

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Maja M. Bubić

**Antioksidativni i antiinflamatorni efekti
suplementacije orasima (*Juglans regia* L.) na srce
pacova sa metaboličkim sindromom izazvanim
ishranom bogatom fruktozom**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

University of Belgrade
Faculty of Biology

Maja M. Bubić

**Antioxidative and antiinflammatory effects of
walnut supplementation (*Juglans regia* L.) on
rat heart with fructose-rich diet-induced
metabolic syndrome**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor:

dr Maja Živković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Korićanac, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku i Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, kao i u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma u Beogradu, a u okviru teme „Genetska osnova hronične inflamacije“, br. 0802102, čiji je rukovodilac dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik. Veliku zahvalnost dugujem svima koji su na bilo koji način doprineli realizaciji ove doktorske disertacije i mom naučno-istraživačkom radu.

Hvala mojoj mentorki, dr Maji Živković, na pomoći, energiji i strpljenju u svim fazama izrade ove disertacije, kao i u uobličavanju naučnih radova iz teme disertacije.

Posebno se zahvaljujem članovima komisije:

Dr Aleksandri Stanković, rukovodiocu istraživanja, na svim savetima, sugestijama i pomoći pri realizaciji ove doktorske disertacije, kao i naučnih radova koji su joj prethodili.

Prof. dr Biljani Božić Nedeljković, na savetima i sugestijama koji su doprineli da ova doktorska disertacija dobije svoj konačni oblik.

Dr Goranu Korićancu na razvijanju životinjskog modela metaboličkog sindroma i svim eksperimentima koji su urađeni u njegovoj laboratoriji, na pristupačnosti, stručnim savetima i sugestijama, koji su dodatno poboljšali kvalitet ove teze i mojih naučnih radova.

Zahvaljujem se svim kolegama iz grupe dr Gorana Korićanca koji su mi ustupili svoju laboratoriju za realizaciju dela eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije i uvek bili tu da odgovore na sva moja pitanja i nedoumice u eksperimentalnom radu.

Hvala dr Manji Zec za inicijativu u sprovođenju studije suplementacije orasima, kao i ostalim kolegama Centra izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma na pomoći u realizaciji dela eksperimentalnog rada i stručnim savetima iz oblasti analize masnih kiselina.

Zahvaljujem se profesoru dr Vladimiru Jakovljeviću, dekanu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, što je omogućio merenje pritiska eksperimentalnih životinja.

Svojim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, veliko hvala na nesebičnoj razmeni znanja i timskom radu, a posebno na empatiji i uvek pozitivnoj energiji koja stvara prijatnu radnu atmosferu i čini da posao bude mesto pozitivne produktivnosti.

Dr Maji Bundalo hvala što me je uvela u eksperimentalni rad i tematiku u okviru koje je urađena disertacija.

Zahvaljujem se dr Draganu Alavantiću što mi je omogućio da svoj naučno-istraživački rad započnem u Laboratoriji 080 u kojoj je ova doktorska disertacija osmišljena i urađena. Hvala na svim kiflicama koje su nam ulepšale jutarnju rutinu!

Mladenu hvala na pružanju ljubavi, podrške i davanju ličnog primera da nikad ne odustanem... na putovanjima koja su nam pružila predah od svakodnevnih preokupacija i vratila snagu za nove izazove.

Mom Arseniju hvala što postoji, dao je smisao svemu ostalom.

Mojoj sestri Nini, hvala što je uvek tu za mene. Hvala Hani i Joci na ljubavi!

Hvala tetki i ujaku koji su me bodrili tokom celog školovanja!

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima. Hvala što ste uvek verovali u mene, čak i onda kada ja nisam. Hvala na svemu što ste mi pružili. Zbog toga što se vi najviše radujete mom uspehu, ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama!

Sažetak

Povećana konzumacija fruktoze kroz industrijsku hranu doprinosi razvoju metaboličkog sindroma (MetS). MetS prati hronična inflamacija niskog intenziteta kojoj doprinosi oksidativni stres i aktivacija renin-angiotenzin sistema (RAS). Orasi su bogat izvor antioksidanasa i polinezasićenih n-3 masnih kiselina koje imaju antiinflamatorne/imunomodulatorne efekte na kardiometaboličko zdravlje, čija molekularna osnova nije dovoljno poznata.

Konzumacija oraha (2,4 g/dan, 6 nedelja) je smanjila sistolni krvni pritisak kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom (10% rastvor, 15 nedelja), pokazala je protektivni efekat na antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza i antiinflamatorni kapacitet srca (smanjenje AA/EPA) i promovisala antiinflamatorni profil masnih kiselina u plazmi (smanjenje AA/EPA i AA/DHA), koji su kompromitovani fruktoznom ishranom. Ulogu negativnih regulatora antioksidativne ose, Nox4 i ChREBP, u srcu treba dodatno ispitati jer je nivo Nox4 povećan i nakon fruktozne ishrane i nakon suplementacije orasima, dok je nivo ChREBP u jedru smanjen nakon fruktozne ishrane i nakon konzumacije oraha kod kontrolnih pacova. Fruktozna ishrana je aktivirala signalni put koji reguliše inflamaciju povećanjem nivoa transkripcionog faktora NF- κ B i ključnog enzima RAS-a, ACE, dok je suplementacija orasima kod pacova na fruktoznoj ishrani povećala nivo ACE2, kardioprotektivne komponente RAS-a. Na proteinski/iRNK nivo RAS receptora, AT1R i AT2R, nije uticao nijedan od dva nutritivna faktora.

Ova studija je potvrdila korisne efekte konzumacije oraha na kardiometabolički status i predložila mehanizme koji su u osnovi njihovih antiinflamatornih i antioksidativnih efekata u srcu, ukazujući na mogućnost razvoja novih, nefarmakoloških pristupa u terapiji kardiometaboličkih bolesti.

Ključne reči: fruktoza, metabolički sindrom, srce, orasi, SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza, Nox4, ChREBP, renin-angiotenzin sistem, NF- κ B, masne kiseline

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Abstract

Increased fructose intake via industrial food is associated with metabolic syndrome (MetS). MetS is characterized by chronic low-intensity inflammation caused by oxidative stress and activation of the renin-angiotensin system (RAS). Walnuts are a rich source of antioxidants and polyunsaturated n-3 fatty acids that exert anti-inflammatory/immunomodulatory effects on cardiometabolic health, which molecular background is underexplored.

Walnut consumption (2.4 g/day, 6 weeks) reduced systolic blood pressure in rats fed a fructose-rich diet (10% FRD, 15 weeks), showed a protective effect on the antioxidative axis SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase and anti-inflammatory cardiac capacity (AA/EPA reduction) and promoted the anti-inflammatory profile of plasma fatty acids (AA/EPA and AA/DHA reduction), which were compromised by FRD. The role of the axis negative regulators, Nox4 and ChREBP, should be further investigated in the heart because the Nox4 level was increased by both, FRD and walnut supplementation, while the ChREBP nuclear level was reduced in FRD as well as in control rats subjected to walnuts. FRD activated a signaling pathway that regulated inflammation by increasing the levels of the transcription factor NF- κ B and the key RAS enzyme, ACE, while walnut supplementation in FRD rats increased ACE2 level, a cardioprotective component of the RAS. The protein/mRNA levels of the RAS receptors, AT1R and AT2R, were not affected by either of the two nutritional factors.

This study confirmed the beneficial effects of walnut consumption on cardiometabolic status and proposed the mechanisms underlying their anti-inflammatory and antioxidative effects in the heart, indicating the possibility for development of novel, non-pharmacological approaches in cardiometabolic disease therapy.

Key words: fructose, metabolic syndrome, walnuts, heart, SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase, Nox4, ChREBP, renin-angiotensin system, NF- κ B, fatty acids

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

SKRAĆENICE

- AA** - arahidonska kiselina (engl. *Arachidonic Acid*)
ACE – angiotenzin konvertujući enzim (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
ACE2 – angiotenzin konvertujući enzim 2 (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*)
Acetil-CoA - acetil koenzim A (engl. *Acetyl Coenzyme A*)
AGE - finalni produkti glikozilacije (engl. *Advanced Glycation End products*)
ALA - alfa-linoleinska kiselina (engl. *α -Linolenic Acid*)
AMPK - proteinska kinaza koju aktivira AMP (engl. *AMP-activated protein Kinase*)
Ang I – angiotenzin I
Ang II – angiotenzin II
Ang 1-7 – angiotenzin 1-7
APS - amonijum persulfat (engl. *Ammonium Persulfate*)
AT1R – angiotenzin II receptor tipa 1
AT2R – angiotenzin II receptor tipa 2
ATP – adenozin tri fosfat
BCA – bicinhoninična kiselina (engl. *Bicinchoninic Acid*)
BHT - butilirani hidroksitoluen (engl. *Butylated Hydroxytoluene*)
Cdc42 – protein uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa (engl. *Cell division control protein 42 homolog*)
cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
cGMP – ciklični guanozin monofosfat
CRP – C reaktivni protein
DBP - dijastolni krvni pritisak (engl. *Diastolic Blood Pressure*)
DHA - dokozaheksanska kiselina (engl. *Docosahexanoic Acid*)
DHAP - dihidroksiaceton fosfat
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA - etilendiamino tetrasirćetna kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
EET - epoksieikozatrienska kiselina (engl. *Epoxyeicosatrienoic Acid*)
EGFR - receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*)
eNOS - endotelna sintaza azot monoksida (engl. *endothelial Nitric Oxide Synthase*)
EPA - eikozapentanska kiselina (engl. *Eicosapentanoic Acid*)
ERK - kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinases*)
ET-1 - endotelin-1
F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze
FAK – engl. *Focal Adhesion Kinase*
FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha
GLUT – transporter za glukozu (engl. *Glucose Transporter*)
HETE - hidroksieikozatetraenska kiselina (engl. *Hydroxyeicosatetraenoic Acid*)
HFCS – kukuruzni sirup sa visokim sadržajem fruktoze (engl. *High Fructose Corn Syrup*)
HRF – frekvencija srčanih otkucaja (engl. *Heart Rate Frequency*)
HRP – peroksidaza rena (engl. *Horseradish Peroxidase*)
ICAM-1 - intraćelijski adhezivni molekul-1 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule-1*)
I κ B - inhibitor kapa B (engl. *Inhibitor of kappa B*)
IKK – I κ B kinazni kompleks
IL- – interleukin
IR – insulinska rezistencija
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

IRS-1 – supstrat za insulinski receptor 1 (engl. *Insulin Receptor Substrate-1*)
Jak/STAT – engl. *Janus kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)*
JNK – c-jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal Kinases*)
K – kontrolna grupa životinja
KO – životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha
KVB – kardiovaskularne bolesti
LDL – lipoproteini male gustine (engl. *Low Density Lipoproteins*)
MAP – srednji arterijski pritisak (engl. *Mean Arterial Pressure*)
MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MCP-1 – monocitni hemoatraktantni protein-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)
MetS – metabolički sindrom
MMP – matriks metaloproteinaza
MnSOD – mangan superoksid dismutaza (engl. *Manganese Superoxide Dismutase*)
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)
NFAT – nuklearni faktor aktiviranih T ćelija (engl. *Nuclear Factor of Activated T-cells*)
NF-κB – nuklearni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor-kappa B*)
NO – azot oksid (engl. *Nitric Oxide*)
Nrf2 – engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
O²⁻ - superoksid anjon
ONOO⁻ - peroksinitrit
ox-LDL – oksidovani lipoproteini male gustine
PA - palmitinska kiselina (engl. *Palmitic Acid*)
PDGF-R - receptor za faktor rasta trombocita (engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*)
PKC - protein kinaza C
PLA2 - fosfolipaza A2 (engl. *Phospholipase A2*)
PLC - fosfolipaza C (engl. *Phospholipase C*)
PLD – fosfolipaza D (engl. *Phospholipase D*)
POA - palmitoleinska kiselina (engl. *Palmitoleic Acid*)
PP - pulsni pritisak (engl. *Pulse Pressure*)
PTP1B - protein tirozin fosfataza 1B (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*)
PUFA – polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*)
PVDF – poliviniliden-fluoridna membrana (engl. *polyvinyl difluoride*)
Pyk2 – Ca²⁺-zavisna prolinom bogata tirozin kinaza 2
RAGE – receptor za AGE
RAS – renin-angiotenzin system
Real-Time PCR - reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. *Realtime Polymerase Chain Reaction*)
RNK – ribonukleinska kiselina
RVK – reaktivne vrste kiseonika
SBP – sistolni krvni pritisak (engl. *Systolic Blood Pressure*)
SDS-PAGE – elektroforeza na natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium Dodecil Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
SIRT1 – sirtuin 1
SMK – slobodne masne kiseline
T2D – dijabetes tipa 2
TEMED - tetrametil etilendiamin (engl. *Tetramethylethylenediamine*)
TG - trigliceridi

TLR – receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like Receptor*)

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor- α*)

TXA2 - tromboksan A2

VCAM-1 – vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

VLDL – lipoproteini veoma niske gustine (engl. *Very Low Density Lipoproteins*)

VPR - senzor za detekciju krvnog pritiska na osnovu promena u zapremini repa (engl. *Volume Pressure Recording*)

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Ishrana bogata fruktozom | 1 |
| 1.1.1. Metabolizam fruktoze | 1 |
| 1.1.2. Ishrana bogata fruktozom i metabolički sindrom..... | 3 |
| 1.2. Životinjski model metaboličkog sindroma | 4 |
| 1.3. Metabolička inflamacija | 5 |
| 1.3.1. Metabolizam u srcu u fiziološkim uslovima i uslovima insulinske rezistencije | 6 |
| 1.4. Oksidativni stres u metaboličkom sindromu | 7 |
| 1.4.1. Oksidativni stres u srcu | 7 |
| 1.4.2. AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza antioksidativna osa | 8 |
| 1.5. Renin-angiotenzin sistem (RAS)..... | 9 |
| 1.5.1. Angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1R) | 10 |
| 1.5.2. Angiotenzin II receptor tipa 2 (AT2R) | 11 |
| 1.5.3. Angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) | 12 |
| 1.5.4. Angiotenzin-konvertujući enzim 2 (ACE2) | 13 |
| 1.5.5. Lokalni RAS u srcu | 13 |
| 1.6. Transkripcioni faktor NF-κB..... | 14 |
| 1.7. Veza između RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u metaboličkom sindromu | 14 |
| 1.8. Polinezasićene masne kiseline (PUFA)..... | 15 |
| 1.8.1. Orasi kao suplement u ishrani bogat n-3 PUFA - nutritivni tretman u terapiji metaboličkog sindroma?..... | 16 |
| 2. HIPOTEZA I CILJEVI | 18 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 19 |
| 3.1. Poreklo i hemijski sastav oraha | 19 |
| 3.2. Životinjski model i tretman životinja u studiji..... | 19 |
| 3.3. Energetski unos, telesna masa, relativna masa srca, krvni pritisak i srčana frekvencija eksperimentalnih životinja..... | 20 |
| 3.4. Analiza masnih kiselina u ukupnom sadržaju lipida u plazmi i srcu pacova..... | 21 |
| 3.5. Priprema ćelijskog lizata srca..... | 21 |
| 3.6. Priprema citosolne i jedarne frakcije..... | 22 |
| 3.7. Određivanje koncentracije proteina..... | 22 |
| 3.8. Elektroforeza na natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)..... | 22 |
| 3.9. Western blot analiza | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.10. Izolacija ukupne ćelijske RNK iz tkiva srca i određivanje njene koncentracije | 24 |
| 3.11. Tretman uzoraka RNK dezoksiribonukleazom | 25 |
| 3.12. Reverzna transkripcija | 25 |
| 3.13. Analiza relativnog nivoa iRNK reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu | 25 |
| 3.14. Statistička analiza | 26 |
| 4. REZULTATI | 27 |
| 4.1. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na energetske unos, telesnu masu, relativnu masu srca, krvni pritisak i srčanu frekvenciju eksperimentalnih životinja | 27 |
| 4.2. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na odnos AA/EPA i AA/DHA u ukupnim lipidima plazme i srca pacova..... | 28 |
| 4.3. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaze, ChREBP i Nox4 u srcu mužjaka pacova | 29 |
| 4.4. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ekspresiju molekula RAS-a u srcu mužjaka pacova..... | 33 |
| 4.4.1. Nivo proteina ACE i ACE2 | 33 |
| 4.4.2. Nivo iRNK i proteina AT1R i AT2R..... | 34 |
| 4.5. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo NF-κB u srcu pacova..... | 35 |
| 5. DISKUSIJA..... | 37 |
| 5.1. Uticaj ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na telesnu masu, relativnu masu srca, krvni pritisak i srčanu frekvenciju pacova..... | 37 |
| 5.2. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na odnos AA/EPA i AA/DHA u ukupnim lipidima plazme i srca pacova..... | 38 |
| 5.3. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo AMPK, SIRT1, FoxO3a, MnSOD, katalaze, ChREBP i Nox4 u srcu pacova..... | 38 |
| 5.4. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ekspresiju komponenata RAS-a u srcu mužjaka pacova..... | 41 |
| 5.5. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo NF-κB u srcu pacova..... | 43 |
| 5.6. Shematski prikaz povezanosti RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u MetS-u | 44 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 45 |
| 7. LITERATURA | 46 |

1. UVOD

1.1. Ishrana bogata fruktozom

Fruktoza je prost monosaharid koji je u prirodi zastupljen u voću (5–10% ukupnog sadržaja šećera), medu (>10% ukupnog sadržaja šećera) i u manjoj meri u povrću. Unos fruktoze putem konzumacije voća i povrća je nizak (oko 15 grama na dan) jer se u prirodi fruktoza nalazi u kombinaciji sa vlaknima koja brzo dovode do osećaja sitosti, te doprinose da se šećer apsorbira sporo i obezbeđuju organizam energijom u dužem periodu. Međutim, u savremenom načinu ishrane upotreba fruktoze nije prirodna i umerena jer je u prehrambenoj industriji fruktoza zastupljena kao zaslađivač u gotovo svim industrijskim proizvodima, kako u obliku disaharida saharoze (50% fruktoze), tako i u obliku kukuruznog sirupa sa visokim sadržajem fruktoze (engl. *High Fructose Corn Syrup*, HFCS, 42-90% fruktoze) (Basciano i sar., 2005).

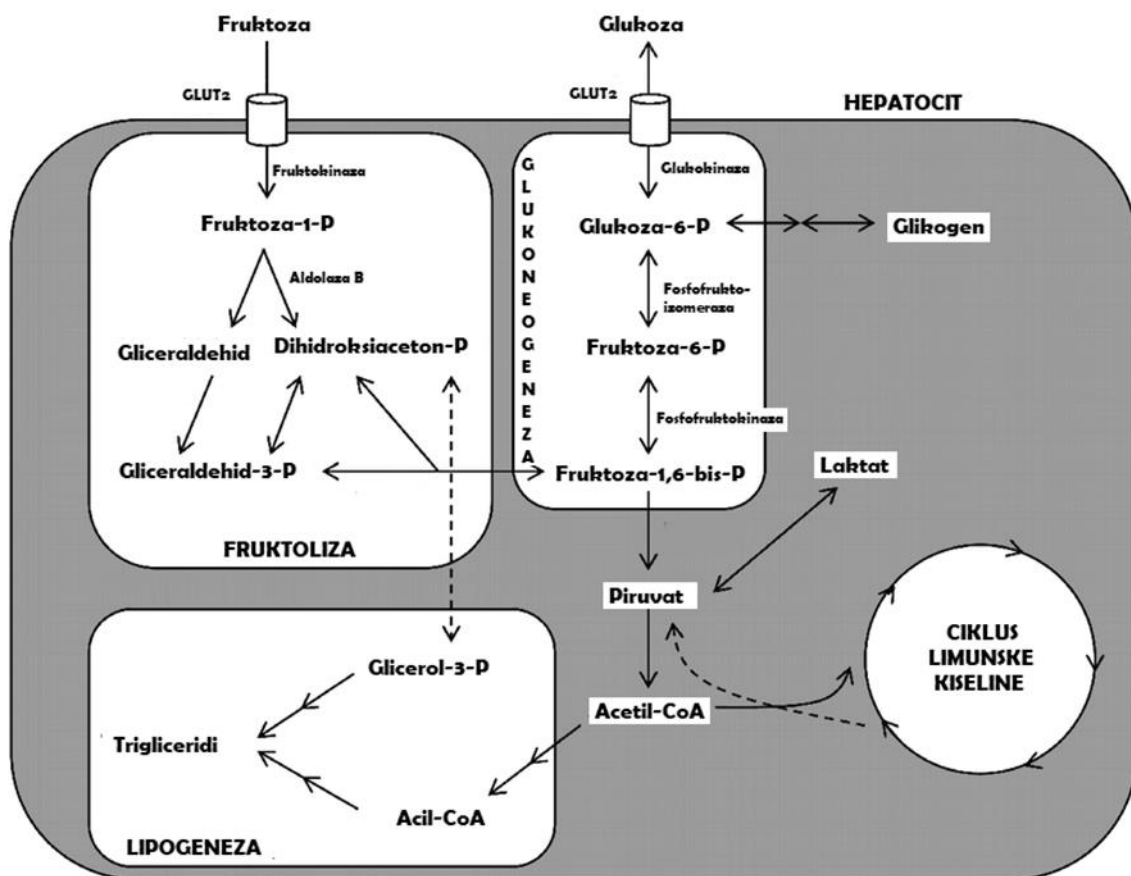
Saharozu se dobija iz šećerne trske i šećerne repe. To je disaharid sastavljen od jednog molekula fruktoze i jednog molekula glukoze koji su vezani α -1,2-glikozidnom vezom koja podleže razgradnji u digestivnom traktu pomoću enzima saharaze kako bi nastali molekuli monosaharida koji se kao takvi transportuju u krvotok.

HFCS se dobija iz kukuruznog skroba enzimskom izomerizacijom dela glukoze u fruktozu. Ušao je u upotrebu ranih 1970-ih godina, a od sredine 1980-ih počela je njegova masovna upotreba u industriji bezalkoholnih pića. HFCS ima prednost kao zaslađivač u odnosu na saharozu zbog veće slatkoće i niže cene. U proizvodnji bezalkoholnih pića kao zaslađivač se najviše koristi HFCS koji sadrži 55% fruktoze. Molekuli glukoze i fruktoze su u nevezanom obliku u HFCS-u tako da se ovi šećeri brzo transportuju u krvotok, pri čemu fruktoza ide direktno u jetru gde pokreće proces lipogeneze (Khorshidian i sar., 2021).

Povećana konzumacija fruktoze u poslednjih nekoliko decenija korelira sa povećanom stopom gojaznosti i hipertenzije i veruje se da ima ključnu ulogu u nastanku epidemije metaboličkih poremećaja (Johnson i sar., 2007).

1.1.1. Metabolizam fruktoze

Za razliku od strogo regulisanog metabolizma glukoze koja predstavlja primarni izvor energije u svim ćelijama, u kojima se direktno i metaboliše, metabolizam fruktoze je gotovo neregulisan i odvija se najvećim delom u jetri (Douard i Ferraris, 2008). Sa evolucionog stanovišta ovakva neregulacija je opravdana jer je upotreba slobodne fruktoze u ishrani naših predaka bila zanemarljiva. Ugljeni hidrati su prirodno konzumirani uglavnom u obliku skroba ili u kombinaciji sa biljnim vlaknima metabolišući se do pojedinačnih molekula glukoze čiji se nivo u cirkulaciji reguliše insulinom (koga luče β -ćelije pankreasa), koji stimuliše preuzimanje glukoze u ćelijama skeletnih mišića, masnog tkiva i srca. Nakon toga lučenje insulina se smanjuje negativnom povratnom spregom.



Slika U1. Metabolizam fruktoze i glukoze (preuzeto i modifikovano sa https://www.researchgate.net/figure/Hepatic-fructose-metabolism-provides-substrate-for-multiple-metabolic-pathways-Ingested_fig1_319507329)

Fruktoza, sa druge strane, ne stimuliše sekreciju insulina, pa u ćelije jetre ulazi posredstvom transportera iz familije glukoznih transportera (engl. *Glucose Transporter*, GLUT) koji nisu regulisani insulinom (GLUT5 i GLUT2), procesom olakšanog transporta. Metabolizam fruktoze se odvija kroz proces fruktolize koja se razlikuje od glikolitičkog puta kome podleže glukoza u nekoliko ključnih reakcija (**Slika U1**). Naime, za razliku od glukoze koja se kataboliše posredstvom enzima glukokinaze i fosfofruktokinaze, fruktoza se fosforiliše uz pomoć enzima fruktokinaze do fruktozo-1-fosfata, a on se posredstvom aldolaze B konvertuje u trioze, dihidroksiaceton fosfat (DHAP) i gliceraldehid. Obe ove trioze se mogu konvertovati u gliceraldehid-3 fosfat (izomerizacijom, odnosno fosforilacijom) koji je intermedijer glikolize. Fruktoza, dakle, ulazi u glikolitički put zaobilazeći negativnu povratnu spregu fosfofruktokinaze kao glavnog regulatornog enzima glikolize. To ima za posledicu neograničen ulazak fruktoze u ovaj proces, što dovodi do akumulacije fosforilisanih supstrata i velike potrošnje ATP-a, što, sa druge strane, aktivira enzime purinskog metabolizma koji degraduju adeninske nukleotide do urične kiseline (Collino, 2011).

Fruktozni metaboliti se najvećim delom konvertuju u glukozu i laktat koji se koriste kao izvor energije u ćelijama širom organizma (Sun i sar., 2012). Jedan deo ove glukoze se u jetri konvertuje u glikogen, procesom glikogeneze. Međutim, nakon što se obnove rezerve glikogena u jetri, značajan deo fruktoznih metabolita može biti iskorišćen za sintezu masnih kiselina *de novo* lipogenezom u jetri koja započinje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata do acetil-CoA, kao prekursora za sintezu slobodnih masnih

kiselina (SMK). Esterifikacijom SMK glicerol-3-fosfatom koji nastaje redukcijom DHAP, dolazi do sinteze triglicerida (TG). TG se deponuju u jetri ili se pakuju u lipoproteine veoma niske gustine (engl. *Very Low Density Lipoproteins*, VLDL) i oslobađaju u cirkulaciju gde podležu hidrolizi lipoproteinskom lipazom, čime ponovo nastaju SMK i monoacilglicerol. Za razliku od fruktoznih metabolita, manje od jednog procenta glukoznih metabolita se direktno konvertuje u TG plazme (Sun i sar., 2012), zahvaljujući procesima glukoneogeneze, glikogeneze i inhibicije glikolize i daljeg preuzimanja glukoze usled negativne povratne inhibicije enzima fosfofruktokinaze. Kao posledica povišenih koncentracija SMK u cirkulaciji, masno tkivo, skeletni mišići i srce intenzivno preuzimaju SMK kada su energetske potrebe organizma povećane. To može uzrokovati taloženje lipidnih intermedijera u ovim tkivima što može dovesti do insulinske rezistencije (IR) (Tappy i Le, 2010). S obzirom da insulin inhibira lipolizu, usled poremećaja u insulinskom delovanju, dolazi do intenzivne lipolize i oslobađanja masnih kiselina u plazmu (Delarue i Magnan, 2007). Dakle, povećana koncentracija SMK i urične kiseline u cirkulaciji su glavne posledice metabolizma fruktoze.

1.1.2. Ishrana bogata fruktozom i metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MetS) je skup metaboličkih poremećaja koji obuhvata abdominalnu gojaznost, IR, hiperinsulinemiju, hipertenziju i dislipidemiju (Tran i sar., 2009). Ovi poremećaji, sa druge strane, povećavaju rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KVB) i dijabetesa tipa 2 (T2D) (Eckel i sar., 2005). Etiologija MetS-a uključuje kompleksnu interakciju genetičkih, metaboličkih i sredinskih faktora, uključujući navike u ishrani.

Istraživanja su pokazala da dramatičan porast konzumacije fruktoze u obliku HFCS u poslednjih nekoliko decenija, kao zaslađivača u industrijskoj hrani i piću, predstavlja glavni uzrok razvoja većine karakteristika MetS-a (Taskinen i sar., 2019). Stimulacija lipogeneze leži u osnovi mehanizama kojima fruktoza dovodi do razvoja metaboličkih poremećaja. Energetska homeostaza je poremećena jer fruktoza ne stimuliše oslobađanje hormona sitosti - insulina i leptina (iz ćelija masnog tkiva), pa se zaobilazi kontrola posredstvom centara u hipotalamusu, koja rezultuje inhibiranjem unosa hrane i povećanjem potrošnje energije. Čak se stimuliše apetit jer ishrana bogata fruktozom povećava koncentraciju hormona grelina (Elliott i sar., 2002).

Metabolički poremećaji se javljaju u glavnim ciljnim tkivima za insulin (jetri, mišićima i masnom tkivu). Međutim, fruktoza indukuje pojavu IR i u srcu (Mellor i sar., 2011), s obzirom da je i ono target delovanja insulina. U stanju IR receptori za insulin, na površini ćelija skeletnih mišića, masnog tkiva i srca, imaju smanjeni odgovor na delovanje insulina pa je mobilizacija glukoznih transportera i transport glukoze u ćeliju otežan što dovodi do hiperglikemije i posledične hiperinsulinemije jer nepreuzeta glukoza u cirkulaciji stimuliše ćelije pankreasa da luče insulin (Schinner i sar., 2005).

IR je povezana i sa hipertrigliceridemijom jer povećani nivo insulina stimuliše *de novo* lipogenezu i sintezu TG, pa u stanju IR dolazi do intenzivnog oslobađanja TG u cirkulaciju. Zbog toga se MetS karakteriše povećanjem nivoa TG u jetri i u cirkulaciji (Choi i Ginsberg, 2011).

Studije su pokazale da ishrana bogata fruktozom dovodi do pojave hipertenzije posredstvom nekoliko mehanizama (Klein i Kiat, 2015). Povećana apsorpcija soli u intestinumu i smanjeno izlučivanje soli u bubrezima doprinosi povećanju krvnog pritiska pre svega zahvaljujući transporterima u ovim organima koji su pozitivno regulisani

fruktozom što je pokazano u eksperimentima kod glodara (Soleimani, 2011). Endotelne ćelije imaju ključnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa kroz sintezu i oslobađanje faktora kontrakcije i relaksacije. Ishrana bogata fruktozom izaziva endotelnu disfunkciju, smanjujući produkciju azot oksida (NO), važnog medijatora vazodilatacije (Okamura i sar., 2014), uz povećanje nivoa vazokonstriktora, kao što su endotelin-1 (ET-1) i tromboksan A2 (TXA2) (Jiang i sar., 2007).

Ishrana bogata fruktozom povećava aktivnost i ekspresiju angiotenzina II (Ang II), glavne komponente renin-angiotenzin sistema (RAS), koji ostvaruje vazokonstrukciju stimulacijom Ang II receptora u glatkim mišićnim ćelijama vaskulature (Tran i sar., 2009, Shinozaki i sar., 2004). Ang II stimuliše i aktivnost nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, NADPH) oksidaze (Nox), koja je odgovorna za produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (RVK), uključujući superoksid anjon radikal (O_2^-) koji inaktivira NO usled stvaranja peroksinitrita ($ONOO^-$) (Cuzzocrea i sar., 2004), a može smanjiti i njegovu produkciju u endotelu oksidacijom ključnog kofaktora endotelne azot oksid sintaze (eNOS) (Schulz i sar., 2008). Ang II, ET-1 i TXA2 stimulišu ekspresiju matriks metaloproteinaza (MMP) koje degraduju eNOS, smanjujući produkciju NO (Nagareddy i sar., 2012), čime se opet povećava pritisak.

Nivo metilglioksala, visoko reaktivnog dikarbonilnog molekula, koji nastaje kao nusprodukt metabolizma fruktoze i glukoze, značajno je povećan u aorti pacova na fruktoznoj ishrani (Dhar i sar., 2013). Metilglioksal je važan prekursor AGE proteina (engl. *Advanced Glycation End products*) koji nastaju kada karbonilne grupe aldehida kao što je metilglioksal reaguju sa slobodnim amino grupama u proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama. AGE proteini, vezujući se za svoj receptor (RAGE) u endotelu, aktiviraju Nox, uzrokujući RVK-posredovanu inaktivaciju NO (Wautier i sar., 2001), što je još jedan način regulacije pritiska.

Hiperuricemija, kao jedna od glavnih posledica metabolizma fruktoze uzrokuje endotelnu disfunkciju promovisanjem oksidativnog stresa što za posledicu ima inaktivaciju endotelnog NO (Jia i sar., 2014). Osim toga, urična kiselina indukuje ekspresiju C-reaktivnog proteina (CRP) u vaskularnom endotelu, koji inhibira oslobađanje NO (Kang i sar., 2005). Inflamacija uzrokovana ishranom bogatom fruktozom takođe utiče na reaktivnost vaskularnog endotela (Glushakova i sar., 2008).

Hronična stimulacija simpatičkog nervnog sistema (SNS), pre svega kao rezultat hiperinsulinemije, takođe dovodi do pojave hipertenzije (Tran i sar., 2009). Sa druge strane, hronična stimulacija SNS-a povećava IR, čime se uspostavlja pozitivna povratna sprega (Tran i sar., 2009). Povećano oslobađanje kateholamina, kao rezultat hronične stimulacije SNS, povećava produkciju RVK-a u endotelnim ćelijama pacova, uzrokujući hipertenziju RVK-posredovanom inaktivacijom NO (Fu i sar., 2006).

Procenjuje se da jedna četvrtina svetske populacije pati od višestrukih poremećaja metabolizma. Oko 3.2 miliona ljudi godišnje umre od posledica T2D, kao jednog od glavnih ishoda MetS-a. Osobe sa T2D imaju 2 - 4 puta veći rizik za razvoj KVB, koje su odgovorne za najveći broj smrtnih slučajeva kod osoba sa MetS i T2D (između 50% i 80%) (Tabish, 2007).

1.2. Životinjski model metaboličkog sindroma

Za izučavanje etiologije MetS-a kod ljudi uglavnom se koristi laboratorijski pacov soja Wistar, muškog ili ženskog pola, koji se podvrgava ishrani obogaćenoj 10% ili 20% rastvorom fruktoze (Dai i McNeill, 1995), što najvernije oponaša današnji način ishrane

industrijskom hranom obogaćenom fruktozom, gaziranim pićima i zaslađenim voćnim sokovima (između 7% i 15% fruktoze) (Dills, 1993). Eksperimentalno se primenjuje i 60% fruktoza u hrani (Nakagawa i sar., 2006) ili vodi (Wong i Johns, 1999) kod glodara.

Različite koncentracije i načini administracije fruktoze, kao i dužina trajanja tretmana mogu dovesti do manifestacije različitih komponenata MetS-a (Sanchez-Lozada i sar., 2007). Naročito je važno da se ovakva istraživanja sprovedu kod mladih pacova zbog donošenja zaključaka vezanih za preporuke u ishrani adolescenata koji su najveći konzumenti industrijskih napitaka i hrane zaslađene sa HFCS, čime značajno povećavaju rizik za raniji razvoj T2D i KVB (Yi i sar., 2014).

Istraživanja su pokazala da pacovi hranjeni fruktozom unose za oko 10-20% više kalorija u odnosu na životinje na standardnoj ishrani (Kanarek i Orthen-Gambil, 1982), što može dovesti do povećanja telesne mase (D'Angelo i sar., 2005), u zavisnosti od starosti životinja (Huynh i sar., 2008) i razvoja leptinske rezistencije (Shapiro i sar., 2008). Konzumacija fruktoze promovira stvaranje lipidnih depozita pre svega u visceralnom masnom tkivu, naročito kod muškaraca (Stanhope i sar., 2009).

Brojne studije su pokazale da ishrana bogata fruktozom kod glodara dovodi do razvoja različitih simptoma MetS-a kao što su hipertrigliceridemija, IR, hiperinsulinemija, visceralna gojaznost, hipertenzija i hiperglikemija (Tran i sar., 2009, Machi i sar., 2012, Mostarda i sar., 2012, Sanches i sar., 2012). Ovaj životinjski model je pogodan i za proučavanje hronične inflamacije koja prati MetS, a koja se karakteriše povećanom koncentracijom proinflamatornih citokina u cirkulaciji (Pektas i sar., 2016).

1.3. Metabolička inflamacija

Prekomerni unos hranljivih materija povezan je sa sistemskom inflamacijom niskog intenziteta i dužeg trajanja, koja se razlikuje od akutne ili hronične inflamacije podstaknute infekcijom ili autoimunošću (Kopp i sar., 2009). Ona ne izaziva masivno oštećenje tkiva, ali narušava metaboličku ravnotežu i naziva se metabolička ili metainflamacija (Hotamisligil, 2006). Neki autori je označavaju i kao parainflamacija, kako bi definisali intermedijerno stanje (Medzhitov, 2008). Inflatorni proces koji karakteriše MetS ima svoje jedinstvene karakteristike i mehanizme koji još uvek nisu dovoljno istraženi.

Osnovna uloga adipocita je skladištenje viška energije u obliku TG, lipoliza i oslobađanje SMK u cirkulaciju koje se koriste kao izvor energije u mišićima. Međutim, prekomerni unos fruktoze dovodi do hipertrofije i hiperplazije adipocita (Halberg i sar., 2008) što uzrokuje nedovoljno snabdevanje ovih ćelija krvlju, uzrokujući hipoksiju koja izaziva nekrozu adipocita (Cinti i sar., 2005). Nekrotični adipociti oslobađaju hemokine i citokine koji uzrokuju infiltraciju makrofaga u adipozno tkivo (Donath i Shoelson, 2011). Makrofagi vrše fagocitozu nekrotičnih adipocita i proizvode proinflamatorne faktore kao što su hemokini. Lokalizovana inflamacija u adipoznom tkivu pokreće sistemsku inflamaciju jer brojni adipocitokini oslobođeni iz nekrotičnih adipocita, uključujući CRP, faktor nekroze tumora α (engl. *Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α) i interleukine IL-1 β , IL-6 i IL-17, putem cirkulacije dospevaju u druga insulin-zavisna tkiva kao što su jetra, mišići i srce (Trayhurn i Wood, 2004) izazivajući infiltraciju imunskih ćelija (makrofaga i T limfocita) u ova tkiva (Greevenbroek i sar., 2013). Na ovaj način se ostvaruje veza između MetS, inflamacije i KVB ili drugih bolesti. Sistemsku inflamaciju karakteriše i smanjena sinteza antiinflamatornog adiponektina (Ouchi i sar., 2011).

Iz nekrotičnih adipocita dolazi do oslobađanja velike količine SMK, što može izazvati stres endoplazmatskog retikuluma i aktivaciju proinflamatornih signalnih puteva (Zhang i Kaufman, 2008). U stanju narušene metaboličke ravnoteže, hiperoksidacije masti i ugljenih hidrata u mitohondrijama dovodi do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika koje stimulišu aktivnost inflamatornih kinaza (Kamata i sar., 2005).

Tokom hiperglikemije dolazi do neenzimske glikozilacije proteina na lizinskim i argininskim ostacima, što dovodi do stvaranja AGE proteina. Iako je formiranje ovih proteina u korelaciji sa hiperglikemijom, fruktoza proizvodi 10 puta više AGE nego glukoza (Goldin i sar., 2006). Formiranje AGE ima direktne i indirektne efekte povezane sa MetS-om. Direktno, AGE utiču na integritet proteina, kao što je npr. smanjena rastvorljivost kolagena i elastina (McCance i sar., 1993), čime doprinose razvoju ateroskleroze. Indirektno, preko nizvodnih efekata, AGE uzrokuju inflamaciju i oksidativni stres, koji doprinose patogenezi MetS-a. Naime, stimulacija receptora sličnog Toll-u (engl. *Toll-like Receptor*, TLR) od strane AGE proteina pokreće unutarćelijsku kaskadu koja rezultuje aktivacijom transkripcionog faktora NF- κ B (engl. *Nuclear Factor-kappa B*) i transkripcijom gena koji kodiraju inflamatorne citokine i hemokine i pokreću inflamaciju u odgovoru na hiperglikemiju. Osim toga, AGE proteini vezivanjem za RAGE u endotelu, dovode do aktivacije Nox-a i povećane intraćelijske produkcije RVK-a koja, sa druge strane, aktivira NF- κ B i transkripciju gena za proinflamatorne citokine, intenzivirajući inflamatorni odgovor (Nowotny i sar., 2015).

Inflamacija prethodi razvoju IR koja leži u osnovi MetS-a. Naime, u normalnim uslovima, insulin se vezuje za insulinski receptor na površini ćelija što pokreće intraćelijsku signalnu kaskadu posredovanu tirozinskom fosforilacijom supstrata za insulinski receptor (engl. *Insulin Receptor Substrate-1*, IRS-1) koja aktivira AKT kinazu, a ona indukuje mobilizaciju glukoznih transportera (GLUT4) koji vrše transport glukoze u ćeliju. U stanju metainflamacije, aktivirani makrofagi oslobađaju citokine koji vezujući se za svoj receptor aktiviraju intraćelijske kinaze koje vrše inhibitornu serinsku fosforilaciju IRS-1 (Zhang i sar., 2008), inhibirajući IRS-AKT-GLUT signalni put što izaziva IR. Osim toga, ovi citokini posredstvom intraćelijskih kinaza mogu stimulisati aktivnost NF- κ B, što vodi povećanoj produkciji proinflamatornih citokina i indirektnoj inhibiciji insulinske signalne kaskade. Oksidativni stres koji nastaje u stanju narušene metaboličke ravnoteže takođe može da dovede do razvoja IR, direktno, inhibicijom IRS-1 ili indirektno, preko aktivacije NF- κ B i povećanja produkcije citokina (Qatanani i Lazar, 2007). Na ovaj način, oksidativni stres i inflamacija konvergiraju u zajedničke puteve povezane sa IR.

1.3.1. Metabolizam u srcu u fiziološkim uslovima i uslovima insulinske rezistencije

U fiziološkim uslovima, masne kiseline dugih lanaca predstavljaju dominantan supstrat za proizvodnju energije u srcu (60–70%). Pored masnih kiselina, energija potrebna za rad srčanog mišića, potiče iz mitohondrijalne oksidacije glukoze (20%) i laktata (10%) (Bertrand i sar., 2008). Fruktoza se takođe koristi kao energetski supstrat u srcu, s obzirom na to da kardiomiociti ekspiriraju fruktoza-specifični GLUT5 transporter (Karaca i sar., 2016). Srce se snabdeva masnim kiselinama najvećim delom iz cirkulacije, s obzirom da ima mali kapacitet za *de novo* lipogenezu. 70–90% masnih kiselina koje uđu u ćeliju podležu oksidaciji u mitohondrijama, a 10–30% se skladišti u obliku TG (Stanley i sar., 2005). Glukoza potrebna za rad srca potiče iz cirkulacije ili iz unutarćelijskih depoa glikogena (Kodde i sar., 2007). Povišena koncentracija masnih kiselina u krvi dovodi do povećanog snabdevanja srčanog mišića masnim kiselinama i povećane β -oksidacije, što

ima za posledicu smanjenje nivoa glikolize i akumulaciju lipida u miokardu. Kardijačna lipotoksičnost dovodi do poremećaja u insulinskom signalnom putu, transportu glukoze i skladištenju glikogena u kardiomiocitima (Gray i Kim, 2011). Povećana oksidacija lipida u stanju narušene metaboličke ravnoteže u srcu, dovodi do nastanka velike količine RVK-a. To izaziva poremećaje u funkciji mitohondrija i apoptozu kardiomiocita, što dovodi do promena u strukturi i funkciji srca (Gray i Kim, 2011).

1.4. Oksidativni stres u metaboličkom sindromu

RVK se u organizmu konstantno stvaraju tokom normalnih fizioloških procesa, kao nusprodukti aerobnog metabolizma (endogeni izvori), ali mogu nastati i delovanjem različitih sredinskih faktora (egzogeni izvori), uključujući i neadekvatnu ishranu (Pejčić i sar., 2006). Poremećaj u ravnoteži između proizvodnje RVK-a i njihovog uklanjanja mehanizmima antioksidativne zaštite, dovodi do narušavanja redoks homeostaze u ćeliji i nastanka oksidativnog stresa koji se manifestuje oksidativnim oštećenjem ćelijskih biomolekula, kao i poremećajem signalne transdukcije i ekspresije gena, čime se remete normalne funkcije ćelija (Maritim i sar., 2003) i dolazi do razvoja MetS-a (Vona i sar., 2019).

Antioksidativni mehanizmi zaštite uklanjaju i inaktiviraju RVK u organizmu, enzimski (superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza) ili neenzimski (antioksidativni vitamini, GSH, cistein). Mnoga istraživanja ukazuju na ulogu n-3 masnih kiselina u podsticanju endogene antioksidativne zaštite, međutim, njihovi antioksidativni mehanizmi još uvek nisu dovoljno ispitani. Visok unos suplemenata koji sadrže n-3 polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) povezan je sa nižom stopom oboljevanja od KVB i drugih oboljenja u čijoj patogenezi leži oksidativni stres (Calder, 2015).

Nekoliko istraživanja je pokazalo da pacijenti sa MetS-om imaju smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima u plazmi, kao i povećane nivoe markera oksidativnih oštećenja, uglavnom lipidne peroksidacije (Bekkouche i sar., 2014). Osim toga, direktni efekti fruktoze na oksidativni stres pokazani su u studijama u kojima su pacovi hranjeni fruktozom tretirani antioksidansima, što je dovelo do smanjenog stvaranja RVK-a i sprečavanja IR (Song i sar., 2005).

Povećanje produkcije RVK-a u srcu može biti posledica aktivacije RAS-a, što je pokazano kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Giacchetti i sar., 2000). Naime, ustanovljeno je da je hronična administracija Ang II povezana sa prekomernom produkcijom RVK-a koja je posredovana aktivacijom Nox-a (Delbosc i sar., 2002).

1.4.1. Oksidativni stres u srcu

Oksidativni stres dovodi do inhibicije insulinske signalne kaskade u srcu, direktno - serinskom fosforilacijom IRS-1 ili indirektno, preko aktivacije NF- κ B i povećanja produkcije citokina (Qatanani i Lazar, 2007). RVK uzrokuju i poremećaj u signalizaciji kalcijuma, što dovodi do promene dinamike relaksacije i kontrakcije srčanog mišića i rezultuje dijastolnom i sistolnom disfunkcijom (Barouch i sar., 2002). Oksidativni stres u srcu karakteriše i povećano oslanjanje na masne kiseline u poređenju sa glukozom kao izvorom energije, što uzrokuje lipidnu akumulaciju i disfunkciju srca (Bayeva i sar., 2013). Takođe doprinosi i razvoju inflamacije u srcu (Kamata i sar., 2005), s obzirom da RVK regrutuju cirkulišuće inflamatorne ćelije aktivacijom ekspresije hemokina, integrina neutrofila i adhezivnih molekula, što može pokrenuti disfunkciju i apoptozu kardiomiocita i uzrokovati remodelovanje, fibrozu, hipertrofiju i srčanu insuficijenciju.

1.4.2. AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza antioksidativna osa

Nedavna istraživanja ukazuju na snažnu vezu između energetske homeostaze u ćeliji i aktivacije imunskih ćelija i pokretanja inflamacije u odgovoru na ćelijska i tkivna oštećenja (Weinberg i sar., 2015). To je potkrepljeno otkrićem da AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK), pored uloge u održavanju energetske homeostaze u ćeliji, pre svega aktivacijom metabolizma lipida i ugljenih hidrata (Sambandam i Lopaschuk, 2003), ima ulogu u regulaciji metaboličke inflamacije (Lyons i sar., 2016). Studije na ljudima i eksperimentalnim životinjama pokazale su negativnu asocijaciju između inflamacije izazvane ishranom i aktivnosti AMPK (Ruderman i sar., 2013). Štaviše, ishrana sa visokim sadržajem masti ili fruktoze aktivira inflamaciju inhibicijom AMPK signalnog puta u srcu (Ko i sar., 2009, Zhao i sar., 2017). Osim toga, nekoliko direktnih ili indirektnih aktivatora AMPK su već u kliničkoj upotrebi kao potencijalna terapija u lečenju metaboličkih bolesti (Steinberg i Carling, 2019).

AMPK se sastoji od tri subjedinice - katalitičke α subjedinice, koja sadrži kinazni domen, i dve regulatorne subjedinice, β i γ . Aktivira se u odgovoru na negativan energetski bilans (povećan odnos AMP/ATP), posredstvom nekoliko uzvodnih kinaza koje katalizuju fosforilaciju katalitičke α subjedinice na Thr172 uz prisustvo AMP.

Aktivacija AMPK u T ćelijama promovira njihov prelazak sa proinflamatornog na antiinflamatorni fenotip, kroz represiju aerobne glikolize i aktivaciju mitohondrijskog oksidativnog metabolizma (O'Neill i Hardie, 2013).

Pokazano je da AMPK sprečava razvoj metaboličke inflamacije putem inhibicije NF- κ B, posredstvom nizvodnih medijatora, kao što je sirtuin 1 (SIRT1) (Salminen i sar., 2011). Naime, SIRT1 deacetiluje RelA/p65 subjedinicu NF- κ B, čime inicira ubikvitinaciju i degradaciju NF- κ B (Yang i sar., 2010). Stoga, poremećena regulacija energetskih senzora, AMPK i SIRT1, povezuje metabolizam nutrijenata sa inflamacijom i posledičnom IR.

Istraživanja su pokazala da SIRT1 ima centralnu ulogu u povezivanju imunskog odgovora i metabolizma. SIRT1-posredovana regulacija reprogramiranja ćelijskog metabolizma (Chang i Guarente, 2014) je usko povezana sa ulogom SIRT1 u funkciji dendritskih ćelija i urođenoj imunosti. Naime, pokazano je da nedostatak SIRT1 dovodi do promena mitohondrijske funkcije i metaboličkog fenotipa, što rezultuje aktivacijom sinteze masnih kiselina i dovodi do poremećaja u regulaciji urođenog i adaptivnog imunskog odgovora (Elesela i sar., 2020). Nedavna istraživanja podržavaju ulogu SIRT1 u prelasku rane u kasnu fazu inflamacije (Raud i sar., 2018).

Osim uloge u inhibiciji metaboličke inflamacije, AMPK i SIRT1 takođe sprečavaju razvoj oksidativnog stresa (Price i sar., 2012). Naime, SIRT1 deacetiluje transkripcioni regulator, FoxO3a (engl. *Forkhead box O3*), promovirajući njegovu defosforilaciju, jedarnu akumulaciju i inicijaciju FoxO3a - zavisne genske transkripcije (Olmos i sar., 2013). FoxO3a reguliše ekspresiju gena uključenih u antioksidativnu odbranu, kao što su mitohondrijska mangan superoksid dismutaza (MnSOD) i katalaza (Kops i sar., 2002, Tan i sar., 2008). MnSOD se nalazi u mitohondrijskom matriksu i peroksizomima i predstavlja prvu liniju odbrane od mitohondrijskog O²⁻ jer katalizuje njegovu dismutaciju u molekularni kiseonik i vodonik peroksid, sprečavajući na taj način superoksid-posredovanu inaktivaciju NO. Katalaza katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i molekularnog kiseonika. Nalazi se u peroksizomima svih tkiva sisara, kao i u citosolu retikulocita i zrelih eritrocita.

Dakle, AMPK i SIRT1 ostvaruju iste efekte u pogledu inflamacije i oksidativnog stresa, pri čemu ova dva molekula aktiviraju jedan drugog, sugerirajući postojanje AMPK-

SIRT1 ciklusa koji povezuje energetska i redoks stanje u ćeliji (Ruderman i sar., 2010). Istraživanja su pokazala da je regulacija AMPK i SIRT1 poremećena kako kod ljudi tako i kod eksperimentalnih životinja sa MetS-om, što ukazuje na ulogu ovih metaboličkih senzora u promociji patogeneze MetS-a (Ruderman i sar., 2010).

Pored regulacije gena uključenih u antioksidativnu odbranu, SIRT1 inaktivira NADPH oksidazu 4 (Nox4) u kardiomiocitima (Cheng i sar., 2010) i aorti pacova (Zarzuelo i sar., 2013), što je od velikog značaja, s obzirom da je Nox4 glavni izvor mitohondrijskog oksidativnog stresa (Kuroda i sar., 2010). Naime, Nox enzimi su familija transmembranskih proteina koji katalizuju transfer jednog elektrona sa NADPH na molekularni kiseonik, čime nastaje O^{2•}. Osnovna biološka uloga Nox-posredovanog formiranja RVK-a je eliminacija patogena u makrofagima i neutrofilima.

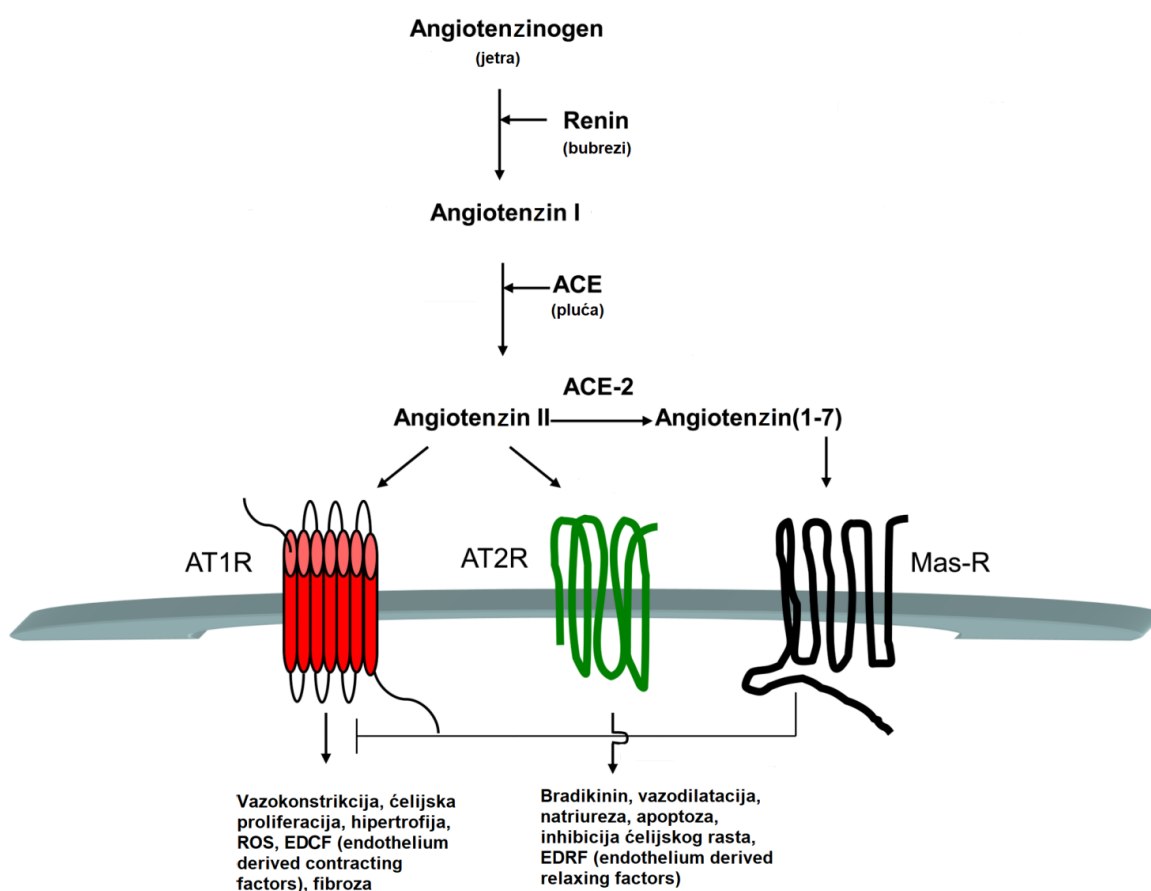
Ekspresija SIRT1 može biti inhibirana direktnim vezivanjem ChREBP (engl. *Carbohydrate Response-Element-Binding Protein*) za njegov promotor u metabolički aktivnim tkivima (Noriega i sar., 2011). ChREBP reguliše gensku transkripciju u glikolizi/fruktolizi i *de novo* lipogenezi (Iizuka i sar., 2004), što ukazuje na važnu ulogu ovog molekula u patogenezi metaboličkih poremećaja. Aktivacija ChREBP zavisi od koncentracije glukoze/fruktoze. Povećanje nivoa glukoze/fruktoze u hepatocitima stimuliše defosforilaciju ChREBP-a, njegovu translokaciju u jedro i vezivanje za promotorske sekvence ciljnih gena čija transkripcija obezbeđuje supstrat za sintezu masnih kiselina (piruvat kinaza) (Uyeda i Repa, 2006). Na ovaj način, ChREBP povezuje metabolizam ugljenih hidrata i lipida. Nedavna istraživanja potvrđuju kritičnu ulogu ChREBP u prevenciji inflamacije i apoptoze makrofaga u aterosklerozi, što ukazuje na značaj imunskog metaboličkog fluksa u hroničnim inflamatornim bolestima (Sarrazy i sar., 2015).

Pokazano je da ishrana bogata fruktozom inhibira antioksidativnu osu SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u srcu ovarijektomisanih ženki pacova (Bošković i sar., 2018). Takođe je ustanovljeno da Ang II, posredstvom svog receptora, AT1R, inhibira signalni put SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u mitohondrijama osteoblasta, izazivajući oksidativni stres (Li i sar., 2014). Na taj način, RAS je povezan sa molekulima puta antioksidativne odbrane.

1.5. Renin-angiotenzin sistem (RAS)

RAS je hormonski sistem koji reguliše krvni pritisak preko balansa elektrolita i volumena telesnih tečnosti u organizmu. Smanjenje bubrežne perfuzije stimuliše jukstaglomerularne ćelije bubrega da luče enzim renin koji proteolitički seče neaktivni zimogen angiotenzinogen, koji uglavnom luči jetra, konvertujući ga u angiotenzin I (Ang I). Ang I se zatim konvertuje u Ang II pomoću angiotenzin konvertujućeg enzima (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme*, ACE), koji se nalazi uglavnom u plućnom vaskularnom endotelu. Ang II reguliše krvni pritisak, ostvarujući vazokonstrikciju stimulacijom angiotenzinskih receptora u glatkim mišićnim ćelijama vaskulature. Ang II takođe stimuliše lučenje aldosterona iz kore nadbubrežne žlezde, a on stimuliše reapsorpciju natrijuma i vode od strane bubrežnih tubula. To povećava zapreminu tečnosti u organizmu, što izaziva povećanje krvnog pritiska. ACE homolog, ACE2 (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) proteolitički seče jednu aminokiselinu iz Ang II, smanjujući nivo Ang II u cirkulaciji, na račun povećanja nivoa angiotenzina 1-7 (Ang 1-7), koji ima kontraregulatornu ulogu u odnosu na Ang II i predstavlja glavnu komponentu deaktivirajuće kaskade RAS-a, za koju se veruje da ima značajne kardioprotektivne efekte.

Efekti Ang II se prvenstveno ostvaruju posredstvom dva G protein kuplovana receptora sa sedam transmembranskih domena, angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1R) i angiotenzin II receptor tipa 2 (AT2R). Ova dva receptora ostvaruju različite fiziološke efekte posredstvom različitih signalnih puteva (Mehta i Griendling, 2007). AT1R aktivira puteve koji podstiču oslobađanje aldosterona, vazokonstrikciju i povećanje krvnog pritiska, srčanu kontraktilnost, apsorpciju natrijuma od strane bubrežnih tubula, ćelijski rast i proliferaciju, ostvarujući štetne efekte Ang II (oksidativni stres, endotelna disfunkcija, IR i inflamacija) (Mehta i Griendling, 2007). Aktivacija AT2R izaziva suprotne efekte, kao što su vazodilatacija i hipotenzija, natriureza, inhibicija ćelijskog rasta i proliferacije apoptozom i moguća inhibicija AT1R (Mehta i Griendling, 2007, AbdAlla i sar., 2001). Efekti Ang 1-7 su posredovani Mas receptorima i ogledaju se u povećanoj produkciju NO i fosforilaciji AKT kinaze u kardiomiocitima (Dias-Peixoto i sar., 2008). Međutim, ovo je samo uprošćena slika RAS-a koji je daleko složeniji jer se novi članovi još uvek identifikuju (**Slika U2**).



Slika U2. Renin-angiotenzin sistem (RAS) (preuzeto i modifikovano sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022115/figure/F1/?report=objectonly>)

1.5.1. Angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1R)

AT1R su eksprimirani u svim organima, uključujući srce (kardiomiociti i fibroblasti) i vaskulaturu (glatke mišićne ćelije). Kod čoveka postoji samo jedan gen za AT1R, lokalizovan na hromozomu 3, dok su kod pacova i miša prisutna dva podtipa ovog gena – gen za AT1a receptor (AT1aR), lokalizovan na hromozomu 17 i gen za AT1b receptor

(AT1bR), lokalizovan na hromozomu 2. Većina dobro poznatih efekata Ang II posredovana je AT1 receptorima.

AT1aR i AT1bR se sastoje od 359 aminokiselina, sa molekulskom težinom od 40–41 kDa i sedam transmembranskih domena. Oni pripadaju superfamiliji G protein vezujućih receptora. Kod pacova, AT1a i AT1b receptori pokazuju 95% homologije u aminokiselinskim sekvencama u kodirajućem regionu, međutim prisustvo niske homologije (35%) u nekodirajućim regionima njihovih iRNK ukazuje na moguću diferencijalnu regulaciju ova dva gena.

Ekspresija gena za AT1aR i AT1bR je tkivno-specifična. AT1aR je dominantan u srcu i krvnim sudovima, dok je AT1bR u većoj meri prisutan u hipofizi i nadbubrežnim žlezdama (Shanmugam i Sandberg, 1996), pa bi AT1aR izoforma mogla biti značajnija u regulaciji krvnog pritiska od AT1bR izoforme (Chen i sar., 1997).

1.5.1.1. Mehanizmi delovanja AT1R

AT1R stimulišu brojne signalne puteve koji su, pre svega, posredovani G protein - zavisnim mehanizmima. Nakon aktivacije od strane AngII, AT1R se kupluje sa nekom od G proteinskih izoformi, što dovodi do aktivacije različitih nizvodnih efektoru, uključujući fosfolipazu C (PLC), fosfolipazu D (PLD) i fosfolipazu A2 (PLA2) (Mehta i Griendling, 2007).

Aktivacija PLC i PLD rezultuje kontrakcijom glatkih mišićnih ćelija posredstvom različitih nizvodnih medijatora, pa su ovi signalni putevi uključeni u patogenezu hipertenzije i hipertrofije srca. Aktivacija PLA2 posredstvom AT1R dovodi do produkcije arahidonske kiseline (AA) i njenog derivata, hidroksieikozatetraenske kiseline (HETE), koji ostvaruje hipertenzivni efekat putem vazokonstrikcije (Sarkis i sar., 2004), Nox-zavisnu oksidaciju i inflamaciju posredovanu aktivacijom NF- κ B (Rompe i sar., 2010).

AT1R posredstvom G proteinskih izoformi može aktivirati i tirozin kinaze (Src, Jak/STAT, FAK, Pyk2), kao i receptore koji imaju tirozin kinaznu aktivnost (insulinski receptor, receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) i receptor za faktor rasta trombocita (engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, PDGF-R)) (Mehta i Griendling, 2007). Aktivacijom ovih signalnih puteva, AT1R učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije, migracije i apoptoze. AT1R aktivira i serin/treonin kinaze kao što su PKC i MAPK (ERK 1/2, p38MAPK i JNK) koje su uključene u ćelijski rast i hipertrofiju (Mehta i Griendling, 2007).

Pored G protein-zavisnih efekata, aktivirani AT1R može stimulisati signalne puteve nezavisne od G proteina direktnim vezivanjem za signalne molekule, kao što su β -arrestin i tirozin kinaze, uključujući Cdc42, Src i Jak/STAT (Hunyady i Catt, 2006).

1.5.2. Angiotenzin II receptor tipa 2 (AT2R)

Kod pacova, miša i čoveka postoji samo jedan gen za AT2R koji je lokalizovan na X hromozomu. AT2R takođe pripada superfamiliji G protein - vezujućih receptora i ima sedam transmembranskih domena, sa molekulskom težinom od 41 kDa i 363 aminokiseline, koje dele samo 34% homologije sa aminokiselinskom sekvencom AT1R.

AT2R je visoko eksprimiran u fetalnom srcu i fetalnoj aorti, i u umerenoj količini u bubrezima, plućima i jetri. Međutim, njegova ekspresija naglo opada nakon rođenja, što sugeriše potencijalno važnu ulogu AT2R u razvoju fetusa (Shanmugam i Sandberg, 1996). Ekspresija gena za AT2R se može stimulisati u odraslom dobu u patološkim stanjima, tj. nakon oštećenja tkiva (Steckelings i sar., 2010), kao što je fibroza srca (Tsutsumi i sar.,

1998). Prekomerna ekspresija AT2R u srcu, međutim, dovodi do fatalnih posledica, ukazujući na mogući razlog gašenja njegove ekspresije u postnatalnom periodu života. Ang II se vezuje jednakim afinitetom za AT1R i AT2R, ali zbog dominantne ekspresije AT1R u većini adultnih tkiva, stimulacija Ang II obično izaziva fiziološki odgovor posredovan AT1R.

Pokazalo se da farmakološka stimulacija AT2R ima blagotvorne metaboličke efekte u različitim životinjskim modelima IR i T2D, pa bi farmakološka modulacija balansa između AT1R i AT2R mogla biti značajna u terapiji MetS i T2D, kao i smanjenju posledičnih kardiovaskularnih komplikacija (Paulis i sar., 2016). Rezultati nedavno objavljene studije, međutim, ukazuju da AT2R ima fiziološku ulogu u očuvanju insulinske osetljivosti kod ženskih, ali ne i kod muških miševa (Quiroga i sar., 2019).

1.5.2.1. Mehanizmi delovanja AT2R

AT2R ostvaruje proapoptotska, antiproliferativna, antiinflamatorna i vazorelaksirajuća svojstva, pa je uključen u fiziološke procese poput tkivnog remodelovanja, kontrole krvnog pritiska, natriureze i aktivnosti neurona.

AT2R svoje antiproliferativne i proapoptotske efekte u glatkim mišićnim ćelijama vaskulature, najverovatnije ostvaruje formiranjem heterodimera sa AT1R, pa se smatra G protein kuplovanim AT1R - specifičnim antagonistom (AbdAlla i sar., 2001). Opisana su tri glavna puta AT2R signalizacije - aktivacija puta protein fosfataza, aktivacija bradikinin/NO/cGMP puta i aktivacija PLA2 (Lemarie i Schiffrin, 2010). Aktivacija AT2R pomoću Ang II stimuliše proizvodnju bradikina koja rezultuje vazodilatacijom posredstvom nizvodnih medijatora, uključujući NO i cGMP (Bergaya i sar., 2004). Aktivacija PLA2 rezultuje proizvodnjom AA čiji derivat, epoksieikozatrienska kiselina (EET), ostvaruje antihipertenzivni efekat putem vazodilatacije (Campbell i sar., 1996), ali posreduje i u antiinflamatornim efektima putem inhibicije NF- κ B (Rompe i sar., 2010).

Stimulacija *de novo* ekspresije AT2R u srcu u patološkim stanjima može sprečiti formiranje neointime, ćelijsku proliferaciju i inflamaciju, što ukazuje na njegovu kardioprotektivnu ulogu.

1.5.3. Angiotenzin-konvertujući enzim (ACE)

ACE je ključni enzim RAS-a. To je cink metaloproteinaza koja funkcioniše kao dipeptidil karboksipeptidaza. Osnovna uloga ACE je da konvertuje neaktivni dekaeptid, Ang I u aktivni oktapeptid sa snažnim vazokonstriktorskim dejstvom, Ang II. ACE takođe inaktivira vazodilatator bradikinin (Erdos, 1976). Dve forme ACE, somatska i testikularna, kodirane su sa istog gena. Somatski ACE je visoko eksprimiran u endotelnim ćelijama vaskulature, a proizvode ga i drugi tipovi ćelija, uključujući makrofage, tubularni epitel i epitel creva. Somatski ACE ima dva nezavisna katalitička mesta sa različitim svojstvima koja postoje kao solubilne i membranski vezane forme. Germinativna forma ACE, koja se nalazi isključivo u testisima, ima jedno katalitičko mesto i uključena je u fertilitet. Pokazano je da ACE hidrolizuje Ang 1-7 do Ang 1-5 (Chappell i sar., 1998). U uslovima ACE inhibicije, ne samo da dolazi do povećanja u nivou njegovog supstrata Ang I, koji se može konvertovati u Ang 1-7 delovanjem endopeptidaza, već dolazi i do sprečavanja hidrolize Ang 1-7. Na taj način, inhibicija ACE dovodi do povećanja nivoa Ang 1-7 u plazmi, tkivu i urinu (Campbell i sar., 1999), čime se delimično ostvaruju antihipertenzivna dejstva ACE blokatora.

1.5.4. Angiotenzin-konvertujući enzim 2 (ACE2)

ACE2 je integralni membranski glikoprotein tipa 1 koji je eksprimiran u većini tkiva. Najveća ekspresija ACE2 detektovana je u vaskulaturi, bubrezima, plućima i srcu (Donoghue i sar., 2000). Vanćelijski domen ACE2 sadrži jednu katalitičku cink metalopeptidaznu subjedinicu koja pokazuje 42% identičnosti i 61% sličnosti sa sekvencom katalitičkog domena ACE (Donoghue i sar., 2000). Međutim, za razliku od ACE, ACE2 funkcioniše kao karboksipeptidaza, a njegova aktivnost nije antagonizovana konvencionalnim ACE inhibitorima (Rice i sar., 2004). Glavni supstrat za ACE2 je Ang II (Donoghue i sar., 2000, Rice i sar., 2004), čijim proteolitičkim sečenjem nastaje Ang 1-7, mada može katalizovati i proteolizu drugih peptida, sa manjim afinitetom, uključujući i Ang I.

Nakon karakterizacije ACE2, njegova funkcionalna uloga u srcu bila je donekle kontroverzna. Međutim, rezultati studije koju su objavili Mercure i saradnici ukazuju na blagotvorno dejstvo ACE2/Ang 1-7/MasR ose u srcu, napominjući da su kardioprotektivni efekti ACE2 rezultat direktne degradacije Ang II i inhibicije AT1R - posredovane signalizacije (Mercure i sar., 2008). Nedavne studije ističu antiinflamatornu i antifibrozu ulogu ACE2 u bubrezima i srcu, što ga čini potencijalnim targetom u terapiji KVB pored ACE inhibitora i AT1R blokatora (e Silva i Martins Teikeira, 2016). Mnoge studije ističu da Ang 1-7 ublažava manifestacije MetS-a redukcijom količine masnog tkiva i nivoa lipida u plazmi, kao i povećanjem osetljivosti na insulin i metabolizma glukoze (Liu i sar. 2011a, Santos i sar., 2010).

Farmakološka inhibicija ili genetička delecija ACE2 ima štetne efekte na srce (Kim i sar., 2010, Moritani i sar., 2013), dok povećana ekspresija ACE2 sprečava ove efekte i poboljšava funkciju srca (Huentelman i sar., 2005, Díez-Freire i sar., 2006, Dong i sar., 2012). Prema tome, povećanje ekspresije ACE2 može biti korisno u terapiji oboljenja koja se karakterišu aktivacijom RAS-a u srcu, kao što je to slučaj u MetS-u. Povećanje endogene ekspresije ACE2, pre svega upotrebom prirodnih jedinjenja, kao suplemenata u ishrani, znatno je pogodnije od egzogenog povećanja ACE2, upotrebom humanog rekombinantnog ili adenovirusnog ACE2 u animalnim modelima kardiometaboličkih poremećaja.

1.5.5. Lokalni RAS u srcu

U srcu je detektovana ekspresija svih komponenata RAS-a koji ima ulogu u regulaciji/modulaciji srčane i koronarne funkcije, apoptozi, inflamaciji, metabolizmu, rastu i remodelovanju srca. Ovaj tkivni RAS može da se aktivira nezavisno od sistemskog. Više od 90% Ang I i više od 75% Ang II u srcu, sintetiše se od strane kardiomiocita. ACE sintetišu fibroblasti i koronarne endotelne ćelije, a detektovana je i ekspresija ACE2. Kardiomiociti i fibroblasti eksprimiraju AT1R koji, nakon aktivacije Ang-om II, aktivira signalne puteve faktora rasta i indukuje fibrozu i hipertrofiju srca (Dostal, 2000). AT1R je uključen i u apoptozu koja je odgovorna za remodelovanje srca (Fiordaliso i sar., 2000). Prekomerna aktivacija RAS-a u srcu može uzrokovati smanjenu dijastolnu relaksaciju (Rothermund i sar., 2001), i dovesti do promena u sprovođenju električnog nadražaja uzrokujući aritmije (Healey i sar., 2005).

1.6. Transkripcioni faktor NF- κ B

Aktivacija transkripcionog faktora NF- κ B koja dovodi do povećane produkcije proinflammatoryh citokina ima centralnu ulogu u hroničnoj inflamaciji koja prati metaboličke poremećaje uzrokovane ishranom bogatom fruktozom (Gregor i Hotamisligil, 2011, Lumeng i Saltiel, 2011).

Familija transkripcionih faktora NF- κ B obuhvata pet članova: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB i c-Rel. NF- κ B je prisutan u ćeliji kao homo- ili heterodimer, pri čemu je najčešći u formi p65/p50 heterodimera.

U neaktivnom stanju, NF- κ B se nalazi u citoplazmi, u kompleksu sa inhibitornim proteinom (engl. *Inhibitor of κ B*, I κ B) koji maskira njegov signal za jedarnu lokalizaciju čime sprečava aktivaciju NF- κ B i njegov prelazak u jedro. Da bi se NF- κ B aktivirao, neophodno je da dođe do fosforilacije inhibitornog proteina I κ B. Vezivanje proinflammatoryh citokina (TNF- α i IL-1) za odgovarajući receptor dovodi do aktivacije I κ B kinaznog kompleksa (IKK) koji se sastoji od dve katalitičke subjediniice, IKK1 (IKK α) i IKK2 (IKK β) i regulatorne subjediniice NEMO (IKK γ). Ovaj kompleks vrši fosforilaciju proteina I κ B. SMK stimulišu β -oksidaciju u jetri tokom koje dolazi do oslobađanja peroksida koji takođe može da aktivira IKK β (Boden i sar., 2005). Fosforilacija I κ B dovodi do njegove ubikvitinacije i degradacije u proteazomima što rezultuje oslobađanjem NF- κ B i njegovom translokacijom u jedro (Wolf i sar., 2002). NF- κ B se u jedru vezuje za κ B regulatorne DNK sekvence i preko svog transaktivacionog domena reguliše transkripciju gena uključenih u brojne biološke procese kao što su inflamacija, imunski odgovor, proliferacija i apoptoza (Perkins, 2007). Pošto NF- κ B stimuliše transkripciju gena za proinflammatoryh citokine kao što su TNF- α , IL-1 β i IL-6, povećanje nivoa ovih citokina može biti i uzrok i posledica aktiviranog NF- κ B signalnog puta. Pored aktivacije ekspresije velikog broja hemokina i inflammatoryh citokina, koji inhibiraju signalni put insulina aktivacijom intraćelijskih kinaza (Zhang i sar., 2008), NF- κ B takođe može regulisati ekspresiju gena koji direktno utiču na signalizaciju insulina. U masnom tkivu i jetri je pokazano da NF- κ B povećava ekspresiju protein tirozin fosfataze 1B (PTP1B), glavnog negativnog regulatora insulina (Zabolotny i sar., 2008).

1.7. Veza između RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u metaboličkom sindromu

Istraživanja su pokazala da aktivacija RAS-a ima bitnu ulogu u razvoju MetS-a (Bundalo i sar., 2016). Ang II je uključen u patologiju MetS-a prvenstveno preko AT1R, uzrokujući vazokonstrikciju, oksidativni stres, endotelnu disfunkciju, IR i inflamaciju.

Kao što je već rečeno, AT1R - posredovana aktivacija Nox-a rezultuje produkcijom RVK-a uzrokujući oksidativni stres koji promovise inflamaciju, aktivacijom NF- κ B i transkripcijom gena za proinflammatoryh citokine (Wang i sar., 2012, Nowotny i sar., 2015). To utiče na signalni put insulina izazivajući IR (Zhang i sar., 2008). Na ovaj način su povezani RAS, oksidativni stres i inflamacija, kao ključni faktori u insulinskom signalnom putu koji leži u osnovi metaboličkih poremećaja (Nelson i Bremer, 2010). Kod animalnog modela sa hronično povećanim nivoom Ang II, oksidativni stres koji nastaje usled AT1R - posredovane aktivacije Nox-a, povećava remodelovanje srca i doprinosi razvoju IR u srcu (Whaley-Connell i sar., 2007). IR, uočena kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom, povezana je sa povećanom ekspresijom AT1R u aorti, kao i sa povećanom aktivnošću Nox-a (Shinozaki i sar., 2004). U animalnom modelu MetS-a, uzrokovanom ishranom bogatom fruktozom, pokazano je da blokada AT1R inhibira proinflammatoryh mehanizme u krvnim

sudovima, uključujući smanjenu ekspresiju NF- κ B i proinflamatornih citokina, i dovodi do normalizacije oksidativnog statusa u endotelu smanjujući produkciju superoksid anjona i aktivnost Nox-a, ukazujući na ulogu RAS-a i oksidativnog stresa u inflamatornim procesima u MetS-u (Renna i sar., 2012).

1.8. Polinezasićene masne kiseline (PUFA)

PUFA sadrže dve ili više dvostrukih veza, a klasifikuju se kao n-3 i n-6 PUFA, u zavisnosti od pozicije prve dvostruke veze u odnosu na terminalnu metil grupu. PUFA se sintetišu u većini biljaka, dok sisari nemaju sposobnost njihove sinteze, pa ih moraju biljnom ishranom unositi u organizam, zbog čega se označavaju kao esencijalne masne kiseline. To su linolna kiselina (LA, 18:2n-6), koja se uglavnom nalazi u ulju suncokreta i soje i predstavlja prekursor za sintezu dugolančanih n-6 PUFA (AA, 20:4n-6) i alfa-linoleinska kiselina (ALA, 18:3n-3) koja je zastupljena u lanenom ulju i prekursor je dugolančanih n-3 PUFA, eikozapentaenoične kiseline (EPA, 20:5 n-3) i dokozaheksanoične kiseline (DHA, 22:6n-3). Glavni izvori AA su meso i jaja, dok ribe, riblja ulja i orašasti plodovi obiluju sa EPA i DHA.

Eikozanoidi, važni medijatori i regulatori inflamacije, sintetišu se iz dugolančanih PUFA koje imaju 20 ugljenikovih atoma. Pošto membrane inflamatornih ćelija imaju veći udeo AA u odnosu na druge 20-C PUFA, AA je dominantni supstrat za sintezu eikozanoida. Povećan unos EPA i DHA iz suplemenata, kao što su orasi, rezultuje u povećanom sadržaju ovih PUFA u fosfolipidima ćelija uključenih u inflamaciju (Browning i sar., 2012). Pošto EPA, DHA i AA kompetiraju za iste enzime koji učestvuju u biosintezi eikozanoida, povećanjem sadržaja EPA i DHA u membranskim fosfolipidima, ove PUFA postaju dominantan supstrat za sintezu eikozanoida. Eikozanoidi sintetisani iz EPA su manje biološki potentni nego oni sintetisani iz AA (Calder, 2015) jer eikozanoidni receptori imaju manji afinitet za ove medijatore (Wada i sar., 2007). Osim toga, pokazano je da EPA inhibira metabolizam AA i da smanjuje ekspresiju gena za COX-2, enzima koji katalizuje produkciju eikozanoida iz AA (Calder, 2015). Nekoliko studija na životinjama je pokazalo da je produkcija eikozanoida iz AA, kao što je prostaglandin E2 (PGE2), smanjena nakon ishrane obogaćene sa EPA ili DHA (Yaqoob i Calder, 1995, Peterson i sar., 1998). Osim što modifikuju profil eikozanoida uključenih u inflamatorne procese, EPA i DHA smanjuju produkciju mnogih inflamatornih proteina uključujući citokine i adhezivne molekule (Calder, 2015, Yamada i sar., 2008), dok, sa druge strane, povećavaju koncentraciju antiinflamatornog citokina IL-10 (Calder, 2015). Ishrana obogaćena sa EPA smanjuje koncentraciju solubilnih molekula ICAM-1 i VCAM-1 u krvi pacijenata sa MetS-om (Yamada i sar., 2008).

Istraživanja su pokazala da n-3 PUFA deluju na signalne puteve koji kontrolišu gensku ekspresiju u inflamatornim ćelijama. Naime, pokazano je da PUFA inhibiraju diferencijaciju i aktivaciju dendritskih ćelija posredovanu LPS-om, što rezultuje izmenjenom ekspresijom površinskih molekula i smanjenom sekrecijom citokina (Zeyda i sar., 2005). Na taj način, PUFA smanjuju potencijal dendritskih ćelija da stimulišu aktivaciju T ćelija. U T ćelijama PUFA blokiraju aktivaciju JNK i NFAT, transkripcionog faktora odgovornog za produkciju IL-2, čime utiču na smanjenje proliferacije T ćelija (Zeyda i sar., 2003). Xue i sar. su pokazali da antiinflamatorni efekti n-3 PUFA u makrofagima mogu biti posredovani aktivacijom AMPK/SIRT1 puta, što rezultuje deacetilacijom p65 subjedine NF- κ B i posledičnom inhibicijom ekspresije gena za proinflamatorne medijatore (Xue i sar., 2012).

EPA i DHA su prekursori antiinflamatornih lipidnih medijatora (resolvina i protektina) koji ublažavaju i/ili vrše rezoluciju inflamacije (Bannenberg i sar., 2005), tako što stimulišu fagocitozu apoptotskih neutrofila od strane makrofaga, a takođe mogu da smanje produkciju proinflamatornih citokina od strane drugih imunskih ćelija (Serhan i Chiang, 2013). Nekoliko animalnih (Hong i sar., 2003) i humanih studija (Mas i sar., 2012, Polus i sar., 2016) je pokazalo povećane nivoe pro-resolvinskih medijatora nakon ishrane obogaćene sa EPA i DHA.

Efekti PUFA zavise od odnosa n-3 i n-6 PUFA, koji je u savremenim prehranbenim navikama znatno viši (1:10 do 1:25) od balansiranog odnosa (1:1) na kome je naša vrsta evoluirala (Wathes i sar., 2007), kao i od zdravstveno preporučenog odnosa (1:4) (Petrovic i Arsic, 2016). S obzirom da n-3 PUFA imaju antiinflamatorna svojstva, dok n-6 PUFA ostvaruju proinflamatorne efekte (Calder, 2006), poremećen odnos n-6/n-3 PUFA u korist n-6 PUFA ukazuje na proinflamatorno stanje koje doprinosi povećanoj prevalenci MetS-a i ateroskleroze (Simopoulos, 2008, Simopoulos, 2013, Kromhout i sar., 2014). Pokazano je da je povećan odnos AA/EPA direktno asociran sa povećanim rizikom za nastanak KVB (Ninomiya i sar., 2013, Takahashi i sar., 2017), zbog čega je predložen kao biohemijski marker kardiovaskularnih događaja (Tutino i sar., 2019).

Osim antiinflamatornih efekata, pokazano je da EPA i DHA smanjuju nivo RVK-a u endotelnim ćelijama, a time i RVK-posredovana oštećenja DNK (Sakai i sar., 2017).

1.8.1. Orasi kao suplement u ishrani bogat n-3 PUFA - nutritivni tretman u terapiji metaboličkog sindroma?

Pokazano je da je redovna konzumacija orašastih plodova asocirana sa smanjenim rizikom za nastanak KVB (Aune i sar., 2016, Relja i sar., 2017, Guasch-Ferré i sar., 2017, Larsson i sar., 2018) i T2D (Pan i sar., 2013), kao i sa poboljšanjem metaboličkog statusa (Salas-Salvadó i sar., 2008).

U poređenju sa drugim orašastim plodovima koji sadrže uglavnom mononezasićene masne kiseline, orasi sadrže najveću količinu n-3 PUFA (Leung i sar., 2021) koje imaju antioksidativni i antiinflamatorni/imunomodulatorni efekat na srce (Gutiérrez i sar., 2019, Oppedisano i sar., 2020). Naime, orasi sadrže 65.2% masti koje se predominantno sastoje od PUFA (47.18%), uglavnom n-6, LA (38.1%) i n-3, ALA (9.08%) (Ros i Mataix, 2006). Osim toga, orasi su bogat izvor vlakana, vitamina, minerala, arginina, fitosterola i fenola.

Nezasićene masne kiseline i vlakna (Salas-Salvadó i sar., 2006) doprinose poboljšanju lipidnog profila smanjujući ukupni i LDL (engl. *Low Density Lipoproteins*) holesterol, kao i koncentraciju triacilglicerola, bez uticaja na koncentraciju HDL-holesterola (Choi i sar., 2016, Kim i sar., 2018). Katjoni, kao što su magnezijum i kalcijum, doprinose smanjenju krvnog pritiska (Elin, 1993), kao i arginin, koji je fiziološki prekursor NO (Fraser, 1999). Polifenoli (Vinson i sar., 2012), tokoferol (Fraser, 1999) i fitosteroli (Segura i sar., 2006) mogu da povećaju antioksidativnu aktivnost i smanje oksidativni stres. Zapravo, orasi su jedan od najbogatijih nutritivnih izvora antioksidanasa (Halvorsen i sar., 2006). Takođe, oni bi mogli imati veće antiinflamatorno dejstvo nego drugi orašasti plodovi, zbog značajne količine ALA, koja predstavlja jednu od masnih kiselina sa najvećom antiinflamatornom aktivnošću (Zhao i sar., 2004) i posebno bogatog sadržaja fenolnog jedinjenja, elagične kiseline, koja je pokazala snažno antiinflamatorno dejstvo u eksperimentalnim studijama (Papoutsis i sar., 2008). Fitosteroli iz oraha doprinose njihovom efektu smanjenja koncentracije holesterola (Segura i sar., 2006). Visok nivo

arginina u orašastim plodovima stimuliše oslobađanje insulina i unos glukoze u ćelije (Ishiyama i sar., 2006). Konzumiranje oraha korisno utiče i na funkciju endotela usled povećane produkcije NO iz njegovog prekursora arginina, inhibicije ET-1 (Coates i Howe, 2007), kao i smanjenja cirkulišućih adhezivnih molekula (Zhao i sar., 2004, Bhardwaj i sar., 2012) i inflamatornih markera (Casas-Agustench i sar., 2011).

Uprkos visokom sadržaju masti i energetske vrednosti, istraživanja pokazuju da redovna konzumacija orašastih plodova ne samo da sprečava povećanje telesne težine, već može da promoviše i njeno smanjenje (Freisling i sar., 2018). Mehanizmi koji objašnjavaju efekat orašastih plodova na kontrolu težine uključuju supresiju apetita (efekat sitosti), smanjeno oslobađanje lipida i nepotpunu apsorpciju masti, kao i povećanje bazalnog metabolizma. Orasi postižu efekat sitosti usled visokog sadržaja vlakana, proteina i energije, kao i usled njihove fizičke strukture koja zahteva povećanu mastikaciju koja aktivira signalne sisteme uključene u regulaciju apetita (Brennan i sar., 2010). Nepotpuna apsorpcija masti, dokumentovana kao povećano izlučivanje masti putem fekalija, može biti posledica rezistencije njihovih parenhimskih ćelijskih zidova na mikrobijalnu i enzimsku degradaciju. Na taj način, ćelije koje nisu degradovane tokom mastikacije mogu proći kroz gastrointestinalni trakt bez oslobađanja svog lipidnog sadržaja (Ellis i sar., 2004). Povećanje stope bazalnog metabolizma se objašnjava visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina koje mogu da stimulišu metabolizam masti, s obzirom da se nezasićene masti oksiduju lakše nego zasićene (Langhans i sar., 2011), kao i visokim sadržajem proteina koji imaju značajan termogeni efekat (Eisenstein i sar., 2002).

Iako je pokazano da orasi imaju pozitivne efekte na metaboličko zdravlje, specifični mehanizmi koji leže u osnovi ovih efekata nisu u potpunosti poznati.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Na osnovu prethodnih studija koje povezuju imunski odgovor/inflamaciju i metabolizam, kao i rezultata koji se odnose na štetne efekte fruktoze na ciljne molekule u srcu i pozitivne efekte oraha na kardiometabolički status, postavljena je hipoteza da suplementacija ishrane orasima predstavlja nutritivni tretman koji ima potencijalno korisne efekte na promene izazvane povećanim unosom fruktoze na:

1. mitohondrijsku osu metaboličkog stresa – AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u srcu pacova, kao i na negativne regulatore ove ose - Nox4 i ChREBP
2. masnokiselinski odnos (n-6/n-3 masnih kiselina) u cirkulaciji i u srcu u korist n-3 PUFA
3. aktivaciju puta koji reguliše inflamaciju promenama u ekspresiji NF- κ B i komponenata RAS-a (ACE, ACE2, AT1R i AT2R)

Istraživanje je sprovedeno na mužjacima pacova soja Wistar koji su bili podeljeni u četiri eksperimentalne grupe prema režimu ishrane: (I) standardna ishrana, (II) standardna ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze (15 nedelja), (III) standardna ishrana uz suplementaciju orasima poslednjih šest nedelja trajanja eksperimenta i (IV) ishrana bogata fruktozom uz svakodnevnu konzumaciju oraha (2,4 g/dan) poslednjih šest nedelja trajanja eksperimenta. Dobijeni rezultati će omogućiti da se bolje sagleda veza između oksidativnog stresa i inflamacije u srcu pacova, izazvanih prekomernim unosom fruktoze, kao i potencijalni antioksidativni, antiinflamatorni/imunomodulatorni efekti suplementacije orasima, koji u metaboličkim poremećajima još uvek nisu dovoljno ispitani. Ova istraživanja, osim bazičnog aspekta, imaju translacioni potencijal u razvoju novih pristupa u terapiji pomenutih patologija. U cilju testiranja postavljene hipoteze, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Utvrditi sistolni (engl. *Systolic Blood Pressure*, SBP) i dijastolni krvni pritisak (engl. *Diastolic Blood Pressure*, DBP), kao i srčanu frekvenciju (engl. *Heart Rate Frequency*, HRF) mužjaka pacova u sve četiri eksperimentalne grupe životinja.
2. Identifikovati i kvantifikovati AA, EPA i DHA u cirkulaciji (ukupnom pulu lipida u plazmi pacova) i u srcu. Odrediti odnos n-6/n-3 PUFA (AA/EPA, AA/DHA) u sve četiri eksperimentalne grupe životinja.
3. Utvrditi nivo AMPK, ChREBP i FoxO3a u citosolu i jedru, kao i nivo SIRT1, MnSOD, katalaze i Nox4 u ukupnom lizatu tkiva srca mužjaka pacova, u sve četiri eksperimentalne grupe životinja.
4. Utvrditi nivo komponenata RAS-a (ACE, ACE2, AT1R i AT2R) i transkripcionog faktora NF- κ B u ukupnom lizatu izolovanih proteina iz tkiva srca mužjaka pacova, u sve četiri eksperimentalne grupe životinja.
5. Utvrditi nivo ekspresije gena koji kodiraju AT1R i AT2R u tkivu srca mužjaka pacova u sve četiri eksperimentalne grupe životinja.

3. MATERIJAL I METODE

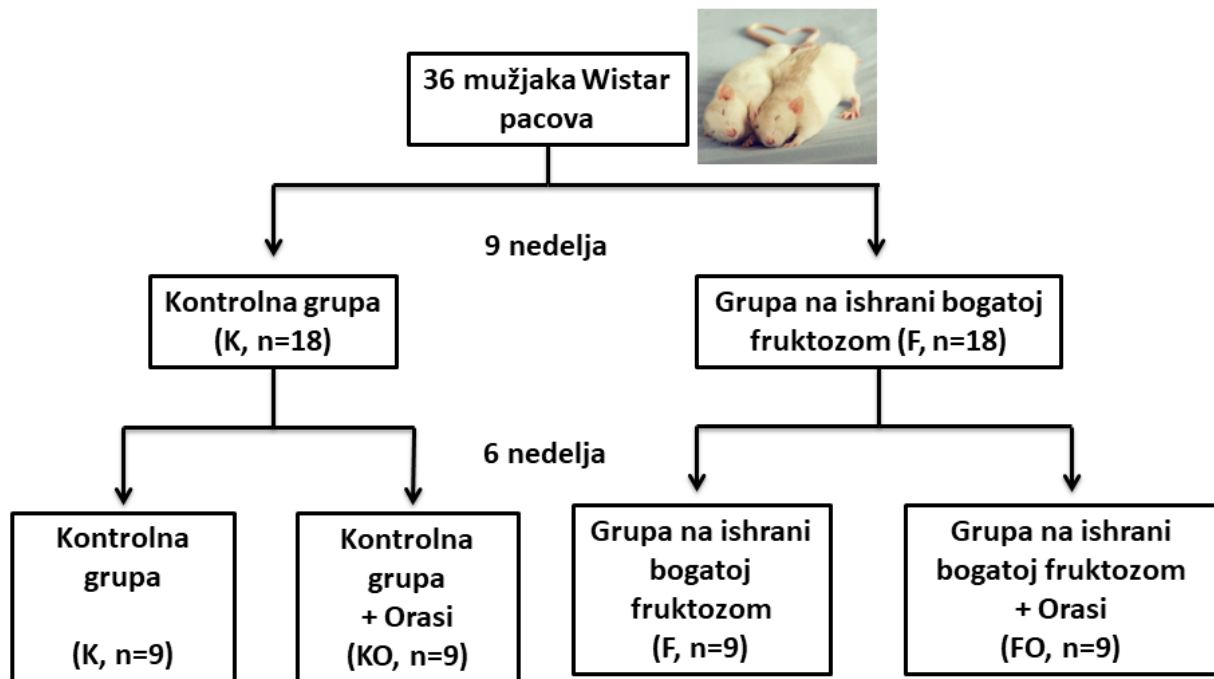
3.1. Poreklo i hemijski sastav oraha

Orasi (*Juglans regia* L.) korišćeni u ovoj studiji su poreklom sa podneblja Srbije i kupljeni su u reprezentativnom lokalnom marketu. U nedavno objavljenoj studiji (Petrovic-Oggiano i sar., 2020) opisan je precizan hemijski sastav ove sorte oraha, koji je u skladu sa rezultatima objavljenim u bazi podataka Evropskog izvora za informacije o hrani (EuroFIR FoodExplorer, 2013). U pogledu sastava makronutrijenata, ugljeni hidrati čine 8.10%, proteini 16.21%, masti 68.38%, voda 3.60%, vlakna 1.86%. Osim toga, orasi su bogat izvor minerala od kojih su najzastupljeniji magnezijum (147.2 mg/100g), kalijum (438.2 mg/100g) i kalcijum (113.5 mg/100g). U pogledu sadržaja masnih kiselina, identifikovanih gasnom hromatografijom, među n-3 PUFA u orasima dominira ALA (11.15% ukupnih masnih kiselina), dok je najprisutnija n-6 masna kiselina LA (63.15% ukupnih masnih kiselina).

3.2. Životinjski model i tretman životinja u studiji

Mušjaci pacova soja Wistar, stari 21 dan, nasumično su podeljeni u dve grupe prema režimu ishrane – kontrolna grupa (K, n=18), koja je dobijala običnu, česmensku vodu i standardnu hranu za pacove, i grupa podvrgnuta ishrani bogatoj fruktozom (F, n=18), koja je dobijala istu hranu i 10% (w/v) rastvor fruktoze umesto obične vode (**Slika M1**). Komercijalna hrana i voda (ili fruktozni rastvor) su bili dostupni pacovima *ad libitum*. Fruktoza je nabavljena od firme API-PEK iz Bečeja, Srbija.

Pacovi su gajeni u kavezima (3 pacova po kavezu), u standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22°C, vlažnost vazduha 55%, svetlosni režim 12 h svetlo/12 h mrak, počevši od 7:00 časova). Ovakav režim ishrane trajao je devet nedelja. Nakon tog perioda, polovina pacova iz obe grupe svakoga dana dobijala je, uz standardnu hranu, 2.4 g oraha (KO, n=9; FO, n=9), narednih šest nedelja. Ova količina okvirno odgovara polovini jezgra oraha. Kako bi se osiguralo precizno doziranje, orasi su davani pacovima u komadu i striktno se pratilo da svaka životinja pojede svoj deo oraha u trenutku distribucije. Nakon šest nedelja na ovakvom režimu ishrane, svi pacovi su žrtvovani dekapitacijom, srca su im izolovana, isprana fiziološkim rastvorom i skladištena na -80°C do momenta analize, dok su uzorci krvi za merenja biohemijskih parametara, nakon gladovanja tokom prethodne noći, sakupljeni u staklene epruvete koje sadrže antikoagulans EDTA. Krvna plazma je izdvojena centrifugiranjem (1600 × g, 10 min), alikvotirana i skladištena na -20°C do momenta analize. Ukupno 36 pacova je učestvovalo u studiji (po 9 pacova u svakoj od četiri eksperimentalne grupe), u skladu sa statističkim i etičkim standardima. Studija je odobrena od strane Etičke komisije za rad sa oglednim životinjama Instituta za nuklearne nauke "Vinča". Eksperimentalni protokoli su izvedeni u skladu sa smernicama Direktive Evropskog parlamenta (2010/63/EU).



Slika M1. Eksperimentalna postavka

3.3. Energetski unos, telesna masa, relativna masa srca, krvni pritisak i srčana frekvencija eksperimentalnih životinja

Unos hrane i tečnosti kod pacova beležen je svakodnevno, dok je telesna masa merena sedmično u toku trajanja studije. Energetski unos poreklom iz standardne hrane, rastvora fruktoze i oraha izražen je kao dnevni unos kJ po pacovu za sve tri vrste hrane pojedinačno.

Masa srca je određena nakon izolacije srca iz organizma (apsolutna) i izražena je u odnosu na ukupnu telesnu masu (relativna).

SBP i DBP, kao i HRF, izmereni su po završetku eksperimenta, kod svesnih pacova, neinvazivnim, kompjuterizovanim "tail-cuff" sistemom (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc. USA) (Feng i sar., 2008). Ovaj sistem koristi VPR (engl. *Volume Pressure Recording*) senzor za detekciju krvnog pritiska na osnovu promena u zapremini repa. Pacovi su aklimatizovani tokom jednog sata pre početka merenja, u mirnom okruženju, kako bi se izbegle varijacije krvnog pritiska. Životinja se stavlja u komoru u kojoj je sprečeno prekomerno pomeranje zahvaljujući držačima na krajevima komore. Okluzijska manžetna se postavlja na bazu repa, a blizu nje se postavlja i VPR manžetna sa senzorom. Komora se prethodno zagreva do 34°C. Pacovi su zagrevani 5 min pre i tokom merenja krvnog pritiska. VPR manžetna potiskuje krv iz repa, a zatim se okluzijska manžetna naduvava da spreči povratak krvi u rep, sve do momenta kada se zaustavlja pulsacija. Tada okluzijska manžetna počinje da se izduvava i krv počinje da teče nazad u rep, povećavajući zapreminu repa. Pritisak okluzijske manžetne pri početnom povećanju zapremine repa koju detektuje VPR senzor je SBP.

Zapremina repa se i dalje povećava kako se okluzijska manžetna izduvava sve dok se ne izjednači protok krvi u rep i iz njega. Pritisak okluzijske manžetne u ovom trenutku je DBP. HRF se određuje automatski, brojanjem pulsa u jedinici vremena. Srednji arterijski pritisak (engl. *Mean Arterial Pressure*, MAP) je prosečni pritisak u arterijama u toku jednog kardijačnog ciklusa, koji se sastoji od dijasolne faze (dve trećine ciklusa) i sistolne faze (jedna trećina ciklusa). MAP je izračunat na osnovu formule:

$$\text{MAP}=\text{DBP}+1/3(\text{SBP}-\text{DBP})$$

Pulsni pritisak (engl. *Pulse Pressure*, PP) je izračunat kao razlika između SBP i DBP:

$$\text{PP}=\text{SBP}-\text{DBP}$$

3.4. Analiza masnih kiselina u ukupnom sadržaju lipida u plazmi i srcu pacova

Ukupni lipidi plazme su izdvojeni ranije opisanom metodom (Folch i sar., 1957) pomoću smeše hloroforma i metanola (2:1) sa 0.05% (w/v) butiliranom hidroksitoluenom (BHT).

Ukupni lipidi srca izolovani su modifikovanom metodom po Hartu (Harth i sar., 1978). Srca su pomoću tučka izgnječena u tri vrste rastvarača - 5 ml hloroform (chl):metanol (met) (2:1, v/v) sa 0.05% (w/v) BHT, zatim 5 ml chl:met:5 % vode (1:1, v/v) i na kraju 5 ml chl:met (1:1, v/v). Izgnječena srca su zatim ostavljena 24h u zamrzivaču, nakon čega su ekstrakti filtrirani i isprani sa po 3 ml svakog od gore navedenih sistema rastvarača. Ekstrakti su upareni pomoću vakuumske isparivača. Suvi ostatak je resuspendovan u 300 µl chl:met (2:1, v/v).

Masne kiseline su esterifikovane u metil-estre koji su pripremljeni transmetilacijom sa 3N HCl u metanolu na 85°C tokom 1 sata, a zatim rekonstituisani u heksanu (oko 75 µl, u zavisnosti od količine suvog ostatka) i razdvojeni gasnom hromatografijom (1 µl rekonstituisanih uzoraka metil-estara je naneto na kolonu) pomoću Shimadzu hromatografa (GC-2014, Kyoto, Japan) sa plameno-jonizujućim detektorom i kapilarnom kolonom od mešane silike, RTX 2330 (60 m × 0.25 mm id × 0.2) (Restek Co., Bellefonte, PA, USA). Metil-estri pojedinačnih masnih kiselina su identifikovani poređenjem pikova retencionih vremena iz uzoraka sa pikovima retencionih vremena iz standarda PUFA-2 smeše i "Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix" (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA). Za potrebe ove studije, u ukupnom pulu lipida plazme i srca, identifikovane su AA, EPA i DHA. Količina pojedinačnih masnih kiselina u plazmi i srcu predstavljena je kao procenat svih identifikovanih masnih kiselina u ukupnom pulu lipida u plazmi, odnosno srcu.

3.5. Priprema ćelijskog lizata srca

Tkiva srca poreklom od tri životinje iz iste grupe iseckana su i pulovana u cilju pripreme ćelijskog lizata, citosolne i jedarne frakcije. Jedna trećina svakog uzorka je korišćena za dobijanje ćelijskog lizata srca. Ovi uzorci su homogenizovani na ledu pomoću Ultra-turrax homogenizera u modifikovanom RIPA puferu (pH 7.4) koji sadrži 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.2% Na-deoksiholat, 0.2% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.4, proteazne inhibitore (1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin i 10 µg/mL aprotinin) i fosfatazne inhibitore (1 mM aktivni Na-ortovanadate i 10 mM Na-fluorid). Homogenati su centrifugirani 30 min na 15 000 × g, na 4 °C, a dobijeni supernatanti su izdvojeni kao ukupni ćelijski lizati srca. Koncentracija proteina određena je pomoću BCA

metode, a uzorci ćelijskog lizata su pripremljeni za Western blot analizu. Najpre su razblaživani do koncentracije 5 mg/ml odgovarajućim puferom, a zatim do finalnih 2,5 mg/ml dodavanjem iste zapremine 2 x Laemmli pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM β -merkaptetanol, 4% SDS, 0,2% bromfenol plavo i 20% glicerol), kuvani (5 min na 100 °C) i zamrznuti na -20 °C (Laemmli, 1970).

3.6. Priprema citosolne i jedarne frakcije

Ostatak ukupne težine pulovanih srca, homogenizovan je na ledu pomoću Ultraturrax homogenizera u homogenizacionom TEMG puferu (pH 7.5) koji sadrži 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 12 mM monotioglicerol, 10% glicerol (v/v), proteazne i fosfatane inhibitore. Ćelijski lizat je filtriran kroz gazu i centrifugiran (1000 x g, 15 min). Citosolni proteini su izolovani iz početnog supernatanta (Sn1), dok su proteini jedra izolovani iz početnog peleta. Sn1 je centrifugiran 30 min na 12 000 x g. Dobijeni supernatant (Sn2) je centrifugiran 1h na 100 000 x g, nakon čega je sakupljena gornja faza koja sadrži citosolne proteine. Početni pelet je ispran dva puta u TMG + 0.2% Triton X-100 puferu i jednom u TMG puferu, pH 7.5 (20 mM Tris-HCl, 12 mM monotioglicerol i 10% glicerol (v/v)) uz centrifugiranje (1000 x g, 15 min) nakon svakog ispiranja. Isprani pelet je resuspendovan u TEMG + 0.5 M KCl puferu i inkubiran na ledu 1h uz često vorteksovanje. Resuspendovani pelet je zatim centrifugiran (34 200 rpm, 1 h), nakon čega je sakupljen supernatant koji sadrži proteine jedra. Nakon merenja koncentracije proteina BCA metodom, uzorci citosolne i jedarne frakcije srca su pripremljeni za Western blot analizu na isti način kao i uzorci ukupnog ćelijskog lizata srca.

3.7. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određena je BCA metodom, korišćenjem komercijalnog kita (Smith i sar., 1985). Ova metoda se zasniva na sposobnosti proteina da redukuju Cu^{2+} do Cu^{1+} u alkalnoj sredini (biuretska reakcija). Ova reakcija se detektuje formiranjem ljubičasto obojenog kompleksa koji nastaje interakcijom bicinhononične kiseline (BCA) sa jonima Cu^{1+} . Nastali kompleks BCA i Cu^{1+} apsorbuje svetlost na 562 nm, pri čemu apsorbanca linearno raste sa povećavanjem koncentracije proteina. Koncentracija proteina u uzorcima lizata, citosola i jedra je očitavana sa standardne krive koja je konstruisana na osnovu vrednosti apsorbanca rastvora albumina goveđeg seruma (BSA, Sigma-Aldrich) poznatih rastućih koncentracija (0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2 mg/ml).

3.8. Elektroforeza na natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteini iz uzoraka ukupnog ćelijskog lizata, kao i uzoraka citosolne i jedarne frakcije su razdvojeni metodom SDS elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Proteini se pomoću ove tehnike razdvajaju na osnovu razlika u njihovoj relativnoj molekularnoj masi. Na brzinu migracije proteina kroz matriks gela utiču njihova molekulska masa, struktura i naelektrisanje. U prisustvu anjonskog deterdženta, natrijum dodecil sulfata (SDS) koji se vezuje za okosnicu proteina i redukcionog agensa β -merkaptetanola, koji se dodaju uzorcima, dolazi do cepanja disulfidnih veza kritičnih za pravilno savijanje proteina, usled čega se proteini denaturišu u linearne lance sa negativnim naelektrisanjem koje je proporcionalno dužini polipeptidnog lanca. Kuvanje uzoraka na visokoj temperaturi narušava sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina prekidanjem vodoničnih veza. Na ovaj način se eliminiše uticaj strukture i naelektrisanja

na brzinu kretanja proteina kroz matriks gela, pa se oni razdvajaju samo na osnovu dužine polipeptidnog lanca. Pri tome, proteini manje molekulske mase brže migriraju, usled manjeg otpora matriksa gela. Naime, polimerizovani akrilamid (poliakrilamid) formira mrežasti matriks pogodan za kretanje proteina u odredjenom opsegu molekulskih masa. Gel se sastoji od 4% gela za sabijanje (4% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8) koji se nanosi preko 10% gela za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8). Dodavanjem inicijatora polimerizacije, 0,033% tetrametil etilendiamina (TEMED) i 0,05% amonijum persulfata (APS) započinje polimerizacija akrilamida.

Svaki uzorak se pipetira u svoj bunarić u gelu (50 µg proteina/bunariću), koji je prethodno uronjen u TANK pufer (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 0,1% SDS) u mini sistemu za elektroforezu (Mini Protein Electrophoresis Cell, Bio-Rad). Kako bi se odredile molekulske mase razdvojenih proteina, na gel se pored uzoraka nanosi proteinski marker koji predstavlja smešu proteina poznatih molekulskih masa (132 kDa, 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa i 23 kDa, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Elektroforeza se odvijala prvih 15 min na 150 V, što je omogućilo migraciju negativno naelektrisanih molekula kroz gel za sabijanje u smeru pozitivno naelektrisane anode, a zatim je napon spušten na 100 V, dok se uzorci nisu u potpunosti razdvojili u gelu za razdvajanje, još 1,5 h. Gelovi su nakon elektroforeze korišćeni za Western blot analizu.

3.9. Western blot analiza

Western blot je tehnika koja omogućava detekciju specifičnih proteina u uzorku koji sadrži kompleksnu smešu različitih proteina, na osnovu njihove sposobnosti da se vežu za specifična antitela. Da bi proteini postali dostupni za detekciju antitelima, neophodno je da se nakon razdvajanja SDS-PAGE elektroforezom, izvrši njihov transfer sa gela na nitroceluloznu ili poliviniliden-fluoridnu (PVDF) membranu. Najčešće korišćena metoda za prenos proteina je elektroblotting koji koristi električnu struju da povuče negativno naelektrisane proteine iz gela prema pozitivno naelektrisanom anodi, na membranu. Proteini se kreću iz gela na membranu zadržavajući organizaciju koju su imali u gelu. Vezivanje proteina za membranu zasniva se na hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama.

PVDF membrana (Hybond-P membrana, veličine pora 0,45 µm, Amersham) je prethodno aktivirana metanolom. Transfer se odvijao preko noći na 4°C pri konstantnoj struji od 80 mA u sistemu za mokri transfer (Trans Blott Cell, Bio-Rad). Za transfer je korišćen pufer koji sadrži 0,0025 M Tris, pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS i 20% metanol.

Uniformnost transporta proteina u svakoj traci proverena je bojenjem membrane pomoću Ponceau S (Sigma-Aldrich, P3504). Osim toga, ovo ukupno proteinsko bojenje korišćeno je kao loading kontrola, što je omogućilo da se izvrši naknadna normalizacija količine ciljnog proteina sa ukupnom količinom proteina po traci (Romero-Calvo i sar., 2010).

Kako bi se sprečile interakcije između membrane i antitela koja se koriste za detekciju ciljnog proteina, budući da su i ona po svojoj prirodi proteini, izvršeno je blokiranje nespecifičnog vezivanja postavljanjem membrane u 5% rastvor mleka u TBST puferu (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 8,0) 1,5 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Proteini iz razblaženog rastvora mleka se vezuju za membranu na svim mestima na kojima se proteini iz uzorka nisu vezali, tako da se antitelo može vezati samo za specifični ciljni protein.

U cilju identifikacije željenih proteina, membrane su inkubirane sa rastvorima odgovarajućih primarnih antitela (u TBST puferu), preko noći, na 4 °C, uz blago mešanje. Korišćena su antitela specifična za AMPK (sc-25792), SIRT1 (sc-74465), FoxO3a (sc-11351), MnSOD (sc-30080), katalazu (ab16731), Nox4 (ab133303), ChREBP (NB400-135), ACE (sc-20791), ACE2 (sc-20998), AT1R (ab124505), AT2R (ab254561) i NF-κB (sc-372(C-20)). Nevezana i nespecifično vezana antitela uklonjena su ispiranjem membrane 5 puta po 5 minuta sa TBST puferom, uz blago mešanje. Nakon toga, membrane su inkubirane sa rastvorima sekundarnih antitela (razblaženje 1:10000, u TBST puferu), 1.5 h na sobnoj temperaturi. Za detekciju primarnih antitela specifičnih za AMPK, FoxO3a, MnSOD, katalazu, ChREBP, ACE, ACE2, AT1R, AT2R i NF-κB korišćena su sekundarna anti-zečja antitela, dok je za detekciju antitela specifičnog za SIRT1 korišćeno anti-mišje sekundarno antitelo. Sekundarno antitelo je konjugovano sa reporterskim enzimom, peroksidazom rena (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) (Santa Cruz Biotechnology), koji omogućava detekciju ciljnog proteina hemiluminiscencijom. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima, membrane su isprane u TBST puferu, a zatim su inkubirane u mraku 3 minuta sa supstratom za hemiluminiscenciju koji se dobija mešanjem jednake količine rastvora koji sadrži luminol i rastvora koji sadrži vodonik peroksid. Rendgenski film (ORTO CP-G-PLUS, AGFA) je postavljen na membranu u kaseti za razvijanje filmova, i nakon 3 minuta ekspozicije, filmovi su razvijeni, pri čemu je intenzitet signala na filmu proporcionalan količini ciljnog proteina u analiziranim uzorcima. Filmovi su skenirani, nakon čega je urađena kvantitativna analiza traka bazirana na denzitometriji, pomoću ImageJ softvera (NIH, USA).

Nivoi ukupnih formi AMPK, FoxO3a i ChREBP determinisani su u citosolnoj i jedarnoj frakciji tkiva srca, dok su nivoi SIRT1, MnSOD, katalaze, Nox4, kao i komponenata RAS-a i NF-κB determinisani u ćelijskom lizatu tkiva srca. Svi rezultati Western blot analize su izraženi kao odnos količine ciljnog proteina i ukupnog proteinskog bojenja. Nivoi proteina su prikazani kao promena u odnosu na jediničnu vrednost kontrolne grupe.

3.10. Izolacija ukupne ćelijske RNK iz tkiva srca i određivanje njene koncentracije

Izolacija ukupne ćelijske RNK iz tkiva srca pacova izvršena je upotrebom trizol reagensa (TRIzol Reagent, Ambion, Inc.) prema protokolu proizvođača. Tkivo srca je ručno homogenizovano u 1 ml trizola, nakon čega su uzorci inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 200 µl hloroforma i inkubacije na sobnoj temperaturi (15 min), uzorci su centrifugirani (12 000 × g, 15 min, +4 °C). Iz tuba je sakupljen supernatant koji sadrži RNK, dok su interfaza i donji sloj koji sadrže proteine i DNK, odbačeni. Dodavanjem 500 µl rashlađenog izopropanola, omogućena je precipitacija RNK, dok je glikogen olakšao vizuelizaciju nastalog peleta. Uzorci su inkubirani preko noći na -20 °C, a zatim centrifugirani 8 minuta na +4 °C i 12 000 rcf. Supernatant je odbačen, a talog koji sadrži RNK je ispran dva puta u 1 ml 75% etanola, uz centrifugiranje (7 500 × g, 5 min, +4 °C) nakon svakog ispiranja. Pošto je uklonjen sav etanol, talog je osušen (25 min, 38 °C) i rastvoren u Nuclease-Free vodi (ThermoFischer Scientific), inkubacijom u termobloku (10 min, 55 °C). Koncentracija i čistoća RNK određeni su spektrofotometrijski (NanoDrop® ND-1000 spektrofotometar, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Čistoća uzoraka RNK je bila zadovoljavajuća, s obzirom da su odnosi apsorbanci na kojima apsorbuje RNK, odnosno kontaminanti, 260/280 nm i 260/230 nm, bili u dozvoljenom opsegu. Izolati RNK su čuvani na -80°C do momenta analize.

3.11. Tretman uzoraka RNK dezoksiribonukleazom

Ukupna ćelijska RNK tretirana je enzimom dezoksiribonukleazom I (DNase I, (1U/ μ l), Fermentas) koji je omogućio uklanjanje jednolančanih i dvolančanih molekula DNK. U ovoj reakciji 1 μ g ukupne RNK inkubirano je 30 minuta na 37 °C sa DNase I, za čiju su aktivnost neophodni joni Mg^{2+} koji su obezbeđeni u reakcionom puferu (10 X Reaction Buffer with $MgCl_2$ for DNase I, Fermentas). DNase I je potom inhibirana hemijskim i termičkim putem, dodavanjem 1 μ l 25 mM EDTA u smešu i inkubacijom na 65 °C, 10 minuta. Ukupna zapremina reakcije je bila 11 μ l.

3.12. Reverzna transkripcija

Reakcija reverzne transkripcije je proces u kome se jednolančana RNK prepisuje u jednolančanu komplementarnu DNK (engl. *complementary DNA*, cDNA), uz pomoć kita za sintezu cDNK (RevertAid first Strand cDNA synthesis kit, Fermentas, Lithuania), prema uputstvu proizvođača. Nakon DNase I digestije, u uzorak RNK dodat je 1 μ l prajmera (20 X oligo(dT)18 Primer, ThermoFischer Scientific), smeša je inkubirana 5 minuta na 65 °C, a zatim je svakom uzorku, na ledu, dodato 8 μ l prethodno pripremljene reakcione smeše koja se sastojala od četiri dezoksiribonukleozidtrifosfata (10 mM dNTP Mix, Amersham Biosciences), reverzne transkriptaze (Revert Aid Reverse Transcriptase (200 U/ μ l), ThermoFischer Scientific), ribonukleaznog inhibitora (RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μ l), ThermoFischer Scientific) i reakcionog pufera (5 X Reaction Buffer, ThermoFischer Scientific). Ukupna zapremina reakcije je bila 20 μ l. Smeša je inkubirana 60 minuta na 42 °C, a zatim 10 minuta na 70°C. Dobijena cDNK je skladištena na -80 °C do upotrebe. Neposredno pre analize, cDNK je razblažena Nuclease-Free vodom (ThermoFischer Scientific) do finalne koncentracije od 0.01 μ g/ μ l.

3.13. Analiza relativnog nivoa iRNK reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. *Realtime Polymerase Chain Reaction*, Real-Time PCR) omogućava merenje relativnog nivoa iRNK na osnovu amplifikacije cDNK koja se detektuje fluorescencijom, a čiji nivo odgovara količini ciljnog produkta. Ovom metodom je detektovana i kvantifikovana ekspresija gena za AT1R i AT2R, upotrebom komercijalno dostupnih TaqMan® eseja, Rn02758772_s1 i Rn00560677_s1, koji sadrže specifične prajmere i probu za koju je vezana reporterska boja koja emituje fluorescenciju nakon sečenja DNK polimerazom u svakom ciklusu amplifikacije. Kao endogena kontrola korišćena je 18S rRNK (TaqMan® esej Hs99999901_s1) koja pripada housekeeping genu koji ima konstantan nivo ekspresije u svim eksperimentalnim uzorcima. Pored eseja, reakciona smeša je sadržala 1 X TaqMan® Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) i 50 ng cDNK. Sve reakcije izvedene su u duplikatu, u ukupnoj zapremini od 25 μ l. RT PCR reakcija se odvijala u Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemu (ABI, Foster City, CA, USA) u 96-komornim pločama (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, SAD). Reakcija je uključivala inicijalnu denaturaciju na 95 °C, 10 min, radi aktivacije enzima, nakon čega je usledilo 40 ciklusa denaturacije DNK dimera (95 °C, 15 s), hibridizacije prajmera i umnožavanja ciljne sekvence pomoću Taq DNK polimeraze, uz prisustvo slobodnih dezoksinukleozidtrifosfata (dNTP) i jona Mg^{2+} (60 °C, 60 s). Tokom procesa amplifikacije razlikuju se dve faze, eksponencijalna, u kojoj se količina PCR produkta eksponencijalno povećava u

svakom ciklusu, a zatim se reakcija usporava, zbog trošenja komponenata reakcione smeše i proces ulazi u plato fazu (28-40 ciklusa). Nivo detektovane fluorescencije odgovara količini ciljnog produkta. Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena korišćena je $2^{-\Delta Ct}$ metoda gde se količina iRNK ispitivanog gena normalizuje prema količini iRNK endogene kontrole zbog mogućih razlika u količini uzorka u svakoj reakciji (Schmittgen i Livak, 2008).

3.14. Statistička analiza

Za statističku analizu dobijenih podataka korišćen je softverski paket Statistica 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) od tri nezavisna eksperimenta vršena sa 9 životinja po svakoj eksperimentalnoj grupi (ukupno 36 životinja). Rezultati su analizirani pomoću two-way analysis of variance (ANOVA), procenjujući uticaj faktora - ishrane bogate fruktozom i suplementacije oraha, kao i njihovu interakciju, nakon čega je urađen Tukey's post-hoc test za procenu razlika između pojedinačnih grupa. Vrednost $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na energetske unos, telesnu masu, relativnu masu srca, krvni pritisak i srčanu frekvenciju eksperimentalnih životinja

Energetski unos (kJ/dan/pacov) iz svakog pojedinačnog izvora (standardna hrana, rastvor fruktoze, orasi) je izračunat i izražen kao procenat ukupnog energetske unosa za datu grupu životinja. Kod kontrolnih životinja, ukupan energetske unos potiče od kalorija unetih isključivo putem standardne hrane (100%). Ukupan energetske unos pacova iz KO grupe predstavlja sumu energetske unosa poreklom iz standardne hrane (90.66 %) i energetske unosa poreklom iz oraha (9.34%), dok u F grupi predstavlja sumu energetske unosa poreklom iz standardne hrane (63.27%) i energetske unosa poreklom iz rastvora fruktoze (36.73%). U FO grupi ukupan energetske unos potiče iz sva tri izvora: standardne hrane (59.13%), rastvora fruktoze (33.43%) i oraha (7.44%). Nije pokazana značajna razlika u energetske unosu poreklom iz rastvora fruktoze između F i FO grupe, što je prethodno objavljeno u studiji na istom animalnom modelu, ali su pokazani značajni efekti ishrane bogate fruktozom ($p < 0.001$) i suplementacije orasima ($p < 0.01$) na ukupan energetske unos (Stanišić i sar., 2020).

Na ukupnu telesnu masu eksperimentalnih pacova na kraju studije, uticala su oba faktora, ishrana bogata fruktozom ($p < 0.01$) i suplementacija orasima ($p < 0.001$) (**Tabela R1**). Sa druge strane, nije došlo do promene relativne mase srca kao posledica ishrane bogate fruktozom, dok je suplementacija orasima značajno uticala na masu srca u odnosu na ukupnu telesnu masu ($p < 0.01$). Uočeno je značajno smanjenje relativne mase srca samo između K i FO grupe ($p < 0.05$) (**Tabela R1**).

Pokazani su značajni efekti suplementacije orasima ($p < 0.05$) i njihove interakcije sa fruktozom ($p < 0.01$) na SBP, ali ne i na DBP (**Tabela R1**). Suplementacija orasima značajno je uticala na HRF ($p < 0.01$) (**Tabela R1**). Kod kontrolnih pacova suplementacija orasima nije značajno uticala na krvni pritisak i srčanu frekvenciju, dok je kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom, suplementacija orasima povezana sa značajnim smanjenjem SBP (F vs. FO, $p < 0.01$, K vs. FO, $p < 0.05$), a postoji i trend ka smanjenju HRF (F vs. FO, $p = 0.08$). Međutim, ni ishrana bogata fruktozom, ni suplementacija orasima, kao ni njihova interakcija nisu pokazali značajne efekte na MAP, niti na PP.

Tabela R1. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ukupnu telesnu masu, relativnu masu srca, krvni pritisak i srčanu frekvenciju eksperimentalnih životinja

| | | | | | Two-way ANOVA | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|---------------|-------|-------|
| | K | KO | F | FO | O | F | FxO |
| Ukupna telesna masa (g) | 463±34 | 513±37* | 485±31 | 554±33***,\$\$\$ | <0.001 | <0.01 | NS |
| Masa srca/ukupna telesna masa (x100) | 0.25±0.02 | 0.23±0.02 | 0.24±0.01 | 0.22±0.03* | <0.01 | NS | NS |
| SBP (mm Hg) | 147±3 | 150±3 | 151±6 | 139±5*,\$\$,## | <0.05 | NS | <0.01 |
| DBP (mm Hg) | 85±7 | 91±9 | 89±14 | 85±5 | NS | NS | NS |
| HRF (otkucaji /min) | 360±29 | 323±30 | 390±42 | 337±27 | <0.01 | NS | NS |
| MAP (mm Hg) | 103±6 | 107±10 | 106±12 | 107±9 | NS | NS | NS |
| PP (mm Hg) | 63±10 | 58±10 | 63±11 | 55±16 | NS | NS | NS |

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± SD za 9 životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha; SBP - sistolni krvni pritisak; DBP - dijastolni krvni pritisak; HRF - frekvencija srčanih otkucaja; MAP - srednji arterijski pritisak; PP - pulsni pritisak; NS (engl. *Not Significant*) - nije statistički značajno.

* p<0.05 vs. K, # p<0.05 vs. O, \$ p<0.05 vs. F. *p<0.05; ##,\$\$p<0.01; ***, \$\$\$p<0.001.

4.2. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na odnos AA/EPA i AA/DHA u ukupnim lipidima plazme i srca pacova

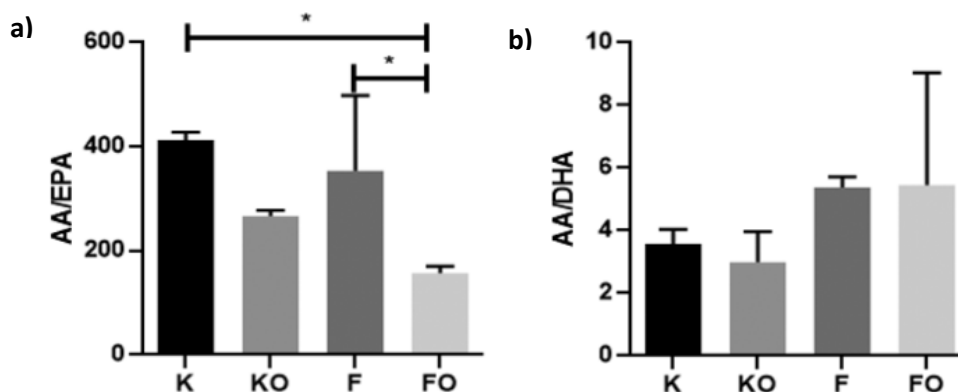
Rezultati su pokazali da suplementacija orasima ima značajan efekat na smanjenje odnosa AA/EPA u plazmi pacova (p < 0.001) koji je značajno povećan kao posledica ishrane bogate fruktozom (p < 0.05). Suplementacija orasima je značajno uticala i na smanjenje odnosa AA/DHA u plazmi (p < 0.05), dok ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze nije imala uticaj na ovaj odnos (**Tabela R2**).

Tabela R2. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ukupni odnos AA/EPA i AA/DHA u plazmi eksperimentalnih pacova.

| | | | | | Two-way ANOVA | | |
|--------|------------|-------------|--------------|-------------|---------------|-------|-------|
| | K | KO | F | FO | F | O | FxO |
| AA/EPA | 116±58 | 87.09±20.31 | 204.50±46.87 | 58.92±17.09 | 0.032 | 0.000 | 0.000 |
| AA/DHA | 15.17±7.35 | 8.28±2.61 | 12.36±3.80 | 11.17±2.35 | 0.977 | 0.013 | 0.071 |

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. Vrednost $p < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha; AA - arahidonska kiselina (20:4 n-6), EPA - eikozapentaenoična kiselina (20:5 n-3), DHA - dokozaheksanoična kiselina (22:6 n-3).

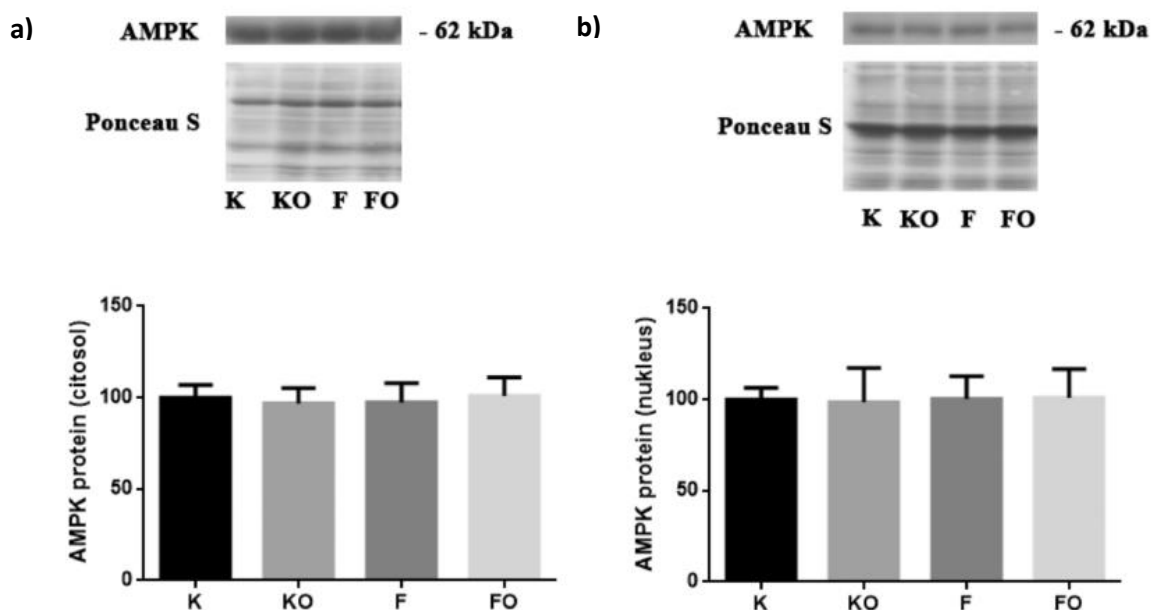
Kada je u pitanju odnos pojedinačnih n-6 i n-3 PUFA u lipidnom sadržaju u srcu pacova, suplementacija orasima je pokazala značajan efekat na odnos AA/EPA ($p < 0.01$). Naime, konzumacija oraha od strane pacova koji su pili fruktozu značajno je smanjila ovaj odnos, kako u odnosu na kontrolnu grupu (K *vs.* FO, $p < 0.05$), tako i u odnosu na grupu koja je bila na ishrani bogatoj fruktozom bez dodatka oraha (F *vs.* FO, $p < 0.05$) (**Grafik R1 a**). Sa druge strane, ni ishrana bogata fruktozom ni suplementacija orasima nisu pokazali značajan efekat na odnos AA/DHA (**Grafik R1 b**).



Grafik R1. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na odnos a) AA/EPA i b) AA/DHA u ukupnim lipidima srca pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 3 životinje u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, * $p < 0.05$

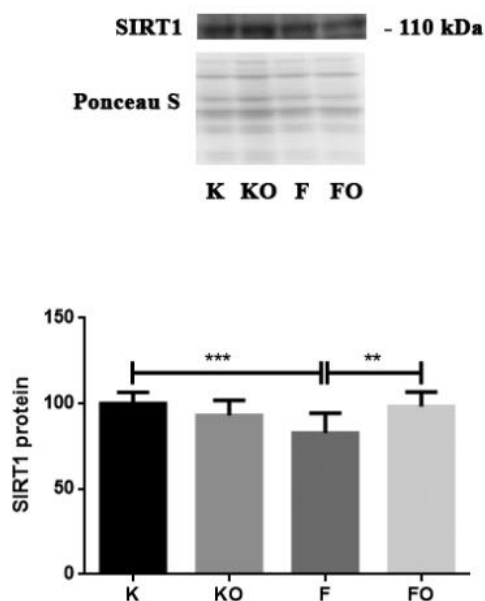
4.3. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo AMPK-SIRT1-FokO3a-MnSOD/katalaze, ChREBP i Nox4 u srcu mužjaka pacova

Na nivo AMPK u citosolu/jedru u srcu pacova nije uticala ni ishrana bogata fruktozom, ni suplementacija orasima, kao ni njihova interakcija (**Slika R1 a i R1 b**).



Slika R1. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na **a)** citosolni i **b)** jedarni nivo AMPK u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K – životinje na standardnoj ishrani, F – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO – životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha

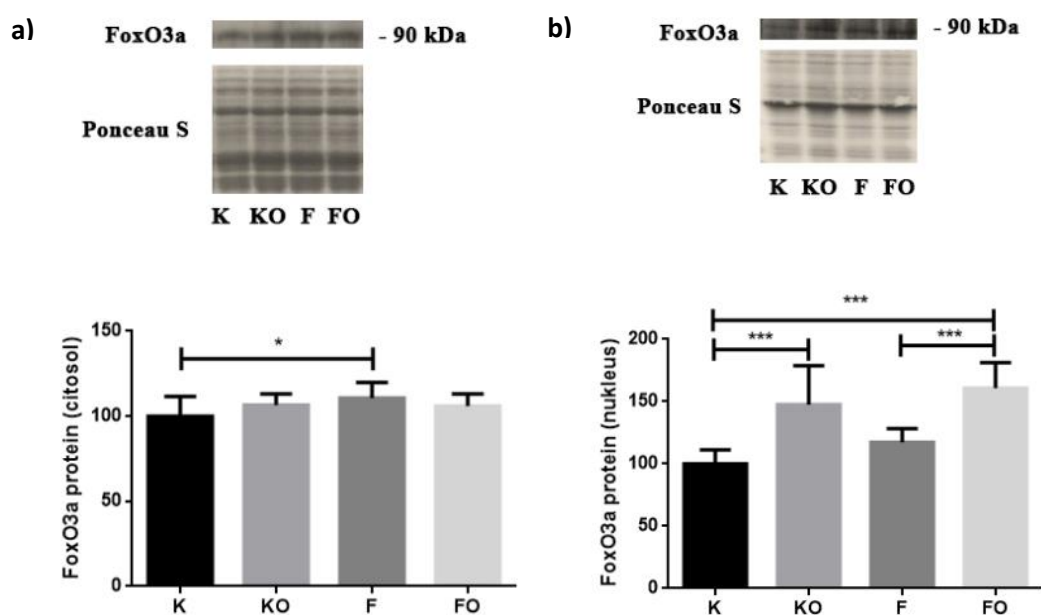
Rezultati su pokazali značajne efekte ishrane bogate fruktozom ($p < 0.05$) i njene interakcije sa orasima ($p < 0.001$) na nivo SIRT1 (**Slika R2**). Fruktozna ishrana je značajno smanjila nivo SIRT1 u srcu u poređenju sa kontrolnim životinjama (K *vs.* F, $p < 0.001$), dok je suplementacija orasima povećala nivo SIRT1 kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u poređenju sa pacovima na fruktoznoj ishrani bez dodatka oraha (F *vs.* FO, $p < 0.01$).



Slika R2. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo SIRT1 u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9

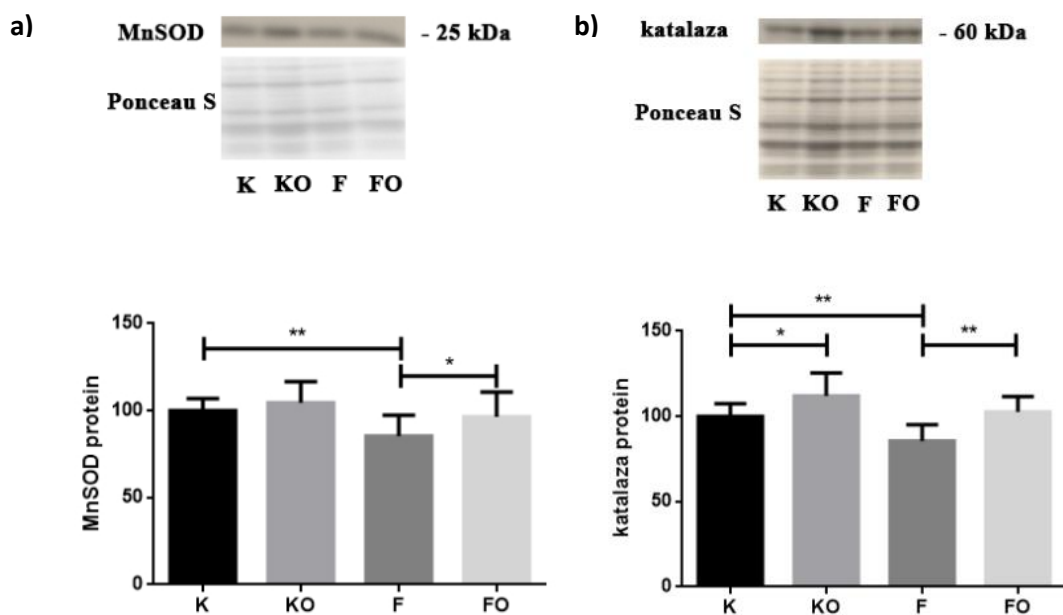
životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Na nivo FoxO3a u citosolu značajno je uticala interakcija dva nutritivna faktora ($p < 0.05$), dok su na nivo FoxO3a u jedru značajne efekte pokazali ishrana bogata fruktozom ($p < 0.05$) i suplementacija orasima ($p < 0.001$) (Slika R3 a i R3 b). Fruktozna ishrana je značajno povećala nivo FoxO3a u citosolu (K vs. F, $p < 0.05$), dok je suplementacija orasima povećala nivo FoxO3a u jedru ćelija srca kako kontrolnih (K vs. KO, $p < 0.001$) tako i pacova na ishrani bogatoj fruktozom (F vs. FO, $p < 0.001$, K vs. FO, $p < 0.001$).



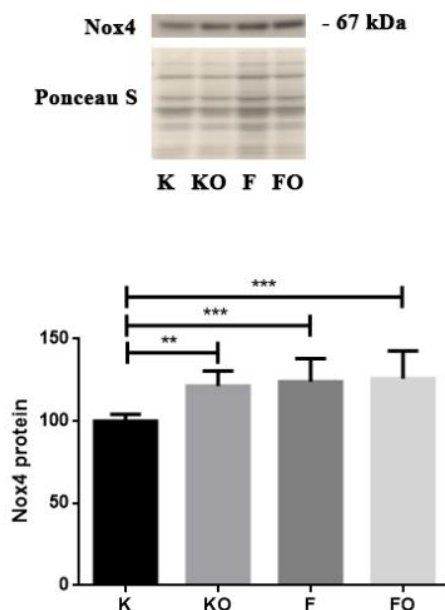
Slika R3. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na a) citosolni i b) jedarni nivo FoxO3a u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Rezultati su pokazali značajne efekte ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo MnSOD ($p < 0.001$ i $p < 0.01$, respektivno) i katalaze ($p < 0.001$ i $p < 0.001$, respektivno) (Slika R4 a i R4 b). Fruktozna ishrana je smanjila nivo MnSOD i katalaze (K vs. F, $p < 0.01$, za oba), dok je suplementacija orasima poništila ove promene (F vs. FO, $p < 0.05$ i $p < 0.01$, respektivno). Konzumacija oraha je značajno povećala nivo katalaze čak i kod kontrolnih životinja (K vs. KO, $p < 0.05$).



Slika R4. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo **a)** MnSOD i **b)** katalaze u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K – životinje na standardnoj ishrani, F – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO – životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

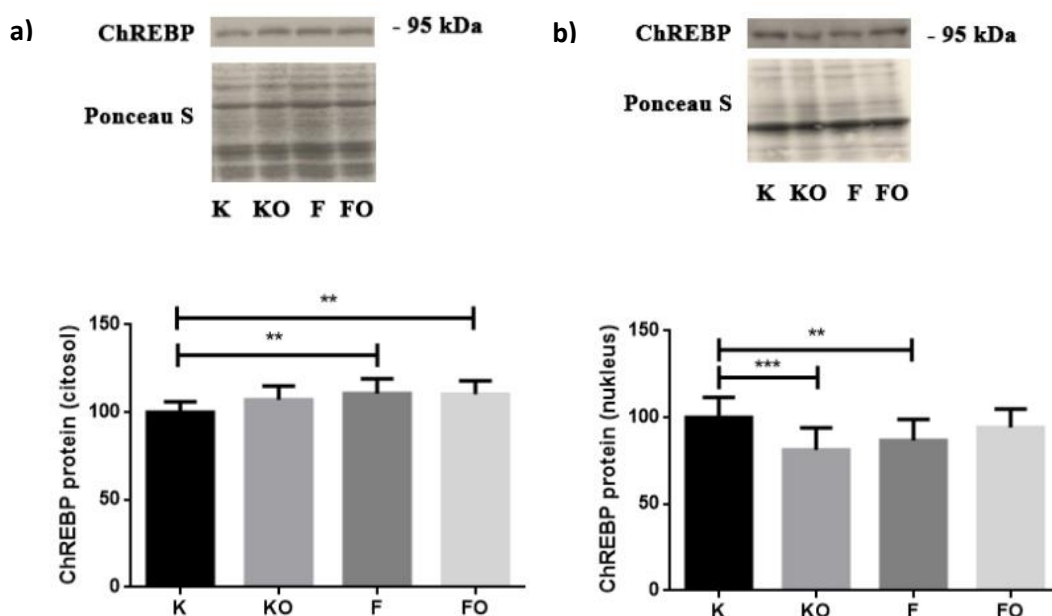
Ishrana bogata fruktozom ($p < 0.001$), suplementacija orasima ($p < 0.01$), kao i njihova interakcija ($p < 0.05$) pokazali su značajan efekat na nivo Nox4 u srcu pacova (**Slika R5**). Detektovan je značajan porast nivoa Nox4 nakon ishrane bogate fruktozom (K *vs.* F, $p < 0.001$), ali i nakon suplementacije orasima u poređenju sa kontrolnom grupom (K *vs.* KO, $p < 0.01$, K *vs.* FO, $p < 0.001$).



Slika R5. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo Nox4 u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9

životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Na nivo ChREBP u citosolu značajno je uticala ishrana bogata fruktozom (p < 0.01), dok je u jedarnoj frakciji značajan efekat na nivo ovog proteina pokazala interakcija fruktoze i oraha (p < 0.001) (Slika R6 a i R6 b). Ishrana bogata fruktozom je povećala nivo ChREBP u citosolnoj frakciji (K vs. F, p < 0.01) i smanjila njegov nivo u jedru (K vs. F, p < 0.01) u poređenju sa kontrolnom grupom. Suplementacija orasima značajno je smanjila nivo jedarnog ChREBP kod kontrolnih pacova (K vs. KO, p < 0.001) i pokazala je trend ka povećanju nivoa citosolnog ChREBP u kontrolnoj grupi (K vs. KO, p = 0.07). Osim toga, suplementacija orasima je značajno povećala nivo ChREBP u citosolu kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom u poređenju sa kontrolnom grupom (K vs. FO, p < 0.01).



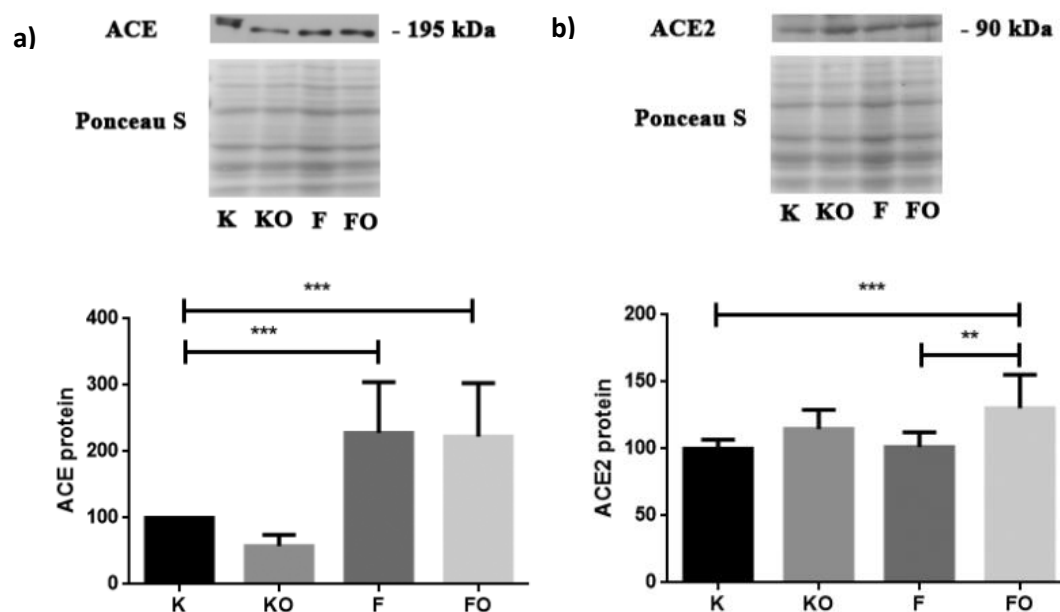
Slika R6. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na a) citosolni i b) jedarni nivo ChREBP u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, **p < 0.01, ***p < 0.001.

4.4. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ekspresiju molekula RAS-a u srcu mužjaka pacova

4.4.1. Nivo proteina ACE i ACE2

Detektovan je značajan efekat fruktoze na nivo ACE (p < 0.001), kao i značajan efekat suplementacije orasima na nivo ACE2 (p < 0.001). Ishrana bogata fruktozom je značajno povećala nivo ACE u srcu pacova, u poređenju sa kontrolnim životinjama (K vs. F, p < 0.001) (Slika R7 a), dok je nivo ACE2 ostao nepromenjen u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika R7 b). Suplementacija orasima kod pacova koji su pili fruktozu je povećala

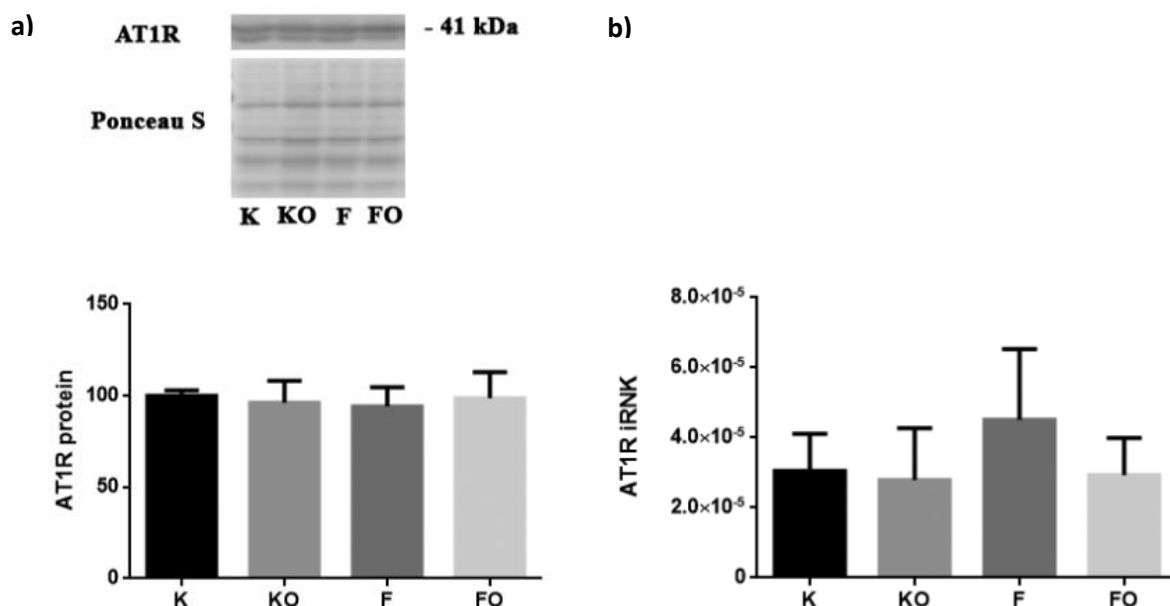
nivo oba proteina, ACE i ACE2, u poređenju sa kontrolnom grupom (K *vs.* FO, $p < 0.001$, za oba), kao i nivo ACE2 u poređenju sa pacovima na fruktoznoj ishrani bez dodatka oraha (F *vs.* FO, $p < 0.01$).



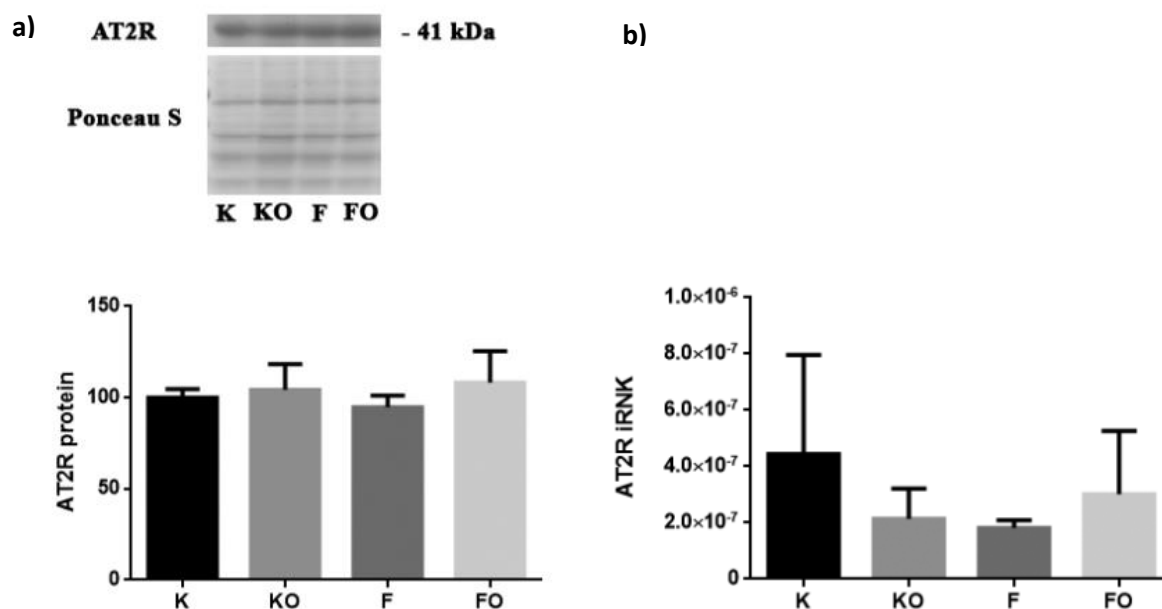
Slika R7. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo **a)** ACE i **b)** ACE2 u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenju 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenju 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4.2. Nivo iRNK i proteina AT1R i AT2R

Ni ishrana bogata fruktozom, ni suplementacija orasima, kao ni njihova interakcija, nisu uticali ni na proteinski, ni na iRNK nivo RAS receptora, AT1R i AT2R, u srcu pacova (Slika R8 a i R8 b; Slika R9 a i R9 b).



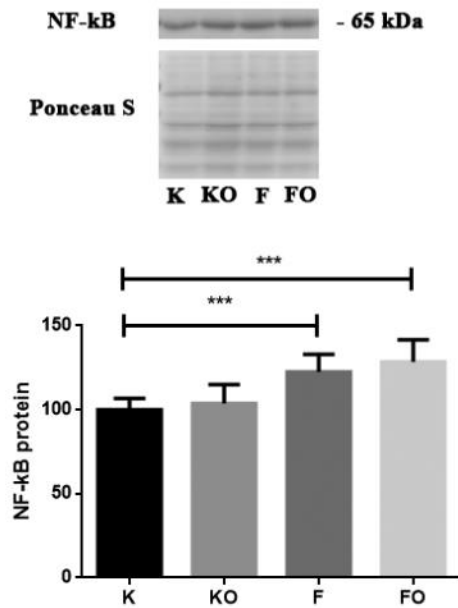
Slika R8. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na **a) AT1R** i **b) iRNK** za AT1R u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K – životinje na standardnoj ishrani, F – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO – životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha.



Slika R9. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na **a) AT2R** i **b) iRNK** za AT2R u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K – životinje na standardnoj ishrani, F – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO – životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO – životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha.

4.5. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo NF- κ B u srcu pacova

Rezultati su ukazali na značajan efekat fruktoze na nivo NF- κ B ($p < 0.001$) u srcu pacova (**Slika R10**). Ishrana bogata fruktozom značajno je povećala nivo NF- κ B u odnosu na kontrolnu grupu (K *vs.* F, $p < 0.001$), kao i suplementacija orasima nakon fruktozne ishrane (K *vs.* FO, $p < 0.001$).



Slika R10. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo NF-κB u srcu eksperimentalnih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD za 9 životinja u svakoj grupi. K - životinje na standardnoj ishrani, F - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze, KO - životinje na standardnoj ishrani sa dodatkom oraha, FO - životinje na ishrani obogaćenoj 10% rastvorom fruktoze i dodatkom oraha, *** $p < 0.001$.

5. DISKUSIJA

Učestalost MetS-a je u stalnom porastu, pogađajući gotovo četvrtinu odrasle populacije, i u direktnoj je vezi sa globalnom epidemijom gojaznosti i dijabetesa, čime postaje glavni zdravstveni problem u svetu (Grundy, 2008). Razvoj MetS-a zavisi od složene interakcije genetskih determinanti i faktora životne sredine, uključujući ishranu (Phillips i sar., 2006). Stoga, intervencije u načinu ishrane predstavljaju važan deo strategije za sprečavanje MetS-a i njegovih krajnjih ishoda, T2D i KVB. Usled visokog sadržaja n-3 PUFA, vlakana, antioksidanasa i fitosterola (Croitoru i sar., 2019), orasi se smatraju korisnim suplementom u ishrani, sa potencijalom poboljšanja metaboličkog statusa koji je narušen uglavnom usled visokog unosa fruktoze, kao nezaobilazne komponente savremenog načina ishrane. Epidemiološka zapažanja i kliničke studije pokazuju da unos oraha ima blagotvoran uticaj na oksidativni stres i sistemsku inflamaciju niskog intenziteta (Salas-Salvado i sar., 2008), faktore koji prate MetS, T2D i KVB. Cilj ove disertacije jeste da se procene antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima na srce u MetS-u izazvanom ishranom sa visokim sadržajem fruktoze.

5.1. Uticaj ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na telesnu masu, relativnu masu srca, krvni pritisak i srčanu frekvenciju pacova

Pacovi koji su podvrgnuti ishrani sa dodatkom oraha imali su veću telesnu masu u odnosu na pacove koji nisu konzumirali orahe (Bošković i sar., 2021). Klinička ispitivanja koja istražuju asocijaciju između konzumacije orašastih plodova i telesne mase pokazuju različite rezultate (Lutz i sar., 2016, Kim i sar., 2017, Li i sar., 2018). U studijama u kojima su orašasti plodovi uvedeni u redovnu ishranu bez kontrole energetskeg unosa, kao što je to slučaj u ovoj studiji, ili nije bilo promena u telesnoj masi (Njike i sar., 2015, Scott i sar., 2017, Kim i sar., 2018) ili je došlo do povećanja telesne mase, usled dodatnog energetskeg unosa na dnevnom nivou, ali u daleko manjoj meri nego što se teoretski moglo očekivati (Sabate i sar., 2005, Baer i sar., 2016). Međutim, kada su uvedeni kao deo energetske kontrolisane ishrane (izokalorična ishrana), ustanovljeno je da orasi pomažu u gubitku telesne mase, iako ovakva ispitivanja najčešće ne oslikavaju realne situacije (Rock i sar., 2017, Neale i sar., 2017).

Sa druge strane, konzumacija oraha je značajno uticala na smanjenje relativne mase srca (Bošković i sar., 2021), što ukazuje na njen antihipertrofični kapacitet. To je u saglasnosti sa studijom koja je pokazala da je povećani unos celih orašastih plodova (kikiriki, pinjoli i bademi) povezan sa smanjenim rizikom za razvoj hipertrofije leve komore (Park i sar., 2021). Ovaj efekat se može pripisati omega-3 masnim kiselinama iz oraha (Toko i sar., 2020). Ishrana bogata fruktozom nije značajno uticala na relativnu masu srca, iako prethodne studije ukazuju da bi produženi režim ishrane fruktozom ili povećani procenat konzumirane fruktoze konačno rezultirao hipertrofijom srca (Patel i sar., 2009, Zhang i sar., 2016).

Jedan od najranije uočenih blagotvornih efekata konzumacije oraha u ovoj studiji jeste smanjenje sistolnog krvnog pritiska kod pacova na fruktoznoj ishrani, što je bitan faktor rizika za nastanak KVB. U literaturi, efekat konzumacije oraha i drugih orašastih plodova na krvni pritisak nije konzistentan. Rezultat ove studije je u skladu sa studijama koje su utvrdile smanjenje krvnog pritiska nakon konzumacije oraha (Scott i sar., 2017, Rock i sar., 2017), što se objašnjava bogatim sadržajem katjona, kao što su magnezijum i kalijum (Elin i Hosseini, 1993) i visokim sadržajem ALA (Croitoru i sar., 2019), koja

uzrokuje koronarnu relaksaciju glatkih mišićnih ćelija vaskulature (Pomposiello i sar., 1998). Uočeni efekat konzumacije oraha na krvni pritisak mogao bi biti povezan sa njenim blagotvornim efektom na vaskularni tonus, preko ATP zavisnog kanala za kalijum, što je nedavno pokazano na istom eksperimentalnom modelu (Stanišić i sar., 2020).

5.2. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na odnos AA/EPA i AA/DHA u ukupnim lipidima plazme i srca pacova

Sistemska inflamacija kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom, pre i posle konzumacije oraha, praćena je kroz analizu odnosa AA/EPA i AA/DHA u ukupnom sadržaju lipida u plazmi, dok je inflamacija u srcu praćena kroz analizu odnosa ovih masnih kiselina u ukupnom pulu lipida u srcu pacova.

Ova studija je pokazala povećan odnos AA/EPA u plazmi pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Bošković i sar., 2021). Kao što je već rečeno, povećan odnos ovih PUFA ima proinflamatorna svojstva i povezan je sa povećanim rizikom za nastanak KVB (Ninomiya i sar., 2013, Takahashi i sar., 2017). Sa druge strane, u ovoj studiji je pokazano smanjenje odnosa AA/EPA i AA/DHA u plazmi pacova kao rezultat konzumacije oraha i interakcije fruktoza x orasi (Bošković i sar., 2021). Istraživanja su pokazala da je smanjenje odnosa n-6/n-3 PUFA povezano sa smanjenim nivoom cirkulišućih inflamatornih markera (Ferrucci i sar., 2006, Kalogeropoulos i sar., 2010). To potvrđuje da bi konzumacija oraha mogla biti korisna u režimu ishrane, posebno u MetS-u i u prevenciji KVB asociranih sa MetS-om. Suplementacija orasima je pokazala statistički značajno smanjenje odnosa AA/EPA i u srcu pacova (Bošković i sar., 2022), što potvrđuje njene antiinflamatorne i kardioprotektivne efekte. To je u skladu sa studijom koja je pokazala da konzumacija oraha značajno povećava nivoe ALA i EPA, a smanjuje nivo AA u tkivu srca u poređenju sa kontrolnom grupom (Leung i sar., 2021). Iako je uočeno smanjenje odnosa AA/EPA i kod kontrolnih životinja hranjenih orasima, ono nije bilo statistički značajno (Bošković i sar., 2022).

Nedavno je pokazano smanjenje tkivno-specifičnog odnosa n-6/n-3 PUFA nakon konzumacije oraha na istom animalnom modelu MetS-a (Zec i sar., 2020). Osim toga, u ovom animalnom modelu je pokazano da i fruktoza i orasi stimulišu preuzimanje i oksidaciju masnih kiselina u srcu, ali za razliku od fruktoze, suplementacija orasima primarno povećava nivo i metabolizam n-3 PUFA, i smanjuje odnos POA (palmitoleinska kiselina)/PA (palmitinska kiselina) u srcu (Romić i sar., 2022), koji predstavlja marker *de novo* lipogeneze i direktno je povezan sa Mets-om (Mayneris-Perxachs i sar., 2014). Ovi nalazi su, takođe, u skladu sa studijama koje su pokazale kardioprotektivnu ulogu n-3 PUFA, koja se, po svemu sudeći, postiže njenim antioksidativnim i antiinflamatornim (imunomodulatornim) efektima na srce (Gutiérrez i sar., 2019, Oppedisano i sar., 2020). Osim toga, istraživanja su pokazala asocijaciju inflamacije i masnih kiselina koje zadovoljavaju nutritivne potrebe imunskih ćelija nakon metaboličkog stresa (Liu i sar., 2012).

5.3. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo AMPK, SIRT1, FoxO3a, MnSOD, katalaze, ChREBP i Nox4 u srcu pacova

Rezultati ove studije su pokazali blagotvorne efekte konzumacije oraha na antioksidativnu osu AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza u srcu mužjaka pacova na ishrani bogatoj fruktozom. Dva metabolička senzora, AMPK i SIRT1, međusobno interaguju inhibirajući oksidativni stres i inflamaciju u makrofagima, koji su, po svemu

sudeći, uključeni u patogenezu MetS-a (Ruderman i sar., 2010). Smanjen nivo/aktivnost jedarnog SIRT1 povećava aktivnost NF- κ B i pojačava ekspresiju gena za proinflamatorne medijatore tokom hronične inflamacije (Vachharajani i sar., 2016). Sa druge strane, primećeno je da aktivacija SIRT1 polifenolom fisetinom (Zheng i sar., 2017) ili pomoću n-3 PUFA (Xue i sar., 2012) ostvaruje antiinflamatorne efekte, kroz inhibiciju ekspresije citokina, hemokina, prostaglandina i MMP-a. Ovo nas je navelo da istražimo SIRT1 i AMPK u srcu pacova na fruktoznoj ishrani, kao i potencijal suplementacije orasima da rebalansira sirtuine kao molekule koji integrišu metabolizam, bioenergetiku i imunski status tokom inflamacije u MetS-u. U prethodnoj studiji smo pokazali da supstituciona terapija estrogenom ima blagotvorne efekte na AMPK-SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza osu u srcu ženki pacova, koja je kompromitovana fruktoznom ishranom (Bošković i sar., 2018). Efekti suplementacije orasima na ovu osu i njene regulatore, Nox4 i ChREBP, u srcu pacova na fruktoznoj ishrani nisu prethodno utvrđeni. Pretpostavljeno je da bi smanjeni oksidativni stres u srcu, kao rezultat suplementacije orasima, mogao biti posredovan i supresijom produkcije RVK-a od strane Nox4. Pokazano je da n-3 PUFA mogu sprečiti aktivaciju Nox-a koja je posredovana TLR4 receptorom (Park i sar., 2006) i inhibirati produkciju RVK-a i RVK-zavisnu aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B u endotelnim ćelijama (Maloney i sar., 2009). Takođe je pokazano da ishrana obogaćena 60% fruktozom povećava nivo iRNK za Nox4 u srcu i aorti pacova (Nyby i sar., 2007). U ovoj studiji, ishrana obogaćena 10% fruktozom povećala je nivo Nox4 u srcu pacova. Kao što je prethodno naznačeno, Nox-posredovana produkcija RVK-a ima centralnu ulogu u inflamaciji krvnih sudova koja je posledica nutritivnog preopterećenja (Inoguchi i sar., 2000). Ekspresiju vaskularnog Nox-a mogao bi dodatno pojačati Ang II (Harrison i sar., 2003), koji je glavni efektorski molekul aktiviranog RAS-a u srcu/aorti pacova na fruktoznoj ishrani (Bundalo i sar., 2016).

Međutim, neke studije sugerišu moguću ateroprotektivnu ulogu Nox4 (Schröder i sar., 2012, Gray i sar., 2016), kao i njegovu ulogu u održavanju energetskeg statusa u srcu (Nabeebaccus i sar., 2017). U skladu sa tim, povećani nivo Nox4 kod kontrolnih životinja nakon suplementacije orasima, ukazuje na potencijalnu ulogu Nox4 u održavanju energetskeg statusa u srcu i adaptaciji na hroničnu inflamaciju. Uprkos tome, ulogu Nox4 u srcu treba dodatno ispitati.

Ni ishrana bogata fruktozom, ni suplementacija orasima nisu uticali na nivo AMPK, dok su oba faktora značajno uticala na nivo SIRT1, što ukazuje na mogućnost da ekspresija SIRT1 u srcu nije regulisana putem AMPK, bar u ovim eksperimentalnim uslovima, što je u saglasnosti sa našom prethodnom studijom (Bošković i sar., 2018), kao i nedavnim rezultatima u aorti kod istog životinjskog modela (Stanišić i sar., 2020).

U ovoj studiji, ishrana bogata fruktozom smanjila je nivo SIRT1 u srcu pacova, što je u skladu sa studijama koje su ustanovile smanjen nivo SIRT1 u aorti mužjaka pacova nakon ishrane obogaćene 10% i 20% HFCS (Akar i sar., 2012), kao i smanjen nivo iRNK za SIRT1 u aortama ženki pacova nakon ishrane obogaćene 10% fruktozom (Pektas i sar., 2015). Smanjenje nivoa SIRT1 u srcu pacova nakon ishrane bogate fruktozom, u skladu je sa nalazima da su MetS, gojaznost i hronična inflamacija asocirani sa smanjenim nivoom SIRT1 (Poulsen i sar., 2013). Ob/ob miševi sa SIRT1 deficijencijom pokazuju preteranu mikrovaskularnu inflamaciju u poređenju sa wild-type miševima (Vachharajani i sar., 2005). Pored toga, pokazano je da delecija SIRT1 u mijeloidnim ćelijama povećava infiltraciju M1 makrofaga, a smanjuje broj M2 makrofaga u adipoznom tkivu miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti, što je rezultiralo rezistencijom na insulin (Yang i sar., 2012) koja je prisutna i u našem modelu MetS-a. Studija koju su sprovedi Yoshizaki i

saradnici direktno je povezala antiinflamatorne efekte SIRT1 u adipocitima i makrofagima sa poboljšanom osetljivošću na insulin (Yoshizaki i sar., 2010). SIRT1 se nalazi u jedrima značajne frakcije kardiomiocita (Bolasco i sar., 2012) i mogao bi da ima kardioprotektivnu ulogu. U skladu sa našom hipotezom, suplementacija orasima je poništila promene u nivou SIRT1 u srcu pacova na fruktoznoj ishrani, ukazujući na kardioprotektivnu ulogu i potencijalno smanjenje inflamacije. Zbog svoje pluripotentne regulatorne uloge, sirtuini su prepoznati kao novi terapijski targeti. Stoga, utvrđeni efekat konzumacije oraha na SIRT1 predstavlja osnovu za dalji razvoj nutritivne terapije u pogledu metaboličkog stanja i inflamatornih procesa u srcu.

Nishodni efekti SIRT1 uključuju promociju deacetilacije FoxO3a i posledičnu inicijaciju FoxO3a-zavisne genske transkripcije (Zarzuelo i sar., 2013). Rezultati ove studije sugerišu da smanjenje SIRT1 uzrokovano fruktoznom ishranom dovodi do povećane fosforilacije FoxO3a. Kako FoxO3a reguliše ekspresiju gena za MnSOD (Kops i sar., 2002) i katalazu (Tan i sar., 2008), smanjen nivo ovih enzima kod pacova na fruktoznoj ishrani, mogao bi biti posledica povećanog nivoa FoxO3a u citosolu ovih pacova. To je u skladu sa studijom koja je pokazala smanjenje aktivnosti MnSOD u mozgu mužjaka pacova nakon ishrane obogaćene 10% fruktozom, što doprinosi neuropatogenezi hipertenzije (Cheng i sar., 2014), ali do sada nije bilo podataka o uticaju fruktoze na ekspresiju MnSOD u tkivu srca. Sa druge strane, ustanovljeno je da ishrana bogata fruktozom značajno smanjuje ekspresiju iRNK za katalazu u srcu pacova (Cavarape i sar., 2001). Značajno povećanje nivoa FoxO3a u jedru pokazano je nakon suplementacije orasima, što je praćeno povećanjem nivoa MnSOD i katalaze, kako u kontrolnoj, tako i u fruktoznoj grupi životinja (Bošković i sar., 2021).

Fruktoza aktivira ChREBP koji smanjuje ekspresiju SIRT1 u metabolički aktivnim tkivima (Noriega i sar., 2011), međutim, podaci vezani za ekspresiju ChREBP u srcu nisu poznati. Koo i saradnici su pokazali da je u jetri pacova, aktivnost ChREBP znatno veća nakon fruktozne ishrane u poređenju sa pacovima koji su bili na izokaloričnoj glukoznoj ishrani (Koo i sar., 2009). Tokom gladovanja transport ChREBP u jedro je inaktiviran (Kawaguchi i sar., 2002), dok proizvodi metabolizma ugljenih hidrata aktiviraju ovaj proces (Kabashima i sar., 2003). U našoj studiji, međutim, ishrana bogata fruktozom je značajno povećala nivo ChREBP u citosolu, uz istovremeno smanjenje nivoa ChREBP u jedru. Nedostatak studija koje se bave ekspresijom ChREBP u srcu i kompleksnost njegove tkivno-specifične ekspresije ukazuju na mogućnost diferencijalne ekspresije ChREBP u srcu u poređenju sa metabolički aktivnim tkivima (Yamashita i sar., 2001, Iizuka i sar., 2004). Moguće je da ekspresija SIRT1 u srcu nije regulisana putem ChREBP i da je ChREBP važan za regulaciju transkripcije gena u glikolizi/fruktolizi u tkivima koja preferencijalno oksiduju ugljene hidrate, kako bi obezbedila ATP za energetske skupe metaboličke procese (Logan i Storey, 2016). Čak 60–70% energetske potrebe u srcu obezbeđeno je oksidacijom masnih kiselina (Bertrand i sar., 2008), iako se fruktoza takođe koristi kao energetske supstrat, s obzirom na to da kardiomiociti eksprimiraju fruktoza-specifični GLUT5 transporter (Karaca i sar., 2016). Rezultati ove studije sugerišu da je ChREBP takođe zastupljeniji u citosolu pacova na fruktoznoj ishrani nakon konzumacije oraha, što ukazuje na supresiju aktivnosti ChREBP u srcu ovih pacova. Smanjen nivo jedarne lokalizacije ChREBP u srcu pacova nakon suplementacije orasima, koji je ranije pokazan i u jetri pacova nakon ishrane sa visokim sadržajem masti (Kawaguchi i sar., 2002), mogao bi biti posledica povišenih količina masnih kiselina u srcu. Naime, pokazano je da ishrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama inhibira ekspresiju ChREBP, ubrzavajući degradaciju njegove iRNK (Kawaguchi i sar., 2002, Dentin i sar., 2005) i inhibirajući njegov transport u

jedro (Dentin i sar., 2005). Smanjena DNK-vezujuća aktivnost ChREBP pokazana je kod pacova na ishrani sa visokim sadržajem masti, u poređenju sa onima na ishrani sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, što potvrđuje njegovu ulogu u inhibiciji glikolize i lipogeneze koja je posredovana masnim kiselinama (Yamashita i sar., 2001, Kawaguchi i sar., 2002). Međutim, neophodna su dodatna istraživanja ChREBP u srcu kako bi se bolje sagledala njegova uloga u nutritivnoj terapiji.

5.4. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ekspresiju komponenata RAS-a u srcu mužjaka pacova

Rezultati ove studije pokazuju značajan efekat suplementacije orasima na nivo ACE2 u srcu (Bošković i sar., 2022), što je u skladu sa značajnim smanjenjem sistolnog krvnog pritiska u ovom životinjskom modelu MetS-a (Bošković i sar., 2021). U prethodnim studijama je pokazano da je nedostatak ACE2 povezan sa umerenom sistolnom hipertenzijom (Gurley i sar., 2006), a da ACE2 aktivatori snižavaju krvni pritisak (Hernandez Prada i sar., 2008) i poboljšavaju funkciju srca (Dong i sar., 2012, Murca i sar., 2012). Ne samo da ACE2 ima važnu ulogu u regulaciji funkcije srca (Crackower i sar., 2002), već ispoljava i antiinflamatorna svojstva (Kassiri i sar., 2009). Pokazano je da sistemska isporuka ACE2 smanjuje Ang II - indukovanu hipertrofiju i fibrozu (Huentelman i sar., 2005), pa čak i da one nisu prisutne kod ACE2 nokaut miševa (Crackower i sar., 2002). Pored toga, ACE2 terapija koja se bazira na upotrebi adenovirusnog vektora pokazala je smanjenje nivoa proinflamatornih citokina, MCP-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) i IL-6, kao i smanjenje produkata lipidne peroksidacije u jetri (Mak i sar., 2015).

Ovi nalazi vezani za efekte konzumacije oraha na ACE2 su takođe u skladu sa rezultatima prethodnih studija koje su pokazale da n-3 PUFA predstavljaju ACE2 modulatore. Ulu i saradnici su pokazali da ishrana bogata n-3 PUFA smanjuje inflamaciju u Ang II - zavisnoj hipertenziji, povećanjem nivoa iRNK za ACE2 u bubrezima (Ulu i sar., 2013). Efekat suplementacije PUFA na nivo ACE2 u MetS-u još uvek nije istražen. Prethodna istraživanja koja povezuju PUFA ili polifenolna jedinjenja sa ACE2 su oskudna i nekonzistentna. U adipocitima miša, DHA je povećala ekspresiju iRNK za ACE2 (Gupte, 2011), dok je inkubacija adipocita svinje sa DHA smanjila ekspresiju iRNK za ACE2 (Tseng i sar., 2010). Za razliku od adipoznog tkiva, administracija DHA nije pokazala uticaj na ekspresiju ACE2 u srcu i bubrezima (Gupte, 2011). Neslaganja u prethodnim studijama mogu biti posledica razlika u životinjskim modelima, vrsti ćelija i dozi PUFA, trajanju i tipu tretmana.

ACE2 je postao centar interesovanja nauke u toku COVID-19 pandemije, pri čemu se većina istraživanja sprovedenih u toku prethodnih nekoliko godina, fokusirala na jedinjenja koja bi mogla inhibirati aktivnost rekombinantnog humanog ACE2 (rhACE2). Nekoliko biljnih ekstrakata koji sadrže polifenole (Takahashi i sar., 2015, Takahashi i sar., 2017, Liu i sar., 2020) inhibiraju aktivnost rhACE2, in vitro, dok neki od njih inhibiraju ACE (Takahashi i sar., 2015). Nedavni rezultati su otkrili da se korisni efekti PUFA mogu pripisati njihovom inhibitornom efektu na vezivanje receptor-vezujućeg domena virusnog spajk proteina za humani ACE2 receptor (Goc i sar., 2021).

Dakle, naša studija je pokazala da suplementacija orasima, namirnicama bogatim n-3 PUFA, u MetS-u ima zaštitni efekat na srce kroz smanjenje odnosa n-6/n-3 PUFA i kroz povećanje nivoa ACE2 u srcu. Stimulacija ACE2/Ang 1-7 ose RAS-a može predstavljati moćan terapijski pristup u lečenju KVB. Pokazano je da povećana ekspresija ACE2, putem genskog transfera, sprečava fibrozu srca (Diez-Freire i sar., 2006), dok oralna

administracija ACE2 aktivatora poboljšava funkciju i remodelovanje srca u modelima pacova sa dijabetesom (Dong i sar., 2012, Murca i sar., 2012). Nedavna studija meta-analize je potvrdila da suplementacija n-3 PUFA smanjuje rizik od mortaliteta usled bolesti srca, kardiovaskularnih događaja i infarkta miokarda (Casula i sar., 2020). Imajući u vidu da su orasi bogat izvor n-3 PUFA, jasno je da promene u navikama u ishrani mogu imati dugoročne korisne efekte po zdravlje. Osim toga, orasi su i bogat izvor proteina, arginina, polifenola i katjona sa antihipertenzivnim svojstvima, pa bi njihova upotreba kao nutritivnih ACE2 aktivatora mogla imati dodatne kardioprotektivne efekte u kombinovanom pristupu sa konvencionalnim RAS blokatorima (kao što su ACE inhibitori i AT1R antagonisti) u terapiji KVB. Pokazano je da u prisustvu AT1R blokade, aktivacija ACE2/Ang 1-7/MasR ose povoljno utiče na remodelovanje miokarda (Sukumaran i sar., 2012) i vaskulature (Savoia i sar., 2020).

Međutim, mehanizmi koji preciznije objašnjavaju regulaciju ACE2 su još uvek nerazjašnjeni. Pokazano je da je ekspresija ACE2 pod kontrolom SIRT1 (Clarke i sar., 2014). To je u saglasnosti sa našom studijom, koja je ustanovila da suplementacija orasima povećava kako nivo SIRT1 (Bošković i sar., 2021), tako i nivo ACE2 u srcu pacova na fruktoznoj ishrani (Bošković i sar., 2022), što podržava hipotezu da SIRT1 povećava ekspresiju ACE2 u MetS-u.

Povećani nivo ACE nakon ishrane bogate fruktozom (Bošković i sar., 2022) mogao bi dovesti do povećanog nivoa Ang II, koji bi, sa druge strane, mogao povećati ekspresiju Nox4 (Harrison i sar., 2003) koja je detektovana u ovoj studiji (Bošković i sar., 2021). Sa druge strane, u ovom eksperimentalnom modelu MetS-a, suplementacija orasima nije poništila promene u nivoima ACE i Nox4 (Bošković i sar., 2022, Bošković i sar., 2021).

Nalazi naše studije ne sugerišu da bi povećana ekspresija ACE2, kao rezultat konzumacije oraha, mogla u potpunosti da neutrališe štetne efekte povećane ekspresije ACE, kao rezultat ishrane bogate fruktozom, već ukazuje na to da su ovi mehanizmi zavisni od AT1R, na čiju ekspresiju nije uticala ni ishrana bogata fruktozom ni suplementacija orasima (Bošković i sar., 2022). Odsustvom promena u ekspresiji AT1R može se objasniti odsustvo hipertrofije srca u ovom modelu MetS-a, što je u saglasnosti sa studijom koja je pokazala da upotreba AT1R antagonista može sprečiti progresiju hipertrofije leve komore kod pacova na visoko - fruktoznoj ishrani (Kamide i sar., 2002).

U ovoj studiji nije detektovan nijedan značajan efekat konzumacije oraha na komponente RAS-a kod kontrolnih pacova. Međutim, ishrana bogata orasima je smanjila nivo ACE kod kontrolnih pacova, iako ovo smanjenje nije statistički značajno. Gencoglu i sar. su takođe u svojoj studiji ukazali da nema značajnih razlika između kontrolne i grupe na standardnoj ishrani koja je konzumirala orahovo ulje, na promene telesne težine i težine jetre, metaboličke faktore rizika, markere oksidativnog stresa (eNOS) i faktore transkripcije (NF- κ B i Nrf2) kao i NADPH oksidaze (p22phok) i SIRT1. Sa druge strane, oni su pokazali da suplementacija orahovim uljem može ublažiti štetne uticaje kako ishrane sa visokim sadržajem ugljenih hidrata tako i ishrane sa visokim sadržajem masti kod pacova (Gencoglu i sar., 2020). Kao što je nedavno pokazano, ishrana bogata orasima ne utiče na ekspresiju gena povezanih sa inflamacijom (IL-6, IL-1 β i TNF- α) u poređenju sa kontrolnom grupom (Leung i sar., 2021). Iako efekti u kontrolama i dalje pokazuju neka neslaganja, mnoge studije naglašavaju obećavajući potencijal konzumacije oraha kako u prevenciji tako i u tretmanu MetS-a.

5.5. Efekti ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na nivo NF- κ B u srcu pacova

Hronična inflamacija, koja se karakteriše povećanjem cirkulišućih nivoa proinflamatornih markera, ima kritičnu ulogu u patogenezi MetS-a. Meta-analiza objavljena 2018. godine otkrila je da su brojne studije potvrdile vezu između konzumacije šećera i razvoja inflamacije (Della Corte i sar., 2018).

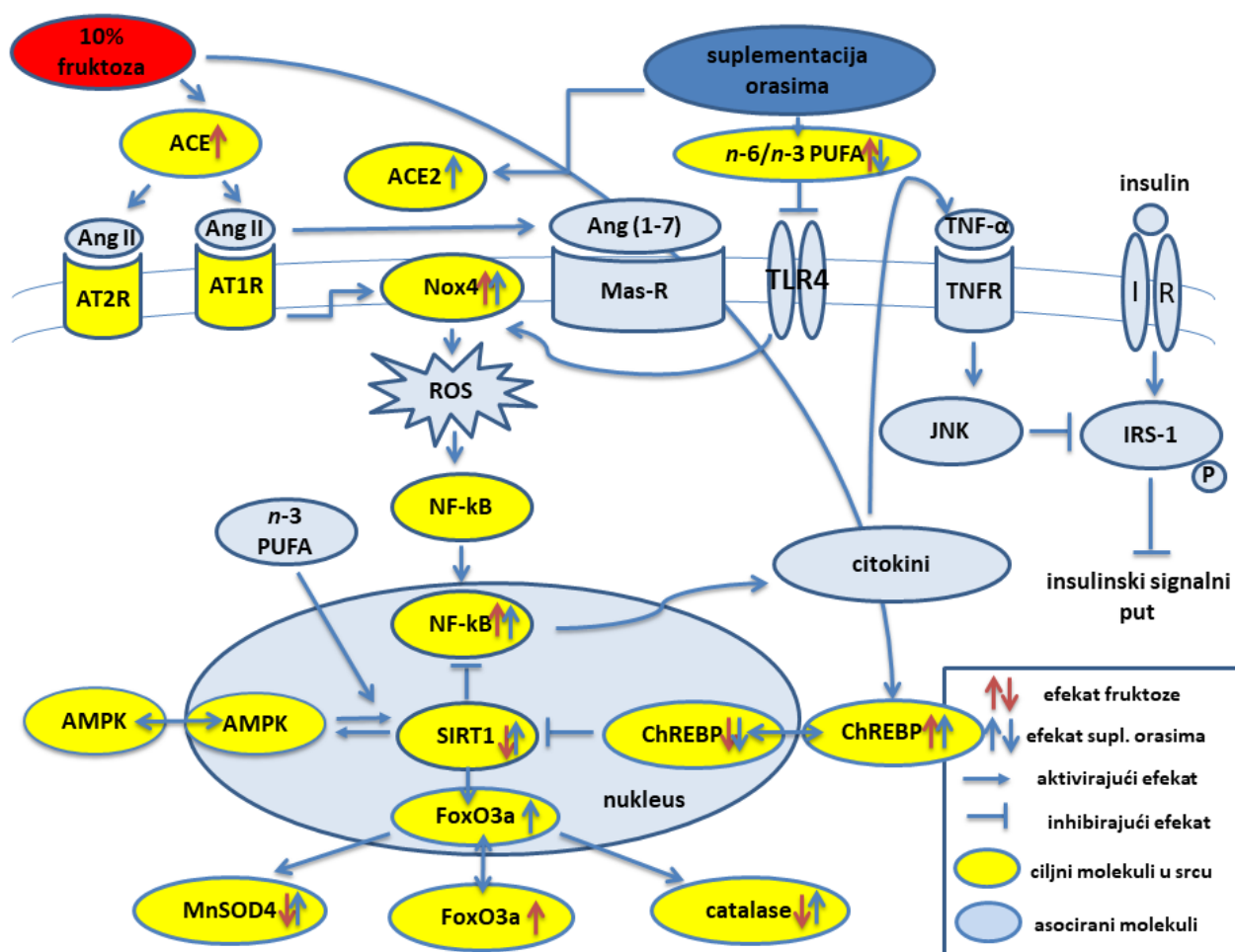
Inflamacija u srcu pacova na ishrani bogatoj fruktozom, pre i posle konzumacije oraha, praćena je kroz ekspresiju transkripcionog faktora NF- κ B. Kao što se očekivalo, ishrana bogata fruktozom je povećala nivo NF- κ B, ali 6-nedeljna konzumacija oraha nije uspela da poništi ovu promenu.

Efekat ishrane bogate fruktozom na aktivaciju NF- κ B u skladu je sa prethodnom studijom, u kojoj je pokazano da ishrana bogata fruktozom aktivira NF- κ B u srcu ovarijektomisanih ženki pacova, povećanjem fosforilacije p65 subjedinice na Ser 276 (Bundalo i sar., 2015). Osim toga, Veličković i saradnici su pokazali da ishrana bogata fruktozom aktivira NF- κ B kroz fosforilaciju i proteolitičku degradaciju inhibitornog proteina I κ B u jetri pacova na fruktoznoj ishrani (Veličković i sar., 2019).

Zhang i saradnici su pokazali da oralna administracija jestivih ulja sa niskim odnosom n-6/n-3 PUFA u trajanju od 12 nedelja ublažava inflamaciju i progresiju osteoartritisa putem inhibicije NF- κ B signalnog puta (Zhang i sar., 2020). Produženi period konzumacije oraha bi, stoga, mogao uticati na smanjenje ekspresije NF- κ B u srcu mužjaka pacova nakon ishrane bogate fruktozom, s obzirom i na to da je pokazano da tretman humanih LPS-stimulisanih makrofaga primenom EPA ili DHA smanjuje ekspresiju i sekreciju proinflamatornih citokina, kao i aktivnost NF- κ B (Weldon i sar., 2007).

5.6. Shematski prikaz povezanosti RAS-a, oksidativnog stresa i inflamacije u MetS-u

Shema D1. Efekat ishrane bogate fruktozom i suplementacije orasima na ciljne molekule u srcu, kao i sa njima asocirane molekule iz literature koji povezuju RAS, oksidativni stres i inflamaciju u zajedničke puteve povezane sa insulinskom rezistencijom koja leži u osnovi metaboličkih poremećaja.



6. ZAKLJUČCI

Izvedena studija je potvrdila korisne efekte konzumacije oraha na kardiometabolički status i predložila mehanizme koji su u osnovi njihovih antiinflamatornih i antioksidativnih efekata u srcu, ukazujući na mogućnost razvoja novih, nefarmakoloških pristupa u terapiji kardiometaboličkih bolesti.

1. SIRT1-FoxO3a-MnSOD/katalaza antioksidativna osa, kompromitovana ishranom sa visokim sadržajem fruktoze, uravnotežena je nakon suplementacije orasima.
2. SIRT1 ima ulogu nutritivnog senzora koji prenosi signale odgovorne za metaboličko stanje i inflamatorne procese u srcu, pa bi korisni efekti konzumacije oraha na SIRT1 mogao predstavljati osnovu za dalji razvoj nutritivne strategije u pogledu očuvanja srca u MetS-u.
3. Konzumacija oraha je pokazala značajan efekat na smanjenje odnosa AA/EPA i AA/DHA u plazmi, što predstavlja značajno antiinflamatorno dejstvo. U srcu, fruktoza i orasi stimulišu preuzimanje i oksidaciju masnih kiselina, ali za razliku od fruktoze, suplementacija orasima primarno povećava nivo i metabolizam n-3 PUFA.
4. Detekcija ekspresije ChREBP-a u srcu, do sada nedovoljno istražena u modelu MetS-a, predstavlja značajan doprinos u oblasti. Ishrana bogata fruktozom i suplementacija orasima utiču na njegovu ekspresiju i u citosolu i u jedru. Ipak potrebna su dalja istraživanja u cilju razumevanja efekata suplementacije orasima.
5. Suplementacija orasima u trajanju od šest nedelja kod pacova izloženih ishrani bogatoj fruktozom, pozitivno utiče na nivo ACE2 i odnos AA/EPA u srcu, kardioprotektivne komponente, što doprinosi zaštiti srca u MetS-u.
6. Stimulacija ACE2/Ang 1-7 ose RAS-a može predstavljati važan terapijski pristup u lečenju kardiometaboličkih bolesti, pa suplementacija orasima može predstavljati potencijalno moćnu nefarmakološku strategiju.

7. LITERATURA

1. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*. 2005; 2(1):5. doi: 10.1186/1743-7075-2-5.
2. Khorshidian N, Shadnoush M, Zabihzadeh Khajavi M, Sohrabvandi S, Yousefi M, Mortazavian AM. Fructose and high fructose corn syrup: are they a two-edged sword? *Int J Food Sci Nutr*. 2021; 72(5):592–614. doi:10.1080/09637486.2020.1862068
3. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(4):899-906. doi: 10.1093/ajcn/86.4.899.
4. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(2):E227-37. doi: 10.1152/ajpendo.90245.2008.
5. Collino M. High dietary fructose intake: Sweet or bitter life? *World journal of diabetes*. 2011; 2(6):77-81. doi: 10.4239/wjd.v2.i6.77.
6. Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab (Lond)*. 2012; 9(1):89. doi: 10.1186/1743-7075-9-89.
7. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010; 90(1):23-46. doi: 10.1152/physrev.00019.2009.
8. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10(2):142-8. doi: 10.1097/MCO.0b013e328042ba90.
9. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2009; 332(1-2):145-59. doi: 10.1007/s11010-009-0184-4.
10. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365(9468):1415-1428. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
11. Taskinen MR, Packard CJ, Borén J. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2019; 11(9):1987. doi: 10.3390/nu11091987.
12. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(5):911-22. doi: 10.1093/ajcn/76.5.911.
13. Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LM. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50(6):1035-43. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.03.002.
14. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*. 2005; 22(6):674-82. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x.
15. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011; 22(9):353-63. doi: 10.1016/j.tem.2011.04.007.
16. Klein AV, Kiat H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J Hypertens*. 2015; 33(5):912-920. doi: 10.1097/HJH.0000000000000551.
17. Soleimani M. Dietary fructose, salt absorption and hypertension in metabolic syndrome: towards a new paradigm. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011; 201(1):55-62. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02167.x.

18. Okamura T, Tawa M, Geddawy A, Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H, et al. Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. *J Pharmacol Sci.* 2014; 124(1):76-85. doi: 10.1254/jphs.13178fp.
19. Jiang J, Tran L, Vasudevan H, Xia Z, Yuen VG, McNeill JH. Endothelin-1 blockade prevents COX2 induction and TXA2 production in the fructose hypertensive rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85(3-4):422-429. doi: 10.1139/y06-088.
20. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem.* 2009; 325(1-2):89-97. doi: 10.1007/s11010-008-0023-z.
21. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 2004; 43(2):255-62. doi: 10.1161/01.HYP.0000111136.86976.26.
22. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Caputi AP, Salvemini D. Superoxide: a key player in hypertension. *FASEB J.* 2004; 18(1):94-101. doi: 10.1096/fj.03-0428com.
23. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(6):1115-26. doi: 10.1089/ars.2007.1989.
24. Nagareddy PR, Rajput PS, Vasudevan H, McClure B, Kumar U, MacLeod KM, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 improves endothelial function and prevents hypertension in insulin-resistant rats. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(3):705-15. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01583.x.
25. Dhar I, Dhar A, Wu L, Desai KM. Increased methylglyoxal formation with upregulation of renin angiotensin system in fructose fed sprague-dawley rats. *PLoS One* 2013; 8(9):e74212. doi: 10.1371/journal.pone.0074212.
26. Wautier M-P, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier J-L. Activation of NADPH oxidase by age links oxidant stress to altered gene expression via rage. *Am J Physiol* 2001; 280(5):E685-94. doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685.
27. Jia G, Aroor Annayya R, Whaley-Connell Adam T, Sowers James R. Fructose and uric acid: is there a role in endothelial function? *Curr Hypertens Rep.* 2014; 16(6):434. doi: 10.1007/s11906-014-0434-z.
28. Kang D-H, Park S-K, Lee I-K, Johnson RJ. Uric acid-induced c-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(12):3553-62. doi: 10.1681/ASN.2005050572.
29. Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, Mu W, Heinig M, Cirillo P, et al. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19(9):1712-20. doi: 10.1681/ASN.2007121304.
30. Fu Y-C, Yin S-C, Chi C-S, Hwang B, Hsu S-L. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat endothelial cells via a ros-dependent jnk activation pathway. *Apoptosis.* 2006; 11(11):2053-63. doi: 10.1007/s10495-006-0192-8.
31. Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *Int J Health Sci (Qassim).* 2007; 1(2):V-VIII.
32. Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33(2):101-7. doi: 10.1016/1056-8719(94)00063-a.

33. Dills WL Jr. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am J Clin Nutr.* 1993; 58(5 Suppl):779S-787S. doi: 10.1093/ajcn/58.5.779S.
34. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(3):F625-31. doi: 10.1152/ajprenal.00140.2005.
35. Wong PS, Johns EJ. Effect of acute saline volume loading on renal sympathetic nerve activity in anaesthetised fructose-fed and fat-fed rats. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 75(1):60-69. doi: 10.1016/s0165-1838(98)00180-5.
36. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292(1):F423-9. doi: 10.1152/ajprenal.00124.2006.
37. Yi KH, Hwang JS, Kim EY, Lee SH, Kim DH, Lim JS. Prevalence of insulin resistance and cardiometabolic risk in Korean children and adolescents: a population-based study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 103(1):106-13. doi: 10.1016/j.diabres.2013.10.021.
38. Kanarek RB, Orthen-Gambill N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr.* 1982; 112(8):1546-54. doi: 10.1093/jn/112.8.1546.
39. D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM, Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension.* 2005; 46(4):806-11. doi: 10.1161/01.HYP.0000182697.39687.34.
40. Huynh M, Luiken JJ, Coumans W, Bell RC. Dietary fructose during the suckling period increases body weight and fatty acid uptake into skeletal muscle in adult rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16(8):1755-62. doi: 10.1038/oby.2008.268.
41. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295(5):R1370-5. doi: 10.1152/ajpregu.00195.2008.
42. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(5):1322-34. doi: 10.1172/JCI37385.
43. Machi JF, Bernardes N, Mostarda C, Moraes-Silva IC, Irigoyen MC, De Angelis K, et al. Walking promotes metabolic and baroreflex sensitivity improvement in fructose-fed male rats. *Eur J Appl Physiol.* 2013; 113(1):41-49. doi: 10.1007/s00421-012-2411-z.
44. Mostarda C, Moraes-Silva IC, Salemi VM, Machi JF, Rodrigues B, De Angelis K, et al. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics.* 2012; 67(7):815-20. doi: 10.6061/clinics/2012(07)18.
45. Sanches IC, de Oliveira Brito J, Candido GO, da Silva Dias D, Jorge L, Irigoyen MC, et al. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause.* 2012; 19(5):562-568. doi: 10.1097/gme.0b013e3182358c9c.
46. Pektas MB, Koca HB, Sadi G, Akar F. Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. *Biomed Res Int.* 2016; 8014252. doi: 10.1155/2016/8014252.

47. Kopp A, Gross P, Falk W, Bala M, Weigert J, Buechler C, et al. Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39(10):924-933. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02185.x.
48. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444(7121):860-867. doi: 10.1038/nature05485.
49. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.
50. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008; 37(3):753-68, x-xi. doi: 10.1016/j.ecl.2008.07.002.
51. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005; 46(11):2347-55. doi: 10.1194/jlr.M500294-JLR200.
52. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews Immunology*. 2011; 11(2):98-107. doi: 10.1038/nri2925.
53. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92(3):347-55. doi: 10.1079/bjn20041213.
54. van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med*. 2013; 71(4):174-87.
55. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(2):85-97. doi: 10.1038/nri2921.
56. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008; 454(7203):455-462. doi: 10.1038/nature07203.
57. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005; 120(5):649-661. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.041.
58. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114(6):597-605. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.
59. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2470-2478. doi: 10.1172/JCI116482.
60. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015; 5(1):194-222. doi: 10.3390/biom5010194.
61. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(α) signaling through IKK2. *J Biol Chem*. 2008; 283(51):35375-35382. doi: 10.1074/jbc.M806480200.
62. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007; 21(12):1443-55. doi: 10.1101/gad.1550907.
63. Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2008; 79(2):238-48. doi: 10.1093/cvr/cvn093.
64. Karaca A, Palabıyık O, Taştekin E, Turan FN, Vardar SA. High fructose diet suppresses exercise-induced increase in AQP7 expression in the in vivo rat heart. *Anatol J Cardiol*. 2016; 16(12):916-922. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2016.6958.

65. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005; 85(3):1093-129. doi: 10.1152/physrev.00006.2004.
66. Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 146(1):26-39. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.09.014.
67. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2011; 22(10):394-403. doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001.
68. Pejčić Z, Dobrić S, Čupić V, Borožan S. Uticaj peroralne primene diklofenaka na koncentraciju azotnog oksida u plazmi pacova. *Arhiv za farmaciju.* 2006; 56(4):394-395.
69. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(1):24-38. doi: 10.1002/jbt.10058.
70. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:8267234. doi: 10.1155/2019/8267234.
71. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015; 39(1 Suppl):18S-32S. doi: 10.1177/0148607115595980.
72. Bekkouche L, Bouchenak M, Malaisse WJ, Yahia DA. The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients. *Horm Metab Res.* 2014; 46(4):274-82. doi: 10.1055/s-0033-1363657.
73. Song D, Hutchings S, Pang CC. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 508(1-3):205-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.12.018.
74. Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens.* 2000; 18(6):695-702. doi: 10.1097/00004872-200018060-00006.
75. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension.* 2002; 40(2):142-7. doi: 10.1161/01.hyp.0000024348.87637.6f.
76. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002; 416(6878):337-9. doi: 10.1038/416337a.
77. Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H. Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(6):e000433. doi: 10.1161/JAHA.113.000433.
78. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2015; 42(3):406-17. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.
79. Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(3):238-56. doi: 10.1016/s0163-7827(02)00065-6.

80. Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*. 2016; 8(5):247. doi: 10.3390/nu8050247.
81. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2013; 123(7):2764-72. doi: 10.1172/JCI67227.
82. Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, et al. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*. 2009; 58(11):2536-46. doi: 10.2337/db08-1361.
83. Zhao C, Zhang Y, Liu H, Li P, Zhang H, Cheng G. Fortunellin protects against high fructose-induced diabetic heart injury in mice by suppressing inflammation and oxidative stress via AMPK/Nrf-2 pathway regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 490(2):552-559. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.076.
84. Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18(7):527-551. doi: 10.1038/s41573-019-0019-2.
85. O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*. 2013; 493(7432):346-55. doi: 10.1038/nature11862.
86. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89(7):667-76. doi: 10.1007/s00109-011-0748-0.
87. Yang XD, Tajkhorshid E, Chen LF. Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 2010; 30(9):2170-80. doi: 10.1128/MCB.01343-09.
88. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25(3):138-45. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.001.
89. Elesela S, Morris SB, Narayanan S, Kumar S, Lombard DB, Lukacs NW. Sirtuin 1 regulates mitochondrial function and immune homeostasis in respiratory syncytial virus infected dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2020; 16(2):e1008319. doi: 10.1371/journal.ppat.1008319.
90. Raud B, McGuire PJ, Jones RG, Sparwasser T, Berod L. Fatty acid metabolism in CD8+ T cell memory: Challenging current concepts. *Immunol Rev*. 2018; 283(1):213-231. doi: 10.1111/imr.12655.
91. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012; 15(5):675-90. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.003.
92. Olmos Y, Sánchez-Gómez FJ, Wild B, García-Quintans N, Cabezudo S, Lamas S, et al. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(13):1507-21. doi: 10.1089/ars.2012.4713.
93. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002; 419(6904):316-21. doi: 10.1038/nature01036.
94. Tan WQ, Wang K, Lv DY, Li PF. Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):29730-9. doi: 10.1074/jbc.M805514200.

95. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(4):E751-60. doi: 10.1152/ajpendo.00745.2009.
96. Cheng L, Tanaka A, Chiribau C, Qin Q, Sorescu D. Nox4 regulates cellular survival by modulating FoxO3a activity and SIRT1 expression. *J Card Fail.* 2010; 16:S35. doi:10.1016/j.cardfail.2010.06.118.
97. Zarzuelo MJ, López-Sepúlveda R, Sánchez M, Romero M, Gómez-Guzmán M, Ungvary Z, et al. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85(9):1288-96. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.015.
98. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107:15565–15570. doi:10.1073/pnas.1002178107.
99. Noriega LG, Feige JN, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman MA, et al. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. 2011; *EMBO Rep.* 12:1069–1076. doi: 10.1038/embor.2011.151.
100. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(19):7281-7286. doi: 10.1073/pnas.0401516101.
101. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism.* 2006; 4(2):107-110. doi: 10.1016/j.cmet.2006.06.008.
102. Sarrazy V, Sore S, Viaud M, Rignol G, Westerterp M, Ceppo F, et al. Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation. *Cell Rep.* 2015; 13(1):132-144. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.068.
103. Bošković M, Bundalo M, Živković M, Stanišić J, Kostić M, Korićanac G, et al. Estradiol ameliorates antioxidant axis SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase in the heart of fructose-fed ovariectomized rats. *J Funct Foods.* 2018; 52:690–698, doi: 10.1016/j.jff.2018.11.053.
104. Li Y, Shen G, Yu C, Li G, Shen J, Gong J, et al. Angiotensin II induces mitochondrial oxidative stress and mtDNA damage in osteoblasts by inhibiting SIRT1-FoxO3a-MnSOD pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 455(1-2):113-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.123.
105. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006.
106. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001; 276(43):39721-6. doi: 10.1074/jbc.M105253200.
107. Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension.* 2008; 52(3):542-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114280.
108. Shanmugam S, Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int.* 1996; 20(3):169-76. doi: 10.1006/cbir.1996.0021.

109. Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, et al. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol.* 1997; 272(3 Pt 2):F299-304. doi: 10.1152/ajprenal.1997.272.3.F299.
110. Sarkis A, Lopez B, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13(2):205-214. doi: 10.1097/00041552-200403000-00009.
111. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension.* 2010; 55(4):924-31. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147843.
112. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(5):953-70. doi: 10.1210/me.2004-0536.
113. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, et al. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010; 11(1):67-73. doi: 10.1177/1470320309347791.
114. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res.* 1998; 83(10):1035-46. doi: 10.1161/01.res.83.10.1035.
115. Paulis L, Foulquier S, Namsolleck P, Recarti C, Steckelings UM, Unger T. Combined Angiotensin Receptor Modulation in the Management of Cardio-Metabolic Disorders. *Drugs.* 2016; 76(1):1-12. doi: 10.1007/s40265-015-0509-4.
116. Quiroga DT, Miquet JG, Gonzalez L, Sotelo AI, Muñoz MC, Geraldés PM, et al. Mice lacking angiotensin type 2 receptor exhibit a sex-specific attenuation of insulin sensitivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 498:110587. doi: 10.1016/j.mce.2019.110587.
117. Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010; 11(1):19-31. doi: 10.1177/1470320309347785.
118. Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, Dong Y, Bloch-Faure M, Inagami T, et al. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circ Res.* 2004; 94(12):1623-9. doi: 10.1161/01.RES.0000131497.73744.1a.
119. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996; 78(3):415-23. doi: 10.1161/01.res.78.3.415.
120. Erdös EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med.* 1976; 60(6):749-59. doi: 10.1016/0002-9343(76)90889-5.
121. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1998; 31(1 Pt 2):362-7. doi: 10.1161/01.hyp.31.1.362.
122. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A. Angiotensin-converting enzyme inhibition modifies angiotensin but not kinin peptide levels in human atrial tissue. *Hypertension.* 1999; 34(2):171-5. doi: 10.1161/01.hyp.34.2.171.
123. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts

- angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5):E1-9. doi: 10.1161/01.res.87.5.e1.
124. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004; 383(Pt 1):45-51. doi: 10.1042/BJ20040634.
125. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, et al. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008; 103(11):1319-26. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184911.
126. Simões E Silva AC, Teixeira MM. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacol Res.* 2016; 107:154-162. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.018.
127. Liu C, Lv XH, Li HX, Cao X, Zhang F, Wang L, et al. Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol.* 2012; 49(4):291-9. doi: 10.1007/s00592-011-0348-z.
128. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Pôrto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(5):953-61. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.200493.
129. Kim MA, Yang D, Kida K, Molotkova N, Yeo SJ, Varki N, et al. Effects of ACE2 inhibition in the post-myocardial infarction heart. *J Card Fail.* 2010; 16(9):777-85. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.04.002.
130. Moritani T, Iwai M, Kanno H, Nakaoka H, Iwanami J, Higaki T, et al. ACE2 deficiency induced perivascular fibrosis and cardiac hypertrophy during postnatal development in mice. *J Am Soc Hypertens.* 2013; 7(4):259-66. doi: 10.1016/j.jash.2013.03.002.
131. Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol.* 2005; 90(5):783-90. doi: 10.1113/expphysiol.2005.031096.
132. Díez-Freire C, Vázquez J, Correa de Adjounian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics.* 2006; 27(1):12-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00312.2005.
133. Dong B, Yu QT, Dai HY, Gao YY, Zhou ZL, Zhang L, et al. Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59(8):739-47. doi: 10.1016/j.jacc.2011.09.071.
134. Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept.* 2000; 91(1-3):1-11. doi: 10.1016/s0167-0115(99)00123-8.
135. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab Invest.* 2000; 80(4):513-27. doi: 10.1038/labinvest.3780057.
136. Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, et al. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats

- overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens.* 2001; 19(8):1465-72. doi: 10.1097/00004872-200108000-00015.
137. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, et al. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(11):1832-9. doi: 10.1016/j.jacc.2004.11.070.
138. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:415-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
139. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011; 121(6):2111-7. doi: 10.1172/JCI57132.
140. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* 2005; 54(12):3458-65. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3458.
141. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int.* 2002; 61(6):1986-95. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00365.x.
142. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(1):49-62. doi: 10.1038/nrm2083.
143. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem.* 2008; 283(21):14230-41. doi: 10.1074/jbc.M800061200.
144. Bundalo MM, Zivkovic MD, Romc SDj, Tepavcevic SN, Koricanac GB, Djuric TM, et al. Fructose-rich diet induces gender-specific changes in expression of the renin-angiotensin system in rat heart and upregulates the ACE/AT1R axis in the male rat aorta. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2016; 17(2):1470320316642915. doi: 10.1177/1470320316642915.
145. Wang X, Khaidakov M, Ding Z, Mitra S, Lu J, Liu S, et al. Cross-talk between inflammation and angiotensin II: studies based on direct transfection of cardiomyocytes with AT1R and AT2R cDNA. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237(12):1394-401. doi: 10.1258/ebm.2012.012212.
146. Nelson RA, Bremer AA. Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010; 8(1):1-14. doi: 10.1089/met.2009.0068.
147. Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(1):E355-63. doi: 10.1152/ajpendo.00632.2006.
148. Renna NF, Lembo C, Diez E, Miatello RM. Role of Renin-Angiotensin system and oxidative stress on vascular inflammation in insulin resistance model. *Int J Hypertens.* 2013; 2013:420979. doi: 10.1155/2013/420979.
149. Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, et al. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(4):748-58. doi: 10.3945/ajcn.112.041343.

150. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.010.
151. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. 2007; 282(31):22254-66. doi: 10.1074/jbc.M703169200.
152. Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol*. 1995; 163(1):120-8. doi: 10.1006/cimm.1995.1106.
153. Peterson LD, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids*. 1998; 33(2):171-80. doi: 10.1007/s11745-998-0193-y.
154. Yamada H, Yoshida M, Nakano Y, Suganami T, Satoh N, Mita T, et al. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(12):2173-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.171736.
155. Zeyda M, Säemann MD, Stuhlmeier KM, Mascher DG, Nowotny PN, Zlabinger GJ, et al. Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2005; 280(14):14293-301. doi: 10.1074/jbc.M410000200. Epub 2005 Jan 31.
156. Zeyda M, Szekeres AB, Säemann MD, Geyeregger R, Stockinger H, Zlabinger GJ, et al. Suppression of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids: selectivity in inhibition of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor activation. *J Immunol*. 2003; 170(12):6033-9. doi: 10.4049/jimmunol.170.12.6033.
157. Xue B, Yang Z, Wang X, Shi H. Omega-3 polyunsaturated fatty acids antagonize macrophage inflammation via activation of AMPK/SIRT1 pathway. *PLoS One*. 2012; 7(10):e45990. doi: 10.1371/journal.pone.0045990.
158. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*. 2005; 174(7):4345-55. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4345.
159. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(4):632-40. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.012.
160. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*. 2003; 278(17):14677-87. doi: 10.1074/jbc.M300218200.
161. Mas E, Croft KD, Zahra P, Barden A, Mori TA. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin Chem*. 2012; 58(10):1476-84. doi: 10.1373/clinchem.2012.190199.
162. Polus A, Zapala B, Razny U, Gielicz A, Kiec-Wilk B, Malczewska-Malec M, et al. Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator production. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1861(11):1746-1755. doi: 10.1016/j.bbaliip.2016.08.005.

163. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod.* 2007; 77(2):190-201. doi: 10.1095/biolreprod.107.060558.
164. Petrovic S, Arsic A. Fatty Acids: Fatty Acids. In: Caballero B, Finglas P, and Toldrá F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 2, 2016; pp. 623-631. Oxford: Academic Press.
165. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(6 Suppl):1505S-1519S. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1505S.
166. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008; 233(6):674-88. doi: 10.3181/0711-MR-311.
167. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2013; 5(8):2901-23. doi: 10.3390/nu5082901.
168. Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of ω -3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25(1):85-90. doi: 10.1097/MOL.0000000000000041.
169. Ninomiya T, Nagata M, Hata J, Hirakawa Y, Ozawa M, Yoshida D, et al. Association between ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid and risk of cardiovascular disease: the Hisayama Study. *Atherosclerosis.* 2013; 231(2):261-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.023.
170. Takahashi M, Ando J, Shimada K, Nishizaki Y, Tani S, Ogawa T, et al. The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017; 17(1):41. doi: 10.1186/s12872-017-0479-4.
171. Tutino V, De Nunzio V, Caruso MG, Veronese N, Lorusso D, Di Masi M, et al. Elevated AA/EPA Ratio Represents an Inflammatory Biomarker in Tumor Tissue of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(8):2050. doi: 10.3390/ijms20082050.
172. Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2017; 12(11):e0187934. doi: 10.1371/journal.pone.0187934.
173. Aune D, Keum N, Giovannucci E, Fadnes LT, Boffetta P, Greenwood DC, et al. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMC Med.* 2016; 14(1):207. doi: 10.1186/s12916-016-0730-3.
174. Relja A, Miljković A, Gelemanović A, Bošković M, Hayward C, Polašek O, et al. Nut Consumption and Cardiovascular Risk Factors: A Cross-Sectional Study in a Mediterranean Population. *Nutrients.* 2017; 9(12):1296. doi: 10.3390/nu9121296.
175. Guasch-Ferré M, Liu X, Malik VS, Sun Q, Willett WC, Manson JE, et al. Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(20):2519-2532. doi: 10.1016/j.jacc.2017.09.035.
176. Larsson SC, Drca N, Björck M, Bäck M, Wolk A. Nut consumption and incidence of seven cardiovascular diseases. *Heart.* 2018; 104(19):1615-1620. doi: 10.1136/heartjnl-2017-312819.

177. Pan A, Sun Q, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Walnut consumption is associated with lower risk of type 2 diabetes in women. *J Nutr.* 2013; 143(4):512-8. doi: 10.3945/jn.112.172171.
178. Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, et al; PREDIMED Study Investigators. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med.* 2008; 168(22):2449-2458. doi: 10.1001/archinte.168.22.2449.
179. Leung KS, Galano JM, Yau YF, Oger C, Durand T, Lee JC. Walnut-Enriched Diet Elevated α -Linolenic Acid, Phytosteranes, and Phytosterols in Rat Liver and Heart Tissues and Modulated Anti-inflammatory Lipid Mediators in the Liver. *J Agric Food Chem.* 2021; 69(32):9094-9101. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06690.
180. Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(20):5028. doi: 10.3390/ijms20205028.
181. Oppedisano F, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, et al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines.* 2020; 8(9):306. doi: 10.3390/biomedicines8090306.
182. Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts--implications for cardiovascular health. *Br J Nutr.* 2006; 96 Suppl 2:S29-35. doi: 10.1017/bjn20061861.
183. Salas-Salvadó J, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr.* 2006; 96 Suppl 2:S46-51. doi: 10.1017/bjn20061863.
184. Choi Y, Abdelmegeed MA, Akbar M, Song BJ. Dietary walnut reduces hepatic triglyceride content in high-fat-fed mice via modulation of hepatic fatty acid metabolism and adipose tissue inflammation. *J Nutr Biochem.* 2016; 30:116-25. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.005.
185. Kim Y, Keogh J, Clifton PM. Nuts and Cardio-Metabolic Disease: A Review of Meta-Analyses. *Nutrients.* 2018; 10(12):1935. doi: 10.3390/nu10121935.
186. Elin RJ, Hosseini JM. Is the magnesium content of nuts a factor for coronary heart disease? *Arch Intern Med.* 1993; 153(6):779-80. doi:10.1001/archinte.1993.00410060079014
187. Fraser GE. Nut consumption, lipids, and risk of a coronary event. *Clin Cardiol.* 1999; 22(7 Suppl):III11-5. doi: 10.1002/clc.4960221504.
188. Vinson JA, Cai Y. Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food Funct.* 2012; 3(2):134-40. doi: 10.1039/c2fo10152a.
189. Segura R, Javierre C, Lizarraga MA, Ros E. Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. *Br J Nutr.* 2006; 96 Suppl 2:S36-44. doi: 10.1017/bjn20061862.
190. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84(1):95-135. doi: 10.1093/ajcn/84.1.95.
191. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr.* 2004; 134(11):2991-7. doi: 10.1093/jn/134.11.2991.

192. Papoutsi Z, Kassi E, Chinou I, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Moutsatsou P. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *Br J Nutr*. 2008; 99(4):715-22. doi: 10.1017/S0007114507837421.
193. Ishiyama N, Ravier MA, Henquin JC. Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290(3):E540-9. doi: 10.1152/ajpendo.00032.2005.
194. Coates AM, Howe PR. Edible nuts and metabolic health. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18(1):25-30. doi: 10.1097/MOL.0b013e3280123a47.
195. Bhardwaj R, Manivannan S, Gharib W, Warden B, Hobbs G, Jain A. Acute effects of diets rich in almonds and walnuts on endothelial function in humans (abstract). *Circulation*. 2012; 126:A14738.
196. Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Bulló M, Ros E, Cabré-Vila JJ, Salas-Salvadó J. Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011; 21(2):126-35. doi: 10.1016/j.numecd.2009.08.005.
197. Freisling H, Noh H, Slimani N, Chajès V, May AM, Peeters PH, et al. Nut intake and 5-year changes in body weight and obesity risk in adults: results from the EPIC-PANACEA study. *Eur J Nutr*. 2018; 57(7):2399-2408. doi: 10.1007/s00394-017-1513-0.
198. Brennan AM, Sweeney LL, Liu X, Mantzoros CS. Walnut consumption increases satiation but has no effect on insulin resistance or the metabolic profile over a 4-day period. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18(6):1176-82. doi: 10.1038/oby.2009.409.
199. Ellis PR, Kendall CW, Ren Y, Parker C, Pacy JF, Waldron KW, et al. Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(3):604-13. doi: 10.1093/ajcn/80.3.604.
200. Langhans W, Leitner C, Arnold M. Dietary fat sensing via fatty acid oxidation in enterocytes: possible role in the control of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300(3):R554-65. doi: 10.1152/ajpregu.00610.2010.
201. Eisenstein J, Roberts SB, Dallal G, Saltzman E. High-protein weight-loss diets: are they safe and do they work? A review of the experimental and epidemiologic data. *Nutr Rev*. 2002; 60(7 Pt 1):189-200. doi: 10.1301/00296640260184264.
202. Petrović-Oggiano G, Debeljak-Martačić J, Ranković S, Pokimica B, Mirić A, Glibetić M, et al. The Effect of Walnut Consumption on n-3 Fatty Acid Profile of Healthy People Living in a Non-Mediterranean West Balkan Country, a Small Scale Randomized Study. *Nutrients*. 2020; 12(1):192. doi: 10.3390/nu12010192.
203. EuroFIR FoodExplorer. 2013; Available at: <http://www.eurofir.org/foodexplorer/>
204. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens*. 2008; 21(12):1288-91. doi: 10.1038/ajh.2008.301.
205. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226(1):497-509.

206. Harth S, Dreyfus H, Urban PF, Mandel P. Direct thin-layer chromatography of gangliosides of a total lipid extract. *Anal Biochem.* 1978; 86(2):543-51. doi: 10.1016/0003-2697(78)90781-9.
207. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
208. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
209. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010; 401(2):318-20. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036.
210. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
211. Stanisic J, Ivkovic T, Romic S, Zec M, Culafic T, Stojiljkovic M, et al. Beneficial effect of walnuts on vascular tone is associated with Akt signalling, voltage-dependent calcium channel LTCC and ATP-sensitive potassium channel Kv1.2. *Int J Food Sci Nutr.* 2021; 72(3):324-334. doi: 10.1080/09637486.2020.1796931.
212. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(4):629-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092.
213. Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21(3):185-93. doi: 10.1097/01.hco.0000221579.25878.11.
214. Croitoru A, Fikai D, Craciun L, Fikai A, Andronescu E. Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, *Juglans regia*. *Curr Pharm Des.* 2019; 25(2):119-131. doi: 10.2174/1381612825666190329150825.
215. Bošković M, Živković M, Korićanac G, Stanišić J, Zec M, Krga I, et al. Walnut Supplementation Restores the SIRT1-FoxO3a-MnSOD/Catalase Axis in the Heart, Promotes an Anti-Inflammatory Fatty Acid Profile in Plasma, and Lowers Blood Pressure on Fructose-Rich Diet. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021:5543025. doi: 10.1155/2021/5543025.
216. Lutz M, Luna L. Nuts and Body Weight - An Overview. *J Nutr Health Sci.* 2016; 3(1): 104. doi: 10.15744/2393-9060.3.104.
217. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Benefits of Nut Consumption on Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors: Multiple Potential Mechanisms of Actions. *Nutrients.* 2017; 9(11):1271. doi: 10.3390/nu9111271.
218. Li H, Li X, Yuan S, Jin Y, Lu J. Nut consumption and risk of metabolic syndrome and overweight/obesity: a meta-analysis of prospective cohort studies and randomized trials. *Nutr Metab (Lond).* 2018; 15:46. doi: 10.1186/s12986-018-0282-y.
219. Njike VY, Ayettey R, Petraro P, Treu JA, Katz DL. Walnut ingestion in adults at risk for diabetes: effects on body composition, diet quality, and cardiac risk measures. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2015; 3(1):e000115. doi: 10.1136/bmjdr-2015-000115.
220. Scott NJA, Ellmers LJ, Pilbrow AP, Thomsen L, Richards AM, Frampton CM, et al. Metabolic and Blood Pressure Effects of Walnut Supplementation in a Mouse

- Model of the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2017; 9(7):722. doi: 10.3390/nu9070722.
221. Sabaté J, Cordero-Macintyre Z, Siapco G, Torabian S, Haddad E. Does regular walnut consumption lead to weight gain? *Br J Nutr*. 2005; 94(5):859-64. doi: 10.1079/bjn20051567.
222. Baer DJ, Gebauer SK, Novotny JA. Walnuts Consumed by Healthy Adults Provide Less Available Energy than Predicted by the Atwater Factors. *J Nutr*. 2016; 146(1):9-13. doi: 10.3945/jn.115.217372.
223. Rock CL, Flatt SW, Barkai HS, Pakiz B, Heath DD. Walnut consumption in a weight reduction intervention: effects on body weight, biological measures, blood pressure and satiety. *Nutr J*. 2017; 16(1):76. doi: 10.1186/s12937-017-0304-z.
224. Neale EP, Tapsell LC, Martin A, Batterham MJ, Wibisono C, Probst YC. Impact of providing walnut samples in a lifestyle intervention for weight loss: a secondary analysis of the HealthTrack trial. *Food Nutr Res*. 2017; 61(1):1344522. doi: 10.1080/16546628.2017.1344522.
225. Park SK, Oh CM, Kang JG, Seok HS, Jung JY. The association between left ventricular hypertrophy and consumption of nuts, including peanuts, pine nuts, and almonds. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2021; 31(1):76-84. doi: 10.1016/j.numecd.2020.08.009.
226. Toko H, Morita H, Katakura M, Hashimoto M, Ko T, Bujo S, et al. Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart. *Sci Rep*. 2020; 10(1):15553. doi: 10.1038/s41598-020-72686-0.
227. Patel J, Iyer A, Brown L. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys*. 2009; 46(1):66-72.
228. Zhang YB, Meng YH, Chang S, Zhang RY, Shi C. High fructose causes cardiac hypertrophy via mitochondrial signaling pathway. *Am J Transl Res*. 2016 Nov 15; 8(11):4869-4880.
229. Elin RJ, Hosseini JM. Is the magnesium content of nuts a factor for coronary heart disease? *Arch Intern Med*. 1993; 153(6):779-80.
230. Pomposiello SI, Alva M, Wilde DW, Carretero OA. Linoleic acid induces relaxation and hyperpolarization of the pig coronary artery. *Hypertension*. 1998; 31(2):615-20. doi: 10.1161/01.hyp.31.2.615.
231. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(2):439-46. doi: 10.1210/jc.2005-1303.
232. Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rousinou G, Toutouza M, et al. Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta*. 2010; 411(7-8):584-91. doi: 10.1016/j.cca.2010.01.023.
233. Bošković M, Živković M, Koricanac G, Tepavcevic S, Zec M, Debeljak-Martacic J, et al. Walnut supplementation after fructose-rich diet is associated with a beneficial fatty acid ratio and increased ACE2 expression in the rat heart. *Front Physiol*. 2022; 13:942459. doi: 10.3389/fphys.2022.942459.
234. Zec MM, Krga I, Takić M, Debeljak-Martačić J, Korićanac G, Ranković S, et al. Walnut Consumption Induces Tissue-Specific Omega-6/Omega-3 Decrease in

- High-Fructose-Fed Wistar Rats. *ACS Omega*. 2020; 5(43):28136-28145. doi: 10.1021/acsomega.0c03784.
235. Romić S, Tepavčević S, Popović T, Zec M, Stojiljković M, Čulafić T, et al. Consumption of walnuts suppresses the conversion of palmitic to palmitoleic acid and enhances omega-3 fatty acid metabolism in the heart of fructose-fed rats. *Int J Food Sci Nutr*. 2022; 73(7):940-953. doi: 10.1080/09637486.2022.2107186.
236. Mayneris-Perxachs J, Guerendiain M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI, Fitó M, et al.; for PREDIMED Study Investigators. Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. *Clin Nutr*. 2014; 33(1):90-97. doi: 10.1016/j.clnu.2013.03.001.
237. Liu TF, Brown CM, El Gazzar M, McPhail L, Millet P, Rao A, et al. Fueling the flame: bioenergy couples metabolism and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012; 92(3):499-507. doi: 10.1189/jlb.0212078.
238. Vachharajani VT, Liu T, Wang X, Hoth JJ, Yoza BK, McCall CE. Sirtuins Link Inflammation and Metabolism. *J Immunol Res*. 2016; 2016:8167273. doi: 10.1155/2016/8167273.
239. Zheng W, Feng Z, You S, Zhang H, Tao Z, Wang Q, et al. Fisetin inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017; 45:135-147. doi: 10.1016/j.intimp.2017.02.009.
240. Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2006; 72(3):447-55. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.012.
241. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, Pham M, Rizzo NO, Tateya S, et al. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(9):1370-5. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188813.
242. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML. Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 2007; 30(5):451-7. doi: 10.1291/hypres.30.451.
243. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000; 49(11):1939-45. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1939.
244. Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2003; 4(2):51-61. doi: 10.3317/jraas.2003.014.
245. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res*. 2012; 110(9):1217-25. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.
246. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, et al. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36(2):295-307. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307012.

247. Nabeebaccus AA, Zoccarato A, Hafstad AD, Santos CX, Aasum E, Brewer AC, et al. Nox4 reprograms cardiac substrate metabolism via protein O-GlcNAcylation to enhance stress adaptation. *JCI Insight*. 2017; 2(24):e96184. doi: 10.1172/jci.insight.96184.
248. Akar F, Uludağ O, Aydın A, AYTEKİN YA, Elbeg S, Tuzcu M, et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(6):2135-41. doi: 10.1016/j.fct.2012.03.061.
249. Pektaş MB, Sadi G, Akar F. Long-Term Dietary Fructose Causes Gender-Different Metabolic and Vascular Dysfunction in Rats: Modulatory Effects of Resveratrol. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 37(4):1407-20. doi: 10.1159/000430405.
250. Poulsen MM, Jørgensen JO, Jessen N, Richelsen B, Pedersen SB. Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1290:74-82. doi: 10.1111/nyas.12141.
251. Vachharajani V, Russell JM, Scott KL, Conrad S, Stokes KY, Tallam L, et al. Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. *Microcirculation*. 2005; 12(2):183-94. doi: 10.1080/10739680590904982.
252. Yang Z, Wang X, He Y, Qi L, Yu L, Xue B, et al. The full capacity of AICAR to reduce obesity-induced inflammation and insulin resistance requires myeloid SIRT1. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49935. doi: 10.1371/journal.pone.0049935.
253. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298(3):E419-28. doi: 10.1152/ajpendo.00417.2009.
254. Bolasco G, Calogero R, Carrara M, Banchaabouchi MA, Bilbao D, Mazzocchi G, et al. Cardioprotective mIGF-1/SIRT1 signaling induces hypertension, leukocytosis and fear response in mice. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4(6):402-16. doi: 10.18632/aging.100464.
255. Cheng PW, Ho WY, Su YT, Lu PJ, Chen BZ, Cheng WH, et al. Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(11):2739-50. doi: 10.1111/bph.12648.
256. Cavarape A, Feletto F, Mercuri F, Quagliari L, Daman G, Ceriello A. High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J Endocrinol Invest*. 2001; 24(11):838-45. doi: 10.1007/BF03343940.
257. Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390(2):285-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.109.
258. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2002; 277(6):3829-35. doi: 10.1074/jbc.M107895200.
259. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(9):5107-12. doi: 10.1073/pnas.0730817100.
260. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate

- metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(16):9116-21. doi: 10.1073/pnas.161284298.
261. Logan SM, Storey KB. Tissue-specific response of carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) to mammalian hibernation in 13-lined ground squirrels. *Cryobiology*. 2016; 73(2):103-11. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.09.002.
262. Dentin R, Benhamed F, Pégrier JP, Fougère F, Viollet B, Vaulont S, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*. 2005; 115(10):2843-54. doi: 10.1172/JCI25256.
263. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, et al. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest*. 2006; 116(8):2218-25. doi: 10.1172/JCI16980.
264. Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, et al. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*. 2008; 51(5):1312-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.108944.
265. Murça TM, Moraes PL, Capuruço CA, Santos SH, Melo MB, Santos RA, et al. Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regul Pept*. 2012; 177(1-3):107-15. doi: 10.1016/j.regpep.2012.05.093.
266. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002; 417(6891):822-8. doi: 10.1038/nature00786.
267. Kassiri Z, Zhong J, Guo D, Basu R, Wang X, Liu PP, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates maladaptive left ventricular remodeling in response to myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2009; 2(5):446-55. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.840124.
268. Mak KY, Chin R, Cunningham SC, Habib MR, Torresi J, Sharland AF, et al. ACE2 Therapy Using Adeno-associated Viral Vector Inhibits Liver Fibrosis in Mice. *Mol Ther*. 2015; 23(9):1434-43. doi: 10.1038/mt.2015.92.
269. Ulu A, Harris TR, Morisseau C, Miyabe C, Inoue H, Schuster G, et al. Anti-inflammatory effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors in angiotensin-II-dependent hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013; 62(3):285-97. doi: 10.1097/FJC.0b013e318298e460.
270. Gupte, M. Role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in obesity - associated hypertension. Lexington, Kentucky: University of Kentucky Doctoral Dissertations. 2011; Available from: https://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/37 (Accessed October 28, 2020).
271. Tseng YW, Wang PH, Lee HS, Liu BH, Mersmann HJ, Lin EC, et al. Regulation of the expression of angiotensin-converting enzyme 2 by polyunsaturated fatty acids in porcine adipocytes. *J Anim Sci*. 2010; 88(11):3563-7. doi: 10.2527/jas.2010-2905.
272. Takahashi S, Yoshiya T, Yoshizawa-Kumagaye K, Sugiyama T. Nicotianamine is a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor in soybean. *Biomed Res*. 2015; 36(3):219-24. doi: 10.2220/biomedres.36.219.
273. Liu X, Raghuvanshi R, Ceylan FD, Bolling BW. Quercetin and Its Metabolites Inhibit Recombinant Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Activity. *J Agric Food Chem*. 2020; 68(47):13982-13989. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05064.

274. Goc A, Niedzwiecki A, Rath M. Polyunsaturated ω -3 fatty acids inhibit ACE2-controlled SARS-CoV-2 binding and cellular entry. *Sci Rep.* 2021; 11(1):5207. doi: 10.1038/s41598-021-84850-1.
275. Casula M, Olmastroni E, Gazzotti M, Galimberti F, Zambon A, Catapano AL. Omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation and cardiovascular outcomes: do formulation, dosage, and baseline cardiovascular risk matter? An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res.* 2020; 160:105060. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105060.
276. Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(2):208-19. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.010.
277. Savoia C, Arrabito E, Parente R, Nicoletti C, Madaro L, Battistoni A, et al. Mas Receptor Activation Contributes to the Improvement of Nitric Oxide Bioavailability and Vascular Remodeling During Chronic AT1R (Angiotensin Type-1 Receptor) Blockade in Experimental Hypertension. *Hypertension.* 2020; 76(6):1753-1761. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15527.
278. Clarke NE, Belyaev ND, Lambert DW, Turner AJ. Epigenetic regulation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) by SIRT1 under conditions of cell energy stress. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(7):507-16. doi: 10.1042/CS20130291.
279. Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Okamura A, Nagai M, Moriguchi K, et al. The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens.* 2002; 15(1 Pt 1):66-71. doi: 10.1016/s0895-7061(01)02232-4.
280. Gencoglu H, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Juturu V, Sahin K. Effects of walnut oil on metabolic profile and transcription factors in rats fed high-carbohydrate-/fat diets. *J Food Biochem.* 2020; 44(7):e13235. doi: 10.1111/jfbc.13235.
281. Della Corte KW, Perrar I, Penczynski KJ, Schwingshackl L, Herder C, Buyken AE. Effect of Dietary Sugar Intake on Biomarkers of Subclinical Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients.* 2018; 10(5):606. doi: 10.3390/nu10050606.
282. Bundalo M, Zivkovic M, Culafic T, Stojiljkovic M, Koricanac G, Stankovic A. Oestradiol Treatment Counteracts the Effect of Fructose-Rich Diet on Matrix Metalloproteinase 9 Expression and NF κ B Activation. *Folia Biol (Praha).* 2015; 61(6):233-40.
283. Veličković N, Teofilović A, Ilić D, Djordjevic A, Vojnović Milutinović D, Petrović S, et al. Modulation of hepatic inflammation and energy-sensing pathways in the rat liver by high-fructose diet and chronic stress. *Eur J Nutr.* 2019; 58(5):1829-1845. doi: 10.1007/s00394-018-1730-1.
284. Zhang T, Dai Y, Zhang L, Tian Y, Li Z, Wang J. Effects of Edible Oils with Different n-6/n-3 PUFA Ratios on Articular Cartilage Degeneration via Regulating the NF- κ B Signaling Pathway. *J Agric Food Chem.* 2020; 68(45):12641-12650. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05240.
285. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-

stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid.
J Nutr Biochem. 2007; 18(4):250-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.04.003.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja M. Bubić (rođ. Bošković) rođena je 18.05.1985. godine u Požegi. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Arilju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Genetički inženjering i biotehnologija. Diplomirala je 06.10.2011. godine sa prosečnom ocenom 9,06 i ocenom 10 na diplomskom radu na temu „Komparacija efikasnosti determinacije pola kod ptica iz dva tipa uzorka (pera i brisa usne duplje) analizom polno-vezanog CHD gena“, na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Jevrosime Stevanović. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Imunobiologija, upisala je školske 2013/2014. godine.

U Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, zaposlena je od 01.09.2014. godine, kao saradnik na projektu dr Dragana Alavantića, naučnog savetnika. Od 2020. godine angažovana je na temi „Genetska osnova hronične inflamacije“ (br. 0802102), u okviru programa istraživanja INN „Vinča“, čiji je rukovodilac dr Aleksandra Stanković.

Maja M. Bubić je publikovala osam radova u časopisima međunarodnog značaja, od čega tri rada iz teme disertacije, dva kao prvi autor i jedan kao koautor. Takođe je publikovala 2 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampana u celini i 4 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Маја Бубић, рођ. Бошковић

Број индекса Б3027/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом

- 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 докторанда

У Београду, 14.11.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Маја Бубић, рођ. Бошковић _____

Број индекса _____ Б3027/2013 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада „Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом“

Ментори: др Маја Живковић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ - Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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 докторанда

У Београду, 14.11.2022.

Изјава о коришћењу

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

„Антиоксидативни и антиинфламаторни ефекти суплементације орасима (*Juglans regia* L.) на срце пацова са метаболичким синдромом изазваним исхраном богатом фруктозом“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 14.11.2022.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.