

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Anastasija M. Pajčin

**Uticaj estradiola na regulaciju enzima
antioksidativne zaštite i inducibilne
azot-monoksid-sintaze u jetri
normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Anastasija M. Pajčin

**The effects of estradiol on the regulation of
antioxidant defense enzymes and inducible
nitric oxide synthase in the liver of
normally fed and obese male rats**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023.

MENTORI:

dr Emina Sudar Milovanović, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Iva Lakić, docent,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Esma R. Isenović, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Tanja Jevđović, docent,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Sonja Zafirović, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

Datum i mesto javne odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerziteta u Beogradu, u okviru istraživačke teme 0802301, pod rukovodstvom dr Esme R. Isenović, naučnog savetnika.

Neposrednom mentoru, dr Emini Sudar Milovanović, najdublje se zahvaljujem na pruženom znanju, ukazanom strpljenju i poverenju, na stručnoj pomoći, podršci, na prijateljstvu i sveukupnom zalaganju tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mentoru, dr Ivi Lakić, na stručnoj pomoći, konstruktivnim sugestijama, i na vremenu, trudu i energiji koju je uložila pri pregledu i oceni ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se cenjenoj prof. dr Esmi R. Isenović, članu komisije, na pruženoj šansi da postanem deo njenog naučno-istraživačkog tima, na ukazanom poverenju, na pruženoj stručnoj pomoći, strpljenju i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije. Neizmerno joj se zahvaljujem na izdvojenom vremenu i trudu pri pregledu i oceni ove teze.

Zahvaljujem se članu komisije, dr Tanji Jevđović, na vremenu i trudu koje je uložila pri pregledu i oceni ove disertacije, kao i na korisnim sugestijama, čime je bitno doprinela konačnom uobličenju ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem dragoj koliginici i članu komisije, dr Sonji Zafirović, na podršci, prijateljstvu, pozitivnoj energiji, dragocenim savetima, i vremenu i trudu koje je uložila pri pregledu i oceni ove disertacije.

Najiskrenije se zahvaljujem kolegi dr Milanu Obradoviću koji je dao ogroman doprinos u mom stručnom osposobljavanju, kao i na podršci, prijateljstvu i pomoći koju mi je ukazao od samog početka mog naučnog rada.

Hvala mojoj najboljoj prijateljici i najdražoj koleginici, dr Julijani Stojanović, na bezrezervnoj pomoći u izvođenju eksperimenata, na tome što mi je početke rada u laboratoriji učinila vedrim, zabavnim i nezaboravnim, na prijateljstvu koje je odatle poteklo, i na svojoj podršci i ljubavi koju mi pruža.

Hvala i dragoj koleginici MSc Katarini Banjac na pozitivnoj energiji, podeljenom smehu i suzama, podršci i drugarstvu koje mi je pružila tokom pisanja ove teze.

Iskreno se zahvaljujem kolegama iz tima i saradnicima na temi: dr Vladanu Bajiću, dr Božidarki Zarić, dr Sanji Soskić, dr Jeleni Radovanović i dr Nikoli Lukiću na lepoj radnoj atmosferi i nesebično pruženim stručnim savetima.

Zahvaljujem se svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ koji su doprineli izradi ove doktorske disertaciji, naročito dr Nini Petrović koja mi je pomogla pri analizi miR-221.

Najtoplije se zahvaljujem mojim bliskim prijateljima na ljubavi i podršci.

Neizmernu zahvalnost dugujem roditeljima, bez čije безусловne ljubavi i podrške nikad ne bih postigla ovo što jesam, i sestri Evgeniji na ljubavi, konstantnoj podršci i pomoći u svim periodima života.

Od srca se zahvaljujem suprugu Torodu na bezgraničnoj ljubavi i podršci, na beskrajnom poverenju koje mi pruža i što nikada ne odustaje.

Sa najvećom ljubavlju, ovu tezu posvećujem svojim sinovima, Bogdanu i Ognjenu, koji su moja najveća motivacija i inspiracija.

Anastasija M. Pajčin

SPISAK SKRAĆENICA

A.J.	arbitrarna jedinica
Akt	protein-kinaza B (<i>engl. protein kinase B, PKB</i>)
Akt1/PKBα, Akt2/PKBβ, Akt3/PKBγ	izoforme Akt
ALP	alkalna fosfataza (<i>engl. alkaline phosphatase</i>)
AMP	adenozin monofosfat (<i>engl. adenosine monophosphate</i>)
AMPK	AMP-aktivirana protein-kinaza (<i>engl. AMP-activated protein kinase</i>)
AOS	antioksidativni
AP-1	protein aktivator-1 (<i>engl. activator protein-1</i>)
APS	amonijum-persulfat
ARE	elementi odgovora na antioksidante (<i>engl. antioxidant response element</i>)
ArKO	inaktiviran gen za aromatazu (<i>engl. aromatase knock-out</i>)
ATP	adenozin-trifosfat (<i>engl. adenosine triphosphate</i>)
BCIP/NBT	reagens (<i>engl. 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride</i>)
BH4	tetrabiohidropterin
BSA	albumin govedeg seruma (<i>engl. bovine serum albumin</i>)
Ca²⁺	jon kalcijuma
cAMP	ciklični AMP (<i>engl. cyclic AMP</i>)
CAT	katalaza
cDNK	komplementarna DNK
cGMP	ciklični guanozin-monofosfat (<i>engl. cyclic guanosine monophosphate</i>)
CO₃^{·-}	karbonat anjon radikal
CuSO₄ x 5H₂O	bakar-sulfat-pentahidrat
Ct	ciklus praga (<i>engl. cycle threshold</i>)
Cys	cistein
DEPC	dietilpirokarbonat
dH₂O	destilovana voda
dNTP	dezoksinukleozid-trifosfat
DTT	ditiotreititol
E2	17 β -estradiol
ECL	pojačana hemiluminescencija (<i>engl. enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
eNOS/NOS3	endotelna NOS (<i>engl. endothelial NOS</i>)
ER	receptor za estrogene
ERα	ER alfa
ERβ	ER beta
ERE	elementi odgovora na estrogene (<i>engl. estrogen response elements</i>)
ERK1/2	ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1 i 2 (<i>engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>)
Fe²⁺/Fe³⁺	joni gvožđa
FAD	flavin-adenin-dinukleotid

FMN	flavin-mononukleotid
GEF	faktori izmene guaninskih nukleotida (<i>engl. guanine nucleotide exchange factors</i>)
GDP	guanozin-difosfat (<i>engl. guanosine diphosphate</i>)
GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutation
GSSG	oksidovani glutation-disulfid
GPER	ER spregnut sa proteinom G (<i>engl. G protein-coupled ER</i>)
GTP	guanozin-trifosfat (<i>engl. guanosine triphosphate</i>)
HCl	hlorovodonična kiselina
HDL-C	holesterol vezan za lipoproteine velike gustine (<i>engl. high density lipoprotein cholesterol</i>)
HF	bogato mastima (<i>engl. high-fat</i>)
HO[•]	hidroksil radikal
H₂O₂	vodonik-peroksid
HOCl	hipohlorasta kiselina
HOMA-β	indeks sekrecije β-ćelija pankreasa
HOMA-IR	indeks rezistencije na insulin
HRP	peroksidaza rena (<i>engl. horseradish peroxidase</i>)
HSP	protein toplotnog šoka (<i>engl. heat-shock protein</i>)
IGF1	insulinu sličan faktor rasta 1 (<i>engl. insulin-like growth factor 1</i>)
IκB	inhibitor kapa B (<i>engl. inhibitor kappa B</i>)
IKK	kinaza inhibitora kapa B (<i>engl. inhibitor of kappa B kinase</i>)
iNOS/NOS2	inducibilna NOS (<i>engl. inducible NOS</i>)
IR	rezistencija na insulin
iRNK	informaciona RNK
IRS-1/2	supstrat receptora za insulin 1 ili 2 (<i>engl. insulin receptor substrate-1/2</i>)
K⁺	jon kalijuma
KCl	kalijum-hlorid
LBD	ligand-vezujući domen
LDL-C	holesterol vezan za lipoproteine male gustine (<i>engl. low density lipoprotein cholesterol</i>)
LPL	lipoprotein-lipaza (<i>engl. lipoprotein lipase</i>)
MAPK	mitogen-aktivirana protein-kinaza (<i>engl. mitogen-activated protein kinase</i>)
MDA	malon-dialdehid
Mg²⁺	jon magnezijuma
miRNK	mikro RNK
MS	metabolički sindrom
mtNOS	mitohondrijska NOS (<i>engl. mitochondrial NOS</i>)
mTOR	ciljni molekul rapamicina kod sisara (<i>engl. mammalian target of rapamycin</i>)
mTORC1/2	mTOR kompleks 1 ili 2 (<i>engl. mTOR complex 1/2</i>)
NaCl	natrijum-hlorid
Na₂CO₃	natrijum-karbonat

NADPH	redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (<i>engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>)
NFκB	nuklearni faktor kapa B (<i>engl. nuclear factor kappa B</i>)
NH₂- (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O	amino-terminalni kraj amonijum molibdat tetra hidrat
NO	azot-monoksid (<i>engl. nitric oxide</i>)
NO₂	azot-dioksid
NO₂⁻	nitriti
NO₃⁻	nitрати
NaOH	natrijum hidroksid
nNOS/NOS1	neuronalna NOS (<i>engl. neuronal NOS</i>)
NOS	azot-monoksid-sintaza (<i>engl. nitric oxide synthase</i>)
Nrf2	nuklearni faktor eritroid 2-vezani faktor 2 (<i>engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
NTD	amino-terminalni domen
O₂⁻	superoksid anjon radikal
ONOO⁻	peroksinitrit
ONOOH	peroksinitritna kiselina
OS	oksidativni stres
PCC	nivo karbonilovanih proteina (<i>engl. protein carbonyl content</i>)
PDK1	fosfoinozimid-zavisna protein-kinaza 1 (<i>engl. phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>)
PH	homolog sa plekstrinom (<i>engl. pleckstrin homology</i>)
PI3K	fosfoinozimid-3-kinaza (<i>engl. phosphoinositide 3-kinase</i>)
PIP3	fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (<i>engl. phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>)
PVDF	poliviniliden-difluorid (<i>engl. polyvinylidene difluoride</i>)
Raptor	regulatorni protein asociiran sa mTOR (<i>engl. regulatory-associated protein of mTOR</i>)
RBD	Rho-vezujući domen (<i>engl. Rho-binding domain</i>)
RhoA	mali GTP-vezujući protein (<i>engl. Ras homolog gene family, member A</i>)
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (<i>engl. quantitative real time-polymerase chain reaction</i>)
ROCK	Rho-asocirane kinaze (<i>engl. Rho-associated kinase</i>)
ROCK1/ROKβ, ROCK2/ROKα	izoforme ROCK
RO[•]/ROO[•]	alkoksil/alkil peroksil radikal
ROS/RNS	reaktivne vrste kiseonika i azota (<i>engl. reactive oxygen/nitrogen species</i>)
RTK	transmembranski receptori koji poseduju aktivnost Tyr-kinaza (<i>engl. transmembrane receptor tyrosine kinase</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (SDS, <i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	metoda denaturišuće poliakrilamidne elektroforeze (<i>engl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

Ser	serin
SMK	slobodne masne kiseline
SOD	superoksid-dismutaza
SOD1 (Cu/Zn-SOD)	bakar/cink-SOD
SOD2 (Mn-SOD)	mangan-SOD
SOD3 (EC-SOD)	vanćelijska SOD (<i>engl. extracellular SOD</i>)
Sp-1	stimulišući protein-1 (<i>engl. stimulating protein-1</i>)
TBA	tiobarbiturna kiselina
TBARS	supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (<i>engl. thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBS	fiziološki rastvor puferovan Tris-om (<i>engl. tris-buffered saline</i>)
TCA	trihlorsirćetna kiselina
TEMED	tetrametiletildiamin
Tg	trigliceridi
Thr	treonin
TNFα	faktor nekroze tumora alfa (<i>engl. tumor necrosis factor alpha</i>)
Tris	trisaminometan
Trp	triptofan
Trx	tioedoksin
Tyr	tirozin
Zn²⁺	jon cinka

SAŽETAK

Steroidni hormon 17 β -estradiol (E2) ostvaruje zaštitnu ulogu u jetri, održavajući homeostazu masti i glukoze. Njegov nedostatak doprinosi razvoju steatoze jetre i progresiji poremećene funkcije jetre. U stanjima gojzanosti i prisustva rezistencije na insulin (IR), E2 ostvaruje uticaj na regulaciju enzima antioksidativne (AOS) zaštite i inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS).

Kontrolni i gojazni mužjaci *Wistar* soja pacova su tretirani jednom dozom E2 (40 μ g/kg) ili 1% etanolom 24 sata pre žrtvovanja. Spektrofotometrijskim metodama su određivane koncentracije malon-dialdehida (MDA), karbonilovanja proteina (PCC) i azot-monoksida (NO), kao i aktivnost enzima CAT u lizatu jetre. Western blot metodom su određivani nivoi proteina SOD1, SOD2, CAT, GPx, iNOS, ER α , ER β , Src, NF κ B-p50, NF κ B-p65, ROCK1, ROCK2, RhoA, pERK1/2/ERK1/2, pAkt/Akt, pAMPK α_1 /AMPK α_1 proteina. Metodom koimunoprecipitacije je određivan nivo Src u kompleksu sa ER α , dok je metodom Pull-down eseja određivana aktivnost ukupnih Rho proteina u jetri pacova. Metodom qRT-PCR određivan je nivo iRNK za iNOS i miR-221 u jetri pacova. Rezultati su analizirani korišćenjem Studentovog *t*-testa.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da E2 tretman kod normalno uhranjenih pacova značajno povećava nivoe SOD1, GPx, CAT proteina i nivo asocijacije ER α /Src, a smanjuje nivoe proteina iNOS i ER α , fosforilaciju kinaza ERK1/2 i Akt, i ekspresiju miR-221 u jetri. Kod gojaznih pacova, E2 tretman povećava nivoe SOD1, SOD2, GPx i CAT proteina, aktivnost CAT enzima, nivo NO, fosforilaciju AMPK α_1 i ekspresiju miR-221, a smanjuje ekspresiju gena za iNOS i nivo iNOS proteina, nivo p65-NF κ B, nivo ER α i nivo asocijacije ER α /Src, fosforilaciju kinaza ERK1/2 i Akt, i aktivnost ukupnih Rho proteina u jetri.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da E2 ima zaštitne efekte u jetri u fiziološkim i patofiziološkim uslovima, koji se ogledaju u povećanju nivoa i aktivnosti enzima AOS zaštite i smanjenju ekspresije iNOS. Osim toga, rezultati istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom doprinose sagledavanju molekulskih mehanizama kojima E2 učestvuje u regulaciji ekspresije i aktivnosti enzima AOS zaštite i ekspresije iNOS enzima, u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Ključne reči: estradiol, jetra, AOS, iNOS, gojaznost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

UDK broj:

ABSTRACT

The steroid hormone 17 β -estradiol (E2) has a protective role in the liver, maintaining fat and glucose homeostasis. Its deficiency contributes to the development of liver steatosis and the progression of chronic liver diseases. In obesity and insulin resistance (IR), E2 exerts effects on the regulation of antioxidant defence system (AOS) enzymes and inducible nitric oxide synthase (iNOS).

Control and obese male *Wistar* rats were treated with a bolus injection of E2 (40 μ g/kg) or with the same volume of 1% ethanol, 24 hours before euthanasia. The concentrations of malondialdehyde (MDA), protein carbonylation content (PCC) and nitric oxide (NO), as well as CAT enzyme activity in liver lysate were determined by spectrophotometric methods. Protein levels of SOD1, SOD2, CAT, GPx, iNOS, ER α , ER β , Src, NF κ B-p50, NF κ B-p65, ROCK1, ROCK2, RhoA, pERK1/2/ERK1/2, pAkt/Akt, pAMPK α ₁/AMPK α ₁ were determined by Western blot. The coimmunoprecipitation method was used to determine the ER α /Src association, while the pull-down assay method was used to determine the activity of total Rho proteins in the rat liver. The level of iNOS mRNA and miR-221 level in the rat liver were determined by qRT-PCR. Results were analyzed using Student's t-test.

The results presented in this doctoral dissertation show that E2 treatment in normally fed rats significantly increases SOD1, GPx, CAT protein levels and ER α /Src association level, while decreasing iNOS and ER α protein levels, ERK1/2 and Akt kinase phosphorylation, and miR-221 expression in liver. In obese rats, E2 treatment increases SOD1, SOD2, GPx and CAT protein levels, CAT activity, NO level, AMPK α ₁ phosphorylation and miR-221 expression, and decreases iNOS gene and protein expression, p65-NF κ B level, ER α level and ER α /Src association level, phosphorylation of the ERK1/2 and Akt, and the activity of total Rho proteins in liver.

Based on the obtained results, it can be concluded that E2 has protective effects in the liver in physiological and pathophysiological conditions, which are mediated by an increase in the level of AOS enzymes and a decrease in iNOS expression. In addition, the results of this doctoral dissertation contribute to the understanding of the molecular mechanisms by which E2 is involved in the regulation of the expression and activity of the AOS enzymes and iNOS expression, in the liver of normally fed and obese rats.

Key Words: estradiol, liver, AOS, iNOS, obesity

Scientific Group: Biology

Specific Area within a Group: Molecular Endocrinology

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Estradiol - opšte osobine i molekularni mehanizmi delovanja estradiola	1
1.1.1 Opšte osobine i uloga estradiola	1
1.1.2 Receptori za estrogene	2
1.1.3 Molekularni mehanizmi delovanja estradiola	2
1.1.3.1 <i>Uloga signalnih molekula ERK1/2, Src, Akt, AMPK, RhoA, ROCK i NFκB u molekularnim mehanizmima delovanja estradiola</i>	4
1.2 Efekti estradiola u jetri	6
1.2.1 Efekti estradiola u jetri u fiziološkom stanju	6
1.2.2 Efekti estradiola u patofiziološkom stanju gojaznosti i rezistencije na insulin	7
1.2.2.1 <i>Gojaznost i rezistencija na insulin</i>	7
1.3 Oksidativni stres i enzimi antioksidativnog sistema zaštite	9
1.3.1 Enzimi antioksidativnog sistema zaštite	11
1.3.1.1 <i>Superoksid-dismutaze</i>	11
1.3.1.2 <i>Katalaza</i>	11
1.3.1.3 <i>Glutation-peroksidaza</i>	11
1.3.1.4 <i>Glutation-reduktaza</i>	12
1.3.2 Antioksidativni sistem zaštite u gojaznosti i rezistenciji na insulin	12
1.3.3 Uloga antioksidativnog sistema zaštite u jetri	12
1.3.4 Regulacija antioksidativnog sistema zaštite pod delovanjem estradiola	14
1.4 Inducibilna azot-monoksid-sintaza i azot-monoksid	15
1.4.1 Inducibilna azot-monoksid-sintaza u gojaznosti i rezistenciji na insulin	17
1.4.2 Uloga iNOS u jetri	18
1.4.2.1 <i>Regulacija iNOS pod delovanjem estradiola</i>	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Eksperimentalni protokol	20
3.2. Izolacija ukupnih proteina iz jetre pacova	21
3.3. Određivanje koncentracije proteina u lizatu jetre pacova	22
3.4. Metoda denaturišuće poliakrilamidne elektroforeze (SDS-PAGE)	22
3.5. Imunohemijska metoda – Western blot	22
3.6. Koimunoprecipitacija	25
3.7. Određivanje aktivnosti ukupnih Rho proteina u lizatu jetre pacova	25
3.8. Određivanje aktivnosti enzima CAT u lizatu jetre pacova	26
3.9. Određivanje nivoa malon-dialdehida (MDA) u lizatu jetre pacova	26

3.10	Određivanje nivoa karbonilovanih proteina (PCC) u lizatu jetre pacova	27
3.11	Određivanje koncentracije azot-monoksida u lizatu jetre pacova	27
3.12	Određivanje relativne ekspresije gena	27
3.12.1	<i>Izolacija ukupne RNK iz jetre pacova</i>	27
3.12.2	<i>Reverzna transkripcija</i>	28
3.13	Statistička obrada dobijenih rezultata	29
4.	REZULTATI	30
4.1	Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova	30
4.1.1	Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativne zaštite i parametre oksidativnog stresa u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova	30
4.1.1.1	<i>Efekat estradiola na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	31
4.1.1.2	<i>Efekat estradiola na nivo GPx proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	32
4.1.1.3	<i>Promene nivoa proteina i aktivnosti enzima CAT pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	33
4.1.1.4	<i>Efekat estradiola na nivo MDA i PCC u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	34
4.1.2	Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova tretiranih estradiolom	35
4.1.2.1	<i>Efekat estradiola na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	35
4.1.2.2	<i>Efekat estradiola na koncentraciju NO_2^-/NO_3^- u lizatu jetre normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	36
4.1.3	Efekat estradiola na signalne molekule uključene u regulaciju enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova	36
4.1.3.1	<i>Efekat estradiola na nivo subjedinica p50 i p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	37
4.1.3.2	<i>Efekat estradiola na nivo ERα i ERβ proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	38
4.1.3.3	<i>Efekat estradiola na nivo proteina Src i asocijaciju ERα sa Src kinazom u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	39
4.1.3.4	<i>Efekat estradiola na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	40
4.1.3.5	<i>Efekat estradiola na nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	41
4.1.3.6	<i>Efekat estradiola nivo fosforilacije Akt u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	42
4.1.3.7	<i>Promene u nivou RhoA proteina i aktivnosti ukupnih Rho proteina pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	43

4.1.3.8	<i>Efekat estradiola na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	44
4.1.3.9	<i>Promene u ekspresiji miR-221 pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova</i>	45
4.2	Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova	46
4.2.1	Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativne zaštite i parametre oksidativnog stresa u jetri gojaznih mužjaka pacova	46
4.2.1.1	<i>Efekat estradiola na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	46
4.2.1.2	<i>Efekat estradiola na nivo GPx proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	47
4.2.1.3	<i>Promene nivoa proteina i aktivnosti enzima CAT pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	47
4.2.1.4	<i>Efekat estradiola na nivo MDA i PCC u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	48
4.2.2	Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova tretiranih estradiolom	50
4.2.2.1	<i>Efekat estradiola na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	50
4.2.2.2	<i>Efekat estradiola na koncentraciju NO₂⁻/NO₃⁻ u lizatu jetre gojaznih mužjaka pacova</i>	51
4.2.3	Efekat estradiola na signalne molekule uključene u regulaciju enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova	51
4.2.3.1	<i>Efekat estradiola na nivo subjedinic p50 i p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	52
4.2.3.2	<i>Efekat estradiola na nivo ERα i ERβ proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	53
4.2.3.3	<i>Efekat estradiola na nivo proteina Src i asocijaciju ERα sa Src kinazom u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	54
4.2.3.4	<i>Efekat estradiola na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	55
4.2.3.5	<i>Efekat estradiola na nivo fosforilacije α₁ subjedinic AMPK u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	56
4.2.3.6	<i>Efekat estradiola nivo fosforilacije Akt u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	57
4.2.3.7	<i>Promene u nivou RhoA proteina i aktivnosti ukupnih Rho proteina pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	58
4.2.3.8	<i>Efekat estradiola na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	59
4.2.3.9	<i>Promene u ekspresiji miR-221 pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova</i>	60
5.	DISKUSIJA	61
6.	ZAKLJUČCI	73
7.	LITERATURA	74

1. UVOD

Hormon 17β -estradiol (E2) je važan regulator mnogih fizioloških procesa. On utiče na reprodukciju i razvoj organizma, a učestvuje i u regulaciji metaboličkih procesa u različitim organima, uključujući jetru [1]. Podaci iz literature ukazuju da E2 ostvaruje zaštitnu ulogu u jetri održavajući homeostazu masti i glukoze, dok njegov nedostatak doprinosi razvoju steatoze i progresiji hroničnih bolesti jetre [1, 2]. Poremećaji metaboličkih procesa koji su regulisani estrogenima povezani su sa nastankom i povećanjem stepena visceralne gojaznosti, rezistencijom na insulin (IR) i metaboličkim sindromom (MS) [2]. Gojaznost i izmenjen metabolizam lipida i glukoze u jetri su među glavnim faktorima rizika za razvoj bolesti jetre [3].

Jetra je najveći visceralni organ odgovoran za održavanje sistemske homeostaze glukoze, proteina i masti. U stanju gojaznosti, u jetri dolazi do prekomernog nakupljanja lipida [4]. Povećano oslobađanje lipida iz visceralnog masnog tkiva i smanjenje antilipolitičke aktivnosti insulina dovode do porasta koncentracije slobodnih masnih kiselina (SMK) u plazmi i samim tim, u portnoj cirkulaciji [5]. U zdravom organizmu, u postprandijalnoj fazi, jetra se prilagođava pojačanom prilivu SMK njihovom esterifikacijom [6]. Međutim, u stanju gojaznosti dotok velikih količina SMK u jetru nije moguće kompezovati sintezom triglicerida (Tg) [7], što direktno doprinosi razvoju IR i steatoze jetre [8-10].

U stanju gojaznosti, usled nakupljanja lipida u hepatocitama i aktivacije urođenog imunskog odgovora, povećava se produkcija reaktivnih vrsta kiseonika i azota (ROS/RNS, *engl. reactive oxygen/nitrogen species*), nastaje oksidativni stres (OS) i metaflamacija [11]. Pokazano je da E2 ostvaruje antioksidativne i antiinflamacijske efekte u jetri, kao i da utiče na regulaciju enzima antioksidativne (AOS) zaštite [12] i inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS/NOS2, *engl. inducible nitric oxide synthase*) [13]. Enzimi AOS zaštite i iNOS, pored zaštitne uloge u procesima inflamacije, imaju važnu ulogu i u različitim metaboličkim poremećajima, ali podaci o molekulskim mehanizmima koji su u osnovi *in vivo* delovanja E2 na regulaciju enzima AOS i iNOS u jetri, u fiziološkim i patofiziološkim stanjima kao što su gojaznost povezana sa IR su vrlo retki i nedovoljno izučavani.

1.1 Estradiol - opšte osobine i molekularni mehanizmi delovanja estradiola

1.1.1 Opšte osobine i uloga estradiola

17β -estradiol je dominantna i biološki najpotentnija forma estrogena. Estrogeni su primarno ženski polni hormoni koji regulišu reprodukciju i reproduktivno ponašanje jedinki ženskog pola, ali ostvaruju i važnu ulogu u regulaciji reproduktivnih funkcija kod mužjaka. Tri najvažnija estrogena koja se sintetišu u organizmu su estron, E2 i estriol. Kod žena u premenopauzi, E2 se prvenstveno sintetiše od holesterola u jajnicima, u koncentracijama koje su i do pet puta više nego kod muškaraca. Nakon menopauze, enzim aromataza konvertuje testosteron u E2 u perifernim tkivima, kao što su masno tkivo, kosti, vaskularni endotel i glatki mišići [14]. Najveći deo estrogena u cirkulaciji žena nakon menopauze se proizvodi u masnom tkivu [15]. Kod ovih žena, koncentracija E2 u cirkulaciji je približno jednaka koncentraciji E2 kod muškaraca, i prvenstveno ostvaruje autokrino i parakrino dejstvo u okviru ćelija i tkiva koja ga proizvode [14, 16].

Kod mužjaka, E2 doprinosi ranom reproduktivnom razvoju, kao i reproduktivnom ponašanju u adultnom dobu. Složeno međusobno delovanje testosterona, E2, aromataze i odgovarajućih receptora za hormone u mozgu, testisima i penisu obezbeđuje precizno regulisanu interakciju hormona, neophodnu za regulaciju libida, erektilne funkcije i spermatogeneze [17].

Osim efekata koje ima u regulaciji reprodukcije, E2 je uključen i u regulaciju različitih aspekata metabolizma u mnogim organima [2, 18].

1.1.2 Receptori za estrogene

17 β -estradiol i drugi estrogeni hormoni ostvaruju svoje funkcije vezujući se za specifične receptore za estrogene (ER), koji obuhvataju unutarćelijske forme ER alfa (ER α) i ER beta (ER β), membranske forme ER α i ER β , kao i membranski ER spregnut sa proteinom G (GPER, *engl. G protein-coupled ER*) [2, 19]. Izrazito hidrofobna priroda estrogena im omogućava da nezavisno od interakcije sa ER, prolaze kroz ćelijske membrane difuzijom u unutrašnjost ćelija, kao i da se koncentrišu u samim membranama [20, 21].

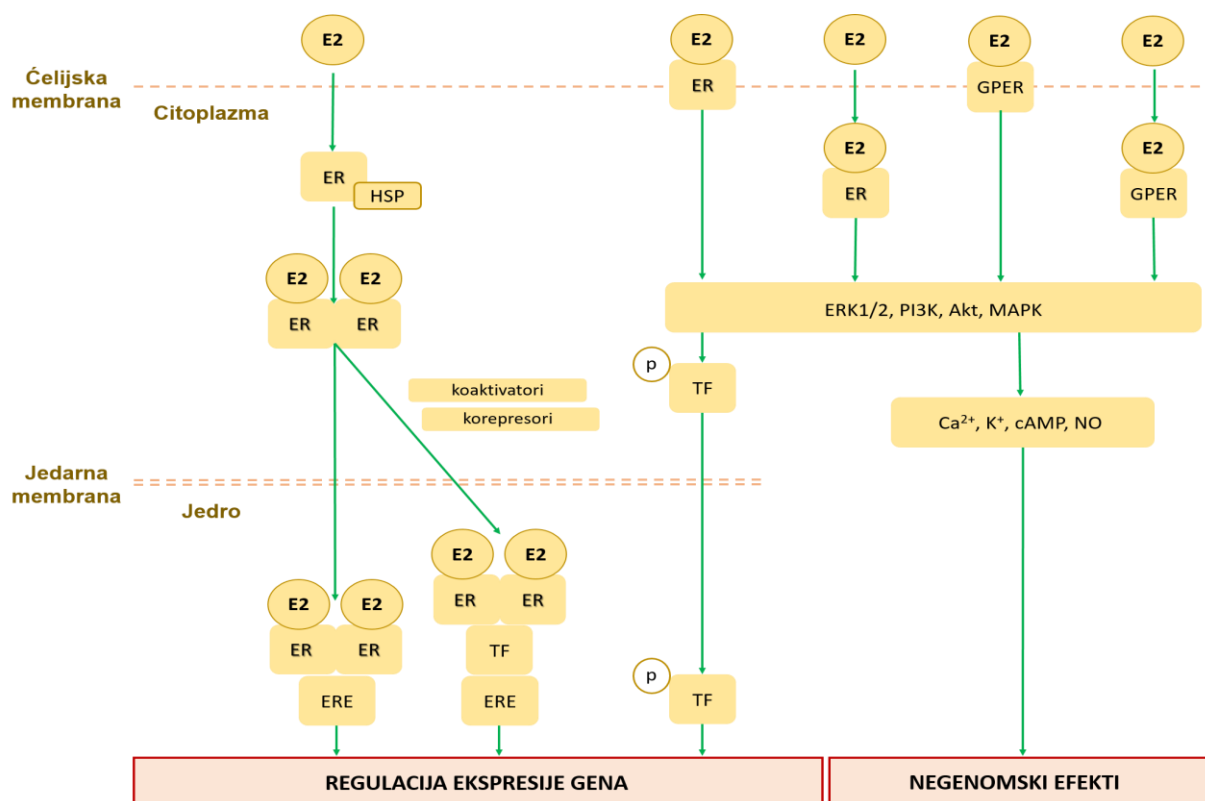
Unutarćelijske forme ER α i ER β mogu biti lokalizovane u citoplazmi i/ili u jedru. Kada su ER lokalizovani u jedru, posreduju u ostvarivanju genomskih efekata E2. ER α i ER β koji su lokalizovani u citoplazmi mogu posredovati i u genomskim i u negenomskim efektima E2. Manji broj ER α i ER β , koji su lokalizovani na plazma membrani, kao i treći tip receptora, GPER koji je takođe lokalizovan na plazma membrani, posreduju u ostvarivanju negenomskih efekata E2 [22]. Svi navedeni tipovi ER su eksprimirani i u jetri mužjaka i ženki glodara i ljudi, ali u manjem broju u odnosu na reproduktivna tkiva [14, 23].

Zastupljenost svih formi ER je tkivno specifična. ER α je dominantna forma ER prisutna u bubrezima, srcu, kostima, materici, masnom tkivu i jetri, dok se ER β dominantno nalazi u jajnicima, prostati, plućima, bešici, ćelijama hematopoeze, gastrointestinalnom traktu i centralnom nervnom sistemu [24, 25]. Aktivnost svih tipova ER je regulisana na specifičan način u odnosu na ćelije i tkiva u kojima se nalazi. Uloga ER u regulaciji ekspresije gena, zavisi od kombinacije transkripcionih kofaktora i odnosa različitih tipova ER u datoj ćeliji ili tkivu [26, 27].

1.1.3 Molekulski mehanizmi delovanja estradiola

Efekti koje ostvaruje E2 mogu biti posredovani kompleksnim mehanizmima genomskog i negenomskog delovanja (**Slika 1**). Odgovor organizma na delovanje E2 najčešće je rezultat složene interakcije između genomske i negenomske signalizacije ER [19].

Klasični mehanizam delovanja E2 je genomski mehanizam, koji može biti direktan i indirektan i može trajati od nekoliko sati do nekoliko dana nakon aktivacije ER. Genomski mehanizam delovanja E2 rezultuje aktivacijom ili inhibicijom transkripcije ciljnih gena. Direktne genomske efekte E2 ostvaruje vezivanjem za specifične ER u citoplazmi, nakon čega formirani kompleks E2/ER prolazi kroz konformacione promene u citoplazmi, disocira od proteina pratioca (*engl. heat-shock protein, HSP*) i formira homo- ili heterodimer sa drugim E2/ER kompleksom i takav se translocira u jedro [19, 28, 29]. Formirani E2/ER-E2/ER kompleks predstavlja transkripcioni faktor aktiviran ligandom, i vezuje se direktno za specifične sekvence na DNK, koje se zovu elementi odgovora na estrogene (ERE, *engl. estrogen response elements*) i nalaze se u promotorima ciljnih gena. Aktivacija ER je takođe povezana sa fosforilacijom specifičnih ostataka aminokiselina serina (Ser) i tirozina (Tyr) u amino-terminalnom (NTD, *engl. N-terminal domain*) i ligand-vezujućem domenu (LBD, *engl. ligand-binding domain*) ER [30-33].



Slika 1. Molekulski mehanizmi delovanja estradiola (E2). E2 ostvaruje svoje efekte preko genomskih i nengenomskih mehanizama signalizacije. Genomski mehanizam signalizacije E2 podrazumeva da se E2 vezuje za specifične receptore za estrogene (ER) u citoplazmi kada kompleks E2/ER disocira od HSP i formira dimer sa drugim E2/ER kompleksom, a tako formiran dimer se translocira u jedro. U jedru, dimer E2/ER-E2/ER se može direktno vezati (direktna genomska signalizacija) za specifične sekvence DNK – ERE, ili se mogu vezati indirektno (indirektna genomska signalizacija) preko nekog drugog transkripcionog faktora. Genomski mehanizmi mogu biti modulirani kroz interakciju sa kofaktorima (koaktivatorima ili korepresorima) koja je specifična za određeni tip ćelije. Metabolički efekti E2 ostvaruju se preko nejedarnih formi ER, preko indirektna regulacije ekspresije gena ili aktivacijom signalnih puteva. Akt – protein-kinaza B; Ca^{2+} – jon kalcijuma; cAMP – ciklični adenzin-monofosfat (engl. cyclic adenosine monophosphate); ERK1/2 – ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1 i 2; GPER – ER spregnut sa proteinom Ge; K^{+} – jon kalijuma; MAPK – mitogen-aktivirana protein-kinaza; NO – azot-monoksid; PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza, TF – transkripcioni faktor. Preuzeto i modifikovano iz Monteiro sa saradnicima [34].

Indirektni genomski efekti E2 ostvaruju se bez direktnog vezivanja E2/ER-E2/ER kompleksa za DNK. Naime, kompleks E2/ER može interagovati sa drugim transkripcionim faktorima, kao što su protein aktivator-1 (AP-1, *engl. activator protein-1*), i stimulirajući protein 1 (Sp-1, *engl. stimulating protein-1*), vezanim za svoje specifične sekvence u određenom regionu ciljnih gena. Takođe, kompleks E2/ER se može vezati za vezivna polumesta u ERE, što se stabilizuje vezivanjem AP-1 i Sp1 za nishodne sekvence u genu [19, 35, 36]. Na isti način, vezivanje ER za ERE može stabilizovati interakciju transkripcionih faktora sa nesavršenim elementima odgovora u genima (*engl. imperfect gene response elements*), kao što je interakcija transkripcionog faktora nuklearnog faktora kapa B (NFκB, *engl. nuclear factor kappa B*) sa specifičnim elementom ushodno od ERE [37].

Za razliku od efekata E2 na reproduktivnu funkciju koji su posredovani genomskim putem, metabolički efekti se ostvaruju negenomskim putem. Negenomski put uključuje aktivaciju ER koji su lokalizovani u ćelijskoj membrani ili u citoplazmi, pri čemu dolazi do aktivacije složene mreže unutarćelijskih signalnih puteva [38, 39]. Na ovaj način, E2 ostvaruje svoje dejstvo za nekoliko sekundi ili minuta, a takođe može biti indirektno uključen i u regulaciju ekspresije ciljnih gena. Mehanizmi negenomske signalizacije obuhvataju promene u nivoima jona kalcijuma (Ca^{2+}), jona kalijuma (K^+), cAMP i NO, zatim aktivaciju procesa posredovanih G proteinom i stimulaciju različitih kinaza, kao što su ekstracelularnim signalom regulisana kinaza (ERK, *engl. extracellular signal-regulated kinases*), fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K, *engl. phosphoinositide 3-kinase*) i p38 mitogen-aktivirana protein-kinaza (p38 MAPK, *engl. p38 mitogen-activated protein kinase*) [40-43].

Odgovor na delovanje E2 zavisi od tipa ER, liganda, proteina koaktivatora i korepresora [44]. Osim toga, u prisustvu obe izoforme ERα i ERβ, bilo genomski ili negenomski odgovor, dominantno je aktiviran sa ERα, dok aktivnost ERβ utiče na poništavanje efekata ERα [45].

1.1.3.1 Uloga signalnih molekula ERK1/2, Src, Akt, AMPK, RhoA, ROCK i NFκB u molekulskim mehanizmima delovanja estradiola

Negenomski efekti E2 najčešće podrazumevaju aktivaciju različitih uzajamno zavisnih i složenih unutarćelijskih signalnih puteva, koji uključuju signalne molekule kao što su: ERK1/2, Tyr-kinaza Src, Akt (protein-kinaza B, PKB), adenozin monofosfat-aktivirana protein kinaza (AMPK, *engl. AMP-activated protein kinase*), GTP (*engl. guanosine triphosphate*) vezujući protein RhoA (*engl. Ras homolog gene family, member A*), Rho-asocirane kinaze (*engl. Rho-associated kinase*, ROCK) i NFκB [46-51].

ERK1/2: Signalni molekul ERK1/2 pripada serin/treonin (Ser/Thr) kinazama iz familije MAPK, koje učestvuju u regulaciji više signalnih puteva uključenih u ćelijske procese u jetri [52] i važan je nishodni efektor transmembranskih receptora koji poseduju aktivnost Tyr-kinaza (*engl. transmembrane receptor tyrosine kinase*, RTK) i ERα. Osim što ERK1/2 može biti aktiviran preko ERα, i ERα/β mogu biti fosforilisani od strane ERK1/2 i na taj način aktivirani nezavisno od prisustva E2 [53-56]. Za potpunu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na dva mesta, na Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴, nakon čega se formira dimer, i tako aktiviran enzim može da reguliše aktivnost ciljnih molekula fosforilacijom u citoplazmi ili može da fosforiliše transkripcione faktore u jedru [57-60]. ERK1/2 predstavlja i važan molekul u signalizaciji supstrata receptora za insulin-1 (IRS-1, *engl. insulin receptor substrate-1*) [61]. Kod jedinki sa smanjenom osetljivošću na insulin [62], smanjen insulinom posredovan transport glukoze u mišiće se može povezati sa smanjenom aktivacijom ERK1/2 [63].

Src: Kinaza Src je jedan od važnijih signalnih molekula odgovoran za interakciju puteva nishodno od aktiviranih steroidnih receptora (kao što su ER) i RTK. Src je nereceptorska Tyr kinaza koja pripada devetočlanjoj porodici Src kinaza i ima ulogu u regulaciji proliferacije, apoptoze, adhezije, migracije i diferencijacije ćelija [64]. Estradiolom aktivirani ERα/β mogu da vežu Src,

koja se aktivira autofosforilacijom, a zatim fosforiliše ER α / β i na taj način može da stimuliše transkripciju zavisnu od tipa ER [65, 66]. Interakcija ER sa Src aktivira i ERK1/2 i na taj način, takođe, može da stimuliše transkripciju zavisnu od ER [67, 68]. Osim toga, Src aktiviran delovanjem E2 može da utiče na signalni put kinaze Akt [69].

Akt: Protein-kinaza B, poznata i kao Akt, jeste Ser/Thr kinaza koja je u tkivima sisara prisutna u tri izoforme, označene kao PKBa (Akt1), PKB β (Akt2) i PKB γ (Akt3). Do aktivacije Akt dolazi u odgovoru na različite stimuluse, poput hormona i faktora rasta. Estradiol dovodi do aktivacije Akt vezivanjem za ER α i aktivacijom AMPK [49]. Aktivacija Akt se odigrava nishodno od PI3K, koja se aktivira direktnom interakcijom p85 regulatorne subjedinice PI3K sa RTK, IRS i/ili ER α (ali ne i ER β) [70-74]. Posledično se aktivira katalitička p110 subjedinica PI3K koja se translocira ka ćelijskoj membrani [75] i fosforiliše inozitolne molekule povećavajući koncentraciju fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3, *engl. phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*). Domen homolog sa plekstrinom (PH, *engl. pleckstrin homology*) u amino-terminalnom kraju (NH₂-) Akt kinaze se vezuje za novoformirani PIP3 čime se Akt privremeno translocira na ćelijsku membranu gde se aktivira fosforilacijom od strane fosfoinozimid-zavisne protein kinaze 1 (PDK1, *engl. phosphoinositide-dependent protein kinase 1*). Potpuna aktivacija Akt zahteva fosforilaciju na Thr³⁰⁸ od strane PDK1, i na Ser⁴⁷³ od strane kompleksa ciljnog molekula rapamicina kod sisara 2 (mTORC2, *engl. mammalian target of rapamycin complex 2*) [76-78]. Aktivirana Akt fosforiliše mnoge ciljne molekule, među kojima je i transkripcioni faktor NF κ B, i reguliše različite procese u ćeliji, uključujući metabolizam glukoze, ćelijski rast, proliferaciju, i apoptozu [79].

AMPK: Adenozin monofosfat (AMP)-aktivirana protein kinaza je Ser/Thr kinaza predstavljena heterotrimerom sastavljenim od katalitičke α i regulatornih β i γ subjedinica. AMPK vrši inhibitornu fosforilaciju regulatornog Raptor proteina (*engl. regulatory-associated protein of mTOR*), čime sprečava aktivnost kompleksa mTORC1 i zaustavlja ćelijski ciklus u uslovima stresa usled nedostatka energije [80]. Aktivacija AMPK podrazumeva alosteričnu modifikaciju usled povećanja koncentracije AMP i fosforilaciju α subjedinice na Thr¹⁷². Ključna uloga AMPK je u održanju metaboličke homeostaze u uslovima stresa, kao što je stanje gojaznosti [81-83]. Takođe je pokazano da E2 stimuliše aktivnost AMPK u mišićnom tkivu glodara, kao i u ćelijskim kulturama adipocita, najverovatnije vezivanjem za ER α [49]. Osim toga, u odgovoru na visoke nivoe ATP u ćeliji, Akt sprečava aktivnost AMPK i na taj način aktivira mTOR [84].

ROCK: Rho-asocirane kinaze su Ser/Thr kinaze i predstavljaju nishodne efektore malih GTP vezujućih proteina iz Rho porodice (RhoA, B, C, D i E). Identifikovane su dve izoforme ROCK kod sisara, ROCK1 (ROK β) i ROCK2 (ROK α). Obe izoforme enzima su eksprimirane u svim tipovima ćelija [85]. Aktivacija RTK i receptora spregnutih sa G-proteinom vodi aktivaciji faktora izmene guaninskih nukleotida (GEF, *engl. guanine nucleotide exchange factors*) koji aktiviraju RhoA. Aktivnost RhoA proteina takođe može biti regulisana kinazama zavisnim od cAMP i cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP, *engl. cyclic guanosine monophosphate*) (protein kinaze A i Ge) koje fosforilišu RhoA protein na Ser¹⁸⁸ [86, 87], što vodi posledičnoj inhibiciji RhoA/ROCK signalnog puta [88]. ROCK imaju važnu ulogu u regulaciji apoptoze, ćelijskog rasta, metabolizma i migracije ćelija. Pokazano je da ROCK fosforiliše IRS-1, pri čemu su rezultati studija koji se odnose na efekte interakcije Rho/ROCK/IRS-1 međusobno suprotstavljeni [89-92]. Većina studija svedoči u prilog negativnih efekata aktivacije ROCK na signalizaciju insulina posredstvom Ser³⁰⁷ inhibitorne fosforilacije IRS-1 proteina [89, 90, 92]. Estrogeni učestvuju u regulaciji Rho/ROCK signalnog puta posredstvom različitih mehanizama, koji uključuju ER, AMPK i ERK [50, 93-97].

NF κ B: Značajnu ulogu u modulaciji zapaljenskog odgovora organizma E2 ostvaruju regulacijom aktivnosti NF κ B putem genomskih i negenomskih mehanizama. NF κ B predstavlja homo- ili heterodimerni kompleks sastavljen od mogućih varijanti Rel proteina: p65 (Rel A), p50/105, p52/100, Rel B i c-Rel. Najčešći NF κ B heterodimer se sastoji od p50 i p65 subjedinica. U nedostatku adekvatnog stimulusa, neaktivna forma NF κ B se nalazi u citoplazmi ćelije vezana za inhibitor kapa B (I κ B, *engl. inhibitor kappa B*). Kao odgovor na stimulaciju OS, virusima ili

citokinima, kinaza inhibitora kapa B (IKK, *engl. inhibitor of kappa B kinase*) fosforiliše I κ B, što vodi njegovoj ubikvitinaciji i degradaciji u proteazomu, a NF κ B disocira od inhibitora. Posledično formirani NF κ B dimeri prelaze u jedro, vezuju se za κ B mesta na ciljnim genima i prilagođavaju njihovu ekspresiju adekvatnom odgovoru ćelije na stimulus. Aktivacija NF κ B signalnog puta je kratkotrajna, zahvaljujući činjenici da NF κ B reguliše povećanje ekspresije sopstvenih molekula inhibitora. Međutim, produžena aktivacija NF κ B vodi u hroničnu inflamaciju [51, 98, 99]. Estrogeni utiču na signalni put NF κ B posredstvom nekoliko mehanizama. U mnogim tkivima, ER α negativno reguliše aktivnost NF κ B, smanjujući vezivanje NF κ B za DNK, regulišući nivoe NF κ B signalnih proteina i modulišući funkcije NF κ B koaktivatora [100]. Osim toga, p50 subjedinica NF κ B može da asocira sa ER α na ERE, a inhibicija NF κ B povećava ekspresiju gena regulisanih estrogenima [101]. Efekat regulacije NF κ B signalnog puta zavisi od tipa ćelije, relativne zastupljenosti određenih ER tipova i vremena koje protekne nakon izlaganja E2 [98]. Signalni put AMPK ograničava aktivaciju NF κ B, a nekoliko studija je ukazalo na usku povezanost između inflamacije i smanjene aktivnosti AMPK [102-105].

1.1.2 Efekti estradiola u jetri

1.2.1 Efekti estradiola u jetri u fiziološkom stanju

Jetra je ključni organ odgovoran za kontrolisano skladištenje energije i ima veliki kapacitet za preuzimanje lipida iz cirkulacije, *de novo* lipogenezu, oksidaciju lipida i lipolizu, kao i za *de novo* biosintezu holesterola. Studije na animalnim modelima i na ljudima su pokazale da E2 ima važnu ulogu u regulaciji lipogeneze u jetri oba pola.

Fiziološke fluktuacije u nivou E2 kod ženki imaju značajnu ulogu u ograničavanju deponovanja masti u jetri [106]. Osim toga, pokazano je da je E2 uključen u regulaciju aktivnosti enzima jetre uključenih u sintezu masnih kiselina i holesterola [106]. U jetri, E2 ograničava preuzimanje SMK iz cirkulacije, smanjujući aktivnost lipoprotein lipaze (LPL, *engl. lipoprotein lipase*), enzima odgovornog za konverziju Tg u SMK i glicerol, i stimulišući lipolizu unutarćelijskih Tg povećanjem ekspresije hormon-senzitivne lipaze i lipaze adipocita [1]. Rezultati epidemioloških studija pokazuju prisustvo značajno povišenih nivoa LDL-C i sniženih nivoa HDL-C kod žena nakon menopauze kao i kod muškaraca, u poređenju sa nivoima ovih parametara kod žena premenopauze, sugerišući da niski nivoi E2 u cirkulaciji stimulišu deponovanje masti u jetri [107]. Davanje estrogena ovarijektomisanim ženkama pacova i transgenim miševima kojima je eksperimentalnim postupkom inaktiviran gen za aromatazu (ArKO, *engl. aromatase knock-out*), enzim odgovoran za sintezu E2, dovodi do normalizacije nivoa LDL partikula kao i ukupnog holesterola [108, 109]. Takođe, kod ArKO miševa oba pola je pokazano da dolazi do razvoja gojaznosti i steatoze jetre kao posledice poremećene oksidacije masnih kiselina i povećanog nivoa sinteze masnih kiselina u jetri [110].

Osim na metabolizam masti, E2 utiče i na homeostazu glukoze u jetri poboljšavajući toleranciju na glukozu i osetljivost na insulin, što je pokazano u studijama na životinjama i na ljudima [111-113]. Estrogeni povećavaju sintezu i oslobađanje insulina [114], i utiču na klirens insulina iz jetre [115, 116]. Takođe, estrogeni smanjuju stopu glukoneogeneze i povećavaju sintezu glikogena u jetri, smanjujući time nivo glukoze u cirkulaciji [117, 118]. Kod osoba muškog pola kod kojih je utvrđeno postojanje mutacije u genu za aromatazu, pokazana je poremećena funkcija jetre, praćena pojavom steatoze jetre, izmenjenim lipidnim profilom, i razvojem hipertrigliceridemije i IR [119, 120]. Svi zapaženi poremećaji metabolizma mogu biti ublaženi terapijom estrogenima [120, 121]. Osim toga, pokazano je da kod ArKO miševa, usled nedostatka endogenog E2 dolazi do razvoja steatoze jetre i IR [111].

Protektivni efekti E2 na metaboličke procese u jetri se ostvaruju signalnom transdukcijom posredstvom ER α [122]. Nedostatak ER α kod miševa vodi smanjenju tolerancije na glukozu i razvoju IR u jetri, dok nedostatak ER β ne utiče na toleranciju na glukozu, što ukazuje na značajnu ulogu ER α u održavanju homeostaze glukoze u jetri [118]. Osim toga, ER β je manje zastupljena forma ER u ćelijama jetre u odnosu na ER α [25, 123], i njegova uloga u jetri i dalje nije detaljno poznata.

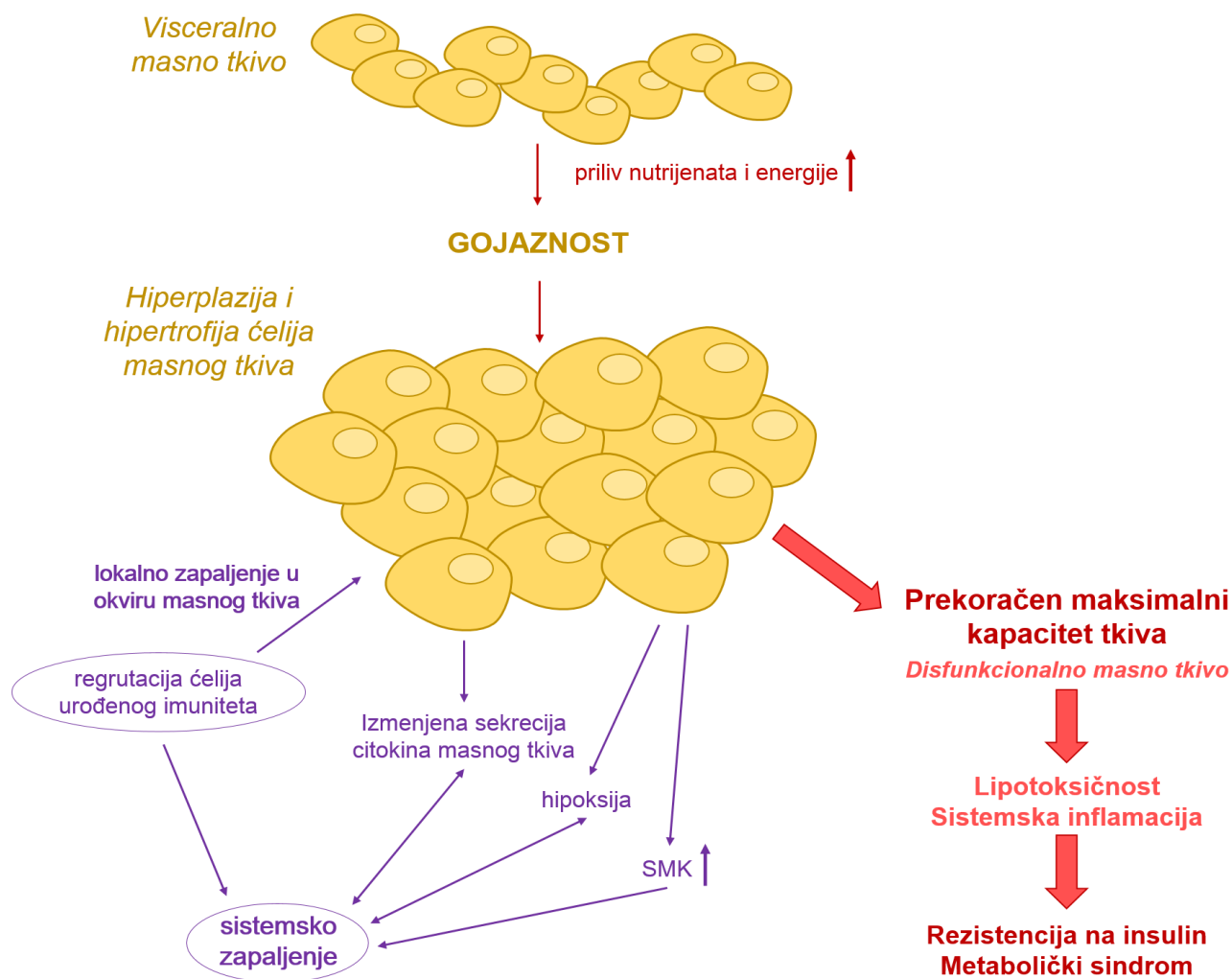
1.2.2 Efekti estradiola u patofiziološkom stanju gojaznosti i rezistencije na insulin

1.2.2.1 Gojaznost i rezistencija na insulin

Gojaznost se definiše kao prekomerno nagomilavanje masnog tkiva u organizmu koje može dovesti do brojnih zdravstvenih komplikacija i time pogoršati kvalitet života i skratiti životni vek [124]. Gojaznost nastaje kao rezultat odsustva ravnoteže između unosa visokokalorične hrane i potrošnje energije u fiziološkim procesima organizma [125]. Povećan unos nutrijenata i priliv energije dovode do uvećanja (hipertrofija) i povećanja broja (hiperplazija) ćelija masnog tkiva (**Slika 2**). Smanjena fizička aktivnost, genetički, hormonski, ekološki, kulturni i ekonomski faktori dodatno doprinose razvoju gojaznosti [126]. S obzirom na svoje razmere, gojaznost predstavlja ozbiljan zdravstveni problem imajući u vidu da povećava rizik za nastanak različitih metaboličkih poremećaja i oboljenja, uključujući IR, diabetes mellitus tipa 2, kardiovaskularne bolesti, dislipidemiju, nealkoholnu bolest masne jetre (NAFLD, *engl. non-alcoholic fatty liver disease*) i određene tipove raka [8, 10, 127, 128].

Prema anatomskoj raspodeli masnog tkiva u organizmu, razlikuju se dva tipa gojaznosti, centralna i gojaznost zastupljena u donjim delovima tela. Centralna (visceralna ili abdominalna) gojaznost karakteriše se nakupljanjem masnog tkiva unutar abdomena oko visceralnih organa i potkožno (subkutano) oko abdomena, i povezana je sa visokim faktorom rizika za pojavu MS. Gojaznost u donjim delovima tela (gluteo-femoralna ili ginoidna gojaznost) podrazumeva uglavnom subkutano nakupljanje masnog tkiva u oblasti kukova i butina [129]. Pokazano je da metaboličke i hormonske promene, koje su posledica, pre svega, visceralne gojaznosti, mogu da dovedu do pojave IR [8, 129, 130]. Rezistencija na insulin predstavlja stanje u kome insulin nije u mogućnosti da ostvari svoje biološke efekte na fiziološki zadovoljavajući način [131]. IR dovodi do progresivnog smanjenja sposobnosti perifernih ciljnih tkiva da odgovore na stimulaciju insulinom, usled nagomilavanja nutrijenata, OS i hronične inflamacije [132, 133]. U stanju IR, periferna ciljna tkiva su u nemogućnosti da reaguju na odgovarajući način čak i na fiziološke koncentracije insulina u cirkulaciji, stoga po definiciji IR predstavlja defekt u signalnoj transdukciji insulina [134].

Masno tkivo, kao jedan od najvećih endokrinih organa u telu, odgovorno je za proizvodnju i oslobađanje čitavog spektra molekula medijatora inflamacije nazvanih adipokini, u koje spadaju neki citokini, hemokini i hormoni [135]. Citokini, oslobođeni u masnom tkivu, parakrinim delovanjem pojačavaju inflamaciju u samom masnom tkivu i prelaze u cirkulaciju, prenoseći inflamacijske signale kroz organizam (**Slika 2**). To je praćeno rastom nivoa insulina u cirkulaciji [135-137]. Beta (β) ćelije pankreasa sintetišu i oslobađaju suprafiziološke koncentracije insulina, održavajući optimalan opseg glukoze u cirkulaciji. Vremenom, sposobnost pankreasa da kompenzuje napredovanje IR oslobađanjem dodatnih količina insulina opada, što postepeno vodi razvoju hiperglikemije i dijabetesa [138, 139].



Slika 2. Disfunkcionalnost masnog tkiva u gojaznosti. Prekomeran priliv nutrijenata i energije dovodi do povećanja veličine (hipertrofija) i broja (hiperplazija) ćelija masnog tkiva. U odgovoru na narušavanje fiziološke ravnoteže, ćelije urođenog imuniteta se nakupljaju u masnom tkivu izazivajući nastanak lokalne inflamacije, koja zajedno sa izmenjenim profilom sekrecije citokina masnog tkiva, hipoksijom i povećanom lipolizom dovodi do uspostavljanja sistemske inflamacije. Navedena mreža patofizioloških procesa rezultuje u razvoju rezistencije na insulin i metaboličkog sindroma, što dodatno narušava funkcionalnost masnog tkiva i doprinosi razvoju poremećaja povezanih sa gojaznošću. SMK – slobodne masne kiseline. Preuzeto i modifikovano iz Mair sa saradnicima [140].

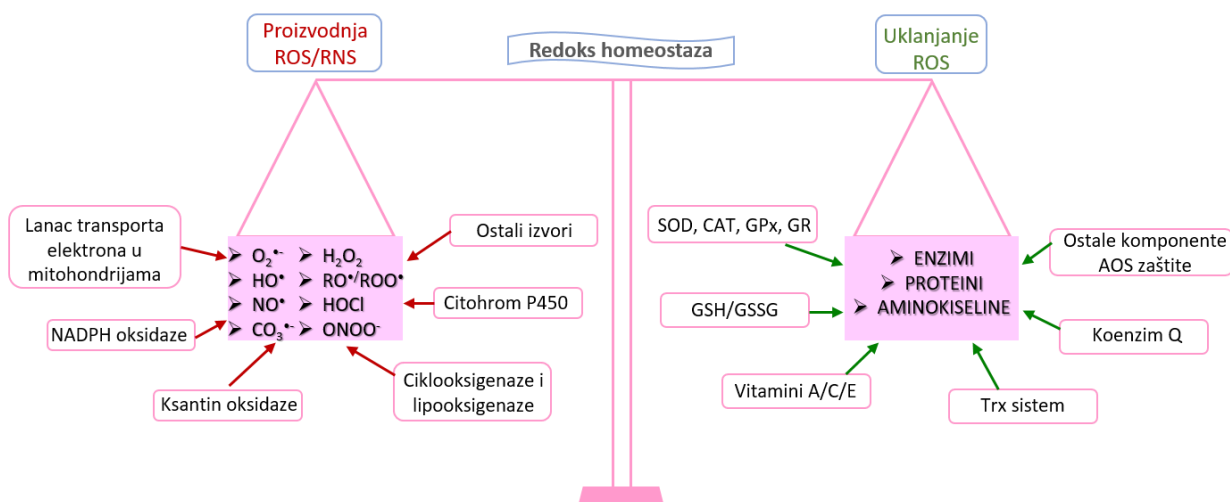
1.2.2.2 Efekti estradiola u jetri u gojaznosti

Estrogeni svojom aktivnošću pružaju zaštitu organizmu od razvoja visceralne gojaznosti i intolerancije na glukozu i doprinose održavanju osetljivosti na insulin [2]. Količina i regionalna raspodela masnog tkiva umnogome zavisi od nivoa estrogena u cirkulaciji [141]. U uslovima koji vode ka razvoju gojaznosti, estrogeni utiču na sprečavanje lipogeneze. Kada, usled uvećanja adipocita, nivo E2 u cirkulaciji poraste iznad fizioloških granica, metabolizam unutar masnog tkiva se menja tako da dolazi do smanjenja lipogeneze i deponovanja masti u cilju sprečavanja daljeg nagomilavanja masnog tkiva [142]. Osim toga, E2 povećava nivo HDL-C i Tg i smanjuje nivo holesterola vezanog za lipoproteine male gustine (LDL-C, *engl. low density lipoprotein cholesterol*) [143]. Pokazano je da je nivo E2 obrnuto proporcionalan nivou glukoze i insulina našte [143]. Ipak, kod žena u menopauzi dolazi do snižavanja nivoa E2 i porasta nivoa insulina i glukoze, što je posledica odgovora na promene u raspodeli masnog tkiva u telu [144]. Kako verovatnoća pojave MS raste sa nagomilavanjem visceralnog masnog tkiva [145, 146], stopa nastanka metaboličkih poremećaja karakteristična za gojazne pacijente je mnogo niža kod žena u premenopauzi nego kod kod muškaraca i žena nakon menopauze. Kod muškaraca, smanjeni nivo E2 usled inhibicije aromataze vodi povećanju abdominalne gojaznosti [147]. Takođe, mužjaci transgenih ArKO miševa razvijaju IR. I mužjaci i ženke ArKO miševa ispoljavaju smanjenu oksidaciju glukoze i povećane nivo HDL-C i Tg i smanjuje nivo holesterola vezanog za lipoproteine male gustine i insulina [109].

Pokazano je da primena E2 ublažava simptome MS [148, 149]. Ovarijektomija prolazno povećava kalorijski unos, što vodi povećanju količine visceralnog masnog tkiva, dok količina subkutanog masnog tkiva ostaje nepromenjena [150, 151]. Primena egzogenog E2 kod ovarijektomisanih pacova menja raspodelu masnog tkiva i čini je sličnom raspodeli kod intaktnih ženki. Dodatno, davanje E2 ovarijektomisanim glodarima smanjuje nivo glukoze u cirkulaciji i poboljšava odgovor tkiva na dejstvo insulina [151, 152]. Davanje E2 mužjacima pacova povećava količinu subkutanog masnog tkiva [150, 153]. Razvoj IR kod ArKO mužjaka miševa takođe može biti ublažen davanjem E2 [109, 154]. U epidemiološkim studijama u kojima je primećeno povećanje nivoa Tg u serumu kod žena u postmenopauzi, terapija estrogenima smanjuje aktivnost LPL [155].

1.3 Oksidativni stres i enzimi antioksidativnog sistema zaštite

Oksidativni stres u tkivu nastaje kao rezultat remećenja ravnoteže između proizvodnje ROS/RNS i sposobnosti enzima AOS zaštite da ih neutrališe (**Slika 3**) [156]. Na osnovu hemijske strukture, ROS/RNS mogu biti podeljene u dve grupe, slobodne radikale i neradikalske ROS/RNS. Među slobodnim radikalima najznačajniji su: superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidrosil (HO^{\cdot}), azot-monoksid (NO^{\cdot}), azot-dioksid (NO_2^{\cdot}), karbonat anjon ($CO_3^{\cdot-}$) i alkoksil/alkil peroksil (RO^{\cdot}/ROO^{\cdot}) radikali. Osnovna vrsta ROS koja predstavlja prekursor ostalih ROS/RNS je $O_2^{\cdot-}$. On nastaje u metaboličkim reakcijama u ćelijama, kuplovanjem molekuskog kiseonika O_2 i elektrona oslobođenih tokom prenosa elektrona u procesu ćelijskog disanja u mitohondrijama. Reakciju katalizuje enzim oksidaza redukovano nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH oksidaza, *engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*). Najznačajnije neradikalske vrste ROS/RNS su: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HOCl$), peroksinirit ($ONOO^{\cdot-}$) i peroksiniritna kiselina ($ONOOH$) [157, 158]. ROS/RNS se proizvode tokom fizioloških i metaboličkih procesa koji se odvijaju u nekoliko različitih ćelijskih organela, kao što su mitohondrije, peroksizomi i endoplazmatski retikulum. Osim toga, enzimi poput NADPH oksidaze, ksantin oksidaze, citohrom p450 2E1, cikloosigenaze i lipooksigenaze u citoplazmi i plazma membrani takođe proizvode ROS/RNS, posebno H_2O_2 [157, 159].



Slika 3. Shematski prikaz održavanja redoks homeostaze u tkivima. Redoks homeostazu čini ravnoteža između procesa u kojima nastaju reaktivne vrste kiseonika i azota (ROS/RNS) i procesa tokom kojih se odvija uklanjanje viška ROS/RNS. $O_2^{\bullet-}$ – superoksid anjon radikal; HO^{\bullet} – hidrosil radikal; NO^{\bullet} – azot-monoksid; $CO_3^{\bullet-}$ – karbonat anjon radikal; H_2O_2 – vodonik peroksid; $RO^{\bullet}/ROO^{\bullet}$ – alkoksil/alkil peroksil radikal; $HOCl$ – hipohlorasta kiselina; $ONOO^{\bullet}$ – peroksinitrit; SOD – superoksid-dismutaza; CAT – katalaza; GPx – glutation-peroksidaza, GR – glutation-reduktaza; GSH/GSSG – redukovani glutation/oksidovani glutation-disulfid; Trx – tioredoksin; AOS – antioksidativna. Preuzeto i modificovano iz Li sa saradnicima [160].

U fiziološkim uslovima, ROS/RNS mogu da obavljaju funkciju signalnih molekula posredstvom modulacije transkripcionih faktora i epigenetskih mehanizama. Na taj način regulišu metabolizam ćelija, ćelijsko preživljavanje, imunsku odbranu tkiva, proliferaciju i diferencijaciju ćelija [157]. Smanjena proizvodnja ROS/RNS dovodi do poremećaja redoks statusa ćelije i ometa redoks signalizaciju prisutnu u fiziološkim uslovima. Sa druge strane, u uslovima OS, povećana proizvodnja ROS/RNS i/ili smanjen kapacitet AOS zaštite pokreću patološku redoks signalizaciju koja vodi oksidaciji bioloških makromolekula: DNK, proteina i lipida, a zatim i oštećenju tkiva i razvoju različitih patoloških stanja i bolesti, uključujući i gojaznost [161, 162].

Fiziološki nivo ROS/RNS se održava ćelijskim mehanizmima koji uključuju neenzimske i enzimске komponente AOS zaštite. Neenzimske komponente AOS zaštite čine: vitamin A (retionidi), vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (α -tokoferol), polifenoli, α -lipoinjska kiselina, tioredoksin (Trx), glutation (GSH/GSSG), melatonin, koenzim Q (ubikvinon) i β -karoten (prekursor vitamina A). Enzimске komponente AOS zaštite čine enzimi AOS zaštite, koji obuhvataju: superoksid-dismutaze (SOD), katalazu (CAT), glutation-peroksidazu (GPx) i glutation-reduktazu [163-165]. AOS zaštite može da deluje na nekoliko nivoa: na prevenciju nastanka ROS/RNS, na uklanjanje ROS/RNS i na saniranje oštećenja nastalih delovanjem ROS/RNS.

Enzimi AOS zaštite predstavljaju prvu liniju odbrane ćelija i tkiva od OS neutrališući svaki molekul koji ima potencijal da formira ROS/RNS. Vitamini C i E, koenzim Q i glutation čine drugu liniju AOS zaštite i uklanjaju ROS/RNS donirajući svoje elektrone kako bi ih neutralisali. Sistemi enzima za obnovu DNK molekula, proteina i lipida predstavljaju treću liniju odbrane od OS. Ovi enzimi prepoznaju oštećenja i koriguju ili uklanjaju oksidovane proteine, lipide i DNK molekule kako bi sprečili njihovo nagomilavanje koje može imati toksičan efekat. Četvrta linija AOS zaštite

predstavlja mehanizam adaptacije u kome proizvodnja i aktivnost slobodnih radikala pokreću nastajanje odgovarajućih antioksidanata [166].

1.3.1 Enzimi antioksidativnog sistema zaštite

1.3.1.1 Superoksid-dismutaze

Superoksid-dismutaze su najpotentniji antioksidativni enzimi u ćeliji uključeni u prvu liniju AOS zaštite od OS koji katalizuju dismutaciju dva molekula $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i O_2 , neutrališući razarajući potencijal $O_2^{\cdot-}$. Nagomilavanje H_2O_2 u ćelijama i tkivima ima toksičan efekat jer u prisustvu divalentnih katjona poput gvožđa (Fe^{2+}) (Fentonova reakcija) ili u reakciji sa $O_2^{\cdot-}$ biva konvertovan u visoko reaktivan HO^{\cdot} radikal.

Superoksid-dismutaze su metaloenzimi, što znači da je za njihovu aktivnost neophodno prisustvo jona metala kao kofaktora [167, 168]. Kod sisara postoje tri izoforme SOD enzima koje ispoljavaju istu funkciju, ali se razlikuju na osnovu kvaternerne strukture, tipa metala kao kofaktora, gena koji ih kodiraju i lokacije gena na hromozomima, i ćelijske kompartmentalizacije [169, 170]. Bakar (Cu)/Cink (Zn)-SOD (Cu/Zn-SOD, SOD1) je kodirana SOD1 genom i dominantna je forma SOD kod eukariota. SOD1 je homodimer koji sadži jone Cu ($Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$) i Zn (Zn^{2+}), i lokalizovana je u najvećoj meri u citoplazmi, mada se može naći i u peroksizomima [171]. Mangan (Mn)-SOD (SOD2) je tetramer koji sadži jon Mn ($Mn^{3+} \rightarrow Mn^{2+}$), kodirana je SOD2 genom i nalazi se isključivo u mitohondrijalnom matriksu [172]. Vanćelijska Cu/Zn-SOD (EC-SOD, *engl. extracellular SOD*, SOD3) kodirana je genom SOD3, nalazi se u formi tetramera koji sadži $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ i Zn^{2+} i lokalizovana je isključivo u vanćelijskom prostoru [172].

1.3.1.2 Katalaza

Katalaza je enzim AOS zaštite u formi tetramernog kompleksa sastavljenog od četiri identične subjedinice, pri čemu svaka subjedinica poseduje po jedan protoporfirinski prsten [173]. Katalaza je prisutna u svim tipovima tkiva koja koriste O_2 gde katalizuje redukciju dva molekula H_2O_2 do vode i O_2 , koristeći jone Fe ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) ili Mn ($Mn^{2+} \rightarrow Mn^{3+}$) kao kofaktore [174]. U peroksizomima sisara, u reakcijama β -oksidacije masnih kiselina, stvaraju se velike količine H_2O_2 koje enzim CAT uklanja sa velikom efikasnošću. S obzirom da enzim CAT nije prisutan u mitohondrijama sisara, H_2O_2 koji nastaje u metaboličkim procesima u ovim organelama uklanja enzim AOS zaštite GPx. Izuzetak su ćelije srca pacova u čijim se mitohondrijama eksprimira CAT [175]. Aktivnost CAT odvija se u dva koraka: u prvom koraku molekul H_2O_2 oksiduje hem grupu enzima pri čemu nastaje porfirin katjon radikal, a u drugom koraku, drugi molekul H_2O_2 ima ulogu redukujućeg agensa, vraćajući enzim u početno stanje, pri čemu se iz reakcije oslobađaju voda i O_2 [174].

1.3.1.3 Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaze čine familiju filogenetski povezanih oksidoredukataza koje svoje funkcije dominantno obavljaju u mitohondrijama, ali su prisutne i u citoplazmi ćelija [176, 177]. Kod sisara postoji najmanje osam GPx enzima, kodiranih posebnim genima [178]. Većina GPx enzima predstavljena je tetramernim kompleksom, čija aktivnost zavisi od prisustva selena kao kofaktora vezanog za cistein (Cys) u aktivnom mestu, zbog čega se često označavaju kao selenocistein peroksidaze [177, 179, 180]. GPx koristi H_2O_2 u reakciji u kojoj dolazi do oksidacije monomernog glutationa (GSH) do glutation disulfida (GSSG). Enzim GPx katalizuje redukciju peroksida lipida do odgovarajućih alkohola, kao i H_2O_2 do vode i O_2 , koristeći GSH kao kosupstrat

[181, 182]. Na taj način, GPx štiti ćeliju od oksidativnih oštećenja i učestvuje u uklanjanju H₂O₂ [183].

1.3.1.4 Glutation-reduktaza

Organizmi koji koriste glutacion za održavanje redoks homeostaze imaju mogućnost *de novo* sinteze GSH, ali i sposobnost obnavljanja GSH polazeći od GSSG. Ključni enzim odgovoran za obnavljanje depoa GSH je GR. GR se predominantno nalazi u citoplazmi, odakle se transportuje u ćelijske organele, kao što su jedro, mitohondrije [184-186] i endoplazmatski retikulum [187]. GR poseduje dva značajna, visoko konzervisana domena, jedan koji poseduje mesta za vezivanje flavin adenin dinukleotida (FAD) i NADPH, i drugi domen za dimerizaciju [188-190]. U aktivnom mestu enzima se nalaze dva konzervisana ostatka aminokiseline Cys koja formiraju disulfidnu vezu. GR redukuje GSSG koristeći NADPH i time obnavlja depo redukovanog GSH [191, 192].

1.3.2 Antioksidativni sistem zaštite u gojznosti i rezistenciji na insulin

U stanju gojznosti, aktivacija urođenog imunskog odgovora u masnom tkivu je usko povezana sa povećanom proizvodnjom ROS/RNS, razvojem OS i smanjenjem efikasnosti mehanizama AOS zaštite [193]. Usled nemogućnosti za nagomilavanjem masti u adipocitima, nivo SMK u cirkulaciji se povećava, remeti se metabolizam glukoze i dolazi do nagomilavanja masti i glukoze u srcu, jetri, mišićima i pankreasu, intenzivirajući procese oksidacije u mitohondrijama i peroksizomima ćelija [194, 195]. Posledično, raste proizvodnja ROS/RNS, nastaju OS i oštećenja na mitohondrijskoj DNK, smanjuje se nivo adenzin-trifosfata (ATP, *engl. adenosine triphosphate*) i uspostavlja se stanje glukotoksičnosti i lipotoksičnosti [196, 197]. Glukotoksičnost i lipotoksičnost izazivaju IR i u jetri, što doprinosi razvoju dijabetesa [198].

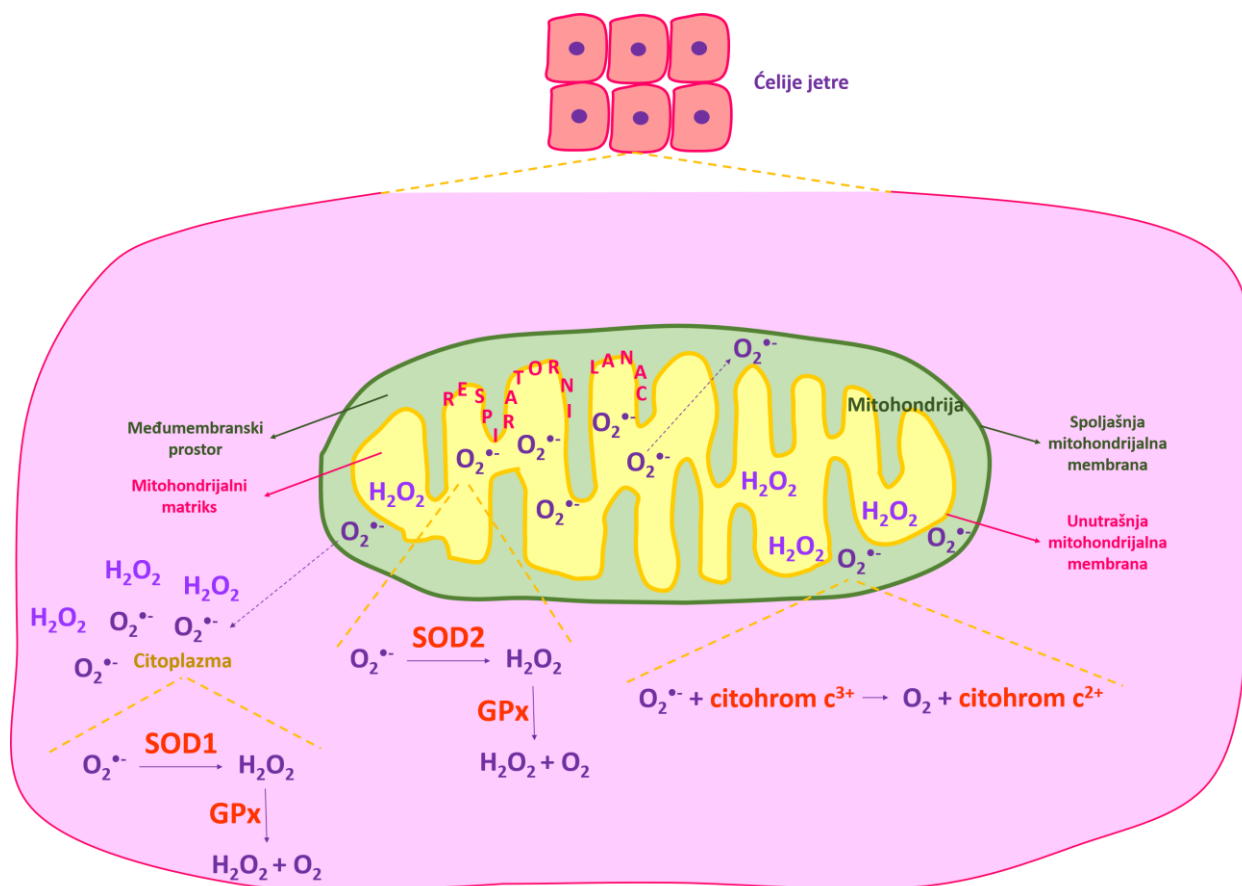
U početnom stadijumu gojznosti, ekspresija i aktivnost enzima AOS zaštite raste i neutrališe oštećenja izazvana OS u tkivima. Pokazano je da, kod miševa na ishrani bogatoj mastima (HF ishrana, *engl. high-fat diet*), uz rast nivoa H₂O₂ u srcu raste i aktivnost CAT, najverovatnije zbog zaštite mitohondrija od oksidativnog oštećenja [199]. Međutim, sa napredovanjem gojznosti, količina i aktivnost komponenti AOS zaštite, uključujući SOD, GPx i CAT, se iscrpljuju, zbog čega podložnost oksidativnim oštećenjima tkiva sve više raste [200]. U više studija je pokazano da su aktivnosti SOD, CAT i GPx obrnuto proporcionalne indeksu telesne mase kod gojazne dece i odraslih [201-203]. Snižena aktivnost enzima AOS zaštite je takođe izmerena kod pacijenata sa MS [204].

1.3.3 Uloga antioksidativnog sistema zaštite u jetri

Narušavanje antioksidativnog sistema zaštite jetre značajno doprinosi nastajanju i napredovanju hroničnih oboljenja jetre, poput nealkoholne bolesti masne jetre (NAFLD, *engl. non-alcoholic fatty liver disease*) [160]. Naime, Tg se nagomilavaju u hepatocitima i sa masti nagomilanoj u adipocitima i mišićima, doprinose razvoju IR [205]. Zbog ovoga se remeti metabolizam masti u jetri i povećava stopa β-oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i ketogneza, što dovodi do povećane proizvodnje ROS/RNS u hepatocitima [206, 207]. Nastali ROS/RNS dovodi do peroksidacije lipida plazma membrana, ekspresije proinflamacijskih citokina, aktivacije stelatnih ćelija jetre i fibrogeneze, apoptoze i nekroze ćelija, što sve zajedno vodi nastanku NAFLD [208-211]. Osim toga, nastali ROS/RNS doprinosi napredovanju NAFLD remeteći fiziološku redoks signalizaciju [212]. Ćelije urođenog imuniteta, kao što su stelatne i

Kupferove ćelije, su odgovorne za proizvodnju ROS/RNS i transkripciju citokina i enzima važnih za održavanje redoks ravnoteže, metabolizma, zapaljenja i nastanak fibroze u jetri [213-215].

U fiziološkim uslovima ćelije jetre efikasno uklanjaju višak ROS/RNS posredstvom mehanizama AOS zaštite (**Slika 4**). U matriksu mitohondrija, SOD2 katalitički pretvara $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 . Nastali $O_2^{\cdot-}$ ne može da difunduje iz mitohondrijalnog matriksa u citoplazmu izuzev u svojoj protonovanoj formi, što čini veoma malu frakciju $O_2^{\cdot-}$ radikala u fiziološkim pH vrednostima [216]. $O_2^{\cdot-}$ u međumembranskom prostoru mitohondrija se razlaže pod delovanjem oksidovane forme citohroma c, ili difunduje u citoplazmu kroz voltažno-zavisne kanale za anjone [217]. U citoplazmi se nalazi SOD1 koja vrši dismutaciju $O_2^{\cdot-}$. GSH i GSH-spregnuti enzimi AOS zaštite predstavljaju važnu mitohondrijalnu antioksidativnu zaštitu. GPx enzimi redukuju H_2O_2 i lipidne perokside; H_2O_2 može i da difunduje iz mitohondrija u citoplazmu. U citoplazmi ćelija se nalazi Gpx1, dok se u blizini mitohondrijske membrane nalazi GPx4 izoforma enzima. Povećana proizvodnja ROS/RNS u mitohondrijama jetre i smanjena aktivnost mehanizama AOS zaštite (GSH, SOD2, CAT) u stanju NAFLD doprinose efektima OS preko oksidacije polinezasićenih masnih kiselina [218]. OS takođe izaziva oksidaciju proteina i peroksidaciju lipida koje pokreću promene i oštećenja mitohondrijalne DNK, što može izazvati uspostavljanje ciklusa mitohondrijskih oštećenja i OS poteklog od poremećenih funkcija mitohondrijalnih enzima [219].



Slika 4. Mehanizmi AOS zaštite u jetri. U metaboličkim procesima, u mitohondrijama ćelija jetre nastaje $O_2^{\bullet-}$, tokom prenosa elektrona kroz respiratorni lanac u procesu ćelijskog disanja. U matriksu mitohondrija, SOD2 katalitički pretvara $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 . U međumembranskom prostoru mitohondrija, $O_2^{\bullet-}$ se razlaže pod delovanjem oksidovane forme citohroma c, ili difunduje u citoplazmu, gde se nalazi SOD1 koja vrši dismutaciju $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 . Enzimi GPx, u matriksu mitohondrija i citoplazmi ćelija jetre, redukuju H_2O_2 do H_2O i O_2 .

1.3.4 Regulacija antioksidativnog sistema zaštite pod delovanjem estradiola

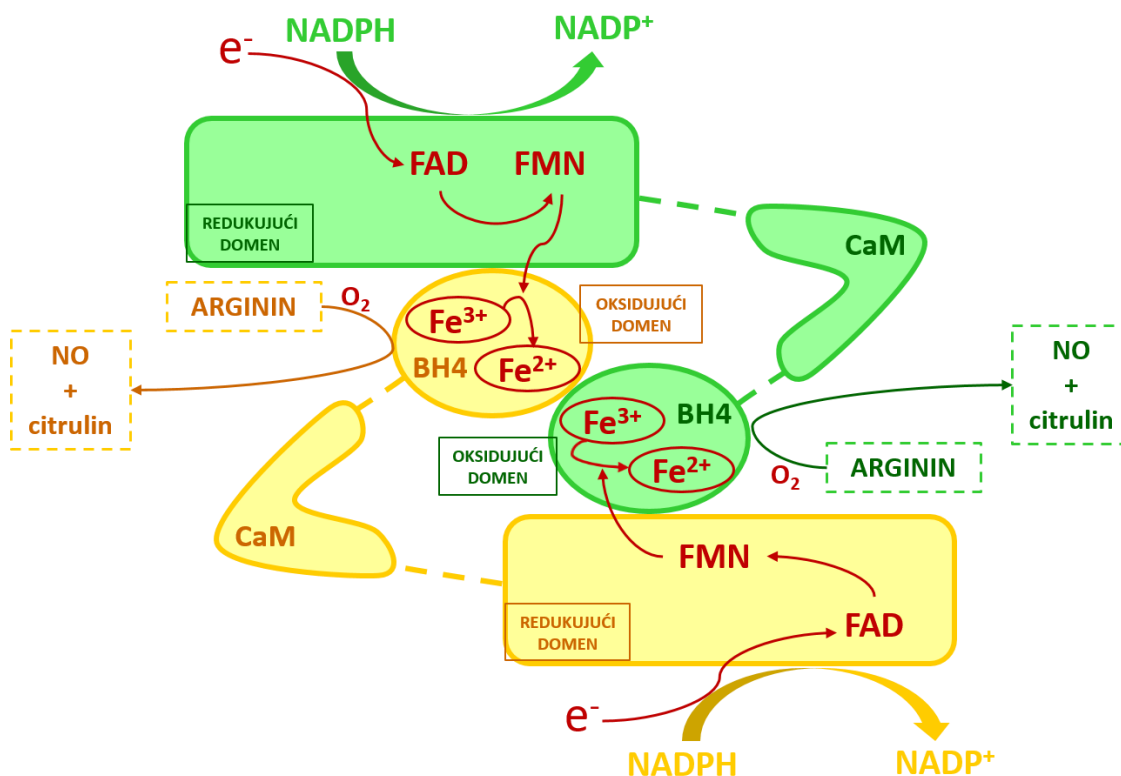
Estradiol, kao i ostali estrogenski hormoni, ispoljava antioksidativno dejstvo [220]. Nivo E2 se nalazi u pozitivnoj korelaciji sa antioksidativnim kapacitetom u plazmi, kao i sa ekspresijom enzima AOS zaštite tokom menstrualnog ciklusa [221-223], dok je korelacija između nivoa E2 i nivoa peroksida lipida negativna [224]. Terapijsko davanje estrogena obnavlja antioksidativni kapacitet u cirkulaciji i snižava nivo lipidnih peroksida [224, 225]. Smatra se da antioksidativno dejstvo estrogena može biti rezultat direktnog uklanjanja reaktivnih molekularnih vrsta kada su estrogenski prisutni u visokim koncentracijama [226]. Estrogenski u niskim koncentracijama, koje odgovaraju nivou hormona u cirkulaciji žena tokom menstrualnog ciklusa, ostvaruju svoje antioksidativno dejstvo vezujući se za ER, regulišući tako ekspresiju enzima AOS zaštite [12, 227, 228]. U skeletnim mišićima ovarijektomisanih miševa, primena E2 kao terapije uticala je na povećanje ekspresije gena za enzime AOS zaštite posredstvom ER α [229]. Kod ovarijektomisanih pacova je pokazan povećan nivo GSSG u odnosu na GSH [230], dok je u eritrocitima žena nakon menopauze pokazana linearna veza između estrogena i GPx [222]. Snižene aktivnosti enzima SOD, CAT i GPx su detektovane u homogenatima jetre i butne kosti ovarijektomisanih pacova . [228, 231]. U *in*

vitro uslovima, E2 aktivira ERK1/2, MAPK i NFκB što dovodi do ekspresije enzima AOS zaštite SOD2 i GPx [227]. Estradiol smanjuje stvaranje H₂O₂ u mitohondrijama izolovanim iz mozga i jetre mužjaka pacova, vezivanjem za ER i posledičnim aktiviranjem MAPK i NFκB [220]. Tretman E2 dijabetičnih mužjaka pacova je doveo do povećanja aktivnosti SOD, CAT i GPx u jetri i pankreasu [232]. U određenim tkivima mužjaka glodara, kao što su mozak, pluća i srce, pokazan je smanjen nivo aktivnosti SOD enzima, u odnosu na nivo aktivnosti SOD u istim organima kod ženki. Nivo aktivnosti CAT je niža u bubrezima mužjaka u odnosu na ženke, dok je nivo aktivnosti GPx viša kod mužjaka u poređenju sa ženkama [233]. Antioksidativno dejstvo samog E2 može obezbediti AOS zaštitu u tkivima ženki u kojima je ekspresija i/ili aktivnost enzima AOS zaštite smanjena u odnosu na mužjake, kao što je enzim GPx. Povećana ekspresija i/ili aktivnost enzima AOS zaštite kod ženki u odnosu na mužjake, najverovatnije je rezultat delovanja E2 na regulaciju enzima AOS zaštite preko aktivacije ER [233].

1.4 Inducibilna azot-monoksid-sintaza i azot-monoksid

Inducibilna NOS je jedna od izoformi enzima azot-monoksid-sintaza (NOS, *engl. nitric oxide synthases*) (**Slika 5**), koje čine porodicu enzima koji katalizuju oksidaciju L-arginina u L-citrulin, pri čemu nastaje gas NO [234]. Osim iNOS, do sada su klonirane i okarakterisane još tri izoforme NOS: neuronalna NOS (nNOS/NOS1, *engl. neuronal NOS*), endotelna NOS (eNOS/NOS3, *engl. endothelial NOS*) i konstitutivno aktivna NOS izoforma prisutna u mitohondrijama koja se naziva mitohondrijska NOS (mtNOS, *engl. mitochondrial NOS*). Sve izoforme NOS imaju specifičnu tkivnu distribuciju i različite stope stvaranja NO [235]. iNOS poseduje najveći kapacitet za proizvodnju NO i ekspirira se u mnogim tipovima ćelija u odgovoru na inflamaciju [236, 237]. U fiziološkim uslovima u većini ćelija, iNOS nije ekspimirana, a stepen njene aktivnosti zavisi od dostupnosti supstrata i prisutnosti kofaktora [238-240]. Aktivnost iNOS je indukovana prisustvom citokina i drugih bioloških faktora (mikroorganizama, lipopolisaharida, endotoksina itd.), a njena ekspresija regulisana je na nivou transkripcije i posttranskripcione obrade. eNOS je najzastupljenija forma NOS u vaskularnom endotelu, ali se takođe nalazi i u neuronima, epitelnim ćelijama, kardiomiocitima [241], adipocitima [242, 243] i hepatocitima [244-246]. eNOS stvara NO u niskim koncentracijama, a aktivnost enzima je zavisna od Ca²⁺ i kalmodulina, posttranslacionih modifikacija [247, 248] i fizičke sile poput istezanja zidova krvnih sudova [236, 249]. nNOS predstavlja još jednu Ca²⁺/kalmodulin-zavisnu izoformu NOS enzima koja može biti aktivirana agonistima receptora za N-metil-D-aspartat [236]. Ekspimirana je prvenstveno u neuronima, zatim skeletnim mišićima i epitelnim ćelijama. Specifična uloga mtNOS i dalje nije u potpunosti razjašnjena [250, 251]. Osim posttranslacionih modifikacija i dostupnosti supstrata i kofaktora, lokalizacija unutar ćelija i međusobne interakcije, kao i interakcije sa drugim proteinima, dodatno regulišu aktivnost različitih NOS [236].

Inducibilna NOS predstavlja flavoprotein i oksidoreduktazu za čiju aktivnost je neophodno prisustvo molekuskog kiseonika, NADPH, kalmodulina i četiri redoks-aktivne prostetične grupe (FAD, FMN, hem grupa – Fe protoporfirin IX i tetrahidrobiopterin). Aktivnošću iNOS, semi-esencijalna aminokiselina L-arginin biva konvertovana u L-citrulin, vodu i NO, uz nastanak N-hidroksi-L-arginina kao međuproizvoda reakcije vezanog za enzim [252]. Holoenzim iNOS je dimer u kome dva oksidujuća domena dimerizuju sa antiparalelnim usmerenjem, dok se bočno od njih nalaze dva odvojena domena sa funkcijom reduktaze [253]. Tri prilagodljiva vezujuća domena omogućavaju konformacionu pokretljivost enzima i blisku interakciju između redukujućih i oksidujućih domena, što je značajno za prelazak elektrona i reakciju katalize [253].



Slika 5. Shematski prikaz strukture i funkcije iNOS. Funkcionalni iNOS enzim je homodimer koji se sastoji od dve identične subjedinice. Svaka subjedinica se sastoji od tri domena: oksidujući domen na N-terminusu, kalmodulin (CaM)-vezujući domen i redukujući domen na C-terminusu enzima. Uloga redukujućeg domena jedne subjedinice enzima jeste da izvrši redukciju gvožđa ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) u oksidujućem domenu druge subjedinice postepenim prenosom (e^-) od redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) kao sekundarnog supstrata preko kofaktora flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FMN). Vezivanje CaM za CaM-vezujući domen i kofaktora tetrabiohidropterina (BH4) za oksidujući domen osiguravaju funkcionalnu dimerizaciju subjedinica iNOS. Svaka subjedinica iNOS katalizuje dvostepenu oksidaciju L-arginina, preko intermedijernog jedinjenja N-hidroksi-L-arginina (nije prikazano), do L-citrulina, pri čemu se oslobađa molekul NO. Preuzeto i modifikovano iz Santolini [254].

Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS enzima je visoko specifičan proces koji se odvija na različitim nivoima. Aktivnost iNOS zavisi od bioraspoloživosti aminokiseline arginina, te su regulacija ćelijskog transporta arginina [255, 256] i potrošnje arginina od strane drugih biohemijskih procesa u ćeliji [257-259] važni procesi koji učestvuju u regulaciji aktivnosti iNOS u svim ćelijama. Mehanizmi koji regulišu stvaranje i potrošnju iNOS kofaktora BH₄ su takođe odgovorni za regulaciju aktivnosti iNOS [260, 261]. Nakon stvaranja aktivnog iNOS enzima, proizvodnja NO se odvija sve dok enzim ne bude degradovan [262, 263]. Transkripcioni faktor NFκB predstavlja ciljni molekul mnogih aktivatora i inhibitora ekspresije iNOS [264, 265]. Lipopolisaharid, citokini IL-1β i TNFα, kao i OS pokreću ekspresiju iNOS u različitim tipovima ćelija aktivacijom NFκB. Takođe, pokazano je da je sprečavanje ekspresije iNOS glukokortikoidima i antioksidantima posledica odsustva aktivnosti NFκB [266-272].

Gas NO je slobodni radikal koji, zajedno sa drugim srodnim oksidima azota, predstavlja veoma značajan regulator ćelijskih i tkivnih funkcija [235]. Poluzivot i biološka reaktivnost NO zavise od raspoloživosti reaktanata [273]. NO obavlja mnogobrojne biološke funkcije u regulaciji fizioloških procesa, koje mogu imati prolazne efekte, ili mogu dugotrajno menjati ćelijske funkcije. Kada NO nastaje kao posledica aktivnosti eNOS i nNOS ima ključnu ulogu u regulaciji sistemskog krvnog pritiska i aktunoj regulaciji protoka krvi kroz pojedinačne organe [274-277]. S druge strane, NO nastao aktivnošću iNOS enzima svoju najvažniju funkciju ostvaruje u odstranjivanju patogena i reakcijama zapaljenja [278]. Molekul NO interaguje sa najvećim afinitetom sa tiol (sulfhidril) grupama aminokiseline Cys u okviru peptida i proteina, što vodi nastanku S-nitrozotiola [279] i sa divalentnim katjonima Fe²⁺ i cinka (Zn²⁺) koji regulišu aktivnost mnogih transkripcionih faktora i enzima [280, 281]. U reakciji sa slobodnim radikalom O₂^{•-}, NO formira ONOO⁻ [278, 282, 283]. ONOO⁻ i reaktivne vrste koje nastaju od njega (npr. NO₂) su važni učesnici inflamacijskih procesa [283], mogu da modulišu ćelijsku signalizaciju [284-287] i da pokreću oksidaciju i nitraciju biomolekula [235]. Deaminacija nukleinskih kiselina vodi nastanku mutacija [288], a NO₂ može da „napadne“ dvostruke veze u nezasićenim lipidima i na taj način formira nitrolipide [289].

1.4.1 Inducibilna azot-monoksid-sintaza u gojaznosti i rezistenciji na insulin

Biološka dostupnost NO je smanjena u animalnim modelima gojaznosti i dijabetesa [290, 291], kao i kod gojaznih i dijabetičnih ljudi [292, 293]. Smanjeni nivoi NO u stanju gojaznosti mogu biti posledica smanjene ekspresije i/ili aktivnosti NOS enzima ili reakcije NO sa reaktivnim vrstama kao što je O₂^{•-}. Nasuprot eNOS čija se ekspresija i zastupljenost smanjuje u stanju gojaznosti kod glodara i ljudi [294-297], nivo iNOS izoforme enzima raste u β-ćelijama pankreasa [298], aorti [299], skeletnim mišićima [300], jetri [3, 219] i masnom tkivu [301-303] gojaznih glodara. Ekspresija iNOS je stimulisana delovanjem proinflamacijskih citokina i SMK [304], hiperglikemijom [305, 306], endotoksinima [307, 308] i OS. U masnom tkivu, najveći deo iNOS se eksprimira od strane makrofaga koji se nakupljaju iz cirkulacije i odlikuju se proinflamacijskim fenotipom [301-303]. Dodatno, visoki nivoi TNFα utiču na povećanje nivoa iNOS u samim adipocitima [309].

Azot-monoksid i ROS/RNS, koje nastaju aktivnošću iNOS enzima, učestvuju u regulaciji metabolizma. Povećana aktivnost iNOS predstavlja jedan od važnih faktora koji doprinose razvoju IR usled zapaljenja pokretanjem stresa endoplazmatskog retikuluma i/ili OS [3]. Pokazano je da povećana ekspresija iNOS u skeletnim mišićima miševa može inhibirati dejstvo insulina S-nitracijom receptora za insulin, kao i IRS-1 i Akt, što sugerise ulogu nitrozativnih posttranslacionih modifikacija proteina u patogenezi IR [310, 311]. iNOS svojom aktivnošću smanjuje zastupljenost IRS-1 proteina najverovatnije pokretanjem njegove degradacije u proteazomu [300]. Osim toga, u studiji Perreaulta i Marettea je pokazano da delecija gena za iNOS omogućava zaštitu od razvoja IR koja nastaje usled primene HF ishrane [312]. Naime, delecija gena za iNOS pospešuje toleranciju

na glukozu, osetljivost na insulin i sprečava remećenje PI3K/Akt signalnog puta kod miševa na HF ishrani [312]. Takođe, iNOS-KO miševi na HF ishrani su bili zaštićeni od razvoja sistemske IR iako su imali povećanu telesnu masu i hiperglikemiju [312]. Takođe, pokazano je da su makrofagi, koji se nakupljaju u masnom tkivu i eksprimiraju iNOS, odgovorni su za širenje inflamacijskih signala uključenih u razvoj IR [313].

1.4.2 Uloga iNOS u jetri

U fiziološkim uslovima, iNOS je eksprimiran u jetri u Kupferovim ćelijama i u hepatocitima [314]. Citokini koji pokreću inflamacijski odgovor izazivaju povećanu ekspresiju iNOS i regulišu proizvodnju NO, kako u hepatocitima, tako i u Kupferovim ćelijama [315]. Ravnoteža između procesa sinteze i razgradnje NO je ključna u određivanju efekata NO u jetri, pa tako, povećana ekspresija iNOS dovodi do prekomerne proizvodnje NO, koji može dovesti do genotoksičnih i citotoksičnih oštećenja jetre [316]. Sa druge strane, u studiji Szabo sa saradnicima je pokazano da selektivni inhibitori iNOS utiču na smanjenje oštećenja jetre pacova izazvanih bakterijskim lipopolisaharidima (LPS) [317]. U do sada objavljenim studijama su zabeležena različita zapažanja o efektima koje iNOS može imati na signalni put insulina u jetri i razvoj IR [312, 318]. Najveći broj rezultata govori u prilog stanovištu da gojaznost i poremećeni metabolizam lipida u jetri ometa signalni put insulina u jetri, vodi povećanju ekspresije iNOS i doprinosi razvoju IR [3, 319-322]. Kod *ob/ob* miševa, selektivna prekomerna ekspresija iNOS u jetri izaziva hepatičnu IR, hiperglikemiju i hiperinsulinemiju [322], a upotreba specifičnog inhibitora za iNOS poništava nabrojane efekte [3]. U studiji Charbonneau sa saradnicima je pokazano da iNOS može izazvati IR u jetri posredstvom nitrovanja Tyr ostataka u proteinima učesnicima signalnog puta insulina [319]. Sa druge strane, studija Chena sa saradnicima pokazuje da iNOS može zaustaviti napredovanje steatohepatitisa u fibrozu jetre kod miševa izlaganih HF ishrani, sugerišući važnu ulogu iNOS u regeneraciji jetre [323]. Delecija iNOS može poremetiti sposobnost regeneracije jetre i može povećati oštećenja u jetri nastala pod uticajem načina ishrane [323, 324]. U studiji Perreaulta i Merettea je pokazano da ekspresija iNOS nije povećana u jetri miševa na HF ishrani [312].

1.4.2.1 Regulacija iNOS pod delovanjem estradiola

Estradiol reguliše ekspresiju iNOS posredstvom ER [13, 325]. ER α posreduje u anti-inflamacijskim efektima E2 u vaskularnim [326, 327] i nevaskularnim tkivima [328, 329]. Međutim, inkubacija glatkih mišićnih ćelija aorte, poreklom od dijabetičnih pacova tretiranih streptozotocinom, sa agonistom selektivnim za ER α izaziva smanjenje ekspresije iNOS [330]. Osim toga, u stanjima sepse i hemoragijskog šoka, E2 dovodi do smanjenja nivoa NO u hepatocitima u odgovoru na prozapaljenske citokine na način zavisano od nivoa hormona [331]. Pokazano je da ER α u jetri posreduje u zaštitnim efektima E2 tokom zapaljenja [332] i reguliše ekspresiju iNOS [331]. Prenos signala od E2/ER kompleksa kroz citoplazmu je posredovan aktivacijom unutarćelijskih kinaza [333, 334] koje dalje fosforilišu i aktiviraju transkripcione faktore [335]. Osim toga, mikro RNK miR-221 ima mogućnost modulisanja zapaljenskog odgovora kontrolisanjem aktivnosti NF κ B [336]. Ranije objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da E2 reguliše ekspresiju iNOS u srcu pacova preko PI3K/Akt signalnog puta [337].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Polazna hipoteza istraživanja, čiji su rezultati obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom, jeste da je E2 uključen u regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS u jetri mužjaka pacova, molekulskim mehanizmom koji uključuje vezivanje E2 za ER α i/ili ER β i aktivaciju signalnih molekula Src, ERK1/2, AMPK, Akt i RhoA, transkripcionog faktora NF κ B, kao i posttranskripcionog regulatora miR-221. Pretpostavljeno je da patofiziološki uslovi nastali usled primene HF ishrane (gojaznost i IR) dovode do unutarćelijskog stresa i promena u molekulskom mehanizmu delovanja E2 na regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS u jetri pacova, kao posledica promenjene ekspresije i aktivnosti signalnih molekula ER α , ER β , Src, ERK1/2, AMPK, Akt i RhoA, transkripcionog faktora NF κ B, kao i posttranskripcionog regulatora miR-221.

Stoga, u skladu sa postavljenom hipotezom, naučni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- izučavanje efekata E2 *in vivo* na regulaciju enzima AOS zaštite, u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova;
- izučavanje efekata E2 *in vivo* na regulaciju enzima iNOS, u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova;
- izučavanje uloga signalnih molekula ER α i ER β , Src, ERK1/2, AMPK, Akt, RhoA, transkripcionog faktora NF κ B, kao i posttranskripcionog regulatora miR-221 u regulaciji enzima AOS zaštite i iNOS, u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova tretiranih E2.

3. MATERIJAL I METODE

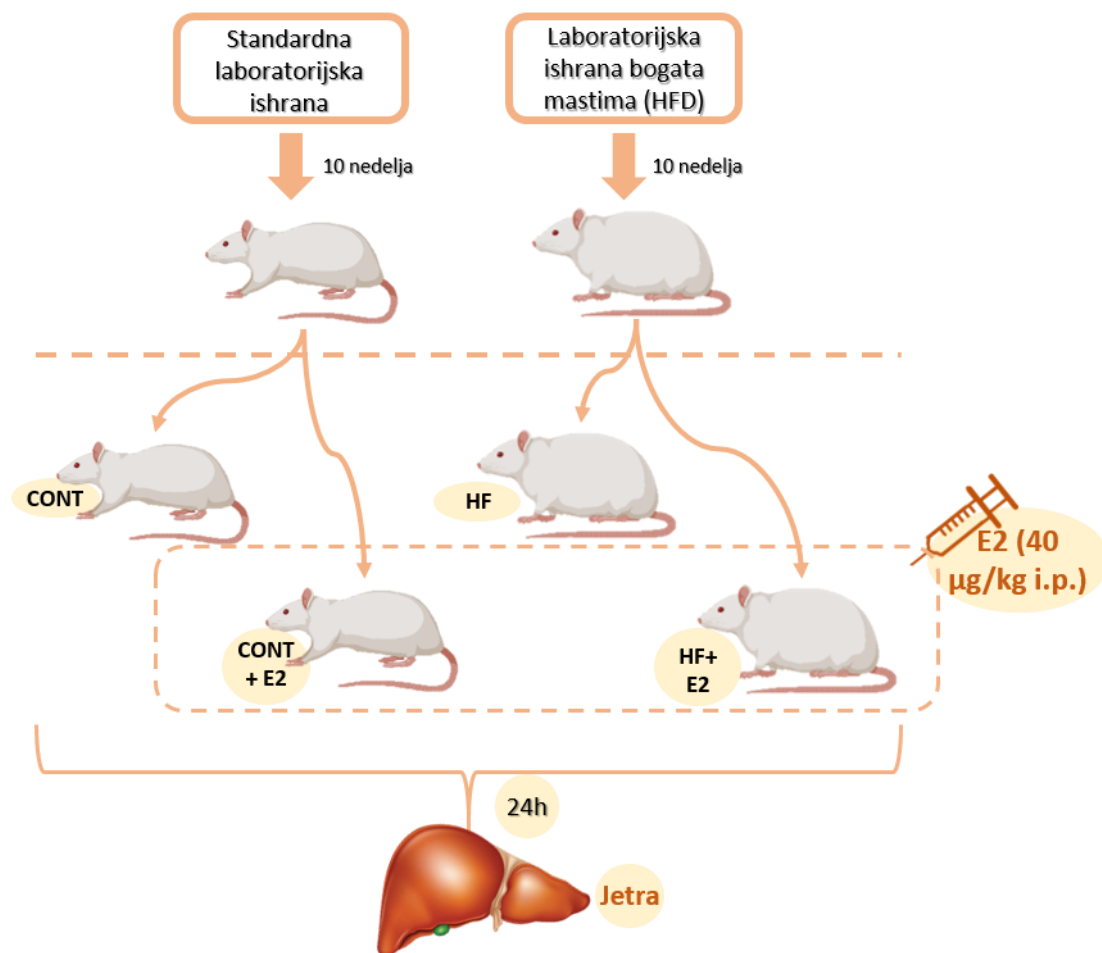
3.1. Eksperimentalni protokol

U eksperimentu je korišćeno 28 adultnih mužjaka *Wistar* soja pacova (*lat. Rattus norvegicus*), starosti osam nedelja, telesne mase 150-200 grama, iz odgajališta Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Sve eksperimentalne procedure su odobrene od strane Etičke komisije za upotrebu eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (Uprava za veterinu).

Na početku eksperimenta, pacovi su podeljeni u dve grupe (**Slika 6**). Tokom narednih deset nedelja, prva grupa pacova, označena kao kontrola (CONT) je imala slobodan (*ad libitum*) pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani. Digestibilna energija hrane iznosila je 11 MJ/kg, a njen sastav činili su: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 1% kalcijuma, 0,90% lizina, 0,75% metionina+cisteina, 0,5% fosfora, 0,15-0,25% natrijuma, mešavina vitamina (A 10000 IU/kg, D3 1600 IU/kg, E 25 mg/kg, B12 0,02 mg/kg), mešavina minerala (u mg/kg: cink 100, gvožđe 100, magnezijum 30, bakar 20, jod 0,5, selen 0,1), antioksidanti 100 mg/kg (D.D. “Veterinarski zavod Subotica”, Subotica, R. Srbija). Druga grupa pacova, označena kao gojazni (HF), je tokom istog vremenskog perioda bila na HF režimu ishrane, odnosno, imala je *ad libitum* pristup vodi i standardnoj laboratorijskoj hrani za životinje obogaćenoj mastima – suncokretovim uljem (42%).

Tokom trajanja eksperimenta, pacovi su u grupama od po dve do tri jedinke smešteni u kaveze od pleksiglasa sa poklopcem od nerđajuće čelične žice, i podlogom od piljevine koja je menjana dva do tri puta nedeljno. Laboratorijski uslovi su ispunjavali standardne zahteve za čuvanjem laboratorijskih životinja: ambijentalna temperatura u opsegu 21-24°C, relativna vlažnost vazduha 60-70%, provetravanje prostorija sistemom ventilacije, dok je dnevno noćni ritam (12 sati svetla/12 sati mraka) postizan pomoću veštačkog osvetljenja.

Nakon 10 nedelja na različitim režimima ishrane, pacovi u okviru obe grupe (CONT i HF) su podeljeni na po dve podgrupe, čime su finalno formirane četiri grupe od po sedam pacova. Dve novoobrazovane grupe pacova, označene kao Estradiol (E2) i Gojazni+Estradiol (HF+E2), su 24 sata pre žrtvovanja tretirane intraperitonealno sa E2 (Sigma, E8875) po rastvorenim u 1% etanolu u fiziološkom rastvoru u dozi od 40µg po kilogramu telesne mase. Preostale dve grupe pacova (CONT i HF) su istovremeno tretirane intraperitonealno istom količinom 1% etanola u fiziološkom rastvoru, radi eliminisanja efekta stresa, izazvanog ubodom injekcije. U dubokoj anesteziji, izazvanoj etrom, životinje su žrtvovane punkcijom krvi iz leve komore srca. Jetre su izolovane i izmerena je njihova masa. Deo tkiva jetre odvajan je za izolaciju ukupnih proteina, a deo za izolaciju RNK. Tkiva su trenutno zamrzavana u tečnom azotu, a potom čuvana na -70°C, za dalje analize.



Slika 6. Dizajn eksperimenta. Mužjaci Wistar pacova su bili na standardnoj laboratorijskoj ishrani ili HF ishrani tokom 10 nedelja. Polovina normalno uhranjenih (CONT) i gojaznih (HF) pacova je tretirano jednom dozom estradiola (E2) (40 µg/kg intraperitonealno) i nakon 24 sata od injekcije, svi pacovi su žrtvovani, a jetre izolovane.

3.2. Izolacija ukupnih proteina iz jetre pacova

Tkivo jetre (300-350 mg) pacova je usitnjeno u 1,4 ml pufera za liziranje, pH vrednosti 7,4, i homogenizovano na ledu korišćenjem homogenizera T10 Basic Ultra-Turrax (IKA-Werke, Nemačka). Pufer za liziranje je sadržao 150 mM natrijum hlorida (NaCl), 20 mM trisaminometana (Tris), 2 mM etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA), 2 mM ditiotreitola (DTT), 1% nejonskog deterdženta Triton X-100, 10% glicerola. U pufer su pred upotrebu dodati koktel inhibitora proteaza (Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack, Roche, Nemačka) i fosfataza (PhosSTOP, Roche, Nemačka), kao i 2 mM Na-ortovanadat, inhibitor fosfataza Tyr aminokiselinskih ostataka u proteinima. Homogenati jetre su inkubirani 60 minuta na 4°C uz rotaciju. Dobijeni lizati jetre su potom centrifugirani 30 minuta na 18500 rpm na 4°C. Izdvojeni supernatanti u kojima su se nalazili ukupni proteini su alikvotirani, zamrzavani na -70°C i čuvani za dalje analize.

3.3. Određivanje koncentracije proteina u lizatu jetre pacova

Koncentracija ukupnih proteina jetre pacova je određivana metodom po Loriju [338]. Zapremina lizata jetre razblaživana je dejonizovanom vodom u odnosu zapremina 1:99, a zatim je dodatno razblažena četiri puta. U epruvete sa 100 μ l finalnog razblaženja lizata jetre je dodavano 100 μ l 2% rastvora natrijum dodecil sulfata (SDS, *engl. sodium dodecyl sulfate*), sadržaj je intenzivno mešan na vorteksu, a zatim je u svaku epruvetu dodavano po 1 ml radnog rastvora. Radni rastvor je sadržao jedan volumen 1% rastvora NaK-tartarata u 0,5 % bakar sulfat pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) i 49 volumena 2% rastvora natrijum karbonata (Na_2CO_3) u 0,1 M natrijum hidroksidu (NaOH). Sadržaj epruveta je ponovo mešan na vorteksu, nakon čega je inkubiran deset minuta na svetlu na sobnoj temperaturi. Po isteku perioda inkubacije, u epruvete je dodavano 100 μ l Folin-Šialtoovog reagensa (1:2), sadržaj je ponovo intenzivno mešan, a zatim je inkubiran, u mraku 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, apsorbanca je merena na 750 nm na spektrofotometru (Ultrospec 2000, Pharmacia, Biotech). Intenzitet dobijene boje je proporcionalan koncentraciji proteina izražavanoj u $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Prema vrednostima apsorbaneci očitanih za seriju rastvora albumina goveđeg seruma (BSA, *engl. bovine serum albumin*) poznatih koncentracija (10, 25, 50, 75, 100, 200, 400 i 800 mg/ml), konstruisana je standardna kriva na osnovu koje je preračunata koncentracija proteina u lizatu jetre.

3.4. Metoda denaturišuće poliakrilamidne elektroforeze (SDS-PAGE)

Nivo ekspresije proteina od interesa u ukupnom ćelijskom lizatu jetre je određivan u dva koraka. Metoda diskontinuirane poliakrilamid gel elektroforeze u prisustvu detergenta SDS (SDS-PAGE, *engl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis*), omogućava razdvajanje proteinskih frakcija u uzorku na osnovu njihovih molekulskih masa [339]. Visoka rezolucija razdvajanja proteinskih frakcija je postizana sistemom gradijantnih gelova: 4% gela za koncentrovanje (0,5 M Tris-hlorovodonična kiselina (HCl) pH 6,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, amonijum persulfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED) i H_2O), i 10%, 12% ili 15% gelova za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, APS, TEMED i H_2O), kao i korišćenjem dva različita pufera sistema: pet puta koncentrovani redukujući pufer za uzorkovanje – 5 \times Lemli pufer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,5% 2- β -merkptoetanol, 0,1% bromfenol plavo) i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H_2O). Elektroforetsko razdvajanje proteinskih frakcija je izvođeno u Bio-Rad Mini Protean 3 Cell electrophoresis (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD) aparaturi za vertikalnu elektroforezu.

Uzorci lizata jetri su svođeni na iste koncentracije proteina (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) korišćenjem pufera za liziranje (TES), a zatim razblaživani sa 5 \times Lemli puferom. Zbog dodatne denaturacije, uzorci su, pre nalivanja, kuvani pet minuta na 95°C. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na gel u količini od 80 μg ukupnih proteina po bunariću. Elektroforeza je vršena 15 minuta pri naponu od 100 V, a zatim 90 minuta pri naponu od 150 V. Na svaki gel je nanošen i proteinski marker za elektroforezu (PageRegularTMPrestained Protein Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Litvanija).

3.5. Imunohemijska metoda – Western blot

Kao drugi korak u određivanju nivoa specifičnih proteina u lizatu jetre pacova, neposredno nakon razdvajanja proteinskih frakcija SDS-PAGE elektroforezom na gelu, rađena je semikvantitativna imunohemijska metoda – Western blot [340, 341]. Nakon elektroforeze, vršen je elektrotransfer proteina sa poliakrilamidnog gela na poliviniliden difluorid (PVDF, *engl. polyvinylidene difluoride*) membranu (Immobilon-P membrana, veličina pora 0,45 μm , Millipore Corporation, SAD). Vršen je takovani mokri transfer (Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD) u puferu za transfer (25 mM Tris-HCl Ph 8,3, 192 mM glicin, 20% metanol i

H₂O), sat vremena pri konstantnoj struji od 350 mA na 4°C. Efikasnost transfera proteina je proveravana bojenjem membrana tokom jednog minuta 0,5 % rastvorom PonsoS pufera (0,1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, razblažen istom zapreminom TBS-T (0,05% Tween 20 u TBS puferu, *engl. tris-buffered saline*). Nakon potvrde transfera, membrane su ispirane destilovanom H₂O (dH₂O) i TBS-T puferom. Da bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za PVDF membrane, one su inkubirane u puferu za blokiranje (5% rastvor BSA u TBS-T) sat vremena na sobnoj temperaturi uz konstantno klackanje.

Nakon blokiranja, membrane su ispirane TBS-T puferom, i potom inkubirane preko noći na 4°C uz konstantnu rotaciju sa specifičnim primarnim antitelima. Membrane su inkubirane sa odgovarajućim razblaženjima primarnih antitela u 5% BSA/TBS-T (**Tabela 1**). Antitelo na β-aktin je korišćeno kao kontrola nalivanja (*engl. loading control*).

Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelima, membrane su ispirane tri puta po pet minuta u TBS-T puferu, a zatim su inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi uz konstantnu rotaciju sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP, *engl. horseradish peroxidase*; kozija anti-zečija IgG-HRP i kozija anti-mišija IgG-HRP) (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD), ili sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom (ALP, *engl. alkaline phosphatase*; kozija anti-zečija IgG-ALP i kozija anti-mišija IgG-ALP). Sekundarna antitela razblaživana su do odgovarajuće koncentracije u 5% BSA/TBS-T puferu, a nakon inkubacije, membrane su ispirane tri puta po pet minuta na sobnoj temperaturi u TBS-T puferu.

Tabela 1. Primarna antitela korišćena za detekciju proteina.

Primarno antitelo	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
anti- β -aktin	Santa Cruz Biotechnology	sc-81178	1:2000
anti-ER α	Santa Cruz Biotechnology	sc-542	1:1000
anti-ER β	Santa Cruz Biotechnology	sc-8974	1:1000
anti-NF κ B-p65	Santa Cruz Biotechnology	sc-372	1:500
anti-NF κ B-p50	Santa Cruz Biotechnology	sc-1190	1:500
anti-RhoA	Santa Cruz Biotechnology	sc-418	1:1000
anti-SOD1	Santa Cruz Biotechnology	sc-11407	1:600
anti-SOD2	Santa Cruz Biotechnology	sc-137254	1:1000
anti-GPX	Santa Cruz Biotechnology	sc-133160	1:2000
anti-CAT	Cell Signaling Technology	14097	1:1000
anti-Src	Cell Signaling Technology	2108	1:1000
anti-fosfo-AMPK α (Thr ¹⁷²)	Cell Signaling Technology	2531	1:1000
anti-AMPK α	Cell Signaling Technology	2532	
anti-fosfo-p44/42 ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signaling Technology	9101	1:1000
anti-p44/42 ERK1/2	Cell Signaling Technology	9102	
anti-ROCK1	Cell Signaling Technology	4035	1:1000
anti-ROCK2	Cell Signaling Technology	8236	1:1000
anti-fosfo-Akt (Ser ⁴⁷³)	Cell Signaling Technology	9271	1:1000
anti-Akt	Cell Signaling Technology	9272	1:1000
anti-fosfo-Akt (Thr ³⁰⁸)	Abcam	ab38449	1:600
anti-Akt	Abcam	ab8805	1:1000
anti-iNOS	Abcam	ab15323	1:1000

ER α – receptor za estrogene alfa; ER β – receptor za estrogene beta; NF κ B-p50/p65 – p50/p65 subjedinica nuklearnog faktora kapa B; SOD1 – bakar/cink-superoksid-dismutaza; SOD2 – mangan-superoksid-dismutaza; GPX – glutation-peroksidaza; AMPK α – adenozin monofosfat-aktivirana protein-kinaza; ERK1/2 – ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1 i 2; ROCK1/2 – Rho-asocirane kinaze 1 i 2; Akt – protein-kinaza B; iNOS – inducibilna azot-monoksid sintaza.

Analizirani proteini u uzorcima su vizuelizovani bojenom reakcijom na samoj membrani nanošenjem supstrata za HRP (ECL, *engl. enhanced chemiluminescence*) ili supstrata za ALP (BCIP/NBT, *engl. 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride*). Ukoliko su sekundarna antitela bila vezana sa ALP, postupak vizuelizacije proteina je izvođen tako što su membrane inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje u puferu (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂) kome je dodavano 200 μ l reagensa BCIP/NBT, do razvijanja boje. Nakon pojavljivanja signala na membranama, u vidu plavo-ljubičastih traka koje odgovaraju analiziranim proteinima, membrane su ispirane vodom, sušene, i signali su kvantifikovani. Kada su sekundarna antitela bila vezana za HRP, na membranu je dodavan ECL reagens, a analizirani proteini su detektovani korišćenjem autoradiografskog filma. Postupak se zasniva na tome da HRP katalizuje oksidaciju luminola u prisustvu H₂O₂. Intermedijarno jedinjenje, koje u ovoj reakciji nastaje, prelazi u stabilnu formu uz emisiju svetlosti (luminiscenciju) i osvetljava film. Membrana je inkubirana tokom jednog minuta u reagensu dobijenim mešanjem istih zapremina rastvora luminola i p-kumarične kiseline (rastvorenih u Tris-HCl pH 8,5), kao i rastvora H₂O₂ (u Tris-HCl pH 8,5), a zatim postavljena u kasetu za detekciju (Hyperscreen, Amersham Life Science, SAD). Preko membrane se postavlja rendgen film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija) u mračnoj sobi sa

crvenom svetlošću. Vreme ekspozicije filma je variralo od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, a otisci dobijeni na filmu odgovaraju analiziranim proteinima na membrani.

Intenzitet signala dobijenog na membrani (ALP metoda) ili na filmu (ECL metoda) proporcionalan je količini analiziranog proteina u lizatima jetri pacova i određivan je denzitometrijski, u odnosu na β -aktin sa iste membrane, odnosno filma. Optička gustina detektovanih proteinskih traka je kvantifikovana korišćenjem računarskog programa Image J 1.45s (NIH, SAD). Prosečan broj piksela po otisku dobijenog signala kontrolnih grupa pacova je definisan kao jedna arbitrarna jedinica (A.J.) po μg proteina. Vrednosti dobijene za eksperimentalne grupe su predstavljene u odnosu na vrednosti dobijene za kontrole.

3.6 Koimunoprecipitacija

Koimunoprecipitacija je metoda prečišćavanja i detekcije proteina od interesa koji se nalaze u međusobnoj interakciji, iz rastvora nedenaturisanih ukupnih proteina, korišćenjem primarnog antitela kuplovanog za nerastvorni supstrat (agarozu ili sefarozu) za koju je vezan protein A ili G. Metoda se zasniva na korišćenju primarnog antitela određenog proteina („mamac“ protein), da bi se indirektno došlo do proteina od interesa („plen“ protein) pod pretpostavkom da ova dva proteina interaguju. Protein A/G služi za „hvatanje“ imunokompleksa nastalog prethodnom inkubacijom uzorka sa antitelom specifičnim na „mamac“ protein. Na ovaj način se „mamac“ protein prečišćava, „povlačeći“ sa sobom i sve proteine sa kojima formira komplekse. Prečišćeni imunokompleksi se zatim razdvajaju i elektrotransferom prenose na membranu, gde se „plen“ protein od interesa detektuje klasičnom Western blot metodom.

Postupak koimunoprecipitacije je izvođen tako što je protein A/G sefaroza (Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, inc. Dallas, SAD) pripremana ispiranjem 20 μl sefaroze u TBS-T puferu tri puta, uz centrifugiranje. Zatim su lizati jetre, koji su sadržali 500 μg ukupnih proteina po uzorku, inkubirani preko noći na 4°C sa 2 μg anti-ER α antitela. Dobijeni imunokompleksi ER α antitela i uzorka, inkubirani su sa protein A/G sefarozom preko noći na 4°C, pri konstantnoj rotaciji. Novonastali imunokompleks proteina sa protein A/G sefarozom je centrifugiran (2500 \times g tokom pet minuta), a dobijeni pelet je ispiran tri puta u puferu za liziranje, čime je protein od interesa resuspendovan. Dobijeni uzorci proteina su kuvani pet minuta na 95°C, zatim naneti u bunariće gela i razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom, i preneti na PVDF membranu koja je inkubirana sa anti-Src antitelom. Za detekciju je korišćeno sekundarno anti-zečije IgG-HRP antitelo, razblaženo u TBS-T puferu u odnosu 1:5000, i ECL supstrat. Optička gustina detektovanih signala je kvantifikovana u Image J 1.45s softverskom programu, izražavana u A.J. i dobijene vrednosti su predstavljane u odnosu na kontrolu.

3.7 Određivanje aktivnosti ukupnih Rho proteina u lizatu jetre pacova

Rho proteini pripadaju familiji malih GTP-vezujućih proteina koji se aktiviraju formirajući kompleks sa molekulom GTP, dok su u kompleksu sa guanozin-difosfatom (GDP, *engl. guanosine diphosphate*) neaktivni. Aktivirani Rho poseduje sposobnost asocijacije sa RBD rotetkina (mamac protein), što omogućava merenje njegove aktivnosti pomoću komercijalnog kita (Active Rho Pull-Down and Detection Kit, Thermofisher Scientific, SAD). Postupak je izvođen tako što je u epruvetama inkubirano 500 μg ukupnih proteina sa 400 μg rotekin-RBD proteina imobilisanog na afinitetnom ligandu (agarozne kuglice), na 4 °C uz rotaciju tokom sat vremena. Sadržaj je nakon toga centrifugiran 1 minut na 6000 \times g, i supernatant je dekantovan. Nakon ispiranja kompleksa centrifugiranjem, uzorci su pripremljeni za SDS-PAGE (4% gel za koncentrovanje i 12% gel za razdvajanje). Membrane su nakon transfera i blokiranja inkubirane sa primarnim anti-Rho antitelom (1:600) i sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG-HRP antitelom (1:500). Analizirani proteini u uzorku

su vizualizovani i denzitometrijski kvantifikovani kao što je opisano u poglavlju Western blot. Dobijene vrednosti su izražavane u odnosu na vrednosti dobijene za kontrole.

3.8 Određivanje aktivnosti enzima CAT u lizatu jetre pacova

Aktivnost CAT je određivana spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na formiranju stabilnog kompleksa između amonijum molibdat-tetra-hidrata $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O})$ i H_2O_2 [342]. Postupak je izvođen tako što su uzorci tkiva jetre svake životinje, prosečne mase 300 mg, usitnjeni su u 0,16 M rastvoru kalijum-hlorida (KCl) i homogenizovani na ledu korišćenjem T10 Basic Ultra-Turrax (IKA-Werke, Nemačka) homogenizera. Homogenati jetri su razblaživani u dH_2O dva puta, nakon čega je u jedan mililitar ovako dobijenog razblaženja svakog pojedinačnog uzorka dodavano po deset mikrolitara apsolutnog etanola. U sledećem koraku je izdvajano po 100 μl razblaženih homogenata jetre i inkubirano u 1 ml 30 % H_2O_2 na 37°C tokom deset minuta. Enzim CAT oksiduje etanol u prisustvu H_2O_2 [343]. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 500 μl $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, koncentracije 34,4 mmol/l. Vodonik-peroksid i joni molibdata formiraju kompleks žućkaste boje čija se apsorpcija UV zraka meri na 405 nm talasne dužine u odnosu na blank kontrolu (dH_2O i H_2O_2). Spektrofotometrijsko merenje je izvođeno na Perkin Elmer Lambda 35 spektrofotometru, na sobnoj temperaturi. Kontrola je pripremana od 100 μl dH_2O , 1 ml H_2O_2 i 500 μl $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$. Aktivnost CAT je izračunavana prema sledećoj jednačini:

$$\text{CAT aktivnost } \left(\frac{\text{U}}{\text{G}}\right) = \frac{(\text{Ak} - \text{Ab}) - (\text{Au} - \text{Ab})}{\varepsilon \times t} \times \frac{V_u}{V_h} \times R \times 10$$

gde je A_k apsorbanca kontrole, A_b je apsorbanca blanka, A_u je apsorbanca uzorka, ε je molarni apsorpcioni koeficijent ($22,2 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), t je vreme inkubacije (10 minuta), V_u je ukupna zapremina reakcione smeše (1,6 ml), V_h je zapremina homogenata (100 μl), R je razblaženje homogenata ($\times 2$), a činilac 10 omogućava pretvaranje jedinica u grame tkiva. Aktivnost CAT je izražavana kao U/g.

3.9 Određivanje nivoa malon-dialdehida (MDA) u lizatu jetre pacova

Određivanje nivoa MDA se zasniva na spektrofotometrijskom merenju koncentracije roze obojenog kompleksa MDA-TBA₂ koji nastaje pri zagrevanju u reakciji između MDA i tiobarbiturne kiseline (TBA) [344, 345]. Tkiva jetre pacova homogenizovana su u 0,16 M KCl na ledu Ultra-Turrax homogenizerom, a zatim su homogenati razblaživani sa dH_2O u odnosu 1:1. Po 1 ml homogenata svakog uzorka je inkubiran 15 minuta na 100°C , sa 500 μl 40 % trihlorsirćetne kiseline (TCA, *engl. trichloroacetic acid*) i 500 μl 55 mM TBA rastvorene u 0,1mM rastvoru NaOH. Nakon inkubacije, tube sa sadržajem su ohlađene i centrifugirane 5 minuta na 13000 rpm kako bi se odstranio TBA talog. Apsorbanca je merena na 540 nm talasne dužine, u odnosu na blank (1 ml dH_2O , 500 μl TCA, 500 μl TBA), u Perkin Elmer Lambda 35 spektrofotometru na sobnoj temperaturi. Nivo MDA je izračunavan prema sledećoj jednačini:

$$\text{MDA nivo } (\mu\text{M}) = \frac{A_u - A_b}{\varepsilon} \times \frac{V_u}{V_h} \times R \times 10$$

gde je A_u apsorbanca uzorka, A_b je apsorbanca blanka, ε je molarni apsorpcioni koeficijent ($156 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), V_u je ukupna zapremina reakcione smeše (2 ml), V_h je zapremina homogenata (1 ml), R je razblaženje homogenata ($\times 2$), a činilac 10 omogućava pretvaranje jedinica u grame tkiva. Nivo MDA je izražavan u μM .

3.10 Određivanje nivoa karbonilovanih proteina (PCC) u lizatu jetre pacova

Nivo PCC (*engl. protein carbonyl content*) u lizatu jetre je određivan korišćenjem komercijalnog kita (ab126287 Protein Carbonyl Assay Kit, Abcam, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, Velika Britanija) prema uputstvu proizvođača. Uzorci tkiva jetre, prosečne mase 200 mg, homogenizovani su u dH₂O na ledu. Količina ukupnih proteina u svakom uzorku je određivana proteinskim esejem, uz korišćenje BSA kao proteinskog standarda. Uzorci su svedeni na koncentraciju 10 mg/ml razblaživanjem sa dH₂O, nakon čega je po 100 µl pripremljenih razblaženja korišćeno za određivanje nivoa PCC. Za odgovarajuću kontrolu uzeto je 100 µl dH₂O. Optička gustina uzoraka je merena na 375 nm talasne dužine na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (TECAN Sunrise, Švajcarska) i rezultati su izražavani kao nmol/mg proteina.

3.11 Određivanje koncentracije azot-monoksida u lizatu jetre pacova

Koncentracija NO u lizatu jetre pacova je određivana indirektno, merenjem koncentracije nitrita (NO₂⁻) i nitrata (NO₃⁻) kao krajnjih produkata NO, korišćenjem NO₂⁻/NO₃⁻ komercijalnog kita (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001) prema uputstvu proizvođača.

Određivanje koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻ se odvijalo u dva koraka. U prvom koraku, korišćenjem nitrit reduktaze, vršila se redukcija NO₃⁻ u NO₂⁻, a u drugom koraku (Griess-ova reakcija), dodavanjem Griess-ovog reagensa, dobijeni NO₂⁻ se konvertovao u azo jedinjenje tamno ljubičaste boje [346]. Esej je rađen u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarića, nanošenjem serije standarda NO₃⁻ poznate koncentracije, i uzoraka lizata jetre (500 µg ukupnih proteina po uzorku). Nakon inkubacije sa nitrit reduktazom, a zatim i Griess-ovim reagensima 1 i 2, merena je apsorbancija nastalog azo jedinjenja kako bi se odredila koncentracija NO₂⁻. Apsorbancija je očitavana na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Perkin Elmer, Wallac 1420 Victor), na talasnoj dužini 540 nm što je maksimumu apsorpcije NO₂⁻, a rezultati su izražavani u µM.

3.12 Određivanje relativne ekspresije gena

3.12.1 Izolacija ukupne RNK iz jetre pacova

Ukupna RNK (uključujući informacionu RNK – iRNK, i mikroRNK – miRNK) iz tkiva jetre pacova je izolovana korišćenjem Trizol reagensa, jednofaznog rastvora fenola i guanidin izotiocianata kojim se rastvara biološki materijal i denaturišu proteini (metoda fenolske ekstrakcije). Postupak je izvođen tako što je tkivo jetre homogenizovano ručnim homogenizerom, na ledu (4°C), u mililitru Trizola (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija). Nakon homogenizacije uzorci su intenzivno mešani i inkubirani pet minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je u homogenate dodavano po 200 µl hloroforma, smeša je mešana i inkubirana 10 minuta na 4°C. Uzorci su centrifugirani tokom 15 minuta pri brzini centrifuge od 14000 rpm na 4°C, nakon čega je gornja, trizolska faza, koja je sadržala ukupnu RNK, pipetom prebacivana u novi set tuba. U njima je dodavanjem 500 µl rashlađenog (-20°C) izopropil alkohola vršeno taloženje RNK (tokom 24 sata). Nakon centrifugiranja (15 minuta, 14000 rpm, 4°C), tečna faza je dekantovana, a talog RNK je opran dva puta u mililitru 75% etanola (-20°C) i potom sušen pet minuta na sobnoj temperaturi. Rastvaranje taloga RNK vršeno je u vodi tretiranoj dietilpirokarbonatom (DEPC-H₂O). Koncentracija izolovane RNK određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm na aparatu Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, SAD). Odnos apsorbanci na 260 nm (RNK) i na 280 nm (proteini) je korišćen za određivanje čistoće izolovane RNK. Odnos A₂₆₀/A₂₈₀>1,8 je

smatran zadovoljavajućim. Provera degradiranosti izolovane RNK vršena je horizontalnom nenedaturišućom elektroforezom na 1,2 % agaroznom gelu.

3.12.2 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT reakcija) predstavlja proces u kome se jednolančana RNK prepisuje u komplementarnu DNK (cDNA, *engl. complementary DNA*), uz pomoć komercijalnog kita za sintezu cDNK, prema uputstvu proizvođača. Prepis iRNK u cDNK je vršen korišćenjem RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher Scientific, SAD). Mikrogram ukupne RNK iz jetre pacova je inkubirana sa mikrolitrom heksamera (Random Hexamer Primer) i dejonizovanom vodom do ukupne zapremine 12 μ l, pet minuta na 65°C. Nakon završene inkubacije, u smešu je dodavano 4 μ l reakcionog pufera (5 \times Reaction Buffer), 1 μ l inhibitora RNKaze (RiboLock RNase Inhibitor), 2 μ l 10 mM dezoksinukleozid-trifosfata (dNTP) Mix i 1 μ l reverzne transkriptaze (RevertAid H Minus M-MuL Reverse Transcriptase). Uzorci su blago promešani, centrifugirani, i inkubirani pet minuta na 25°C, a zatim 60 minuta na 42°C. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem na 70°C u trajanju od pet minuta. Dobijena cDNK je direktno korišćena za kvantifikaciju relativne ekspresije gena za iNOS.

Za reverznu transkripciju miRNK, miR-221 u cDNK je korišćeno 10 ng ukupne RNK i TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Universal master mix 2 \times , No UNG amperase (Applied Biosystems, SAD). U tubama od 0,5 ml pripremljena je smeša 0,15 μ l 100 mM dNTP, 1 μ l reverzne transkriptaze, 1,5 μ l reakcionog pufera, 0,19 μ l inhibitora RNKaze i DEPC-H₂O do ukupne zapremine 7 μ l. Zatim je u svaku tubu dodavano po 5 μ l uzorka. Sadržaj tuba je blago ručno promešan i centrifugiran 7 sekundi, te je u svaku tubu dodavano po 3 μ l prajmera (Custom RT Primer Pool), prethodno promešanih na vorteksu. Finalna smeša od 15 μ l je ručno promućkana, kratko centrifugirana i inkubirana na ledu tokom pet minuta. Primenjeni temperaturni profil reakcije je bio: 30 minuta na 16°C, 30 minuta na 42°C i pet minuta na 85°C.

3.12.3 Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR)

Nivoi relativne ekspresije gena za iNOS i ekspresije posttranskripcionog regulatora miR-221 u jetri pacova kvantifikovani su metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (PCR, *engl. polymerase chain reaction*) u realnom vremenu (qRT-PCR, *engl. quantitative real time-PCR*). U osnovi qRT-PCR metode je ciklična replikacija molekula DNK, kao i naizmenično zagrevanje i hlađenje inkubacione smeše, u prisustvu fluorofora koje omogućuju kvantifikaciju svake pojedinačne amplifikacije. Reakcija započinje denaturacijom DNK, praćenom hibridizacijom prajmera, dok u trećoj fazi Taq DNK polimeraza, uz prisustvo slobodnih dNTP i jona magnezijuma (Mg²⁺), sintetishe kopije željene sekvence. Sam proces amplifikacije odvija se kroz dve faze: eksponencijalna fazu u kojoj se količina PCR produkta eksponencijalno povećava u svakom ciklusu i neeksponencijalna odnsono plato faza. Tokom PCR reakcije, nivo detektovane fluorescencije odgovara količini ciljnog produkta.

Analiza nivoa relativne ekspresije gena za iNOS je izvođena u Real-Time PCR sistemu (Applied Biosystems 7500, SAD), u 96-komornim mikrotitarskim pločama (MicroAmp Optial, Applied BioSystems, SAD). Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Zapremina od 20 μ l reakcione smeše po komori je sadržala uzorak (razblažen u dejonizovanoj vodi u odnosu 1:10), reakcionu smešu Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mixes with low ROX (Agilent Technologies, SC, SAD) i parove prajmera (*engl. forward i reverse*) za iNOS (Metabion, Martinsried, Nemačka), ili za β -aktin (Sigma Aldrich Corporation, SAD) koji je korišćen kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena za iNOS. Prajmeri za gen za β -aktin i gen za iNOS pacova dizajnirani su korišćenjem Primer Express1 software v2.0 računarskog programa. Sekvence prajmera za gen za iNOS pacova (GenBank pristupni broj: NM_012611) bile su 5'-AGAAGTCCAGCCGCACCAC-3' (*forward* prajmer) i 5'-TGGTTGCCTGGGAAAATCC-3' (*reverse* prajmer), dok su sekvence

prajmera za gen za β -aktin pacova (GenBank pristupni broj: NM_031144) bile 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3' (*forward* prajmer) i 5'-GAGCCACCAATCCACACAGA-3' (*reverse* prajmer). Finalne koncentracije prajmera su bile 450 nM za iNOS i 150 nM za β -aktin. Temperaturni profil reakcije u qRT-PCR sistemu bio je: 3 minuta na 95°C, 40 ciklusa u trajanju od po 15 sekundi na 95°C i po 32 sekunde na 61°C. U cilju provere kontaminacije uzorka i nastanka nespecifičnih produkata (dimer-prajmer), podešavani su uslovi za konstruisanje krive topljenja PCR produkta po završetku umnožavanja: 15 sekundi na 95°C, 15 sekundi na 60°C, 20 minuta temperaturnog rasta (δ), te 15 sekundi na 95°C.

Ekspresija posttranskripcionog regulatora miR-221 je, takođe, analizirana u Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemu, u 96-komornim mikrotitarskim pločama, i normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu – malu jedarnu RNK U6B. Za amplifikaciju miR-221 i U6B korišćen je TaqMan microRNA assays (Thermofisher Scientific, SAD). Zapremina od 20 μ l po komori sadržala je 1 μ l TaqMan Small RNA assay (20 \times) polimeraze, 10 μ l PCR master mix-a, 7,67 μ l vode (nuclease-free) i 1,33 μ l cDNK uzorka. Reakciona PCR smeša pre dodavanja uzorka je intenzivno mešana i kratko centrifugirana. Temperaturni profil reakcije u qRT-PCR sistemu bio je: 20 sekundi na 95°C, a zatim 40 ciklusa u trajanju od po 3 sekundi na 95°C i po 30 sekundi na 62°C.

Dobijeni rezultati qRT-PCR analize relativne ekspresije gena za iNOS i miR-221 su obrađeni primenom komparativne Ct metode (Ct, *engl. cycle threshold*). Ct je broj ciklusa ekspanencijalne faze PCR reakcije nakon kojeg vrednosti fluorescentnog signala reakcije pređu prag. Tokom ekspanencijalne faze PCR, fluorescenca se duplira u svakom ciklusu amplifikacije, zatim kinetika reakcije usporava zbog trošenja komponenti reakcione smeše i reakcija ulazi u „plato“ fazu (28-40 ciklusa). Ct vrednost je proporcionalna logaritmu početne količine ispitivanog ciljnog molekula u uzorku. Nivo ekspresije gena od interesa je izražen kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$, pri čemu ΔCt predstavlja razliku između Ct vrednosti gena od interesa i Ct vrednosti gena za β -aktin, dok $\Delta\Delta Ct$ predstavlja razliku između ΔCt i ΔCt kalibratora (kao kalibrator je korišćena srednja vrednost svih uzoraka kontrolne grupe) [347]. Dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem programa Detection RQ Study za 7500 System SDS (Applied Biosystem, Carlsbad, SAD). Konačan rezultat, relativna ekspresija gena za iNOS i miR-221, izražavan je u odnosu na vrednosti dobijene za kontrole.

3.13 Statistička obrada dobijenih rezultata

Dobijeni rezultati su prikazani kao aritmetička srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Značajnost razlika ispitivanih parametara između kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova je određena pomoću Student-ovog *t*-testa primenom Excel PC programa. Verovatnoća manja od 0,05 ($p < 0,05$) je smatrana statistički značajnom razlikom između dve grupe.

4. REZULTATI

Na osnovu postavljenih ciljeva istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji je izučavan efekat koji E2 tretman ostvaruje na regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova. Takođe, izučavana je uloga NFκB, ERα, ERβ, Src, ERK1/2, AMPK, Akt, RhoA, ROCK1, ROCK2 i miR-221 u delovanju E2 na regulaciju enzima AOS i iNOS u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova.

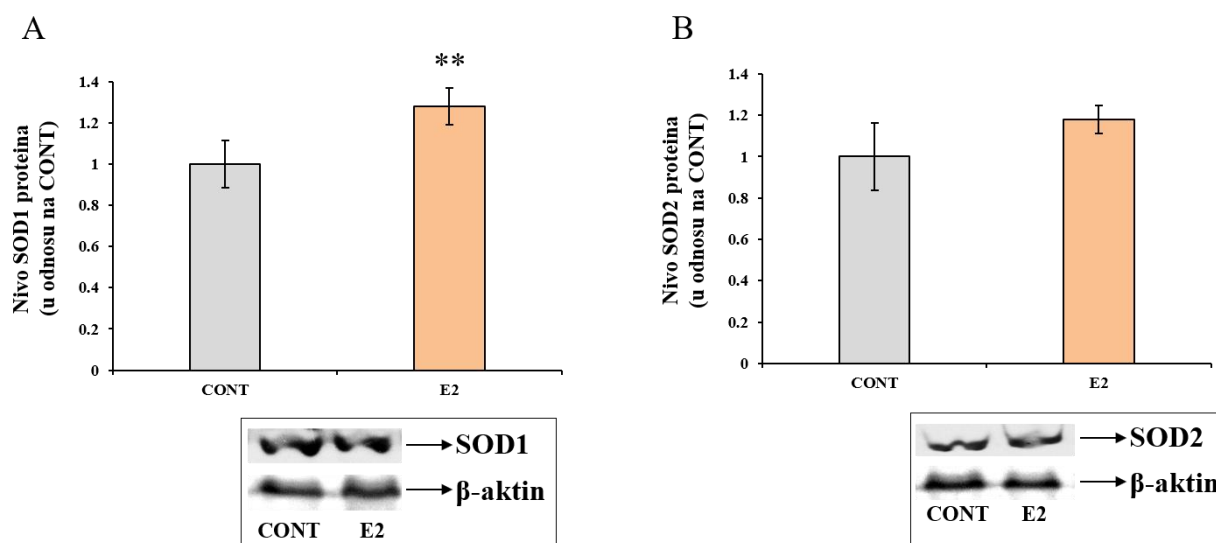
4.1 Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

4.1.1 Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativne zaštite i parametre oksidativnog stresa u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

U cilju izučavanja efekata E2 na komponente AOS zaštite u lizatu jetre normalno uhranjenih mužjaka pacova, određivan je nivo enzima AOS zaštite (SOD1, SOD2, GPx i CAT), kao i aktivnost CAT. Takođe, kako bi se izučio efekat E2 na nivo OS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova, analizirani su markeri peroksidacije lipida (nivo MDA) i oksidativne modifikacije proteina (PCC) u kontrolnoj i E2 tretiranoj grupi normalno uhranjenih mužjaka pacova.

4.1.1.1 Efekat estradiola na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

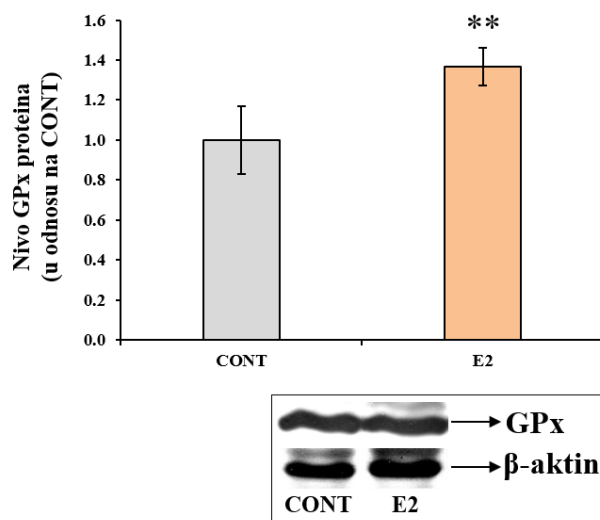
Nivo SOD1 i SOD2 proteina u lizatu jetre normalno uhranjenih mužjaka pacova je analiziran Western blot metodom. Dobijeni rezultati, prikazani na **Slici 7A**, pokazuju da tretman E2 normalno uhranjenih mužjaka pacova značajno povećava ($p < 0,01$) nivo SOD1 proteina u jetri u odnosu na kontrolu. Rezultati prikazani na **Slici 7B**, pokazuju da tretman E2 normalno uhranjenih pacova ne dovodi do značajnog povećanja nivoa SOD2 proteina u jetri u poređenju sa kontrolom.



Slika 7. Efekat E2 na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.
A. Rezultati određivanja nivoa SOD1 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo SOD1 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), $**p < 0,01$. **B.** Rezultati određivanja nivoa SOD2 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo SOD2 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3$). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.1.2 Efekat estradiola na nivo GPx proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Na **Slici 8.** su prikazani rezultati efekata E2 tretmana na nivo GPx proteina u lizatu jetre normalno uhranjenih pacova dobijeni metodom Western blota. Tretman E2 normalno uhranjenih mužjaka pacova dovodi do značajnog povećanja ($p < 0,01$) nivoa GPx proteina u jetri odnosu na kontrolu.

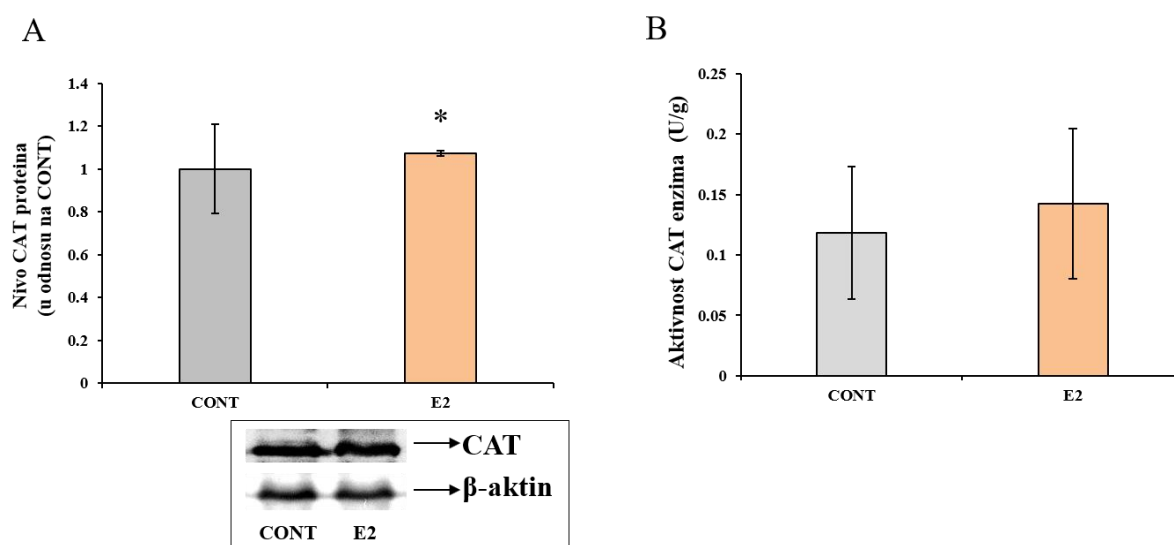


Slika 8. Efekat E2 na nivo GPx proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

Rezultati određivanja nivoa GPx proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo GPx proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), $**p < 0,01$. Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.1.3 Promene nivoa proteina i aktivnosti enzima CAT pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati određivanja nivoa CAT proteina (**Slika 9A**) Western blot metodom pokazuju da je E2 tretman normalno uhranjenih mužjaka pacova doveo do značajnog povećanja nivoa CAT proteina u jetri ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni određivanjem aktivnosti CAT enzima (**Slika 9B**) u lizatu jetre mužjaka pacova pokazuju da tretman E2 ne dovodi do značajnih promena u aktivnosti CAT enzima u poređenju sa kontrolom.

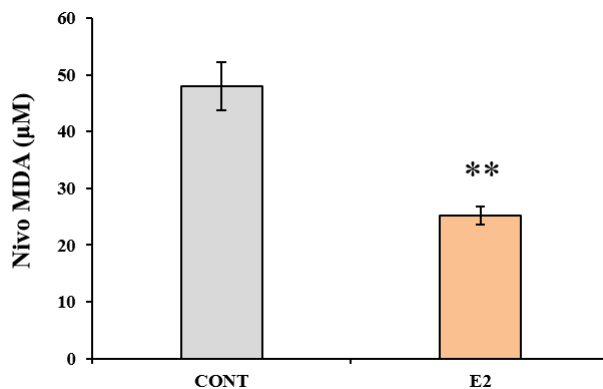


Slika 9. Efekat E2 na nivo proteina i aktivnost enzima CAT u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa CAT proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo CAT proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3-4$), $*p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. **B.** Rezultati određivanja aktivnosti CAT enzima su izraženi u U/g. Aktivnost CAT enzima je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3-6$). CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

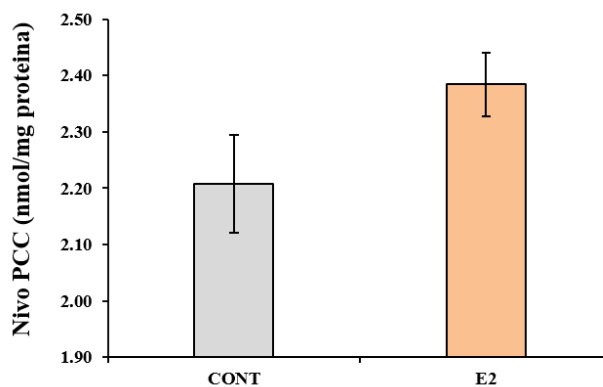
4.1.1.4 Efekat estradiola na nivo MDA i PCC u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni određivanjem nivoa MDA spektrofotometrijskom metodom (**Slika 10**) pokazuju da E2 tretman normalno uhranjenih pacova značajno smanjuje ($p < 0,01$) nivo MDA u jetri u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 10. Efekat E2 na nivo MDA u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. Rezultati merenja nivoa MDA su izraženi u μM . Nivo MDA je predstavljen kao srednja vrednost $\pm\text{SEM}$ ($n=4-6$), ** $p < 0,01$. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

Analiza rezultata dobijenih korišćenjem PCC eseja (**Slika 11**) pokazuje da tretman E2 normalno uhranjenih pacova ne utiče značajno na nivo PCC u jetri, u odnosu na kontrolu.



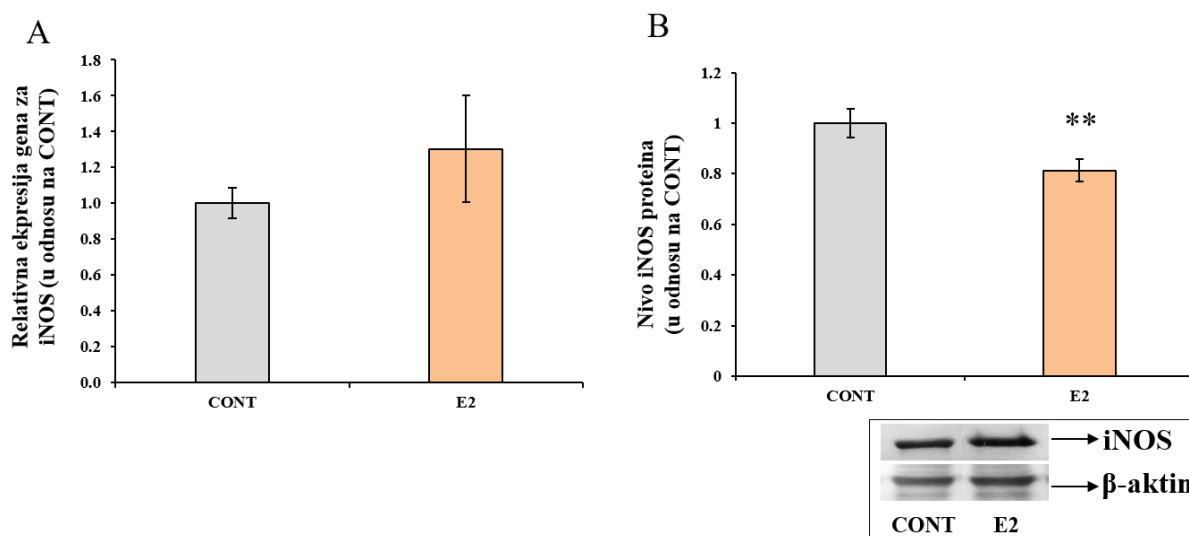
Slika 11. Efekat E2 na nivo PCC u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. Rezultati merenja nivoa PCC su izraženi u nmol/mg proteina . Nivo PCC je predstavljen kao srednja vrednost $\pm\text{SEM}$ ($n=4-6$). CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.2 Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova tretiranih estradiolom

U cilju izučavanja efekata E2 tretmana na ekspresiju iNOS proteina u jetri kod normalno uhranjenih mužjaka pacova, merena je relativna ekspresija gena za iNOS, kao i nivo proteina. Takođe, kao indirektni pokazatelj aktivnosti NOS je određivana koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u lizatu jetre E2 tretiranih i kontrolnih, normalno uhranjenih mužjaka pacova.

4.1.2.1 Efekat estradiola na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni primenom qRT-PCR metode pokazuju da E2 tretman ne menja značajno relativnu ekspresiju gena za iNOS u jetri normalno uhranjenih pacova u odnosu na kontrolu (**Slika 12A**). Rezultati dobijeni Western blot metodom pokazuju da E2 tretman značajno smanjuje ($p < 0,01$) nivo iNOS proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova, u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 12B**).

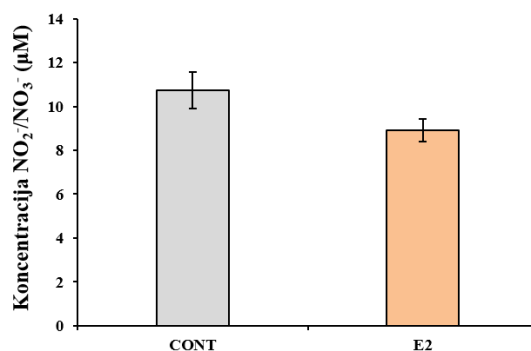


Slika 12. Efekat E2 na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa iRNK za iNOS su izraženi u odnosu na CONT. Nivo iRNK za iNOS je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5-6$). **B.** Rezultati određivanja nivoa iNOS proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo iNOS proteina predstavljen je kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$), $**p < 0,01$. Umetak – reprezentivni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.2.2 Efekat estradiola na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u lizatu jetre normalno uhranjenih mužjaka pacova

Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, krajnjih produkata NO, u lizatu jetre normalno uhranjenih mužjaka pacova, određivana je korišćenjem $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ eseja. Na **Slici 13.** su prikazani rezultati koji pokazuju da tretman E2 normalno uhranjenih pacova ne dovodi do značajnih promena u koncentraciji $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u jetri u poređenju sa kontrolom.



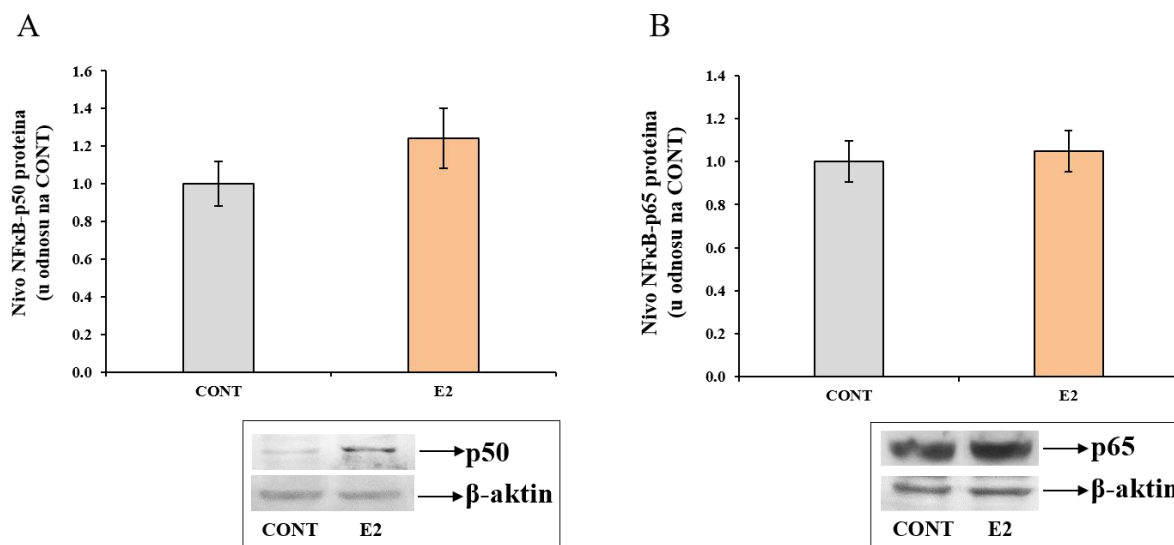
Slika 13. Efekat E2 na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. Rezultati određivanja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ su izraženi u μM . Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ je predstavljena kao srednja vrednost $\pm\text{SEM}$ ($n=4$). CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3 Efekat estradiola na signalne molekule uključene u regulaciju enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Polazeći od podataka iz literature koji ukazuju na značajnu ulogu signalnih molekula u regulaciji enzima AOS zaštite i iNOS [265, 336, 348-352], analizirani su efekti E2 na nivo p50 i p65 subjedinica NF κ B, receptora ER α i ER β , kinaze Src, asocijaciju ER α i Src, kinaza RhoA, ROCK1, ROCK2, aktivnost Rho proteina, aktivaciju fosforilacijom kinaza ERK1/2, AMPK α_1 i Akt, i ekspresiju regulatorne mikro RNK, miR-221 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

4.1.3.1 Efekat estradiola na nivo subjedinica p50 i p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati Western blot analize prikazani na **Slici 14.** pokazuju da E2 tretman ne dovodi do značajnih promena u nivou NFκB-p50, kao ni u nivou NFκB-p65 proteina u jetri normalno uhranjenih pacova, u poređenju sa kontrolom.

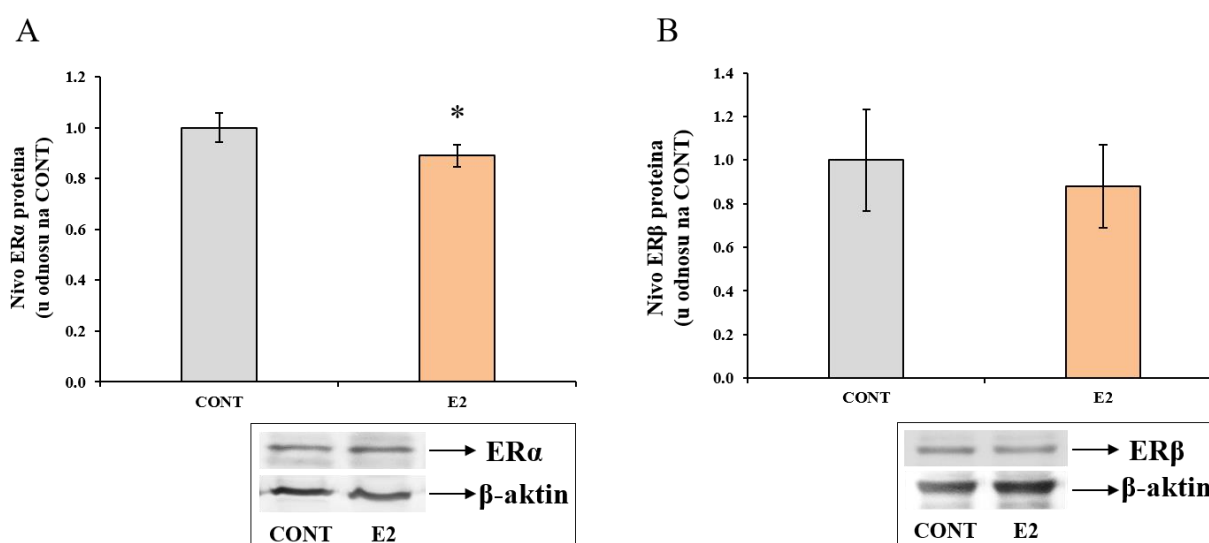


Slika 14. Efekat E2 na nivo p50 i p65 subjedinica transkripcionog faktora NFκB u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

A. Rezultati određivanja nivoa NFκB-p50 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo NFκB-p50 proteina je predstavljen kao srednja vrednost ± SEM (n=6). **B.** Rezultati određivanja nivoa NFκB-p65 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo NFκB-p65 proteina je predstavljen kao srednja vrednost ± SEM (n=5). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.2 Efekat estradiola na nivo ER α i ER β proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni Western blot metodom, prikazani na **Slici 15**, pokazuju da E2 tretman značajno smanjuje ($p < 0,05$) nivo ER α proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova (**Slika 15A**) u odnosu na kontrolu. Nivo proteina ER β u jetri normalno uhranjenih pacova (**Slika 15B**) nije značajno promenjen nakon E2 tretmana u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

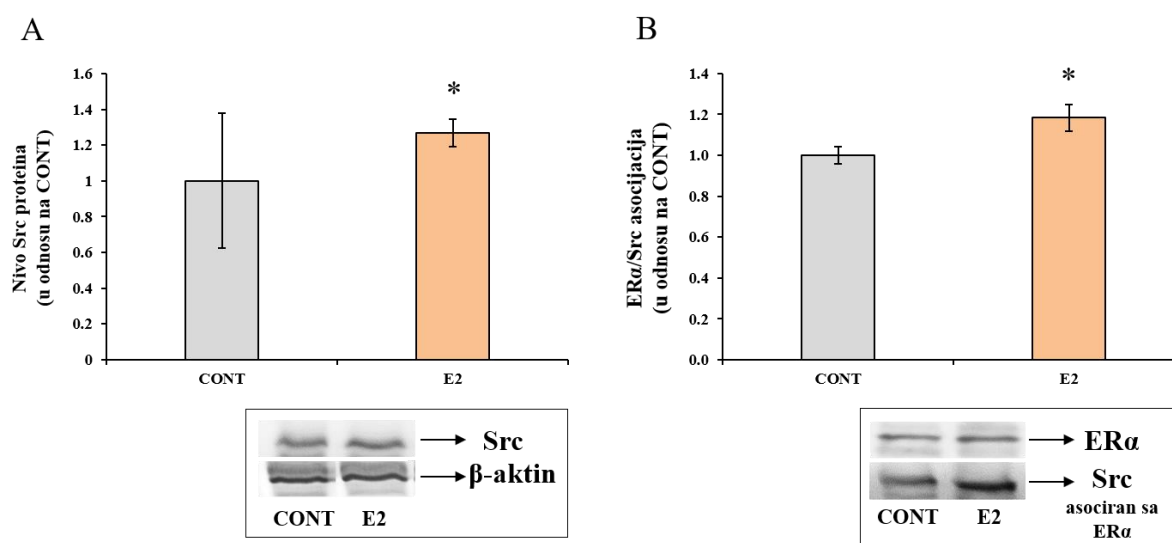


Slika 15. Efekat E2 na nivo ER α i ER β u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa ER α proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ER α proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5-6$), $*p < 0,05$. **B.** Rezultati određivanja nivoa ER β proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ER β proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.3 Efekat estradiola na nivo proteina Src i asocijaciju ER α sa Src kinazom u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni analizom nivoa Src proteina (**Slika 16A**) pokazuju da tretman E2 dovodi do značajnog povećanja ($p < 0,05$) nivoa Src proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova u poređenju sa kontrolom. Na **Slici 16B**, su prikazani rezultati dobijeni metodom koimunoprecipitacije, koji pokazuju da E2 tretman značajno povećava ($p < 0,05$) nivo asocijacije ER α receptora i Src kinaze u jetri normalno uhranjenih pacova u poređenju sa kontrolnom grupom pacova.

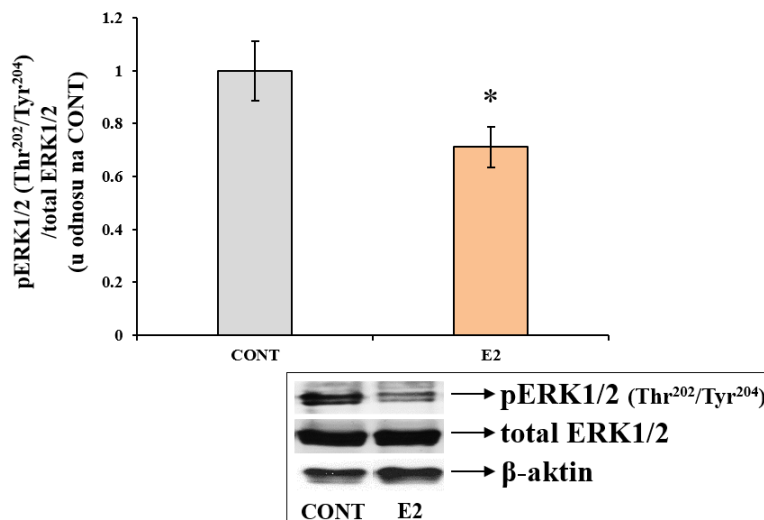


Slika 16. Efekat E2 na nivo proteina Src i asocijaciju ER α sa Src kinazom u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa Src proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo Src proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), $*p < 0,05$. **B.** Rezultati određivanja nivoa asocijacije ER α proteina i Src kinaze su izraženi u odnosu na CONT. Nivo asocijacije ER α sa Src je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), $*p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.4 Efekat estradiola na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

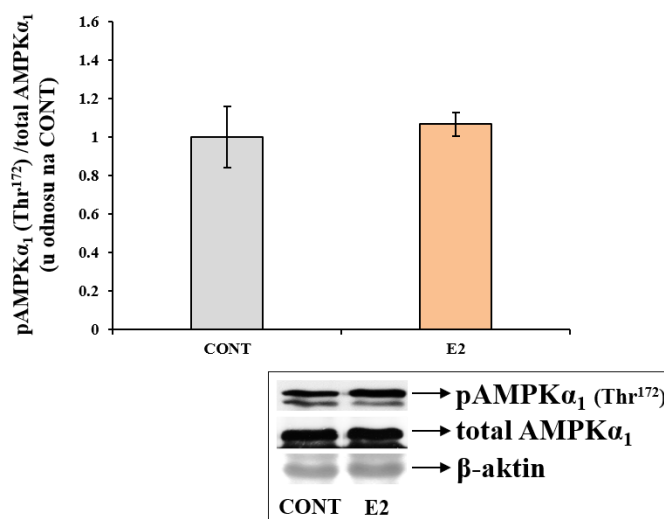
Rezultati prikazani na **Slici 17**, pokazuju da E2 tretman kod normalno uhranjenih mužjaka pacova značajno smanjuje (* $p < 0,05$) nivo fosforilacije ERK1/2 na aminokiselinama Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ u jetri, u odnosu na kontrolu.



Slika 17. Efekat E2 na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova
 Rezultati određivanja nivoa fosforilacije ERK1/2 proteina na aminokiselinama Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos nivoa fosforilisane i ukupne forme ERK1/2 je predstavljen kao srednja vrednost ± SEM (n=6-7), * $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.5 Efekat estradiola na nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati određivanja nivoa fosforilacije AMPK α_1 metodom Western blot, pokazuju da nivo fosforilacije AMPK α_1 nije značajno promenjen u jetri normalno uhranjenih pacova nakon E2 tretmana u poređenju sa CONT grupom pacova (Slika 18).

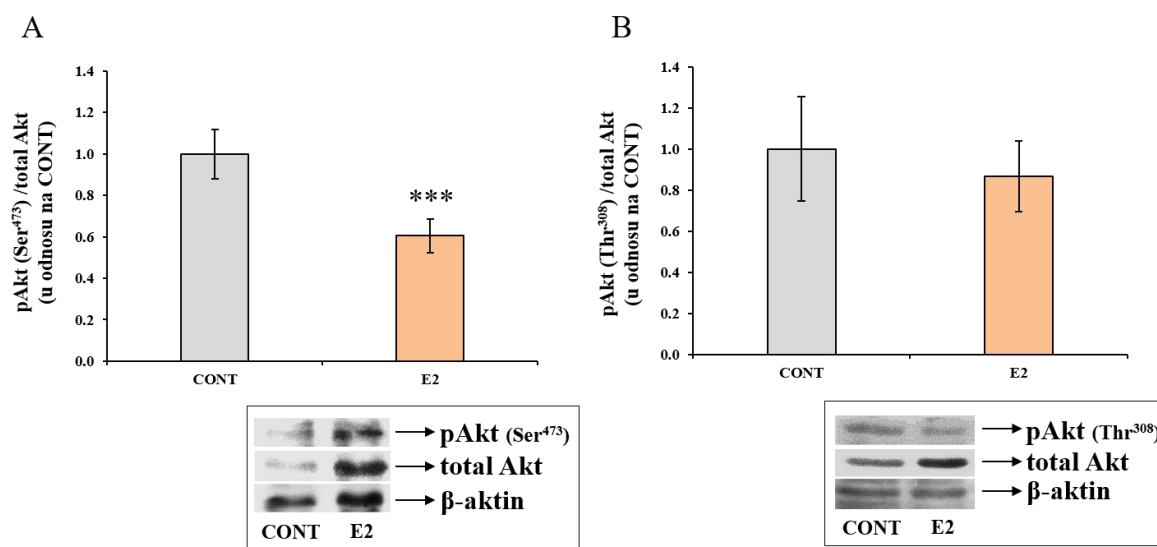


Slika 18. Efekat E2 na nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati određivanja nivoa fosforilacije AMPK α_1 na aminokiselini Thr¹⁷² su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme AMPK α_1 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.6 Efekat estradiola nivo fosforilacije Akt u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Rezultati Western blot analize pokazuju da E2 tretman normalno uhranjenih pacova dovodi do značajnog smanjenja ($p < 0,001$) nivoa fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ u jetri u odnosu na kontrolne životinje (**Slika 19A**), dok se nivo fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u jetri normalno uhranjenih pacova (**Slika 19B**) ne menja značajno nakon E2 tretmana u poređenju sa kontrolom.

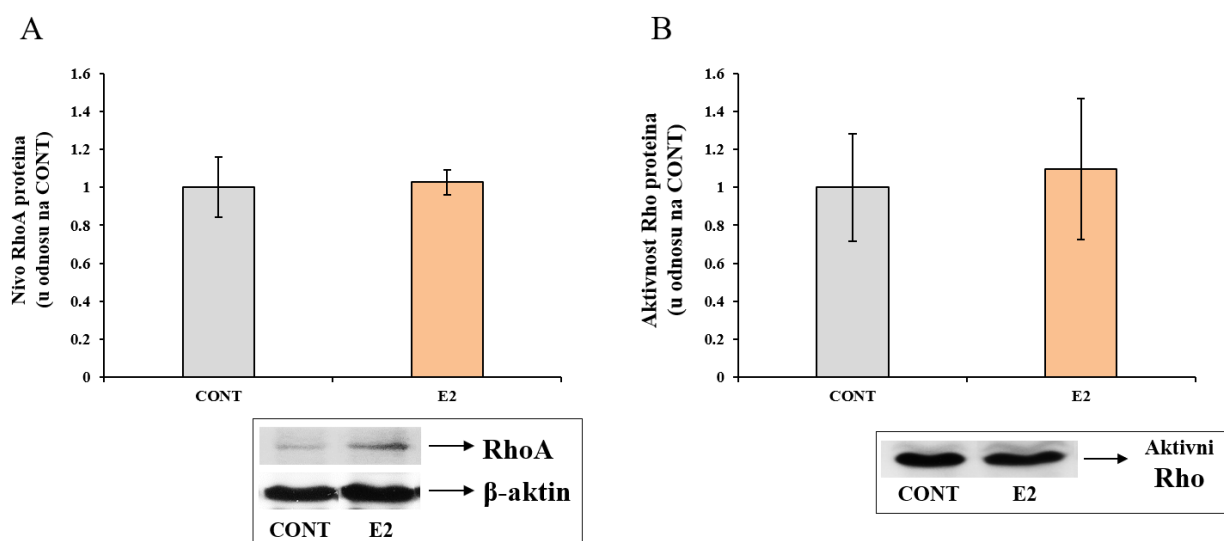


Slika 19. Efekat E2 na nivo fosforilacije Akt u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

A. Rezultati određivanja nivoa fosforilacije Akt enzima na aminokiselini Ser⁴⁷³ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme Akt predstavljen je kao srednja vrednost \pm SEM ($n=7$), *** $p < 0,001$. **B.** Rezultati određivanja nivoa fosforilacije Akt enzima na aminokiselini Thr³⁰⁸ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme Akt je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.7 Promene u nivou RhoA proteina i aktivnosti ukupnih Rho proteina pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Tretman E2 normalno uhranjenih mužjaka pacova (**Slika 20A**) ne dovodi do značajnih promena u nivou RhoA proteina u jetri, u odnosu na kontrolu. Rezultati dobijeni određivanjem aktivnosti ukupnih Rho proteina pokazuju da E2 tretman normalno uhranjenih pacova ne dovodi ni do značajnih promena u Rho aktivnosti (**Slika 20B**) u jetri, u poređenju sa kontrolom.

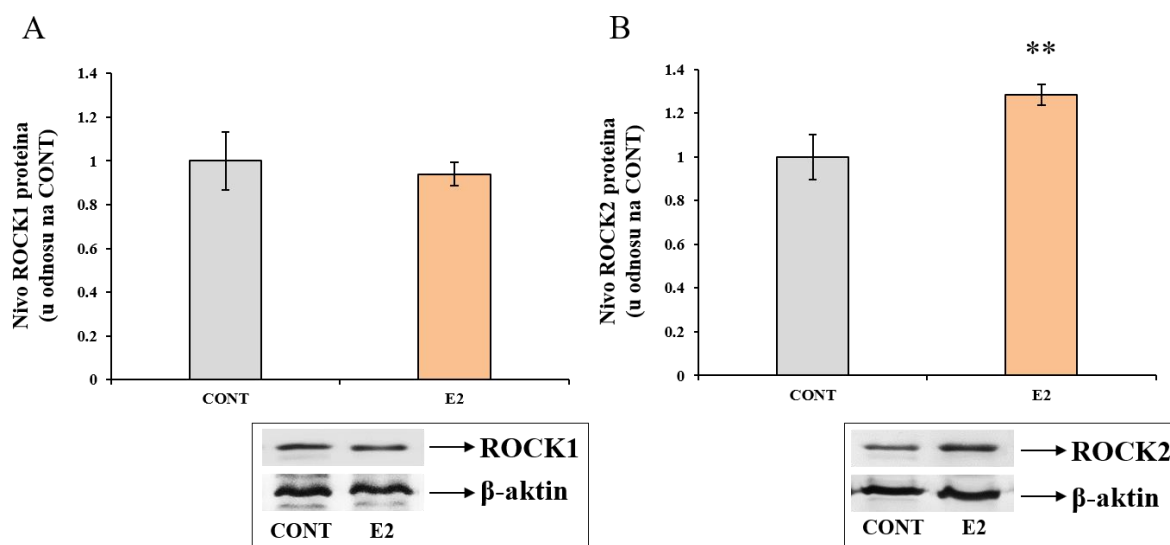


Slika 20. *Efekat E2 na nivo proteina RhoA i aktivnost ukupnih Rho proteina u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova.*

A. Rezultati određivanja nivoa RhoA proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo RhoA proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$). **B.** Rezultati dobijeni merenjem aktivnosti ukupnih Rho proteina u jetri su izraženi u odnosu na CONT. Aktivnost ukupnih Rho proteina je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$). Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.8 Efekat estradiola na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

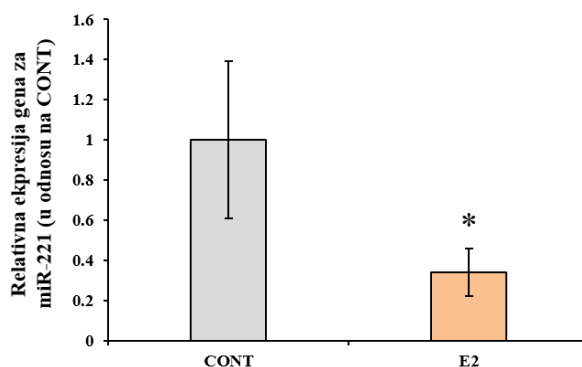
Rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina ROCK1 i ROCK2, pokazuju da se nivo ROCK1 proteina u jetri (**Slika 21A**) kod normalno uhranjenih mužjaka pacova nakon E2 tretmana, ne menja značajno u poređenju sa vrednostima dobijenim u CONT grupi pacova. Međutim, E2 tretman značajno povećava ($p < 0,01$) nivo ROCK2 proteina (**Slika 21B**) u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova u odnosu na kontrolu.



Slika 21. Efekat E2 na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. **A.** Rezultati određivanja nivoa ROCK1 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ROCK1 proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$). **B.** Rezultati određivanja nivoa ROCK2 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ROCK2 proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5$), $**p < 0,01$. Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.

4.1.3.9 Promene u ekspresiji miR-221 pod delovanjem estradiola u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova

Primenom qRT-PCR metode je određivana relativna ekspresija posttranskripcionog regulatora miR-221, za koji je pokazano da ima značajnu ulogu u patogenezi dijabetesa i nastanku IR u jetri [353, 354]. Rezultati pokazuju da tretman E2 normalno uhranjenih pacova značajno smanjuje ($p < 0,05$) relativnu ekspresiju miR-221 u jetri (**Slika 22**).



Slika 22. *Efekat E2 na ekspresiju miR-221 u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. Rezultati određivanja nivoa ekspresije miR-221 u jetri su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ekspresije miR-221 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5-7$), $*p < 0,05$. CONT – Kontrola; E2 – Kontrola+Estradiol.*

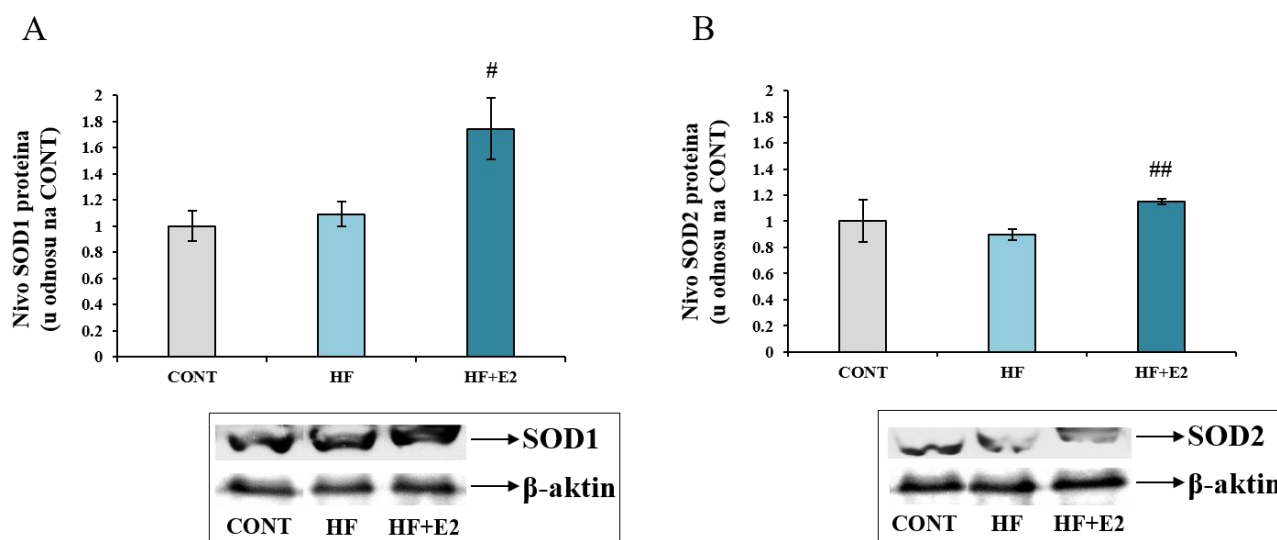
4.2 Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova

4.2.1 Efekat estradiola na nivo enzima antioksidativne zaštite i parametre oksidativnog stresa u jetri gojaznih mužjaka pacova

Kako bi se procenio efekat E2 tretmana na komponente AOS u jetri kod gojaznih mužjaka pacova, u daljem radu u okviru ove doktorske disertacije je određivan nivo enzima AOS zaštite (SOD1, SOD2, GPx i CAT), kao i aktivnost CAT u grupi gojaznih i u grupi E2 tretiranih gojaznih pacova. Osim toga, u cilju određivanja efekata E2 na nivo OS u jetri gojaznih pacova, analizirani su markeri peroksidacije lipida (nivo MDA) i oksidativne modifikacije proteina (PCC).

4.2.1.1 Efekat estradiola na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni Western blot metodom, prikazani na **Slici 23**, pokazuju da primena HF ishrane ne dovodi do značajne promene u nivou SOD1 (**Slika 23A**) i SOD2 (**Slika 23B**) enzima u jetri mužjaka pacova, u poređenju sa nivoima ovih enzima izmerenim kod kontrolnih životinja na standardnoj ishrani. Međutim, kod gojaznih mužjaka pacova, E2 tretman značajno povećava nivo SOD1 ($p < 0,05$) proteina (**Slika 23A**), kao i nivo SOD2 ($p < 0,01$) proteina (**Slika 23B**) u jetri u odnosu na netretirane gojazne pacove.

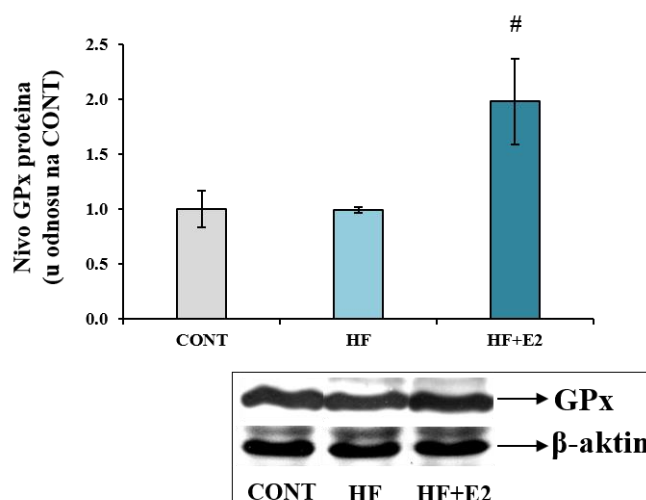


Slika 23. Efekat E2 na nivo SOD1 i SOD2 proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa SOD1 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo SOD1 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), [#] $p < 0,05$. **B.** Rezultati određivanja nivoa SOD2 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo SOD2 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3$), ^{##} $p < 0,01$. Umetak – reprezentivni Western blot. [#] - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.1.2 Efekat estradiola na nivo GPx proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova

Na **Slici 24.** su prikazani rezultati dobijeni za nivo GPx proteina u lizatu jetre gojaznih pacova, dobijeni metodom Western blota. Dobijeni rezultati pokazuju da primena HF ishrane ne menja značajno nivo GPx enzima u jetri gojaznih mužjaka pacova u odnosu na kontrolu. Tretman E2 gojaznih mužjaka pacova dovodi do značajnog povećanja ($p<0,05$) nivoa GPx proteina u jetri u odnosu na netretirane gojazne pacove.

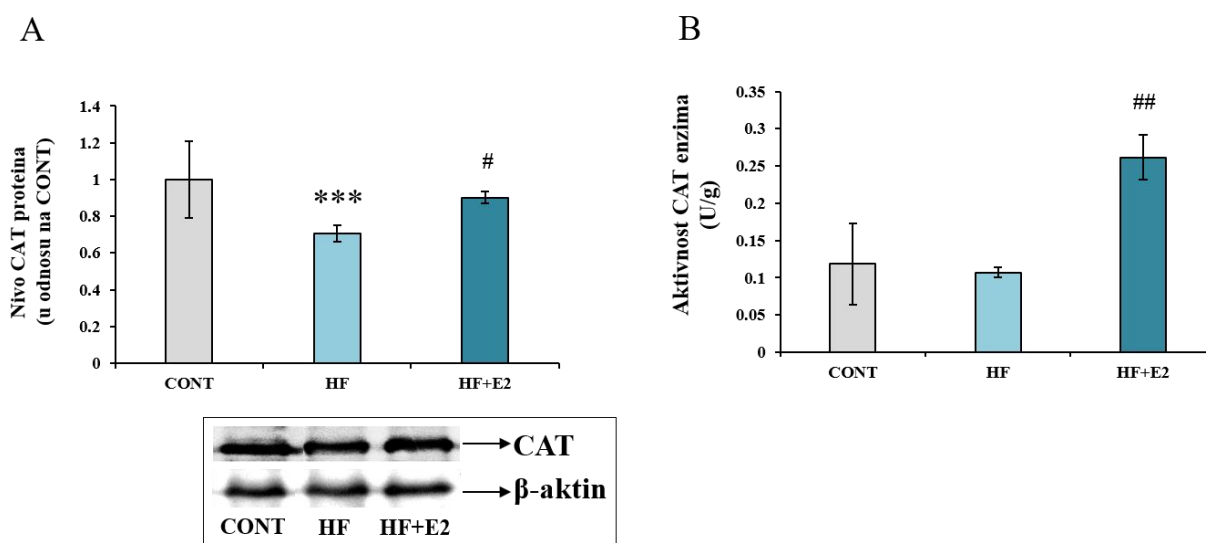


Slika 24. Efekat E2 na nivo GPx proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova.

Rezultati određivanja nivoa GPx proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo GPx proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), # $p<0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. # - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.1.3 Promene nivoa proteina i aktivnosti enzima CAT pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni za nivo CAT proteina (**Slika 25A**) Western blot metodom pokazuju značajno smanjenje ($p<0,001$) nivoa CAT u grupi HF pacova u odnosu na CONT grupu. Međutim, rezultati dobijeni određivanjem aktivnosti CAT proteina (**Slika 25B**) pokazuju da HF ishrana ne dovodi do značajnih promena u aktivnosti CAT enzima u jetri pacova iz HF grupe u odnosu na pacove iz CONT grupe. Rezultati dalje pokazuju da je E2 tretman doveo do značajnog povećanja nivoa CAT proteina ($p<0,05$) kao i aktivnosti CAT proteina ($p<0,01$) u jetri gojaznih mužjaka pacova u odnosu na netretirane gojazne mužjake pacova.



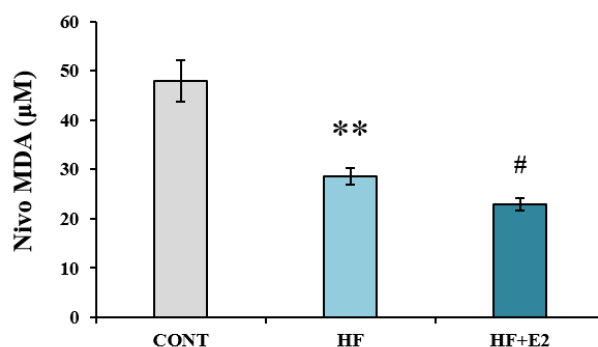
Slika 25. Efekat E2 na nivo proteina i aktivnost enzima CAT u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa CAT proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo CAT proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3-4$), *** $p<0,001$, # $p<0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. **B.** Rezultati određivanja aktivnosti CAT enzima u jetri su izraženi u U/g. Aktivnost CAT enzima je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3-6$), ## $p<0,01$.

* - u odnosu na CONT; # - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.1.4 Efekat estradiola na nivo MDA i PCC u jetri gojaznih mužjaka pacova

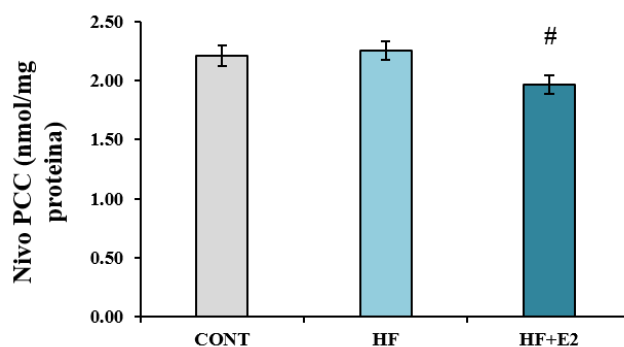
Rezultati spektrofotometrijskog merenja nivoa MDA (**Slika 26**) pokazuju da se nivo MDA značajno smanjuje ($p<0,01$) kod životinja koje su bile na HF ishrani u odnosu na jedinke iz CONT grupe. Tretman E2 gojaznih pacova značajno smanjuje ($p<0,05$) nivo MDA u jetri, u odnosu na netretirane gojazne pacove.



Slika 26. Efekat E2 na nivo MDA u jetri gojaznih mužjaka pacova.

Rezultati merenja nivoa MDA u jetri su izraženi u μM . Nivo MDA je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), $**p<0,01$; $\#p<0,05$. * - u odnosu na CONT; # - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

Analiza rezultata dobijenih korišćenjem PCC eseja (**Slika 27**) pokazuje da HF ishrana ne menja značajno nivo PCC u jetri gojaznih pacova u odnosu na kontrolne životinje na standardnoj ishrani. Tretman E2 kod gojaznih pacova (HF+E2 grupa) dovodi do značajnog smanjenja ($p<0,05$) nivoa PCC u odnosu na netretirane gojazne pacove.



Slika 27. Efekat E2 na nivo PCC u jetri gojaznih mužjaka pacova.

Rezultati merenja nivoa PCC u jetri gojaznih mužjaka pacova su izraženi u nmol/mg proteina. Nivo PCC je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), $\#p<0,05$. # - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

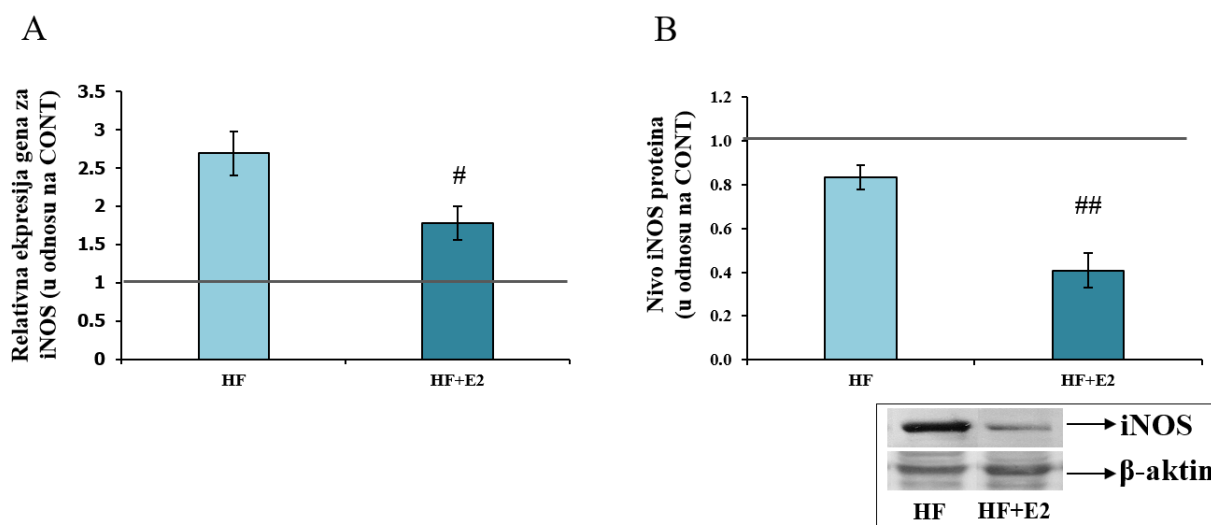
4.2.2 Regulacija ekspresije i aktivnosti iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova tretiranih estradiolom

Da bi se ustanovio efekat E2 tretmana na ekspresiju iNOS, u jetri kod gojaznih mužjaka pacova, merena je relativna ekspresija gena za iNOS i nivo iNOS proteina, kao i koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

4.2.2.1 Efekat estradiola na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati prethodnih istraživanja naše grupe pokazuju da je relativna ekspresija gena za iNOS povećana, dok je nivo iNOS proteina smanjen u jetri gojaznih mužjaka pacova izlaganih HF ishrani, u odnosu na kontrolne životinje na standardnoj ishrani [355].

Rezultati dobijeni primenom qRT-PCR metode u ovoj disertaciji pokazuju da E2 tretman gojaznih pacova značajno smanjuje ($p < 0,05$) ekspresiju gena za iNOS u jetri, u poređenju sa E2 netretiranim gojaznim pacovima (Slika 28A). Osim toga, i rezultati Western blot metode pokazuju da E2 tretman gojaznih mužjaka pacova značajno smanjuje ($p < 0,01$) nivo iNOS proteina u jetri (Slika 28B), u poređenju sa netretiranim gojaznim pacovima.

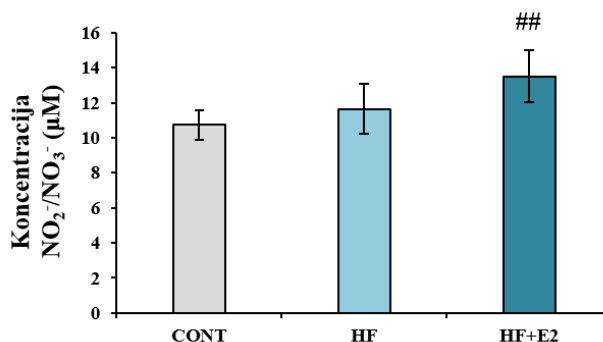


Slika 28. Efekat E2 na ekspresiju iNOS gena i proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa iRNK za iNOS su izraženi u odnosu na CONT. Nivo iRNK za iNOS je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-5$), # $p < 0,05$. **B.** Rezultati određivanja nivoa iNOS proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo iNOS proteina predstavljen je kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$), ## $p < 0,01$. Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.2.2 Efekat estradiola na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u lizatu jetre gojaznih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni određivanjem koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u lizatu jetre gojaznih mužjaka pacova (Slika 29) pokazuju da primena HF ishrane ne utiče značajno na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u jetri. Tretman E2 gojaznih pacova značajno povećava ($p < 0,01$) koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u poređenju sa vrednostima izmerenim u jetri HF grupe životinja.



Slika 29. Efekat E2 na koncentraciju $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u jetri gojaznih mužjaka pacova.

Rezultati određivanja koncentracije $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ u jetri su izraženi u μM . Koncentracija $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), ## $p < 0,01$. # - u odnosu na HF.

CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

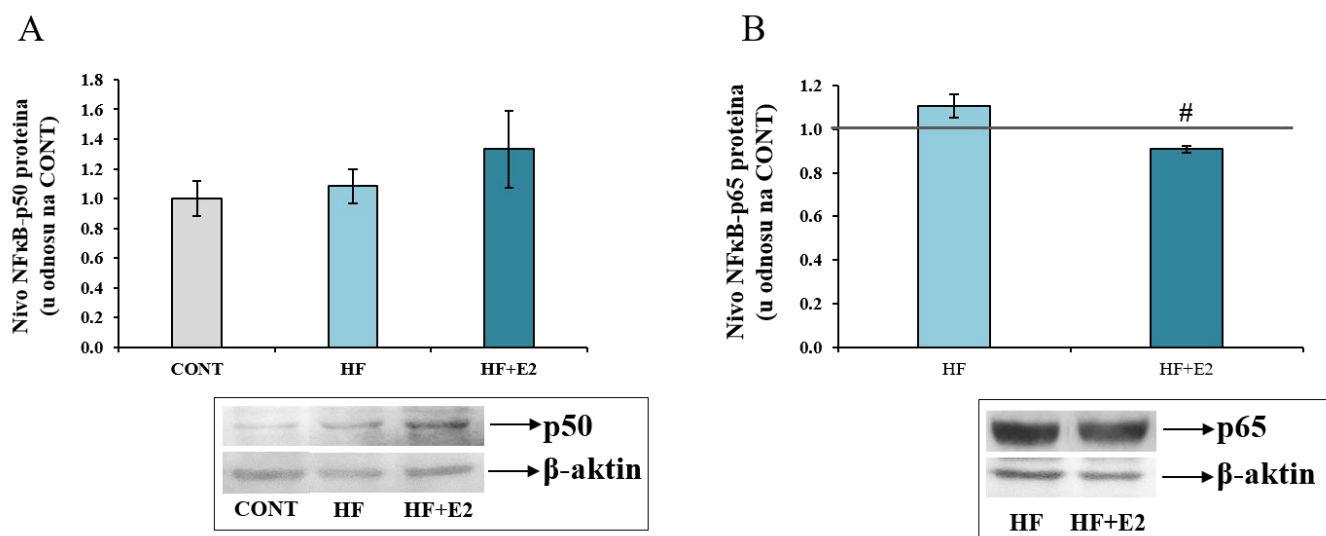
4.2.3 Efekat estradiola na signalne molekule uključene u regulaciju enzima antioksidativnog sistema zaštite i iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova

U cilju izučavanja efekata E2 tretmana na signalne molekule uključene u regulaciju aktivnosti enzima AOS zaštite i iNOS u jetri gojaznih mužjaka pacova, u narednim eksperimentima su izučavani efekti E2 na nivo p50 i p65 subjedinica $\text{NF}\kappa\text{B}$, receptora $\text{ER}\alpha$ i $\text{ER}\beta$, kinaze Src, asocijaciju $\text{ER}\alpha$ i Src, kinaza RhoA, ROCK1, ROCK2, aktivnost Rho proteina, aktivaciju fosforilacijom kinaza ERK1/2, $\text{AMPK}\alpha_1$ i Akt, i ekspresiju miR-221 u jetri gojaznih mužjaka pacova.

4.2.3.1 Efekat estradiola na nivo subjedinica p50 i p65 transkripcionog faktora NFκB u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati Western blot analize prikazani na **Slici 30A**, pokazuju da HF ishrana, kao ni tretman E2 kod gojaznih pacova, ne dovode do promena u nivou NFκB-p50 proteina.

Prethodna istraživanja naše grupe pokazuju da se nivo p65 subjedinice NFκB ne menja u jetri gojaznih mužjaka pacova u poređenju sa kontrolama [356]. Rezultati ove disertacije pokazuju da E2 tretman gojaznih pacova (**Slika 30B**) dovodi do značajnog smanjenja ($p < 0,05$) nivoa NFκB-p65 proteina u jetri u odnosu na vrednosti izmerene kod netretiranih gojaznih pacova.

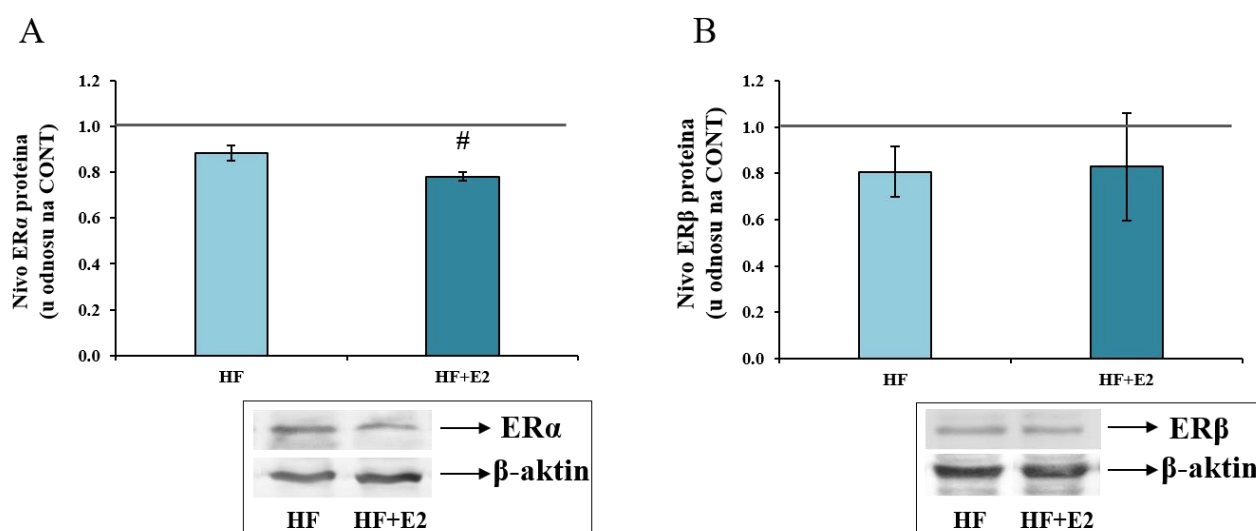


Slika 30. Efekat E2 na nivo p50 i p65 subjedinica transkripcionog faktora NFκB u jetri gojaznih mužjaka pacova

A. Rezultati određivanja nivoa NFκB-p50 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo NFκB-p50 proteina je predstavljen kao srednja vrednost ± SEM ($n=6$). **B.** Rezultati određivanja nivoa NFκB-p65 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo NFκB-p65 proteina je predstavljen kao srednja vrednost ± SEM ($n=3-5$), [#] $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.2 Efekat estradiola na nivo $ER\alpha$ i $ER\beta$ proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova

Ranije objavljeni rezultati istraživanja naše grupe pokazuju da HF ishrana smanjuje nivo $ER\alpha$ proteina, dok je nivo $ER\beta$ proteina nepromenjen u jetri gojaznih mužjaka pacova u poređenju sa kontrolama [357]. Rezultati dobijeni Western blot metodom u ovoj disertaciji, koji su prikazani na **Slici 31A**, pokazuju da E2 tretman gojaznih mužjaka pacova značajno smanjuje ($p < 0,05$) nivo $ER\alpha$ proteina u jetri, u odnosu na nivo ovog receptora kod gojaznih netretiranih pacova. Nivo proteina $ER\beta$ u jetri gojaznih pacova nakon tretmana E2 (**Slika 31B**) nije značajno promenjen u poređenju sa HF grupom pacova.

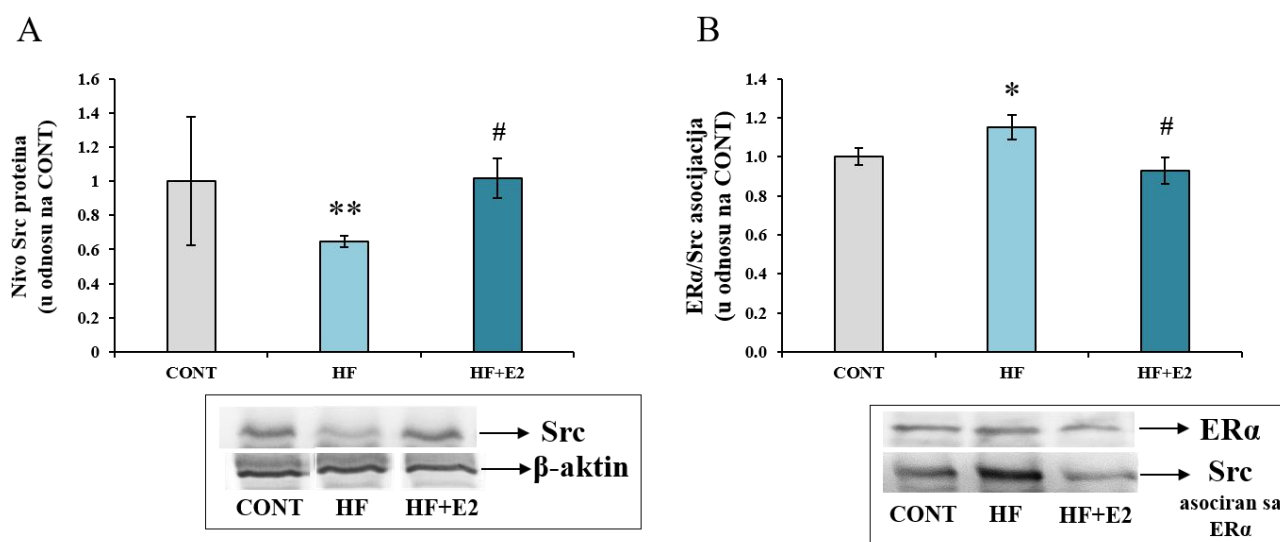


Slika 31. Efekat E2 na nivo $ER\alpha$ i $ER\beta$ u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa $ER\alpha$ proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo $ER\alpha$ proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3$), [#] $p < 0,05$. **B.** Rezultati određivanja nivoa $ER\beta$ proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo $ER\beta$ proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.3 Efekat estradiola na nivo proteina Src i asocijaciju ER α sa Src kinazom u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati dobijeni analizom nivoa Src proteina (**Slika 32A**) pokazuju da u HF grupi pacova dolazi do značajnog smanjenja ($p < 0,01$) nivoa Src proteina u jetri u odnosu na CONT grupu. Tretman E2 gojaznih mužjaka pacova dovodi do značajnog povećanja ($p < 0,05$) nivoa Src proteina u jetri u poređenju sa netretiranim gojaznim pacovima. Na **Slici 32B**, su prikazani rezultati dobijeni metodom koimunoprecipitacije, koji pokazuju da u jetri gojaznih pacova (HF grupa) dolazi do značajnog povećanja ($p < 0,05$) nivoa ER α /Src asocijacije u odnosu na CONT grupu pacova. Međutim, tretman E2 kod gojaznih pacova značajno smanjuje ($p < 0,05$) nivo ER α /Src asocijacije u jetri u odnosu na netretirane gojazne pacove.

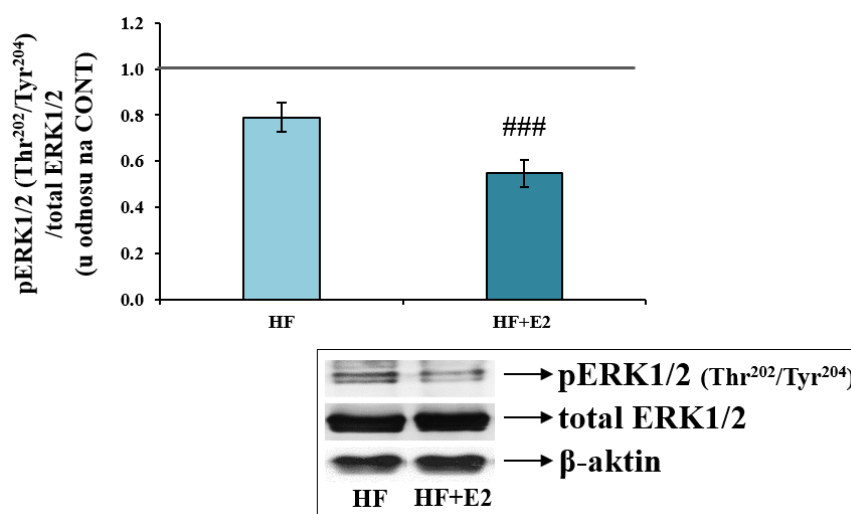


Slika 32. Efekat E2 na nivo proteina Src i asocijaciju ER α sa Src kinazom u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa Src proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo Src proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-6$), # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **B.** Rezultati određivanja nivoa asocijacije ER α proteina i Src kinaze su izraženi u odnosu na CONT. Nivo asocijacije ER α /Src je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), *# $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. * - u odnosu na CONT; # - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.4 Efekat estradiola na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri gojaznih mužjaka pacova

Prethodno objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da HF ishrana smanjuje nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri gojaznih mužjaka pacova u odnosu na kontrolu [357]. Rezultati ove doktorske disertacije, dobijeni Western blot metodom, pokazuju da E2 tretman gojaznih mužjaka pacova značajno smanjuje ($###p < 0,001$) nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri u poređenju sa vrednostima dobijenim kod netretiranih gojaznih pacova (**Slika 33**).

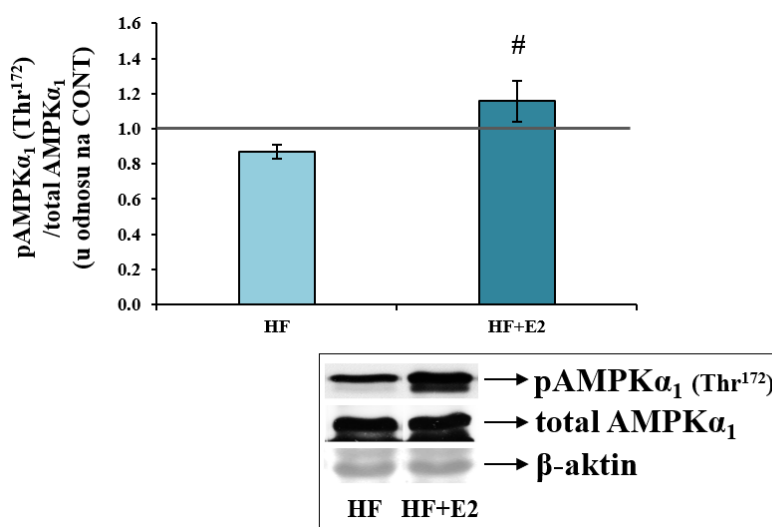


Slika 33. Efekat E2 na nivo fosforilacije ERK1/2 u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati određivanja nivoa fosforilacije ERK1/2 proteina na aminokiselinama Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos nivoa fosforilisane i ukupne forme ERK1/2 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6-7$), $###p < 0,001$. Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.5 Efekat estradiola na nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri gojaznih mužjaka pacova

Ranije objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da kod gojaznih mužjaka pacova dolazi do smanjenja u nivou aktivacije fosforilacijom AMPK α_1 u odnosu na kontrolu [357]. Rezultati određivanja nivoa fosforilacije AMPK α_1 u ovoj disertaciji pokazuju da je nivo fosforilacije AMPK α_1 značajno povećan ($p < 0,05$) u jetri HF+E2 grupe pacova u odnosu na HF grupu (**Slika 34**).

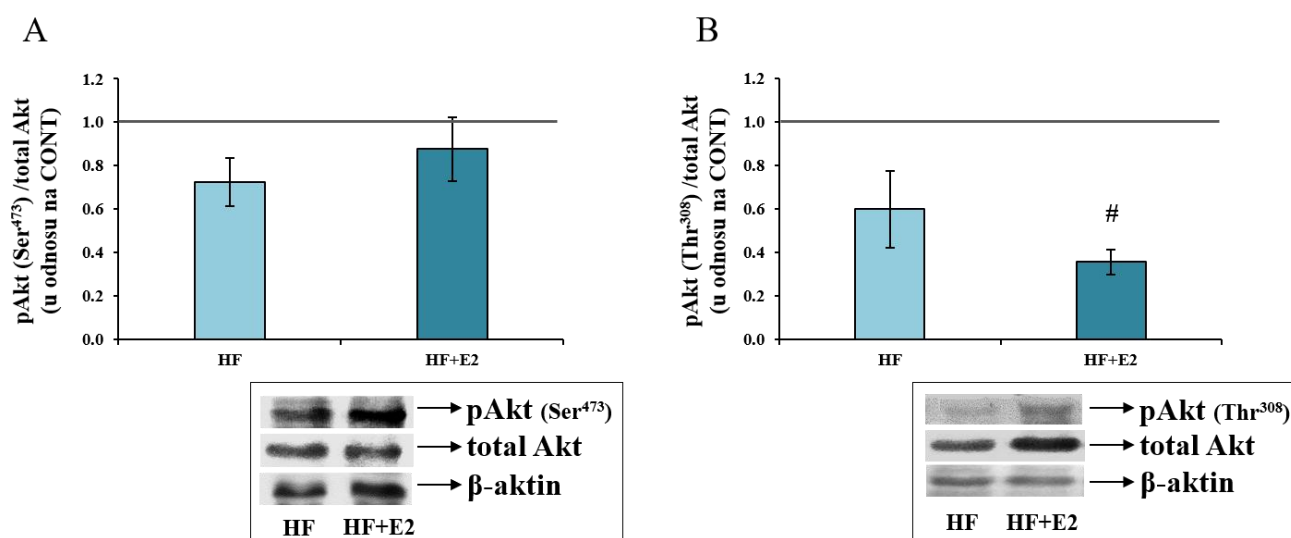


Slika 34. Efekat E2 na nivo fosforilacije α_1 subjedinice AMPK u jetri gojaznih mužjaka pacova

Rezultati određivanja nivoa fosforilacije AMPK α_1 na aminokiselini Thr¹⁷² su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme AMPK α_1 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=6$), [#] $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.6 Efekat estradiola nivo fosforilacije Akt u jetri gojaznih mužjaka pacova

Prethodni objavljeni rezultati su pokazali da HF ishrana smanjuje nivo fosforilacije Akt, kako na Ser⁴⁷³, tako i na Thr³⁰⁸, u jetri gojaznih mužjaka pacova [356]. Rezultati Western blot analize dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da E2 tretman gojaznih pacova (**Slika 35A**) ne dovodi do značajnih promena u nivou fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³, dok se nivo fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ u jetri gojaznih pacova (**Slika 35B**) značajno smanjuje ($p < 0,05$) nakon E2 tretmana u poređenju sa E2 netretiranim gojaznim pacovima.

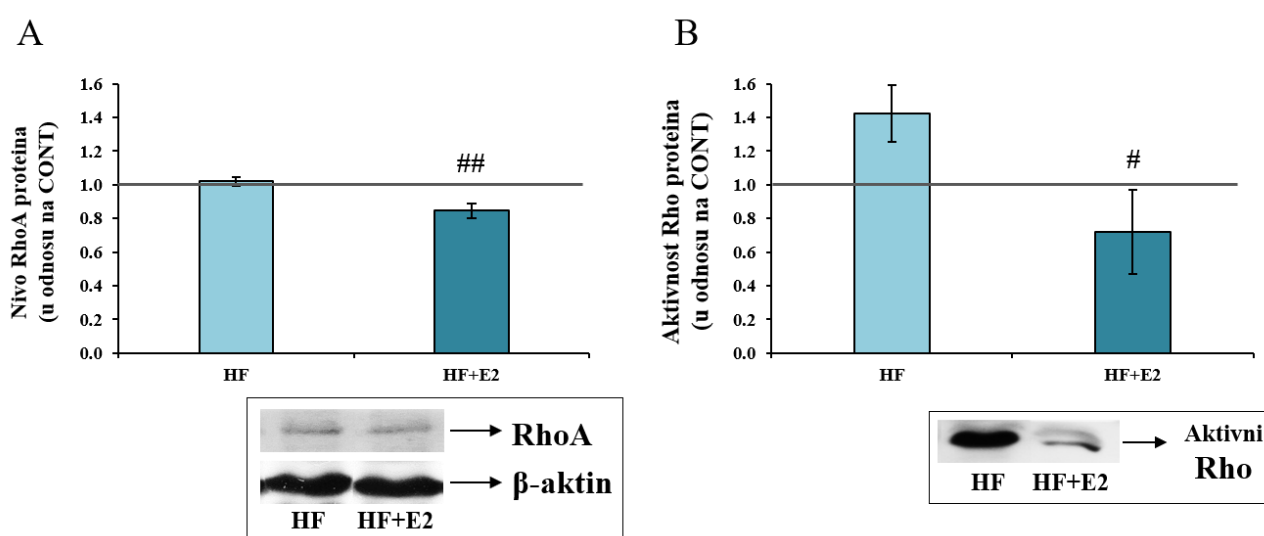


Slika 35. Efekat E2 na nivo fosforilacije Akt u jetri gojaznih mužjaka pacova

A. Rezultati određivanja nivoa fosforilacije Akt enzima na aminokiselini Ser⁴⁷³ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme Akt predstavljen je kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4-5$). **B.** Rezultati određivanja nivoa fosforilacije Akt enzima na aminokiselini Thr³⁰⁸ su izraženi u odnosu na CONT. Odnos fosforilisane i ukupne forme Akt je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3$), [#] $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.7 Promene u nivou RhoA proteina i aktivnosti ukupnih Rho proteina pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova

Ranije objavljeni rezultati naše grupe na mužjacima pacova pokazuju da u jetri gojaznih pacova nema promena u nivou RhoA proteina, ali da se povećava aktivnost ukupnih Rho proteina (sposobnost Rho proteina da se vežu za Rho-vezujući domen rotkina) u poređenju sa kontrolnim pacovima [357]. Rezultati prikazani na **Slici 36**, pokazuju da kod gojaznih pacova tretman E2 značajno smanjuje nivo RhoA ($p < 0,01$) proteina (**Slika 36A**), kao i aktivnost ukupnih Rho ($p < 0,05$) proteina (**Slika 36B**) u jetri, u poređenju sa vrednostima zabeleženim kod netretiranih gojaznih pacova.

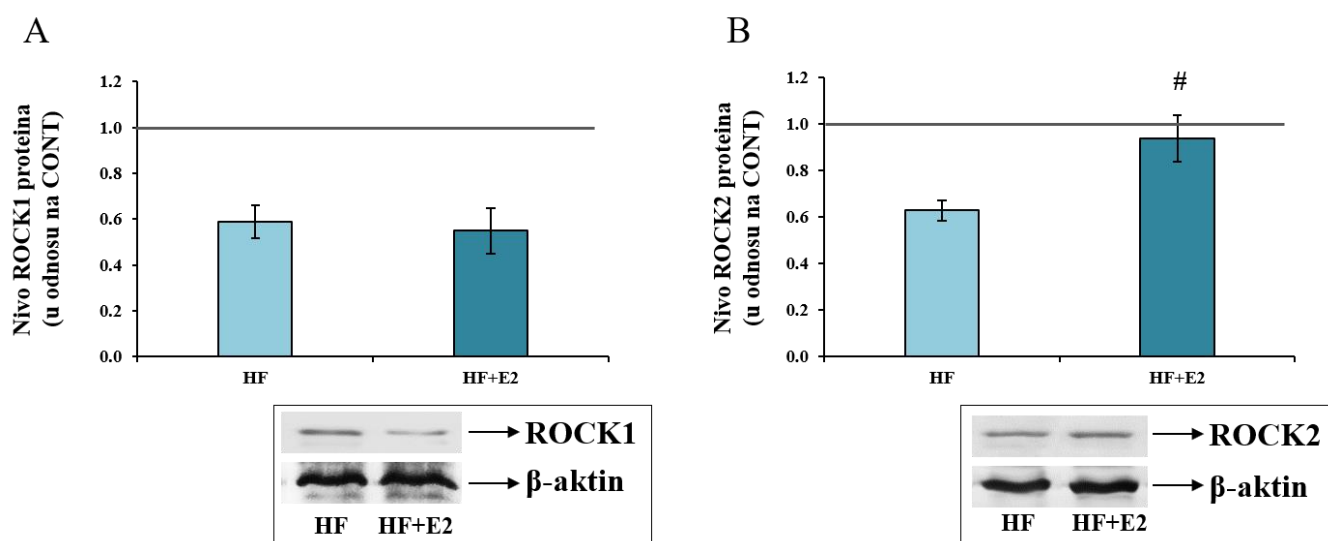


Slika 36. Efekat E2 na nivo proteina RhoA i aktivnost ukupnih Rho proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa RhoA proteina u jetri gojaznih mužjaka pacova su izraženi u odnosu na CONT. Nivo RhoA proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5$), ^{##} $p < 0,01$. Umetak – reprezentativni Western blot. **B.** Rezultati dobijeni merenjem aktivnosti ukupnih Rho proteina u jetri su izraženi u odnosu na CONT. Aktivnost ukupnih Rho proteina je predstavljena kao srednja vrednost \pm SEM ($n=4$), [#] $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot za aktivnost. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.8 Efekat estradiola na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri gojaznih mužjaka pacova

Prethodno objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da HF ishrana smanjuje nivo kako ROCK1, tako i ROCK2 proteina, u jetri gojaznih mužjaka pacova u poređenju sa kontrolnim normalno uhranjenim pacovima [357]. Rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina ROCK1 i ROCK2 u lizatu jetre pacova u ovoj disertaciji, pokazuju da se nivo ROCK1 proteina kod gojaznih (Slika 37A) mužjaka pacova nakon E2 tretmana ne menja značajno u odnosu na netretirane gojazne pacove. Međutim, E2 tretman gojaznih mužjaka pacova značajno povećava ($p < 0,05$) nivo ROCK2 proteina u jetri u poređenju sa HF grupom pacova (Slika 37B).

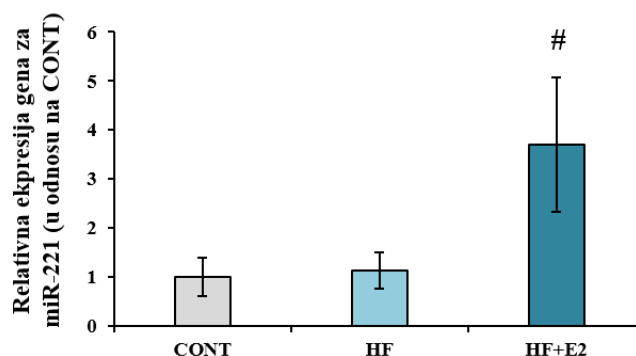


Slika 37. Efekat E2 na nivo proteina ROCK1 i ROCK2 u jetri gojaznih mužjaka pacova.

A. Rezultati određivanja nivoa ROCK1 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ROCK1 proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5-6$). **B.** Rezultati određivanja nivoa ROCK2 proteina su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ROCK2 proteina je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=3-5$), [#] $p < 0,05$. Umetak – reprezentativni Western blot. HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

4.2.3.9 Promene u ekspresiji miR-221 pod delovanjem estradiola u jetri gojaznih mužjaka pacova

Primenom qRT-PCR metode je određivana relativna ekspresija posttranskripcionog regulatora miR-221, a dobijeni rezultati pokazuju da u HF grupi pacova ne dolazi do značajne promene u relativnoj ekspresiji miR-221 u jetri u odnosu na kontrolu (**Slika 38**). Tretman E2 gojaznih mužjaka pacova dovodi do značajnog povećanja ($p < 0,05$) relativne ekspresije miR-221 u jetri u poređenju sa HF grupom pacova.



Slika 38. Efekat E2 na ekspresiju miR-221 u jetri gojaznih mužjaka pacova.

Rezultati određivanja nivoa ekspresije miR-221 su izraženi u odnosu na CONT. Nivo ekspresije miR-221 je predstavljen kao srednja vrednost \pm SEM ($n=5-7$), [#] $p < 0,05$.

[#] - u odnosu na HF. CONT – Kontrola; HF – Gojazni; HF+E2 – Gojazni+Estradiol.

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji su prikazani rezultati dobijeni izučavanjem efekata E2 na regulaciju aktivnosti enzima AOS zaštite i enzima iNOS u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova. Osnovna hipoteza istraživanja je bila da je E2 uključen u regulaciju aktivnosti enzima AOS zaštite i iNOS u jetri mužjaka pacova, molekulskim mehanizmom koji uključuje vezivanje E2 za ER α i/ili ER β i aktivaciju signalnih molekula Src, ERK1/2, AMPK, Akt, RhoA, ROCK i transkripcionog faktora NF κ B, kao i posttranskripcionog regulatora miR-221. Pretpostavljeno je da u patofiziološkim stanjima, kao što su stanje gojaznosti združeno sa IR, nastalim usled primene HF ishrane, dolazi do poremećaja u molekulskom mehanizmu delovanja E2 zbog promena u ekspresiji i aktivnosti signalnih molekula, a posledično i do poremećaja u regulaciji ekspresije enzima AOS zaštite i iNOS u jetri mužjaka pacova. Izmenjeni metabolizam lipida i glukoze prisutan u gojaznosti, remeti metaboličke procese u jetri, čime doprinosi nastanku IR, što ga ubraja u glavne faktore rizika za razvoj bolesti jetre, kao što je NAFLD. Kao posledica gojaznosti i aktivacije urođenog imunskog odgovora dolazi do nakupljanja lipida u jetri, a vremenom i do njene hipertrofije [358], što je praćeno povećanom proizvodnjom ROS/RNS i nastankom OS [359, 360]. Smanjivanje količine i aktivnosti enzima AOS zaštite, kao što su SOD, CAT i GPx, povećava podložnost tkiva oksidativnim oštećenjima u gojaznosti [200]. Citokini inflamacije, hiperglikemija i OS u jetri dodatno dovode do povećane ekspresije iNOS i sinteze NO [3].

Literaturni podaci pokazuju da biološki najpotentnija forma estrogena, E2, poseduje antioksidativna i antiinflamacijska svojstva [12, 361-363]. Ranije objavljeni rezultati istraživanja naše grupe pokazuju da davanje E2 gojaznim mužjacima pacova smanjuje hipertrofiju srčanog mišića uzrokovanu gojaznošću, i ispoljava antizapaljenske i antiaterogene efekte, čime ostvaruje kardioprotektivno dejstvo [364]. Estradiol u srcu istih pacova, u stanju gojaznosti udružene sa IR, dovodi i do povećanja ekspresije i aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze [365], smanjenja ekspresije gena za iNOS, kao i nivoa iNOS proteina [366]. Podaci iz literature pokazuju da E2 sprečava razvoj masne jetre i IR u jetri kod mužjaka pacova, održavajući homeostazu masti i glukoze, dok nedostatak E2 doprinosi razvoju steatoze i progresiji hroničnih bolesti jetre [367, 368]. Međutim, literaturni podaci koji se odnose na *in vivo* efekte E2 na regulaciju ekspresije i aktivnosti enzima AOS zaštite i iNOS u jetri u stanju gojaznosti su ograničeni i nedovoljno dokumentovani. Takođe, ne postoje literaturni podaci koji povezuju efekte koje E2 ostvaruje na enzime AOS zaštite i iNOS sa promenama u regulaciji ER i signalnih molekula NF κ B, Src, ERK1/2, AMPK, Akt, RhoA, ROCK1/2, kao i posttranskripcionog regulatora miR-221 u jetri u stanju gojaznosti.

Kako bi se izbegao uticaj cirkadijalnih oscilacija nivoa E2 tokom estrusnog ciklusa ženki, za eksperimente u okviru ove doktorske disertacije su korišćeni mužjaci *Wistar* pacova. Osim toga, bilateralna ovarijektomija kojom se ženkama pacova operativno uklanjaju oba jajnika i neutrališu efekti endogenog E2, posledično vodi do razvoja IR, gojaznosti i inflamacije, koji bi ometali interpretaciju potencijalnih efekata HF ishrane [152, 369-371]. Doza primenjenog E2 je izabrana na osnovu ranijih eksperimenata i objavljenih rezultata naše grupe [337, 364-366, 372], kao i literaturnih podataka [373-375]. U cilju razvijanja odgovarajućeg životinjskog modela gojaznosti, mužjaci *Wistar* pacova su hranjeni standardnom laboratorijskom hranom za pacove, obogaćenom sa 42% masti (HF ishrana), tokom 10 nedelja. Ovakav eksperimentalni model gojaznosti je odabran na osnovu literaturnih podataka koji pokazuju da HF ishrana dovodi do razvoja gojaznosti udružene sa IR [376-378], kao i do strukturnih i funkcijskih poremećaja jetre [358]. Prethodno objavljeni rezultati naše grupe na životinjama ispitivanim u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da HF ishrana kod mužjaka pacova dovodi do povećanja mase tela, kao i razvoja IR, što je zaključeno na osnovu povećanih vrednosti koncentracija insulina, glukoze, holesterola i Tg u serumu, kao i HOMA- β i HOMA-IR indeksa, koji ukazuju na smanjenje osetljivosti srca i jetre, na insulin [364, 365].

Takođe, objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da HF ishrana dovodi do povećanja mase jetre i koncentracije holesterola i glukoze u jetri kod mužjaka pacova [356].

Prvi eksperimenti u okviru ove disertacije bili su usmereni na izučavanje *in vivo* efekata E2 na enzime AOS zaštite u jetri kod normalno uhranjenih pacova (fiziološki uslovi), a zatim i kod gojaznih pacova (patofiziološki uslovi). Merenjem nivoa SOD1, SOD2, GPx i CAT proteina Western blot metodom, kao i aktivnosti CAT enzima, u jetri svih grupa pacova, ispitivan je *in vivo* efekat E2 na nivo enzima AOS zaštite kod normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije idu u prilog postavljenoj hipotezi da E2 tretman značajno povećava nivo proteina SOD1 (**Slika 7A i 23A**), GPx (**Slika 8 i 24**) i CAT (**Slika 9A i 25A**) u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Nivo SOD2 proteina (**Slika 7B**) kao i aktivnost enzima CAT (**Slika 9B**), nakon E2 tretmana u jetri normalno uhranjenih pacova su takođe povećane, ali bez značajnosti. Međutim, u jetri gojaznih pacova tretiranih E2, nivo SOD2 proteina (**Slika 23B**), kao i aktivnost enzima CAT (**Slika 25B**) su značajno povećane. Neočekivano, u jetri HF grupe pacova, nivoi enzima SOD1 (**Slika 23A**), SOD2 (**Slika 23B**) i GPx (**Slika 24**) su nepromenjeni u odnosu na kontrolu. Takođe, izostala je i značajna promena u aktivnosti CAT enzima (**Slika 25B**), uprkos značajno smanjenom novou CAT proteina u jetri gojaznih pacova u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 25A**).

Izostanak promena u aktivnosti enzima AOS zaštite usled gojaznosti, najverovatnije potiče od dužine trajanja eksperimenta. U studijama koje su objavili Xia sa saradnicima [379], kao i Albrahim sa saradnicima [380], pokazano je da aktivnost CAT značajno opada nakon 12 nedelja primene HF ishrane. Pretpostavljeno je da duže izlaganje životinja HF ishrani vodi smanjenju aktivnosti enzima AOS zaštite, što se može dovesti u vezu sa smanjivanjem ćelijskih zaliha pomenutih enzima u reakcijama neutralizacije povećanih nivoa ROS koji prate tok razvoja gojaznosti. Međutim, slično našim rezultatima, u studiji Noemana sa saradnicima [381] nije uočena značajna promena aktivnosti CAT enzima u tkivu jetre pacova izlaganih HF ishrani, čak ni nakon 16 nedelja trajanja eksperimenta. Takođe, u studiji Gasparinija sa saradnicima [382], proteinska ekspresija SOD1, SOD2, GPx i CAT je ostala nepromenjena u grupi gojaznih pacova u odnosu na kontrolu posle 20 nedelja primene HF ishrane. Neslaganja u dobijenim rezultatima pomenutih studija najverovatnije potiču ne samo od razlika u trajanju postavljenog eksperimenta, već i od drugih faktora, kao što su: sojevi korišćenih eksperimentalnih životinja, sastav primenjene laboratorijske hrane i stepen gojaznosti postignut u eksperimentu. Značajno smanjeni nivo proteinske ekspresije CAT enzima (**Slika 25A**) predstavljen u ovoj disertaciji ukazuje na smanjeni antioksidativni kapacitet tkiva jetre pacova zbog primene HF ishrane i gojaznosti. Rezultati, dobijeni nakon E2 tretmana gojaznih pacova (HF+E2 grupa), podržavaju postavljenu hipotezu da E2 značajno povećava ekspresiju enzima AOS zaštite u stanju gojaznosti i pokazuju da E2 tretman kod gojaznih pacova dovodi do povećanja nivoa svih ispitivanih proteina u jetri: SOD1 (**Slika 23A**), SOD2 (**Slika 23B**), GPx (**Slika 24**) i CAT (**Slika 25A**). Osim toga, dobijeni rezultati pokazuju i da je aktivnost CAT enzima u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova značajno povećana (**Slika 25B**). Rezultati studija drugih autora koji su ispitivali efekte E2 na enzime AOS zaštite u jetri su različiti. Rezultati studije Ozgonula sa saradnicima [383] pokazuju da E2 nije ostvario efekte na aktivnost SOD, dok je aktivnost CAT bila značajno povećana u jetri ovarijektomisanih pacova, nakon primenjenog E2, u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. U studiji Hamdena sa saradnicima [384] je pokazano da E2 tretman (u trajanju od šest meseci) značajno povećava aktivnosti enzima SOD i CAT u jetri starih pacova kod kojih je nivo OS povećan. Interesantno je pomenuti istraživanja grupe Sobočanec sa saradnicima [385] u kojima su analizirani ekspresija i aktivnost SOD i CAT enzima u jetri mužjaka miševa u fiziološkim uslovima. Rezultati pomenute istraživačke grupe pokazuju da dugotrajan E2 tretman ne dovodi do promene u ekspresiji SOD1 proteina, ali utiče na povećanje nivoa SOD2 proteina. Ista grupa autora je pokazala da E2 tretman značajno smanjuje i ekspresiju i aktivnost CAT u jetri mužjaka miševa [385]. Sličnosti i razlike u rezultatima koji se odnose na ekspresiju i aktivnost navedenih enzima AOS zaštite u literaturi sa

našim rezultatima mogu se dovesti u vezu sa različitim sojevima i tipovima korišćenih životinjskih modela, kao i načina primene egzogenog E2 i trajanja E2 tretmana.

U daljem radu su izučavani biomarkeri OS, radi boljeg razumevanja antioksidativnih efekata E2 u jetri pacova. Analizirani su nivoi MDA kao biomarkera lipidne peroksidacije [386] i PCC kao biomarkera stepena oksidativnih oštećenja proteina [387]. U skladu sa postavljenom hipotezom, dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman dovodi do značajnog smanjenja nivoa MDA (**Slika 10**) u jetri normalno uhranjenih pacova (E2 grupa), što ukazuje da E2 ostvaruje svoj antioksidativni efekat u fiziološkim uslovima. Međutim, nivo PCC u jetri istih životinja je nepromenjen nakon E2 tretmana (**Slika 11**). Rezultati drugih autora o delovanju E2 na biomarkere OS su oprečni. Rezultati studije Sobočaneca sa saradnicima [385] pokazuju da E2 tretman ne dovodi do promena u nivou MDA kod mužjaka miševa u fiziološkim uslovima, dok rezultati Ozgonula sa saradnicima [383] pokazuju nepromenjen nivo MDA u jetri ovarijektomisanih ženki pacova nakon E2 tretmana. Većina literaturnih podataka pokazuje da se nivoi MDA i PCC povećavaju u tkivima životinja na HF ishrani, što ukazuje na postojanje OS u stanju gojaznosti [380-382]. Međutim, rezultati ove disertacije pokazuju značajno snižen nivo MDA (**Slika 26**), dok nivo PCC nije značajno promenjen (**Slika 27**) u jetri HF grupe pacova u poređenju sa CONT grupom. Moguće objašnjenje razlika između naših rezultata i navedenih studija jeste u statistički nepromenjenom nivou većine ispitivanih enzima AOS zaštite, kao i nepromenjenoj aktivnosti CAT koji obezbeđuju zadovoljavajući kapacitet AOS zaštite za uklanjanje ROS i sprečavaju nagomilavanje analiziranih molekulskih produkata OS. Sa druge strane, rezultati dobijeni nakon E2 tretmana gojaznih pacova pokazuju značajno smanjenje kako nivoa MDA (**Slika 26**), tako i nivoa PCC (**Slika 27**) u jetri, u poređenju sa HF grupom pacova, što ukazuje da E2 ostvaruje svoj antioksidativni efekat u patofiziološkom stanju gojaznosti. Slično rezultatima ove disertacije, rezultati Hamdena sa saradnicima [384] pokazuju da E2 tretman smanjuje nivo biomarkera lipidne peroksidacije TBARS (*engl. thiobarbituric acid reactive substances*) u jetri pacova u patofiziološkim uslovima starenja. Takođe, pokazano je da E2 tretman epitelnih ćelija tankog creva u kulturi, značajno smanjuje nivo PCC nakon izlaganja ćelija H_2O_2 , koji je doveo do oksidativnih oštećenja mukoznog sloja [388]. Kontradiktornost u rezultatima iz literature, koji se odnose na efekte E2 na nivo MDA i PCC je moguće objasniti poreklom ispitivanog tkiva, zatim različitim dozama, načinom aplikacije, kao i trajanjem E2 tretmana. Zbog kontroverzi u navedenim rezultatima, neophodna su dalja izučavanja kako bi se precizno odredila uloga E2 u regulaciji biomarkera OS.

Polazeći od postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije, u daljem radu je izučavan *in vivo* efekat E2 na regulaciju enzima iNOS u jetri kod normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Azotmonoksid ostvaruje značajne efekte u regulaciji brojnih fizioloških procesa, a objavljeni rezultati naše grupe, kao i rezultati drugih autora pokazuju da E2 stimuliše *in vitro* [389, 390] i *in vivo* [327, 366] sintezu NO. U stanju gojaznosti, NO ostvaruje ulogu u regulaciji energetskog metabolizma i osetljivosti na insulin [391-394], a važan molekulski posrednik koji povezuje poremećaje metabolizma sa inflamacijom u jetri jeste enzim iNOS [319]. U uslovima OS, kada je ekspresija i regulacija enzima AOS zaštite oslabljena, aktivacija iNOS vodi povećanoj proizvodnji NO koji interaguje sa $O_2^{\cdot-}$ i formira ONOO⁻, izuzetno reaktivne slobodne radikale koji narušavaju ćelijski integritet i doprinose razvoju poremećaja praćenih inflamacijom [395]. Stoga, u daljim eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije je ispitivan *in vivo* efekat E2 na gensku i proteinsku ekspresiju iNOS enzima i na koncentraciju NO_2^-/NO_3^- u lizatu jetre normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova.

Dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman normalno uhranjenih pacova (E2 grupa) ne dovodi do značajnih promena u ekspresiji gena za iNOS (**Slika 12A**), dok je smanjio nivo iNOS proteina u jetri (**Slika 12B**). Ovaj rezultat, može se objasniti prethodno dokumentovanim povećanjem koncentracije NO_2^-/NO_3^- , to jest povećanjem nivoa NO, u plazmi istih pacova [396]. Naime, poznato je da lipofilni molekul NO brzo difunduje iz krvotoka u ćelije organa, inhibirajući sintezu iNOS na nivoima transkripcije, translacije i post-translacionih modifikacija [397]. U jetri E2 grupe pacova, uzimajući u obzir nepromenjeni nivo iRNK za iNOS, možemo pretpostaviti da

povećani NO inhibira ekspresiju i aktivaciju iNOS post-translacionim mehanizmom, po principu negativne povratne sprege, koji podrazumeva uspostavljanje koordinantskih veza NO sa hem grupom iNOS enzima [397].

U patofiziološkom stanju gojaznosti, povećano nakupljanje lipida u jetri remeti metabolizam lipida [360] i aktivira molekulske puteve inflamacije [3], pri čemu posrednici inflamacije kao što su citokini mogu podstaći ekspresiju iNOS u jetri. Prethodno objavljeni rezultati naše grupe pokazuju da u jetri HF grupe mužjaka pacova, uprkos značajnom smanjenju nivoa iNOS proteina, dolazi do značajnog povećanja ekspresije gena za iNOS [355], što ukazuje da gojaznost kao posledica HF ishrane vodi aktivaciji procesa inflamacije u jetri. Tretman E2 kod gojaznih pacova (HF+E2 grupa) primenjen u ovoj disertaciji dovodi do značajnog smanjenja kako ekspresije gena za iNOS (**Slika 28A**), tako i nivoa iNOS proteina u jetri (**Slika 28B**), u poređenju sa vrednostima dobijenim u HF grupi pacova. Promene nivoa iNOS proteina, prate promene u nivou iRNK za iNOS, pa se može pretpostaviti da su promene nivoa iNOS proteina nastale usled promena u transkripciji gena za iNOS. U saglasnosti sa dobijenim rezultatima su i rezultati drugih autora, koji pokazuju da E2 tretman dovodi do značajnog smanjenja ekspresije iNOS proteina [398, 399], kao i ekspresije gena za iNOS u inflamatornim stanjima [400, 401]. Takođe, u studiji Nwezea sa saradnicima je pokazano da inkubacija hepatocita pacova sa E2 inhibira citokinima stimulisanu sintezu NO, kao i da dovodi do smanjenja nivoa iRNK za iNOS i iNOS proteina [398]. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da E2 reguliše ekspresiju iNOS enzima u jetri gojaznih pacova na nivou transkripcije. Povišen nivo NO dovodi do smanjenja ekspresije gena za iNOS inhibicijom post-translacionih modifikacija I κ B α , čime se snižava DNK-vezujuća aktivnost transkripcionog faktora NF κ B [402].

Rezultati merenja koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻ u lizatu jetre su pokazali da E2 tretman ne smanjuje značajno koncentraciju NO₂⁻/NO₃⁻ u jetri normalno uhranjenih pacova (E2 grupa) (**Slika 13**). Takođe, u lizatu jetre gojaznih pacova, koncentracija NO₂⁻/NO₃⁻ se ne smanjuje značajno u odnosu na kontrolu (**Slika 29**). Međutim, E2 tretman gojaznih pacova dovodi do značajnog povećanja koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻ u jetri u poređenju sa HF grupom pacova (**Slika 29**). Izostanak značajnog smanjenja koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻, kako u E2 grupi, tako i u HF grupi pacova, iako su nivoi iNOS proteina u jetri sniženi, najverovatnije se mogu dovesti u vezu sa aktivnostima drugih izoformi NOS prisutnim u jetri. U jetri gojaznih pacova tretiranih sa E2, iako je ekspresija iNOS proteina smanjena, zapažena je povećana koncentracija NO₂⁻/NO₃⁻, za koju takođe možemo pretpostaviti da potiče od aktivnosti neke druge izoforme NOS. Naime, podaci iz literature pokazuju da AMPK može da aktivira eNOS, fosforilacijom na specifičnim Ser ostacima aminokiselina, kao i da je aktivacija eNOS važna za održavanje metabolizma [403]. Kako su naši rezultati pokazali povećanje aktivacije AMPK α ₁ u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova (**Slika 34**), možemo pretpostaviti mehanizam po kome eNOS aktiviran od strane AMPK α ₁ doprinosi povećanom nivou NO₂⁻/NO₃⁻ u lizatu jetre ovih pacova. Takođe, na isti način se može povezati i nepromenjen nivo fosforilacije AMPK α ₁ (**Slika 18**) sa nepromenjenim nivoom NO₂⁻/NO₃⁻ u lizatu jetre E2 grupe životinja.

Poznato je da se u promotorima gena za AOS enzime i iNOS nalaze mesta vezivanja transkripcionog faktora NF κ B [270, 404], stoga su dalja istraživanja bila usmerena na izučavanje uloge NF κ B u E2-posredovanoj regulaciji enzima AOS zaštite i iNOS u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. NF κ B je ključni transkripcioni faktor koji reguliše molekulske mehanizme uključene u ranu fazu inflamacije. Signalni put NF κ B ima ključnu ulogu u održanju homeostaze u jetri, ali i u odvijanju patofizioloških procesa, regulaciji ćelijskog preživljavanja i smrti i aktivaciji reakcija urođenog i stečenog imunskog odgovora [405]. U brojnim bolestima jetre je pokazana aktivacija NF κ B, uključujući alkoholnu bolest jetre, NAFLD, virusni hepatitis i hepatocelularni karcinom [406]. U fiziološkim uslovima, neaktivni NF κ B proteini se prvenstveno nalaze u citoplazmi ćelija, vezani za članove I κ B familije proteina inhibitora. Aktivacija transkripcionog faktora NF κ B ostvaruje se fosforilacijom I κ B proteina i njegovom degradacijom, čime se oslobađaju sekvence NF κ B proteina koji predstavljaju signale za translokaciju u jedro ćelije [407].

Western blot metodom je prvo određivan nivo p50 subjedinice NFκB proteina u lizatu jetre pacova i dobijeni rezultati pokazuju da je nivo proteina NFκB-p50 nepromenjen u svim eksperimentalnim grupama životinja (**Slika 14A** i **30A**). Statistički nepromenjeni nivo proteina NFκB-p50 ukazuje na mogućnost da p50 subjedinica NFκB nije uključena u posredovanju efekta E2 na regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS. Ova pretpostavka je podržana rezultatima drugih autora [408, 409]. Tako je u studiji Simona sa saradnicima [408] pokazano da je ekspresija gena za iNOS u mijeloidnim ćelijama regulisana p50/p50 i p65/p65 homodimerima subjedinica transkripcionog faktora NFκB, umesto kanonskim heterodimerom NFκB-p50/p65. Takođe, rezultati DeAngelisa sa saradnicima [409] pokazuju da u jetri miševa kojima je eliminisan gen za NFκB-p50 (C57BL/6 p50⁻/p50⁻ miševi), nivo NFκB-p65 subjedinice u jedru ćelija se povećava. Visok nivo NFκB-p65 subjedinice omogućava formiranje p65 homodimera NFκB koji nadoknađuju nedostatak p50/p65 heterodimera i obezbeđuju zadovoljavajući nivo aktivacije ciljnih gena. Na osnovu svega navedenog možemo pretpostaviti da E2 u jetri pacova ispitivanih u našoj studiji, najverovatnije ostvaruje svoje efekte na regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS ne utičući na nivo NFκB-p50 proteina.

U narednim eksperimentima određivan je nivo subjedinice NFκB-p65 u lizatu jetre pacova. Dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman ne dovodi do promene nivoa NFκB-p65 proteina u jetri normalno uhranjenih pacova (**Slika 14B**), što navodi na pretpostavku da E2 može ostvariti efekat i na druge transkripcione faktore odgovorne za regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS, kao što je Nrf2 [399]. Objavljeni rezultati naše grupe takođe pokazuju da primena HF ishrane ne utiče značajno na nivo NFκB-p65 [356]. Sa druge strane, u jetri gojaznih životinja, E2 tretman značajno smanjuje nivo NFκB-p65 proteina (**Slika 30B**) u poređenju sa HF grupom pacova. Podaci iz literature pokazuju da produžena primena E2 ima negativan efekat na aktivaciju NFκB [51, 410]. Osim toga, pokretanje mehanizama negenomske ćelijske signalizacije u odgovoru na delovanje E2, za posledicu ima brzu aktivaciju NFκB proteina [51]. Rezultati ove disertacije, zajedno sa navedenim literaturnim podacima, ukazuju da jednokratna primena E2 dovodi do smanjenja nivoa NFκB-p65 u jetri gojaznih pacova pokretanjem mehanizama brze signalizacije čiji je rezultat aktivacija i translokacija NFκB-p65 u jedro hepatocita. Navedeni rezultati, kao i literaturni podaci, ukazuju da je NFκB-p65 važan faktor u E2 regulisanoj ekspresiji iNOS u jetri gojaznih pacova. Međutim, u studiji Zhanga sa saradnicima [411] je pokazano da dugotrajna primena E2 tokom 10 nedelja, smanjuje nivo proteina NFκB u hipokampusu ovarijektomisanih ženki pacova, aktivacijom negenomskog signalnog puta koji uključuje AMPK. Studija Kireeva sa saradnicima [412] takođe pokazuje da E2 tretman tokom 10 nedelja smanjuje proteinski nivo NFκB-p65 uz inhibiciju aktivnosti p38 MAPK kinaze, u hipokampusu ovarijektomisanih ženki pacova. Uočena smanjena ekspresija gena za iNOS u jetri HF+E2 grupe pacova u ovoj disertaciji može da ukazuje da translokacija u jedro nije omogućila potpunu aktivaciju NFκB transkripcionog faktora. S obzirom da NFκB može da ostvari svoju funkciju preko interakcije sa drugim transkripcionim faktorima, kao što je AP-1 [413, 414], smanjena aktivacija AP-1 može biti odgovorna za smanjenu ekspresiju gena za iNOS. Takođe, NFκB može da interaguje sa Nrf2 [415], koji inhibira aktivnost NFκB-p65 i tako smanjuje ekspresiju gena za iNOS.

Rezultati ove disertacije jasno pokazuju da tretman E2 dovodi do povećanja nivoa proteina SOD1, SOD2, GPx i CAT u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova, dok nema uticaj na nivo proteina NFκB-p65 kod normalno uhranjenih pacova, a dovodi do smanjenja nivoa proteina NFκB-p65 kod gojaznih pacova. Shodno ovim rezultatima, može se pretpostaviti da, u fiziološkim i patofiziološkim uslovima, NFκB-p65 transkripcioni faktor najverovatnije nije uključen u regulaciju enzima AOS zaštite u tretmanu E2.

Hepatociti ekspimiraju oba tipa receptora za E2, ERα i ERβ [416], i stoga su analizirani nivoi ovih proteina u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Pokazano je da je ERα preovlađujuća izoforma ER u jetri [331]. Međutim, kod miševa kojima nedostaje ERβ zapažena je povećana osetljivost na insulin i smanjeno nakupljanje Tg u jetri [417].

Dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman dovodi do značajnog smanjenja nivoa ER α u jetri normalno uhranjenih (**Slika 15A**) i gojaznih pacova (**Slika 31A**), dok se za nivo ER β proteina promene ne uočavaju (**Slika 15B** i **31B**). Osim toga, naša prethodna istraživanja su pokazala da primena HF ishrane dovodi do značajnog smanjenja nivoa ER α proteina, ali da nema značajnijeg uticaja na nivo proteina ER β u jetri pacova [357]. Nivo ER može biti regulisan na nivou transkripcije i translacije, što je zapaženo u stanju dijabetesa [418]. Naime, pokazano je da E2 pokreće brzu razgradnju ER α u proteazomima, pri čemu su ubikvitilacija i proteoliza ER α praćeni aktivacijom transkripcije gena za ER α i obnavljanjem nivoa ER α proteina [419]. Zatim, pokazano je da je neophodna dugotrajna primena E2 kako bi se održali stabilni nivoi ER α u nereproduktivnim tkivima, kao što je jetra [419]. Važno je istaći da su u eksperimentima rađenim u okviru ove disertacije, pacovi tretirani jednom dozom E2 i žrtvovani 24 sata nakon tretmana, čime se može objasniti smanjen nivo ER α proteina u E2 (**Slika 15A**) i HF+E2 grupi (**Slika 31A**) pacova.

Još jedan mehanizam regulacije koji može doprineti smanjenju nivoa ER α u citoplazmi ćelija jetre, nakon E2 tretmana, jeste translokacija kompleksa ER α /E2 u jedro [29]. U *in vitro* i *in vivo* studijama je pokazano postojanje funkcionalne interakcije između ER i NF κ B-p65 [420, 421]. Direktna interakcija između ER i NF κ B u jedru može dovesti do konformacionih promena u oba proteina, utičući na sposobnost njihovog vezivanja za DNK, ili može rezultovati u nastanku neaktivnih kompleksa vezanih za DNK koji nemaju mogućnost interakcije sa neophodnim kofaktorima i molekulima transkripcione mašinerije [422]. U studiji Shih sa saradnicima [423] pokazano je da E2 tretman *Sprague-Dawley* mužjaka pacova inhibira ekspresiju gena za iNOS i iNOS proteina, posredstvom translokacije ER i njegove interakcije sa NF κ B-p65, čime se narušava transkripciona aktivnost NF κ B. S obzirom da rezultati ove disertacije pokazuju, osim smanjenih nivoa ER α (**Slika 31A**) i NF κ B-p65 (**Slika 30B**), i smanjenu ekspresiju gena za iNOS u jetri HF+E2 grupe pacova (**Slika 28A**), moguće objašnjenje je da je upravo translokacija ER α u jedro ćelije mogla dovesti do smanjenog nivoa ER α u citoplazmi, a isto tako i do pretpostavljene nepotpune aktivnosti NF κ B-p65 u jedru i sledstveno smanjene ekspresije iRNK za iNOS. Osim toga, rezultati nekoliko studija pokazuju da se aktiviranje promotora gena za iNOS, u odgovoru na delovanje E2, dešava preko ER β , dok se inhibicija ekspresije iNOS u jetri ostvaruje posredstvom ER α [424, 425]. S obzirom na smanjeni nivo iNOS proteina u jetri E2 tretiranih normalno uhranjenih pacova, može se pretpostaviti da E2 inhibira ekspresiju iNOS preko aktivacije ER α kod ovih pacova.

Takođe, E2 poseduje i antioksidativna svojstva [361], koja su posredovana tkivno-specifično distribuiranim izoformama ER [426]. Imajući u vidu da je ER α dominantna izoforma ER u jetri [427], i da su rezultati pokazali da je nakon jednokratnog E2 tretmana detektovan nepromenjen nivo ER β i smanjen nivo ER α u citoplazmi ćelija jetre, može se pretpostaviti da je efekat E2 na nivoe enzima iNOS i AOS zaštite u jetri posredovan prevashodno preko ER α . Naime, smanjen nivo ER α u citoplazmi ukazuje da se receptor ER α translocirao u jedro gde može učestvovati u regulaciji ekspresije enzima AOS zaštite.

Negenomski prenos E2 signala kroz citoplazmu ćelije podrazumeva interakciju kompleksa ER/E2 sa nekim drugim signalnim molekulima, koji poseduju aktivnost kinaza. Centralnu ulogu u signalizaciji E2 u citoplazmi ima nereceptorska kinaza Src koja stimuliše proizvodnju citokina u procesu inflamacije, a nastalo inflamacijsko mikrookruženje u tkivu recipročno aktivira Src [428, 429]. Prethodno je pokazano da tretman miševa inhibitorom protein fosfataze 1 sprečava aktivaciju Src kao i posledično povećanje u proizvodnji IL-6 od strane Kupferovih ćelija u uslovima hipoksije [430], što ukazuje da bi inhibicija Src mogla biti važan korak u terapiji poremećaja uzrokovanih inflamacijom u jetri. Imajući u vidu ulogu Src u mnogim signalnim putevima uključenim u procese inflamacije [431], izučavani su efekti E2 na nivo Src, kao i asocijaciju Src sa ER α .

Dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman značajno povećava nivo Src proteina (**Slika 16A**), kao i stepen asocijacije između Src i ER α (**Slika 16B**) u jetri normalno uhranjenih pacova. Prethodno je pokazano da ER α /Src interakcija, ne samo da pospešuje ER α -posredovanu transkripciju gena, već može da utiče i na pokretanje proteolize ER α [432]. Stoga se može

pretpostaviti da aktivacija Src usled delovanja E2, doprinosi proteolitičkoj degradaciji ER α i, samim tim, uočenom smanjenju nivoa ER α u jetri E2 grupe pacova. U jetri gojaznih pacova (HF grupa) je došlo do značajnog smanjenja nivoa proteina Src (**Slika 32A**), ali i značajnog povećanja asocijacije ER α /Src (**Slika 32B**) u poređenju sa CONT grupom životinja, što može da ukazuje na povećanu aktivaciju Src u uslovima inflamacije u gojaznosti. Kao i kod normalno uhranjenih pacova, E2 tretman u HF+E2 grupi pacova je takođe doveo do značajnog povećanja nivoa Src proteina (**Slika 32A**), međutim stepen asocijacije ER α /Src je značajno smanjen kod ovih pacova (**Slika 32B**). Sniženi nivo ER α /Src kompleksa ukazuje da E2 tretman gojaznih pacova smanjuje E2 posredovanu aktivnost Src zavisnu od interakcije sa ER α u jetri u uslovima gojaznosti.

Poznato je da asocijacija ER sa Src pokreće signalni put posredovan delovanjem molekula ERK1/2 [433], koji može imati važnu ulogu u patogenezi gojaznosti i sa njom povezanih metaboličkih promena [434]. Prethodna istraživanja naše grupe su pokazala da HF ishrana kod mužjaka pacova dovodi do smanjenja fosforilacije ERK1/2 u jetri [357], što je povezano sa razvojem IR kod ovih pacova [364]. Istraživanja su pokazala ulogu ERK1/2 u regulaciji iNOS u različitim tkivima uključujući i jetru [357, 435]. Podaci iz literature, takođe, pokazuju da su fosforilacija i aktivacija ERK1/2 i translokacija NF κ B u jedro, koje se dešavaju kao odgovor na E2 tretman, uključene i u povećanje ekspresije gena za enzime AOS zaštite, poput GPx i SOD2 [227].

Dobijeni rezultati pokazuju da E2 tretman značajno smanjuje nivo Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ fosforilacije ERK1/2 u jetri normalno uhranjenih (**Slika 17**), kao i gojaznih pacova (**Slika 33**) u odnosu na odgovarajuće kontrole. Literaturni podaci koji opisuju efekat E2 na ERK1/2 aktivnost su oprečni. Pokazano je da E2, posredstvom negenomskih signalnih puteva, može da aktivira proteine iz familije MAPK, uključujući ERK1/2 [436]. Međutim, odsustvo E2 posredovane aktivacije ERK1/2 u kulturama ćelija humanog karcinoma dojke je pokazano u mnogobrojnim studijama [437-439]. Smanjena fosforilacija ERK1/2 u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova nakon E2 tretmana, zapažena u ovoj disertaciji, u skladu je sa uočenim smanjenim nivoom ER α i smanjenom ekspresijom iNOS proteina. Međutim, sa druge strane, na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da ERK1/2, kao i NF κ B najverovatnije nije uključen u regulaciju enzima AOS zaštite, s obzirom na povećane nivoe enzima AOS zaštite u jetri E2 tretiranih normalno uhranjenih i gojaznih pacova.

U daljim eksperimentima je izučavan uticaj E2 tretmana na aktivaciju signalnog molekula AMPK, s obzirom da ova kinaza predstavlja unutarćelijski detektor količine odnosa ATP/AMP/ADP molekula [440], i ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze i lipida u mišićima i jetri. Poremećena regulacija AMPK je česta kod MS i dijabetesa tipa 2 [441], a podaci iz literature pokazuju da hormon E2 aktivira AMPK [49]. Rezultati studije Kima sa saradnicima [49] pokazuju da E2 stimuliše aktivaciju AMPK posredstvom, najverovatnije, ER α izoforme. U studiji Zhanga sa saradnicima [400], E2 tretman ovarijektomisanih ženki pacova dovodi do sniženja nivoa fosforilacije AMPK, kao i do smanjenja nivoa NF κ B proteina. Prethodni rezultati istraživanja naše grupe su pokazali da je fosforilacija AMPK α_1 na aminokiselini Thr¹⁷² značajno snižena u jetri gojaznih u odnosu na kontrolne pacove [357]. Pokazano je da lekovi koji povećavaju osetljivost na insulin takođe dovode do aktivacije AMPK, što za posledicu ima inhibiciju iNOS enzima, najverovatnije na nivou translacije, kao i inhibiciju proizvodnje NO od strane iNOS [352]. Literaturni podaci pokazuju da se signalni put AMPK aktivira i u odgovoru na visok stepen OS [442]. AMPK ima važnu ulogu u smanjenju OS u makrofagima [443], i regulaciji translokacije transkripcionog faktora Nrf2 unutar jedra, koji je odgovoran za regulaciju ekspresije enzima AOS, poput CAT, SOD i GPx [415, 442, 444].

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da E2 tretman ne dovodi do značajne promene u nivou fosforilacije AMPK α_1 na Thr¹⁷² u jetri normalno uhranjenih pacova (**Slika 18**), dok se u jetri gojaznih pacova nivo fosforilacije AMPK α_1 značajno povećava nakon E2 tretmana (**Slika 34**). Odsustvo promene AMPK nakon E2 tretmana ukazuje da ovaj enzim ne učestvuje u E2 posredovanom smanjenju nivoa proteina ER α i iNOS, a povećanju nivoa enzima AOS zaštite, u jetri normalno uhranjenih pacova. Sa druge strane, povećana fosforilacija AMPK α_1 u jetri E2

tretiranih gojaznih pacova je u skladu sa uočenim smanjenjem nivoa iNOS proteina u istoj eksperimentalnoj grupi. Literaturni podaci, takođe, pokazuju da aktivacija AMPK sprečava proizvodnju NO u kulturi adipocita tretiranih citokinima i adipoznom tkivu pacova tretiranim lipopolisaharidu [352]. Inhibitorni efekti AMPK na proizvodnju NO su korelisani sa smanjenjem nivoa iNOS proteina, što ukazuje da AMPK utiče na sintezu i degradaciju iNOS proteina [445]. Rezultati ove disertacije sugerišu da E2 posredovana aktivacija AMPK doprinosi smanjenom nivou iNOS proteina u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova. Takođe, povećana aktivacija AMPK se može dovesti u vezu sa povećanim nivoima ispitivanih enzima AOS zaštite i povećanom aktivnošću CAT u jetri HF+E2 grupe pacova. Na osnovu dobijenih rezultata možemo reći da E2 pozitivno reguliše enzime AOS zaštite, najverovatnije i preko aktivacije AMPK u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova.

Jedan od nishodnih signalnih molekula koji se aktivira nakon formiranja kompleksa ER α i Src je kinaza Akt [71]. Poremećena regulacija Akt doprinosi nakupljanju lipida u jetri u stanju gojaznosti i razvoju IR usled primene HF ishrane [446]. Prethodna istraživanja naše grupe pokazuju da primena HF ishrane dovodi do značajnog smanjenja nivoa fosforilacije Akt u jetri gojaznih pacova [356]. Osim toga, Akt pozitivno utiče na ekspresiju iNOS i to preko aktivacije transkripcionog faktora NF κ B [447]. Prenos signala preko Akt uključen je i u molekulske mehanizme AOS zaštite [415], pokretanjem translokacije transkripcionog faktora Nrf2 iz citoplazme u jedro ćelija [448].

Za razliku od E2 tretiranih normalno uhranjenih pacova, kod kojih se nivo fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ značajno smanjio (**Slika 19A**), kod E2 tretiranih gojaznih pacova nije detektovana promena nivoa fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ (**Slika 35A**). Međutim, za razliku od normalno uhranjenih mužijaka pacova, kod kojih je nivo fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ nakon E2 tretmana nepromenjen (**Slika 19B**), u jetri gojaznih mužjaka pacova (HF+E2 grupa) nivo ove fosforilacije se značajno smanjuje (**Slika 35B**). Nasuprot našim rezultatima, rezultati Yokota-Nakagi sa saradnicima [449] pokazuju da je E2 tretman značajno povećao fosforilaciju Akt na Ser⁴⁷³ u jetri normalno uhranjenih, ovarijektomisanih ženki pacova, dok studija Iqbala sa saradnicima pokazuje da E2 tretman značajno povećava fosforilaciju Akt kako na Ser⁴⁷³, tako i na Thr³⁰⁸ u hipofizi ovarijektomisanih ovaca [450]. Studija Stoica sa saradnicima [451] pokazuje da E2 posredstvom ER α aktivira Akt, koji potom fosforiliše ER α , što utiče na genomske efekte ovog receptora. Međutim, slično rezultatima ove disertacije, u jetri gojaznih, ovarijektomisanih ženki pacova izlaganih HF ishrani, E2 tretman nije doveo do značajne promene u nivou fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ [449]. Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da u zavisnosti od metaboličkog statusa životinje, E2 različito reguliše fosforilaciju Akt na analiziranim pozicijama Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸ u jetri.

Rezultati eksperimenata ove disertacije, koji pokazuju smanjenu fosforilaciju Akt na Ser⁴⁷³ u jetri E2 tretiranih normalno uhranjenih pacova, mogu se dovesti u vezu sa smanjenim nivoom proteina iNOS. Može se pretpostaviti da je, u ovoj grupi životinja, fosforilacija Akt na Ser⁴⁷³ uključena u smanjenje nivoa iNOS, ali nezavisno od NF κ B, s obzirom da je nivo ovog proteina nepromenjen. Sa druge strane, prethodno navedeni rezultati E2 tretmana gojaznih pacova, ukazuju da E2, smanjenjem aktivacije Akt, inhibira NF κ B-p65, što za posledicu ima smanjenu ekspresiju gena za iNOS i sledstveno iNOS proteina. Izostanak povećanja nivoa fosforilacije Akt nakon E2 tretmana na Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸, sugeriše da je povećanje nivoa ispitivanih enzima AOS zaštite nezavisno od aktivnosti Akt, kako kod normalno uhranjenih, tako i kod gojaznih pacova.

Literaturni podaci pokazuju da je RhoA/ROCK signalni put uključen u patogenezu različitih bolesti jetre, kao što su ciroza jetre [452] i hepatocelularni karcinom [453]. Rezultati prethodnih istraživanja naše grupe pokazuju da se primenom HF ishrane kod pacova povećava aktivacija RhoA/ROCK signalnog puta u jetri, što se može dovesti u vezu sa smanjenom aktivacijom Akt kinaze i razvojem IR [357]. Signalni put RhoA/ROCK je uključen u procese inflamacije i kroz regulaciju p38 MAPK [454-456] i iNOS [457, 458]. Takođe, pokazano je da su ROCK kinaze uključene u regulaciju procesa OS u jetri kod miševa kod kojih je primenom HF ishrane razvijena NAFLD. Naime, tretman inhibitorom ROCK kinaza, značajno smanjuje nivo MDA i značajno povećava aktivnost SOD [459]. Sa druge strane, pokazano je da tretman selektivnim agonistom

ER β smanjuje aktivaciju RhoA/ROCK u eksperimentalnom modelu ciroze jetre kod ovarijektomisanih ženki pacova [460].

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji pokazuju da E2 tretman nije doveo do značajnih promena ni u nivou RhoA proteina (**Slika 20A**), ni u aktivnosti ukupnih Rho proteina (**Slika 20B**) u jetri normalno uhranjenih pacova. Međutim, u jetri gojaznih životinja (HF+E2 grupa), E2 tretman dovodi do značajnog smanjenja nivoa RhoA proteina (**Slika 36A**), kao i aktivnosti ukupnih Rho proteina (**Slika 36B**). Rezultati, takođe, pokazuju da je nivo ROCK1 proteina nakon E2 tretmana nepromenjen u jetri normalno uhranjenih (**Slika 21A**) i gojaznih pacova (**Slika 37A**), dok je nivo ROCK2 proteina značajno povećan u jetri normalno uhranjenih (**Slika 21B**) i gojaznih pacova (**Slika 37B**), u odnosu na odgovarajuće kontrole.

Uzmajući u obzir rezultate ove disertacije može se zaključiti da je E2, u jetri normalno uhranjenih pacova, učestvovao u regulaciji enzima AOS zaštite i iNOS, nezavisno od RhoA, ROCK1 i AMPK α_1 . Sa druge strane, E2 tretman gojaznih pacova je smanjio nivo RhoA i aktivnost Rho proteina, uprkos povećanom nivou ROCK2 proteina, što ukazuje na smanjenu aktivaciju RhoA/ROCK signalnog puta kod ovih životinja. Kod istih životinja, E2 tretman je povećao aktivaciju AMPK α_1 , a smanjio aktivaciju ERK1/2, ekspresiju iNOS i nivo MDA u jetri. Na osnovu navedenih rezultata, može se pretpostaviti da povećana aktivacija AMPK α_1 u odgovoru na E2 dovodi do smanjenja aktivacije RhoA/ROCK signalnog puta [97] koji dalje smanjuje ekspresiju iNOS i proizvodnju MDA u jetri gojaznih pacova.

Pokazano je da hormon E2 učestvuje u regulaciji ekspresije miRNK, kao i da miRNK regulišu odgovor ER α na E2 stimulaciju [461, 462]. MikroRNK imaju različite uloge u ostvarivanju imunskih odgovora i procesa inflamacije [463]. U brojnim patološkim stanjima, poput gojaznosti i bolesti jetre, dolazi do poremećaja u regulaciji različitih miRNK [464-466]. U patogenezi dijabetesa i tumora, kao i nastanku IR, značajnu ulogu ima miR-221 [353, 467]. U jetri gojaznih miševa, miR-221 je visoko ekspimirana, a „utišavanje“ miR-221 može poboljšati osetljivost na insulin i smanjiti nivo glukoze u krvi [354]. Takođe, u različitim tipovima ćelija, uključujući i hepatocyte, pokazana je uloga miRNK u regulaciji ekspresije iNOS [468]. U nedavno objavljenoj studiji je pokazano da je prekomerna ekspresija miR-221 značajno povećala aktivaciju NF κ B i MAPK, što je povezano sa povećanom proizvodnjom proinflamacijskih citokina [336]. Takođe je pokazano i da inhibicija aktivacije NF κ B smanjuje ekspresiju miR-221 [469], što ukazuje da je miR-221 zavisna od NF κ B. Do sada objavljeni literaturni podaci ne sadrže podatke o ulozi koju miR-221 potencijalno može imati u ostvarivanju efekata E2 na ekspresiju iNOS u jetri.

U okviru ove doktorske disertacije je ispitan efekat E2 tretmana na ekspresiju miR-221 u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Dobijeni rezultati pokazuju da je ekspresija miR-221 nakon E2 tretmana značajno smanjena (**Slika 22**) u jetri normalno uhranjenih pacova u poređenju sa CONT grupom. Uloga miR-221 u inflamaciji je pokazana u nedavno objavljenoj studiji u kojoj je prekomerna ekspresija miR-221 značajno povećala aktivaciju NF κ B i MAPK, što je povezano sa povećanom proizvodnjom proinflamacijskih citokina [336]. Takođe je pokazano i da inhibicija aktivacije NF κ B smanjuje ekspresiju miR-221 [469], što ukazuje da je miR-221 zavisna od NF κ B. Smanjena ekspresija miR-221 nakon E2 tretmana se može dovesti u vezu sa nepromenjenim nivoima p50 i p65 subjedinica NF κ B u E2 grupi pacova. Osim toga, uzimajući u obzir podatke iz literature koji pokazuju da je aktivacija ERK1/2 neophodna za pokretanje ekspresije miR-221 [351], uočeno smanjenje nivoa fosforilacije ERK1/2 nakon E2 tretmana u ovoj disertaciji može biti objašnjenje smanjenog nivoa miR-221 u jetri E2 grupe pacova. Moguće je da E2 ostvaruje efekte na iNOS, u jetri normalno uhranjenih pacova, signalnim putevima koji uključuju ERK1/2 i miR-221, ali ne i NF κ B.

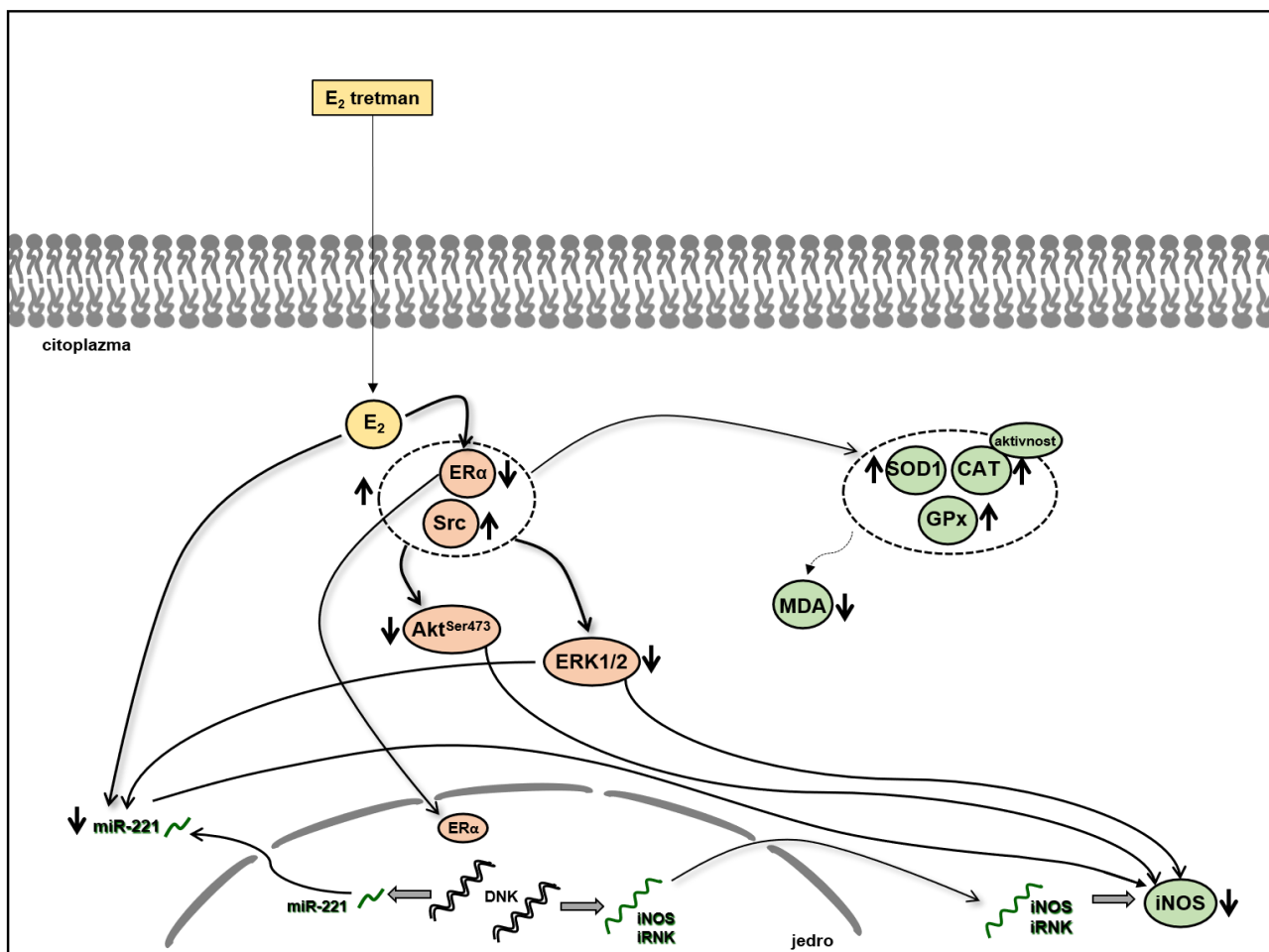
U jetri gojaznih pacova (HF grupa) nije došlo do značajne promene u nivou miR-221 u poređenju sa normalno uhranjenim životinjama, dok je E2 tretman gojaznih pacova (HF+E2 grupa) značajno povećao ekspresiju miR-221 (**Slika 38**). Poznato je da je stopa konverzije estrona u E2 u perifernim tkivima, naročito u adipoznom tkivu, veća kod gojaznih nego kod normalno uhranjenih ljudi, a nivo estrogena pozitivno koreliše sa masom tela [470]. Takođe, belo masno tkivo gojaznih

muškaraca ispoljava povišene nivoe aromataze što vodi povećanju nivoa estrogena [471]. Na osnovu navedenog se može pretpostaviti da je E2 tretman kod pacova iz HF+E2 grupe doveo do povećanja nivoa miR-221 usled sistemski povećanih nivoa E2, što je u saglasnosti sa povećanom ekspresijom miR-221 zapaženoj u tkivima kancera dojke zavisnog od estrogena [472]. Povećani nivo miR-221 bi mogao biti faktor koji doprinosi smanjenom nivou NF κ B-p65 proteina u jetri HF+E2 grupe pacova, s obzirom da miR-221 inicira degradaciju I κ B α [336], pri čemu se p65 subjedinica NF κ B oslobađa za translokaciju u jedro [407].

Pokazano je da nivo miR-221 može biti modulisan količinom produkovanog ROS [473]. Naime, „utišavanjem“ SOD2 posredstvom malih interferirajućih RNK blokira se ekspresija miR-221 [473]. Stoga, povećana ekspresija miR-221 u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova može biti posledica povećanja nivoa SOD2 proteina. Suprotno, u jetri E2 tretiranih normalno uhranjenih pacova, navedeni efekti E2 u regulaciji enzima AOS zaštite preko miR-221 nisu zapaženi.

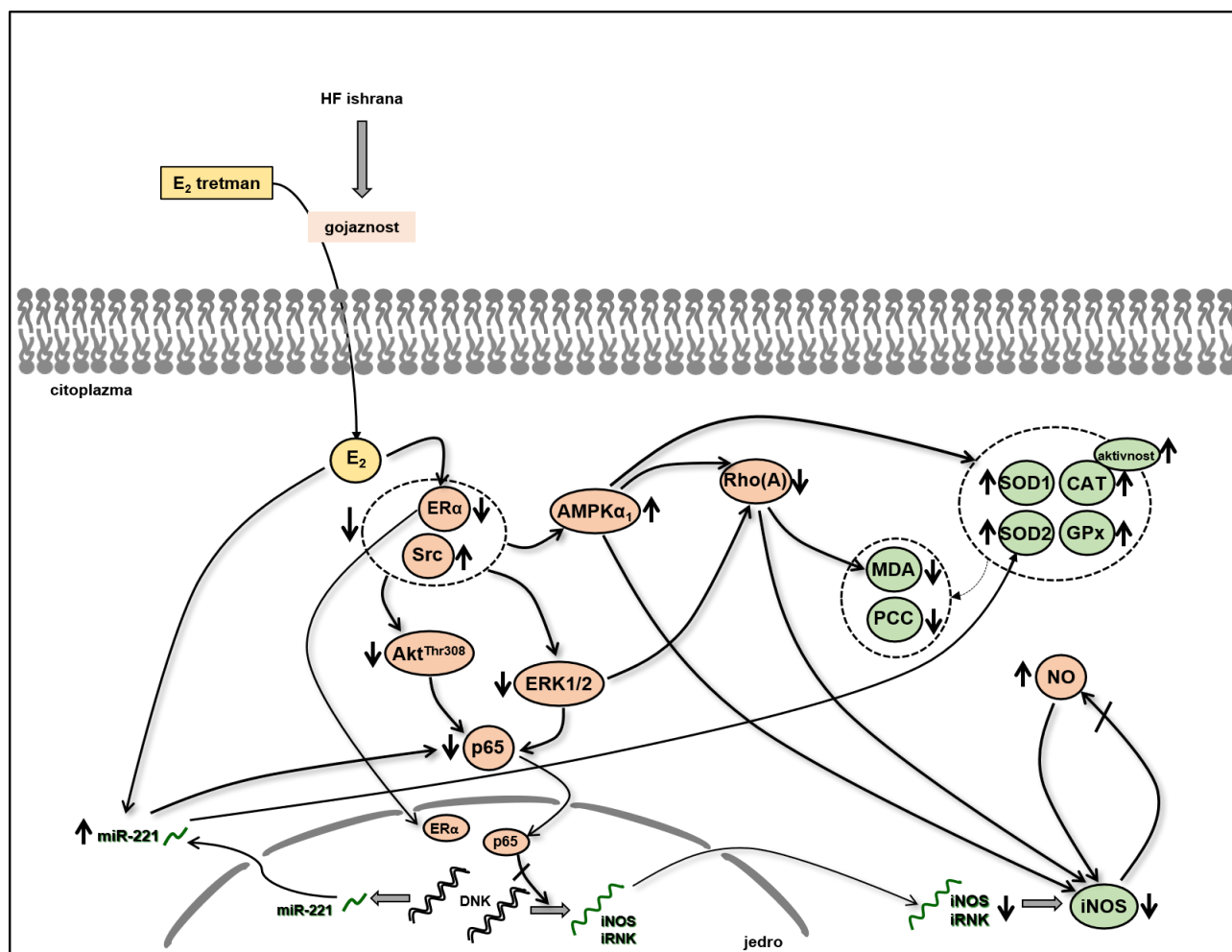
Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, predložen je mogući mehanizam *in vivo* efekata E2 na regulaciju enzima AOS zaštite i iNOS, u jetri normalno uhranjenih (**Slika 39**) i gojaznih mužjaka pacova (**Slika 40**).

U jetri E2 tretiranih normalno uhranjenih mužjaka pacova, E2 prolazi kroz membranu ćelije u citoplazmu, gde se vezuje za specifične receptore ER α , i tako formirani kompleksi ER α /E2 se translociraju iz citoplazme u jedro ćelije, što dovodi do smanjenja nivoa proteina ER α u citoplazmi. Pored toga, asocijacija ER α sa Src, povećava se nakon E2 tretmana što ukazuje na aktiviranje negenomskih E2 signalnih puteva. Aktivirani ER α učestvuje u povećanju nivoa enzima SOD1, GPx i CAT, koji posledično smanjuju nivo MDA u citoplazmi ćelija jetre. Zatim, redukovani nivo proteina iNOS u citoplazmi ćelija jetre može biti posledica smanjene aktivacije Akt i ERK1/2. Osim toga, E2 smanjuje ekspresiju miR-221. Dodatno, smanjena aktivacija ERK1/2 može uticati na ekspresiju transkripcionog regulatora miR-221, što doprinosi smanjenom nivou iNOS proteina (**Slika 39**).



Slika 39. Predloženi mehanizam *in vivo* efekata estradiola (E2) na regulaciju enzima antioksidativne (AOS) zaštite i inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS) u jetri normalno uhranjenih mužjaka pacova. Akt – protein kinaza B; CAT – katalaza; CAT^{aktivnost} – aktivnost katalaze; ER α – receptor za estrogene alfa; ERK1/2 vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1 i 2; GPx – glutation-peroksidaza; MDA – malon-dialedehid; miR-221 – mikroRNK-221; Ser – serin; SOD1 – superkosid-dismutaza 1; \uparrow - povećan nivo proteina/RNK; \downarrow - smanjen nivo proteina/RNK; \rightarrow - predloženi mehanizam.

U stanju gojaznosti, E2 tretman pozitivno regliše enzime AOS zaštite i negativno regliše enzim iNOS u jetri, aktivacijom negenomskog signalnog puta. U jetri E2 tretiranih gojaznih mužjaka pacova, E2 prolazi kroz membranu ćelije u citoplazmu, gde se vezuje za specifične receptore ER α . Formirani kompleksi ER α /E2 se translociraju iz citoplazme u jedro ćelije, doprinoseći smanjenom nivou proteina ER α u citoplazmi. Zatim, E2 tretman dovodi do smanjenja stepena asocijacije ER α sa Src, i smanjenja aktivacije ERK1/2 i Akt. Smanjena aktivacija Akt i ERK1/2 dovode do inhibicije transkripcionog faktora NF κ B-p65, što utiče na smanjen nivo iRNK za iNOS i posledično proteina. Dodatno, povećana ekspresija miR-221 utiče na smanjenje nivoa NF κ B-p65. Na smanjeni nivo iNOS proteina, takođe, utiču i povećana aktivacija AMPK α_1 , kao i smanjeni nivo RhoA proteina i smanjena aktivnost ukupnih Rho proteina. Osim toga, povećan nivo NO u jetri E2 tretiranih gojaznih pacova, regliše ekspresiju iNOS proteina mehanizmom negativne povratne sprege. Sa druge strane, tretman E2 pozitivno regliše enzime AOS zaštite, preko aktivacije AMPK α_1 , i posledično smanjuje nivoe MDA i PCC u jetri gojaznih pacova. Dodatno, povećana aktivacija AMPK α_1 i smanjena aktivacija ERK1/2 mogu uticati na smanjenje nivoa RhoA proteina i smanjenu aktivnost ukupnih Rho proteina, što takođe utiče na smanjenje nivoa MDA, dok povećana ekspresija miR-221 utiče na povećanje nivoa SOD2 (Slika 40).



Slika 40. Predloženi mehanizam *in vivo* efekata estradiola (E_2) na regulaciju enzima antioksidativne (AOS) zaštite i inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS) u jetri gojaznih mužjaka pacova. Akt – protein kinaza B; AMPK α_1 – protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom alfa 1; CAT – katalaza; CAT^{aktivnost} – aktivnost katalaze; ER α – receptor za estrogene alfa; ERK1/2 vanćelijskim signalima regulisana kinaza 1 i 2; HF – bogata mastima; GPx – glutation-peroksidaza; MDA – malon-dialedehid; miR-221 – mikroRNK-221; NF κ B-p65 – p65 subjedinica nuklearnog faktora kapa B; NO – azot-monoksid; PCC – nivo karbonilovanih proteina; SOD1/2 – superkosid dismutaza 1/2; Thr – treonin; ↑ - povećan nivo proteina/RNK; ↓ - smanjen nivo proteina/RNK; → - predloženi mehanizam.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata, dobijenih i prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci o efektima E2 u jetri mužjaka pacova:

- 1) E2 tretman kod normalno uhranjenih pacova dovodi do:
 - a) povećanja nivoa enzima SOD1, GPx i CAT;
 - b) smanjenja nivoa MDA;
 - c) smanjenja nivoa enzima iNOS;
 - d) smanjenja nivoa proteina ER α ;
 - e) povećanja nivoa kinaze Src, i nivoa asocijacije Src kinaze sa ER α ;
 - f) smanjenja nivoa fosforilacije kinaza ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i Akt na Ser⁴⁷³;
 - g) povećanja nivoa ROCK2 proteina;
 - h) smanjenja ekspresije posttranskripcionog regulatora miR-221.

- 2) E2 tretman kod gojaznih pacova, u patofiziološkim uslovima dovodi do:
 - a) povećanja nivoa svih ispitivanih enzima AOS zaštite – SOD1, SOD2, GPx i CAT;
 - b) povećanja aktivnosti enzima CAT;
 - c) smanjenja nivoa MDA i nivoa PCC;
 - d) smanjenja relativne ekspresije gena za iNOS, kao i nivoa iNOS proteina;
 - e) povećanja koncentracije NO₂⁻/NO₃⁻;
 - f) smanjenja nivoa p65 subjedinice transkripcionog faktora NF κ B;
 - g) smanjenja nivoa proteina ER α ;
 - h) povećanja nivoa kinaze Src i smanjenje nivoa ER α /Src asocijacije;
 - i) smanjenja nivoa fosforilacije kinaza ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i Akt na Thr³⁰⁸;
 - j) povećanja nivoa fosforilacije AMPK α ₁ na Thr¹⁷²;
 - k) smanjenja nivoa RhoA proteina, kao i aktivnosti ukupnih Rho proteina;
 - l) povećanja nivoa ROCK2 proteina;
 - m) povećanja ekspresije posttranskripcionog regulatora miR-221.

U ovoj doktorskoj disertaciji su pokazani zaštitni efekti E2 u jetri u fiziološkim i patofiziološkim uslovima, koji se ogledaju u povećanju nivoa i aktivnosti enzima AOS zaštite, smanjenju ispitanih parametara OS i smanjenju ekspresije iNOS. Osim toga, istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom doprinose sagledavanju molekularnih mehanizama kojima E2 učestvuje u regulaciji ekspresije i aktivnosti enzima AOS zaštite, i ekspresije iNOS enzima, u jetri normalno uhranjenih i gojaznih pacova. Ostvareni naučni rezultati u okviru ove doktorske disertacije bi mogli doprineti boljem razumevanju molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi delovanja E2, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima kao što je gojaznost, što je od velike važnosti za razvoj novih terapijskih pristupa u prevenciji i lečenju poremećaja u jetri nastalih u gojaznosti.

7. LITERATURA

1. Shen, M. and H. Shi, *Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis*. Int J Endocrinol, 2015. **2015**: p. 294278.
2. Shi, H., S.P. Kumar, and X. Liu, *G protein-coupled estrogen receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **114**: p. 193-250.
3. Fujimoto, M., et al., *A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1340-8.
4. Yki-Jarvinen, H., *Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 203-9.
5. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 635-46, viii-ix.
6. Griglio, S. and M.I. Malewiak, *Hepatic triglyceride storage and ketonemia in rats fed high fat diets*. Nutr Metab, 1975. **19**(3-4): p. 131-44.
7. Fabbrini, E., et al., *Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 424-31.
8. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
9. McFarlane, S.I., M. Banerji, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and cardiovascular disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 713-8.
10. Carmiel-Haggai, M., A.I. Cederbaum, and N. Nieto, *A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 136-8.
11. Ertunc, M.E. and G.S. Hotamisligil, *Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment*. Journal of Lipid Research, 2016. **57**(12): p. 2099-2114.
12. Strehlow, K., et al., *Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen*. Circ Res, 2003. **93**(2): p. 170-7.
13. Zancan, V., et al., *17Beta-estradiol decreases nitric oxide synthase II synthesis in vascular smooth muscle cells*. Endocrinology, 1999. **140**(5): p. 2004-9.
14. Cui, J., Y. Shen, and R. Li, *Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain*. Trends Mol Med, 2013. **19**(3): p. 197-209.
15. Mair, K.M., R. Gaw, and M.R. MacLean, *Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction - implications for pulmonary arterial hypertension*. Pulm Circ, 2020. **10**(3): p. 2045894020952019.
16. Simpson, E.R., et al., *Aromatase--a brief overview*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 93-127.
17. Schulster, M., A.M. Bernie, and R. Ramasamy, *The role of estradiol in male reproductive function*. Asian J Androl, 2016. **18**(3): p. 435-40.
18. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome pandemic*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 629-36.
19. Fuentes, N. and P. Silveyra, *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. **116**: p. 135-170.
20. Muller, R.E., et al., *Studies on the mechanism of estradiol uptake by rat uterine cells and on estradiol binding to uterine plasma membranes*. Adv Exp Med Biol, 1979. **117**: p. 401-21.
21. Jackson, V. and R. Chalkley, *The binding of estradiol-17 beta to the bovine endometrial nuclear membrane*. J Biol Chem, 1974. **249**(5): p. 1615-26.
22. Murphy, E., *Estrogen signaling and cardiovascular disease*. Circ Res, 2011. **109**(6): p. 687-96.
23. Miceli, V., et al., *Expression of wild-type and variant estrogen receptor alpha in liver carcinogenesis and tumor progression*. OMICS, 2011. **15**(5): p. 313-7.

24. Faulds, M.H., et al., *The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling*. J Endocrinol, 2012. **212**(1): p. 3-12.
25. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-70.
26. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 905-31.
27. Barnes, C.J., R.K. Vadlamudi, and R. Kumar, *Novel estrogen receptor coregulators and signaling molecules in human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(3): p. 281-91.
28. McDonnell, D.P. and S.E. Wardell, *The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(6): p. 620-8.
29. Safe, S. and K. Kim, *Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways*. J Mol Endocrinol, 2008. **41**(5): p. 263-75.
30. Arnold, S.F., et al., *Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(9): p. 1208-14.
31. Arnold, S.F., et al., *Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(1): p. 24-33.
32. Yuan, B., et al., *Tyrosine phosphorylation regulates ER β ubiquitination, protein turnover, and inhibition of breast cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(27).
33. Ohlsson, C., et al., *Phosphorylation site S122 in estrogen receptor alpha has a tissue-dependent role in female mice*. FASEB J, 2020. **34**(12): p. 15991-16002.
34. Monteiro, R., D. Teixeira, and C. Calhau, *Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation*. Mediators of Inflammation, 2014. **2014**: p. 615917.
35. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling*. Nucl Recept, 2004. **2**(1): p. 3.
36. Petz, L.N. and A.M. Nardulli, *Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(7): p. 972-85.
37. Pradhan, M., et al., *Proinflammatory cytokines enhance estrogen-dependent expression of the multidrug transporter gene ABCG2 through estrogen receptor and NF κ B cooperativity at adjacent response elements*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31100-6.
38. Mauvais-Jarvis, F., *Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(1): p. 24-33.
39. Mauvais-Jarvis, F., D.J. Clegg, and A.L. Hevener, *The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis*. Endocr Rev, 2013. **34**(3): p. 309-38.
40. Kow, L.M. and D.W. Pfaff, *Rapid estrogen actions on ion channels: A survey in search for mechanisms*. Steroids, 2016. **111**: p. 46-53.
41. Rosselli, M., et al., *Modulation of Cyclic AMP Levels in Fallopian Tube Cells by Natural and Environmental Estrogens*. Cells, 2021. **10**(5): p. 1250.
42. McNeill, A.M., et al., *Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone*. Stroke, 2002. **33**(6): p. 1685-91.
43. Khajah, M.A., P.M. Mathew, and Y.A. Luqmani, *Inhibitors of PI3K/ERK1/2/p38 MAPK Show Preferential Activity Against Endocrine-Resistant Breast Cancer Cells*. Oncol Res, 2017. **25**(8): p. 1283-1295.
44. Powell, E. and W. Xu, *Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 19012-7.
45. Frasor, J., et al., *Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus*. Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3159-66.
46. Maggiolini, M. and D. Picard, *The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor*. J Endocrinol, 2010. **204**(2): p. 105-14.

47. Wang, Z., et al., *A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9063-8.
48. Song, R.X., et al., *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 116-27.
49. Kim, J.Y., et al., *17 β -estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Int J Mol Med, 2012. **30**(4): p. 979-85.
50. Oviedo, P.J., et al., *Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **335**(2): p. 96-103.
51. Stice, J.P., et al., *Rapid activation of nuclear factor kappaB by 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators: pathways mediating cellular protection*. Shock, 2012. **38**(2): p. 128-36.
52. Kong, T., et al., *Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury*. Frontiers in Physiology, 2019. **10**.
53. Otto, C., et al., *GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice*. Biol Reprod, 2009. **80**(1): p. 34-41.
54. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.
55. Bunone, G., et al., *Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation*. EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2174-83.
56. Tremblay, A., et al., *Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1*. Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 513-9.
57. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
58. Liang, Q., et al., *The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7460-9.
59. Kehat, I. and J.D. Molkentin, *Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1188**: p. 96-102.
60. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.
61. Wang, S., E.J. Dougherty, and R.L. Danner, *PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics*. Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 76-85.
62. Ruiz-Alcaraz, A.J., et al., *Obesity-induced insulin resistance in human skeletal muscle is characterised by defective activation of p42/p44 MAP kinase*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56928.
63. Rajkhowa, M., et al., *Insulin resistance in polycystic ovary syndrome is associated with defective regulation of ERK1/2 by insulin in skeletal muscle in vivo*. Biochem J, 2009. **418**(3): p. 665-71.
64. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 513-609.
65. Sun, J., et al., *ER α phosphorylation at Y537 by Src triggers E6-AP-ER α binding, ER α ubiquitylation, promoter occupancy, and target gene expression*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(9): p. 1567-77.
66. Migliaccio, A., et al., *Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation*. EMBO J, 2000. **19**(20): p. 5406-17.
67. Wong, C.W., et al., *Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14783-8.

68. Kousteni, S., et al., *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity*. Cell, 2001. **104**(5): p. 719-30.
69. Cheskis, B.J., et al., *MNAR plays an important role in ER α activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways*. Steroids, 2008. **73**(9-10): p. 901-5.
70. Asarian, L. and N. Geary, *Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats*. Horm Behav, 2002. **42**(4): p. 461-71.
71. Castoria, G., et al., *PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 6050-9.
72. Simoncini, T., et al., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 538-41.
73. Song, R.X., et al., *The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2076-81.
74. Sun, M., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ER α) via interaction between ER α and PI3K*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 5985-91.
75. Downward, J., *Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 262-7.
76. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
77. Hresko, R.C. and M. Mueckler, *mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40406-16.
78. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
79. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
80. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
81. Hummasti, S. and G.S. Hotamisligil, *Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes*. Circ Res, 2010. **107**(5): p. 579-91.
82. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 1-16.
83. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
84. Juhasz, G., et al., *The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila*. J Cell Biol, 2008. **181**(4): p. 655-66.
85. Loirand, G., *Rho Kinases in Health and Disease: From Basic Science to Translational Research*. Pharmacological Reviews, 2015. **67**(4): p. 1074-1095.
86. Ellerbroek, S.M., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19023-31.
87. Sauzeau, V., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21722-9.
88. Rolli-Derkinderen, M., et al., *RhoA phosphorylation induces Rac1 release from guanine dissociation inhibitor alpha and stimulation of vascular smooth muscle cell migration*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(20): p. 4786-96.
89. Begum, N., et al., *Active Rho kinase (ROK- α) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6214-22.

90. Farah, S., et al., *A rho-associated protein kinase, ROKalpha, binds insulin receptor substrate-1 and modulates insulin signaling.* J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4740-6.
91. Furukawa, N., et al., *Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis.* Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 119-29.
92. Lim, M.J., et al., *RhoA/Rho kinase blocks muscle differentiation via serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2.* Mol Endocrinol, 2007. **21**(9): p. 2282-93.
93. Huang, Z.X., et al., *RhoA/ROCK pathway mediates the effect of oestrogen on regulating epithelial-mesenchymal transition and proliferation in endometriosis.* J Cell Mol Med, 2020. **24**(18): p. 10693-10704.
94. Moore, F., et al., *Up-regulation of p21- and RhoA-activated protein kinases in human pregnant myometrium.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(2): p. 322-6.
95. Simoncini, T., et al., *Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway.* Mol Endocrinol, 2006. **20**(8): p. 1756-71.
96. Fibbi, B., et al., *Estrogens regulate humans and rabbit epididymal contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway.* J Sex Med, 2009. **6**(8): p. 2173-86.
97. Gayard, M., et al., *AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2634-42.
98. Stice, J.P. and A.A. Knowlton, *Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response.* Mol Med, 2008. **14**(7-8): p. 517-27.
99. Steffan, R.J., et al., *Control of chronic inflammation with pathway selective estrogen receptor ligands.* Curr Top Med Chem, 2006. **6**(2): p. 103-11.
100. Kalaitzidis, D. and T.D. Gilmore, *Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB.* Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(2): p. 46-52.
101. Gionet, N., et al., *NF-kappaB and estrogen receptor alpha interactions: Differential function in estrogen receptor-negative and -positive hormone-independent breast cancer cells.* J Cell Biochem, 2009. **107**(3): p. 448-59.
102. Gauthier, M.S., et al., *Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(1): p. 382-7.
103. Yang, Z., et al., *Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1.* J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19051-9.
104. Ko, H.J., et al., *Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart.* Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2536-46.
105. Sag, D., et al., *Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8633-41.
106. Villa, A., et al., *Tetradian oscillation of estrogen receptor alpha is necessary to prevent liver lipid deposition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(29): p. 11806-11.
107. Trapani, L., M. Segatto, and V. Pallottini, *Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic "power station".* World J Hepatol, 2012. **4**(6): p. 184-90.
108. Nigro, M., et al., *A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats.* Endocrinology, 2014. **155**(8): p. 2881-91.
109. Jones, M.E., et al., *Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12735-40.
110. Fisher, C.R., et al., *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6965-70.
111. Takeda, K., et al., *Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency.* J Endocrinol, 2003. **176**(2): p. 237-46.

112. Simpson, E.R., et al., *Estrogen--the good, the bad, and the unexpected*. *Endocr Rev*, 2005. **26**(3): p. 322-30.
113. Gao, H., et al., *Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(6): p. 1287-99.
114. Barton, M. and E.R. Prossnitz, *Emerging roles of GPER in diabetes and atherosclerosis*. *Trends Endocrinol Metab*, 2015. **26**(4): p. 185-92.
115. Scheen, A.J., et al., *Effects of a 1-year treatment with a low-dose combined oral contraceptive containing ethinyl estradiol and cyproterone acetate on glucose and insulin metabolism*. *Fertil Steril*, 1993. **59**(4): p. 797-802.
116. Van Pelt, R.E., et al., *Intravenous estrogens increase insulin clearance and action in postmenopausal women*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(2): p. E311-7.
117. Ahmed-Sorour, H. and C.J. Bailey, *Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis, glycogen formation and gluconeogenesis*. *Ann Nutr Metab*, 1981. **25**(4): p. 208-12.
118. Bryzgalova, G., et al., *Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver*. *Diabetologia*, 2006. **49**(3): p. 588-97.
119. Morishima, A., et al., *Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(12): p. 3689-98.
120. Bilezikian, J.P., et al., *Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(9): p. 599-603.
121. Rochira, V., et al., *Oestradiol replacement treatment and glucose homeostasis in two men with congenital aromatase deficiency: evidence for a role of oestradiol and sex steroids imbalance on insulin sensitivity in men*. *Diabet Med*, 2007. **24**(12): p. 1491-5.
122. Linner, C., et al., *Estrogen receptor alpha single nucleotide polymorphism as predictor of diabetes type 2 risk in hypogonadal men*. *Aging Male*, 2013. **16**(2): p. 52-7.
123. Alvaro, D., et al., *Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1681-91.
124. SZO, *Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation*. 2000, World Health Organization: Geneva.
125. Tseng, Y.H., A.M. Cypess, and C.R. Kahn, *Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(6): p. 465-82.
126. Shuster, A., et al., *The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis*. *Br J Radiol*, 2012. **85**(1009): p. 1-10.
127. Poirier, P., et al., *Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 898-918.
128. Seyda Seydel, G., et al., *Economic growth leads to increase of obesity and associated hepatocellular carcinoma in developing countries*. *Ann Hepatol*, 2016. **15**(5): p. 662-72.
129. Mittal, B., *Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue*. *Indian J Med Res*, 2019. **149**(5): p. 571-573.
130. Bonadonna, R.C., et al., *Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study*. *Metabolism*, 1990. **39**(5): p. 452-9.
131. Hunter, S.J. and W.T. Garvey, *Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system*. *Am J Med*, 1998. **105**(4): p. 331-45.
132. Hardy, O.T., M.P. Czech, and S. Corvera, *What causes the insulin resistance underlying obesity?* *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2012. **19**(2): p. 81-7.

133. Li, M., et al., *Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022. **7**(1): p. 216.
134. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 165-9.
135. Chait, A. and L.J. den Hartigh, *Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 22.
136. Rocha, V.Z. and P. Libby, *Obesity, inflammation, and atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(6): p. 399-409.
137. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
138. Cerf, M.E., *Beta cell dysfunction and insulin resistance*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 37.
139. Langlois, A., et al., *Crosstalk Communications Between Islets Cells and Insulin Target Tissue: The Hidden Face of Iceberg*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 836344.
140. Mair, K.M., R. Gaw, and M.R. MacLean, *Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction – implications for pulmonary arterial hypertension*. Pulmonary Circulation, 2020. **10**(3): p. 2045894020952019.
141. Eaton, S.A. and J.K. Sethi, *Immunometabolic Links between Estrogen, Adipose Tissue and Female Reproductive Metabolism*. Biology (Basel), 2019. **8**(1).
142. D'Eon, T.M., et al., *Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 35983-91.
143. Espeland, M.A., et al., *Effect of postmenopausal hormone therapy on lipoprotein(a) concentration*. PEPI Investigators. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. Circulation, 1998. **97**(10): p. 979-86.
144. Walton, C., et al., *The effects of the menopause on insulin sensitivity, secretion and elimination in non-obese, healthy women*. Eur J Clin Invest, 1993. **23**(8): p. 466-73.
145. Kannel, W.B., et al., *Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study*. J Clin Epidemiol, 1991. **44**(2): p. 183-90.
146. Lee, C.G., et al., *Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1104-10.
147. Simpson, E.R., *Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression*. Semin Reprod Med, 2004. **22**(1): p. 11-23.
148. Hart-Unger, S. and K.S. Korach, *Estrogens and obesity: is it all in our heads?* Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 435-6.
149. Meirelles, R.M., *[Menopause and metabolic syndrome]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2014. **58**(2): p. 91-6.
150. Clegg, D.J., et al., *Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 978-87.
151. Boldarine, V.T., et al., *Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020. **319**(2): p. E427-E437.
152. Zhu, L., et al., *Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance*. Diabetes, 2013. **62**(2): p. 424-34.
153. Dakin, R.S., et al., *Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(10): p. 1539-47.
154. Toda, K., et al., *Lack of 17 β -estradiol reduces sensitivity to insulin in the liver and muscle of male mice*. Heliyon, 2018. **4**(9): p. e00772.
155. Homma, H., et al., *Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11404-11.

156. Takaki, A., D. Kawai, and K. Yamamoto, *Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(10): p. 20704-28.
157. Forrester, S.J., et al., *Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling*. *Circ Res*, 2018. **122**(6): p. 877-902.
158. van der Vliet, A., Y.M.W. Janssen-Heininger, and V. Anathy, *Oxidative stress in chronic lung disease: From mitochondrial dysfunction to dysregulated redox signaling*. *Mol Aspects Med*, 2018. **63**: p. 59-69.
159. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. *Curr Biol*, 2014. **24**(10): p. R453-62.
160. Li, S., et al., *The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(11): p. 26087-124.
161. Zhang, L., et al., *Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation*. *Redox Biol*, 2019. **26**: p. 101284.
162. Campbell, E.L. and S.P. Colgan, *Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. **16**(2): p. 106-120.
163. Hercberg, S., et al., *The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals*. *Arch Intern Med*, 2004. **164**(21): p. 2335-42.
164. Halliwell, B., J. Rafter, and A. Jenner, *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?* *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1 Suppl): p. 268S-276S.
165. Dysken, M.W., et al., *Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial*. *JAMA*, 2014. **311**(1): p. 33-44.
166. Ighodaro, O.M. and O.A. Akinloye, *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018. **54**(4): p. 287-293.
167. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. *Annu Rev Biochem*, 1995. **64**: p. 97-112.
168. Dringen, R., P.G. Pawlowski, and J. Hirrlinger, *Peroxide detoxification by brain cells*. *J Neurosci Res*, 2005. **79**(1-2): p. 157-65.
169. Miao, L. and D.K. St Clair, *Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(4): p. 344-56.
170. Bresciani, G., et al., *The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors*. *Free Radic Res*, 2013. **47**(10): p. 781-92.
171. Banks, C.J. and J.L. Andersen, *Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications*. *Redox Biol*, 2019. **26**: p. 101270.
172. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(3): p. 337-49.
173. Zamocky, M. and F. Koller, *Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999. **72**(1): p. 19-66.
174. Chelikani, P., I. Fita, and P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(2): p. 192-208.
175. Radi, R., et al., *Detection of catalase in rat heart mitochondria*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(32): p. 22028-34.
176. Arai, M., et al., *Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **227**(2): p. 433-9.
177. Toppo, S., et al., *Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(9): p. 1501-14.

178. Kim, Y.W., et al., *Rescue strategy for acute carotid stent thrombosis during carotid stenting with distal filter protection using forced arterial suction thrombectomy with a reperfusion catheter of the Penumbra System: a technical note*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2013. **155**(8): p. 1583-8.
179. Rotruck, J.T., et al., *Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase*. *Science*, 1973. **179**(4073): p. 588-90.
180. Flohe, L., W.A. Gunzler, and H.H. Schock, *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. *FEBS Lett*, 1973. **32**(1): p. 132-4.
181. Toppo, S., et al., *Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(11): p. 1486-500.
182. Ursini, F., M. Maiorino, and H.J. Forman, *Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living*. *Redox Biol*, 2016. **8**: p. 205-15.
183. Lubos, E., et al., *Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(41): p. 35407-35417.
184. Outten, C.E. and V.C. Culotta, *Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7785-91.
185. Couto, N., et al., *Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(6): p. 2885-94.
186. Ge, C., et al., *Import determinants of organelle-specific and dual targeting peptides of mitochondria and chloroplasts in *Arabidopsis thaliana**. *Mol Plant*, 2014. **7**(1): p. 121-36.
187. Chakravarthi, S., C.E. Jessop, and N.J. Bulleid, *The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(3): p. 271-5.
188. Yu, J. and C.Z. Zhou, *Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Proteins*, 2007. **68**(4): p. 972-9.
189. Karplus, P.A. and G.E. Schulz, *Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution*. *J Mol Biol*, 1987. **195**(3): p. 701-29.
190. Mittl, P.R. and G.E. Schulz, *Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocytes*. *Protein Sci*, 1994. **3**(5): p. 799-809.
191. Forman, H.J., M. Maiorino, and F. Ursini, *Signaling functions of reactive oxygen species*. *Biochemistry*, 2010. **49**(5): p. 835-42.
192. Angelova, P.R. and A.Y. Abramov, *Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration*. *FEBS Lett*, 2018. **592**(5): p. 692-702.
193. Hensley, K., et al., *Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(10): p. 1456-62.
194. Rzheshhevsky, A.V., *Fatal "triad": lipotoxicity, oxidative stress, and phenoptosis*. *Biochemistry (Mosc)*, 2013. **78**(9): p. 991-1000.
195. Tereshin, E.V., *[A role of fatty acids in the development of oxidative stress in aging. A hypothesis]*. *Adv Gerontol*, 2007. **20**(1): p. 59-65.
196. Duvnjak, M., et al., *Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(34): p. 4539-50.
197. Goossens, G.H., *The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance*. *Physiol Behav*, 2008. **94**(2): p. 206-18.
198. Yang, J., J. Kang, and Y. Guan, *The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes*. *Front Med*, 2013. **7**(4): p. 433-44.
199. Rindler, P.M., et al., *High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(3): p. 1979-90.

200. Susantiningsih, T., et al., *The Effect of Treadmill Treatment on Oxidative Stress Markers and Endogenous Antioxidant Status in Obesity Mice*. Open Access Maced J Med Sci, 2018. **6**(10): p. 1803-1808.
201. Viroonudomphol, D., et al., *Erythrocyte antioxidant enzymes and blood pressure in relation to overweight and obese Thai in Bangkok*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2000. **31**(2): p. 325-34.
202. Mittal, P.C. and R. Kant, *Correlation of increased oxidative stress to body weight in disease-free post menopausal women*. Clin Biochem, 2009. **42**(10-11): p. 1007-11.
203. Olivares-Corichi, I.M., et al., *Oxidative stress present in the blood from obese patients modifies the structure and function of insulin*. Horm Metab Res, 2011. **43**(11): p. 748-53.
204. Hopps, E., et al., *A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(1): p. 72-7.
205. Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 450-5.
206. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
207. Albano, E., et al., *Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis*. Gut, 2005. **54**(7): p. 987-93.
208. Begrich, K., et al., *Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2013. **58**(4): p. 1497-507.
209. Chitturi, S. and G.C. Farrell, *Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 27-41.
210. Begrich, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion, 2006. **6**(1): p. 1-28.
211. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease*. J Hepatol, 2005. **42**(6): p. 928-40.
212. Mansouri, A., C.H. Gattolliat, and T. Asselah, *Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases*. Gastroenterology, 2018. **155**(3): p. 629-647.
213. Chen, L., et al., *Tripartite Motif 8 Contributes to Pathological Cardiac Hypertrophy Through Enhancing Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase 1-Dependent Signaling Pathways*. Hypertension, 2017. **69**(2): p. 249-258.
214. Wang, P.X., et al., *Interferon regulatory factor 9 is a key mediator of hepatic ischemia/reperfusion injury*. J Hepatol, 2015. **62**(1): p. 111-20.
215. Hu, J., et al., *Targeting TRAF3 signaling protects against hepatic ischemia/reperfusion injury*. J Hepatol, 2016. **64**(1): p. 146-59.
216. Gus'kova, R.A., et al., *Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide (O₂⁻) radicals*. Biochim Biophys Acta, 1984. **778**(3): p. 579-85.
217. Madesh, M. and G. Hajnoczky, *VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release*. J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 1003-15.
218. Yin, X., et al., *Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening*. J Mol Endocrinol, 2015. **55**(3): p. 169-81.
219. Mantena, S.K., et al., *High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 183-93.
220. Borrás, C., et al., *Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2010. **1802**(1): p. 205-211.
221. Massafra, C., et al., *Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle*. J Endocrinol, 2000. **167**(3): p. 447-52.

222. Bednarek-Tupikowska, G., et al., *Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women*. *Gynecol Endocrinol*, 2001. **15**(4): p. 298-303.
223. Serviddio, G., et al., *Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(6): p. 2843-8.
224. Chang, S.P., et al., *Effects of hormonal replacement therapy on oxidative stress and total antioxidant capacity in postmenopausal hemodialysis patients*. *Ren Fail*, 2002. **24**(1): p. 49-57.
225. Bednarek-Tupikowska, G., et al., *Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy*. *Gynecol Endocrinol*, 2004. **19**(2): p. 57-63.
226. Ruiz-Larrea, M.B., et al., *Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes*. *Rev Esp Fisiol*, 1997. **53**(2): p. 225-9.
227. Borrás, C., et al., *17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade*. *Aging Cell*, 2005. **4**(3): p. 113-8.
228. Ha, B.J., *Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate*. *Arch Pharm Res*, 2004. **27**(8): p. 867-72.
229. Baltgalvis, K.A., et al., *Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10164.
230. Baeza, I., et al., *Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats*. *Biogerontology*, 2010. **11**(6): p. 687-701.
231. Muthusami, S., et al., *Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats*. *Clin Chim Acta*, 2005. **360**(1-2): p. 81-6.
232. Hamden, K., et al., *Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol*. *Steroids*, 2008. **73**(5): p. 495-501.
233. Kander, M.C., Y. Cui, and Z. Liu, *Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017. **21**(5): p. 1024-1032.
234. Li, H. and T.L. Poulos, *Structure-function studies on nitric oxide synthases*. *J Inorg Biochem*, 2005. **99**(1): p. 293-305.
235. Hill, B.G., et al., *What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(26): p. 19699-704.
236. Kone, B.C., et al., *Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **285**(2): p. F178-90.
237. Kleinert, H., et al., *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **500**(1-3): p. 255-66.
238. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. *Hypertension*, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
239. Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(6 Pt 1): p. E829-39.
240. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Nitric oxide and the vascular endothelium*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 1): p. 213-54.
241. Dudzinski, D.M. and T. Michel, *Life history of eNOS: partners and pathways*. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(2): p. 247-60.
242. Shen, W., et al., *Lipoamide or lipoic acid stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the endothelial NO synthase-cGMP-protein kinase G signalling pathway*. *Br J Pharmacol*, 2011. **162**(5): p. 1213-24.

243. Tedesco, L., et al., *Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes*. *Diabetes*, 2008. **57**(8): p. 2028-36.
244. Mei, Y. and S. Thevananther, *Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice*. *Hepatology*, 2011. **54**(5): p. 1777-89.
245. Vazquez-Chantada, M., et al., *Evidence for LKB1/AMP-activated protein kinase/ endothelial nitric oxide synthase cascade regulated by hepatocyte growth factor, S-adenosylmethionine, and nitric oxide in hepatocyte proliferation*. *Hepatology*, 2009. **49**(2): p. 608-17.
246. Zimmermann, H., et al., *Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejuno-stomy in the rat*. *J Hepatol*, 1996. **25**(4): p. 567-73.
247. Oess, S., et al., *Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases*. *Biochem J*, 2006. **396**(3): p. 401-9.
248. Sessa, W.C., *eNOS at a glance*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 12): p. 2427-9.
249. Balligand, J.L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(2): p. 481-534.
250. Finocchietto, P.V., et al., *Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. **234**(9): p. 1020-8.
251. Kato, K. and C. Giulivi, *Critical overview of mitochondrial nitric-oxide synthase*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 2725-38.
252. Stuehr, D.J., J. Tejero, and M.M. Haque, *Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: electron transfer through the nitric oxide synthase flavoprotein domain*. *FEBS J*, 2009. **276**(15): p. 3959-74.
253. Campbell, M.G., et al., *Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(35): p. E3614-23.
254. Santolini, J., *What does "NO-Synthase" stand for?* *FBL*, 2019. **24**(1): p. 129-167.
255. Wu, J., et al., *Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis*. *Exp Brain Res*, 1998. **118**(4): p. 457-65.
256. Closs, E.I., et al., *Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(1): p. 68-74.
257. Mori, M. and T. Gotoh, *Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(3): p. 715-9.
258. El-Gayar, S., et al., *Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages*. *J Immunol*, 2003. **171**(9): p. 4561-8.
259. Mori, M., *Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling*. *J Nutr*, 2007. **137**(6 Suppl 2): p. 1616S-1620S.
260. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells*. *Kidney Int*, 1994. **46**(5): p. 1302-6.
261. Ionova, I.A., et al., *Deficient BH4 production via de novo and salvage pathways regulates NO responses to cytokines in adult cardiac myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(5): p. H2178-87.
262. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 323-50.
263. Geller, D.A. and T.R. Billiar, *Molecular biology of nitric oxide synthases*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(1): p. 7-23.
264. Mankan, A.K., et al., *NF-kappaB regulation: the nuclear response*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(4): p. 631-43.

265. Basak, S. and A. Hoffmann, *Crosstalk via the NF-kappaB signaling system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 187-97.
266. Kleinert, H., et al., *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(1): p. 15-21.
267. Pascual, G. and C.K. Glass, *Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(8): p. 321-7.
268. Mukaida, N., et al., *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13289-95.
269. Jeon, Y.J., et al., *Inhibition of NF-kappa B/Rel nuclear translocation by dexamethasone: mechanism for the inhibition of iNOS gene expression*. Biochem Mol Biol Int, 1998. **45**(3): p. 435-41.
270. Yu, Z., W. Zhang, and B.C. Kone, *Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 1): p. 97-105.
271. De Vera, M.E., et al., *Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B*. Am J Physiol, 1997. **273**(6): p. G1290-6.
272. Saura, M., et al., *Involvement of transcriptional mechanisms in the inhibition of NOS2 expression by dexamethasone in rat mesangial cells*. Kidney Int, 1998. **53**(1): p. 38-49.
273. Thomas, D.D., et al., *The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 355-60.
274. Melikian, N., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(8): p. 256-62.
275. Togashi, H., et al., *A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **262**(1): p. 343-7.
276. Toda, N., K. Ayajiki, and T. Okamura, *Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase*. J Hypertens, 2009. **27**(10): p. 1929-40.
277. Kim, N., et al., *A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle*. J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 112-8.
278. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
279. Anand, P. and J.S. Stamler, *Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(3): p. 233-44.
280. Vanin, A.F., *Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology*. Nitric Oxide, 2009. **21**(1): p. 1-13.
281. Kroncke, K.D. and L.O. Klotz, *Zinc fingers as biologic redox switches?* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(5): p. 1015-27.
282. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.
283. Beckman, J.S., *Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases*. Arch Biochem Biophys, 2009. **484**(2): p. 114-6.
284. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 295-311.
285. Xu, S., et al., *Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2220-7.
286. Koeck, T., D.J. Stuehr, and K.S. Aulak, *Mitochondria and regulated tyrosine nitration*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1399-403.
287. Aulak, K.S., et al., *Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12056-61.

288. Sawa, T. and H. Ohshima, *Nitrative DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis*. Nitric Oxide, 2006. **14**(2): p. 91-100.
289. Jones, L.H., *Chemistry and biology of biomolecule nitration*. Chem Biol, 2012. **19**(9): p. 1086-92.
290. Bender, S.B., et al., *Diet-induced obesity and diabetes reduce coronary responses to nitric oxide due to reduced bioavailability in isolated mouse hearts*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9**(5): p. 688-96.
291. Kim, F., et al., *Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1982-8.
292. Higashi, Y., et al., *Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension*. Am J Hypertens, 2001. **14**(10): p. 1038-45.
293. Gruber, H.J., et al., *Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(5): p. 826-31.
294. Georgescu, A., et al., *Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(10): p. 463-72.
295. Sansbury, B.E., et al., *Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1176-89.
296. Valerio, A., et al., *TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2791-8.
297. Neumann, P., N. Gertzberg, and A. Johnson, *TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(2): p. L452-9.
298. Shimabukuro, M., et al., *Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 290-5.
299. Noronha, B.T., et al., *Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1082-9.
300. Sugita, H., et al., *Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 14203-11.
301. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
302. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
303. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 16-23.
304. Shimabukuro, M., et al., *Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32487-90.
305. Sharma, K., et al., *Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(1): p. 80-8.
306. Ceriello, A., et al., *Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1076-82.
307. Sugita, H., et al., *Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(2): p. E386-94.
308. Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4705-8.
309. Merial, C., et al., *Nitric oxide-dependent downregulation of adipocyte UCP-2 expression by tumor necrosis factor-alpha*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(4): p. C1100-6.
310. Carvalho-Filho, M.A., et al., *S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 959-67.

311. Carvalho-Filho, M.A., et al., *Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(3): p. E476-82.
312. Perreault, M. and A. Marette, *Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1138-43.
313. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
314. Leifeld, L., et al., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure*. J Hepatol, 2002. **37**(5): p. 613-9.
315. Taylor, B.S., L.H. Alarcon, and T.R. Billiar, *Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function*. Biochemistry (Mosc), 1998. **63**(7): p. 766-81.
316. García-Monzón, C., et al., *Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 331-8.
317. Szabó, C., G.J. Southan, and C. Thiemermann, *Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourrea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12472-6.
318. Dallaire, P., et al., *Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 1999-2011.
319. Charbonneau, A. and A. Marette, *Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins*. Diabetes, 2010. **59**(4): p. 861-71.
320. Wan, G., S. Ohnomi, and N. Kato, *Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(3): p. 555-61.
321. Ha, S.K. and C. Chae, *Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity*. Exp Anim, 2010. **59**(5): p. 595-604.
322. Shinozaki, S., et al., *Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34959-75.
323. Chen, Y., et al., *Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(1): p. 45-51.
324. Rai, R.M., et al., *Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13829-34.
325. Binko, J. and H. Majewski, *17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS*. Am J Physiol, 1998. **274**(3): p. H853-9.
326. Ardelt, A.A., et al., *Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model*. Stroke, 2005. **36**(2): p. 337-41.
327. Darblade, B., et al., *Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 413-9.
328. Ghisletti, S., et al., *17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2957-68.
329. Le May, C., et al., *Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9232-7.
330. Cignarella, A., et al., *Distinct roles of estrogen receptor-alpha and beta in the modulation of vascular inducible nitric-oxide synthase in diabetes*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(1): p. 174-82.
331. Shimizu, T., et al., *The role of estrogen receptor subtypes in ameliorating hepatic injury following trauma-hemorrhage*. J Hepatol, 2007. **46**(6): p. 1047-54.

332. Evans, M.J., et al., *Estrogen receptor alpha inhibits IL-1beta induction of gene expression in the mouse liver*. *Endocrinology*, 2002. **143**(7): p. 2559-70.
333. Fujita, K., et al., *Nitric oxide plays a crucial role in the development/progression of nonalcoholic steatohepatitis in the choline-deficient, l-amino acid-defined diet-fed rat model*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010. **34 Suppl 1**: p. S18-24.
334. Garcia-Monzon, C., et al., *Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity*. *J Hepatol*, 2000. **33**(5): p. 716-24.
335. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes*. *Hepatology*, 2006. **44**(4): p. 865-73.
336. Zhao, D., et al., *MiR-221 activates the NF-kappaB pathway by targeting A20*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **472**(1): p. 11-8.
337. Zafirovic, S., et al., *Involvement of PI3K, Akt and RhoA in Oestradiol Regulation of Cardiac iNOS Expression*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2019. **17**(3): p. 307-318.
338. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
339. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
340. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
341. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
342. Goth, L., *A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range*. *Clin Chim Acta*, 1991. **196**(2-3): p. 143-51.
343. Van Lente, F. and M. Pepoy, *Coupled-enzyme determination of catalase activity in erythrocytes*. *Clin Chem*, 1990. **36**(7): p. 1339-43.
344. Draper, H.H. and M. Hadley, *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 421-31.
345. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 407-21.
346. Hevel, J.M. and M.A. Marletta, *Nitric-oxide synthase assays*. *Methods Enzymol*, 1994. **233**: p. 250-8.
347. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
348. Conde de la Rosa, L., et al., *Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases*. *J Hepatol*, 2006. **44**(5): p. 918-29.
349. Lee, K. and W.J. Esselman, *Inhibition of PTPs by H(2)O(2) regulates the activation of distinct MAPK pathways*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(8): p. 1121-32.
350. Mao, Y., et al., *Ghrelin protects against palmitic acid or lipopolysaccharide-induced hepatocyte apoptosis through inhibition of MAPKs/iNOS and restoration of Akt/eNOS pathways*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **84**: p. 305-313.
351. Dai, R., et al., *miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27(Kip1)- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation*. *Biol Chem*, 2010. **391**(7): p. 791-801.
352. Pilon, G., P. Dallaire, and A. Marette, *Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 20767-74.
353. Li, S., et al., *Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(9): p. 1756-65.

354. Ogawa, T., et al., *MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis*. Gut, 2012. **61**(11): p. 1600-9.
355. Stanimirovic, J., *Polne razlike u regulaciji ekspresije i aktivnosti inducibilne azot-monoksid-sintaze i natrijum-kalijumove pumpe u jetri gojaznih pacova*. PhD. 2018, Belgrade.
356. Stanimirovic, J., et al., *A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats*. Nitric Oxide, 2016. **54**: p. 51-9.
357. Stanimirovic, J., et al., *Regulation of hepatic Na(+)/K(+)-ATPase in obese female and male rats: involvement of ERK1/2, AMPK, and Rho/ROCK*. Mol Cell Biochem, 2018. **440**(1-2): p. 77-88.
358. Need, A.G., et al., *Relationship between fasting serum glucose, age, body mass index and serum 25 hydroxyvitamin D in postmenopausal women*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **62**(6): p. 738-41.
359. Liu, Z., et al., *High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0128274.
360. Reddy, J.K. and M.S. Rao, *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G852-8.
361. Bellanti, F., et al., *Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 340-6.
362. Stirone, C., et al., *Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(1): p. 105-13.
363. Ospina, J.A., et al., *Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H2010-9.
364. Obradovic, M., et al., *Estradiol in vivo induces changes in cardiomyocytes size in obese rats*. Angiology, 2015. **66**(1): p. 25-35.
365. Obradovic, M., et al., *Effects of 17beta-estradiol on cardiac Na(+)/K(+)-ATPase in high fat diet fed rats*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **416**: p. 46-56.
366. Zafirovic, S., et al., *17β-Estradiol protects against the effects of a high fat diet on cardiac glucose, lipid and nitric oxide metabolism in rats*. Mol Cell Endocrinol, 2017. **446**: p. 12-20.
367. Palmisano, B.T., L. Zhu, and J.M. Stafford, *Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1043**: p. 227-256.
368. Zhu, L., et al., *Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2014. **306**(10): p. E1188-E1197.
369. Handgraaf, S., et al., *Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERalpha activation function-2 (ERalphaAF-2), whereas ERalphaAF-1 is dispensable*. Diabetes, 2013. **62**(12): p. 4098-108.
370. Hao, L., et al., *Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment*. Eur J Appl Physiol, 2010. **109**(5): p. 879-86.
371. Stubbins, R.E., et al., *Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(1): p. 58-66.
372. Koricanac, G., et al., *Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase*. Eur J Pharmacol, 2011. **655**(1-3): p. 23-30.
373. Barbacanne, M.A., et al., *Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 672-81.
374. Ren, J., et al., *Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1800-7.

375. Wu, Q., et al., *Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(9): p. 1034-43.
376. Richardson, J.R., et al., *Insulin resistant rats display enhanced rewarding effects of nicotine*. *Drug Alcohol Depend*, 2014. **140**: p. 205-7.
377. Woods, S.C., et al., *A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats*. *J Nutr*, 2003. **133**(4): p. 1081-7.
378. Buettner, R., J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer, *High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents*. *Obesity (Silver Spring)*, 2007. **15**(4): p. 798-808.
379. Xia, S.F., et al., *Regressive Effect of Myricetin on Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet*. *Nutrients*, 2016. **8**(12).
380. Albrahim, T. and M.A. Alonazi, *Lycopene corrects metabolic syndrome and liver injury induced by high fat diet in obese rats through antioxidant, anti-inflammatory, antifibrotic pathways*. *Biomed Pharmacother*, 2021. **141**: p. 111831.
381. Noeman, S.A., H.E. Hamooda, and A.A. Baalash, *Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats*. *Diabetol Metab Syndr*, 2011. **3**(1): p. 17.
382. Gasparini, P.V.F., et al., *High-Fat and Combined High-Fat and Sucrose Diets Promote Cardiac Oxidative Stress Independent of Nox2 Redox Regulation and Obesity in Rats*. *Cell Physiol Biochem*, 2021. **55**(5): p. 618-634.
383. Ozgonul, M., et al., *The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats*. *Endocr Res*, 2003. **29**(2): p. 183-9.
384. Hamden, K., et al., *Protective effect of 17beta-estradiol on oxidative stress and liver dysfunction in aged male rats*. *J Physiol Biochem*, 2007. **63**(3): p. 195-201.
385. Sobocanec, S., et al., *The role of 17beta-estradiol in the regulation of antioxidant enzymes via the Nrf2-Keap1 pathway in the livers of CBA/H mice*. *Life Sci*, 2015. **130**: p. 57-65.
386. Olusi, S.O., *Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002. **26**(9): p. 1159-64.
387. Uzun, H., et al., *Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients*. *Obes Surg*, 2007. **17**(10): p. 1367-73.
388. Diebel, M.E., et al., *Estrogen modulates intestinal mucus physiochemical properties and protects against oxidant injury*. *J Trauma Acute Care Surg*, 2015. **78**(1): p. 94-9.
389. Isenovic, E.R., et al., *Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells*. *Metabolism*, 2003. **52**(4): p. 482-7.
390. Nevzati, E., et al., *Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells*. *Acta Neurochir Suppl*, 2015. **120**: p. 141-5.
391. Morley, J.E. and J.F. Flood, *Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice*. *Life Sci*, 1991. **49**(10): p. 707-11.
392. Sadler, C.J. and J.P. Wilding, *Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance*. *Brain Res*, 2004. **1016**(2): p. 222-8.
393. Wascher, T.C., et al., *Effects of low-dose L-arginine on insulin-mediated vasodilatation and insulin sensitivity*. *Eur J Clin Invest*, 1997. **27**(8): p. 690-5.
394. Lucotti, P., et al., *Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(5): p. E906-12.
395. Kiraz, S., et al., *Interactions of nitric oxide and superoxide dismutase in Behcet's disease*. *Clin Exp Rheumatol*, 2001. **19**(5 Suppl 24): p. S25-9.

396. Zafirovic, S., *Efekat estradiola na regulaciju endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova*. PhD. 2018, Belgrade.
397. Griscavage, J.M., et al., *Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6329-37.
398. Nweze, I.C., et al., *17beta-Estradiol attenuates cytokine-induced nitric oxide production in rat hepatocyte*. J Trauma Acute Care Surg, 2012. **73**(2): p. 408-12.
399. Song, C.H. and N. Kim, *17-β estradiol exerts anti-inflammatory effects through activation of Nrf2 in mouse embryonic fibroblasts*. 2019. **14**(8): p. e0221650.
400. Zhang, W.Y., et al., *Neuroprotective effects of vitamin D and 17β-estradiol against ovariectomy-induced neuroinflammation and depressive-like state: Role of the AMPK/NF-κB pathway*. Int Immunopharmacol, 2020. **86**: p. 106734.
401. Kireev, R.A., et al., *Melatonin and oestrogen treatments were able to improve neuroinflammation and apoptotic processes in dentate gyrus of old ovariectomized female rats*. Age (Dordr), 2014. **36**(5): p. 9707.
402. Chang, K., et al., *Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB*. Exp Mol Med, 2004. **36**(4): p. 311-24.
403. Cunningham, R.P., R.D. Sheldon, and R.S. Rector, *The Emerging Role of Hepatocellular eNOS in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Development*. Frontiers in Physiology, 2020. **11**.
404. Kamata, H., et al., *Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases*. Cell, 2005. **120**(5): p. 649-61.
405. Fan, C., et al., *IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 746-55.
406. Ribeiro, P.S., et al., *Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(9): p. 1708-17.
407. Moynagh, P.N., *The NF-kappaB pathway*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4589-92.
408. Simon, P.S., et al., *The NF-κB p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription*. BMC Cancer, 2015. **15**(1): p. 770.
409. DeAngelis, R.A., et al., *Normal liver regeneration in p50/nuclear factor kappaB1 knockout mice*. Hepatology, 2001. **33**(4): p. 915-24.
410. Simoncini, T., et al., *Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 19-25.
411. Zhang, W.Y., et al., *Neuroprotective effects of vitamin D and 17ss-estradiol against ovariectomy-induced neuroinflammation and depressive-like state: Role of the AMPK/NF-kappaB pathway*. Int Immunopharmacol, 2020. **86**: p. 106734.
412. Kireev, R.A., et al., *Melatonin and oestrogen treatments were able to improve neuroinflammation and apoptotic processes in dentate gyrus of old ovariectomized female rats*. Age (Dordr), 2014. **36**(5): p. 9707.
413. Zhang, Y., et al., *AP-1 and NF-κB transcriptionally regulate interleukin-8 in EA.Hy926 cells under shear stress*. Cell Biol Int, 2012. **36**(3): p. 251-4.
414. Zhou, L.Z., A.P. Johnson, and T.A. Rando, *NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1405-16.
415. Zhang, H.F. and J.H. Wang, *Salvianolic Acid A Protects the Kidney against Oxidative Stress by Activating the Akt/GSK-3β/Nrf2 Signaling Pathway and Inhibiting the NF-κB Signaling Pathway in 5/6 Nephrectomized Rats*. 2019. **2019**: p. 2853534.
416. Klinge, C.M., *Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors*. Steroids, 2000. **65**(5): p. 227-51.

417. Foryst-Ludwig, A., et al., *Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma*. PLoS Genet, 2008. **4**(6): p. e1000108.
418. Maggi, A., et al., *Diabetes Undermines Estrogen Control of Inducible Nitric Oxide Synthase Function in Rat Aortic Smooth Muscle Cells Through Overexpression of Estrogen Receptor- β* . Circulation, 2003. **108**(2): p. 211-217.
419. Pinzone, J.J., et al., *Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4605-12.
420. Ray, P., et al., *Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor*. FEBS Lett, 1997. **409**(1): p. 79-85.
421. Evans, M.J., et al., *Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 823-30.
422. You, H.J., et al., *Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by 4-nonylphenol in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(4): p. 753-9.
423. Shih, H.C., et al., *17beta-Estradiol inhibits subarachnoid hemorrhage-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by interfering with the nuclear factor kappa B transactivation*. Stroke, 2006. **37**(12): p. 3025-31.
424. Zhu, Y., et al., *Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta*. Science, 2002. **295**(5554): p. 505-8.
425. Tsutsumi, S., et al., *Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2*. J Endocrinol, 2008. **199**(2): p. 267-73.
426. Kurt, A.H., A. Celik, and B.M. Kelleci, *Oxidative/antioxidative enzyme-mediated antiproliferative and proapoptotic effects of the GPER1 agonist G-1 on lung cancer cells*. Oncol Lett, 2015. **10**(5): p. 3177-3182.
427. Yu, H.P. and I.H. Chaudry, *The role of estrogen and receptor agonists in maintaining organ function after trauma-hemorrhage*. Shock, 2009. **31**(3): p. 227-37.
428. Ramnath, R.D., J. Sun, and M. Bhatia, *Involvement of SRC family kinases in substance P-induced chemokine production in mouse pancreatic acinar cells and its significance in acute pancreatitis*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **329**(2): p. 418-28.
429. Satoh, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 639-51.
430. Thobe, B.M., et al., *Src family kinases regulate p38 MAPK-mediated IL-6 production in Kupffer cells following hypoxia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(3): p. C476-82.
431. Shupnik, M.A., *Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7979-89.
432. Chu, I., et al., *Src promotes estrogen-dependent estrogen receptor alpha proteolysis in human breast cancer*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2205-15.
433. Migliaccio, A., et al., *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. EMBO J, 1996. **15**(6): p. 1292-300.
434. Khan, A.S., et al., *ERK1 and ERK2 activation modulates diet-induced obesity in mice*. Biochimie, 2017. **137**: p. 78-87.
435. Hou, C.H., et al., *Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts*. J Cell Physiol, 2009. **220**(1): p. 196-203.
436. Moor, A.N., et al., *17beta-estradiol stimulates MAPK signaling pathway in human lens epithelial cell cultures preventing collapse of mitochondrial membrane potential during acute oxidative stress*. Mitochondrion, 2005. **5**(4): p. 235-47.
437. Lobenhofer, E.K. and J.R. Marks, *Estrogen-induced mitogenesis of MCF-7 cells does not require the induction of mitogen-activated protein kinase activity*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **75**(1): p. 11-20.

438. Caristi, S., et al., *Estrogens do not modify MAP kinase-dependent nuclear signaling during stimulation of early G(1) progression in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(17): p. 6360-6.
439. Gaben, A.M., et al., *Mitogenic activity of estrogens in human breast cancer cells does not rely on direct induction of mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase or phosphatidylinositol 3-kinase*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(11): p. 2700-13.
440. Hardie, D.G., D. Carling, and S.J. Gamblin, *AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?* *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(9): p. 470-7.
441. Lage, R., et al., *AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis*. *Trends Mol Med*, 2008. **14**(12): p. 539-49.
442. Su, C.H., et al., *1-Nitropyrene Induced Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis in Macrophages through AIF Nuclear Translocation and AMPK/Nrf-2/HO-1 Pathway Activation*. 2021. **2021**: p. 9314342.
443. Mo, C., et al., *The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(4): p. 574-88.
444. Zimmermann, K., et al., *Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis--A role for the unfolded protein response*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **88**(Pt B): p. 417-426.
445. Horman, S., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis*. *Curr Biol*, 2002. **12**(16): p. 1419-23.
446. Leavens, K.F., et al., *Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **10**(5): p. 405-18.
447. Dan, H.C., et al., *Akt-dependent regulation of NF-kappaB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK*. *Genes Dev*, 2008. **22**(11): p. 1490-500.
448. Li, C., et al., *Puerarin induces the upregulation of glutathione levels and nuclear translocation of Nrf2 through PI3K/Akt/GSK-3 β signaling events in PC12 cells exposed to lead*. *Neurotoxicol Teratol*, 2014. **46**: p. 1-9.
449. Yokota-Nakagi, N., et al., *Estradiol replacement improves high-fat diet-induced insulin resistance in ovariectomized rats*. *Physiol Rep*, 2022. **10**(5): p. e15193.
450. Iqbal, J., O. Latchoumanin, and I.J. Clarke, *Rapid in Vivo Effects of Estradiol-17 β in Ovine Pituitary Gonadotropes Are Displayed by Phosphorylation of Extracellularly Regulated Kinase, Serine/Threonine Kinase, and 3',5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Responsive Element-Binding Protein*. *Endocrinology*, 2007. **148**(12): p. 5794-5802.
451. Stoica, G.E., et al., *Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway*. *Oncogene*, 2003. **22**(39): p. 7998-8011.
452. Trebicka, J., et al., *Assessment of response to beta-blockers by expression of betaArr2 and RhoA/ROCK2 in antrum mucosa in cirrhotic patients*. *J Hepatol*, 2016. **64**(6): p. 1265-73.
453. Wong, C.M., et al., *MiR-200b/200c/429 subfamily negatively regulates Rho/ROCK signaling pathway to suppress hepatocellular carcinoma metastasis*. *Oncotarget*, 2015. **6**(15): p. 13658-70.
454. Tatsumi, E., et al., *RhoA/ROCK pathway mediates p38 MAPK activation and morphological changes downstream of P2Y12/13 receptors in spinal microglia in neuropathic pain*. *Glia*, 2015. **63**(2): p. 216-28.
455. Hall, A., *Rho GTPases and the control of cell behaviour*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 5): p. 891-5.
456. Zhang, D., et al., *Ferulic acid alleviates sciatica by inhibiting peripheral sensitization through the RhoA/p38MAPK signalling pathway*. *Phytomedicine*, 2022. **106**: p. 154420.
457. Jing, F., et al., *P2Y12 receptor mediates microglial activation via RhoA/ROCK pathway in the trigeminal nucleus caudalis in a mouse model of chronic migraine*. 2019. **16**(1): p. 217.

458. Tu, P.C. and Y.L. Pan, *Mechanical Stretch Promotes Macrophage Polarization and Inflammation via the RhoA-ROCK/NF- κ B Pathway*. 2022. **2022**: p. 6871269.
459. Wang, J. and W. Jiang, *The Effects of RKI-1447 in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by a High-Fat Diet and in HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells Treated with Oleic Acid*. *Med Sci Monit*, 2020. **26**: p. e919220.
460. Zhang, C.G., et al., *Role of estrogen receptor beta selective agonist in ameliorating portal hypertension in rats with CCl4-induced liver cirrhosis*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(18): p. 4484-500.
461. Rao, X., et al., *MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways*. *Oncogene*, 2011. **30**(9): p. 1082-97.
462. Castellano, L., et al., *The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(37): p. 15732-7.
463. Davidson-Moncada, J., F.N. Papavasiliou, and W. Tam, *MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1183**: p. 183-94.
464. Callegari, E., et al., *Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model*. *Hepatology*, 2012. **56**(3): p. 1025-33.
465. Sayed, D. and M. Abdellatif, *MicroRNAs in development and disease*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 827-87.
466. Estrella Ibarra, P., et al., *Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review*. *Endokrynol Pol*, 2021. **72**(1): p. 73-80.
467. Dentelli, P., et al., *miR-221/222 control luminal breast cancer tumor progression by regulating different targets*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(11): p. 1811-26.
468. Guo, Z., et al., *miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(15): p. 5826-31.
469. Galardi, S., et al., *NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(9): p. 3892-902.
470. van Beresteijn, E.C., J.P. van Laarhoven, and A.G. Smals, *Body weight and/or endogenous estradiol as determinants of cortical bone mass and bone loss in healthy early postmenopausal women*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1992. **127**(3): p. 226-30.
471. Cabler, S., et al., *Obesity: modern man's fertility nemesis*. *Asian J Androl*, 2010. **12**(4): p. 480-9.
472. Hwang, M.S., et al., *miR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66502.
473. Togliatto, G., et al., *Unacylated ghrelin promotes skeletal muscle regeneration following hindlimb ischemia via SOD-2-mediated miR-221/222 expression*. *J Am Heart Assoc*, 2013. **2**(6): p. e000376.

BIOGRAFIJA

Anastasija M. Pajčin (rođeno Panić), rođena 16. februara 1990. godine u Beogradu, Republika Srbija, završila je Biološki fakultet, smer molekularna biologija i fiziologija, Univerziteta u Beogradu, 2014. godine, odbranivši master rad pod nazivom “Transkripciona regulacija ekspresije komponenti oksidativne fosforilacije i enzima antioksidativne odbrane u bubregu tekunica (*Spermophilus citellus*) tokom aklimacije na hladnoću i u hibernaciji”, sa ocenom 10.

Od 2014. godine pohađa doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Anastasija Pajčin je 1.3.2015. godine zaposlena u Institutu „Vinča” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerziteta u Beogradu, u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, department „Molekularna endokrinologija i bolesti metabolizma“, gde je kao istraživač saradnik, u potpunosti uradila eksperimentalni deo teze. Veće naučnih oblasti prirodnih nauka na sednici održanoj 29. 6. 2023. godine donelo je odluku o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Anastasije Pajčin pod nazivom “Uticaj estradiola na regulaciju enzima antioksidativne zaštite i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri normalno uhranjenih i gojaznih mužjaka pacova”.

Trenutno je angažovana na istraživačkoj temi 0802301, čiji je rukovodilac prof. dr Esmā R. Isenović, Naučni savetnik. U svom dosadašnjem radu je saradnik na 12 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na tri rada saopštena na skupu međunarodnog značaja. Glavna oblast njenog naučno-istraživačkog rada je: molekularna endokrinologija, dijabetes, gojaznost i kardiovaskularne bolesti.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Анастасија Пајчин (рођ. Панић)

Број индекса Б3017/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај естрадиола на регулацију ензима антиоксидативне заштите и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у јетри нормално ухрањених и гојазних мужјака пацова

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

Потпис аутора

У Београду, 6.11.2023.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Анастасија Пајчин (рођ. Панић)

Број индекса Б3017/2014

Студијски програм Биологија – Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Утицај естрадиола на регулацију ензима антиоксидативне заштите и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у јетри нормално ухрањених и гојазних мужјака пацова

Ментори:

1. др Емина Судар Миловановић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Ива Лакић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

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 аутора

У Београду, 6.11.2023.

Изјава о коришћењу

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

Утицај естрадиола на регулацију ензима антиоксидативне заштите и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у јетри нормално ухрањених и гојазних мужјака пацова,

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 6.11.2023.

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