001). Nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) nastaju kao krajnji produkt NO (Slika 1.A), stoga je nivo NO određivan indirektno. Princip metode se zasniva na redukciji  $\text{NO}_3^-$  reakcijom nitrat reduktaze i bojenjem dobijenih  $\text{NO}_2^-$  u Griz-ovoj reakciji (Slika 1.B) (Hevel sa sar., 1994). U prvom koraku nitrat reduktaza konvertuje  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}_2^-$ , a u sledećem koraku  $\text{NO}_2^-$  gradi tamno ljubičasto azo

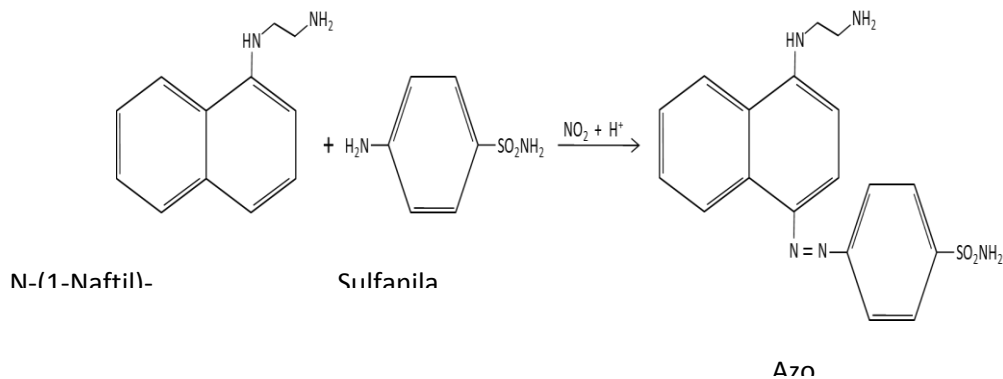
### 3. Materijal i metode

jedinjenje dodatkom Griz-ovog reagensa. Merenjem apsorbance na 540 nm određivana je koncentracija  $\text{NO}_2^-$ .

A.



B.



#### **Slika 1. Konverzija nitrata u Azo produkt**

A. Konverzija azot monoksida ( $\text{NO}$ ) u nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) i nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )

B. Formiranje Azo jedinjenja iz nitrita

Postupak za merenje nivoa  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  je izvođen nanošenjem po 80  $\mu\text{l}$  niza razblaženja  $\text{NO}_3^-$  poznatih koncentracija, kao i proteinskih lizata tkiva srca pacova na mikrotitarske polistirenske ploče sa 96 bunarića. Nakon toga su u mikrotitarske ploče pipetirani kofaktori za enzime u zapremini od po 10  $\mu\text{l}$ , a zatim je pipetirana i nitrat reduktaza u zapremini od 10  $\mu\text{l}$ . Uzorci sa kofaktorima i nitrat reduktazom su inkubirani 3 sati na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodavano po 50  $\mu\text{l}$  Griz-ovog reagensa R1 i Griess-ovog reagensa R2. Očitavanje apsorbanci dobijenog produkta vršeno je nakon 10 minuta inkubiranja na sobnoj temperaturi, uz pomoć automatskog čitača za mikrotitarske ploče (Perkin Elmer, Wallac 1420 Victor) na talasnoj dužini od 540 nm. Standardna kriva je konstruisana na osnovu vrednosti dobijenih merenjem apsorbanci očitanih za niz  $\text{NO}_3^-$  poznate koncentracije i izražavana u  $\mu\text{M}$ .



## 3. Materijal i metode

### 3.8. Merenje nivoa L-Arginina (L-Arg) u lizatima srca ženki pacova

Koncentracije L-Arg u proteinskim lizatima tkiva srca ženki pacova određivane su modifikovanom spektrofotometrijskom reakcijom po Kovalčuku (Kowalczuk D i sar., 2007). Ova metoda je zasnovana na ninhidrinskoj reakciji u kojoj  $\alpha$ -aminokiselina i ninhidrin reaguju pri čemu se ninhidrin redukuje do hidrindantina, dok se  $\alpha$ -aminokiselina najpre oksiduje u  $\alpha$ -imino kiselinu, a zatim se hidrolizom imino ( $\text{NH}^2$ ) grupe i oslobađanjem amonijaka  $\alpha$ -imino kiselina konvertuje u  $\alpha$ -keto kiselinu. Nastala  $\alpha$ -keto kiselina se dekarboksilacijom, usled zagrevanja, konvertuje u odgovarajući aldehid, dok ostatak ninhidrina, hidrindantin i nastali amonijak grade kondenzovano jedinjenje plave boje, koje ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 404 nm.

Postupak za određivanje nivoa L-Arg izvođen je tako što je u 1980  $\mu\text{l}$  25 mM PBS (fosfatni pufer, pH=9) pipetirano po 20  $\mu\text{l}$  lizata srca pacova čija je koncentracija proteina bila 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , kao i dodavanjem po 1 ml 2% ninhidrinskog reagensa (Ninhzdrinum, Serva, Hajdelberg, Nemačka) rastvorenog u PBS. Ovako pripremljeni uzorci su kratko mućkani, a zatim inkubirani na 80 °C (korišćenjem vodenog kupatila) u trajanju od 15 minuta. U sledećem koraku, uzorci su hlađeni do temperature prostorije, a zatim su spektrofotometrom (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer) određivane apsorbanice uzoraka. Standardna kriva je konstruisana na osnovu vrednosti dobijenih merenjem apsorbanice niza razblaženja L-Arg (L-arginine monohydrochloride, Kemika, Zagreb, Hrvatska) čije su koncentracije bile poznate. Količina L-Arg u svakom uzorku odgovara intenzitetu boje koja je dobijena u uzorcima, a izražavana je kao  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 3. Materijal i metode

### 3.9. Merenje nivoa slobodnih masnih kiselina (SMK) u lizatima srca ženki pacova

Za merenje količine SMK u lizatima ženki srca pacova korišćena je modifikovana kolorimetrijska metoda po Dunkombu (Duncombe, 1964). Ova metoda je zasnovana na činjenici da masne kiseline izolovane iz lizata tkiva srca u hloroformu grade soli bakra uz prisustvo reagensa koji sadrži bakar, koje naknadno uz prisustvo dietilditiokarbamata (DDC; *engl. Diethyl-Dithiocarbamate*) formiraju kompleksno jedinjenje žute boje, koje maksimalno apsorbuje svetlost talasne dužine od 463 nm.

Esej je rađen dodavanjem 45 µl lizata tkiva srca pacova u prethodno pripremljene epruvete koje sadrže po 225 µl trietanolaminskog (TEA) pufera pH 7,8 ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{H}_2\text{O}$  uz postepeno dodavanje 7,5M TEA) i kratko mešano. Nakon toga je u epruvete dodavano po 1125 µl hloroforma i snažno mućkano 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirano (klinička centrifuga, Galaxy 14D, VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD) pri brzini od 3000 rpm u trajanju od 10 minuta. Gornji plavozeleni nivo koji je sadržao proteine, odstranjivan je pasterovom pipetom, dok su u donjem (hloroformskom) sloju ostale SMK. U sledećem koraku je u čiste epruvete pesipano 450 µl donjeg sloja i pipetirano po 45 µl 0,2% DDC. Posle snažnog mućkanja, uzorci su inkubirani na temperaturi prostorije u trajanju od 20 minuta. Očitavanjem apsorbance dobijenog produkta reakcije na 463 nm uz pomoć spektrofotometra (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer), određivana je količina SMK. Standardna kriva, pomoću koje je merena količina SMK u lizatima tkiva srca pacova, konstruisana je na osnovu vrednosti dobijenih merenjem apsorbance niza razblaženja palmitinske kiseline čije su koncentracije bile poznate. Količina SMK u svakom uzorku odgovara intenzitetu boje koja je dobijena u uzorcima, a izražavana je kao mmol/mg tkiva.

## 3. Materijal i metode

### 3.10. Merenje aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze

Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze merena u proteinima izolovanim iz plazma membrana tkiva srca pacova, pri čemu je korišćena modifikovana spektrofotometrijska metoda po Kacu (Katz i Epstein, 1967).

S obzirom da je Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaza enzim koji za svoju aktivnost koristi energiju oslobođenu hidrolizom ATP pri čemu nastaju ADP i P<sub>i</sub>, njena aktivnost određuje se merenjem količine nastalog P<sub>i</sub>, koja je direktno proporcionalna aktivnosti enzima.

Oubain je kardijačni glikozid koji blokira Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu. Vezivanje oubaina za Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu sprečava konformacione promene neophodne za njeno pravilno funkcionisanje, a samim tim i hidrolizu ATP. Relativna aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze računa se na osnovu razlike količine oslobođenog fosfata u uzorcima sa totalnom inkubacionom smešom bez oubaina i uzoraka koji sadrže totalnu inkubacionu smešu sa oubain-om. U prisustvu odgovarajućeg redukujućeg agensa, fosfati reaguju sa amonijum molibdatom i formiraju jedinjenje plave boje. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji fosfata u uzorku (Katz i Epstein, 1967)

Postupak je izvođen u dva seta epruveta. Prvom setu epruveta dodavana je totalna inkubaciona smeša (50 µl) (40 mM NaCl; 80 mM KCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 mM Tris HCl; pH=7,4), uzorci plazma membrane (25 µl) u kojem je koncentracija proteina bila 1 µg/µl i dejonizovana voda (105 µl). Drugom setu epruveta dodavana je totalna inkubaciona smeša (50 µl), uzorci plazma membrane (25 µl) u kojem je koncentracija proteina bila 1 µg/µl, dejonizovana voda (85 µl) i 10mM oubain (20 µl). Pokretanje reakcije vršeno je inkubiranjem uzoraka 15 minuta na 37 °C i dodavanjem 20mM ATP (20 µl), dok je zaustavljanje reakcije vršeno tako što je u uzorke dodavana 3 M perhlorna kiselina (22 µl), nakon čega su uzorci hladjeni stavljanjem na led. U sledećem koraku su određivane koncentracije fosfata u uzorcima, i to dodavanjem u uzorke 0,02 M amonijum heksahidro molibdat rastvoren u 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 µl) i dve kapi SnCl<sub>2</sub>, te inkubacijom uzoraka 15 minuta na temperaturi prostorije. Koncentracija fosfata određivana je merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 690 nm uz pomoć spektrofotometra (Perkin Elmer Lambda 35UV/VIS Spectrometer). Aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze predstavljena je kao mmolPi/min/mg proteina.

## 3. Materijal i metode

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

Kao početni postupak za određivanje nivoa proteina izolovanih iz srca pacova primenjena SDS-PAGE (Laemmli, 1970), što predstavlja metodu kojom se denaturisani proteini razdvajaju, i to na osnovu njihovih različitih molekularnih masa. Kako bi se postigao visok stepen odvajanja proteina na osnovu molekularne mase, korišćen je 4% gel za koncentrovanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H<sub>2</sub>O) i 10% gel za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H<sub>2</sub>O), a takođe su korišćeni i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H<sub>2</sub>O) kao i pet puta koncentrovan Laemmli pufer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2-β-mercaptoetanol, 0,1% bromfenol plavo).

Priprema uzoraka za elektroforezu podrazumevala je njihovo svođenje na koncentraciju od 5 µg/µl proteina, pri čemu je za ukupne proteine tkiva srca korišćen pufer za liziranje, dok je za proteine plazma membrana korišćen TES pufer. Dalje, u uzorke je dodavan pet puta koncentrovan Laemmli pufer, u odnosu 1:5. Elektroforeza je započinjana nanošenjem po 20 µl uzorka u svaki bunarić gela (100 µg ukupnih proteina). U sledećem koraku su proteini u uzorcima razdvajani pomoću aparature za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell electrophoresis, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD), prvo primenom napona od 80 V u trajanju od 30 minuta, nakon čega su uzorci u trajanju od 120 minuta izlagani voltaži od 120 V.

Kako bi po zavšetku elektroforeze lokalizovali ispitivane proteine prema molekularnoj masi, u svaki prvi bunarić gela je nanošeno i po 5 µl proteinskog markera za elektroforezu (PageRegularTMPrestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Litvanija) koji je sadržao niz različitih obojenih proteina kojima su poznate molekularne mase, i to: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa.

## 3. Materijal i metode

### 3.12. Imuno blot

Po završetku SDS-PAGE elektroforeze, vršena je detekcija nivoa specifičnih proteina u lizatima i membranama srca pacova Imuno blot (Western blot) analizom. Ispitivani proteini su identifikovani po principu antigen-antitelo reakcije. Imajući u vidu da se ova reakcija ne može izvesti na gelu, razdvojene proteinske frakcije su transportovane na membranu.

Elektrotransfer proteina koji su se nalazili na poliakrilamidnom gelu vršen je upotrebom aparata za mokri transfer (Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD). Proteini su transferovani na poliviniliden fluorid (PVDF) membrane (Immobilon-P membrana, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corporation, SAD) primenom konstantne struje od 350 mA u trajanju od 60 minuta uz korišćenje pufera za transfer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicin), pri čemu je ceo postupak izvođen u frižideru na temperaturi od +4°C. Kako bi se proverio stepen uspešnosti transfera proteina, membrane su po završetku transfera, u toku jednog minuta, inkubirane u rastvoru PonsoS (0,1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, razblažen istovetnim volumenom TBS-T pufera (0,05% Tween 20 u TBS puferu, *engl. Tris Buffered Saline; puferu* (25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 7,8)). Nakon vizualizacije traka proteina, višak rastvora PonsoS uklanjan je ispiranjem membrana prvo destilovanom vodom, a potom i TBS-T puferom. Imajući u vidu da se tokom imuno blot procedure antitela mogu nespecifično vezati za PVDF membranu, membrane su morale biti blokirane. Ovaj korak je vršen inkubiranjem membrana u trajanju od 120 minuta i pri sobnoj temperaturi, u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBS-T ili 5% nemasno mleko u prahu rastvoreno u TBS-T).

Po završenom blokiranju uklanjan je višak pufera za blokiranje, i to ispiranjem membrana u TBS-T puferu, a zatim su membrane u toku noći ostavljane u rastvoru specifičnih primarnih antitela, u frižideru na temperaturi od +4 °C, uz konstantno rotiranje. Kako bi potvrdili da je u bunariće nanošena istovetna količina uzorka (*engl. loading control*) korišćena su antitela koja specifično prepoznaju  $\beta$ -aktin. Primarna antitela razblaživana su u odgovarajućem odnosu u 5% rastvoru nemasnog mleka ili 5% rastvora BSA u TBS-T (**Tabela 1.**). Nakon inkubiranja u rastvoru specifičnih primarnih antitela, sledilo je ispiranje membrana u TBS-T puferu tri do pet puta, po pet minuta, a potom i inkubiranje membrana u

### 3. Materijal i metode

rastvoru odgovarajućih HRP ili ALP konjugovanih sekundarnih antitela (anti—zečija, anti—mišija, ili anti—kozija, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) u trajanju od 60 minuta, a pri temperaturi prostorije. Sekundarno antitelo razblaživano je do odgovarajuće koncentracije u 5% rastvoru BSA u TBS-T puferu. Posle inkubiranja u rastvoru sekundarnih antitela, sledilo je ispiranje membrana u TBS-T puferu tri do pet puta, po pet minuta. Uzimajući u obzir tip enzima koji je konjugovan sa sekundarnim antitelom, membrane su kratko inkubirane ili u supstratu za peroksidazu rena (HRP; *engl. HoRseradish Peroxidase*) ili u supstratu za alkalnu fosfatazu (ALP; *engl. Alkaline phosphatase*).

Detektovanje željenih proteina vršeno je nanošenjem ECL (ECL; *engl. enhanced chemiluminescence*) na membrane u slučaju kada je sekundarno antitelo bilo konjugovano sa HRP, i to uz pomoć autoradiografskih filmova. Princip ove metode baziran je na oksidaciji luminola uz pomoć peroksidaze, a pri tome nastaje intermedijerno koje jedinjenje koje luminiscencijom (emitovanjem svetlosti) dovodi do osvetljavanja filma. Ovaj postupak se izvodi inkubiranjem membrane u trajanju od jednog minuta u reagensu dobijenim mešanjem jednakih zapremina rastvora  $H_2O_2$  u Tris-HCl, pH 8,5 i luminola i p-kumarične kiseline rastvorenih u Tris-HCl, pH 8,5. Za detekciju signala korišćene su kasete za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD), kao i rentgen filmovi (AGFA, Medical X-ray film, Belgija), pri čemu je vremenski period u kome je film ekspoziran luminiscenciji varirao od 30 sekundi do sat vremena, u zavisnosti od intenziteta dobijenog signala.

U slučaju kada je sekundarno antitelo bilo konjugovano sa ALP, detektovanje željenih proteina vršeno je pomoću BCIP/NBT reagensa (BCIP/NBT; *engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Chloride*; sc-2498, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD). Princip reakcije se zasniva na defosforilaciji BCIP pod dejstvom ALP, pri čemu nastali produkt intereaguje sa NBT formirajući na taj način plavo-ljubičasto obojeno jedinjenje. Postupak je izvođen inkubiranjem membrane u mraku i na temperaturi prostorije u rastvoru koji je činilo 200  $\mu$ l reagensa BCIP/NBT/i 10 ml pufera: 0,1M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1M NaCl, 0,05M  $MgCl_2$ . U trenutku kada se membrane oboje, odnosno kada se signali pojave kao plavo-ljubičasto obojene trake, a koje predstavljaju željene proteine, reakcija bojenja je zaustavljena ispiranjem membrana u TBS-T puferu, nakon čega je sledilo kvantifikovanje signala.

### 3. Materijal i metode

Prilikom kvantifikovanja optičkih gustina dobijenih traka proteina, korišćen je računarski program ImageJ 1.48 (NIH, SAD). Srednja vrednost piksela koja se dobije za otisak signala kod kontrolnih ženki pacova definisana je kao arbitrarna jedinica (AJ) po  $\mu\text{g}$  proteina, dok su očitane vrednosti za gojazne životinje uprođivane su sa kontrolnim vrednostima i opet prikazivane kao (AJ) po  $\mu\text{g}$  proteina. Intenziteti signala, odnosno nivo ispitivanog proteina, oređivan je denzitometrijski i u odnosu na  $\beta$ -aktin.

**Tabela 1. Spisak primarnih antitela korišćenih prilikom detekcije proteina**

Primarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Korišćeno razblaženje
$\beta$ aktin	Santa Cruz Biotechnology	sc-81178	1:1000
iNOS	Abcam	ab15323	1:200
NF- $\kappa$ B p50	Santa Cruz Biotechnology	sc-1190	1:500
Anti-PI3K p85	Abcam	ab86714	1:1000
Anti-PI3K p110	Cell Signalling	4249	1:1000
pAKT (Ser <sup>473</sup> )	Abcam	ab66138	1:2500
Akt	Abcam	ab8805	1:2500
pERK (Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> )	Cell Signalling	9101	1:1000
ERK	Cell Signalling	9102	1:1000
RhoA	Abcam	ab68829	1:800
ROCK1	Cell Signalling	4035	1:1000
ROCK2	Cell Signalling	8236	1:1000
ER $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	sc-542	1:1000
NDRG2	Cell Signalling	5667	1:1000
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza p $\alpha_1$ (Ser <sup>23</sup> )	Abcam	ab74069	1:1000
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza $\alpha_1$	Abcam	ab74945	1:1000
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza $\alpha_2$	Santa Cruz Biotechnology	sc-16049	1:1000
CD36	Santa Cruz Biotechnology	sc-9154	1:100
GLUT-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-7903	1:200
GLUT-4	Santa Cruz Biotechnology	sc-7938	1:200

*iNOS-inducibilna azot-monoksid sintaza; NF- $\kappa$ B p50- p50 subjedinica nuklearni faktor  $\kappa$ B; PI3K p85- regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol-3 kinaze; PI3K p110- katalitička subjedinica fosfatidilinozitol-3 kinaze; Akt-protein kinaza B; ERK 1/2 kinaza regulisane vanćelijskim signalima 1 i 2; RhoA- mali GTP vezujući protein (engl. Ras homolog gene family, member A); ROCK- RhoA-asocirana protein kinaza (engl. Rho-associated protein kinase); ER $\alpha$ - ER alfa); CD36-translokaza masnih kiselina; GLUT-1- transporter za glukozu tip 1; GLUT-4-transporter za glukozu tip 4.*

## 3. Materijal i metode

### 3.13. Ko-imunoprecipitacija IRS-1 i p85 subjedinice PI3K

Ko-imunoprecipitacija je tip imunoprecipitacije kojim se detektuju interakcije koje postoje između dva proteina, i to indirektnim vezivanjem određenog proteina za koji je poznato da interaguje sa željenim proteinom. Imunoprecipitacija je reakcija koja se zasniva na interakciji određenog antitela i antigena koji se nalazi na ciljnom proteinu. Da bi došlo do imunoprecipitacije neophodno je da antitelo bude kuplovano za supstrat-agarozu, koja ima funkciju “kačenja“ proteinskog kompleksa koji je nastao u reakciji željenog proteina iz uzorka i njegovog specifičnog antitela. Protein koji je izolovan na ovaj način, ponovo se rastvara u puferu za liziranje i dalje detektuje Western blot metodom.

Postupak ko-imunoprecipitacije je podrazumevao je pripremanje uzorka, i to tako što je u 50  $\mu$ l proteinskog lizata srca pacova koncentracije 10  $\mu$ g/ $\mu$ l dodavano 2  $\mu$ g primarnog antitela za IRS-1 (ab52167, Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL), i ova smeša je preko noći inkubirana u frižideru, na temperaturi od +4 °C i uz konstantno rotiranje. Sledeći dan je najpre 20  $\mu$ l protein A/G sefaroze (Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) ispirano u TBS-T, pri čemu sefaroza centrifugirana tri puta, a potom je u sefarozu dodavan prethodno pripremljen uzorak i cela smeša (protein A/G sefaroza+antitelo+uzorak) je opet preko noći inkubirana u frižideru, na temperaturi od +4 °C i uz konstantno rotiranje. Nakon inkubiranja, novonastali kompleks je ispiran uz centrifugiranje. Talog koji je nastao nakon poslednjeg centrifugiranja sadržao je, kako ciljni protein, tako i sve ostale proteine sa kojima interaguje. Ovaj talog je ponovo rastvoren u puferu za liziranje, i pripreman za elektroforezu po prethodno opisanom postupku. Nakon elektroforeze i transfera proteina, na membranama je detektovana p85 subjedinica PI3K Western blot metodom, po prethodno opisanoj proceduri.



## 3. Materijal i metode

### 3.14. Određivanje ekspresije iRNK za iNOS

Ekspresija iRNK za iNOS određivana je u tri koraka. Prvo je izolovana ukupna RNK iz tkiva srca pacova. U drugom koraku je reverznom transkripcijom RNK molekula koji je služio kao matrica, sintetisan komplementarni lanac molekula DNK (cDNK; *engl. complementary DNA*). Na osnovu dobijenog cDNK u sledećim koracima je merena relativna ekspresija gena za iNOS na nivou iRNK, primenom metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR, *engl. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

#### 3.14.1. Izolovanje RNK

Ukupna RNK iz tkiva srca ženki pacova izolovana je primenom metode fenolske ekstrakcije uz pomoć reagensa Trizola (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija). Komadi tkiva srca pacova homogenizovani su na ledu, u trizolu (1 ml), uz pomoć homogenizatora (T10 Basic Ultra-Turrax IKA, Werke, Nemačka). Po završenom inkubiranju uzoraka na temperaturi prostorije, a koje je trajalo pet minuta, sledilo je centrifugiranje na temperaturi od +4 °C, pri brzini od 12000 x g, a u trajanju od deset minuta. U sledećem koraku je u uzorke dodavan hloroform (200 µl), a potom je smeša vorteksovana i inkubirana deset minuta na +4 °C. Dalje, uzorci su još jednom centrifugirani 15 minuta pri brzini od 12000 x g, na temperaturi od +4 °C, nakon čega su razdvajane hloroformska i fenolska faza, dok je ukupna RNK je taložena sa izopropil alkoholom (500 µl) na temperaturi od -20 °C, a u trajanju od 24 sata. Na kraju je staložena RNK je ispirana dva puta u 75% etanolu (1 ml), ostavljena pet minuta na temperaturi prostorije da se osuši i resuspendovana u vodi tretiranoj dietilpriokarbonatom (DPC-H<sub>2</sub>O). Količina izolovane RNK merena je spektrofotometrijskom metodom, uz pomoć aparata BioSpec-nano (Shimatzu, SAD). Prečišćenost RNK određivana je na osnovu odnosa apsorpcije na 260 nm i 280 nm, pri čemu je odnos A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1,8 zadovoljavajući, dok je analiza stepena degradacije dobijene RNK vršena 1,2% agaroznom nenedenaturišućom elektroforezom u primenom konstantne voltaže od 100 V i u toku 30 minuta.

## 3. Materijal i metode

### 3.14.2. Metoda reverzne transkripcije-sinteza cDNK

Metoda reverzne transkripcije, odnosno prevođenje RNK u komplementarnu DNK (cDNK; *engl. Complementary DNA*), vršena je pomoću kompleta za sintezu cDNK: *The RevertAid™ H Minus First Strand Cdna Synthesis Kit* (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođača.

Postupak je izvođen tako što su 1 µg ukupne RNK izolovane iz tkiva srca pacova i 1 µl heksamera (Random Hexamer Primer), razblaženi u dejonizovanoj vodi do ukupnog volumena od 12 µl, inkubirani pri temperaturi od 65 °C i u trajanju od pet minuta. U sledećem koraku u ovako pripremljen uzorak su dodavane sledeće supstance: reakcioni pufer (5xReaction Buffer), po 4 µl; inhibitor RNKaze (RiboLock RNase Inhibitor), po 1 µl, koncentracije 20U/µl; dNTP Mix, po 2 µl koncentracije 10mM i reverzna transkriptaza (RevertAid H Minus M-MuL Reverse Transkriptase), 1 µl koncentracije 200U/µl. Posle kratkog vorteksovanja, uzorci su centrifugirani i prvo inkubirani na temperaturi od 25 °C u trajanju od pet minuta, a potom i na temperaturi od 42 °C u trajanju od 60 minuta. Kako bi se zaustavila reakcija, uzorci su na pet minuta zagrevani na 70 °C. Na ovaj način sintetisana cDNK je dalje upotrebljavana prilikom kvantifikacije relativne ekspresije gena iNOS.

### 3.14.3. Određivanje nivoa ekspresije iNOS gena

Relativna ekspresija gena za iNOS određivana je qRT-PCR metodom. Imajući u vidu da β aktin ima stabilnu ekspresiju u srcu, za normalizaciju ekspresije gena za iNOS na nivou iRNK upotrebljavan je β aktin kao referentni gen.

Reakcija qRT-PCR izvođena je u real-time PCR sistemu reakcija (Applied Biosystem 7500, Carlsbad, SAD), u mikrotitarskim pločama sa 96 komora (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD). Za izvođenje qRT-PCR analize su korišćeni Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mixes with low ROX (Agilent Technologies, Santa Clara, United States), 20 ng cDNK kao matrica, kao i specifični prajmeri čije su sekvence prikazane u Tabeli 2.

### 3. Materijal i metode

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

Gen pacova	Prajmer		GenBank accession number	Dužina PCR produkta (bp)
iNOS	forward	5'-AGAAGTCCAGCCGCACCAC-3'	NM_012611	103
	reverse	5'-TGGTTGCCTGGGAAAATCC-3'		
$\beta$ aktin	forward	5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3'	NM_031144	76
	reverse	5'-GAGCCACCAATCCACAGA-3'		

Reakcija qRT-PCR odvijala se u aparatu ( Applied Biosystem 7500, Carlsbad, SAD) pri slećem temperaturnom profilu: deset minuta na temperaturi od 95 °C, zatim po 40 ciklusa u trajanju od pet sekundi na temperaturi od 95 °C i jedan minut temperaturi od 61 °C, kako za iNOS, tako i za  $\beta$  aktin. Esej je izvođen u mikrotitarskim pločama od po 96 mesta (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, Carlsbad, SAD). U sledećem koraku je konstruisana kriva topljenja, a zatim je na osnovu krive proveravana kontaminacija, kao i formiranje nespecifičnih produkata (dimer-prajmer).

Za obradu rezultat dobijenih primenom qRT-PCR metode, korišćen je matematički model analize, tj. komparativna metoda "ciklus praga" (Ct; *engl. cycle threshold*). Ct predstavlja tačku u PCR reakciji u kojoj se nivo fluorescencije duplira u svakom sledećem ciklusu amplifikacije, a dešava se u toku eksponencijalne faze PCR reakcije. Po dostizanju Ct, reakcija se usporava i poseže se tzv. „plato“ faza. Logaritam početnog nivoa analiziranog molekula proporcionalan je Ct vrednosti. Za određivanje nivoa ekspresije analiziranog gena korišćene se sledeće vrednosti:  $\Delta$ Ct-razlika između dobijene Ct vrednosti za analiziran gen i Ct vrednosti dobijene za  $\beta$  aktin i  $\Delta\Delta$ Ct koja predstavlja razliku između  $\Delta$ Ct i  $\Delta$ Ct kalibratora, pri čemu je kao vrednost kalibratora korišćena srednja vrednost svih uzoraka iz kontrolne grupe (Livak i Schmittgen, 2001), a ekspresija analiziranog gena je iskazivana kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Za analizu dobijenih rezultata upotrebljavan je program Detection RQ Study za 7500 System SDS (Applied Biosystem, Carlsbad, SAD).

## 3. Materijal i metode

### 3.15. Statistička obrada dobijenih i prikazanih rezultata

Dobijeni Rezultati ove doktorske disertacije predstavljani su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Postojanje statistički značajnih razlika u nivou određivanih molekula između kontrolnih i gojaznih ženki pacova određivano je na osnovu Student-ovog *t*-testa, a primenom Excel PC programa. Verovatnoća manja od 0,05 ( $p < 0,05$ ), prihvatana je kao statistički značajna.

### 4. REZULTATI

Imajući u vidu da sinteza i kardioprotektivni uticaj estradiola mogu biti smanjeni usled razvoja gojaznosti indukovane HF režimom ishrane (Balasubramanian i sar., 2012), dalje smo pratili efekte HF režima ishrane na koncentraciju estradiola u serumu, kao i na nivo ER $\alpha$  proteina u srcu ženki pacova.

Uzimajući u obzir postavljene ciljeve istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji izučavana je regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova. Osim toga, izučavani su i efekti HF režima ishrane na signalne molekule IRS-1, PI3K, Akt i ERK 1/2, kao i na RhoA/ROCK signlani put koji su predstavljaju važne regulatore ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu ženki pacova. Takođe, praćen je uticaj HF režima ishrane na ekspresiju transkripcionog faktora NF $\kappa$ B, kao i na nivo NDRG2 proteina u srcu ženki pacova.

Osnovni energetske supstrati, neophodni za normalno funkcionisanje srca, su glukoza i masne kiseline, a njihov transport u kardiomiocite odvija se uz pomoć specifičnih transportera (Luiken i sar., 2004). U cilju izučavanja efekata HF dijete na metabolizam glukoze i masnih kiselina u srcu, merena je koncentracije SMK u lizatima, kao i nivo transportera masnih kiselina CD36 i transportera glukoze GLUT-1 i GLUT-4 u lizatima i membranskim frakcijama tkiva srca ženki pacova.

## 4. Rezultati

### 4.1. Masa srca ženki pacova

U **Tabeli 1.** su prikazani rezultati dobijeni merenjem mase srca ženki pacova, kao i rezultati dobijeni izračunavanjem odnosa mase tela i srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova. Mase srca su merene neposredno nakon žrtvovanja pacova, a rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolnih i gojaznih ženki pacova. Dalje, rezultati izračunavanja odnosa mase srca i tela, nisu se razlikovale između kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

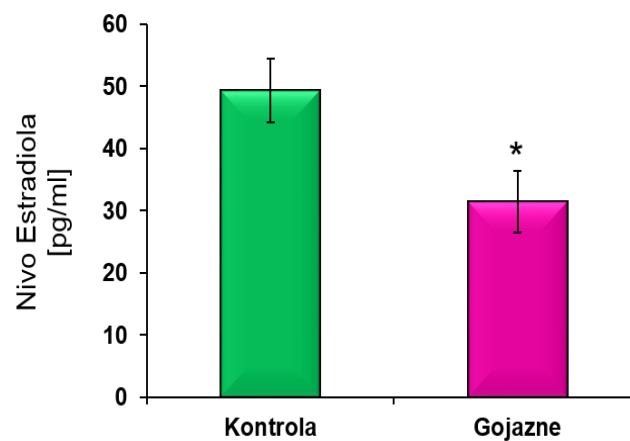
<b>Eksperimentalna grupa</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Gojazne</b>
<b>Masa srca [g]</b>	0,94±0,03	0,97±0,03 n.s.
<b>Odnos mase srca i mase tela</b>	3,6±0,11x10 <sup>-3</sup>	3,59±0,07x10 <sup>-3</sup> n.s.

***Tabela 1. Rezultati merenja mase srca, kao i odnosa mase tela i srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova.***

*Rezultati za mase srca su izraženi u g i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=8) (n.s.-nije statistički značajno).*

### 4.2. Koncentracija estradiola u serumu gojaznih ženki pacova

Literaturni podaci pokazuju da estradiol ima važnu ulogu regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Palacios i sar., 2004; Yeh i sar., 2011). U skladu sa tim, određivan je uticaj HF režima ishrane na koncentraciju estradiola u serumu. Dobijeni i prikazani rezultati (**Slika 1.**) pokazuju da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije estradiola u serumu (Kontrola=  $49.28 \pm 5.16$  pg/ml; Gojazne=  $31.43 \pm 2.68$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova.

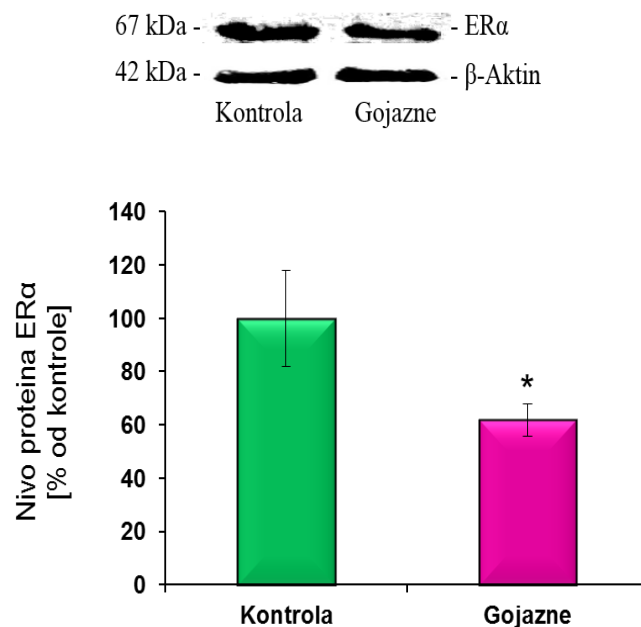


**Slika 1.** Nivo estradiola u serumu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Standardizovana IMMULITE metoda korišćena je za merenje količine estradiola u serumu ženki pacova. Rezultati su prikazani kao pg/ml i predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=6-7$ ) (\* $p < 0,05$ ).

### 4.3. Količina ER $\alpha$ u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Rezultati merenja nivoa ER $\alpha$  (Slika 2.) pokazuju da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja nivoa ER $\alpha$  proteina u tkivu srca pacova (Kontrola=100 $\pm$ 17%; Gojazne=62 $\pm$ 6%, p<0,05) gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova.



**Slika 2. Količina ER $\alpha$  proteina u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina ER $\alpha$  su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM (n=5) (\*p<0,05).



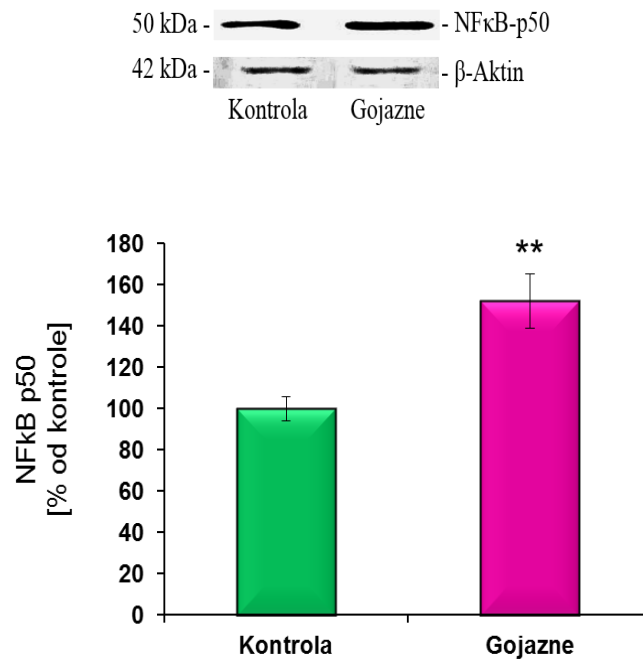
### **4.4. Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova**

Među osnovnim ciljevima u ovoj doktorskoj disertaciji našlo se, između ostalog, i istraživanje uticaja HF režima ishrane na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u tkivu srca ženki pacova. U skladu sa tim, u ovom poglavlju biće prikazani rezultati dobijeni merenjem nivoa transkripcionog faktora NFkB, nivoa iRNK za iNOS, iNOS proteina, kao i koncentracije L-Arg i  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  u lizatima srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova.

#### **4.4.1. Količina p50 subjedinice transkripcionog faktora NFkB u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova**

Transkripcioni faktor NFkB je jedan od važnih regulatora ekspresije gena za iNOS, a literaturni podaci pokazuju da promotor gena iNOS sadrži specifično mesto vezivanja NFkB (Negi i sar., 2011), stoga smo dalje pratili efekte HF režima ishrane na ekspresiju p50 subjedinice NFkB u lizatima tkiva srca ženki pacova (**Slika 3.**). Dobijeni i prikazani rezultati pokazuju da je primena HF režima ishrane dovela do statistički značajnog povećanja nivoa p50 subjedinice NFkB u srcu gojaznih u poređenju sa vrednostima dobijenim kod kontrolnih ženki pacova (Kontrola= $100 \pm 5\%$ ; Gojazne= $152 \pm 13\%$ ,  $p < 0,01$ ).

## 4. Rezultati



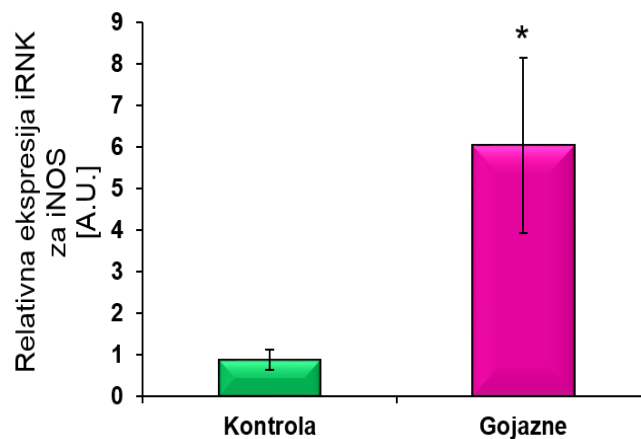
**Slika 3. Ekspresija NFkB-p50 u lizatima tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina NFkB p50 su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), (\*\* $p<0,01$ ).

## 4. Rezultati

### 4.4.2. Analiza ekspresije gena za iNOS na nivou iRNK u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Na **Slici 4.** prikazan je uticaj HF režima ishrane na relativnu ekspresiju gena za iNOS na nivou iRNK u lizatima tkiva srca ženki pacova. Dobijeni i prikazani rezultati su pokazali da nivo iRNK za iNOS bio statistički značajno povećan (Kontrola= $0,87 \pm 0,23$  A.J.; Gojazne= $6,03 \pm 2,10$  A.J.,  $p < 0,05$ ) u srcu gojaznih pacova u poređenju sa vrednostima dobijenim kod kontrolnih ženki pacova



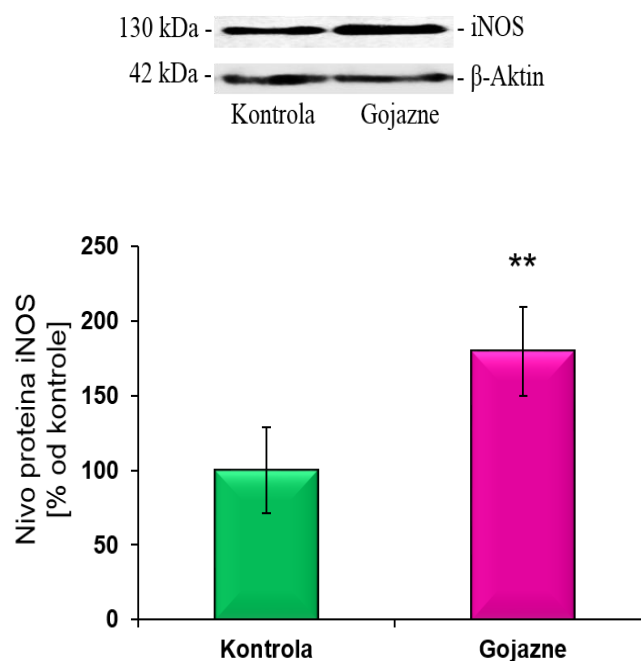
**Slika 4.** Relativna ekspresija gena za iNOS u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Korišćenjem metode qRT-PCR merena je relativna ekspresija gena za iNOS. Dobijene vrednosti izražene su kao relativna količina iRNK za iNOS, tj. A.J. Rezultati su predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=3-5$ ) ( $*p < 0,05$ ); A.J.-arbitrarna jedinica.

## 4. Rezultati

### 4.4.3. Analiza ekspresije gena za iNOS na nivou proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Merenjem nivoa ekspresije gena za iNOS na nivou proteina, u lizatu srca pacova, dobijeni su rezultati koji su prikazani na **Slici 5**. Rezultati su pokazali da je HF režim ishrane, u trajanju od 10 nedelja, doveo do statistički značajnog povećanja nivoa iNOS (Kontrola=100±29%; Gojazne=179±30%,  $p<0.01$ ) u srcu gojaznih u poređenju sa normalno uhranjenim ženkama pacova.

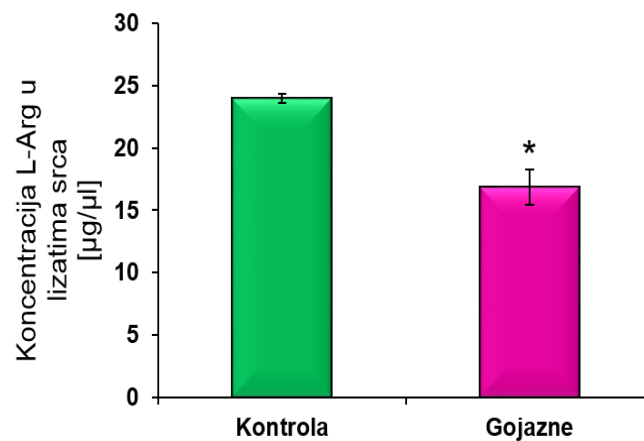


**Slika 5. Ekspresija gena za iNOS na nivou proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije gena iNOS na nivou proteina meren je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ) (\*\* $p<0,01$ ).

### 4.4.4. Količina L-Arg u lizatima srca ženki pacova

Kako bi se istražio uticaj HF režima ishrane na aktivnost iNOS u srcu ženki pacova, među prvim eksperimentima urađenim u okviru ove doktorske disertacije bilo je određivanje količine L-Arg lizatima tkiva srca ženki pacova. Rezultati ovih merenja prikazani su na **Slici 6.**, a pokazuju da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije L-Arg (Kontrola=23,98±0,35 µg/µl; Gojazne=16,86±1,38 µg/µl,  $p<0,05$ ) u srcu gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkama pacova.



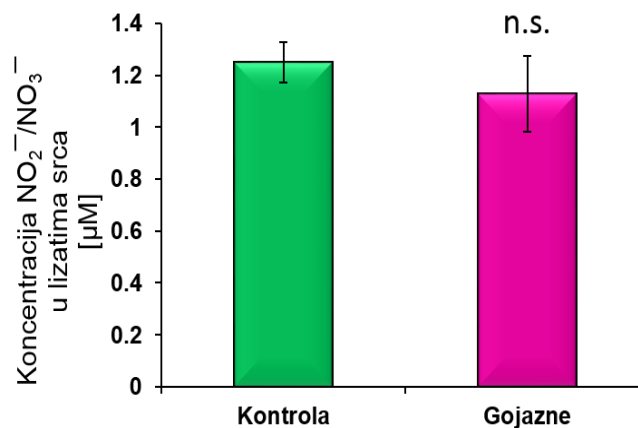
**Slika 6. Količina L-Arg u lizatima srca ženki pacova.**

*Modifikovana spektrofotometrijska metoda po Kovalčuku je korišćena za merenje nivoa L-u srcu ženki pacova. Dobijene vrednosti izražene su u µg/µl. Rezultati su predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=4-7) (\* $p<0,05$ ); L-Arg- L-Arginin.*

## 4. Rezultati

### 4.4.5. Koncentracija NO u lizatima srca ženki pacova

Na **Slici 7.** prikazani su rezultati dobijeni određivanjem nivoa  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , kao mere aktivnosti iNOS, u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova. Primena HF režima ishrane nije dovela do značajnih razlika u nivou  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (Kontrola= $1,25 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ; Gojazne= $1,13 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ) u srcu gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkama pacova.



**Slika 7. Koncentracija NO u lizatima srca ženki pacova.**

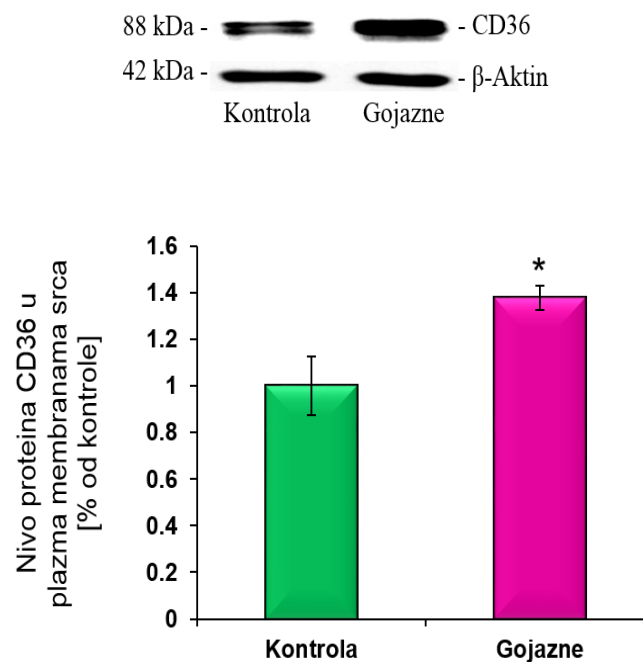
Koncentracija  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  lizatima tkiva srca merena je pomoću komercijalnog  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001). Dobijene vrednosti su izražene u  $\mu\text{M}$ . Rezultati su predstavljeni kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=4-6$ ) (n.s.-nije statistički značajno).

## 4. Rezultati

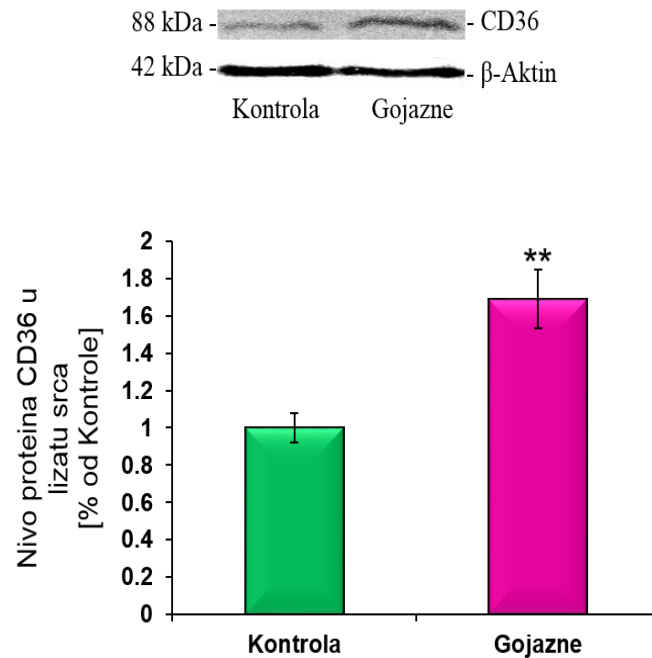
### 4.5. Nivo CD36 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Supstrati za proizvodnju energije u srcu su to glukoza i SMK, transportuju se u kardiomiocite iz cirkulacije pomoću odgovarajućih transportera, koji mogu biti smešteni ili u citoplazmi ili na plazma membrani kardiomiocita (Puthanveetil i sar., 2011). Rezultati merenja nivoa transportera SMK tj. CD36 transportera, u lizatima i membranskim frakcijama proteina tkiva srca ženki pacova prikazani su na **Slici 8**, a pokazali su da je HF režim ishrane doveo je do povećanja nivoa CD36 proteina kako u proteinima membrana kardiomiocita (Kontrola=100±12%; Gojazne=138±5%,  $p<0.05$ ), tako i u lizatima tkiva srca (Kontrola=100±7%; Gojazne=167±15%,  $p<0,01$ ) gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova.

A.



B.



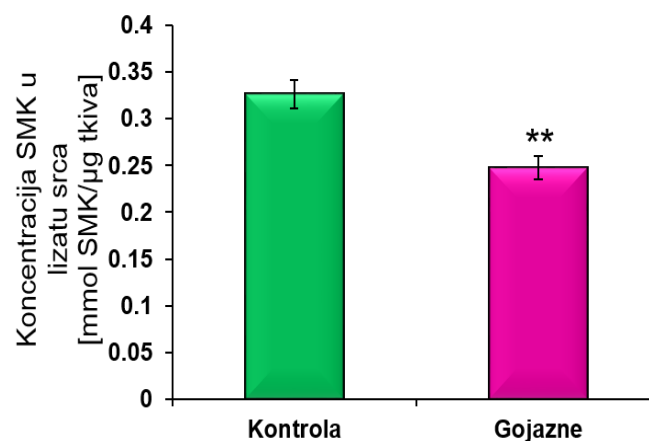
**Slika 8. Količina CD36 transportera u plazm membranama (A) i lizatima (B) tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije CD36 transportera meren je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM (n=4-6) (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01). SMK-slobodne masne kiseline; CD36- translokaza masnih kiselina.



#### 4.6. Koncentracija SMK u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Imajući u vidu da su SMK, pored glukoze, osnovni energetske supstrat u srcu (Lopaschuk i sar., 2007), u daljem radu je određivan nivo SMK u lizatima srca pacova. Rezultati dobijeni merenjem nivoa SMK u lizatima tkova srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova (Slika 9.) pokazuju da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije SMK (Kontrola=0,32±0,01 mmol SMK/μg tkiva; Gojazne=0,24±0,01 mmol SMK/μg tkiva, p<0,01) u srcu gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkaama.



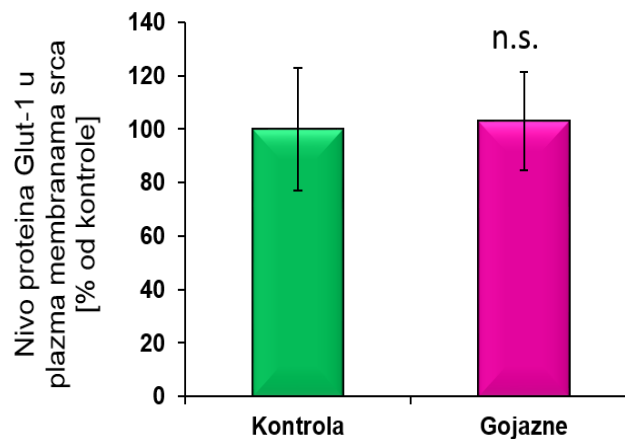
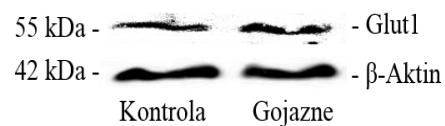
**Slika 9. Koncentracija SMK u lizatima tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Modifikovana kolorimetrijska metoda po Dunkombu korišćena je za merenje količine SMK lizatima srca pacova. Dobijene vrednosti su izražene u mmol SMK/mg tkiva. Rezultati su predstavljani kao srednja aritmetička vrednost ± SEM; (\*\*p<0,01). SMK-slobodne masne kiseline.

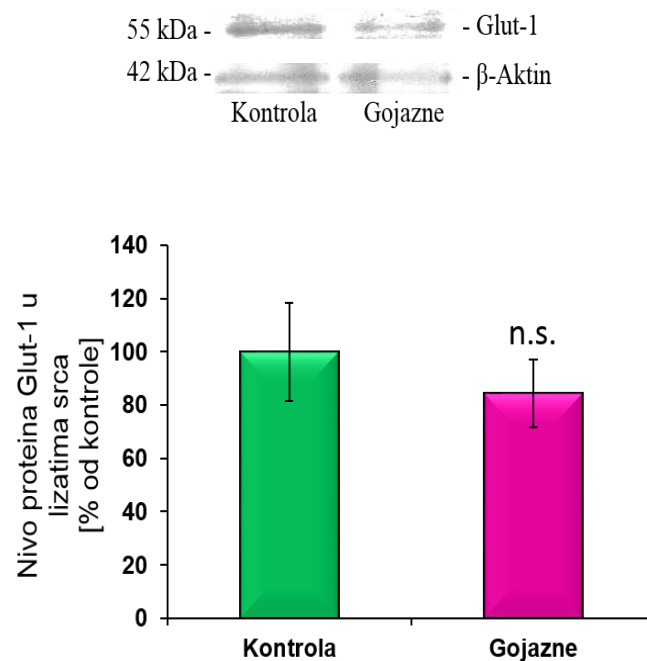
#### 4.7. Nivo GLUT-1 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Predominanti tip transportera glukoze u srcu su GLUT-1 I GLUT-4 i ova dva transportera su veoma važni regulatori metabolizma glukoze u srcu (Shao i Tian, 2015). Merenjem nivoa GLUT-1 transportera u plazma membranama kardiomiocita, kao i lizatima tkiva srca ženki pacva dobijeni su rezultati (**Slika 10**). Dobijeni rezultati su pokazali da nisu postojale značajne razlike nivou GLUT-1 transportera u plazma membranama (Kontrola=100±22%; Gojazne=102±18), kao ni u lizatima (Kontrola=100±18%; Gojazne=84±12) tkiva srca gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkama pacova.

A.



B.



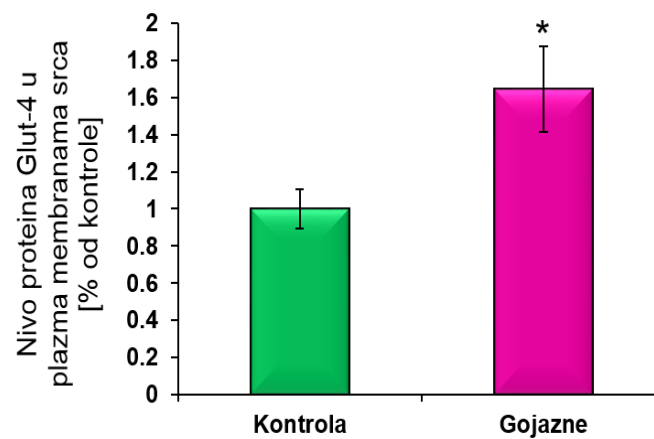
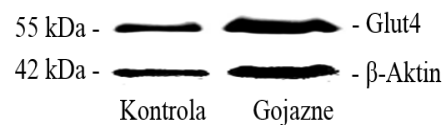
**Slika 10. Nivo GLUT-1 u (A) proteinima plazma membrana i (B) lizatima tkiva srca gojaznih ženki pacova**

Nivo ekspresije GLUT-1 transportera meren je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ) (n.s.- nije statistički značajno). GLUT-1-transporter glukoze-1.

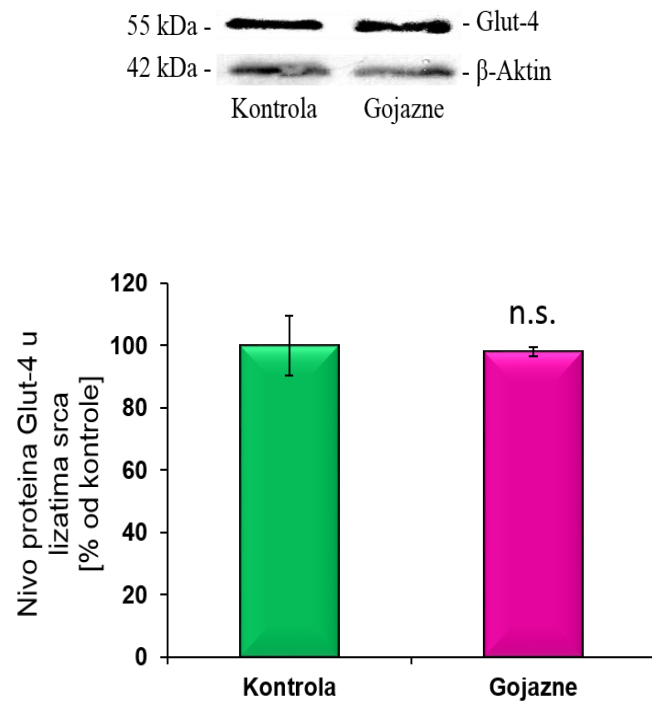
#### 4.8. Nivo GLUT-4 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Na **Slici 11.** prikazani su rezultati koji su dobijeni merenjem nivoa GLUT-4 transportera u srcu ženki pacova. Rezultati pokazuju povećanje nivoa GLUT-4 u proteinima plazm membranska kardiomiocita gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkama (Kontrola=100%±9%; Gojazne=164±16%;  $p<0,001$ ) (**Slika 11.A**), dok u lizatima srca nije bilo promena u nivou GLUT-4 proteina (Kontrola=100%±9%; Gojazne=97±1%) (**Slika 11.B**).

**A.**



B.



**Slika 11. Nivo GLUT-4 u (A) proteinima plazma membrana i (B) lizatima tkiva srca ženki pacova**

Nivo ekspresije GLUT-4 transportera meren je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ) ( $*p<0,05$ ; n.s. - nije statistički značajno). GLUT-4-transporter glukoze-4.

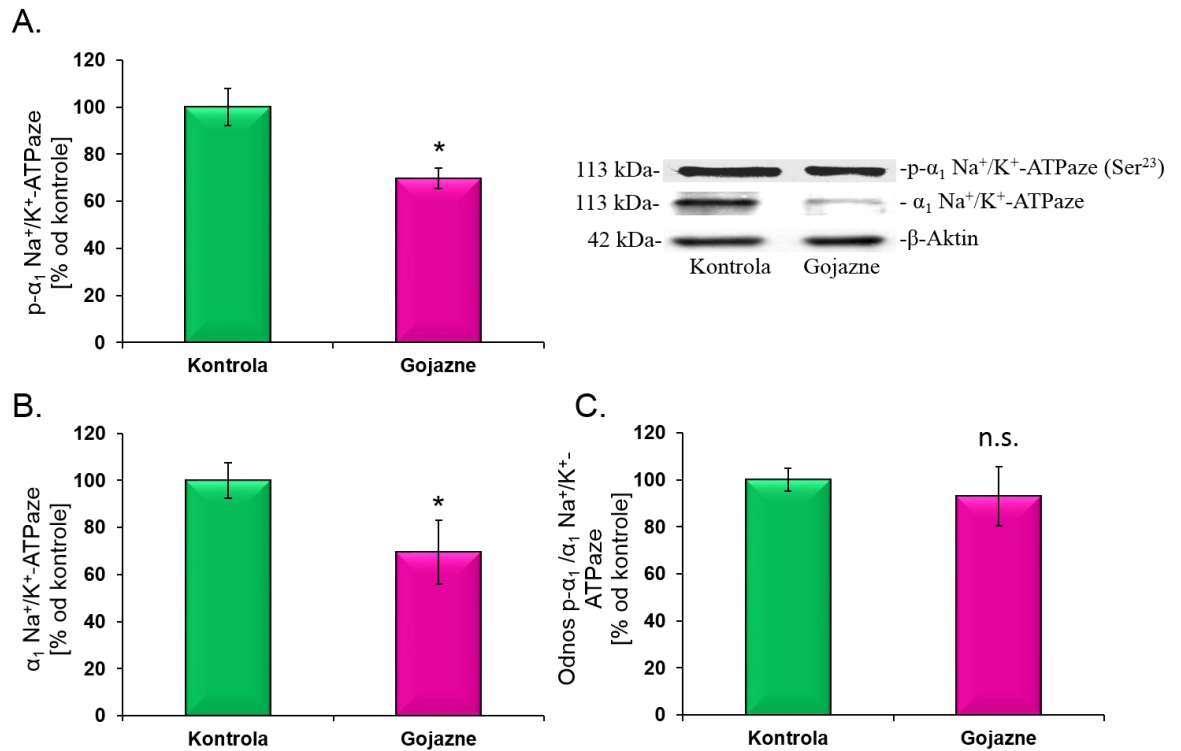
### 4.9. Regulacija ekspresije i aktivnosti $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu ženki pacova

Imajući u vidu da su poremećaji rada srca povezani sa nepravilnim funkcionisanjem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, takođe je izučavana regulacija ekspresija i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova. U ovom poglavlju biće prikazani rezultati dobijeni merenjem aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, nivoa  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, fosforilacije  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, kao i nivoa NDRG2 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

#### 4.9.1. Efekti HF dijete na nivo fosforilacije i nivo proteina $\alpha_1$ subjedinice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu ženki pacova

Na **Slici 12.** prikazani su rezultati dobijeni merenjem ukupnog nivoa  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, kao i nivoa fosforilisane forme ove subjedinice na  $\text{Ser}^{23}$  u plazma membranskim frakcijama proteina tkiva srca ženki pacova. Takođe, kao mera fosforilacije  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na  $\text{Ser}^{23}$ , određivan je i odnos fosforilisane i ukupne forme ove subjedinice. Dobijeni i prikazani rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje nivoa  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Kontrola= $100\pm 7\%$ ; Gojazne= $70\pm 4\%$ ,  $p < 0,05$ ), kao i do smanjenja nivoa njene fosforilisane forme (Kontrola= $100\pm 8\%$ ; Gojazne= $69\pm 13\%$ ,  $p < 0,05$ ) u srcu gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova. Međutim, odnos fosforilisane i ukupne forme  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze nije se razlikovao (Kontrola= $100\pm 4\%$ ; Gojazne= $93\pm 12\%$ ) između kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

## 4. Rezultati



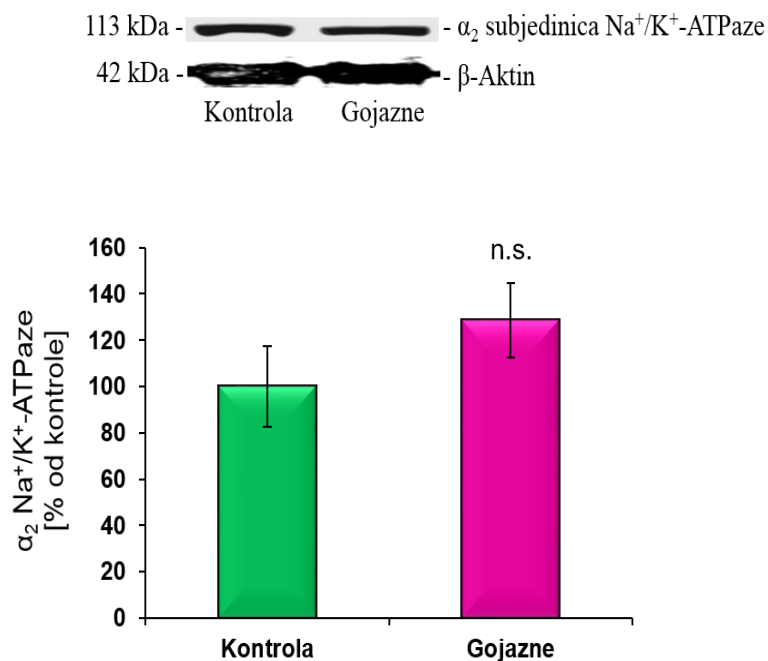
**Slika 12.** Količina  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, kao i njene fosforilisane forme na amino kiselini Ser<sup>23</sup> u plazma membranama tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Nivo ekspresije i fosforilacije  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze meren je primenom metode Western blot. **A.** Fosforilisana forma  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze na Ser<sup>23</sup> (p- $\alpha_1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze); **B.** Nivo ukupne forme  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze; **C.** Odnos fosforilisane i ukupne forme  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=4-5) (\*p<0,05, n.s. nije statistički značajno).

## 4. Rezultati

### 4.9.2. Nivo proteina $\alpha_2$ subjedinice $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Pored  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, koja je konstitutivno eksprimirana u većini tkiva, u srcu pacova je eksprimirana i  $\alpha_2$  subjedinica. Rezultati merenja nivoa proteina  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u membranskim frakcijama proteina tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova prikazani su na **Slici 13**. HF režim ishrane nije doveo do statistički značajnih razlika u nivou proteina  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod gojaznih u poređenju sa kontrolnim pacovima (Kontrola= $100 \pm 17\%$ ; Gojazne= $128 \pm 16\%$ )



**Slika 13.** Nivo proteina  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

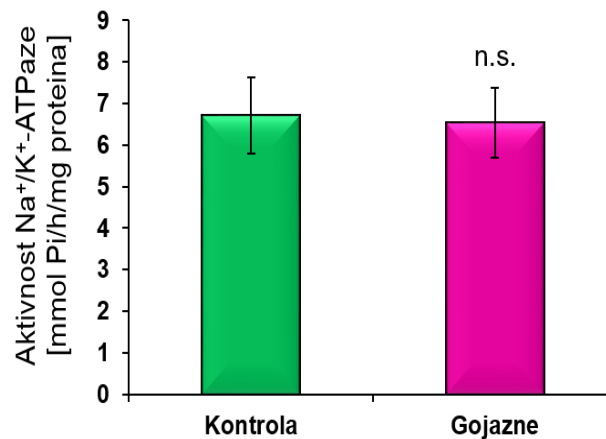
Nivo ekspresije  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze meren je primenom metode western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) (n.s. nije statistički značajno).



## 4. Rezultati

### 4.9.3. Aktivnost $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Imajući u vidu da je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza plazma membranski protein, u eksperimentima kojima je određivan uticaj HF režima ishrane na aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze korišćene su membranske frakcije proteina izolovanih iz tkiva srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova. Dobijeni i prikazani rezultati (**Slika 14.**) pokazuju da HF režim ishrane nije doveo do promena u aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova (Kontrola= $6,71 \pm 0,92$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina; Gojazne= $6,53 \pm 0,83$  mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina).



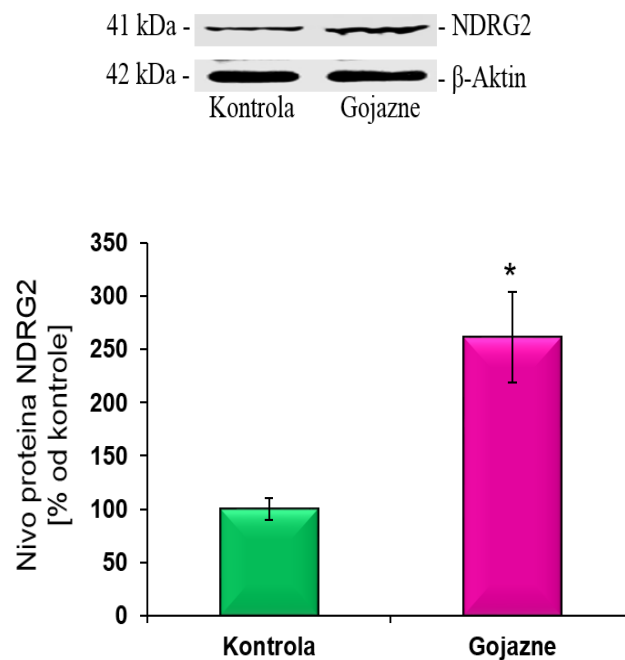
**Slika 14.** Aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Modifikovana spektrofotometrijska metoda po Kacu je korišćena za merenje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, i to na osnovu količine nastalog  $\text{P}_i$ , koja je direktno proporcionalna aktivnosti enzima. Dobijene vrednosti su izražene kao mmol  $\text{P}_i$ /h/mg proteina i predstavljene su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=5-7$ ) (n.s.-nije statistički značajno)

## 4. Rezultati

### 4.9.4. Količina NDRG2 proteina u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova

S obzirom da je pokazano da estradiol pozitivno reguliše ekspresiju NDRG2, za koga je ustanovljeno da se vezuje za  $\beta$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i tako sprečava njenu degradaciju posredovanu ubikvitinom (Li i sar., 2011), u sledećim eksperimentima smo merili nivo NDRG2 proteina u srcu ženki pacova, a dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 15**. Nivoa NDRG2 proteina bio je do statistički značajno povećan (Kontrola=100±9%; Gojazne=261±43%,  $p<0,05$ ) u lizatu srca gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova.



**Slika 15. Nivo NDRG-2 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije NDRG-2 proteina meren je primenom metode western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), ( $*p<0,05$ ).

### 4.10. Signalni putevi kojima je regulisana ekspresija i aktivnost iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova

Pokazano je da gojaznost doprinosi razvoju KVB menjanjem ekspresije i aktivnosti kako iNOS tako i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, a posredstvom više signalnih molekula kao što su: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 kao i RhoA/ROCK. Stoga je u sledećim eksperimentima praćen uticaj HF režima ishrane na regulaciju ovih signalnih proteina. Western blot metodom je određivan nivo regulatorne p85 i katalitičke p110 subjedinice PI3K, nivo RhoA, ROCK1 i ROCK2 proteina, fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> i ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, dok je metodom koimunoprecipitacije analizirana asocijacija IRS-1 i p85 subjedinice PI3K.

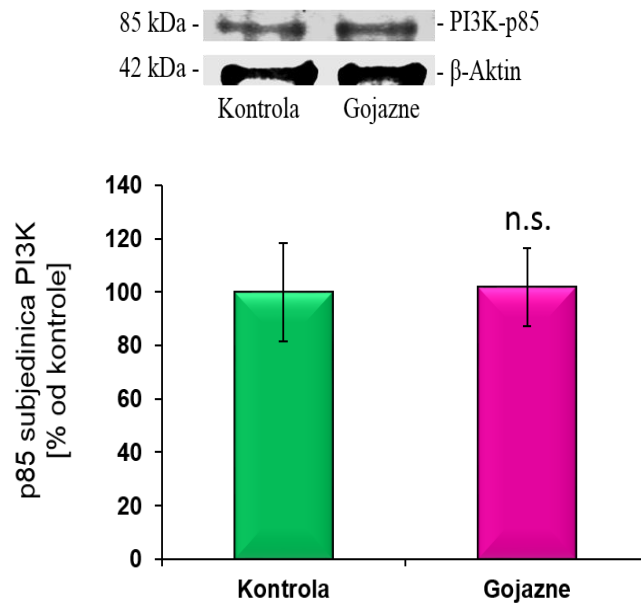
#### 4.10.1. Nivo p85 i p110 subjedinica PI3K u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Enzim PI3K važna protein kinaza čija je aktivnost poremećena u stanju gojaznosti, a takođe može biti i jedan od posrednika kojima HF režim ishrane utiče na ekspresiju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Stoga su u daljem radu analizirani nivoi regulatorne p85 i katalitičke p110 subjedinice PI3K.

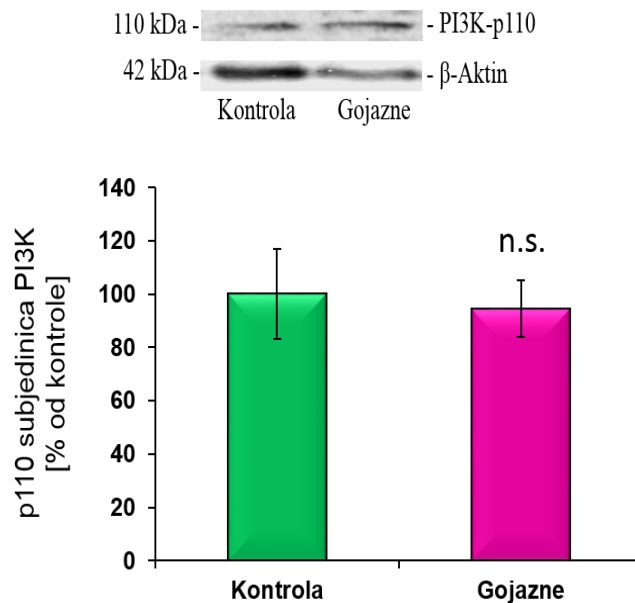
Dobijeni i prikazani rezultati (**Slika 16.**) pokazuju da HF dijeta ne dovodi do promena kako u nivou p85 subjedinice PI3K (Kontrola=100±18%; Gojazne=102±14%), tako ni u nivou p110 subjedinice PI3K (Kontrola=100±16%; Gojazne=94±10%) u srcu gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženkama.

## 4. Rezultati

A.



B.



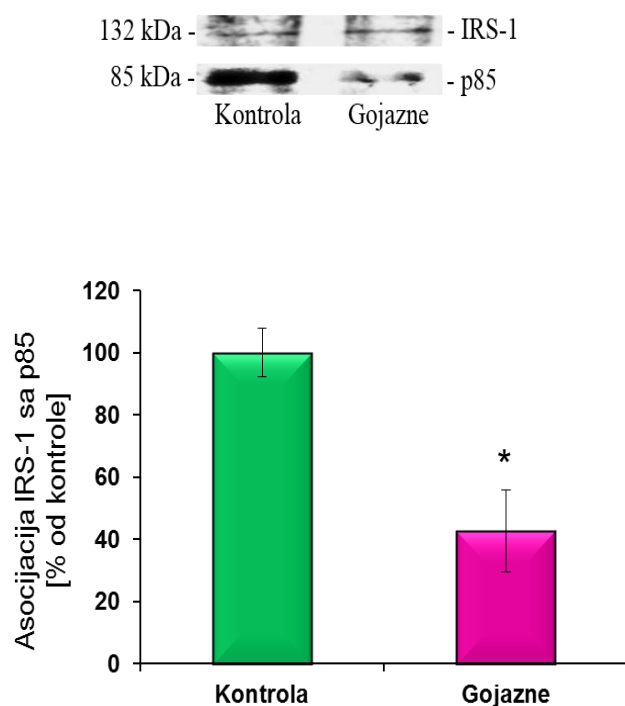
**Slika 16. Nivo proteina p85 (A) i p110 (B) subjedinice PI3K u lizatima srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije p85 i p110 subjedinica PI3K meren je primenom metode western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM (n=4-5) (n.s. nije statistički značajno).

## 4. Rezultati

### 4.10.2. Asocijacija IRS-1 i p85 subjediniice PI3K u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Budući da je fosforilisani supstrat IRS-1 mesto pristupanja PI3K, merena je asocijacija IRS-1 i p85 subjediniice PI3K. Rezultati su pokazali da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja nivoa asocijacije IRS-1 i p85 subjediniice PI3K (Kontrola=100±7%; Gojazne=42±13%;  $p<0,05$ ) (Slika 17.).



**Slika 17. Asocijacija IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.**

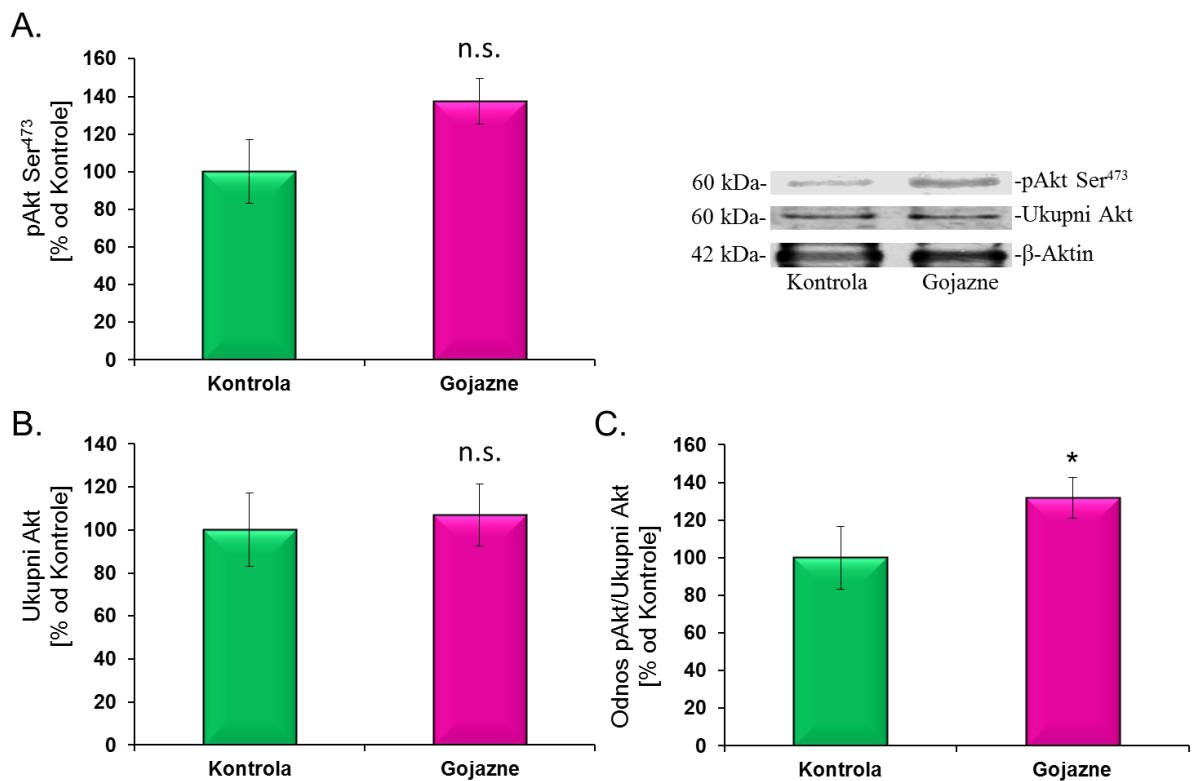
Nivo asocijacije IRS-1 i p85 subjediniice PI3K određivan je primenom metode koimunoprecipitacije. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM ( $n=5$ ), ( $*p<0,05$ ).

## 4. Rezultati

### 4.10.3. Fosforilacija i nivo Akt proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Na **Slici 18.** prikazani su rezultati dobijeni merenjem ukupnog nivoa Akt kinaze, kao i nivoa fosforilisane forme ove protein kinaze na aminokiselini Ser<sup>473</sup>. Takođe, kao mera fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>, određivan je i odnos fosforilisane i ukupne Akt kinaze. Dobijeni i prikazani rezultati pokazuju da u srcu gojaznih ženki pacova ne dolazi do promena u nivou fosforilisane forme Akt proteina (Kontrola=100±16%; Gojazne=137±12%), kao ni u nivou ukupne forme Akt proteina (Kontrola=100±17%; Gojazne=107±14%) u odnosu na kontrolne ženke. Međutim, merenjem odnosa fosforilisane i ukupne forme Akt, pokazano je da HF režim ishrane, u trajanju od 10 nedelja, dovodi do statistički značajnog povećanja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> (Kontrola=100±16%; Gojazne=137±10%, p<0,05) u lizatima tkiva srca ženki pacova.

## 4. Rezultati



**Slika 18.** Nivo fosforilacije Akt na amino kiselini Ser<sup>473</sup> i ukupnog Akt proteina u lizatima, kao i nivo njihovog odnosa, u lizatima srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

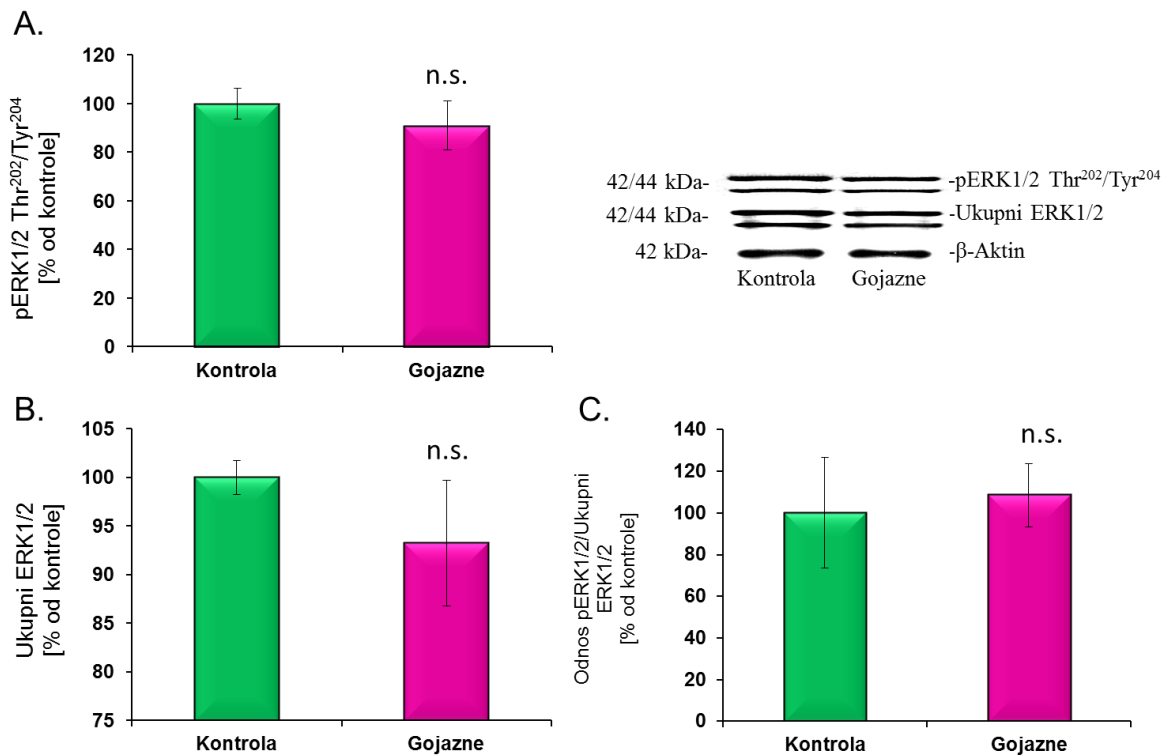
Nivo ekspresije i fosforilacije Akt meren je primenom metode Western blot. **A.** Fosforilisana forma Akt na Ser<sup>473</sup> (pAkt Ser<sup>473</sup>); **B.** Količina ukupne forme Akt; **C.** Odnos fosforilisane i ukupne forme Akt. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ) (\* $p<0,05$ , n.s. nije statistički značajno).

### 4.10.4. Ekspresija i fosforilacija ERK 1/2 proteina u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

U cilju izučavanja uticaja HF režima ishrane na ekspresiju i fosforilaciju ERK1/2 u srcu ženki pacova, mereni su nivoi ukupne forme ERK1/2, kao i nivo fosforilisane forme ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> u lizatima tkiva srca ženki pacova. Takođe, kao mera fosforilacije ERK1/2 na Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup>, određivan je i odnos fosforilisane i ukupne ERK1/2 kinaze. Dobijeni rezultati prikazani su na **Slici 19.**, a pokazuju da HF režim ishrane ne dovodi do statistički značajnih promena u nivou fosforilisane forme ERK1/2 (Kontrola=100±6%; Gojazne=90±10%), kao ni u ukupnom nivou ERK1/2 proteina (Kontrola=100±2%; Gojazne=93±6%) u srcu ženki pacova. Takođe, odnos nivoa fosforilisane i ukupne forme ERK1/2 se nije razlikovao (Kontrola=100±26%; Gojazne=108±15%) između gojaznih i normalno uhranjenih ženki pacova.



## 4. Rezultati

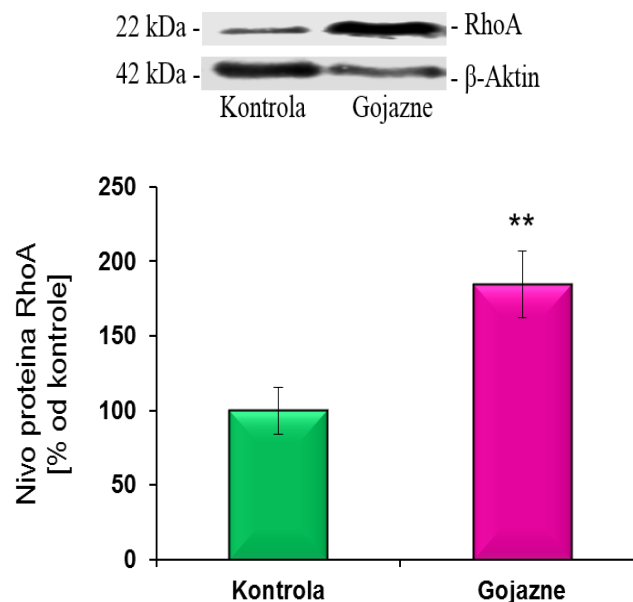


**Slika 19.** Nivo fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> i ukupnog ERK1/2 proteina u lizatima srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Nivo ekspresije i fosforilacije ERK1/2 meren je primenom metode Western blot. **A.** Fosforilisana forma ERK1/2 na Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> (pERK1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>); **B.** Količina ukupne forme ERK1/2; **C.** Odnos fosforilisane i ukupne forme ERK1/2. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=4) (n.s. nije statistički značajno).

### 4.10.5. Nivo RhoA u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

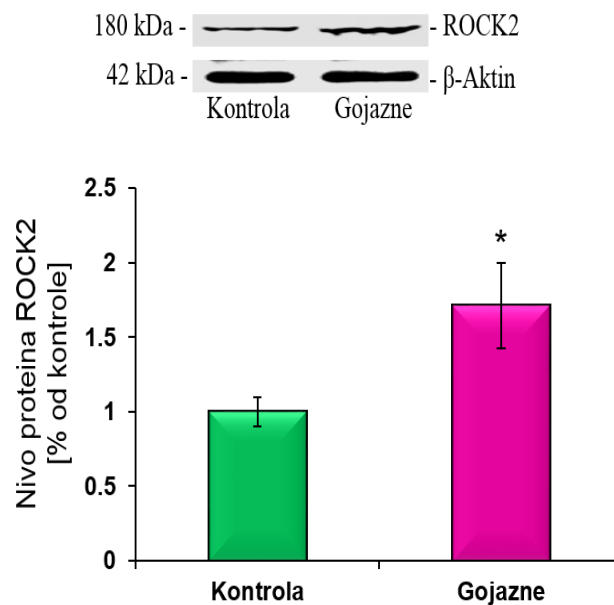
RhoA je mali, GTP vezujući, signalni molekul, a u srcu RhoA zajedno sa svojim nishodnim efektorima ROCK1 i ROCK2, u velikoj meri utiče na razvoj niza patoloških stanja, uključujući i hipertenziju i insuficijenciju srca (Gabrielli i sar., 2014). Merenjem nivoa RhoA u lizatima tkiva srca ženki pacova dobijeni su rezultati koji su prikazani na **Slici 20.**, a koji pokazuju da HF režim ishrane dovodi do povećanja nivoa RhoA proteina (Kontrola=100±15%; Gojazne=184±22%; p<0,01),



**Slika 20. Nivo RhoA proteina u lizatima srca normalno uhanjenih i gojaznih ženki pacova.** Nivo ekspresije RhoA određivan je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljani su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM (n=5-6) (\*\*p<0,01).

### 4.10.6. Nivo ROCK2 u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Određivanjem nivoa ROCK2 dobijeni su rezultati (**Slika 21.**), a koji pokazuju statistički značajno povećanje (Kontrola=100±9%; Gojazne=171±28%;  $p<0,05$ ) nivoa ovog proteina u srcu gojaznih ženki pacova u poređenju sa njihovim kontrolama.

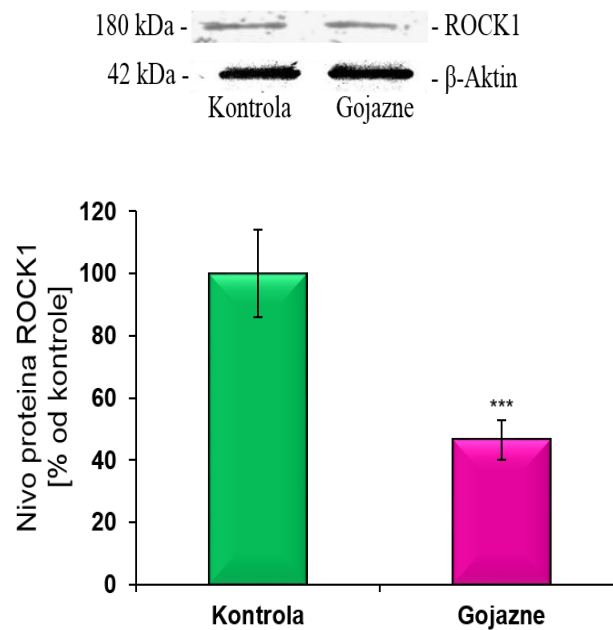


**Slika 21. Količina ROCK2 u lizatima srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije ROCK2 određivan je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM ( $n=5-6$ ) (\* $p<0,05$ ).

### 4.10.7. Nivo ROCK1 u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova

Merenjem nivoa ROCK1 proteina dobijeni su rezultati prikazani na **Slici 22**. Dobijeni rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje nivoa ROCK1 proteina (Kontrola=100±14%; Gojazne=46±6%;  $p<0,001$ ) u srcu gojaznih ženki u odnosu na kontrole.



**Slika 22. Količina ROCK1 u lizatima srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova.**

Nivo ekspresije ROCK1 određivan je primenom metode Western blot. Dobijeni rezultati su prikazani kao procentualna vrednost u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ženke pacova, a predstavljeni su kao srednja aritmetička vrednost ± SEM ( $n=5-6$ ) (\*\*\*) $p<0,001$ ).

### 5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji su prikazani rezultati dobijeni iz eksperimenata u okviru kojih je izučavana regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova. Polazna hipoteza istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije jeste da endogeni estradiol ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze posredstvom IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2, NFκB i RhoA, ROCK signalnih molekula u srcu gojaznih ženki pacova. U postavci osnovne hipoteze, pošlo se od pretpostavke da u patološkim stanjima, uključujući i gojaznost združenu sa IR i hipertenzijom, a koje nastaje kao posledica primene HF režima ishrane, dolazi do smanjenja nivoa endogenog estradiola, kao i do poremećaja signalnih puteva estradiola, što dovodi do poremećaja u ekspresiji i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze srcu ženki pacova.

Rezultati prethodnih istraživanja naše grupe su pokazali da primena HF režim ishrane dovodi do razvoja gojaznosti kako kod ženki, tako i kod mužjaka pacova (Obradovic i sar., 2015; Sudar Milovanovic i sar., 2015; Stanimirovic i sar., 2016). Takođe je pokazano da je gojaznost praćena i pojavom hiperlipidemije, hiperglikemije i IR, ali samo kod mužjaka pacova, što je delimično objašnjeno polno specifičnim razlikama u regulaciji iNOS u jetri pacova (Stanimirovic i sar., 2016). Poznato je da estradiol ostvaruje i kardioprotektivne efekte kod žena pre menopauze, ali nije razjašnjeno da li su kardioprotektivni efekti endogenog estradiola smanjeni u stanju gojaznosti. Imajući u vidu da su literaturni podaci koji se odnose na etiologiju KVB kod gojaznih žena nedovoljno istraženi, u eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije korišćen je animalni model gojaznosti kod ženki pacova za izučavanje regulacije iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova.

## 5. Diskusija

Budući da su eksperimenti čiji su rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije, nastavak naših ranije započetih istraživanja, koja su bila fokusirana na istraživanje uticaja HF režima ishrane na regulisanje ekspresije i aktivnosti iNOS i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u jetri ženki pacova (Stanimirovic i sar., 2016; Stanimirovic i sar., 2017), ovde će biti ukratko predstavljeni rezultati morfometrijskih merenja i analiza biohemijskih parametara (Stanimirovic i sar., 2016) u serumu i plazmi kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

Parametar	Eksperimentalna grupa	
	Kontrola	Gojazne
Početna masa tela [g]	202 ± 8	190 ± 8 n.s.
Finalna masa tela [g]	260 ± 12	275 ± 12 n.s.
Razlika početnih i finalnih masa tela [g]	58 ± 6	85 ± 8 *
INS [mIU/l]	79 ± 19	85 ± 8 n.s.
Glukoza [mmol/l]	11,6 ± 0,5	10,2 ± 0,4 *
HOMA-IR	34 ± 10	36 ± 4 n.s.
HOMA-β	209 ± 48	281 ± 22 n.s.
TC [mmol/l]	2,07 ± 0,11	1,77 ± 0,09 n.s.
SMK [mmol/l]	0,70 ± 0,08	0,81 ± 0,11 n.s.

**Dopunska tabela. Morfometrijski i biohemijski parametri (Stanimirovic i sar., 2016).**

*Mase tela merene su pred žrtvovanje i izražene su u g (n=6-7). Nivoi insulina (INS) i glukoze (Glu) izraženi su mIU/l (n=4-5), odnosno mmol/l (n=7). Indeksa HOMA-IR i HOMA-β su izračunavani su na osnovu vrednosti dobijenih za nivoe INS i Glu (n=4-5). Koncentracije holesterola (TC) i slobodnih masnih kiselina (SMK) su izražene u mmol/l (n=5-7). Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost ± SEM, (\*p<0,05, n.s.-nije statistički značajno).*

## 5. Diskusija

Jedan od najviše primenjivanih animalnih modela gojaznosti je prehrana pacova standardnom briketnom hranom obogaćenom mastima. Pokazano je da primena ovog eksperimentalnog modela dovodi do uvećanja kako ukupne mase tela, tako i količine masnog tkiva (Oakes i sar., 1997; Sumiyoshi i sar., 2006; Thakker i sar., 2006). Osim toga, HF režim ishrane dovodi do povećanja preuzimanja i oksidacije masnih kiselina u skeletnim mišićima, što dovodi do povećanja proizvodnje ROS u mitohondrijama u ćelijama ovog tkiva (Serra i sar., 2013). Takođe, primena HF režima ishrane praćena je i poremećajem tolerancije na glukozu, hiperinsulinemijom, razvojem IR kao i nedovoljnom kompenzacijom  $\beta$  ćelija pankreasa na IR (Ahren i sar., 2000; Ahrén i Pacini, 2002; Prpic i sar., 2003; Winzell i sar., 2003). Polazeći od literaturnih podataka koji su nedvosmisleno pokazali da primena HF režima ishrane uzrokuje pojavu gojaznosti (Buettner i sar., 2007), u eksperimentima rađenim u ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su ženke pacova Wistar soja, koje su tokom deset nedelja hranjene peletiranom hranom za pacove obogaćenom sa 42% masti. Prethodno objavljeni rezultati naše grupe (Stanimirovic i sar., 2016) na istim životinjama pokazali su da je primena HF dijeta, u trajanju od deset nedelja, dovela do statistički značajnog povećanja mase tela kod ženki pacova (**Dopunska tabela.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa (Woods i sar., 2003; Cao i Gregoire, 2016). Međutim, merenjem koncentracije glukoze i insulina u serumu, kao i na osnovu izračunavanja HOMA-IR i HOMA- $\beta$  indeksa, čije vrednosti nisu bile promenjene, pokazano je da HF režim ishrane nije doveo do razvoja IR kod ženki pacova (**Dopunska tabela.**). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Hevener i saradnika (2002), koji su takođe pokazali da su ženke pacova, usled protektivnog dejstva endogenog estradiola, zaštićene od razvoja IR indukovane HF dijetom (Hevener i sar., 2002). Dalje, pokazano je da u serumu gojaznih ženki pacova nije došlo do promena u nivou ukupnog holesterola i SMK u odnosu na kontrolne ženke pacova (**Dopunska tabela.**), što je u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju da ženke pacova dobro tolerišu HF režim ishrane, i to mehanizmom koji uključuje povećano korišćenje masnih kiselina kao izvor energije, čime je ograničena akumulacija masnog tkiva i sprečen razvoj IR (Hewitt i sar., 2004; Estrany i sar., 2013).

Gojaznost je danas prepoznata kao jedan od najuticajnijih faktora koji kako indirektno, tako i direktno povećavaju rizik za pojavu KVB (Wilson i sar., 2002). Hipertrofija srca se često

## 5. Diskusija

javlja kao posledica gojaznosti, imajući u vidu da se usled povećanja mase tela, povećava i površina koju je potrebno perfundovati, što za posledicu ima povećanje ukupnog volumena krvi i povećanog opterećenja miokarda (Alpert, 2001; Bernardo i sar., 2010; Alexescu i sar., 2016). Hronična preopterećenost srca dovodi do kontraktilne disfunkcije srca i srčane insuficijencije (Rider i sar., 2009; Manabe, 2011). Takođe, gojaznost je često praćena poremećenim balansom proinflatornih i antiinflatornih faktora, što utiče na remodelovanje srca, a takođe može dovesti i do inflamacije i fibroze srca (Goncalves i sar., 2017). Rezultati Andrea i saradnika (2006) koji su proistekli iz eksperimenata u kojima je jedna grupa pacova dobijala hranu u kojoj je 45,2% kcal bilo poreklom iz masti (HF dijeta), a druga grupa pacova je dobijala hranu u kojoj je 11,2% kcal bilo poreklom iz masti pokazali su da su mužjaci pacova koji su bili na HF dijeti imali veću masu kako leve komore, tako i srca u celini. Takođe, naši prethodno objavljeni rezultati pokazuju da HF dijeta kod mužjaka pacova dovodi do povećanja mase srca, dok tretman estradiolom ima suprotne efekte (Obradovic i sar., 2015). Stoga je u nastavku eksperimenata praćeno da li HF režim ishrane indukuje promene u masi srca ženki pacova. Rezultati dobijeni merenjem mase srca pokazali su da kod gojaznih ženki pacova nije došlo do uvećanja mase srca u poređenju sa masom srca kontrolnih ženki (**Tabela 1.**). S obzirom da je pokazano da kod gojaznih ženki pacova nije došlo do razvoja IR, može se pretpostaviti da je to razlog izostanka povećanja u masi srca, imajući u vidu da IR koja nastaje kao posledica gojaznosti predstavlja jedan od prvih koraka u razvoju kako KVB, tako i hipertrofije srca (Jeppesen i sar., 2007).

Brojna istraživanja pokazuju da estradiol ima važnu ulogu u regulaciji funkcionisanja KVS (Barros i sar., 2006; Pedram i sar., 2008; Alda i sar., 2009; Pedram i sar., 2010; Ortmann i sar., 2011). Estradiol u fiziološkim koncentracijama doprinosi smanjenju proliferacije VSMC kao i relaksaciji mišićnih ćelija (Alda i sar., 2009; Ortmann i sar., 2011). Takođe, prethodno objavljeni rezultati naše grupe su pokazali da estradiol povoljno utiče na KVS tako što reguliše ekspresiju iNOS proteina, utiče na metabolizam masti u ugljenih hidrata i reguliše ekspresiju i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu (Obradovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2017; Zafirovic i sar., 2018). Mehanizmi kojima estradiol direktno reguliše funkcije u KVS su složeni i podrazumevaju višestruke akcije estradiola u ćelijama srca i vaskulature.



## 5. Diskusija

Efekti estradiola posredovani ER su u animalnim modelima KVB povezani sa modulacijom hipertrofije srca, dok je kod ljudi pokazano da estradiol doprinosi regulaciji metaboličkih bolesti kao što su gojaznost i IR (Pedram i sar., 2008; Pedram i sar., 2010). Većina efekata estradiola posredovana je genomskim i nengenomskim signalnim putevima preko ER $\alpha$  i ER $\beta$  (Barros i Gustafsson, 2011). Pored toga, učešće trećeg tipa receptora za estrogene GPR30 pruža alternativu klasičnom estradiol/ER signalnom putu (Filardo i sar., 2000; Murphy, 2011). Pokazano je da su zdrave žene pre ulaska u menopauzu prirodno zaštićene od KVB, delimično učešćem signalnog puta koji uključuje aktivaciju ER $\alpha$  u vaskulaturi (Manrique i sar., 2016), dok su stanja koja dovode do smanjenja koncentracije estradiola u serumu i/ili poremećaja signalnog puta estradiola povezana sa nastankom KVB (Burger i sar., 1999; Darblade i sar., 2002; Kumar i sar., 2018). U animalnim modelima ateroskleroze je primećeno da je smanjenje ekspresije ER $\alpha$  uzrok odsustva protektivnih efekata estradiola (Hodgin i sar., 2001). Slično tome, gojaznost i IR kod ljudi povezani su sa smanjenom ekspresijom ER $\alpha$  i u tom slučaju je primećen izotanak kardioprotektivnih efekata estradiola (Lehmann i sar., 1996). Gojaznost utiče na sve fiziološke funkcije i u velikoj meri modifikuje nivo reproduktivnih hormona i reproduktivnu funkciju, a može dovesti i do smanjenja nivoa estradiola (Zain i Norman, 2008). Takođe gojaznost može biti uzrok ranijeg ulaska u menopauzu, a pokazano je i postojanje negativne korelacije između BMI i nivoa estradiola kod žena pre menopauze (Randolph i sar., 2003; Santoro i sar., 2008; Su i sar., 2008). Iako veliki broj istraživanja ukazuje na vezu između gojaznosti kod žena i nivoa reproduktivnih hormona, mehanizmi koji su u osnovi povezanosti gojaznosti i reproduktivne funkcije još nisu razjašnjeni (Burger i sar., 1999; Randolph i sar., 2003; Freeman i sar., 2010).

U cilju istraživanja veze gojaznosti i nivoa reproduktivnih hormona kod ženki pacova, u daljem radu određivana je koncentracija estradiola u serumu. Takođe je merena ekspresija ER $\alpha$  u srcu ženki pacova, budući da literaturni podaci koje se odnose na doprinos poremećaja u aktivaciji ER $\beta$ , u razvoju KVB, nisu konzistentni. Rezultati dobijeni merenjem nivoa estradiola u serumu normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova, pokazali su da HF režim ishrane dovodi do statistički značajnog smanjenja nivoa estradiola u serumu ženki pacova (**Slika 1.**). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Balasubramaniana i saradnika (2012),

## 5. Diskusija

a koji su pokazali da je HF režim ishrane gde 45% kcal vodi poreklo od masti, u trajanju od 6 nedelja, smanjila nivo estradiola kod ženki pacova (Balasubramanian i sar., 2012). Takođe, Pergola i saradnici (2006) su pratili nivo reproduktivnih hormona kod žena pre i nakon ulaska menopauzu i izučavali povezanost između gojaznosti i reproduktivnih hormona (De Pergola i sar., 2006). Isti autori su pokazali da kod gojaznih žena pre menopauze nivo estradiola je bio znatno niži u poređenju sa normalno uhranjenim ženama pre menopauze (De Pergola i sar., 2006). Primenom metode linearne regresije su pokazali postojanje negativne korelacije nivoa estradiola, BMI i obima struka (De Pergola i sar., 2006). Iako uzrok smanjenog nivoa estradiola u stanju gojaznosti nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da ovakvo stanje može biti posledica povećanog lučenja adipocitokina iz masnog tkiva, kao što je leptin (Garaulet i sar., 2002; Freeman i sar., 2010). Pokazano je da povećan nivo leptina remeti reproduktivnu funkciju i izaziva neplodnost (Duggal i sar., 2000). Takođe, leptin može poremetiti sintezu estradiola i to putem inhibiranja sinteze pregnenolona, prekursora za sintezu estradiola (Zachow i Magoffin, 1997). U okviru ove doktorske disertacije nije meren nivo leptina, ali polazeći od literaturnih podataka koji nedvosmisleno pokazuju da je povećanje nivoa jedna od pratećih pojava gojaznosti (Considine i sar., 1996; Garaulet i sar., 2000; Prpic i sar., 2003), može se pretpostaviti da je i kod gojaznih ženki u ovim eksperimentima nivo leptina bio povišen u poređenju sa normalno hranjenim ženkama pacova. Osim toga, Guo i saradnici (2012) su otkrili da je ekspresija aromataze, ključnog enzima koji reguliše biosintezu estradiola, značajno smanjena u masnom tkivu ženki miševa na HF režimu ishrane (Guo i sar., 2012). Dalje, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je nivo ER $\alpha$  proteina značajno smanjen u lizatima srca gojaznih ženki pacova u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 2.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da HF režim ishrane u velikoj meri menja ekspresiju ER (Hilakivi-Clarke i sar., 1998; Gorres i sar., 2011; Guo i sar., 2012; Goncalves i sar., 2017). Rezultati koje su objavili Goncalves i saradnici (2017) pokazuju da HF režim ishrane dovodi do smanjenja ekspresije gena za ER $\alpha$  u kardiomitima ovarijektomisanih, kao i ženki sa intaktnim jajnicima (Goncalves i sar., 2017). Takođe, Gorres i saradnici (2011) su pokazali da HF dijeta gde 60% kalorija vodi poreklo od masti, u trajanju od 6 nedelja, dovodi do smanjenja ekspresije ER $\alpha$  proteina u masnom tkivu ženki pacova (Gorres i sar., 2011).

## 5. Diskusija

Iako u ovim eksperimentalnim uslovima nije uočen razvoj IR i povećanje mase srca, kod gojaznih ženki pacova je došlo do smanjenja nivoa endogenog estradiola kao i smanjene ekspresije ER $\alpha$  u srcu. Stoga je dalje praćeno da li je u srcu gojaznih ženki došlo do poremećaja u regulaciji molekula važnih za normalno funkcionisanje KVS, a koji su regulisani i estradiolom. Stoga će u nastavku biti diskutovani rezultati dobijeni merenjem ekspresije i aktivnosti iNOS proteina, nivoa transportera masnih kiselina i glukoze, kao i ekspresije i aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze u srcu kontrolnih i gojaznih ženki pacova.

S obzirom da je pokazano da je gojaznost indukovana HF režimom ishrane povezana sa ushodnom regulacijom transkripcionih faktora za iNOS kao što je NF $\kappa$ B (Mariappan i sar., 2010), o čemu je već bilo reči u uvodnom delu ove doktorske disertacije, u daljem radu su analizirane promene u nivou p50 subjedinice NF $\kappa$ B proteina u srcu gojaznih ženki pacova. Rezultati dobijeni i prikazani u okviru ove doktorske disertacije pokazali su statistički značajno povećanje nivoa p50 subjedinice NF $\kappa$ B lizatima tkiva srca gojaznih ženskih pacova u odnosu na njihove kontrole (**Slika 3.**), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa, a koji takođe pokazuju da HF režim ishrane aktivira NF $\kappa$ B u različitim tkivima (Carlsen i sar., 2009; Vykhoanets i sar., 2011; Kumar i sar., 2013; Benzler i sar., 2015). Cao i saradnici (2011) su pokazali da povećana akumulacija lipida u srcu dovodi do aktivacije proinflamatornih puteva kao i do aktivacije NF $\kappa$ B proteina. Povećana ekspresija NF $\kappa$ B proteina uočena je u srcu genetski gojaznih miševa (Mariappan i sar., 2010). Takođe, polazeći od literaturnih podataka koji ukazuju na važnu ulogu NF $\kappa$ B u regulaciji ekspresije gena za iNOS, može se pretpostaviti da je u ovim eksperimentalnim uslovima povećan nivo NF $\kappa$ B proteina doprineo povećanju ekspresije iNOS proteina u srcu gojaznih ženki.

Veza koja postoji između funkcije srca i ekspresije gena za iNOS je dobro poznata (Balligand i sar., 1994; Isenovic i sar., 2002; Mungrue i sar., 2002; Bai i sar., 2011). Pokazano je da prekomerna ekspresija iNOS indukuje fibrozu srčanog mišića, apoptozu kardiomiocita, kao i hipertrofiju srca (Umar i van der Laarse, 2010). Izostanak ekspresije iNOS enzima kod miševa štiti srce od ventrikularne hipertrofije i kongestivnih poremećaja u radu srca, što opet govori u prilog tome da povećana ekspresija iNOS može uzrokovati i hipertrofiju srca (Zhang i sar., 2007; Umar i van der Laarse, 2010). Takođe, u ćelijama srca

## 5. Diskusija

pacijenata, ali i eksperimentalnih životinja sa poremećajima u radu srca detektovana je povećana ekspresija iNOS (Haywood i sar., 1996; Chen i sar., 2002; Gealekman i sar., 2002; Mungrue i sar., 2002). Prethodno objavljeni rezultati naše gupe (Sudar Milovanovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2018), kao i rezultati drugih istraživača (Noronha i sar., 2005; de Luca i Olefsky, 2008; Nagareddy i sar., 2009) pokazuju da HF režim ishrane kod mužjaka pacova dovodi do povećanja ekspresije iNOS proteina. Pokazano je da je produkcija NO povećana usled indukcije iNOS u aorti gojaznih miševa (Noronha i sar., 2005), u jetri, mišićnom i masnom tkivu gojaznih pacova (Wan i sar., 2000; Perreault i Marette, 2001; Stanimirovic i sar., 2015). Rezultati velikog broja istraživanja pokazuju da hronična inflamacija uzrokovana gojaznošću vremenom dovodi do povećanog nivoa iNOS enzima u srčanom mišiću, skeletnim mišićima, kao i u masnom tkivu (Perreault i Marette, 2001; McArdle i sar., 2013; André i sar., 2017; Lauterbach i Wunderlich, 2017). Poznato je da estradiol u velikoj meri reguliše ekspresiju i aktivnost iNOS proteina (Nuedling i sar., 1999; Nuedling i sar., 2001; Nweze i sar., 2012; Zafirovic i sar., 2018). Literaturni podaci pokazuju da endogeni estradiol ima anti-inflamatorno dejstvo, kao i da tretman estradiolom smanjuje ekspresiju iNOS proteina (Cheng DY, 1994; Darblade i sar., 2002; Ghisletti i sar., 2005). Takođe, naši prethodno objavljeni rezultati pokazuju da tretman estradiolom, *in vivo*, dovodi do smanjenja ekspresije iNOS proteina u srcu gojaznih mužjaka pacova (Zafirovic i sar., 2018).

Oskudni su literaturni podaci koji se odnose na uticaj endogenog estradiola na regulaciju ekspresije gena za iNOS u srcu gojaznih ženki pacova. Stoga su dalja istraživanja bila usmerena na određivanje nivoa ekspresije gena za iNOS, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteinskog produkta u lizatu srca gojaznih ženki pacova. Rezultati su pokazali da je u srcu gojaznih ženki došlo do povećanja količine iRNK za iNOS (**Slika 4.**), kao i količine ovog enzima (**Slika 5.**), što ukazuje da je srce mesto sinteze ovog enzima. Ovi rezultati se, sa jedne strane, mogu povezati sa povećanjem koncentracije niza proinflamatornih citokina, između ostalih i IL-6, za koji je poznato uzrokuje do povećanu ekspresiju i aktivnost iNOS. Iako u okviru ove doktorske disertacije nije bilo mogućnosti za određivanje koncentracije IL-6, istraživanja drugih istraživačkih grupa su pokazala statistički značajno povećanje nivoa IL-6 u gojaznosti (Roytblat i sar., 2000). Osim toga, povećana ekspresija gena za iNOS mogla bi se javiti i kao posledica smanjene koncentracije estradiola u serumu (**Slika 1.**), kao i

## 5. Diskusija

zmanjene ekspresije ER $\alpha$  proteina u srcu gojaznih ženki (**Slika 2.**). Literaturni podaci pokazuju da estradiol, posredstvom ER $\alpha$  smanjuje ekspresiju gena za iNOS (Marino i sar., 2006; Tsutsumi i sar., 2008). Takođe, ekspresija gena za iNOS na nivou proteina je značajno smanjena u hipokampusu i korteksu  $\alpha$ ERKO miševa, dok PPT koji je selektivni ER $\alpha$  agonist, smanjuje ekspresiju iNOS proteina u glatkim mišićnim ćelijama aorti pacova (Cignarella i sar., 2009; Hwang i sar., 2015).

Polazeći od činjenice da je koncentracija L-Arg ograničavajući faktor za sintezu NO posredovanu NOS enzimima, u daljem radu je praćen nivo L-Arg u lizatu tkiva srca normalno uhranjenih i gojaznih ženki pacova. L-Arg je semiesencijalna aminokiselina prisutna u proteinima svih živih organizama (Guoyao, 2013 ). Pored toga što ulazi u sastav skoro svih proteina, L-Arg je takođe i prekursor za sintezu NO, kreatinina, uree, agmatina i poliamina u različitim organima i ima ključnu ulogu u regeneraciji ćelija, procesu zaceljivanja rana kao i imunskom odgovoru (Wu i Morris, 1998; Flynn i sar., 2002; Luiking i sar., 2005). Literaturni podaci su pokazali da je L-Arg jedini supstrat za sintezu NO, kao i da je metabolizam L-Arg jako bitan za funkcionisanje KVS (Morris, 2005). U fiziološkim uslovima, NOS enzimi konvertuju L-Arg u L-citrulin i tom prilikom se oslobađaju fiziološke koncentracije NO u cirkulaciju (Stuehr, 1997; SM, 1998; Wu i sar., 1999; Tapiero i sar., 2002). Stoga, sinteza NO molekula, zavisi od raspoloživosti supstrata za njegovu sintezu, a smanjena koncentracija L-Arg je povezana razvojem poremećaja funkcionisanja KVS, kao i nastankom bolesti kao što je hronična srčana insuficijencija (Mendes Ribeiro i sar., 2001). Rezultati ove doktorske disertacije, dobijeni određivanjem nivoa L-Arg u lizatu tkiva srca ženki pacova, pokazali su da je HF režim ishrane doveo do značajnog smanjenja koncentracije L-Arg u srcu gojaznih ženki pacova u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 6.**). Ovako dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju da je u endotelu gojaznih miševa smanjena koncentracija L-Arg (Korda i sar., 2008). Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljamo da usled detektovane povećane aktivnosti iNOS enzima (**Slika 5.**) dolazi do povećane potrošnje L-Arg od strane iNOS, a kao posledica se javlja smanjenje nivoa L-Arg u lizatu tkiva srca gojaznih ženki pacova. U prilog ovoj pretpostavci su i istraživanja Zunic i saradnika (2009), a čiji su rezultati koji su pokazali da u

## 5. Diskusija

proinflamatornim stanjima, kao što je gojaznost, dolazi do povećanja ekspresije iNOS, kao i do posledičnog smanjenja koncentracije L-Arg.

Kao mera aktivnosti iNOS meren je nivo  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , čiji je krajnji produkt NO, a koji predstavlja važan regulator srčane funkcije (Favero i sar., 2014). NO u KVS u velikoj meri utiče na regulaciju krvnog pritiska, i to regulišući dijametar krvnih sudova, a pored toga ima i važnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti kardiomiocita (Moncada i Higgs, 1995). Iako je održavanje fiziološke koncentracije NO jedan od presudnih faktora koji doprinose normalnom funkcionisanju srca (Pfitzer i sar., 1982; Padilla i sar., 2000), prekomerna sinteza ovog molekula dovodi do pojave srčane hipertrofija i smanjuje kontraktilnost kardiomiocita (Mungrue i sar., 2002). Rezultati koji su dobijeni određivanjem nivoa  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , a čiji je krajnji produkt NO, u lizatu srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova pokazali su da HF režim ishrane nije doveo do promena nivoa NO u lizatima tkiva srca ženki pacova (**Slika 7**). Dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima iz literature koji pokazuju povećanje nivoa NO u srcu gojaznih pacova u odnosu na normalno uhranjene životinje (Choi i sar., 2001; Joost i Tschöp, 2007; Noboru i Tomio, 2013). Kao jedno od mogućih objašnjenja nepromenjenog nivoa NO zapaženog u ovim eksperimentima, i pored povećane ekspresije proteina koji sintetiše NO, moglo bi biti da pod uticajem HF režima ishrane može doći do smanjenja ekspresije i aktivnosti konstitutivne izoforme NOS u srcu tj. eNOS (Scott i sar., 2002), kao i da je povećana ekspresija iNOS proteina uglavnom praćena smanjivanjem ekspresije eNOS proteina (Scott i sar., 2002). Takođe, Yang i saradnici (2007) su pokazali da HF dijeta reguliše ekspresiju eNOS proteina mehanizmom koji podrazumijeva ushodnu regulaciju ekspresije caveolin-1 (Yang i sar., 2007). Takođe, pokazano je da je visok nivo ROS jedna od karakteristika gojaznosti (McMurray i sar., 2016), kao i da NO može da interaguje sa ROS i uzrokuje proizvodnju reaktivnih vrsta azota kao što su  $\text{OONO}^-$ , azot-dioksid ( $\text{NO}_2^-$ ), dinitrogen trioksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) ili azotna kiselina ( $\text{HNO}_2$ ) (Hsieh i sar., 2014).

Brojna istraživanja ukazuju na učešće Akt i ERK1/2 kinaza u regulaciji ekspresije i aktivnosti iNOS proteina (Hattori i sar., 2003; Ellerhorst i sar., 2006; Gwinn i Vallyathan, 2006; Hou i sar., 2009). Hossen i saradnici (2016) su pokazali da aktivacija Akt dovodi do povećanja translokacije NFkB proteina u jedro, kao i do povećanja ekspresije gena za iNOS.

## 5. Diskusija

Takođe, poznato je da je I $\kappa$ B supstrat za Akt i da su procesi neophodni za aktivaciju NF $\kappa$ B (degradacija I $\kappa$ B, translokacija NF $\kappa$ B u jedro i vezivanje za DNK) smanjeni usled inhibicije Akt (Hattori i sar., 2003). Osim toga, povećana fosforilacija ERK1/2 na Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> obično povećava kako ekspresiju i aktivnost NF $\kappa$ B, tako i ekspresiju gena za iNOS (Kim i Kim, 2005; Ellerhorst i sar., 2006; Hou i sar., 2009; Xiao i sar., 2011; Sudar Milovanovic i sar., 2015). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je HF režim ishrane doveo do značajnog povećanja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> u srcu ženki pacova (**Slika 18.**), što je saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa, koji su takođe pokazali da povećana aktivnost Akt doprinosi povećanju ekspresije iNOS (Hattori i sar., 2003; Gwinn i Vallyathan, 2006; Hossen i sar., 2016). Međutim, s obzirom na naša prethodna istraživanja koja pokazuju da HF režim ishrane, u trajanju od deset nedelja, kod mužjaka pacova dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti Akt kinaze (Obradovic i sar., 2015; Zafirovic i sar., 2018), uočena povećana fosforilacija Akt na Ser<sup>473</sup> u srcu gojaznih ženki pacova je neočekivana. Sa druge strane, Unsold i saradnici (2015) su pokazali da u srcu ženki miševa HF dijeta u trajanju od dva meseca dovodi privremenog povećanja nivoa fosforilisane forme Akt, da bi nakon 6 meseci došlo do značajnog smanjenja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>. Stoga se može pretpostaviti da postoje polno specifične razlike u vremenskom periodu u kom dolazi do poremećaja u aktivnosti Akt, kao i da kod ženki pacova HF režim u trajanju od deset nedelja (što je slučaj u eksperimentima rađenim u okviru ove doktorske disertacije) nije dovoljno dug kako bi došlo do smanjenja fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>.

Dalje, rezultati eksperimenata ove doktorske disertacije su pokazali da HF režim ishrane nije doveo do promena u fosforilaciji na aminokiselinama Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> kao ni u ukupnom nivou ERK1/2 kinaza u srcu ženki pacova (**Slika 19**). Poznato je da ERK1/2 kinaza može biti deaktivirana i defosforilisana aktivnošću specifične fosfataze 6 (DUSP6 engl. *Dual-Specificity Phosphatase 6*), čija je ekspresija kao i aktivnost povećana u patofiziološkim stanjima, kao što je gojaznost. Takođe je pokazano da povećanje ekspresije DUSP6 u srcu miševa za posledicu može imati gotovo potpunu inaktivaciju ERK1/2 kinaze u ovom organu (Purcell i sar., 2007).

## 5. Diskusija

Veliki deo energije koja je potrebna za kontrakciju srca, održavanje balasa jona i prometa enegetskih supstrata u srcu obezbeđen je oksidacijom SMK i glukoze, a krajnji proizvod oksidativnog metabolizma u mitohondrijama je ATP (Pulakat i sar., 2011). Unos i korišćenje masnih kiselina u miokard se značajno menjaju u zavisnosti od načina ishrane, nivoa specifičnih hormona (npr. insulina, leptina, estradiola) i fizičke aktivnosti. Usled primene ishrane obogaćene zasićenim masnim kiselinama (npr. tip dijete u zapadnim zemljama), u miokardu se može doći do povećanog korišćenja masnih kiselina, na račun glukoze, za proizvodnju energije, što doprinosi razvoju IR u miokardu i kontraktilne disfunkcije, što je zajedno poznato kao kardiomiopatija uzrokovana dijabetesom (Liu i sar., 2017). Unos SMK u ćelije srca može se, sa jedne strane, odvijati pasivnom difuzijom, dok sa druge strane ovaj proces može biti olakšan transportetrima SMK tj. CD36 transporterom i u tom slučaju na stopu preuzimanja SMK utiče ekspresija i lokalizacija CD36 (van der Vusse i sar., 2000; Coort i sar., 2004; Bharadwaj i sar., 2010; Rider i sar., 2013). U skeletnim mišićima i srcu, stimulacija translokacije CD36 proteina sa endozoma na plazma membranu značajno (do dva puta više) povećava unos masnih kiselina u ćelije (Bonen i sar., 2000; Luiken i sar., 2002; Luiken i sar., 2003). Translokacija CD36 proteina je proces posredovan vezikulama, a taj proces je u fiziološkim uslovima brz i reverzibilan (van Oort i sar., 2008). Estradiol ima važnu ulogu u regulisanju metabolizma glukoze i masnih kiselina u srcu, a protektivno dejstvo estradiola u patološkim stanjima, tipa gojaznosti, ogleda se i u uticaju ovog hormona na smanjenje količine lipida nataloženih u srcu, kao i usmanjenju ekspresije CD36 transportera kao i povećanju nivoa Glut4 u plazma membranama ćelija srca (Zafirovic i sar., 2017). Imajući u vidu važnost metabolizma ugljenih hidrata i masti za pravilno funkcionisanje srca, u dalje je istraživana uticaj gojaznosti na regulaciju metabolizma masti i ugljenih hidrata u srcu ženki pacova.

U cilju izučavanja uticaja HF režima ishrane na metabolizam masti u srcu ženki pacova, određivan je nivo CD36 transportera u lizatima i plazma membranama srca, kao i koncentracija SMK u lizatima srca kontrolnih i gojaznih ženki pacova. Rezultati merenja nivoa CD36 proteina u srcu pokazuju povećanje nivoa ovog transportera kako u lizatima tako i u plazma membranama kardiomiocita gojaznih u odnosu na kontrolne ženke pacova (**Slika 8. A i B**), što ukazuje na povećanu ekspresiju i translokaciju CD36 transportera. Ovo



## 5. Diskusija

povećanje nivoa CD36 transportera može se dovesti u vezu sa uočenim povećanjem ekspresije iNOS proteina (**Slika 5.**) u srcu gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženka pacova. Više istraživanja je pokazalo da je iNOS može uticati na ekspresiju CD36 proteina (Bai i sar., 2011; Puthanveetil i sar., 2011; Zhang i sar., 2013). Pokazano je da inkubacija kardiomiocita sa zasićenom masnom kiselinom (palmitatinska kiselina) vodi povećanom intracelularnom skladištenju TG, povećanoj ekspresiji iNOS proteina kao i povećanoj ekspresiji CD36 proteina (Puthanveetil i sar., 2011). Ovi efekti palmitata na kardiomiocite su sprečeni korišćenjem specifičnog iNOS inhibitora, 1400W (Puthanveetil i sar., 2011). Takođe, više istraživanja pokazuje da se kao posledica gojaznosti može javiti povećana translokacija CD36 proteina na plazma membranu (Considine i sar., 1996; Rider i sar., 2013; Momken i sar., 2017). Dalje, iako je poznato da je, u fiziološkim uslovima, reverzibilna translokacija CD36 normalna pojava, Glatz i saradnici (2013), su pokazali da HF režim ishrane može dovesti do trajne translokacije CD36 transportera iz intracelularnih rezervi na plazma membranu (Glatz i sar., 2013). Dalje, merenjem nivoa SMK u lizatu srca ženki pacova, pokazali smo da je HF režim ishrane doveo do značajnog smanjenja nivoa SMK u lizatima tkiva srca gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova (**Slika 9.**). Ovi rezultati bi mogli ukazivati da je u srcu gojaznih ženki pacova došlo do povećane esterifikacije SMK do TG, imajući u vidu da se u stanju gojaznosti često javlja ektopična akumulacija masti, uključujući i intramiokardijalnu akumulaciju TG (Unger, 2002; Holland i sar., 2007). Takođe su i Bastie i saradnici (2004) pokazali da izlaganje ćelija sa prekomernom ekspresijom CD36 proteina visokim koncentracijama SMK dovodi do povećanja nivoa TG, a istovremenog smanjenja nivoa masnih kiselina u ovim ćelijama u poređenju sa WT „wild type“ ćelijama (Bastie i sar., 2004). Inkubacija ćelija srca sa palmitinskom kiselinom, vodi povećanom unutarćelijskom skladištenju TG, kao i povećanoj translokaciji CD36 proteina na plazma membrane kardiomiocita (Puthanveetil i sar., 2011). Sa druge strane, postoji mogućnost da je smanjenje nivoa SMK nastalo kao posledica njihove povećane oksidacije, imajući u vidu da je gojaznost, između ostalog, okarakterisana i smanjenjem metabolizma glukoze, kao i favorizovanjem proizvodnje energije oksidacijom masnih kiselina u srcu (Abel i sar., 2012; Fillmore i sar., 2014).

## 5. Diskusija

Još jedan važan supstrat za energetske metabolizam u srcu je glukoza, a njen transport je ograničavajući faktor za korišćenje glukoze u miokardu i zahteva učešće GLUT transportera (Pessin i Bell, 1992). Familija transportera glukoze obuhvata veliki broj izoformi ovog proteina, a u srcu se ekspimiraju sledeće izoforme: GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-11 i GLUT-12 (Shao i Tian, 2015). Osnovne i najzastupljenije izoforme glukoznih transportera u kardiomiocitima su GLUT-1 i GLUT-4, i one imaju najvažniju ulogu u transportu glukoze u srce (Olson i Pessin, 1996; Razeghi i sar., 2001). GLUT1 je glavni transporter na plazma membranama kardiomiocita (Santalucia i sar., 1992; Montessuit i Lerch, 2013), dok se transport glukoze preko GLUT-4 odvija prilikom izlaganja ćelija vanćelijskim stimulusima (Fischer i sar., 1997; Glatz i sar., 2013). Translokacija GLUT-4 iz citoplazme na plazma membranu zavisi od IRS/PI3K/Akt signalne kaskade (Mínea i sar., 2005; Brewer i sar., 2014). Aktivacija Akt omogućava fosforilaciju i inhibiciju supstrata za Akt od 160 kDa (AS160), za koji je pokazano da učestvuje u translokaciji GLUT-4 na ćelijsku membranu (Mínea i sar., 2005). Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, a koji su dobijeni merenjem nivoa GLUT-1 proteina u lizatima i membranskim frakcijama proteina pokazuju da HF režim ishrane nije doveo do promena nivoa ovog transportera ni u citoplazmi ni u plazma membrani kardiomiocita ženki pacova (**Slika 10. A i B**). Ovi rezultati mogu se dovesti u vezu sa činjenicom da GLUT-1 održava bazalan metabolizam glukoze i konstitutivno je ekspimiran, a takođe je pokazana i diferencijalna regulacija GLUT-1 i GLUT-4 transportera (Montessuit i Lerch, 2013). Pokazano je da vanćelijski stimulusi indukuju promene, npr. hormoni ili vežbanje, u ekspresiji gena za GLUT-4 na nivou iRNA, dok ekspresija gena za GLUT-1 proteina ostaje nepromenjena (Montessuit i Lerch, 2013). Dalje, rezultati merenja nivoa GLUT-4 transportera pokazali su da nije došlo do promena u nivou ovog proteina u lizatima srca (**Slika 11. A**), dok je u membranskim frakcijama proteina kardiomiocita nivo GLUT-4 proteina bio statistički značajno povećan kod gojaznih u odnosu na normalno uhranjene ženke pacova (**Slika 11. B**). Ovakvi rezultati su očekivani, budući da je u srcu gojaznih ženki pacova u ovom eksperimentu došlo do povećanja nivoa fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> (**Slika 18.**), što ukazuje na povećanu aktivnost Akt kinaze.

## 5. Diskusija

Enzim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza ima presudnu ulogu u regulaciji elektrofiziologije srca i kontraktilnosti kardiomiocita (Skou i Esmann, 1992). Različiti poremećaji funkcije KVS kao što su hipertenzija i hipertrofija srca, a koji se često javljaju kao posledica gojaznosti, povezani su sa poremećajima u regulaciji ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Kjeldsen, 2003; Schwinger i sar., 2003; Iannello i sar., 2007a; Iannello i sar., 2007b). Danas postoji više predloženih mehanizama regulacije aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, a u literaturi se najčešće opisuju: a) regulacija reverzibilnom fosforilacijom subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze; b) regulacija translokacijom već sintetisanih molekula  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze i c) regulacija promenom nivoa ekspresije gena (Ewart i Klip, 1995; Isenovic i sar., 2004; Isenovic i sar., 2004; Efendiev i sar., 2007; Li i sar., 2011). Kada je  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza regulisana direktnim uticajem na kinetiku enzima koji je već prisutan u membrani (kratkoročna regulacija), promena u aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze uočava se u roku od par minuta do par sati (Bertorello i Katz, 1993; Therien i Blostein, 2000). U tom slučaju brži ili sporiji transport  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  u datom trenutku se ostvaruje promenom nivoa fosforilacije već postojećih  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza od strane protein kinaze A (PKA), protein kinaze C (PKC), Akt ili protein kinaze G (PKG) (Li i sar., 1999). Jedno od mesta fosforilacije za koje se smatra da je od značaja za kinetiku  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je Ser<sup>23</sup>, koje se nalazi na N-terminalnom domenu katalitičke  $\alpha$  subjedinice. Još jedan mehanizam regulacije aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je transport ovog molekula iz unutarćelijskih rezervi na plazma membranu (Hundal i sar., 1992; Al-Khalili i sar., 2003). Takođe, postoji mišljenje da se regulacija aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ostvaruje preko povećanja ili smanjenja ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Bonvalet, 1998; Therien i Blostein, 2000). Smanjena ekspresija i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze česta su posledica gojaznosti (Iannello i sar., 2007a; Iannello i sar., 2007b; Galuska i sar., 2009). Pokazno je da HF režim ishrane u trajanju tri meseca, pri čemu je 55% kalorija poreklom od masti, dovodi do smanjenja ekspresije  $\alpha_2$  i  $\beta_1$  subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, kao i do smanjenja aktivnosti ovog enzima u skeletnim mišćima ženki pacova Wistar soja (Galuska i sar., 2009). Naši prethodno objavljeni rezultati pokazuju da kod mužjaka pacova HF dijeta dovodi do hipertrofije srca, smanjenja ekspresije  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kao i do smanjenja aktivnosti ovog enzima, dok tretman estradiolom smanjuje hipertrofiju srca i povećava ekspresiju i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Obradovic i sar., 2015; Obradovic i sar., 2015). Dzurba i saradnici (1997)

## 5. Diskusija

su pokazali da tretiranje estradiolom ovarijektomisanih ženki povećava aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u miokardijumu. Dalje, Palacios i saradnici (2004) su *in vitro* tretirali aorte izolovane iz ovarijektomisanih ženki pacova estradiolom i pokazali da je aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze nakon tretmana estradiolom približno ista kao kod kontrolnih pacova. Isti autori su takođe pokazali da *in vitro* tretman aorti izolovanih iz mužjaka pacova estradiolom povećava nivo iRNK za  $\alpha_2$  subjedinicu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, kao i da je nivo ekspresije  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze veći, dok je nivo  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze manji u aortama ženki pacova u poređenju sa mužjacima (Palacios i sar., 2004).

U cilju izučavanja ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova, daljem radu izučavni su ekspresija, fosforilacija  $\alpha_1$  subjedinice i aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Dobijeni rezultati pokazuju da HF režim ishrane smanjuje ukupni nivo  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, kao i nivo fosforilacije  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na aminokiselinskom ostatku Ser<sup>23</sup>, u srcu ženki pacova, dok vrednost dobijena izračunavanjem odnosa fosforilisane i ukupne forme  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze nije bila statistički značajno promenjena (**Slika 12.**). Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima naše grupe, a koji se odnose na regulaciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod gojaznih mužjaka (Obradovic i sar., 2015), kao i rezultatima drugih autora koji nedvosmileno pokazuju da HF režim ishrane dovodi do smanjenja ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Bray i Yukimura, 1978; Guernsey i Morishige, 1979; Iannello i sar., 2007b). Međutim, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da HF režim ishrane nije doveo do značajnih promena kako u nivou  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 13.**), tako ni u aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 14.**) u srcu ženki pacova. Nepromenjena aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, i pored smanjenja ekspresije  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze može se objasniti time da je u eseju za određivanje aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze korišćen ouabain. Naime, pokazano je da kod glodara  $\alpha_1$  subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze ima nizak afinitet vezivanja ouabain-a, stoga ouabain-senzitivne metode prevashodno reflektuju nivo  $\alpha_2$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Clausen, 2003; Galuska i sar., 2009). Michea i saradnici (2001) su pokazali da smanjena ekspresija  $\alpha_1$  subjedinice ne utiče na aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, dok je redukcija nivoa  $\alpha_2$  subjedinice odgovorna za smanjenje aktivnosti ovog enzima (Michea i sar., 2001). Takođe, nedavno su Correll i saradnici (2014) pokazali da je kod transgenih miševa sa prekomernom ekspresijom  $\alpha_2$ , ali ne i  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze značajno

## 5. Diskusija

smanjena hipertrofija i remodelovanje srca. Literaturni podaci ukazuju na to da bi  $\alpha_2$  subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze mogla da nadomesti ulogu  $\alpha_1$  subjedinice u smislu regulisanja aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Correll i sar., 2014). Rezultati ove doktorske disertacije takođe podržavaju ovu pretpostavku, imajući u vidu da smo uočili smanjenu ekspresiju  $\alpha_1$  subjedinice, bez promena u aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze kod gojaznih u poređenju sa kontrolnim ženka. Polazeći od mnogobrojnih literaturnih podataka koji ukazuju na postojanje polno specifičnih razlika u odnosu nivoa ekspresije  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  subjedinica, kao i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Fekete i sar., 2004; Palacios i sar., 2004; Palacios i sar., 2004; Dias i sar., 2014), pretpostavljamo da su stimulatorni efekti endogenog estradiola dovoljni da održe normalnu funkciju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze tokom reproduktivnog perioda gojaznih ženki pacova.

Nedavno je otkriveno da bi važnu ulogu u regulaciji ekspresije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze mogao imati NDRG2 protein (Li i sar., 2011). NDRG2 protein je uključen u rast, proliferaciju i diferencijaciju ćelija, kao i u odgovor na stres i hormonske reakcije (Yao i sar., 2008). Takođe, smatra se da NDRG2 reguliše transport i homeostazu jona. Prethodna istraživanja su pokazala da ekspresiju NDRG2 proteina regulišu: familija Myc proteina (Zhang i sar., 2006), citokini (Foletta i sar., 2009), kao i mnogi hormoni (Boulkroun i sar., 2002; Boulkroun i sar., 2005; Foletta i sar., 2009). Takođe, pokazano je da tretman HeLa ćelija estradiolom povećava nivo iRNK za NDRG2, i to posredstvom ER $\beta$  receptora (Li i sar., 2011). Nishodna regulacija *NDRG2*, primenom „*silencing*“ RNK (siRNA), dovedena je u vezu sa smanjenjem gradijenta  $\text{Na}^+$ , koji inače održava  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza (Wielputz i sar., 2007; Li i sar., 2011). Naši rezultati su pokazali da je nivo NDRG2 proteina bio značajno povećan u srcu gojaznih ženki u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 15.**). Jedno od mogućih objašnjenja uočenog povećanja nivoa NDRG2 proteina može se dovesti u vezu sa njegovom ulogom u odgovoru na inflamaciju (Wang i sar., 2008; Liu i sar., 2010; Anderson i sar., 2015). Pokazano je da je NDRG2 u pankreasu ključni molekul uključen u zaštitu od lipotoksičnosti indukovane visokim nivoom SMK u cirkulaciji (Shen i sar., 2010). Osim toga, NDRG2 je uključen u kardioprotekciju, što je pokazano u eksperimentima u kojima su ćelije srca sa smanjenom funkcijom NDRG2 podložnije oštećenju indukovanim ishemijom i reperfuzijom (Sun i sar., 2013). Imajući u vidu literaturne podatke koji ukazuju da je gojaznost praćena hroničnom

## 5. Diskusija

inflamacijom (Barros i sar., 2006; Al-Daghri i sar., 2010; Manabe, 2011; McArdle i sar., 2013), kao rezultate prikazane u ovoj disertaciji, koji pokazuju povećanu ekspresiju iNOS proteina u srcu gojaznih ženki pacova (**Slika 3.**), što ukazuje na postojanje inflamatornih procesa u srcu, možemo pretpostaviti da se povećanje NDRG2 javlja kao mehanizam kojim bi se umanjilo oštećenje srca indukovano gojaznošću. Takođe, povećana ekspresija NDRG2 proteina mogla bi biti razlog nepromenjene aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova (**Slika 14.**). Naime, Li i saradnici (2011) su indentifikovali NDRG2 kao protein koji interaguje sa  $\beta_1$  subjedinicom  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, i na taj način olakšava transport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze na plazma membranu i sprečava njenu degradaciju.

Među signalnim putevima koji imaju ulogu u regulaciju ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, jedan od najviše izučavanih je IRS/PI3K signalni put (Isenovic i sar., 2003; Serhan i Kreydiyyeh, 2011; Kim i sar., 2012; Obradovic i sar., 2015). Rezultati brojnih studija pokazuju da smanjena aktivacija IRS-1 predstavlja ključnu vezu između gojaznosti, IR i smanjene aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (Taniguchi i sar., 2006; Iannello i sar., 2007a; Iannello i sar., 2007b). Takođe, smanjena ekspresija  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze (**Slika 12.**), koju su pokazali rezultati ove doktorske disertacije, mogla bi se javiti kao posledica smanjene aktivnosti IRS-1/PI3K signalnog puta. Aktivnost IRS-1 zavisi od nivoa fosforilisanosti na Tyr i Ser ostacima. Kada je IRS-1 fosforilisan na Tyr ostacima, pTyr IRSa postaje mesto vezivanja proteina sa „dzepovima“ za fosfotirozine, tj. proteine sa koji sadrže domen 2 homolog Src (SH2; engl. *Src Homology 2*), a takav domen sadrži i regulatorna p85 subjedinice PI3K (Myers i sar., 1992). Sa druge strane, fosforilacija na Ser ostacima onemogućava fosforilaciju na Tyr i posledično smanjuje asocijaciju IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K (Craparo i sar., 1997; Sun i sar., 1999; Sykiotis i Papavassiliou, 2001). Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazali nema promene ekspresije p85 i p110 subjedinica PI3K (**Slika 16.**) u srcu gojaznih ženki pacova, što je u saglasnosti sa rezultatima Unsolda i saradnika, koji su takođe pokazali da HF dijeta u trajanju od dva meseca ne dovodi do promena nivoa kako p85 tako ni p110 subjedinica PI3K u srcu ženki miševa (Unsold i sar., 2015). Međutim, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, a koji su dobijeni merenjem nivoa asocijacije p85 subjedinice PI3K sa IRS-1, pokazali su da je u srcu gojaznih ženki pacova IRS-1/PI3K asocijacija bila značajno smanjena u poređenju sa kontrolnim

## 5. Diskusija

ženkama (**Slika 17.**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija koje pokazuju da HF režim ishrane povećava fosforilaciju IRS na Ser<sup>307</sup>, koja smanjuje interakciju IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K (Lee i sar., 2010; Manrique i sar., 2012). Prethodno su diskutovani rezultati ove doktorske disertacije, koji su pokazali povećanu ekspresiju i translokaciju CD36 transportera (**Slika 8.**) u kardiomiocitima gojaznih ženki pacova, što dovodi do povećane akumulacije lipida u srcu. Kao posledica može doći do aktivacije niza serin kinaza, kao što je PKC, koje mogu fosforilisati IRS-1 na Ser ostacima i na taj način doprineti smanjenju asocijacije IRS-1 proteina sa p85 subjedinicom PI3K (Dresner i sar., 1999; Dey i sar., 2006; Draznin, 2006; Schmitz-Peiffer i Biden, 2008).

Uloga RhoA/ROCK signalnog puta u razvoju KVB je dobro poznata (Chitaley i sar., 2001; Kolavennu i sar., 2008; Soliman i sar., 2008; Bryan i sar., 2010; Zhou i sar., 2011). Povećana aktivnost RhoA/ROCK signalnog puta, kao i promene u aktivnosti kinaza na koje utiče RhoA/ROCK kaskada, može imati ključnu ulogu u procesima koji dovode do razvoja KVB kao što su ateroskleroza, hipertenzija, plućna hipertenzija, angina pectoris i srčana insuficijencija (Chitaley i sar., 2001; Mukai i sar., 2001; Kishi i sar., 2005; Rikitake i Liao, 2005). Takođe, postoje indikacije da RhoA/ROCK signalni put utiče na ekspresiju i aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, ali tačan mehanizam još nije poznat. Imajući u vidu naše i radove drugih istraživača koji pokazuju da su ekspresija i aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze regulisani i IRS/PI3K signalnim putem (Isenovic i sar., 2004; Obradovic i sar., 2014; Obradovic i sar., 2015), kao i da aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta suprimira IRS/PI3K kaskadu (Soliman i sar., 2015), može se pretpostaviti da aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta negativno deluje na ekspresiju i aktivnost Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je HF režim ishrane doveo do značajnog povećanja nivoa RhoA proteina (**Slika 20.**) u srcima gojaznih ženki pacova u poređenju sa njihovim kontrolama, što se može dovesti u vezu sa povećanom aktivnošću renin-angiotenzin sistema, što je uobičajeno za stanje gojaznosti i koje karakteriše i povećan nivo angiotenzina II (Ang II) (Zhou i sar., 2012). Povećana koncentracija Ang II indukuje hipertrofiju kardiomiocita preko različitih signalnih puteva, koji uključuju i aktivaciju RhoA (Aikawa i sar., 2000; Kim i Iwao, 2000). Pored toga, povećanom nivou RhoA proteina moglo

## 5. Diskusija

bi doprineti povećanje ekspresije iNOS proteina, koje je takođe uočeno u okviru ove doktorske disertacije (**Slika 3.**). Brojna istraživanja su pokazala da povećana ekspresija i aktivnost iNOS proteina vodi fosforilaciji RhoA proteina na specifičnim Ser ostacima, na taj način štiteći RhoA od ubikvitinacije i degradacije posredovane proteazomom, dok je inhibicija iNOS proteina povezana sa smanjenjem iRNK za RhoA kao i sa smanjenom ekspresijom RhoA proteina u aorti i plućnoj arteriji (Sauzeau i sar., 2003; Sauzeau i sar., 2003; Rolli-Derkinderen i sar., 2005). Takođe, merenjem nivoa ROCK2 proteina, pokazano je da je HF režim ishrane doveo do značajnog povećanja nivoa ove kinaze u srcu ženki pacova (**Slika 21.**), što je u skladu sa istraživanjima drugih autora (Zhou i sar., 2011; Chen i sar., 2014; Soliman i sar., 2015). Soliman i saradnici (2015) su pokazali da kod pacova HF režim ishrane, u trajanju od 17 nedelja, značajno povećava ekspresija i aktivnost ROCK2 kinaze u srcu, što za posledicu ima smanjenje aktivnosti IRS/PI3K signalnog puta, dok parcijalna delecija ROCK2 kinaze ima suprotne efekte. Sa druge strane, rezultati merenja nivoa ROCK1 proteina (**Slika 22.**) pokazuju da je HF režim ishrane doveo do značajnog smanjenja nivoa ovog proteina u srcu ženki pacova. Literaturni podaci koji se odnose na regulaciju ROCK1 u srcu u stanju gojaznosti su oskudni. Međutim, O'Brien i saradnici su pokazali da je ekspresija ROCK1 kinaze značajno smanjena u miomertrijumu gojzanih žena (O'Brien i sar., 2013). Danas sve veći broj literaturnih podataka ukazuje na funkcionalne razlike ROCK1 i ROCK2 (Yoneda i sar., 2005; Kalaji i sar., 2012; Zhao i sar., 2012; Boku i sar., 2013). Furukawa i saradnici (2005) su pokazali da je aktivacija ROCK1 veoma važna za održavanje normalnog funkcionisanje IRS/PI3K signalnog puta (Furukawa i sar., 2005). Takođe je pokazano je da deficijencija ROCK1 proteina *in vivo* dovodi do razvoja IR, kao i da je transport glukoze u mišićne ćelije smanjen kada je inhibirana ekspresija ROCK1 kinaze, što sve zajedno ukazuje na poremećenu regulaciju PI3K/Akt signalne kaskade (Chun i sar., 2012; Lee i sar., 2014). Sa druge strane, pokazano je da se samo ROCK2 direktno vezuje za IRS-1 i na taj način remeti njegovu asocijaciju sa PI3K (Chun i sar., 2012; Shi i Wei, 2013).



## 5. Diskusija

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da je HF režim ishrane kod ženki pacova doveo do povećane ekspresije gena za iNOS na nivou iRNK i proteina, i to mehanizmom koji uključuje aktivaciju Akt i NF $\kappa$ B, smanjenje koncentracije endogenog estradiola, kao i smanjenje ekspresije ER $\alpha$  u srcu. Takođe, usled primene HF režima ishrane, a najverovatnije kao posledica povećane aktivacije iNOS proteina, došlo je do povećane ekspresije CD36 transportera što može ukazati na nagomilavanje lipida u srcu, kao i do aktivacije RhoA/ROCK2 signalne kaskade. Dalje, može se pretpostaviti da se ROCK2 direktno vezuje za IRS-1 i time remeti njegovu asocijaciju sa regulatornom p85 subjedinicom PI3K, što utiče na smanjenje ekspresije  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze. Međutim, rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da kod gojaznih ženki pacova nije došlo do promena u nivou  $\alpha_2$  subjedinice kao ni u aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, što ukazuje da iako je nivo endogenog estradiola bio smanjen kod gojaznih ženki pacova, sinteza ovog hormona nije u potpunosti inhibirana, te da su preostale količine estradiola su bile dovoljne da održe normalnu funkciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze.

### 6. ZAKLJUČCI

Uzimajući u obzir rezultate, dobijene i prikazane u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti zaključci da je u srcu gojaznih ženki pacova, kojima je dokazano značajno smanjenje nivoa endogenog estradiola, ustanovljeno:

1. smanjenje ekspresije ER $\alpha$  receptora za estrogene;
2. povećanje ekspresije gena za iNOS i aktivnost iNOS;
3. povećanje ekspresije GLUT-4 i CD36 na membranama kardiomiocita;
4. smanjenje ekspresije  $\alpha_1$  subjedinice Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze, ali ne i  $\alpha_2$  subjedinice kao ni aktivnosti Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaze;
5. smanjenje asocijacije IRS-1 sa p85 subjedinicom PI3K, ali povećanje nivoa NF $\kappa$ B p50, fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> i aktiviranje RhoA/ROCK2 signalne kaskade.

## 6. Zaključci

Rezultati koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju kod gojaznih ženki pacova dolazi do delimičnog smanjenja kardioprotektivnih efekata endogenog estradiola, što za posledicu ima povećanje ekspresije iNOS proteina, kao i smanjenje ekspresije  $\alpha_1$  subjedinice  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na ušće Akt, NF $\kappa$ B, RhoA, ROCK2, IRS-1 i PI3K signalnih molekula u regulaciji iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova.

Molekulski mehanizmi koji leže u osnovi veze između gojaznosti, KVB i regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, još nisu dovoljno poznati, a posebno kod žena. Takođe, nedovoljno su poznati i mehanizmi regulacije ekspresije i aktivnosti iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova, kojima je poremećen kardioprotektivni efekat estradiola. Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom doprinose sagledavanju molekularnih mehanizama kojima je regulisana ekspresija i aktivnost iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu gojaznih ženki pacova, kao i sagledavanju mehanizama kojima stanje gojaznosti remeti kardioprotektivne efekte estradiola. Kompletno razumevanje mehanizama poremećene regulacije iNOS i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze je neophodno za razvoj novih terapijskih pristupa u lečenju gojaznosti, IR i hipertenzije.

## 7. LITERATURA

1. Abel, E. D., K. M. O'Shea and R. Ramasamy (2012). "Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9): 2068-2076.
2. Ahren, B., J. J. Holst and S. Yu (2000). "1,5-Anhydro-D-fructose increases glucose tolerance by increasing glucagon-like peptide-1 and insulin in mice." *Eur J Pharmacol* 397(1): 219-225.
3. Ahrén, B. and G. Pacini (2002). "Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 283(4): E738-E744.
4. Aikawa, R., I. Komuro, R. Nagai and Y. Yazaki (2000). "Rho plays an important role in angiotensin II-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes." *Mol Cell Biochem* 212(1-2): 177-182.
5. Al-Daghri, N. M., O. S. Al-Attas, M. S. Alokail, K. M. Alkharfy, N. A. Shaik, H. M. Draz, A. Bamakhramah and S. L. Sabico (2010). "Gender-specific associations between insulin resistance, hypertension, and markers of inflammation among adult Saudis with and without diabetes mellitus type 2." *Adv Med Sci* 55(2): 179-185.
6. Al-Khalili, L., M. Yu and A. V. Chibalin (2003). "Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase trafficking in skeletal muscle: insulin stimulates translocation of both alpha 1- and alpha 2-subunit isoforms." *FEBS Lett* 536(1-3): 198-202.
7. Alda, J., V. M. S., P. Desiree, G. Pilar and G. R. P. (2009). "Endothelium-independent vasorelaxation by the selective alpha estrogen receptor agonist propyl pyrazole triol in rat aortic smooth muscle." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(5): 641-646.
8. Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* 357(Pt 3): 593-615.
9. Alexescu, T. G., A. Cozma, A. Sitar-Taut, V. Negrean, M. I. Handru, M. Motocu, N. Tohanean, C. Lencu and I. Para (2016). "Cardiac Changes in Overweight and Obese Patients." *Rom J Intern Med* 54(3): 161-172.
10. Alpert, M. A. (2001). "Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome." *Am J Med Sci* 321(4): 225-236.
11. Anderson, K. J., A. P. Russell and V. C. Foletta (2015). "NDRG2 promotes myoblast proliferation and caspase 3/7 activities during differentiation, and attenuates hydrogen peroxide – But not palmitate-induced toxicity." *FEBS Open Bio* 5: 668-681.
12. André, D. M., M. C. Calixto, C. Sollon, E. C. Alexandre, E. B. G. Tavares, A. C. A. Naime, G. F. Anhê and E. Antunes (2017). "High-fat diet-induced obesity impairs insulin signaling in lungs of allergen-challenged mice: Improvement by resveratrol." *Scientific Reports* 7(1): 17296.
13. Ardelt, A. A., L. D. McCullough, K. S. Korach, M. M. Wang, D. H. Munzenmaier and P. D. Hurn (2005). "Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model." *Stroke* 36(2): 337-341.
14. Arias-Loza, P. A., M. C. Kreissl, S. Kneitz, F. R. Kaiser, I. Israel, K. Hu, S. Frantz, B. Bayer, K. H. Fritzemeier, K. S. Korach and T. Pelzer (2012). "The estrogen receptor-alpha is required and

## 7. Literatura

- sufficient to maintain physiological glucose uptake in the mouse heart." *Hypertension* 60(4): 1070-1077.
15. Arvola, P., M. Kahonen, H. Makynen, H. Wuorela, V. Manninen, H. Vapaatalo and I. Porsti (1993). "High calcium diet, different antihypertensive agents, and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in spontaneously hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* 22(5): 702-705.
16. Ascenzi, P., A. Bocedi and M. Marino (2006). "Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health." *Mol Aspects Med* 27(4): 299-402.
17. Attwell, D. and S. B. Laughlin (2001). "An energy budget for signaling in the grey matter of the brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(10): 1133-1145.
18. Axelsen, K. B. and M. G. Palmgren (1998). "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." *J Mol Evol* 46(1): 84-101.
19. Baba, T., T. Shimizu, Y. Suzuki, M. Ogawara, K. Isono, H. Koseki, H. Kurosawa and T. Shirasawa (2005). "Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice." *J Biol Chem* 280(16): 16417-16426.
20. Bai, N., T. Kido, T. J. Kavanagh, J. D. Kaufman, M. E. Rosenfeld, C. van Breemen and S. F. van Eeden (2011). "Exposure to Diesel Exhaust Up-regulates iNOS Expression in ApoE Knockout Mice." *Toxicology and applied pharmacology* 255(2): 184-192.
21. Balasubramanian, P., L. Jagannathan, M. Subramanian, E. T. Gilbreath, P. S. MohanKumar and S. M. J. MohanKumar (2012). "High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats." *Journal of Neuroendocrinology* 24(5): 748-755.
22. Balligand, J. L., D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly and et al. (1994). "Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro." *J Biol Chem* 269(44): 27580-27588.
23. Barros, R., A. Moreira, J. Fonseca, P. Moreira, L. Fernandes, J. F. de Oliveira, L. Delgado and M. G. Castel-Branco (2006). "Obesity and airway inflammation in asthma." *J Allergy Clin Immunol* 117(6): 1501-1502.
24. Barros, R. P. and J. A. Gustafsson (2011). "Estrogen receptors and the metabolic network." *Cell Metab* 14(3): 289-299.
25. Barros, R. P., U. F. Machado and J. A. Gustafsson (2006). "Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus." *Trends Mol Med* 12(9): 425-431.
26. Bastie, C. C., T. Hajri, V. A. Drover, P. A. Grimaldi and N. A. Abumrad (2004). "CD36 in myocytes channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness." *Diabetes* 53(9): 2209-2216.
27. Beggah, A. T., P. Jaunin and K. Geering (1997). "Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase." *J Biol Chem* 272(15): 10318-10326.
28. Bellacosa, A., C. C. Kumar, A. Di Cristofano and J. R. Testa (2005). "Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting." *Advances in Cancer Research*, Vol 94 94: 29-+.
29. Benzler, J., G. K. Ganjam, D. Pretz, R. Oelkrug, C. E. Koch, K. Legler, S. Stohr, C. Culmsee, L. M. Williams and A. Tups (2015). "Central inhibition of IKKbeta/NF-kappaB signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance." *Diabetes* 64(6): 2015-2027.
30. Bernardo, B. C., K. L. Weeks, L. Pretorius and J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." *Pharmacol Ther* 128(1): 191-227.
31. Bertorello, A. M. and A. I. Katz (1993). "Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms." *Am J Physiol* 265(6 Pt 2): F743-755.

## 7. Literatura

32. Bharadwaj, K. G., Y. Hiyama, Y. Hu, L. A. Huggins, R. Ramakrishnan, N. A. Abumrad, G. I. Shulman, W. S. Blaner and I. J. Goldberg (2010). "Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake." *J Biol Chem* 285(49): 37976-37986.
33. Bian, K., M. F. Doursout and F. Murad (2008). "Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases." *J Clin Hypertens (Greenwich)* 10(4): 304-310.
34. Bishop, A. and J. E. Anderson (2005). "NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological." *Toxicology* 208(2): 193-205.
35. Blanco, G. and R. W. Mercer (1998). "Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function." *Am J Physiol* 275(5 Pt 2): F633-650.
36. Blaustein, M. P. (1977). "Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis." *Am J Physiol* 232(5): C165-173.
37. Blaustein, M. P. (1993). "Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness." *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1367-1387.
38. Boerrigter, G. and J. C. Burnett, Jr. (2007). "Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease." *Cardiovasc Drug Rev* 25(1): 30-45.
39. Bogardus, C., S. Lillioja, D. M. Mott, C. Hollenbeck and G. Reaven (1985). "Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man." *Am J Physiol* 248(3 Pt 1): E286-291.
40. Bogdan, C., M. Rollinghoff and A. Diefenbach (2000). "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." *Curr Opin Immunol* 12(1): 64-76.
41. Bogle, R. G., A. R. Baydoun, J. D. Pearson, S. Moncada and G. E. Mann (1992). "L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide." *Biochem J* 284 ( Pt 1): 15-18.
42. Boku, S., S. Nakagawa, H. Toda, A. Kato, N. Takamura, Y. Omiya, T. Inoue and T. Koyama (2013). "ROCK2 regulates bFGF-induced proliferation of SH-SY5Y cells through GSK-3beta and beta-catenin pathway." *Brain Res* 1492: 7-17.
43. Bolego, C., A. Cignarella, P. Sanvito, V. Pelosi, F. Pellegatta, L. Puglisi and C. Pinna (2005). "The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor-alpha agonists and is abolished by estrogen deprivation." *J Pharmacol Exp Ther* 313(3): 1203-1208.
44. Bonadonna, R. C., L. Groop, N. Kraemer, E. Ferrannini, S. Del Prato and R. A. DeFronzo (1990). "Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study." *Metabolism* 39(5): 452-459.
45. Bonen, A., J. J. Luiken, Y. Arumugam, J. F. Glatz and N. N. Tandon (2000). "Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase." *J Biol Chem* 275(19): 14501-14508.
46. Bonvalet, J. P. (1998). "Regulation of sodium transport by steroid hormones." *Kidney Int Suppl* 65: S49-56.
47. Boulkroun, S., M. Fay, M. C. Zennaro, B. Escoubet, F. Jaisser, M. Blot-Chabaud, N. Farman and N. Courtois-Coutry (2002). "Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene." *J Biol Chem* 277(35): 31506-31515.
48. Boulkroun, S., C. Le Moellic, M. Blot-Chabaud, N. Farman and N. Courtois-Coutry (2005). "Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct." *Pflugers Arch* 451(2): 388-394.
49. Brady, A. J., J. B. Warren, P. A. Poole-Wilson, T. J. Williams and S. E. Harding (1993). "Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction." *Am J Physiol* 265(1 Pt 2): H176-182.
50. Bray, G. A. and Y. Yukimura (1978). "Activity of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase in the liver of animals with experimental obesity." *Life Sci* 22(18): 1637-1642.
51. Brewer, P. D., E. N. Habtemichael, I. Romenskaia, C. C. Mastick and A. C. Coster (2014). "Insulin-regulated Glut4 translocation: membrane protein trafficking with six distinctive steps." *J Biol Chem* 289(25): 17280-17298.

## 7. Literatura

52. Brown, L., I. Hoong and S. A. Doggrell (2000). "The heart as a target for oestrogens." *Heart Lung Circ* 9(3): 113-125.
53. Bryan, B. A., E. Dennstedt, D. C. Mitchell, T. E. Walshe, K. Noma, R. Loureiro, M. Saint-Geniez, J. P. Campaigniac, J. K. Liao and P. A. D'Amore (2010). "RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis." *Faseb j* 24(9): 3186-3195.
54. Buettner, R., J. Scholmerich and L. C. Bollheimer (2007). "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents." *Obesity (Silver Spring)* 15(4): 798-808.
55. Burger, H. G., E. C. Dudley, J. L. Hopper, N. Groome, J. R. Guthrie, A. Green and L. Dennerstein (1999). "Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women." *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 4025-4030.
56. Canfield, V. A., B. Loppin, B. Thisse, C. Thisse, J. H. Postlethwait, M. A. Mohideen, S. J. Rajarao and R. Levenson (2002). "Na,K-ATPase alpha and beta subunit genes exhibit unique expression patterns during zebrafish embryogenesis." *Mech Dev* 116(1-2): 51-59.
57. Cao, J., K. Sodhi, N. Puri, S. R. Monu, R. Rezzani and N. G. Abraham (2011). "High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase-adiponectin axis." *Diabetology & Metabolic Syndrome* 3: 37-37.
58. Cao, J. J. and B. R. Gregoire (2016). "A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice." *Nutr Res* 36(4): 320-327.
59. Carley, A. N. and D. L. Severson (2005). "Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts." *Biochim Biophys Acta* 1734(2): 112-126.
60. Carlsen, H., F. Haugen, S. Zadelaar, R. Kleemann, T. Kooistra, C. A. Drevon and R. Blomhoff (2009). "Diet-induced obesity increases NF- $\kappa$ B signaling in reporter mice." *Genes & Nutrition* 4(3): 215-222.
61. Chang, J., M. Xie, V. R. Shah, M. D. Schneider, M. L. Entman, L. Wei and R. J. Schwartz (2006). "Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39): 14495-14500.
62. Chang, L. C. and J. P. Wang (2001). "Signal transduction pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase by arachidonic acid in rat neutrophils." *J Leukoc Biol* 69(4): 659-665.
63. Charbonneau, A. and A. Marette (2010). "Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins." *Diabetes* 59(4): 861-871.
64. Chen, H. W., C. T. Chien, S. L. Yu, Y. T. Lee and W. J. Chen (2002). "Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70." *Br J Pharmacol* 137(6): 771-781.
65. Chen, J., Q. Li, R. Dong, H. Gao, H. U. I. Peng and Y. Wu (2014). "The effect of the Ras homolog gene family (Rho), member A/Rho associated coiled-coil forming protein kinase pathway in atrial fibrosis of type 2 diabetes in rats." *Experimental and Therapeutic Medicine* 8(3): 836-840.
66. Cheng DY, F. C., Kadowitz PJ, and Gruetter CA. (1994). "Effects of 17 $\beta$ -estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta." *Life Sci* 55.
67. Chitale, K., D. Weber and R. C. Webb (2001). "RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension." *Curr Hypertens Rep* 3(2): 139-144.
68. Choi, J. W., S. H. Pai, S. K. Kim, M. Ito, C. S. Park and Y. N. Cha (2001). "Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese humans." *Clin Chem* 47(6): 1106-1109.
69. Christoffersen, C., E. Bollano, M. L. Lindegaard, E. D. Bartels, J. P. Goetze, C. B. Andersen and L. B. Nielsen (2003). "Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice." *Endocrinology* 144(8): 3483-3490.

## 7. Literatura

70. Chun, K. H., K. Araki, Y. Jee, D. H. Lee, B. C. Oh, H. Huang, K. S. Park, S. W. Lee, J. M. Zabolotny and Y. B. Kim (2012). "Regulation of glucose transport by ROCK1 differs from that of ROCK2 and is controlled by actin polymerization." *Endocrinology* 153(4): 1649-1662.
71. Cignarella, A., C. Bolego, V. Pelosi, C. Meda, A. Krust, C. Pinna, R. M. Gaion, E. Vegeto and A. Maggi (2009). "Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes." *J Pharmacol Exp Ther* 328(1): 174-182.
72. Cignarella, A., C. Bolego, V. Pelosi, C. Meda, A. Krust, C. Pinna, R. M. Gaion, E. Vegeto and A. Maggi (2009). "Distinct Roles of Estrogen Receptor- $\alpha$  and  $\beta$  in the Modulation of Vascular Inducible Nitric-Oxide Synthase in Diabetes." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328(1): 174-182.
73. Cignarella, A., C. Minici, C. Bolego, C. Pinna, P. Sanvito, R. M. Gaion and L. Puglisi (2006). "Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16(5): 322-329.
74. Clausen, M. V., F. Hilbers and H. Poulsen (2017). "The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease." *Frontiers in physiology* 8: 371-371.
75. Clausen, T. (2003). "Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pump Regulation and Skeletal Muscle Contractility." *Physiological Reviews* 83(4): 1269-1324.
76. Clausen, T. and O. B. Nielsen (1994). "The Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-pump and muscle contractility." *Acta Physiol Scand* 152(4): 365-373.
77. Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer and et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* 334(5): 292-295.
78. Coort, S. L., D. M. Hasselbaink, D. P. Koonen, J. Willems, W. A. Coumans, A. Chabowski, G. J. van der Vusse, A. Bonen, J. F. Glatz and J. J. Luiken (2004). "Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats." *Diabetes* 53(7): 1655-1663.
79. Correll, R. N., P. Eder, A. R. Burr, S. Despa, J. Davis, D. M. Bers and J. D. Molkentin (2014). "Overexpression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha2 but not alpha1 isoform attenuates pathological cardiac hypertrophy and remodeling." *Circ Res* 114(2): 249-256.
80. Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" *Endocr Rev* 20(3): 358-417.
81. Couse, J. F., J. Lindzey, K. Grandien, J. A. Gustafsson and K. S. Korach (1997). "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse." *Endocrinology* 138(11): 4613-4621.
82. Crambert, G., U. Hasler, A. T. Beggah, C. Yu, N. N. Modyanov, J. D. Horisberger, L. Lelievre and K. Geering (2000). "Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes." *J Biol Chem* 275(3): 1976-1986.
83. Craparo, A., R. Freund and T. A. Gustafson (1997). "14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner." *J Biol Chem* 272(17): 11663-11669.
84. Darblade, B., C. Pendaries, A. Krust, S. Dupont, M. J. Fouque, J. Rami, P. Chambon, F. Bayard and J. F. Arnal (2002). "Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor." *Circ Res* 90(4): 413-419.
85. Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." *Circulation* 109(23 Suppl 1): III27-32.
86. De Meyts, P. (2000). *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. Endotext. L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan et al. South Dartmouth (MA).



## 7. Literatura

87. De Pergola, G., S. Maldera, M. Tartagni, N. Pannacciulli, G. Loverro and R. Giorgino (2006). "Inhibitory effect of obesity on gonadotropin, estradiol, and inhibin B levels in fertile women." *Obesity (Silver Spring)* 14(11): 1954-1960.
88. De Pergola, G. and F. Silvestris (2013). "Obesity as a Major Risk Factor for Cancer." *Journal of Obesity* 2013: 291546.
89. Deng, Y., L. Yao, L. Chau, S. S. Ng, Y. Peng, X. Liu, W. S. Au, J. Wang, F. Li, S. Ji, H. Han, X. Nie, Q. Li, H. F. Kung, S. Y. Leung and M. C. Lin (2003). "N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation." *Int J Cancer* 106(3): 342-347.
90. Desjardins, F. and J. L. Balligand (2006). "Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease." *Acta Clin Belg* 61(6): 326-334.
91. Dey, D., D. Basu, S. S. Roy, A. Bandyopadhyay and S. Bhattacharya (2006). "Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling." *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2): 60-64.
92. Dias, F. M. V., R. F. Ribeiro Júnior, A. A. Fernandes, J. Fiorim, T. C. F. Travaglia, D. V. Vassallo and I. Stefanon (2014). "Na(+)/K(+)-ATPase Activity and K(+) Channels Differently Contribute to Vascular Relaxation in Male and Female Rats." *PLoS ONE* 9(9): e106345.
93. Dobutovic, B., K. Smiljanic, S. Soskic, H.-D. Dungen and E. R. Isenovic (2011). "Nitric Oxide and its Role in Cardiovascular Diseases." *The Open Nitric Oxide Journal* 3: 65-71.
94. Dostanic-Larson, I., J. N. Lorenz, J. W. Van Huysse, J. C. Neumann, A. E. Moseley and J. B. Lingrel (2006). "Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(3): R524-528.
95. Draznin, B. (2006). "Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 $\alpha$ ." *The Two Sides of a Coin* 55(8): 2392-2397.
96. Dresner, A., D. Laurent, M. Marcucci, M. E. Griffin, S. Dufour, G. W. Cline, L. A. Slezak, D. K. Andersen, R. S. Hundal, D. L. Rothman, K. F. Petersen and G. I. Shulman (1999). "Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Clin Invest* 103(2): 253-259.
97. Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." *Reprod Biol Endocrinol* 4: 16.
98. Duggal, P. S., K. H. Van Der Hoek, C. R. Milner, N. K. Ryan, D. T. Armstrong, D. A. Magoffin and R. J. Norman (2000). "The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat." *Endocrinology* 141(6): 1971-1976.
99. Duncombe, W. G. (1964). "THE COLORIMETRIC MICRO-DETERMINATION OF NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS IN PLASMA." *Clin Chim Acta* 9: 122-125.
100. Dzurba, A., A. Ziegelhoffer, N. Vrbjar, J. Styk and J. Slezak (1997). "Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma." *Mol Cell Biochem* 176(1-2): 113-118.
101. Earle, K. A., D. Harry, M. Madhavi, K. Zitouni and J. Barron (2009). "Nitric Oxide Bioavailability and Its Potential Relevance to the Variation in Susceptibility to the Renal and Vascular Complications in Patients With Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 32(1): 138-140.
102. Efendiev, R., K. Das-Panja, A. R. Cinelli, A. M. Bertorello and C. H. Pedemonte (2007). "Localization of intracellular compartments that exchange Na,K-ATPase molecules with the plasma membrane in a hormone-dependent manner." *Br J Pharmacol* 151(7): 1006-1013.
103. El Mernissi, G. and A. Doucet (1984). "Quantitation of [<sup>3</sup>H]ouabain binding and turnover of Na-K-ATPase along the rabbit nephron." *Am J Physiol* 247(1 Pt 2): F158-167.
104. Ellerhorst, J. A., S. Ekmekcioglu, M. K. Johnson, C. P. Cooke, M. M. Johnson and E. A. Grimm (2006). "Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma." *Oncogene* 25(28): 3956-3962.

## 7. Literatura

105. Estrany, M., P. A. M., G. Magdalena and L. Isabel (2013). "High-fat diet feeding induces sex-dependent changes in inflammatory and insulin sensitivity profiles of rat adipose tissue." *Cell Biochemistry and Function* 31(6): 504-510.
106. Ewart, H. S. and A. Klip (1995). "Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity." *Am J Physiol* 269(2 Pt 1): C295-311.
107. Favero, G., C. Paganelli, B. Buffoli, L. F. Rodella and R. Rezzani (2014). "Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention." *BioMed Research International* 2014: 801896.
108. Fekete, A., A. Vannay, A. Ver, B. Vasarhelyi, V. Muller, N. Ouyang, G. Reusz, T. Tulassay and A. J. Szabo (2004). "Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney." *J Physiol* 555(Pt 2): 471-480.
109. Ferrari, R. (1999). "The role of TNF in cardiovascular disease." *Pharmacol Res* 40(2): 97-105.
110. Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton, Jr. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." *Mol Endocrinol* 14(10): 1649-1660.
111. Fillmore, N., J. Mori and G. D. Lopaschuk (2014). "Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy." *Br J Pharmacol* 171(8): 2080-2090.
112. Finck, B. N., X. Han, M. Courtois, F. Aimond, J. M. Nerbonne, A. Kovacs, R. W. Gross and D. P. Kelly (2003). "A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 1226-1231.
113. Fischer, Y., J. Thomas, L. Sevilla, P. Munoz, C. Becker, G. Holman, I. J. Kozka, M. Palacin, X. Testar, H. Kammermeier and A. Zorzano (1997). "Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations." *J Biol Chem* 272(11): 7085-7092.
114. Flammer, A. J. and T. F. Luscher (2010). "Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases." *Swiss Med Wkly* 140: w13122.
115. Flynn, N. E., C. J. Meininger, T. E. Haynes and G. Wu (2002). "The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy." *Biomed Pharmacother* 56(9): 427-438.
116. Foletta, V. C., M. J. Prior, N. Stupka, K. Carey, D. H. Segal, S. Jones, C. Swinton, S. Martin, D. Cameron-Smith and K. R. Walder (2009). "NDRG2, a novel regulator of myoblast proliferation, is regulated by anabolic and catabolic factors." *J Physiol* 587(Pt 7): 1619-1634.
117. Forst, T., D. D. De La Tour, T. Kunt, A. Pfutzner, K. Goitom, T. Pohlmann, S. Schneider, B. L. Johansson, J. Wahren, M. Lobig, M. Engelbach, J. Beyer and P. Vague (2000). "Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in diabetes mellitus type I." *Clin Sci (Lond)* 98(3): 283-290.
118. Forstermann, U. (2010). "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease." *Pflugers Arch* 459(6): 923-939.
119. Fozzard, H. A. and M. F. Sheets (1985). "Cellular mechanism of action of cardiac glycosides." *J Am Coll Cardiol* 5(5 Suppl A): 10A-15A.
120. Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley and A. Toker (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science* 275(5300): 665-668.
121. Freeman, E. W., M. D. Sammel, H. Lin and C. R. Gracia (2010). "Obesity and Reproductive Hormone Levels in the Transition to Menopause." *Menopause (New York, N.Y.)* 17(4): 718-726.
122. Fujimoto, M., N. Shimizu, K. Kunii, J. A. Martyn, K. Ueki and M. Kaneki (2005). "A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice." *Diabetes* 54(5): 1340-1348.

## 7. Literatura

123. Fuller, W., L. B. Tulloch, M. J. Shattock, S. C. Calaghan, J. Howie and K. J. Wypijewski (2013). "Regulation of the cardiac sodium pump." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(8): 1357-1380.
124. Furukawa, N., P. Ongusaha, W. J. Jahng, K. Araki, C. S. Choi, H. J. Kim, Y. H. Lee, K. Kaibuchi, B. B. Kahn, H. Masuzaki, J. K. Kim, S. W. Lee and Y. B. Kim (2005). "Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis." *Cell Metab* 2(2): 119-129.
125. Gabrielli, L., J. L. Winter, I. Godoy, P. McNab, I. Padilla, S. Cordova, P. Rigotti, U. Novoa, I. Mora, L. Garcia, M. P. Ocaranza and J. E. Jalil (2014). "Increased rho-kinase activity in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy." *Am J Hypertens* 27(6): 838-845.
126. Galuska, D., O. Kotova, R. Barres, D. Chibalina, B. Benziane and A. V. Chibalin (2009). "Altered expression and insulin-induced trafficking of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1): E38-49.
127. Galuska, D., O. Kotova, R. Barrès, D. Chibalina, B. Benziane and A. V. Chibalin (2009). "Altered expression and insulin-induced trafficking of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise." *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 297(1): E38-E49.
128. Gamble, J. and G. D. Lopaschuk (1994). "Glycolysis and glucose oxidation during reperfusion of ischemic hearts from diabetic rats." *Biochim Biophys Acta* 1225(2): 191-199.
129. Garaulet, M., F. Perex-Llamas, T. Fuente, S. Zamora and F. J. Tebar (2000). "Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones." *Eur J Endocrinol* 143(5): 657-666.
130. Garaulet, M., F. Perez-Llamas, J. C. Baraza, M. D. Garcia-Prieto, P. S. Fardy, F. J. Tebar and S. Zamora (2002). "Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables." *J Nutr Health Aging* 6(2): 123-126.
131. Garty, H. and S. J. Karlish (2006). "Role of FXD proteins in ion transport." *Annu Rev Physiol* 68: 431-459.
132. Gealekman, O., Z. Abassi, I. Rubinstein, J. Winaver and O. Binah (2002). "Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure." *Circulation* 105(2): 236-243.
133. Geer, E. B. and W. Shen (2009). "Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance." *Gend Med* 6 Suppl 1: 60-75.
134. Ghafourifar, P., U. Schenk, S. D. Klein and C. Richter (1999). "Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation." *J Biol Chem* 274(44): 31185-31188.
135. Ghisletti, S., C. Meda, A. Maggi and E. Vegeto (2005). "17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization." *Mol Cell Biol* 25(8): 2957-2968.
136. Glatz, J. F., Y. Angin, L. K. Steinbusch, R. W. Schwenk and J. J. Luiken (2013). "CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88(1): 71-77.
137. Glatz, J. F. C., Y. Angin, L. K. M. Steinbusch, R. W. Schwenk and J. J. F. P. Luiken (2013). "CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 88(1): 71-77.
138. Godfrey, K. M. and D. J. Barker (2000). "Fetal nutrition and adult disease." *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl): 1344S-1352S.
139. Goncalves, G. K., T. H. C. de Oliveira and N. de Oliveira Belo (2017). "Cardiac Hypertrophy and Brain Natriuretic Peptide Levels in an Ovariectomized Rat Model Fed a High-Fat Diet." *Medical Science Monitor Basic Research* 23: 380-391.

## 7. Literatura

140. Goodpaster, B. H., S. Krishnaswami, T. B. Harris, A. Katsiaras, S. B. Kritchevsky, E. M. Simonsick, M. Nevitt, P. Holvoet and A. B. Newman (2005). "Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women." *Arch Intern Med* 165(7): 777-783.
141. Gorres, B. K., G. L. Bomhoff, A. A. Gupte and P. C. Geiger (2011). "Altered estrogen receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue of female rats fed a high-fat diet." *J Appl Physiol* (1985) 110(4): 1046-1053.
142. Gradman, A. H. and F. Alfayoumi (2006). "From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease." *Prog Cardiovasc Dis* 48(5): 326-341.
143. Grujic, V., N. Dragic, I. Radic, S. Harhaji and S. Susnjec (2010). "Overweight and obesity among adults in Serbia: results from the National Health Survey." *Eat Weight Disord* 15(1-2): e34-42.
144. Guernsey, D. L. and W. K. Morishige (1979). "Na<sup>+</sup> pump activity and nuclear T3 receptors in tissues of genetically obese (ob/ob) mice." *Metabolism* 28(6): 629-632.
145. Guo, H., Y. Zhang, D. A. Brockman, W. Hahn, D. A. Bernlohr and X. Chen (2012). "Lipocalin 2 deficiency alters estradiol production and estrogen receptor signaling in female mice." *Endocrinology* 153(3): 1183-1193.
146. Guoyao, W. (2013 ). *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*, Taylor & Francis Group
147. Gwinn, M. R. and V. Vallyathan (2006). "Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9(1): 27-39.
148. Hammes, S. R. and E. R. Levin (2007). "Extranuclear steroid receptors: nature and actions." *Endocr Rev* 28(7): 726-741.
149. Harada, N. (1999). "Aromatase and intracrinology of estrogen in hormone-dependent tumors." *Oncology* 57 Suppl 2: 7-16.
150. Hardy, O. T., M. P. Czech and S. Corvera (2012). "What causes the insulin resistance underlying obesity?" *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 19(2): 81-87.
151. Hare, J. M. and J. S. Stamler (1999). "NOS: modulator, not mediator of cardiac performance." *Nat Med* 5(3): 273-274.
152. Hassouna, R., P. Zizzari and V. Tolle (2010). "The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake." *J Neuroendocrinol* 22(7): 793-804.
153. Hattori, Y., S. Hattori and K. Kasai (2003). "Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation." *Eur J Pharmacol* 481(2-3): 153-158.
154. Haywood, G. A., P. S. Tsao, H. E. von der Leyen, M. J. Mann, P. J. Keeling, P. T. Trindade, N. P. Lewis, C. D. Byrne, P. R. Rickenbacher, N. H. Bishopric, J. P. Cooke, W. J. McKenna and M. B. Fowler (1996). "Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure." *Circulation* 93(6): 1087-1094.
155. Heine, P. A., J. A. Taylor, G. A. Iwamoto, D. B. Lubahn and P. S. Cooke (2000). "Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12729-12734.
156. Heneka, M. T., P. A. Loschmann, M. Gleichmann, M. Weller, J. B. Schulz, U. Wullner and T. Klockgether (1998). "Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide." *J Neurochem* 71(1): 88-94.
157. Herrera, V. L., A. V. Chobanian and N. Ruiz-Opazo (1988). "Isoform-specific modulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene expression in hypertension." *Science* 241(4862): 221-223.
158. Hevener, A., D. Reichart, A. Janez and J. Olefsky (2002). "Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance." *Diabetes* 51(6): 1907-1912.

## 7. Literatura

159. Hewitt, K. N., K. Pratis, M. E. Jones and E. R. Simpson (2004). "Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse." *Endocrinology* 145(4): 1842-1848.
160. Hilakivi-Clarke, L., A. Stoica, M. Raygada and M. B. Martin (1998). "Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring." *Cancer Res* 58(4): 654-660.
161. Hill-Eubanks, D. C., M. E. Werner, T. J. Heppner and M. T. Nelson (2011). "Calcium Signaling in Smooth Muscle." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(9): a004549.
162. Hirota, J., R. Usui, T. Oyamada and S. Ikemoto (1995). "The phenotypes and gene frequencies of genetic markers in the blood of Japanese crossbred cats." *J Vet Med Sci* 57(2): 381-383.
163. Hobbs, A. J. (1997). "Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling." *Trends Pharmacol Sci* 18(12): 484-491.
164. Hodgin, J. B., J. H. Krege, R. L. Reddick, K. S. Korach, O. Smithies and N. Maeda (2001). "Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe<sup>-/-</sup> mice." *J Clin Invest* 107(3): 333-340.
165. Holland, W. L., T. A. Knotts, J. A. Chavez, L. P. Wang, K. L. Hoehn and S. A. Summers (2007). "Lipid mediators of insulin resistance." *Nutr Rev* 65(6 Pt 2): S39-46.
166. Hong, J., R. E. Stubbins, R. R. Smith, A. E. Harvey and N. P. Núñez (2009). "Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice." *Nutrition Journal* 8: 11-11.
167. Horard, B. and J. M. Vanacker (2003). "Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand." *J Mol Endocrinol* 31(3): 349-357.
168. Hossen, M. J., J. Y. Cho and D. Kim (2016). "PDK1 in NF-kappaB signaling is a target of *Xanthium strumarium* methanolic extract-mediated anti-inflammatory activities." *J Ethnopharmacol* 190: 251-260.
169. Hou, C. H., J. Lin, S. C. Huang, S. M. Hou and C. H. Tang (2009). "Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts." *J Cell Physiol* 220(1): 196-203.
170. Houston, N., E. D. Rosen and E. S. Lander (2006). "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance." *Nature* 440(7086): 944-948.
171. Hsieh, H.-J., C.-A. Liu, B. Huang, A. H. Tseng and D. L. Wang (2014). "Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications." *Journal of Biomedical Science* 21(1): 1-15.
172. Hu, X. L., X. P. Liu, Y. C. Deng, S. X. Lin, L. Wu, J. Zhang, L. F. Wang, X. B. Wang, X. Li, L. Shen, Y. Q. Zhang and L. B. Yao (2006). "Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues." *Cell Tissue Res* 325(1): 67-76.
173. Huang, A., D. Sun, A. Koller and G. Kaley (1997). "Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO." *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): H1804-1809.
174. Huang, W. H., S. S. Kakar and A. Askari (1985). "Mechanisms of detergent effects on membrane-bound (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase." *J Biol Chem* 260(12): 7356-7361.
175. Hundal, H. S., A. Marette, Y. Mitsumoto, T. Ramlal, R. Blostein and A. Klip (1992). "Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle." *J Biol Chem* 267(8): 5040-5043.
176. Hunter, S. J. and W. T. Garvey (1998). "Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system." *Am J Med* 105(4): 331-345.

## 7. Literatura

177. Hwang, C. J., H. M. Yun, K. R. Park, J. K. Song, H. O. Seo, B. K. Hyun, D. Y. Choi, H. S. Yoo, K. W. Oh, D. Y. Hwang, S. B. Han and J. T. Hong (2015). "Memory Impairment in Estrogen Receptor alpha Knockout Mice Through Accumulation of Amyloid-beta Peptides." *Mol Neurobiol* 52(1): 176-186.
178. Iannello, S., P. Milazzo and F. Belfiore (2007a). "Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects." *Obes Rev* 8(3): 231-251.
179. Iannello, S., P. Milazzo and F. Belfiore (2007b). "Animal and human tissue Na,K-ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation." *Am J Med Sci* 333(1): 1-9.
180. Isenovic, E., M. F. Walsh, R. Muniyappa, M. Bard, C. A. Diglio and J. R. Sowers (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase may mediate isoproterenol-induced vascular relaxation in part through nitric oxide production." *Metabolism* 51(3): 380-386.
181. Isenovic, E. R., A. Divald, N. Milivojevic, T. Grgurevic, S. E. Fisher and J. R. Sowers (2003). "Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells." *Metabolism* 52(4): 482-487.
182. Isenovic, E. R., M. Fretaud, G. Koricanac, E. Sudar, J. Velebit, B. Dobutovic and P. Marche (2009). "Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117(5): 214-219.
183. Isenovic, E. R., D. B. Jacobs, M. H. Kedees, Q. Sha, N. Milivojevic, K. Kawakami, G. Gick and J. R. Sowers (2004). "Angiotensin II regulation of the Na<sup>+</sup> pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells." *Endocrinology* 145(3): 1151-1160.
184. Isenovic, E. R., Y. Meng, A. Divald, N. Milivojevic and J. R. Sowers (2002). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in angiotensin II and insulin-like growth factor-1 modulation of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells." *Endocrine* 19(3): 287-292.
185. Isenovic, E. R., Y. Meng, N. Jamali, N. Milivojevic and J. R. Sowers (2004). "Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells." *Int J Mol Med* 13(6): 915-922.
186. Iwamoto, T. and S. Kita (2006). "Hypertension, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase." *Kidney Int* 69(12): 2148-2154.
187. Jeppesen, J., T. W. Hansen, S. Rasmussen, H. Ibsen, C. Torp-Pedersen and S. Madsbad (2007). "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease: a population-based study." *J Am Coll Cardiol* 49(21): 2112-2119.
188. Jewell, E. A. and J. B. Lingrel (1991). "Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells." *J Biol Chem* 266(25): 16925-16930.
189. Joost, H.-G. and M. H. Tschöp (2007). "NO to Obesity: Does Nitric Oxide Regulate Fat Oxidation and Insulin Sensitivity?" *Endocrinology* 148(10): 4545-4547.
190. Jorgensen, J. R. and P. A. Pedersen (2001). "Role of phylogenetically conserved amino acids in folding of Na,K-ATPase." *Biochemistry* 40(24): 7301-7308.
191. Jorgensen, P. L. and J. P. Andersen (1988). "Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins." *J Membr Biol* 103(2): 95-120.
192. Jorgensen, P. L., K.O. Hakansson, and S.J. Karlish (2003). "Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions." *Annu Rev Physiol*, 65: p. 817-849.
193. Kalaitzidis, D. and T. D. Gilmore (2005). "Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB." *Trends Endocrinol Metab* 16(2): 46-52.
194. Kalaji, R., A. P. Wheeler, J. C. Erasmus, S. Y. Lee, R. G. Endres, L. P. Cramer and V. M. Braga (2012). "ROCK1 and ROCK2 regulate epithelial polarisation and geometric cell shape." *Biol Cell* 104(8): 435-451.

## 7. Literatura

195. Kaplan, J. H. (2002). "Biochemistry of Na,K-ATPase." *Annu Rev Biochem* 71: 511-535.
196. Karelis, A. D., D. H. St-Pierre, F. Conus, R. Rabasa-Lhoret and E. T. Poehlman (2004). "Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know?" *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2569-2575.
197. Katz, A. I. and F. H. Epstein (1967). "The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney." *J Clin Invest* 46(12): 1999-2011.
198. Kelly, D. P. and A. W. Strauss (1994). "Inherited cardiomyopathies." *N Engl J Med* 330(13): 913-919.
199. Kelly, R. A., D. S. O'Hara, W. E. Mitch and T. W. Smith (1986). "Identification of NaK-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acids and lysophospholipids." *J Biol Chem* 261(25): 11704-11711.
200. Kim, H. J., T. Higashimori, S. Y. Park, H. Choi, J. Dong, Y. J. Kim, H. L. Noh, Y. R. Cho, G. Cline, Y. B. Kim and J. K. Kim (2004). "Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo." *Diabetes* 53(4): 1060-1067.
201. Kim, J. W. and C. Kim (2005). "Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB." *Biochem Pharmacol* 70(9): 1352-1360.
202. Kim, J. Y., K. J. Jo, B. J. Kim, H. W. Baik and S. K. Lee (2012). "17beta-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes." *Int J Mol Med* 30(4): 979-985.
203. Kim, S. and H. Iwao (2000). "Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases." *Pharmacol Rev* 52(1): 11-34.
204. Kishi, T., Y. Hirooka, A. Masumoto, K. Ito, Y. Kimura, K. Inokuchi, T. Tagawa, H. Shimokawa, A. Takeshita and K. Sunagawa (2005). "Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure." *Circulation* 111(21): 2741-2747.
205. Kjeldsen, K. (2003). "Myocardial Na,K-ATPase: Clinical aspects." *Experimental & Clinical Cardiology* 8(3): 131-133.
206. Klitgaard, H. and T. Clausen (1989). "Increased total concentration of Na-K pumps in vastus lateralis muscle of old trained human subjects." *J Appl Physiol* 67(6): 2491-2494.
207. Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem J* 298 (Pt 2): 249-258.
208. Kojima, M. and K. Kangawa (2005). "Ghrelin: structure and function." *Physiol Rev* 85(2): 495-522.
209. Kolavennu, V., L. Zeng, H. Peng, Y. Wang and F. R. Danesh (2008). "Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control." *Diabetes* 57(3): 714-723.
210. Kolterman, O. G., R. S. Gray, J. Griffin, P. Burstein, J. Insel, J. A. Scarlett and J. M. Olefsky (1981). "Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* 68(4): 957-969.
211. Korda, M., R. Kubant, S. Patton and T. Malinski (2008). "Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4): H1514-1521.
212. Kumar, A., A. Banerjee, D. Singh, G. Thakur, N. Kasarpalkar, S. Gavali, S. Gadkar, T. Madan, S. D. Mahale, N. H. Balasiner and G. Sachdeva (2018). "Estradiol: A Steroid with Multiple Facets." *Horm Metab Res* 50(5): 359-374.
213. Kumar, R., Q. C. Yong and C. M. Thomas (2013). "Do Multiple Nuclear Factor Kappa B Activation Mechanisms Explain Its Varied Effects in the Heart?" *The Ochsner Journal* 13(1): 157-165.

## 7. Literatura

214. Kumashiro, N., Y. Tamura, T. Uchida, T. Ogihara, Y. Fujitani, T. Hirose, H. Mochizuki, R. Kawamori and H. Watada (2008). "Impact of Oxidative Stress and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  in Hepatic Insulin Resistance." *Diabetes* 57(8): 2083-2091.
215. Kushner, P. J., D. A. Agard, G. L. Greene, T. S. Scanlan, A. K. Shiau, R. M. Uht and P. Webb (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5): 311-317.
216. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
217. Lauterbach, M. A. R. and F. T. Wunderlich (2017). "Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance." *Pflugers Archiv* 469(3): 385-396.
218. Lee, J., Y. Xu, L. Lu, B. Bergman, J. W. Leitner, C. Greyson, B. Draznin and G. G. Schwartz (2010). "Multiple abnormalities of myocardial insulin signaling in a porcine model of diet-induced obesity." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 298(2): H310-H319.
219. Lee, S.-H., H. Huang, K. Choi, D. H. Lee, J. Shi, T. Liu, K. H. Chun, J. A. Seo, I. S. Lima, J. M. Zabolotny, L. Wei and Y.-B. Kim (2014). "ROCK1 isoform-specific deletion reveals a role for diet-induced insulin resistance." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 306(3): E332-E343.
220. Lehmann, E. D., K. D. Hopkins and R. G. Gosling (1996). "Increased aortic stiffness in women with NIDDM." *Diabetologia* 39(7): 870-871.
221. Li, D., G. Sweeney, Q. Wang and A. Klip (1999). "Participation of PI3K and atypical PKC in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump stimulation by IGF-I in VSMC." *Am J Physiol* 276(6 Pt 2): H2109-2116.
222. Li, Q., Y. Guo, Q. Ou, C. Cui, W.-J. Wu, W. Tan, X. Zhu, L. B. Lanceta, S. K. Sanganalmath, B. Dawn, K. Shinmura, G. D. Rokosh, S. Wang and R. Bolli (2009). "GENE TRANSFER OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE AFFORDS CARDIOPROTECTION BY UPREGULATING HEME OXYGENASE-1 VIA AN NF- $\kappa$ B-DEPENDENT PATHWAY." *Circulation* 120(13): 1222-1230.
223. Li, Y., J. Yang, S. Li, J. Zhang, J. Zheng, W. Hou, H. Zhao, Y. Guo, X. Liu, K. Dou, Z. Situ and L. Yao (2011). "N-myc Downstream-regulated Gene 2, a Novel Estrogen-targeted Gene, Is Involved in the Regulation of Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase." *The Journal of Biological Chemistry* 286(37): 32289-32299.
224. Li, Y., J. Yang, S. Li, J. Zhang, J. Zheng, W. Hou, H. Zhao, Y. Guo, X. Liu, K. Dou, Z. Situ and L. Yao (2011). "N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase." *J Biol Chem* 286(37): 32289-32299.
225. Lifshitz, Y., M. Lindzen, H. Garty and S. J. Karlish (2006). "Functional interactions of phospholemman (PLM) (FXYD1) with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Purification of alpha1/beta1/PLM complexes expressed in *Pichia pastoris*." *J Biol Chem* 281(23): 15790-15799.
226. Lingrel, J. B. and T. Kuntzweiler (1994). "Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase." *J Biol Chem* 269(31): 19659-19662.
227. Liu, B., A. S. Clanachan, R. Schulz and G. D. Lopaschuk (1996). "Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons." *Circ Res* 79(5): 940-948.
228. Liu, H.-Y., T. Hong, G.-B. Wen, J. Han, D. Zuo, Z. Liu and W. Cao (2009). "Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297(4): E898-E906.
229. Liu, J., J. Zhang, X. Wang, Y. Li, Y. Chen, K. Li, J. Zhang, L. Yao and G. Guo (2010). "HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells." *Exp Cell Res* 316(12): 1985-1993.
230. Liu, V. W. and P. L. Huang (2008). "Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice." *Cardiovasc Res* 77(1): 19-29.
231. Liu, W., A. Ruiz-Velasco, S. Wang, S. Khan, M. Zi, A. Jungmann, M. Dolores Camacho-Muñoz, J. Guo, G. Du, L. Xie, D. Oceandy, A. Nicolaou, G. Galli, O. J. Müller, E. J. Cartwright, Y. Ji and X.



## 7. Literatura

- Wang (2017). "Metabolic stress-induced cardiomyopathy is caused by mitochondrial dysfunction due to attenuated Erk5 signaling." *Nature Communications* 8(1): 494.
232. Lizcano, F. and G. Guzman (2014). "Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause." *Biomed Res Int* 2014: 757461.
233. Lopaschuk, G. D., C. D. Folmes and W. C. Stanley (2007). "Cardiac energy metabolism in obesity." *Circ Res* 101(4): 335-347.
234. Louet, J. F., C. LeMay and F. Mauvais-Jarvis (2004). "Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models." *Curr Atheroscler Rep* 6(3): 180-185.
235. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
236. Luiken, J. J., S. L. Coort, D. P. Koonen, D. J. van der Horst, A. Bonen, A. Zorzano and J. F. Glatz (2004). "Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters." *Pflugers Arch* 448(1): 1-15.
237. Luiken, J. J., S. L. Coort, J. Willems, W. A. Coumans, A. Bonen, G. J. van der Vusse and J. F. Glatz (2003). "Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling." *Diabetes* 52(7): 1627-1634.
238. Luiken, J. J., D. P. Koonen, J. Willems, A. Zorzano, C. Becker, Y. Fischer, N. N. Tandon, G. J. Van Der Vusse, A. Bonen and J. F. Glatz (2002). "Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36." *Diabetes* 51(10): 3113-3119.
239. Luiking, Y. C., M. M. Hallemeesch, W. H. Lamers and N. E. Deutz (2005). "The role of NOS2 and NOS3 in renal protein and arginine metabolism during early endotoxemia in mice." *Am J Physiol Renal Physiol* 288(4): F816-822.
240. Luscher, T. F. and P. M. Vanhoutte (1990). *The Endothelium*, Taylor & Francis.
241. Maas, A. H. and Y. E. Appelman (2010). "Gender differences in coronary heart disease." *Neth Heart J* 18(12): 598-602.
242. Manabe, I. (2011). "Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases." *Circ J* 75(12): 2739-2748.
243. Manrique, C., G. Lastra, J. Habibi, I. Mugerfeld, M. Garro and J. R. Sowers (2012). "Loss of Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling Leads to Insulin Resistance and Obesity in Young and Adult Female Mice." *Cardiorenal Medicine* 2(3): 200-210.
244. Manrique, C., G. Lastra, F. I. Ramirez-Perez, D. Haertling, V. G. DeMarco, A. R. Aroor, G. Jia, D. Chen, B. J. Barron, M. Garro, J. Padilla, L. A. Martinez-Lemus and J. R. Sowers (2016). "Endothelial Estrogen Receptor-alpha Does Not Protect Against Vascular Stiffness Induced by Western Diet in Female Mice." *Endocrinology* 157(4): 1590-1600.
245. Mariappan, N., C. M. Elks, S. Sriramula, A. Guggilam, Z. Liu, O. Borkhsenius and J. Francis (2010). "NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes." *Cardiovasc Res* 85(3): 473-483.
246. Marin-Garcia, J. and M. J. Goldenthal (2002). "Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review." *J Card Fail* 8(5): 347-361.
247. Marino, M., P. Galluzzo and P. Ascenzi (2006). "Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription." *Current Genomics* 7(8): 497-508.
248. Mayer, B. and B. Hemmens (1997). "Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells." *Trends Biochem Sci* 22(12): 477-481.
249. Mayer, B., A. Schrammel, P. Klatt, D. Koesling and K. Schmidt (1995). "Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation." *J Biol Chem* 270(29): 17355-17360.
250. Mazumder, P. K., B. T. O'Neill, M. W. Roberts, J. Buchanan, U. J. Yun, R. C. Cooksey, S. Boudina and E. D. Abel (2004). "Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts." *Diabetes* 53(9): 2366-2374.

## 7. Literatura

251. McArdle, M. A., O. M. Finucane, R. M. Connaughton, A. M. McMorrow and H. M. Roche (2013). "Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies." *Frontiers in Endocrinology* 4: 52.
252. McDonald, K. K., S. Zharikov, E. R. Block and M. S. Kilberg (1997). "A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox"." *J Biol Chem* 272(50): 31213-31216.
253. McFarlane, S. I., M. Banerji and J. R. Sowers (2001). "Insulin resistance and cardiovascular disease." *J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 713-718.
254. McMurray, F., D. A. Patten and M.-E. Harper (2016). "Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches." *Obesity* 24(11): 2301-2310.
255. Mead, J. F. (1984). "The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids." *J Lipid Res* 25(13): 1517-1521.
256. Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." *N Engl J Med* 340(23): 1801-1811.
257. Mendes Ribeiro, A. C., T. M. Brunini, J. C. Ellory and G. E. Mann (2001). "Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure." *Cardiovasc Res* 49(4): 697-712.
258. Mendoza-Hernandez, G., M. Calcagno, H. R. Sanchez-Nuncio and J. C. Diaz-Zagoya (1984). "Dehydroepiandrosterone is a substrate for estradiol 17 beta-dehydrogenase from human placenta." *Biochem Biophys Res Commun* 119(1): 83-87.
259. Messineo, F. C., M. Rathier, C. Favreau, J. Watras and H. Takenaka (1984). "Mechanisms of fatty acid effects on sarcoplasmic reticulum. III. The effects of palmitic and oleic acids on sarcoplasmic reticulum function--a model for fatty acid membrane interactions." *J Biol Chem* 259(2): 1336-1343.
260. Michea, L., V. Iribarra, I. A. Goecke and E. T. Marusic (2001). "Reduced Na-K pump but increased Na-K-2Cl cotransporter in aorta of streptozotocin-induced diabetic rat." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 280(2): H851-H858.
261. Mîinea, Cristinel P., H. Sano, S. Kane, E. Sano, M. Fukuda, J. Peränen, William S. Lane and Gustav E. Lienhard (2005). "AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain." *Biochemical Journal* 391(Pt 1): 87-93.
262. Momken, I., A. Chabowski, E. Dirxx, M. Nabben, S. S. Jain, J. T. McFarlan, J. F. Glatz, J. J. Luiken and A. Bonen (2017). "A new leptin-mediated mechanism for stimulating fatty acid oxidation: a pivotal role for sarcolemmal FAT/CD36." *Biochem J* 474(1): 149-162.
263. Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." *Faseb j* 9(13): 1319-1330.
264. Moncada, S. and E. A. Higgs (2006). "Nitric oxide and the vascular endothelium." *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1): 213-254.
265. Montessuit, C. and R. Lerch (2013). "Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes." *Biochim Biophys Acta* 1833(4): 848-856.
266. Moriarty, K., K. H. Kim and J. R. Bender (2006). "Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling." *Endocrinology* 147(12): 5557-5563.
267. Morisco, C., G. Lembo and B. Trimarco (2006). "Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology." *Trends Cardiovasc Med* 16(6): 183-188.
268. Morris, S. M., Jr. (2005). "Arginine metabolism in vascular biology and disease." *Vasc Med* 10 Suppl 1: S83-87.
269. Morris, S. M., Jr. and T. R. Billiar (1994). "New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis." *Am J Physiol* 266(6 Pt 1): E829-839.

## 7. Literatura

270. Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* 450(7172): 1043-1049.
271. Mukai, Y., H. Shimokawa, T. Matoba, T. Kandabashi, S. Satoh, J. Hiroki, K. Kaibuchi and A. Takeshita (2001). "Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension." *Faseb j* 15(6): 1062-1064.
272. Muller-Ehmsen, J., P. Juvvadi, C. B. Thompson, L. Tumyan, M. Croyle, J. B. Lingrel, R. H. Schwinger, A. A. McDonough and R. A. Farley (2001). "Ouabain and substrate affinities of human Na(+)-K(+)-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(4): C1355-1364.
273. Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart and M. Husain (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." *J Clin Invest* 109(6): 735-743.
274. Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart and M. Husain (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." *The Journal of Clinical Investigation* 109(6): 735-743.
275. Mungrue, I. N., M. Husain and D. J. Stewart (2002). "The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models." *Heart Fail Rev* 7(4): 407-422.
276. Murphy, E. (2011). "Estrogen signaling and cardiovascular disease." *Circ Res* 109(6): 687-696.
277. Myers, M. G., Jr., J. M. Backer, X. J. Sun, S. Shoelson, P. Hu, J. Schlessinger, M. Yoakim, B. Schaffhausen and M. F. White (1992). "IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10350-10354.
278. Nagareddy, P. R., H. Soliman, G. Lin, P. S. Rajput, U. Kumar, J. H. McNeill and K. M. MacLeod (2009). "Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible nitric oxide synthase-mediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats." *Diabetes* 58(10): 2355-2364.
279. Nakagawa, O., K. Fujisawa, T. Ishizaki, Y. Saito, K. Nakao and S. Narumiya (1996). "ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice." *FEBS Lett* 392(2): 189-193.
280. Napoli, C. and L. J. Ignarro (2009). "Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases." *Arch Pharm Res* 32(8): 1103-1108.
281. Naseem, K. M. (2005). "The role of nitric oxide in cardiovascular diseases." *Mol Aspects Med* 26(1-2): 33-65.
282. Negi, S., E. V. Kharshiing and R. Sharma (2011). "NO way!: Is nitric oxide level in tomato regulated by a mammalian IKK/NFκB-like signaling pathway?" *Plant Signaling & Behavior* 6(7): 1049-1052.
283. Nielsen, S., Z. Guo, C. M. Johnson, D. D. Hensrud and M. D. Jensen (2004). "Splanchnic lipolysis in human obesity." *J Clin Invest* 113(11): 1582-1588.
284. Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2002). "Biological role of estrogen and estrogen receptors." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37(1): 1-28.
285. Noboru, T. and O. Tomio (2013). "Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview." *The Journal of Clinical Pharmacology* 53(12): 1228-1239.
286. Nolan, J. J., B. Ludvik, J. Baloga, D. Reichart and J. M. Olefsky (1997). "Mechanisms of the kinetic defect in insulin action in obesity and NIDDM." *Diabetes* 46(6): 994-1000.
287. Noronha, B. T., J. M. Li, S. B. Wheatcroft, A. M. Shah and M. T. Kearney (2005). "Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity." *Diabetes* 54(4): 1082-1089.

## 7. Literatura

288. Nuedling, S., S. Kahlert, K. Loebbert, P. A. Doevendans, R. Meyer, H. Vetter and C. Grohé (1999). "17 $\beta$ -Estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo." *Cardiovascular Research* 43(3): 666-674.
289. Nuedling, S., R. H. Karas, M. E. Mendelsohn, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, R. Meyer, H. Vetter and C. Grohé (2001). "Activation of estrogen receptor  $\beta$  is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes." *FEBS Letters* 502(3): 103-108.
290. Nweze, I. C., J. W. Smith, B. Zhang, J. Lakshmanan, C. M. Klinge and B. G. Harbrecht (2012). "17 $\beta$ -ESTRADIOL ATTENUATES CYTOKINE-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION IN RAT HEPATOCYTE." *The journal of trauma and acute care surgery* 73(2): 408-412.
291. O'Donnell, M. E. and N. E. Owen (1994). "Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle." *Physiol Rev* 74(3): 683-721.
292. O'Brien, M., S. Carbin, J. J. Morrison and T. J. Smith (2013). "Decreased myometrial p160 ROCK-1 expression in obese women at term pregnancy." *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 11: 79-79.
293. Oakes, N. D., G. J. Cooney, S. Camilleri, D. J. Chisholm and E. W. Kraegen (1997). "Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding." *Diabetes* 46(11): 1768-1774.
294. Obradovic, M., P. Bjelogrić, M. Rizzo, N. Katsiki, M. Haidara, A. J. Stewart, A. Jovanovic and E. R. Isenovic (2013). "Effects of obesity and estradiol on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and their relevance to cardiovascular diseases." *J Endocrinol* 218(3): R13-23.
295. Obradovic, M., A. J. Stewart, S. J. Pitt, M. Labudovic-Borovic, E. Sudar, V. Petrovic, S. Zafirovic, V. Maravic-Stojkovic, V. Vasic and E. R. Isenovic (2014). "In vivo effects of 17beta-estradiol on cardiac Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase expression and activity in rat heart." *Mol Cell Endocrinol* 388(1-2): 58-68.
296. Obradovic, M., E. Sudar, S. Zafirovic, J. Stanimirovic, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2015). "Estradiol in vivo induces changes in cardiomyocytes size in obese rats." *Angiology* 66(1): 25-35.
297. Obradovic, M., S. Zafirovic, A. Jovanovic, E. S. Milovanovic, S. A. Mousa, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2015). "Effects of 17beta-estradiol on cardiac Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase in high fat diet fed rats." *Mol Cell Endocrinol* 416: 46-56.
298. Obradovic, M., S. Zafirovic, A. Jovanovic, E. S. Milovanovic, S. A. Mousa, M. Labudovic-Borovic and E. R. Isenovic (2015). "Effects of 17beta-estradiol on cardiac Na/K-ATPase in high fat diet fed rats." *Mol Cell Endocrinol*.
299. Ogawa, H., T. Shinoda, F. Cornelius and C. Toyoshima (2009). "Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13742-13747.
300. Olson, A. L. and J. E. Pessin (1996). "Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family." *Annu Rev Nutr* 16: 235-256.
301. Ortmann, J., M. Veit, S. Zingg, S. Di Santo, T. Traupe, Z. Yang, J. Völzmann, R. K. Dubey, S. Christen and I. Baumgartner (2011). "Estrogen Receptor- $\alpha$  But Not  $-\beta$  or GPER Inhibits High Glucose-Induced Human VSMC Proliferation: Potential Role of ROS and ERK." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(1): 220-228.
302. Ozdemir, O., Y. Ceylan, A. Y. Koksoy, H. Aydin, A. Gultekin and N. Andiran (2012). "Accelerated idioventricular rhythm associated with propranolol treatment in a child." *Cardiol J* 19(3): 330-333.
303. Padilla, F., D. Garcia-Dorado, L. Agullo, J. Inserte, A. Paniagua, S. Mirabet, J. A. Barrabes, M. Ruiz-Meana and J. Soler-Soler (2000). "L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig." *Cardiovasc Res* 46(3): 412-420.

## 7. Literatura

304. Palacios, J., E. T. Marusic, N. C. Lopez, M. Gonzalez and L. Michea (2004). "Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5): H1793-1800.
305. Palacios, J., E. T. Marusic, N. C. Lopez, M. Gonzalez and L. Michea (2004). "Estradiol-induced expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 286(5): H1793-H1800.
306. Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." *Nature* 333(6174): 664-666.
307. Pedram, A., M. Razandi, D. Lubahn, J. Liu, M. Vannan and E. R. Levin (2008). "Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin." *Endocrinology* 149(7): 3361-3369.
308. Pedram, A., M. Razandi, F. O'Mahony, D. Lubahn and E. R. Levin (2010). "Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis." *Mol Endocrinol* 24(11): 2152-2165.
309. Pereira, S. G. and F. Oakley (2008). "Nuclear factor- $\kappa$ B1: Regulation and function." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(8): 1425-1430.
310. Perez GO, L. L., Knowles R, Oster JR, and Vaamonde CA. (1977). "Potassium homeostasis in chronic diabetes mellitus. ." *Arch Intern Med* 137: 1018-1022.
311. Perreault, M. and A. Marette (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." *Nat Med* 7(10): 1138-1143.
312. Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March and R. A. Black (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." *Science* 282(5392): 1281-1284.
313. Pessin, J. E. and G. I. Bell (1992). "Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation." *Annu Rev Physiol* 54: 911-930.
314. Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." *J Clin Invest* 106(2): 165-169.
315. Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2002). "Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus." *Am J Cardiol* 90(5A): 11G-18G.
316. Pfitzer, G., J. C. Ruegg, V. Flockerzi and F. Hofmann (1982). "cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers." *FEBS Lett* 149(2): 171-175.
317. Pickar, J. H., I. Thorneycroft and M. Whitehead (1998). "Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: a review of randomized clinical trials, 1985 to 1995." *Am J Obstet Gynecol* 178(5): 1087-1099.
318. Pollow, K., H. Lubbert and B. Pollow (1975). "Studies on 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human endometrium and endometrial carcinoma. III. Partial purification and characterization of the microsomal enzyme." *Acta Endocrinol (Copenh)* 80(2): 355-364.
319. Pospisilik, J. A., C. Knauf, N. Joza, P. Benit, M. Orthofer, P. D. Cani, I. Ebersberger, T. Nakashima, R. Sarao, G. Neely, H. Esterbauer, A. Kozlov, C. R. Kahn, G. Kroemer, P. Rustin, R. Burcelin and J. M. Penninger (2007). "Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes." *Cell* 131(3): 476-491.
320. Power, M. L. and J. Schulkin (2008). "Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins." *British Journal of Nutrition* 99(5): 931-940.
321. Prpic, V., P. M. Watson, I. C. Frampton, M. A. Sabol, G. E. Jezek and T. W. Gettys (2003). "Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity." *Endocrinology* 144(4): 1155-1163.

## 7. Literatura

322. Pulakat, L., V. G. DeMarco, S. Ardhanari, A. Chockalingam, R. Gul, A. Whaley-Connell and J. R. Sowers (2011). "Adaptive mechanisms to compensate for overnutrition-induced cardiovascular abnormalities." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301(4): R885-895.
323. Purcell, N. H., B. J. Wilkins, A. York, M. K. Saba-El-Leil, S. Meloche, J. Robbins and J. D. Molkentin (2007). "Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(35): 14074-14079.
324. Puthanveetil, P., Y. Wang, D. Zhang, F. Wang, M. S. Kim, S. Innis, T. Pulinilkunnil, A. Abrahani and B. Rodrigues (2011). "Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1-iNOS-CD36 pathway." *Free Radical Biology and Medicine* 51(2): 352-363.
325. Qureshi, K. and G. A. Abrams (2007). "Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* 13(26): 3540-3553.
326. Racette, S. B., E. M. Evans, E. P. Weiss, J. M. Hagberg and J. O. Holloszy (2006). "Abdominal adiposity is a stronger predictor of insulin resistance than fitness among 50-95 year olds." *Diabetes Care* 29(3): 673-678.
327. Radomski, M. W., R. M. Palmer and S. Moncada (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 10043-10047.
328. Randolph, J. F., Jr., M. Sowers, E. B. Gold, B. A. Mohr, J. Luborsky, N. Santoro, D. S. McConnell, J. S. Finkelstein, S. G. Korenman, K. A. Matthews, B. Sternfeld and B. L. Lasley (2003). "Reproductive hormones in the early menopausal transition: relationship to ethnicity, body size, and menopausal status." *J Clin Endocrinol Metab* 88(4): 1516-1522.
329. Rao, K. M. (2000). "Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3(1): 27-58.
330. Rask-Madsen, C. and G. L. King (2007). "Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(1): 46-56.
331. Razeghi, P., M. E. Young, J. L. Alcorn, C. S. Moravec, O. H. Frazier and H. Taegtmeyer (2001). "Metabolic gene expression in fetal and failing human heart." *Circulation* 104(24): 2923-2931.
332. Reaven, G. (2001). "Syndrome X." *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 3(4): 323-332.
333. Reaven, G. M. (2011). "Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease." *Med Clin North Am* 95(5): 875-892.
334. Reaven, G. M., H. Lithell and L. Landsberg (1996). "Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system." *N Engl J Med* 334(6): 374-381.
335. Redinger, R. N. (2007). "The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations." *Gastroenterology & Hepatology* 3(11): 856-863.
336. Riant, E., A. Waget, H. Cogo, J. F. Arnal, R. Burcelin and P. Gourdy (2009). "Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice." *Endocrinology* 150(5): 2109-2117.
337. Ribas, V., M. T. Nguyen, D. C. Henstridge, A. K. Nguyen, S. W. Beaven, M. J. Watt and A. L. Hevener (2010). "Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(2): E304-319.
338. Rider, O. J., P. Cox, D. Tyler, K. Clarke and S. Neubauer (2013). "Myocardial substrate metabolism in obesity." *Int J Obes (Lond)* 37(7): 972-979.
339. Rider, O. J., J. M. Francis, M. K. Ali, S. E. Petersen, M. Robinson, M. D. Robson, J. P. Byrne, K. Clarke and S. Neubauer (2009). "Beneficial cardiovascular effects of bariatric surgical and dietary weight loss in obesity." *J Am Coll Cardiol* 54(8): 718-726.

## 7. Literatura

340. Rikitake, Y. and J. K. Liao (2005). "ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases." *Expert review of cardiovascular therapy* 3(3): 441-451.
341. Roberts, P. J., G. P. Riley, K. Morgan, R. Miller, J. O. Hunter and S. J. Middleton (2001). "The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon." *J Clin Pathol* 54(4): 293-297.
342. Rolli-Derkinderen, M., V. Sauzeau, L. Boyer, E. Lemichez, C. Baron, D. Henrion, G. Loirand and P. Pacaud (2005). "Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 96(11): 1152-1160.
343. Rose, A. M. and R. Valdes, Jr. (1994). "Understanding the sodium pump and its relevance to disease." *Clin Chem* 40(9): 1674-1685.
344. Rosenfeld, C. S., J. S. Wagner, R. M. Roberts and D. B. Lubahn (2001). "Intraovarian actions of oestrogen." *Reproduction* 122(2): 215-226.
345. Roytblat, L., M. Rachinsky, A. Fisher, L. Greemberg, Y. Shapira, A. Douvdevani and S. Gelman (2000). "Raised interleukin-6 levels in obese patients." *Obes Res* 8(9): 673-675.
346. Sader, M. A. and D. S. Celermajer (2002). "Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system." *Cardiovasc Res* 53(3): 597-604.
347. Santalucia, T., M. Camps, A. Castello, P. Munoz, A. Nuel, X. Testar, M. Palacin and A. Zorzano (1992). "Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue." *Endocrinology* 130(2): 837-846.
348. Santoro, N., S. L. Crawford, W. L. Lasley, J. L. Luborsky, K. A. Matthews, D. McConnell, J. F. Randolph, Jr., E. B. Gold, G. A. Greendale, S. G. Korenman, L. Powell, M. F. Sowers and G. Weiss (2008). "Factors related to declining luteal function in women during the menopausal transition." *J Clin Endocrinol Metab* 93(5): 1711-1721.
349. Sarkar, R., E. G. Meinberg, J. C. Stanley, D. Gordon and R. C. Webb (1996). "Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 78(2): 225-230.
350. Sarkar, R. and R. C. Webb (1998). "Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? A critical appraisal." *J Vasc Res* 35(3): 135-142.
351. Sauzeau, V., M. Rolli-Derkinderen, S. Lehoux, G. Loirand and P. Pacaud (2003). "Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery." *Circ Res* 93(7): 630-637.
352. Sauzeau, V., M. Rolli-Derkinderen, C. Marionneau, G. Loirand and P. Pacaud (2003). "RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation." *J Biol Chem* 278(11): 9472-9480.
353. Schmidt, T. A., S. Hasselbalch, J. S. Larsen, H. Bundgaard, M. Juhler and K. Kjeldsen (1996). "Reduction of cerebral cortical [3H]ouabain binding site (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase) density in dementia as evaluated in fresh human cerebral cortical biopsies." *Brain Res Cogn Brain Res* 4(4): 281-287.
354. Schmitz-Peiffer, C. and T. J. Biden (2008). "Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes." *Diabetes* 57(7): 1774-1783.
355. Schwertz, D. W. and S. Penckofer (2001). "Sex differences and the effects of sex hormones on hemostasis and vascular reactivity." *Heart Lung* 30(6): 401-426; quiz 427-408.
356. Schwinger, R. H., H. Bundgaard, J. Muller-Ehmsen and K. Kjeldsen (2003). "The Na, K-ATPase in the failing human heart." *Cardiovasc Res* 57(4): 913-920.
357. Scott, J. A., S. Mehta, M. Duggan, A. Bihari and D. G. McCormack (2002). "Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* 165(10): 1426-1432.
358. Segall, L., S. E. Daly and R. Blostein (2001). "Mechanistic basis for kinetic differences between the rat alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms of the Na,K-ATPase." *J Biol Chem* 276(34): 31535-31541.

## 7. Literatura

359. Segars, J. H. and P. H. Driggers (2002). "Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes." *Trends Endocrinol Metab* 13(8): 349-354.
360. Serhan, M. F. and S. I. Kreydiyyeh (2011). "Insulin targets the Na(+)/K(+) ATPase in enterocytes via PI3K, PKC, and MAPKS." *J Recept Signal Transduct Res* 31(4): 299-306.
361. Serra, D., P. Mera, M. I. Malandrino, J. F. Mir and L. Herrero (2013). "Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Obesity." *Antioxidants & Redox Signaling* 19(3): 269-284.
362. Shah, A. M. (2000). "Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease." *Cardiovascular Research* 45(1): 148-155.
363. Shao, D. and R. Tian (2015). "Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy." *Comprehensive Physiology* 6(1): 331-351.
364. Sharma, R. V., M. V. Gurjar and R. C. Bhalla (2001). "Selected contribution: estrogen receptor-alpha gene transfer inhibits proliferation and NF-kappaB activation in VSM cells from female rats." *J Appl Physiol* (1985) 91(5): 2400-2406; discussion 2389-2490.
365. Shen, L., X. Liu, W. Hou, G. Yang, Y. Wu, R. Zhang, X. Li, H. Che, Z. Lu, Y. Zhang, X. Liu and L. Yao (2010). "NDRG2 is highly expressed in pancreatic beta cells and involved in protection against lipotoxicity." *Cell Mol Life Sci* 67(8): 1371-1381.
366. Shi, J. and L. Wei (2013). "Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil." *J Cardiovasc Pharmacol* 62(4): 341-354.
367. Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* 106(2): 171-176.
368. Sibal, L., S. C. Agarwal, P. D. Home and R. H. Boger (2010). "The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease." *Curr Cardiol Rev* 6(2): 82-90.
369. Silfani, T. N. and E. J. Freeman (2002). "Phosphatidylinositide 3-kinase regulates angiotensin II-induced cytosolic phospholipase A2 activity and growth in vascular smooth muscle cells." *Arch Biochem Biophys* 402(1): 84-93.
370. Simpson, E. and R. J. Santen (2015). "Celebrating 75 years of oestradiol." *J Mol Endocrinol* 55(3): T1-20.
371. Skou, J. C. and M. Esmann (1992). "The Na,K-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* 24(3): 249-261.
372. SM, M. J. (1998). *Arginine synthesis, metabolism and transport: regulators of nitric oxide synthesis*. New York, NY, Marcel Dekker.
373. Smith, B. C., E. S. Underbakke, D. W. Kulp, W. R. Schief and M. A. Marletta (2013). "Nitric oxide synthase domain interfaces regulate electron transfer and calmodulin activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(38): E3577-3586.
374. Snel, M., J. T. Jonker, J. Schoones, H. Lamb, A. de Roos, H. Pijl, J. W. Smit, A. E. Meinders and I. M. Jazet (2012). "Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions." *Int J Endocrinol* 2012: 983814.
375. Soliman, H., G. P. Craig, P. Nagareddy, V. G. Yuen, G. Lin, U. Kumar, J. H. McNeill and K. M. Macleod (2008). "Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats." *Cardiovasc Res* 79(2): 322-330.
376. Soliman, H., V. Nyamandi, M. Garcia-Patino, J. N. Varela, G. Bankar, G. Lin, Z. Jia and K. M. MacLeod (2015). "Partial deletion of ROCK2 protects mice from high-fat diet-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(1): H70-81.
377. Somberg, J. C., W. H. Barry and T. W. Smith (1981). "Differing sensitivities of Purkinje fibers and myocardium to inhibition of monovalent cation transport by digitalis." *J Clin Invest* 67(1): 116-123.
378. Sowers, J. R., P. S. Sowers and J. D. Peuler (1994). "Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis." *J Lab Clin Med* 123(5): 647-652.



## 7. Literatura

379. Speir, E., Z. X. Yu, K. Takeda, V. J. Ferrans and R. O. Cannon, 3rd (2000). "Antioxidant effect of estrogen on cytomegalovirus-induced gene expression in coronary artery smooth muscle cells." *Circulation* 102(24): 2990-2996.
380. Stanimirovic, J., M. Obradovic, A. Jovanovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Zafirovic, S. J. Pitt, A. J. Stewart and E. R. Isenovic (2016). "A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats." *Nitric Oxide* 54: 51-59.
381. Stanimirovic, J., M. Obradovic, A. Panic, V. Petrovic, D. Alavantic, I. Melih and E. R. Isenovic (2017). "Regulation of hepatic Na(+)/K(+)-ATPase in obese female and male rats: involvement of ERK1/2, AMPK, and Rho/ROCK." *Mol Cell Biochem*.
382. Stanimirovic, J., M. Obradovic, S. Zafirovic, I. Resanovic, N. Bogdanovic, Z. Gluvic, S. A. Mousa and E. R. Isenovic (2015). "Effects of altered hepatic lipid metabolism on regulation of hepatic iNOS." *Clinical Lipidology* 10(2): 167-175.
383. Stubbs, C. D. and A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." *Biochim Biophys Acta* 779(1): 89-137.
384. Stuehr, D. J. (1997). "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 339-359.
385. Su, H. I., M. D. Sammel, E. W. Freeman, H. Lin, T. DeBlasis and C. R. Gracia (2008). "Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women." *Menopause (New York, N.Y.)* 15(5): 857-861.
386. Sudar, E., J. Velebit, Z. Gluvic, Z. Zakula, E. Lazic, L. Vuksanovic-Topic, B. Putnikovic, A. Neskovic and E. R. Isenovic (2008). "Hypothetical mechanism of sodium pump regulation by estradiol under primary hypertension." *J Theor Biol* 251(4): 584-592.
387. Sudar Milovanovic, E., A. Jovanovic, M. Misirkic-Marjanovic, L. Vucicevic, K. Janjetovic and E. R. Isenovic (2015). "Effects of Intracerebroventricularly (ICV) Injected Ghrelin on Cardiac Inducible Nitric Oxide Synthase Activity/Expression in Obese Rats." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 123(10): 581-588.
388. Sumiyoshi, M., M. Sakanaka and Y. Kimura (2006). "Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice." *The Journal of Nutrition* 136(3): 582-587.
389. Sun, X. J., J. L. Goldberg, L. Y. Qiao and J. J. Mitchell (1999). "Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway." *Diabetes* 48(7): 1359-1364.
390. Sun, Z., G. Tong, N. Ma, J. Li, X. Li, S. Li, J. Zhou, L. Xiong, F. Cao, L. Yao, H. Wang and L. Shen (2013). "NDRG2: a newly identified mediator of insulin cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury." *Basic Res Cardiol* 108(3): 341.
391. Swarts, H. G., J. A. Timmermans, F. M. Schuurmans Stekhoven, J. J. de Pont, S. J. Graafsma and T. A. Thien (1988). "Non-esterified fatty acids and the circulating inhibitor of Na,K-ATPase." *Prog Clin Biol Res* 268B: 443-448.
392. Sweadner, K. J. and E. Rael (2000). "The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression." *Genomics* 68(1): 41-56.
393. Sykiotis, G. P. and A. G. Papavassiliou (2001). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance." *Mol Endocrinol* 15(11): 1864-1869.
394. Tamura, K., K. Yamaguchi and H. Kogo (2000). "17Beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo." *Life Sci* 66(17): PL 259-264.
395. Taniguchi, C. M., B. Emanuelli and C. R. Kahn (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 85-96.
396. Tao, S. and T. M. McKenna (1994). "In vitro endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes." *Am J Physiol* 267(5 Pt 2): H1745-1752.

## 7. Literatura

397. Tapiero, H., G. Mathe, P. Couvreur and K. D. Tew (2002). "I. Arginine." *Biomed Pharmacother* 56(9): 439-445.
398. Thakker, G. D., N. G. Frangogiannis, M. Bujak, P. Zymek, J. W. Gaubatz, A. K. Reddy, G. Taffet, L. H. Michael, M. L. Entman and C. M. Ballantyne (2006). "Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291(5): H2504-H2514.
399. Therien, A. G. and R. Blostein (2000). "Mechanisms of sodium pump regulation." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C541-566.
400. Tsutsumi, S., X. Zhang, K. Takata, K. Takahashi, R. H. Karas, H. Kurachi and M. E. Mendelsohn (2008). "Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2." *J Endocrinol* 199(2): 267-273.
401. Umar, S. and A. van der Laarse (2010). "Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart." *Mol Cell Biochem* 333(1-2): 191-201.
402. Unger, R. H. (2002). "Lipotoxic diseases." *Annu Rev Med* 53: 319-336.
403. Unsold, B., E. Bremen, M. Didie, G. Hasenfuss and K. Schafer (2015). "Differential PI3K signal transduction in obesity-associated cardiac hypertrophy and response to ischemia." *Obesity (Silver Spring)* 23(1): 90-99.
404. van der Vusse, G. J., M. van Bilsen and J. F. Glatz (2000). "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease." *Cardiovasc Res* 45(2): 279-293.
405. van Oort, M. M., J. M. van Doorn, A. Bonen, J. F. Glatz, D. J. van der Horst, K. W. Rodenburg and J. J. Luiken (2008). "Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4." *Biochim Biophys Acta* 1781(1-2): 61-71.
406. Vegeto, E., S. Belcredito, S. Etteri, S. Ghisletti, A. Brusadelli, C. Meda, A. Krust, S. Dupont, P. Ciana, P. Chambon and A. Maggi (2003). "Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16): 9614-9619.
407. Vemula, S., J. Shi, P. Hanneman, L. Wei and R. Kapur (2010). "ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability." *Blood* 115(9): 1785-1796.
408. Vlkovicova, J., V. Javorkova, O. Pechanova and N. Vrbjar (2005). "Gender difference in functional properties of Na,K-ATPase in the heart of spontaneously hypertensive rats." *Life Sci* 76(9): 971-982.
409. Vykhovanets, E. V., E. Shankar, O. V. Vykhovanets, S. Shukla and S. Gupta (2011). "High-fat diet increases NF-kappaB signaling in the prostate of reporter mice." *Prostate* 71(2): 147-156.
410. Wan, G., S. Ohnmi and N. Kato (2000). "Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet." *Biosci Biotechnol Biochem* 64(3): 555-561.
411. Wang, L., N. Liu, L. Yao, F. Li, J. Zhang, Y. Deng, J. Liu, S. Ji, A. Yang, H. Han, Y. Zhang, J. Zhang, W. Han and X. Liu (2008). "NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells." *Cell Physiol Biochem* 21(1-3): 239-250.
412. Wielputz, M. O., I. H. Lee, A. Dinudom, S. Boulkroun, N. Farman, D. I. Cook, C. Korbmacher and R. Rauh (2007). "(NDRG2) stimulates amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes and fisher rat thyroid cells." *J Biol Chem* 282(38): 28264-28273.
413. Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, L. Sullivan, H. Parise and W. B. Kannel (2002). "Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience." *Arch Intern Med* 162(16): 1867-1872.
414. Winzell, M. S., C. Holm and B. Ahren (2003). "Downregulation of islet hormone-sensitive lipase during long-term high-fat feeding." *Biochem Biophys Res Commun* 304(2): 273-278.
415. Witteles, R. M. and M. B. Fowler (2008). "Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options." *J Am Coll Cardiol* 51(2): 93-102.

## 7. Literatura

416. Woo, A. L., P. F. James and J. B. Lingrel (2000). "Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase." *J Biol Chem* 275(27): 20693-20699.
417. Woods, S. C., R. J. Seeley, P. A. Rushing, D. D'Alessio and P. Tso (2003). "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats." *J Nutr* 133(4): 1081-1087.
418. Wu, G., N. E. Flynn, S. P. Flynn, C. A. Jolly and P. K. Davis (1999). "Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats." *J Nutr* 129(7): 1347-1354.
419. Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." *Biochem J* 336 ( Pt 1): 1-17.
420. Wu, K. L., C. H. Chen and C. D. Shih (2012). "Nontranscriptional activation of PI3K/Akt signaling mediates hypotensive effect following activation of estrogen receptor beta in the rostral ventrolateral medulla of rats." *J Biomed Sci* 19(1): 76.
421. Xiao, Z., T. Wang, H. Qin, C. Huang, Y. Feng and Y. Xia (2011). "Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release modulates endothelial nitric-oxide synthase via extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2-mediated serine 635 phosphorylation." *J Biol Chem* 286(22): 20100-20108.
422. Xing, D., S. Nozell, Y. F. Chen, F. Hage and S. Oparil (2009). "Estrogen and mechanisms of vascular protection." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(3): 289-295.
423. Yang, J., P. Cron, V. M. Good, V. Thompson, B. A. Hemmings and D. Barford (2002). "Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP." *Nat Struct Biol* 9(12): 940-944.
424. Yang, J., J. Zheng, L. Wu, M. Shi, H. Zhang, X. Wang, N. Xia, D. Wang, X. Liu, L. Yao, Y. Li and K. Dou (2011). "NDRG2 ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting the TGF-beta1/Smad pathway and altering the MMP2/TIMP2 ratio in rats." *PLoS One* 6(11): e27710.
425. Yang, N., C. Ying, M. Xu, X. Zuo, X. Ye, L. Liu, Y. Nara and X. Sun (2007). "High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats." *Cardiovasc Res* 76(1): 167-174.
426. Yao, L., J. Zhang and X. Liu (2008). "NDRG2: a Myc-repressed gene involved in cancer and cell stress." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(7): 625-635.
427. Yasuda, S. and W. Y. Lew (1997). "Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in cardiac myocytes." *Circ Res* 81(6): 1011-1020.
428. Yeh, C. H., W. Chou, C. C. Chu, E. C. So, H. C. Chang, J. J. Wang and C. H. Hsing (2011). "Anticancer agent 2-methoxyestradiol improves survival in septic mice by reducing the production of cytokines and nitric oxide." *Shock* 36(5): 510-516.
429. Yetik-Anacak, G. and J. D. Catravas (2006). "Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease." *Vascul Pharmacol* 45(5): 268-276.
430. Yokoyama, T., A. Komori, M. Nakamura, Y. Takii, T. Kamihira, S. Shimoda, T. Mori, S. Fujiwara, M. Koyabu, K. Taniguchi, H. Fujioka, K. Migita, H. Yatsuhashi and H. Ishibashi (2006). "Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways." *Liver Int* 26(4): 467-476.
431. Yoneda, A., H. A. Multhaupt and J. R. Couchman (2005). "The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity." *J Cell Biol* 170(3): 443-453.
432. Young, L. H. (2010). "Diet-induced obesity obstructs insulin signaling in the heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(2): H306-307.
433. Zachow, R. J. and D. A. Magoffin (1997). "Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells." *Endocrinology* 138(2): 847-850.

## 7. Literatura

434. Zafirovic, S., M. Obradovic, E. Sudar-Milovanovic, A. Jovanovic, J. Stanimirovic, A. J. Stewart, S. J. Pitt and E. R. Isenovic (2017). "17beta-Estradiol protects against the effects of a high fat diet on cardiac glucose, lipid and nitric oxide metabolism in rats." *Mol Cell Endocrinol* 446: 12-20.
435. Zafirovic, S., E. Sudar-Milovanovic, M. Obradovic, J. Djordjevic, N. Jasic, M. L. Borovic and E. R. Isenovic (2018). "Involvement of PI3K, Akt, and RhoA in oestradiol regulation of cardiac iNOS expression." *Curr Vasc Pharmacol*.
436. Zago, A. S. and A. Zanesco (2006). "Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise." *Arq Bras Cardiol* 87(6): e264-270.
437. Zain, M. M. and R. J. Norman (2008). "Impact of obesity on female fertility and fertility treatment." *Womens Health (Lond Engl)* 4(2): 183-194.
438. Zhang, J., F. Li, X. Liu, L. Shen, J. Liu, J. Su, W. Zhang, Y. Deng, L. Wang, N. Liu, W. Han, J. Zhang, S. Ji, A. Yang, H. Han and L. Yao (2006). "The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter." *J Biol Chem* 281(51): 39159-39168.
439. Zhang, P., X. Xu, X. Hu, E. van Deel, G. Zhu and Y. Chen (2007). "iNOS deficiency protects the heart from systolic overload induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure." *Circulation research* 100(7): 1089-1098.
440. Zhang, S., L. Yang, M. Kouadir, R. Tan, Y. Lu, J. Chang, B. Xu, X. Yin, X. Zhou and D. Zhao (2013). "PP2 and piceatannol inhibit PrP106-126-induced iNOS activation mediated by CD36 in BV2 microglia." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45(9): 763-772.
441. Zhao, Y., M. Lv, H. Lin, Y. Hong, F. Yang, Y. Sun, Y. Guo, Y. Cui, S. Li and Y. Gao (2012). "ROCK1 induces ERK nuclear translocation in PDGF-BB-stimulated migration of rat vascular smooth muscle cells." *IUBMB Life* 64(2): 194-202.
442. Zhou, H., Y.-j. Li, M. Wang, L.-h. Zhang, B.-y. Guo, Z.-s. Zhao, F.-l. Meng, Y.-g. Deng and R.-y. Wang (2011). "Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes." *Acta Pharmacologica Sinica* 32(8): 999-1008.
443. Zhou, M. S., I. H. Schulman and Q. Zeng (2012). "Link between the renin-angiotensin system and insulin resistance: implications for cardiovascular disease." *Vasc Med* 17(5): 330-341.
444. Zoccali, C. (2010). *Endothelial Dysfunction, Nitric Oxide Bioavailability, and Asymmetric Dimethyl Arginine. Cardiorenal Syndrome: Mechanisms, Risk and Treatment*. A. E. Berbari and G. Mancia. Milano, Springer Milan: 235-244.

### 8. BIOGRAFIJA

**Aleksandra A. Jovanović** je rođena 23. oktobra 1987. godine u Užicu, Republika Srbija. Gimnaziju „Sveti Sava“, prirodno matematički smer, završila je u Beogradu. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, upisala je školske 2006/07. godine i diplomirala je na odseku Fiziologija životinja odbranivši diplomski rad pod nazivom: “Uticaj ishrane obogaćene mastima na regulaciju aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u srcu pacova oba pola”, koji je urađen pod rukovodstvom dr Emine Sudar, naučnog saradnika, 2012. godine. Iste godine, upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, modul Eksperimentalna endokrinologija.

Aleksandra Jovanović je od 1.11.2012. zaposlena u Institutu “Vinča” u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, na projektu: „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja” (br. 173033), čiji je rukovodilac dr Esmā R. Isenović, naučni savetnik, gde je kao istraživač saradnik, u potpunosti uradila eksperimentalni deo teze. Veće naučnih oblasti prirodnih nauka na sednici održanoj 13.10.2017. godine donelo je odluku o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Aleksandre Jovanović pod nazivom “Signalni putevi estradiola uključeni u regulaciju ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-kalijum adenozintrifosfataze u srcu gojaznih ženki pacova”.

U svom dosadašnjem radu je saradnik na 16 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na 5 radova saopštenih na skupovima međunarodnog i domaćeg značaja. Glavna oblast njenog naučno-istraživačkog rada je: molekularna endokrinologija, dijabetes, gojaznost i kardiovaskularne bolesti.

## 9. PRILOZI

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Јовановић

Број индекса БИ3010/2012

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Сигнални путеви естрадиола укључени у регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе и натријум-калијум аденозин трифосфатазе у срцу гојазних женки пацова

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

#### Потпис аутора

У Београду, 16.11.2018.

Јовановић Александра

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Јовановић  
Број индекса БИ3010/2012  
Студијски програм Биологија: Анимална и хумана физиологија  
Наслов рада Сигнални путеви естрадиола укључени у регулацију експресије  
и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе и натријум-калијум аденозин  
трифосфатазе у срцу гојазних женки пацова

Ментор

1. др Есма Исеновић, научни саветник, Универзитет у Београду-  
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд, Србија
2. др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду-  
Биолошки факултет, Београд, Србија

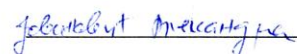
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 16.11.2018.



### Изјава о коришћењу

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

Сигнални путеви естрадиола укључени у регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе и натријум-калијум аденозин трифосфатазе у срцу гојазних женки пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_ 16.11.2018.

