

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Tamara D. Ivković

**Efekat vitamina D na metaboličke procese
regulisane insulinom u srcu pacova**

**Ефекат витамина Дe на метаболичке
процесе регулисане инсулином у срцу
пацова**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

University of Belgrade

Faculty of Biology

Tamara D. Ivković

**The effect of vitamin D on metabolic
processes regulated by insulin in the heart of
the rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

Dr Tijana Čulafić, viši naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Dr Tanja Jevđović, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Goran Korićanac, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Dr Iva Lakić, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Mojca Stojiljković, viši naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, pod neposrednim rukovodstvom dr Tijane Čulafić, a u okviru teme „Molekularne osnove metaboličkih poremećaja i kardiovaskularnih bolesti: uloga insulina“, br. 0902305, čiji je rukovodilac dr Goran Korićanac.

Zahvaljujem se,

*mojoj mentorki **dr Tijani Čulafić** na trudu i vremenu koje je posvetila od prvog dana mog dolaska u laboratoriju, kao i na nesebičnoj podršci i pomoći u svim fazama izrade ove disertacije i publikacija koje su joj prethodile. Hvala na strpljenju i razumevanju, na svim stručnim i životnim savetima.*

*Takođe, veliku zahvalnost dugujem i mentorki sa fakulteta **dr Tanji Jevđović** za sve sugestije i komentare tokom pisanja disertacije. Zahvaljujem se na pristupačnosti i otvorenosti koja je omogućila divnu komunikaciju tokom doktorskih studija i olakšala sve procedure.*

Posebno se zahvaljujem članovima komisije:

***Dr Goranu Korićancu** na definisanju forme i sadržaja ove doktorske disertacije, kao i na uobličavanju publikacija, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom svih faza izrade ove disertacije. Najlepše hvala što mi je omogućio da budem deo jednog divnog kolektiva u kojem se neguju prijateljski odnosi i zdrava radna atmosfera.*

***Dr Ivi Lakić** na kritičkoj oceni ove disertacije, na stručnim i konstruktivnim savetima i sugestijama koji su doprineli kvalitetu disertacije.*

***Dr Mojci Stojiljković** na pomoći tokom svih faza izrade ove disertacije, na kritičkoj oceni, stručnim i konstruktivnim savetima i sugestijama koji su doprineli kvalitetu disertacije.*

*Hvala koleginicama **dr Snežani Tepavčević, dr Snježani Romić, dr Mariji Pantelić, Jeleni Jakovljević**, i kolegi **Milanu Kostiću** na pomoći u izradi eksperimentalnog dela ove disertacije, kao i na svim stručnim savetima, prijateljskoj podršci i pozitivnoj radnoj atmosferi.*

Veliku zahvalnost dugujem svim kolegama koji su na bilo koji način doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.

Hvala Ivanu i mojim devojkicama, Anji i Leni, vi ste moj vetar u leđa, snaga i volja!

Hvala Aleksi i Zokiju, za svu ljubav i podršku svih ovih godina. Mojoj tetki Sandri hvala jer je uvek verovala da mogu i više od onoga što sam postigla.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj majci, mom borcu i uzoru, na pruženoj ljubavi, požrtvovanju, podršci, razumevanju i pomoći. Ovu disertaciju posvećujem njoj!

Efekat vitamina D na metaboličke procese regulisane insulinom u srcu pacova

Sažetak

Vitamin D je lipofilni steroidni prohormon poznat po svojoj ulozi u apsorpciji kalcijuma i mineralizaciji kostiju. Poslednjih decenija veliki broj opservacionih studija ukazao je na povezanost između nedostatka vitamina D i različitih bolesti, što je podstaklo istraživanja o potencijalnim efektima ovog molekula i u drugim organskim sistemima osim skeletnog. Pokazano je da vitamin D može uticati na sistemsku glukoznu homeostazu, kao i na insulinsku senzitivnost u skeletnim mišićima, jetri i adipoznom tkivu. Efekti vitamina D u srcu, kao važnom mestu delovanja insulina, su u jako maloj meri izučavani, naročito u fiziološkim uslovima, zbog čega je cilj ove doktorske disertacije bio da se analiziraju efekti vitamina D na metaboličke procese regulisane insulinom u srcu zdravih pacova.

Mušjaci pacova *Wistar* soja su tretirani holekalciferolom tokom šest nedelja. U cilju izučavanja efekata tretmana vitaminom D na insulinom regulisanu fosforilaciju i unutarćelijsku lokalizaciju ispitivanih molekula, polovina životinja je primila injekciju insulina 40 min pre žrtvovanja. Primenom molekularno-bioloških metoda analizirana je genska ili proteinska ekspresija molekula uključenih u insulinski signalni put, transport i metabolizam glukoze i masnih kiselina, kao i molekula uključenih u transport kalcijuma u srcu.

Tretman vitaminom D nije uticao na parametre sistemske glukozne homeostaze (glukoza, AUC, IPGTT) i lučenje insulina dok je u okviru parametara lipidnog profila značajno smanjio koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina. U srcu životinja tretiranih vitaminom D uočena je značajna redistribucija receptora za vitamin D iz citosola u jedro što ukazuje na direktan efekat vitamina D u srcu. Tretman vitaminom D je ostvario efekat na nivou ključnih insulinom-indukovanih fosforilacija molekula u metaboličkom putu PI3K/Akt (pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAkt Thr³⁰⁸), dok na nivou efektornih molekula MAPK signalnog puta (ERK1/2) promene nisu uočene. Nivo glukoznih transportera (GLUT1, GLUT4) i transportera masnih kiselina (CD36, FATP1) u plazma membrani nije se izmenio nakon tretmana. Vitamin D je povećao ekspresiju molekula uključenih u regulaciju glikolize, PFK2 i HK2, što ukazuje na stimulatorni efekat na proces katabolizma glukoze u srcu. Takođe, tretman vitaminom D je povećao i stepen insulinom stimulisane fosforilacije GSK-3 β na Ser⁹ koja je značajna za regulaciju aktivnosti enzima glikogen sintaze u srcu. Vitamin D je značajno smanjio nivo FoxO1 proteina u ukupnom ćelijskom ekstraktu i citosolnoj frakciji, bez uticaja na PDK4 čiju ekspresiju FoxO1 reguliše. Tretman je značajano uticao i na ekspresiju enzima uključenih u sintezu/degradaciju malonil-CoA, i to tako što je smanjio ekspresiju MCD i povećao ekspresiju ACC. Ovakav efekat mogao bi da ukaže na povećanu dostupnost malonil-CoA koji je negativni alosterički regulator aktivnosti CPT1 zadužene za transport masnih kiselina u mitohondrije, na čiju ekspresiju tretman nije uticao. Tretman vitaminom D je povećao ekspresiju PGC1 α , dok su promene na nivou ostalih ispitivanih molekula uključenih u β -oksidaciju (VLCAD) i njenu regulaciju (PPAR α , lipin1) izostale. Ekspresija SPT1 smanjena je nakon tretmana, dok je ekspresija UCP3 povećana. Ekspresija molekula uključenih u fazu kontrakcije miokarda (LTCC, RyR2) smanjena je nakon tretmana dok je ekspresija ključnog proteina u fazi relaksacije miokarda (SERCA2) povećana.

Ova studija je pokazala da vitamin D ostvaruje direktne i indirektne efekte u srcu zdravih pacova, pri čemu ima potencijal da stimuliše glukozni metabolizam uz istovremenu modulaciju metabolizma masnih kiselina. Takođe, rezultati ukazuju i na pozitivno delovanje vitamina D na relaksaciju miokarda.

Ključne reči: vitamin D, insulinski signalni put, metabolizam srca

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija

The effect of vitamin D on metabolic processes regulated by insulin in the heart of the rats

Abstract

Vitamin D is a lipophilic steroid prohormone known for its role in calcium absorption and bone mineralization. In recent decades, numerous observational studies have indicated the connection between vitamin D deficiency and various diseases, leading researchers to investigate the potential extraskeletal effects of this molecule. It has been shown that vitamin D can affect systemic glucose homeostasis as well as insulin sensitivity in skeletal muscle, liver and adipose tissue. The effects of vitamin D on the heart, as an important site of insulin action, have been studied only to a very limited extent, especially under physiological conditions, and therefore the aim of this dissertation was to analyze the effects of vitamin D on insulin-regulated metabolic processes in the heart of healthy rats.

Male *Wistar* rats were treated with cholecalciferol for six weeks. To investigate the effects of vitamin D treatment on insulin-regulated phosphorylation and intracellular localization of the analyzed molecules, half of the animals received an insulin injection 40 minutes before killing. Molecular biological methods, were used to analyze gene or protein expression of molecules involved in insulin signaling, glucose and fatty acids transport and metabolism, and calcium transport in the heart.

Vitamin D treatment did not affect systemic glucose homeostasis parameters (glucose, AUC, IPGTT) and insulin secretion, whereas it significantly decreased the concentration of nonesterified fatty acids in the lipid profile. In the heart of vitamin D-treated animals, a significant redistribution of the vitamin D receptor from the cytosol to the nucleus was observed, indicating a direct effect of vitamin D in the heart. Vitamin D treatment affected the level of insulin-induced phosphorylation of key molecules of the PI3K/Akt pathway (pIRS-1 Ser³⁰⁷, pAkt Thr³⁰⁸), whereas no changes were observed at the level of the effector molecules of the MAPK signaling pathway (ERK1/2). The levels of glucose transporters (GLUT1, GLUT4) and fatty acid transporters (CD36, FATP1) in the plasma membrane did not change after treatment. Vitamin D increased the expression of enzymes involved in the regulation of glycolysis, PFK2 and HK2, indicating a stimulatory effect at the level of glucose catabolism in the heart. In addition, the vitamin D treatment increased the level of insulin-stimulated phosphorylation of GSK-3 β Ser⁹, which is important for the regulation of glycogen synthase enzyme activity in the heart. Vitamin D also significantly decreased the level of FoxO1 protein in the whole cell extract and in the cytosolic fraction, without affecting PDK4, whose expression is regulated by FoxO1. Treatment significantly affected the expression of enzymes involved in the synthesis/degradation of malonyl-CoA, by decreasing the expression of MCD and increasing the expression of ACC. This effect may indicate increased availability of malonyl-CoA, which is a negative allosteric regulator of the activity of CPT1 responsible for the transport of fatty acids into mitochondria, whose expression was not affected by treatment. Vitamin D treatment increased the expression of PGC1 α , whereas there were no changes in other studied molecules involved in β -oxidation (VLCAD) and its regulation (PPAR α , lipin1). The expression of SPT1 was decreased after treatment, while the expression of UCP3 was increased. The expression of molecules involved in the myocardial contraction phase (LTCC, RyR2) was decreased after treatment, whereas the expression of a key protein of the myocardial relaxation phase (SERCA2) was increased.

This study demonstrates that vitamin D exerts direct and indirect effects on the heart of healthy rats, and has the potential to stimulate glucose metabolism while modulating fatty acid metabolism. In addition, the results suggest a beneficial effect of vitamin D on myocardial relaxation phase.

Keywords: vitamin D, insulin signaling, heart metabolism

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular endocrinology

SKRAĆENICE

ACADs	acil-CoA dehidrogenaze (engl. <i>Acyl-CoA Dehydrogenases</i>)
ACC	acetil-CoA karboksilaza (engl. <i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>)
acil-CoA	engl. <i>Acyl Coenzyme A</i>
AF-1	aktivirajuća funkcija koja ne zavisi od liganda
AF-2	aktivirajuća funkcija koja zavisi od liganda
AMPK	AMP-aktivirana protein kinaza (engl. <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
ANT	adenin nukleotid translokaze (engl. <i>Adenine Nucleotide Translocase</i>)
AS160	Akt supstrat od 160kDa
ATP	adenozin trifosfat
AUC	površina ispod krive (eng. <i>Area Under the Curve</i>)
BCA	bicinhoninična kiselina (engl. <i>Bicinchoninic Acid</i>)
BSA	goveđi serum albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CaMKII	kalmmodulin zavisna kinaza 2 (engl. <i>CAM-Dependent Kinase II</i>)
CD36	klaster diferencijacije 36
cDNK	komplementarna DNK
CPT-1	karnitin palmitoil transferaza 1 (engl. <i>Carnitine Palmitoyltransferase 1</i>)
CPT-2	karnitin palmitoil transferaza 2 (engl. <i>Carnitine Palmitoyltransferase 2</i>)
CYP2R1	engl. <i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily Member R1</i>
CYP27B1	engl. <i>Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1</i>
CYP24A1	engl. <i>Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1</i>
DAG	diacilglicerol (engl. <i>Diacylglycerol</i>)
DBP	protein koji vezuje vitamin D (engl. <i>Vitamin D Binding Protein</i>)
DEPC	eng. <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DDC	dietilditiokarbamat
ECL	pojačana hemiluminescencija (engl. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	etilendiamino tetrasirćetna kiselina (engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
eIF4E	eukariotski faktor inicijacije translacije 4E
ER	endoplazmatični retikulum
ERK	kinaze regulisane vanćelijskim signalima (engl. <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>)

FABPm	plazmamembranski protein koji vezuje masne kiseline (engl. <i>Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein</i>)
FADH2	flavin adenin dinukleotid
FAT	translokaza masnih kiselina (engl. <i>Fatty Acid Translocase</i>)
FATP	transportni proteini masnih kiselina (engl. <i>Fatty Acid Transport Protein</i>)
FGF23	faktora rasta fibroblasta 23 (engl. <i>Fibroblast Growth Factor 23</i>)
FoxO	engl. <i>Forkhead Box O</i>
Fru-1,6-BisP	fruktozo-1,6-bisfosfat
Fru-2,6-BisP	fruktozo-2,6-bisfosfat
Fru-6-P	fruktozo-6-fosfat
GAP	proteini koji aktiviraju GTPazu (engl. <i>GTPase-Activating Protein</i>)
GDP	guanozin difosfat
GLUT	transporter za glukozu (engl. <i>Glucose Transporter</i>)
Glu-1-P	glukozo-1-fosfat
Glu-6-P	glukozo-6-fosfat
Grb2-SOS	engl. <i>Growth Factor Receptor Bound 2 – Son of Sevenless</i>
GS	glikogen sintaza
GSK-3β	kinaza glikogen sintaze 3 β (engl. <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>)
GSV	vezikule za skladištenje GLUT4 (engl. <i>GLUT4 Storage Vesicles</i>)
HDAC	histon deacetilaze
HDL	engl. <i>High-Density Lipoprotein</i>
HFD	ishrana bogata mastima (engl. <i>High Fat Diet</i>)
HK	heksokinaza
HOMA	engl. <i>Homeostasis Model Assessment</i>
H/R	hipooksija/reoksigenacija
IPGTT	intraperitonealni test tolerancije na glukozu
IR	receptor za insulin (engl. <i>Insulin Receptor</i>)
IRS	supstrat receptora za insulin (engl. <i>Insulin Receptor Substrate</i>)
IRV	vezikule koje reaguju na insulin (engl. <i>Insulin-Responsive Vesicles</i>)
JNK	engl. <i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
KVB	kardiovaskularne bolesti

LDL	engl. <i>Low-Density Lipoprotein</i>
LTCC	kalcijumski kanal L-tipa (engl. <i>L-type Ca^{2+} Channels</i>)
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCD	malonil-CoA dekarboksilaza (engl. <i>Malonyl-CoA Decarboxylase</i>)
MMT	mrko masno tkivo
mTOR	ciljni molekul za rapamicin kod sisara (engl. <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NCX1	Na^{+}/Ca^{2+} izmenjivač (engl. <i>Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger</i>)
NEFA	neesterifikovane masne kiseline (engl. <i>Non-Esterified Fatty Acids</i>)
NF-κB	nuklearni faktor kapa B (engl. <i>Nuclear Factor-kappa B</i>)
NO	azot monoksid
NR	nuklearni receptori
PA	fosfatidna kiselina (engl. <i>Phosphatidic Acid</i>)
PAP1	fosfatidat fosfataza 1 (engl. <i>Phosphatidate Phosphatase-1</i>)
PDH	piruvat dehidrogenaza (engl. <i>Pyruvate Dehydrogenase</i>)
PDIA3	engl. <i>Protein Disulfide-Isomerase A3</i>
PDK	kinaza piruvat dehidrogenaze (engl. <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase</i>)
PDK1	fosfoinozolid-zavisna kinaza 1 (engl. <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase 1</i>)
PFK	fosfofruktokinaza
PGC1α	koaktivator 1 α receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (engl. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1α</i>)
PH	engl. <i>Pleckstrin Homology</i>
PHLPP	engl. <i>PH-domain Leucine-Rich Repeat Protein Phosphatase</i>
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>)
PIP2	fosfatidil inozitol 4,5- bifosfat
PIP3	fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
PKA	protein kinaza A (engl. <i>protein kinase A</i>)
PKB/Akt	protein kinaza B (engl. <i>protein kinase B</i>)
PKC	protein kinaza C (engl. <i>protein kinase C</i>)
PLA2	fosfolipaza A2 (engl. <i>Phospholipase A2</i>)

PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid (engl. <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
PP1	protein fosfataza 1 (engl. <i>Protein Phosphatase 1</i>)
PP2A	protein fosfataza 2A (engl. <i>Protein Phosphatase 2A</i>)
PPARα	engl. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α</i>
PTB	engl. <i>Phosphotyrosine-Binding</i>
PTH	paratireoidni hormon
PTP	engl. <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
RAAS	renin-angiotenzin aldosteron sistem
RIA	radioimunoesej
PVDF	engl. <i>Polyvinyl Difluoride</i>
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RT	reverzna transkripcija (engl. <i>Reverse Transcription</i>)
RXR	retinoidni receptor X (engl. <i>Retinoid X Receptor</i>)
RyR2	rijanodinski receptor tipa 2 (engl. <i>Ryanodine Receptor 2</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Ser	serin
SERCA	engl. <i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase</i>
SH2	engl. <i>Src-Homology-2</i>
Shc	protein koji sadrži domen 2 homolog Src (engl. <i>Src Homology 2 Domain Containing Protein</i>)
SPT	serin palmitoiltransferaza (engl. <i>Serine Palmitoyltransferase</i>)
SR	sarkoplazmatični retikulum
S6K	S6 kinaza
TAG	triacilgliceroli
TEA	trietanolamin
Thr	treonin
TSC2	kompleks 2 tuberozne skleroze (engl. <i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i>)
Tyr	tirozin
T1DM	tip 1 dijabetes
T2DM	tip 2 dijabetes

UCP	engl. <i>Uncoupling Protein</i>
UV zračenje	ultravioletno zračenje
VDR	receptor za vitamin D (engl. <i>Vitamin D Receptor</i>)
VDREs	elementi responsivni na vitamin D (engl. <i>Vitamin D Responsive Elements</i>)
VGCC	R-tip voltažno-zavisnog kalcijumovog kanala (engl. <i>R-type Voltage-Gated Calcium Channel</i>)
VLACD	acil-CoA dehidrogenaza veoma dugog lanca (engl. <i>Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i>)
VLDL	engl. <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WISK	engl. <i>Wortmannin-Sensitive and Insulin-Stimulated Protein Kinase</i>
1,25(OH)₂D₃	1,25-dihidroksivitamin D ₃
4E-BP1	eIF4E-vezujući protein-1
7-DHA	7-dehidroksihoolesterol
24,25(OH)₂D₃	24,25-dihidroksivitamin D ₃
25(OH)D₃	25-hidroksivitamin D ₃

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Metabolički procesi u srcu	2
1.1.1. Metabolizam masnih kiselina	3
1.1.1.1. Transport masnih kiselina	3
1.1.1.2. β -oksidacija masnih kiselina	3
1.1.1.3. Transkripciona regulacija β -oksidacije	4
1.1.1.4. Skladištenje masnih kiselina	5
1.1.2. Metabolizam glukoze	6
1.1.3. Randlov ciklus	7
1.2. Insulin.....	9
1.2.1. Signalni putevi insulina	10
1.2.1.1. Receptor za insulin i supstrati receptora za insulin	12
1.2.1.2. Signalni put PI3K	12
1.2.1.3. Signalni put MAPK.....	14
1.3. Vitamin D.....	15
1.3.1. Hemijska struktura, sinteza i distribucija vitamina D.....	15
1.3.2. Metabolizam vitamina D	16
1.3.3. Receptor za vitamin D	16
1.3.4. Osnovna biološka dejstva vitamina D	18
1.3.5. Efekti vitamina D u kardiovaskularnom sistemu.....	19
1.3.6. Efekti vitamina D na insulinsko delovanje	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta	23
3.2. Izolovanje tkiva srca i plazme	23
3.3. Biohemijske analize	24
3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze u krvi	24
3.3.2. Određivanje koncentracije triglicerida i holesterolu u plazmi	24
3.3.3. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi	24
3.3.4. Određivanje koncentracije 25(OH)D3 u plazmi	24
3.3.5. Određivanje koncentracije Ca^{2+} i fosfora u plazmi	24
3.3.6. Određivanje koncentracije insulina u plazmi	25
3.3.7. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu.....	25
3.4. Molekularno-biološke analize	25
3.4.1. Priprema uzoraka za <i>Western blot</i> analizu.....	25
3.4.1.1. Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta srca	25
3.4.1.2. Izolovanje plazma membranske frakcije srca	25

3.4.1.3. Izolovanje citoplazmatične, jedarne i mikrozomalne frakcije srca	26
3.4.2. Određivanje koncentracije proteina	26
3.4.2.1. BCA metoda.....	26
3.4.2.2. Metoda po Loriju	26
3.4.3. Western blot analiza.....	27
3.4.3.1. SDS-PAGE.....	27
3.4.3.2. Transfer proteina sa gela na membranu	27
3.4.3.3. Imunodetekcija.....	27
3.4.4. Reverzna transkripcija sa kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR)	29
3.4.4.1. Izolacija ukupne RNK.....	29
3.4.4.2. Određivanje koncentracije RNK.....	29
3.4.4.3. Reverzna transkripcija RNK	29
3.4.4.4. qPCR.....	30
3.5. Statistička obrada rezultata	30
4. REZULTATI.....	32
4.1. Efekti vitamina D na telesnu masu i masu srca	32
4.2. Efekti vitamina D na biohemijske karakteristike pacova	32
4.3. Efekti vitamina D na VDR i enzime uključene u metabolizam vitamina D.....	34
4.4. Efekti vitamina D na molekule insulinskog signalnog puta u srcu pacova	36
4.5. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam glukoze u srcu pacova	42
4.6. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam masnih kiselina u srcu pacova	49
4.7. Efekti vitamina D na jonske kanale uključene u proces kontrakcije/relaksacije srca pacova	61
5. DISKUSIJA	63
5.1. Efekti vitamina D na biohemijske parametre pacova	63
5.2. Efekti vitamina D na fizičke karakteristike pacova	64
5.3. Efekti vitamina D na VDR i enzime uključene u metabolizam vitamina D.....	65
5.4. Efekti vitamina D na molekule insulinskog signalnog puta u srcu pacova	66
5.5. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam glukoze u srcu pacova	68
5.6. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam masnih kiselina u srcu pacova	70
5.7. Efekti vitamina D na ekspresiju <i>Ucp3</i> u srcu pacova	72
5.8. Efekti vitamina D na jonske kanale uključene u proces kontrakcije/relaksacije srca pacova	73
6. ZAKLJUČAK	75
7. LITERATURA.....	76

1. UVOD

Vitamin D je otkriven pre više od 100 godina ali je postao tema istraživanja u oblasti endokrinologije decenijama kasnije nakon otkrića njegove strukture prohormona (Saponaro et al., 2020). Ključna uloga vitamina D u organizmu je održavanje homeostaze jona kalcijuma (Ca^{2+}) i fosfora u cirkulaciji što direktno utiče na funkciju skeletno-mišićnog sistema. Brojne studije ukazuju da vitamin D ostvaruje efekte i na druge organske sisteme (Bouillon et al., 2019), naročito na funkcionisanje imunog sistema (Martens et al., 2020).

Koncentracija vitamina D u cirkulaciji koja je optimalna za ljudsko zdravlje nije zvanično utvrđena, dok se koncentracija manja od 30 nmol/l smatra graničnom vrednošću koja se definiše kao nedostatak vitamina D (Amrein et al., 2020).

Nedavno publikovane opservacione studije sugerišu da oko 40% Evropljana ima nedostatak vitamina D (Cashman et al., 2016). Osim prvobitno uočenog efekta nedostatka vitamina D koji dovodi do razvoja rahitisa kod dece, niska koncentracija vitamina D u cirkulaciji danas se povezuje sa povećanim rizikom od nastanka osteoporoze, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti (KVB), određenih karcinoma, kognitivnog pada, depresije, komplikacija u trudnoći, autoimunih bolesti, alergija, pa čak i mišićne slabosti (Hosseini-nezhad & Holick, 2013). Dnevni unos od 400 IU vitamina D može sprečiti nutritivni rahitis kod odojčadi i dece (Munns et al., 2016), međutim efekti suplementacije vitaminom D na skeletni sistem kod odraslih, kao i potencijalni efekti na druga tkiva su i dalje predmet rasprave. I pored toga, vitamin D je jedan od najčešće korišćenih suplemenata širom sveta (Bouillon & Bikle, 2019).

Jedan od najkontroverznijih aspekata savremene medicine predstavlja uloga koju vitamin D ima u prevenciji KVB. Nekoliko epidemioloških studija je pokazalo da je nedostatak vitamina D povezan sa konvencionalnim faktorima rizika za nastanak KVB, sa visokom stopom incidence i nepovoljnom prognozom ishoda ovih bolesti. S druge strane, opservacione studije, randomizovana kontrolisana ispitivanja i meta-analize nisu uspele da pokažu da suplementacija vitaminom D u ishrani može da poboljša prognozu ishoda KVB (Trimarco et al., 2022).

Iako je spektar ispitivanih efekata vitamina D proširen poslednjih godina, mehanizmi kojima ovaj vitamin ispoljava svoju biološku funkciju i dalje nisu u potpunosti poznati ili shvaćeni (Donati et al., 2022). Stoga vitamin D i njegova potencijalna uloga u patogenezi, progresiji i prevenciji različitih poremećaja predstavljaju trend u naučnim istraživanjima.

1.1. Metabolički procesi u srcu

Normalno funkcionisanje srca zahteva ogromnu količinu energije. Konstantno snabdevanje energentima i kiseonikom omogućava održavanje intracelularnog nivoa adenozin trifosfata (ATP) koji je neophodan za kontraktilnu aktivnost i funkcionisanje jonskih pumpi (Bertrand et al., 2008). Količina uskladištenog molekula ATP u kardiomiocitima dovoljna je da održi otkucaje srca svega nekoliko sekundi (Kolwicz et al., 2013), ali usklađenost njegove sinteze i hidrolize obezbeđuje održavanje bazalnog nivoa ATP, čak i prilikom znatno povećanog stepena rada srca (Stanley et al., 2005). Promene u procesima koji stvaraju ATP direktno utiču na kontraktilnu funkciju srca (Doenst et al., 2013). U proces kontrakcije i relaksacije miokarda uključeni su joni Ca^{2+} koji deluju kao sekundarni glasnici, i mnogobrojni citosolni i membranski proteini koji regulišu homeostazu Ca^{2+} u ćeliji. Ekscitacija kardiomiocita dovodi do promene membranskog potencijala na koji reaguju voltažno zavisni Ca^{2+} kanali L-tipa (LTCC, engl. *L-type Ca^{2+} Channels*) i omogućavaju ulazak Ca^{2+} u citosol ćelija. Ulazak Ca^{2+} dovodi do dodatnog oslobađanja Ca^{2+} iz sarkoplazmatičnog retikuluma (SR) putem rijanodinskog receptora tipa 2 (RyR2, engl. *Ryanodine Receptor 2*) što značajno povećava koncentraciju slobodnog Ca^{2+} u citosolu. U citosolu se Ca^{2+} vezuje za protein troponinC na kompleksu aktinskih miofilamenata i indukuje konformacione promene aktina koji se zatim vezuje za ATPazu na glavi miozina izazivajući pokrete u kompleksu aktin-miozin koji dovode do kontrakcije miocita (Lahiri et al., 2021). Da bi došlo do relaksacije neophodno je da se koncentracija Ca^{2+} u citosolu smanji što je omogućeno delovanjem nekoliko transportnih proteina, pre svega sarkoplazmatične Ca^{2+} -ATPaze (SERCA, engl. *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) i $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivača (NCX1, engl. *$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger*), dok sarkolemna Ca^{2+} -ATPaza i mitohondrijski Ca^{2+} uniporter učestvuju u manjem obimu.

U fiziološkim uslovima srce koristi različite energetske supstrate u procesu oksidacije za proizvodnju ATP u mitohondrijama i opšte je prihvaćeno da su masne kiseline dominantni supstrat koji koriste ćelije miokarda odraslih osoba (Kolwicz et al., 2013). Međutim, kardiomiociti poseduju i metaboličku fleksibilnost odnosno mogućnost korišćenja različitih supstrata kao izvora energije, u zavisnosti od njihove dostupnosti i trenutnog stanja organizma (Goldberg et al., 2012; Kolwicz et al., 2013). Optimalno funkcionisanje srca podrazumeva da se istovremeno koriste svi dostupni supstrati (Pascual & Coleman, 2016). Mogućnost korišćenja različitih energetskih supstrata za proizvodnju ATP je naročito značajna u uslovima akutnog i/ili hroničnog stresa (Ritterhoff & Tian, 2017). Kratkoročno, promene u korišćenju različitih energetskih supstrata mogu biti korisne za održavanje optimalnog snabdevanja energijom, međutim, dugoročno ovakve promene mogu rezultirati narušenom srčanom funkcijom (Ritterhoff & Tian, 2017). Na primer, tokom kratkotrajne ishemije smanjuje se aerobna proizvodnja ATP dok se glikoliza i razgradnja glikogena pojačavaju što je adaptivni mehanizam. Međutim, tokom dugotrajne ishemije, povećana stopa glikolize dovodi do akumulacije protona $[\text{H}^{+}]$ što postaje štetno za srce. Kod pacijenata sa dijabetesom tipa 1 (T1DM) i dijabetesom tipa 2 (T2DM) dolazi do razvoja dijabetične kardiomiopatije koja se generalno karakteriše povećanim preuzimanjem i oksidacijom masnih kiselina, dok je istovremeno preuzimanje glukoze, glikoliza i oksidacija glukoze smanjena (Bugger & Abel, 2014). Povećan metabolizam masnih kiselina uz smanjen metabolizam glukoze kod dijabetične kardiomiopatije dovodi do povećane potrošnje kiseonika bez ekvivalentnog povećanja kontrakcije, što rezultuje smanjenom srčanom efikasnošću (Bugger & Abel, 2014), koja se u ranim fazama karakteriše abnormalnom dijasolom, dok se promene na nivou sistole javljaju u kasnijim fazama bolesti (Lee & Kim, 2017).

Regulacija upotrebe supstrata u srcu zavisi od njihove koncentracije u cirkulaciji, broja specifičnih transportera prisutnih u ćelijskoj membrani kardiomiocita, i aktivnosti enzima i supstrata/produkata/kofaktora koji su uključeni u njihov metabolizam (Zuurbier et al., 2020). Insulin je glavni regulator energetskog metabolizma u kardiomiocitima (Guo & Guo, 2017). Promene u koncentraciji insulina u cirkulaciji na dnevnom nivou i promene povezane sa unosom

hrane utiču na srčani metabolizam delovanjem na nivou perifernih ciljnih tkiva, što reguliše dostupnost supstrata u cirkulaciji, ali i direktnim uticajem na miokard (Abel, 2021). Nakon obroka, oslobođeni insulin stimuliše preuzimanje i korišćenje glukoze i sintezu makromolekula u srcu. Glukoza je tada primarni supstrat za oksidaciju i generiše oko 70% ATP, dok oksidacija masnih kiselina obezbeđuje samo 20% ATP u srcu. Kada se nivo insulina smanji, povećava se nivo glukagona koji aktivira katabolički metabolizam, uključujući pojačanu lipolizu u masnom tkivu što povećava dostupnost masnih kiselina u cirkulaciji. U takvim uslovima, masne kiseline su glavni supstrat za proizvodnju ATP u srcu (Bertrand et al., 2008). U specifičnim situacijama različiti supstrati postaju dominantni izvori energije u srcu, na primer, laktat koji se tokom intenzivnog vežbanja proizvodi u skeletnim mišićima i oslobađa u cirkulaciju, ili ketonska tela, koja se u cirkulaciji javljaju usled produženog gladovanja ili ketogenih dijeta (Kolwicz et al., 2013). Regulacija energetskeg balansa u srcu odvija se i mehanizmom finog podešavanja upotrebe supstrata (Hue & Taegtmeyer, 2009) tako što visoka koncentracija jednog supstrata u plazmi inhibira upotrebu drugih supstrata (Randlov ciklus) (Abel, 2021).

1.1.1. Metabolizam masnih kiselina

1.1.1.1. Transport masnih kiselina

Većina masnih kiselina egzogenog porekla koje srce koristi potiče od neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA, engl. *Non-Esterified Fatty Acids*), zatim iz hilomikrona, a samo manji deo potiče iz partikula veoma male gustine (VLDL, engl. *Very Low Density Lipoproteins*) (Hauton et al., 2001). Masne kiseline se transportuju pomoću proteinskih nosača, dok difuzija u manjoj meri doprinosi njihovom ulasku u kardiomiocite (Liu et al., 2018). Proteinski nosači mogu biti translokaze masnih kiselina (FAT, engl. *Fatty Acid Translocase*), transportni proteini masnih kiselina (FATP, engl. *Fatty Acid Transport Protein*) ili plazma membranski proteini koji vezuju masne kiseline (FABPpm, eng. *Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein*) (D'Souza et al., 2016). Dominantna translokaza masnih kiselina u srcu je integralni membranski protein označen kao klaster diferencijacije 36 (CD36) (Stanley et al., 2005). Ljudi sa mutacijama u genu za CD36 imaju niže stope preuzimanja analoga dugolančanih masnih kiselina u poređenju sa zdravim osobama, što sugerise da CD36 delimično reguliše brzinu preuzimanja masnih kiselina u miokardu kod ljudi (Stanley et al., 2005). Ulogu u preuzimanju masnih kiselina u kardiomiocite, imaju i transportni proteini FATP1 i FATP6. Međutim, za razliku od CD36 koji ima ključnu ulogu u bazalnim uslovima, uloga FATP dobija na značaju prilikom metaboličkih promena (Glatz et al., 2010). Prilikom transporta kroz membranu kardiomiocita, NEFA se vezuju za FABPpm i dolazi do njihove aktivacije esterifikacijom do dugolančanog acil-CoA (engl. *Acyl Coenzyme A*) delovanjem acil-CoA sintetaze. FATP ima i aktivnost acil-CoA sintetaze te obezbeđuje takozvano „zarobljavanje“ masnih kiselina jednom kada uđu u ćeliju čime se održava gradijent njihove koncentracije i kuplovanje transporta sa metabolizmom u ćeliji (Glatz et al., 2010). Nastali dugolančani acil-CoA se usmerava ka β -oksidaciji ili se skladišti u obliku triacilglicerola (TAG) (Glatz et al., 2010).

1.1.1.2. β -oksidacija masnih kiselina

U srcu se β -oksidacija odvija u mitohondrijama i u znatno manjoj meri u peroksizomima. U međumembranskom prostoru mitohondrija, delovanjem enzima karnitin palmitoiltransferaze 1 (CPT-1, engl. *Carnitine Palmitoyltransferase 1*) dugolančani acil-CoA se prevodi u dugolančani acil-karnitin. S obzirom da je unutrašnja mitohondrijalna membrana nepropustljiva za masne kiseline, naročito one sa velikim brojem ugljenikovih atoma, nastanak acil-karnitina je neophodan za transport masnih kiselina u mitohondrijalni matriks. Transport omogućava enzim karnitin

aciltranslokaza koja prebacuje acil-karnitin kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu u zamenu za slobodni karnitin. U matriksu, karnitin palmitoiltransferaza 2 (CPT-2, engl. *Carnitine Palmitoyltransferase II*) regeneriše dugolančani acil-CoA. Od tri enzima koja su uključena u transmembranski mitohondrijalni transport, CPT-1 ima ključnu regulatornu ulogu u kontroli stepena preuzimanja masnih kiselina u mitohondrije (Kodde et al., 2007). Transportovani acil-CoA derivati u matriksu mitohondrija podležu procesu β -oksidacije koji podrazumeva usklađeno delovanje više enzima prisutnih u mitohondrijama. Za oksidaciju acil-CoA nerazgranatog lanca, kao što je palmitoil-CoA, potrebna je serija specifičnih acil-CoA dehidrogenaza (ACADs, engl. *Acyl-CoA Dehydrogenases*), enoil-CoA hidrataza, 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza i 3-ketoacil-CoA tiolaza koje katalizuju ciklično oslobađanje acetil-CoA jedinica. Pored ovih enzima, za oksidaciju acil-CoA razgranatog lanca kao i nezasićenih masnih kiselina neophodno je i učešće niza pomoćnih enzima (Wanders et al., 2010). ACADs, koje katalizuju prvu enzimsku reakciju u procesu β -oksidacije, se međusobno razlikuju prema specifičnosti za masne kiseline različitih dužina i mogu se razlikovati četiri vrste: acil-CoA dehidrogenaza kratkog lanca, srednjeg lanca, dugog lanca i veoma dugog lanca (VLCAD, engl. *Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*). Svi enzimi uključeni u β -oksidaciju masnih kiselina podležu regulaciji mehanizmom negativne povratne sprege od strane produkata enzimske reakcije, ali i transkripcionoj regulaciji (Lopaschuk et al., 2010).

Svaki ciklus β -oksidacije masnih kiselina dovodi do skraćivanja acilnog dela za dva ugljenika, kao i do proizvodnje acetil-CoA, flavin adenin dinukleotida (FADH₂) i nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) (Lopaschuk et al., 2010). Nastali molekuli acetil-CoA ulaze u Krebsov ciklus, u kojem se generiše FADH₂ i NADH čijom se reoksidacijom na respiratornom lancu oslobađa energija za nastanak dva, odnosno tri molekula ATP (Wanders et al., 2010).

1.1.1.3. Transkripciona regulacija β -oksidacije

Kontrola transkripcije gena za proteine uključene u β -oksidaciju masnih kiselina je regulisana velikim delom aktivnošću receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom α (PPAR α , engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*) koji pripada superfamiliji nuklearnih receptora (NR) zavisnih od liganda. Ligandi za PPAR α uključuju metabolite masnih kiselina i/ili lipida kao što su eikozanoidi i leukotrieni. U odsustvu liganda, PPAR α regrutuje korepresore i histon deacetilaze, što rezultira kompaktnijim okruženjem hromatina u kome je transkripcija onemogućena. Aktivacija PPAR α vezivanjem liganda indukuje konformacionu promenu koja dovodi do disocijacije korepresora i regrutovanja proteinskih kompleksa koji sadrže histon acetiltransferazu čijom aktivnošću se modifikuje lokalna struktura hromatina i omogućava transkripcija gena. Pored toga, vezivanje liganda za PPAR α izaziva heterodimerizaciju PPAR α sa retinoidnim X receptorom (RXR, engl. *Retinoid X Receptor*) i regrutovanje koaktivatora nakon čega se formirani kompleks vezuje za PPAR responsivne elemente koji se nalaze na promotorskim regionima ciljnih gena (Sugden et al., 2010). Ciljni geni PPAR α kodiraju proteine uključene u metabolizam masnih kiselina, počevši od onih koji vrše transport masnih kiselina preko plazma membrane, tioesterifikaciju, transport u mitohondrije, do proteina koji regulišu metabolizam malonil-CoA, mitohondrijalnu β -oksidaciju i oksidaciju glukoze (Duncan & Finck, 2008; Huss & Kelly, 2004; Lopaschuk et al., 2010). Prekomerna ekspresija PPAR α u srcu dovodi do značajnog povećanja preuzimanja i β -oksidacije masnih kiselina usled povećane ekspresije proteina uključenih u ove procese. Suprotno, delecija PPAR α dovodi do smanjene ekspresije proteina uključenih u β -oksidaciju, što je praćeno smanjenjem β -oksidacije masnih kiselina i istovremenim povećanjem oksidacije glukoze (Duncan & Finck, 2008; Lopaschuk et al., 2010).

Koaktivator 1 α receptora aktiviranog peroksizomalnim proliferatorom (PGC1 α engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α*) je visoko ekspresiran u srcu i važan je za mitohondrijalnu biogenezu i kontrolu energetskog metabolizma. PGC-1 koaktivira mnoge članove

superfamilije NR, uključujući PPAR, receptore povezane sa estrogenom i nuklearni respiratorni faktor-1, ali i druge transkripcione faktore i regulatorne proteine (Sugden et al., 2010). Ekspresija PGC-1 α je pozitivno regulisana u uslovima koji povećavaju potrebu za energijom i od strane različitih signalnih molekula, dok se dodatni nivo regulacije vrši putem post-translacionih modifikacija (Di et al., 2018; Sugden et al., 2010). Povećana ekspresija PGC-1 α u fiziološkim - vežbanje ili u patofiziološkim uslovima -gladovanje i dijabetes, dovodi do dramatičnih fenotipskih promena kao što su povećana mitohondrijalna biogeneza, povećana β -oksidacija masnih kiselina i oksidativna fosforilacija, dok smanjena ekspresija PGC-1 α (kao što je u srcu fetusa, srčanoj hipertrofiji i insuficijenciji) ima suprotan efekat (Di et al., 2018; Lopaschuk et al., 2010).

1.1.1.4. Skladištenje masnih kiselina

Kardiomiociti imaju ograničen kapacitet za skladištenje lipida. Depo TAG nalazi se u citoplazmi kardiomiocita u okviru relativno malih lipidnih kapljica. Nekada se smatrao statičnim, neaktivnim skladištem masti, ali je nedavno otkriveno da se u okviru lipidnih kapljica odvija veoma dinamičan proces sinteze i hidrolize TAG. Ove unutrašnje zalihe lipida doprinose sa 10% proizvodnji mitohondrijalnog ATP, što se može povećati i do 50% ukoliko egzogene masne kiseline postanu ograničene (Saddik & Lopaschuk, 1991). TAG uskladišteni u lipidnim kapljicama se uglavnom proizvode *de novo* preko glicerol fosfatnog puta, koji uključuje sekvencijalne reakcije enzima aciltransferaza i fosfataza na mitohondrijalnoj i sarkoplazmatičnoj (SR)/endoplazmatičnoj (ER) membrani (Kienesberger et al., 2013). Centralni intermedijer ovog puta je fosfatidna kiselina (PA, engl. *Phosphatidic Acid*), od koje nastaju diacil glicerol (DAG, engl. *diacylglycerol*), prekursor TAG i fosfolipida, i citidindifosfat-DAG, prekursor drugih fosfolipida (Lutkewitte & Finck, 2020). Enzim koji katalizuje nastanak DAG od PA je fosfatidat fosfataza 1 (PAP1, engl. *Phosphatidate Phosphatase-1*), koja kod sisara pripada familiji proteina lipina, koja obuhvata tri člana: lipin1, lipin2 i lipin3, sa jedinstvenim obrascem tkivne ekspresije. U kardiomiocitima lipin1 čini gotovo svu PAP1 aktivnost (Reue, 2009). Izoforme lipina mogu biti lokalizovane i u jedru gde deluju kao transkripcioni koaktivatori, i u kompleksu sa PPAR i PGC1 α regulišu ekspresiju gena za proteine uključene u β -oksidaciju masnih kiselina (Chen et al., 2015a).

Visoke koncentracije lipida i lipidnih derivata, usled prevazilaženja kapaciteta njihovog deponovanja i β -oksidacije, mogu dovesti do metaboličkih poremećaja i/ili gubitka funkcije ćelija, što se definiše kao lipotoksičnost (Lipke et al., 2022). Akumulacija neutralnih lipida unutar kardiomiocita je karakteristika srca dijabetičara, kao i gojaznih ljudi i glodara (Harmancey et al., 2008; Wende & Abel, 2010). Povećani oksidativni stres, stres ER, razvoj insulinske rezistencije kao i inflamacija su mehanizmi uključeni u lipotoksičnost (Lipke et al., 2022). Akumuliranje intermedijera metabolizma lipida poput ceramida, DAG i acilkarnitina u svim ćelijama izuzev adipocita, doprinosi nastanku lipotoksičnosti (Carpentier, 2018). U različitim modelima lipotoksične kardiomiopatije, dijabetesa i gojaznosti kod glodara, uočen je povećan sadržaj ceramida u miokardu koji se dovodi u vezu sa srčanom disfunkcijom (Chiu et al., 2001; Son et al., 2007; Zhou et al., 2000). Ceramidi su esencijalni prekursori većine složenih sfingolipida, i za razliku od sfingolipida koji su lokalizovani u lipidnim dvoslojevima, gde obavljaju brojne strukturne funkcije, ceramidi mogu funkcionisati i kao signalni molekuli (Choi et al., 2021). *De novo* sinteza sfingolipida počinje u ER sa kondenzacijom palmitoil-CoA i serina, reakcijom koju katalizuje enzimski kompleks serin palmitoiltransferaze (SPT, engl. *Serine Palmitoyltransferase*), koji je ujedno ograničavajući (eng. *rate-limiting*) enzim ovog procesa (Choi et al., 2021).

1.1.2. Metabolizam glukoze

Glukoza putem cirkulacije dolazi do ciljnih ćelija pri čemu se njen transport u ćeliju odvija olakšanom difuzijom preko glukoznih transportera (GLUT, engl. *Glucose Transporter*). Do sada je otkriveno 14 izoformi koje imaju tkivno specifičnu distribuciju (Manolescu et al., 2007). U kardiomiocitima eksprimiran je veći broj izoformi GLUT među kojima najvažniju ulogu u flukсу glukoze imaju GLUT1 i GLUT4. U adultnim kardiomiocitima GLUT4 izoforma eksprimirana je u većoj meri u odnosu na GLUT1 izoformu (Szablewski, 2017). GLUT1 izoforma je lokalizovana u najvećoj meri na plazma membrani i odgovorna je za transport glukoze u bazalnim uslovima, dok je GLUT4 izoforma predominantno lokalizovana u unutarćelijskim vezikulama i translocira se na plazma membranu pod insulinskom stimulacijom (Shao & Tian, 2015). U bazalnom stanju postoji konstitutivan proces recikliranja tokom kojeg GLUT4 sa plazma membrane endocitozom prelazi u rane endosome potom u reciklirajuće endosome, a zatim se egzocitozom ponovo translocira na plazma membranu. Osim ovog reciklažnog sistema vezikula GLUT4, u ćeliji postoje i vezikule za skladištenje GLUT4 (GSV, engl. *GLUT4 Storage Vesicles*) koje su lokalizovane u perinuklearnom prostoru u odeljcima endozomalnog sistema kao i vezikule koje reaguju na insulin (IRV, engl. *Insulin-Responsive Vesicles*) i nalaze se rasute po citoplazmi. Upravo se smatra da su IRV rezervoari GLUT4 koji se pod insulinskom stimulacijom translociraju na plazma membranu (Jaldin-Fincati et al., 2017). Smatra se da insulin aktivira dve odvojene signalne kaskade koje paralelno stimulišu translokaciju GLUT4. Jedna je aktivacija serin/treonin (Ser/Thr) protein kinaze B/Akt (PKB/Akt, engl. *protein kinase B*), koja reguliše proteine uključene u membranski transport vezikula, a druga aktivacija male GTPaze, Rac1, iz porodice Rho koja reguliše remodelovanje aktinske mreže (Jaldin-Fincati et al., 2017). Osim insulina, stimulus za translokaciju GLUT4 na membranu je i kontrakcija kardiomiocita. Ekspresija GLUT4 u miokardu i skeletnim mišićima je skoro jednaka, što ukazuje da razvoj insulinske rezistencije različite etiologije dovodi do smanjenja flukса glukoze kako u skeletnim mišićima tako i u miokardu (Oleinikov, 2019).

U ćeliji se glukoza prevodi u glukozo-6-fosfat (Glu-6-P) delovanjem enzima heksokinaze (HK). Ovim procesom obezbeđuje se održavanje gradijenta koncentracije glukoze kroz membranu, i omogućava njen katabolizam. Formirani Glu-6-P u ćeliji može ući u tri različita metabolička puta. Prvi metabolički put vodi ka sintezi glikogena, UDP-galaktoze i UDP-glukuronata, drugi ka glikolizi dok treći predstavlja put pentozo fosfata (Adeva-Andany et al., 2016).

U srcu se rezerve glikogena smanjuju tokom razvoja, pa u adultnim kardiomiocitima on zauzima svega 2% zapremine ćelije. Smatra se da srce ne koristi glukozu iz glikogena tokom normalne aktivnosti već tokom naglog povećanja srčanog rada i tokom ishemije (Depre et al., 1999). Međutim, mutacije u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u razgradnji glikogena u većoj meri remete funkciju srca u odnosu na ostala tkiva, što govori o važnosti regulacije sadržaja glikogena u srcu (Chandramouli et al., 2015).

Glikoliza se odvija u citosolu svih ćelija i ne zahteva prisustvo kiseonika. Ukupni neto energetski bilans glikolize je relativno mali, svega dva molekula ATP po molekulu glukoze. Prvi korak glikolize je fosforilacija glukoze u Glu-6-P koju katalizuje enzim HK. Nakon toga delovanjem enzima fosfoglukozo izomeraze, Glu-6-P se izomerizuje u fruktozo-6-fosfat (Fru-6-P). Fosfofrukto kinaza 1 (PFK1) katalizuje fosforilaciju Fru-6-P u fruktozo-1,6-bisfosfat (Fru-1,6-BisP) (Lenzen, 2014). Glavne kontrolne tačke procesa glikolize predstavljaju regulacije aktivnosti enzima HK i PFK1 (Hue & Rider, 1987). Aktivnost PFK1 je inhibirana visokim nivoom ATP i NADH koji ukazuju na povoljno energetsko stanje ćelije, kao i visokim nivoom citrata koji ukazuje na dovoljno prisustvo prekursora za biosintetske puteve. Sa druge strane, fruktozo-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-BisP) je snažan alosterički aktivator PFK1, koji nastaje delovanjem enzima fosfofrukto kinaze 2 (PFK2) na Glu-6-P (Hue & Rider, 1987). U poslednjoj reakciji glikolize, enzim piruvat kinaza prenosi fosforu grupu sa fosfoenolpiruvata na ADP čime nastaje drugi molekul ATP u glikolizi i krajnji produkt - piruvat (Lenzen, 2014). Nastali piruvat iz citosola prelazi u mitohondrije gde se vrši

oksidativna dekarboksilacija piruvata delovanjem kompleksa piruvat dehidrogenaze (PDH, engl. *Pyruvate Dehydrogenase*) pri čemu nastaje acetyl-CoA i NADH. Dinamičke promene u stanju aktivnosti kompleksa postižu se suprotstavljenim delovanjem četiri različite kinaze piruvat dehidrogenaze (PDK, engl. *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*) i fosfataze piruvat dehidrogenaze 1 i 2 (Jeon et al., 2021). Regulacija aktivnosti PDH ekspresijom PDK4 je ključni faktor za održavanje metaboličke fleksibilnosti u srcu (Holloway et al., 2022). Nastali acetyl-CoA sa jedne strane predstavlja početno jedinjenje za ciklus trikarbonskih kiselina (Krebsov ciklus), dok sa druge strane izlazi iz mitohondrija i služi za sintezu masnih kiselina u citosolu. Tokom Krebsovog ciklusa oslobađa se CO₂ i NADH i FADH₂ koji služe kao donori elektrona na elektron transportnom lancu na unutrašnjoj membrani mitohondrija gde se odvija oksidativna fosforilacija odnosno biosinteza ATP molekula (Adeva-Andany et al., 2016).

Proces oksidativne fosforilacije odvija se na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani i katalizovan je enzimom ATP-sintazom. ATP-sintaza ili kompleks V nalazi se u neposrednoj blizini respiratornog lanca koji se sastoji od kompleksa I, II, III i IV koji predstavljaju seriju prenosilaca elektrona sa NADH i FADH₂ na molekul kiseonika (O₂). U toku prenosa elektrona između kompleksa respiratornog lanca dolazi do ispumpavanja [H⁺] iz matriksa mitohondrija u međumembranski prostor čime se formira elektrohemijski gradijent [H⁺] koji je ujedno i uslov za biosintezu ATP. Iako se smatra da su procesi prenosa elektrona na respiratornom lancu i oksidativna fosforilacija veoma tesno spregnuti, oni nisu u potpunosti kuplovani zbog toga što se neki od [H⁺] vraćaju do mitohondrijalnog matriksa putevima koji ne zavise od sinteze ATP. Ova pojava, poznata i kao „curenje“ [H⁺], može biti bazalna i inducibilna. Prisustvo adenin nukleotid translokaze (ANT, engl. *Adenine Nucleotide Translocase*) na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani zaslužno je za veliku proporciju bazalnog „curenja“, koje je konstitutivno i neregulisano, i čiji mehanizam nije u potpunosti poznat (Cadenas, 2018). Najbolje izučeni protein koji učestvuje u inducibilnom curenju [H⁺] je UCP1 (engl. *Uncoupling Protein 1*) koji je u velikoj meri eksprimiran na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani ćelija mrkog masnog tkiva (MMT) gde mu je fiziološka funkcija adaptivna termogeneza. UCP1 je inhibiran purinskim nukleotidima u fiziološkim koncentracijama, naročito guanin difosfatom (GDP), dok se smatra da NEFA snažno povećavaju njegovu aktivnost (Demine et al., 2019). U ćelijama MMT, pod dejstvom epinefrina dolazi do razgradnje lipida i glukoze i posledične aktivacije UCP1 koja vodi do odvajanja procesa respiracije od oksidativne fosforilacije pri čemu se energetski fluks [H⁺] koristi za generisanje toplote ali ne i ATP (Echtay et al., 2018). Na osnovu sekvenci komplementarne DNK (cDNK), 20 godina nakon otkrića UCP1, opisani su drugi proteini veoma slični UCP1 koji su eksprimirani u MMT ali i u drugim tkivima. Prvootkriveni bio je UCP2, zatim i UCP3 koji su delili približno 59% homologije sa UCP1, a kod sisara su kasnije otkriveni i UCP4 i UCP5 sa 30% homologije (Bouillaud et al., 2016). Otkriće novih UCP proteina i njihova ekspresija u tkivima gde adaptivna termogeneza nema značaja, otvorila je mogućnost da ovi proteini, osim termogene, mogu imati i neke druge funkcije poput zaštite od oksidativnih oštećenja, degenerativnih bolesti i starenja (Brand & Esteves, 2005). Takođe, postoje hipoteze po kojima UCP proteini mogu učestvovati i u izvozu masnih kiselina i njihovih peroksida iz mitohondrija čime se ostvaruje uticaj na njihov metabolizam (Brand & Esteves, 2005). U srcu su eksprimirane UCP2 i UCP3 izoforme proteina (Alán et al., 2009).

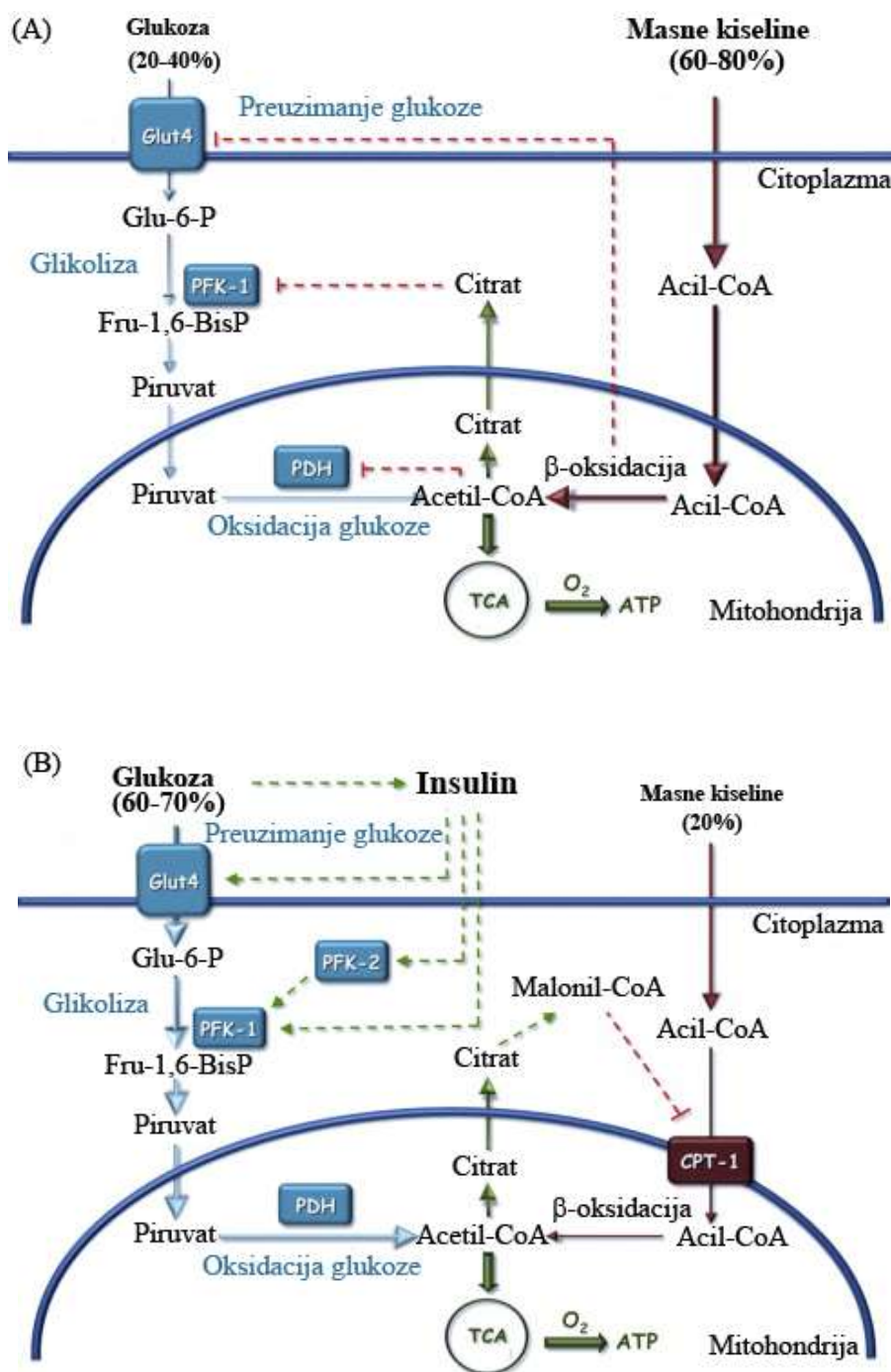
1.1.3. Randlov ciklus

Randlov ciklus ili „glukoza-masne kiseline“ ciklus opisuje kompeticiju između glukoze i masnih kiselina kao supstrata u procesu oksidacije i njihovu međusobnu regulaciju koja je nezavisna od hormona (Hue & Taegtmeyer, 2009; Randle et al., 1963). Ovaj efekat masnih kiselina najpre je otkriven u srcu, zatim u jetri i β ćelijama pankreasa, a onda i u drugim tkivima, što govori o univerzalnosti ovog procesa. U bazalnom stanju intermedijeri β-oksidacije mogu uticati na metabolizam glukoze inhibirajući aktivnost PFK1 i PDH enzima (Slika 1A.). Naime, kada je stepen

β -oksidacije povećan dolazi do povećane produkcije acetil-CoA i NADH koji inhibiraju aktivnost PDH. Povišena količina acetil-CoA povećava produkciju citrata koji inhibira aktivnost enzima PFK1 čime se sprečava konverzija Fru-6-P u Fru-1,6-BisP, i posledičnog nagomilavanja ovog intermedijera koji eventualno može inhibirati aktivnost enzima HK (Hue & Taegtmeyer, 2009).

Iako je originalan rad Randle i saradnika (Randle et al., 1963) ukazivao da postoji i recipročan efekat, odnosno da intermedijeri oksidacije glukoze mogu suprimirati oksidaciju masnih kiselina, tačan mehanizam ove pojave otkriven je kasnije. Lipogeni intermedijer glikolize, malonil-CoA, ima ključnu ulogu u ovom procesu. Naime, kada se koncentracija insulina poveća kao odgovor na povećanje koncentracije glukoze u cirkulaciji, dolazi do povećanog preuzimanja glukoze u ćelije koja se kataboliše u procesu glikolize. Nastali piruvat se aktivnošću PDH u mitohondrijama prevodi u acetil-CoA koji ulazi u Krebsov ciklus. U prvoj reakciji Krebsovog ciklusa nastaje citrat koji delimično može preći u citosol gde sa jedne strane može delovati na PFK1, a delom se može regenerisati acetil-CoA. Na acetil-CoA u citosolu deluje enzim acetil-CoA karboksilaza (ACC, engl. *Acetyl-CoA Carboxylase*) koja ga prevodi u malonil-CoA. Malonil-CoA direktno deluje na CPT-1, tako što blokira njegovu aktivnost i sprečava transport masnih kiselina iz citosola u mitohondrije (Slika 1B.) (Depre et al., 1999). Malonil-CoA u srcu ima kratak polужivot i njegov nivo se kontroliše dinamikom procesa sinteze i degradacije pod dejstvom enzima ACC i malonil-CoA dekarboksilaze (MCD, engl. *Malonyl-CoA Decarboxylase*), respektivno (Hopkins et al., 2003). U jetri je eksprimirana ACC1 izoforma enzima koja je lokalizovana u citosolu i ima ulogu u *de novo* lipogenezi dok u srcu dominira ACC2 izoforma, lokalizovana na spoljašnjoj membrani mitohondrija i ima isključivu ulogu u nastanku malonil-CoA poreklom od oksidacije glukoze koji blokira β -oksidaciju masnih kiselina (Abu-Elheiga et al., 2000). Razlika između jetre i srca ogleda se i u senzitivnosti CPT-1 na malonil-CoA, pri čemu postoji veća senzitivnost u srcu zbog čega povećanje koncentracije malonil-CoA u srcu uvek inhibira aktivnost CPT-1 (Bird & Saggerson, 1984; Hue & Taegtmeyer, 2009). S druge strane, tokom reperfuzije ishemijskih srca pacova pokazano je da fosforilacija i naknadna inhibicija obe izoforme ACC1/ACC2, potiskuje konverziju acetil-CoA u malonil-CoA i povećava unos masnih kiselina u mitohondrije (Kudo et al., 1996).

Glavni regulator aktivnosti ACC u srcu je AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK, engl. *AMP Activated Protein Kinase*) koja vrši fosforilaciju ACC na Ser⁷⁹ i inhibira njegovu enzimsku aktivnost (Dyck et al., 1999; Scott et al., 2002). Takođe, neke studije sugerišu da bi AMPK mogao da utiče i na aktivnost enzima MCD (Sambandam et al., 2004). AMPK je filogenetski očuvan enzimski kompleks koji funkcioniše kao senzor ćelijskog energetskeg statusa i utiče na regulaciju ćelijskog metabolizma i energetske homeostazu. U uslovima energetskeg stresa koji se javlja kao posledica nedostatka dostupnosti nutrijenata ili delovanja farmakoloških agenasa, aktivirani AMPK obnavlja energetske balans tako što aktivira kataboličke puteve koji proizvode ATP i inhibira anaboličke puteve koji troše ATP (Mihaylova & Shaw, 2011). Regulacija aktivnosti AMPK dešava se na nivou alosteričke modifikacije enzima i delovanja uzvodnih kinaza i fosfataza. U okviru kinaznog domena AMPK nalazi se ostatak treonina (Thr¹⁷²) čiji je status fosforilacije ključna determinanta za aktivnost enzima (Yan et al., 2018). Takođe, pokazano je da AMPK u srcu podleže inhibitornoj fosforilaciji na serinskom ostatku (Ser⁴⁸⁵) koju vrši Akt (Kovacic et al., 2003). Aktivirani AMPK u srcu, osim delovanja na ACC molekul, utiče i na transport vezikula sa GLUT4 što omogućava povećan stepen preuzimanja glukoze (Horie et al., 2008; Luiken et al., 2015). Takođe, AMPK utiče i na preuzimanje masnih kiselina stimulisanjem transporta CD36 molekula iz intracelularnih depoa na površinu sarkoleme (Luiken et al., 2003).



Slika 1. Šematski prikaz Randlovog ciklusa. Metabolizam u srcu u bazalnim (A) i insulinom stimulisanim uslovima (B). U bazalnom stanju, acetil-CoA neophodan za nastanak ATP potiče uglavnom iz β-oksidacije masnih kiselina, i inhibira oksidaciju glukoze putem Randlovog ciklusa (isprekidane linije). Kada se koncentracija insulina poveća u odgovoru na povećanje glukoze u cirkulaciji, glukoza postaje glavni energetske supstrat za srce. Insulin indukuje translokaciju GLUT4 na plazma membranu i stimuliše enzime PFK-1/PFK2, što dovodi do istovremene stimulacije preuzimanja glukoze i glikolize. CoA: koenzim A; Fru-1,6-BisP: fruktozo-1,6-bisfosfat; Glu-6-P: glukozo-6-fosfat; PFK-1: fosfofrukto kinaza 1; PFK-2: fosfofrukto kinaza 2; GLUT4: transporter za glukozu 4; PDH: piruvat dehidrogenaza. Preuzeto i modifikovano iz Bertrand et al., 2015.

1.2. Insulin

Insulin je polipeptidni hormon koji ima širok spektar fizioloških delovanja sa važnom ulogom u homeostazi glikemije, ćelijskom rastu i metabolizmu. Svoje efekte ostvaruje vezivanjem za receptor

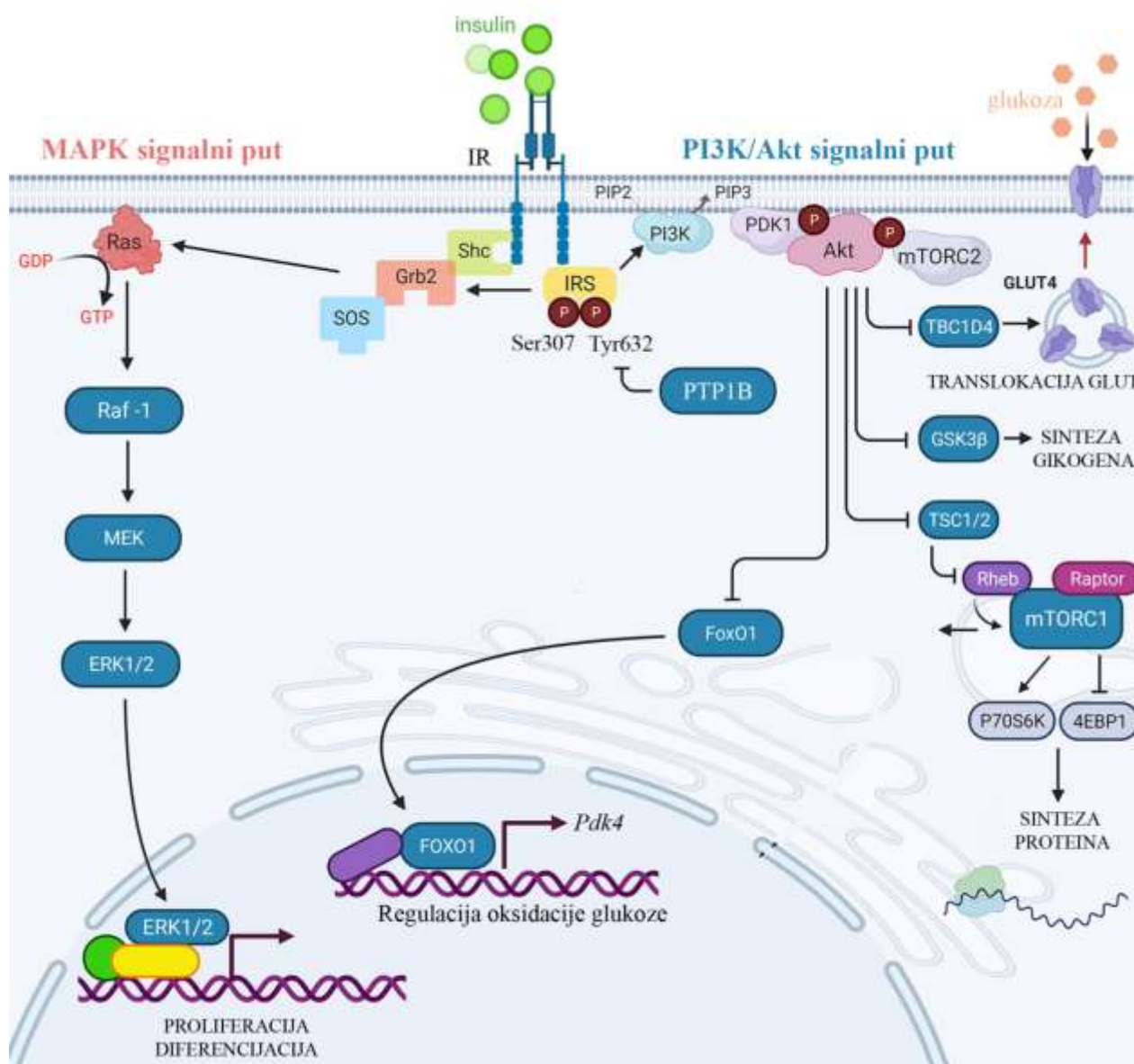
za insulin (IR, engl. *Insulin Receptor*) na površini ćelija. Glavna ciljna tkiva na koja deluje insulin su jetra, skeletni mišići i adipozno tkivo u kojima ispoljava anaboličko dejstvo (Petersen & Shulman, 2018). IR je u velikoj meri eksprimiran i u kardiomiocitima, zbog čega srce takođe predstavlja organ na koji deluje insulin. Insulin utiče na vaskularni tonus, zatim kontraktilnost, apoptozu/preživljavanje i rast kardiomiocita, kao i na metabolizam glukoze i masnih kiselina i sintezu proteina u srcu (Iliadis et al., 2011).

Pokazano je da fiziološke koncentracije insulina, i pre i posle obroka, dovode do inotropnog odgovora tj. povećanja snage srčanog mišića, dok je ovaj efekat oslabljen kod gojaznih ljudi sa insulinskom rezistencijom (Baron, 1994). Sistemska insulinska rezistencija je često prisutna kod pacijenata sa kongestivnom ili ishemijskom srčanom insuficijencijom ili idiopatskom dilatiranom kardiomiopatijom (Paolisso et al., 1991; Swan et al., 1997) zbog čega se smatra da insulinska rezistencija može doprineti kontraktilnoj disfunkciji. Poremećaji intracelularne homeostaze Ca^{2+} , barem delimično, izazivaju kontraktilnu disfunkciju srca kod dijabetičnih pacova (Lagadic-Gossman et al., 1996). Efekti insulina na molekule uključene u regulaciju unutraćeljske homeostaze Ca^{2+} su testirani u *in vivo* i *in vitro* uslovima kod ljudi i nekoliko animalnih modela gde je pokazano da insulin povećava fluks Ca^{2+} kroz LTCC (Aulbach, 1999; Maier et al., 1999) i reverzni NCX (Von Lewinski et al., 2005), kao i da utiče na gensku i proteinsku ekspresiju SERCA2 i RyR (Teshima et al., 2000).

Dobar animalni model sistem koji omogućava izučavanje direktnih efekata insulina na srce su miševi sa specifičnom delecijom IR u kardiomiocitima (CIRKO miševi). Belke i saradnici su pokazali da delecija IR u kardiomiocitima miševa u ranom postnatalnom periodu dovodi do zastoja u rastu srca i zadržavanja metaboličkih karakteristika fetalnog srca, poput povećane glikolize i smanjene oksidacije masnih kiselina, što ukazuje na važnu ulogu insulina u tranziciji između fetalnog ka adultnom srcu (Belke et al., 2002). Takođe, pokazano je i da narušen insulinski signalni put u srcu CIRKO miševa dovodi do mitohondrijalne disfunkcije koja se ogleda u redukciji kapaciteta mitohondrijalne oksidacije i sinteze ATP (Boudina et al., 2009). Dramatično pogoršanje srčane efikasnosti primećeno je kod dijabetičnih CIRKO miševa u odnosu na normalne CIRKO miševe, što ukazuje na sinergističko delovanje metaboličkih promena koje prate dijabetes, i insulinskog signalnog puta u srcu *per se* (Bugger et al., 2012).

1.2.1. Signalni putevi insulina

U ciljnim ćelijama insulin može pokrenuti dva glavna signalna puta: put fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) odgovoran za metaboličke efekte insulina, i put proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) koji reguliše rast i diferencijaciju ćelija (Slika 2). Koncentracije insulina neophodne za stimulisanje metaboličkih odgovora su niže od onih koje su potrebne za mitogene odgovore (Petersen & Shulman, 2018). Oba signalna puta započinju vezivanjem insulina za IR na površini ćelije.



Slika 2. PI3K/Akt i MAPK signalni putevi aktivirani insulinom. Aktivni IR prenosi signal insulina na efektorske proteine nizvodno, preko porodice proteina IRS koji obezbeđuju specifična mesta za vezivanje koja aktiviraju druge kinaze kao što je PI3K. PI3K stupa u interakciju sa svojim supstratom, PIP2 u ćelijskoj membrani, stvarajući PIP3, koji služi kao mesto vezivanja PDK1 i mTORC2 kinaze koje zatim aktiviraju Akt fosforilacijom dva različita ostatka. Akt reguliše metaboličke efekte insulina kroz fosforilaciju širokog spektra supstrata. S druge strane, IR osim što fosforiliše IRS, takođe fosforiliše Shc protein, i oba proteina nezavisno mogu da aktiviraju protein Grb2 koji zatim aktivira MAP kinaze (Raf-1, MEK i ERK 1/2). ERK1/2 aktivira faktore transkripcije i nuklearne proteine, i na taj način insulin modulira ekspresiju gena i rast ćelija. IR: receptor za insulin; IRS: supstrat receptora za insulin; PI3K: fosfatidilinozitol 3-kinaza; PIP2: fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat; PIP3: fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat; PDK1: kinaza tipa 1 zavisna od PIP3; PTP1B: proteinska tirozinska fosfataza 1B; AKT: proteinska kinaza B; GSK3: kinaza glikogen sintaze 3; mTOR: ciljani molekul za rapamicin kod sisara; FoxO1: (engl. *Forkhead Box Protein O1*); GLUT4: transporter za glukoza 4; Shc: protein koji sadrži domen 2 homolog Src; GRB2: (engl. *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*); SOS: (engl. *Son of Sevenless*); MAPK: proteinske kinaze aktivirane mitogenima; ERK: kinaze regulisane vanćelijskim signalima; MEK: MAPK ERK kinaze. Preuzeto i modificovano iz Ortiz-Huidobro et al., 2021.

1.2.1.1. Receptor za insulin i supstrati receptora za insulin

IR je heterotetramerni protein sastavljen od dve α i dve β subjedinice. Vanćelijski domen receptora koji vezuje insulin čine α subjedinice dok su β subjedinice transmembranski domeni receptora sa aktivnošću tirozin kinaze (Petersen & Shulman, 2018). Osim što vezuju insulin, α subjedinice ograničavaju tirozin kinaznu aktivnost β subjedinica. Vezivanjem liganda za receptor dolazi do konformacionih promena u okviru β subjedinica koje aktiviraju tirozin kinaznu aktivnost i vrše trans-autofosforilaciju većeg broja tirozinskih ostataka. Ključne fosforilacije dešavaju se na tirozinskim (Tyr) ostacima 1158, 1162, i 1163 u okviru aktivacione petlje i dovode do oslobađanja katalitičkog mesta enzima što povećava afinitet receptora za ATP i potencijalne supstrate (Youngren, 2007). Fosforilisani Tyr ostaci β subjedinica predstavljaju mesta regrutovanja različitih klasa proteina, od kojih su najvažniji članovi familije supstrata receptora za insulin (IRS, engl. *Insulin Receptor Substrate*) i protein koji sadrži domen 2 homolog Src (Shc, engl. *Src Homology 2 Domain Containing Protein*).

Kod sisara postoje četiri izoforme IRS proteina sa različitom ćelijskom distribucijom pri čemu su IRS-1 i IRS-2 glavne izoforme uključene u regulaciju metabolizma (Haeusler et al., 2018). IRS proteini na amino terminusu poseduju konzervirani plekstrin homologni (PH, engl. *Pleckstrin Homology*) domen i fosfotirozin vezujući (PTB, engl. *Phosphotyrosine-Binding*) domen. PH domen omogućava vezivanje IRS proteina za fosfoinozotide ćelijske membrane i blisku lokalizaciju IRS proteina sa IR. Takođe, PH domen omogućava i protein-protein interakcije IRS proteina međusobno, ali i sa drugim ćelijskim konstituentima. PTB domen omogućava vezivanje IRS proteina za IR. C terminalni region IRS proteina je slabo konzerviran i sadrži mnogobrojne Tyr ostatke koji podležu fosforilaciji od strane IR i služe kao mesta vezivanja efektorih proteina koji sadrže SH2 (engl. *Src Homology 2*) domen (Boura-Halfon & Zick, 2009).

Okončanje aktivnosti insulinskog signalnog puta je strogo regulisan proces. Jedan od mehanizama regulacije podrazumeva internalizaciju i degradaciju IR. Sa druge strane aktivirajuće fosforilacije na IR i IRS proteinima mogu biti uklonjene delovanjem proteinskih fosfataza. Najbolje opisana fosfataza koja učestvuje u ovom procesu je proteinska tirozinska fosfataza (PTP, engl. *Protein Tyrosine Phosphatase*) 1B. Pokazano je da je ekspresija i aktivnost PTP1B fosfataze povećana u jetri, masnom tkivu, skeletnim mišićima i *nukleus arquatus* hipotalamusa kod miševa na režimu ishrane bogate mastima (HFD, engl. *High Fat Diet*), kod kojih je razvijena gojaznost i insulinska rezistencija (Zabolotny et al., 2008). Takođe je pokazano da se smanjenjem ekspresije PTP1B u jetri i masnom tkivu, upotrebom antisens oligonukleotida, povećava osetljivost na insulin i normalizuje nivo glukoze u krvi kod dijabetičnih *ob/ob* miševa (Gum et al., 2003). Okončanje insulinske signalizacije takođe može biti ostvareno i delovanjem serin kinaza na IRS proteine, pri čemu serinske (Ser) fosforilacije na IRS proteinima deluju kao negativni regulatori njihove aktivnosti (Saltiel, 2015).

1.2.1.2. Signalni put PI3K

Prvi protein za koji je utvrđeno da stupa u interakciju sa IRS proteinima bila je PI3K klase I_A (Saltiel, 2015), koji predstavlja heterodimerni protein koji se sastoji od p85 regulatorne subjedinice i od p110 katalitičke subjedinice. U okviru regulatorne subjedinice nalazi se SH2 domen preko kojeg se PI3K povezuje sa IRS proteinima i lokalizuje u blizini plazma membrane. Povezivanje sa IRS proteinima aktivira katalitičku subjedinicu i ona deluje na fosfatidil inozitol 4,5-bifosfat (PIP2) u plazma membrani pri čemu nastaje sekundarni glasnik fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3) (Huang et al., 2018). Povećanje PIP3 u plazma membrani izaziva regrutovanje i kolokalizaciju nekoliko Ser/Thr kinaza, među kojima i fosfoinozitud-zavisnu kinazu 1 (PDK1, engl. *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) i Akt.

Nakon što se aktivira, PDK1 fosforiliše, a time i aktivira najmanje 23 kinaze iz porodice AGC kinaza, među kojima su Akt, S6 kinaza (S6K), protein kinazu C ζ (PKC, engl. *Protein Kinase C*) i druge (Leroux et al., 2018). Studije delovanja insulina pokazale su da je PI3K/Akt put odgovoran za stimulaciju glikolize u srcu tako što sa jedne strane povećava unos glukoze u srce preko GLUT4 transportera, a sa druge strane povećava aktivnost PFK2 enzima (Deprez et al., 1997). Korišćenjem inhibitora u *in vitro* studijama pokazano je da je aktivacija PFK2 u srcu nezavisna od delovanja Akt i S6K, ali da zahteva očuvanu aktivnost PDK1 (Bertrand et al., 1999). Takođe je pokazano i da postoji kinaza nizvodno od PDK1 koja bi mogla biti odgovorna za ove fosforilacije i nazvana je WISK (engl. *Wortmannin-Sensitive and Insulin-Stimulated Protein Kinase*) (Deprez et al., 2000). PDK1 omogućava dalji prenos insulinskog signala od PI3K ka aktivaciji Akt (Cheng et al., 2010).

Akt je Ser/Thr kinaza koja se kod sisara eksprimira u tri izoforme pri čemu je Akt1 izoforma prisutna u svim tkivima, Akt2 izoforma ekspimirana je uglavnom u ćelijama koje su osetljive na insulin dok je Akt3 izoforma u najvećoj meri ekspimirana u mozgu i testisima (Fayard et al., 2010). Za maksimalnu aktivnost Akt neophodne su dve fosforilacije, fosforilacija Thr³⁰⁸ u kinaznom domenu od strane PDK1, i fosforilacija Ser⁴⁷³ u C-terminalnom regulatornom domenu koju vrši kompleks 2 ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (mTORC2, engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*) čija aktivnost takođe zavisi od PI3K (Huang et al., 2018; Manning & Toker, 2017). Signalizacija posredovana PI3K/Akt putem može biti prekinuta delovanjem fosfataze PTEN na lipidne sekundarne glasnike. Takođe, signalizacija može biti prekinuta i delovanjem protein fosfataze 2A (PP2A, engl. *Protein Phosphatase 2A*) i PHLPP (engl. *PH-domain Leucine-Rich Repeat Protein Phosphatase*) koje defosforilišu Akt na ostacima Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³, respektivno (Manning & Toker, 2017). U kardiovaskularnom sistemu, prenos signala nizvodno od Akt uključen je u regulaciju ćelijskog metabolizma, angiogeneze, vazorelaksacije, preživljavanja, rasta i proliferacije ćelija što je obezbeđeno njenim delovanjem na različite supstrate (Abeyrathna & Su, 2015).

Aktivirani Akt utiče na transport vezikula koje u sebi sadrže GLUT4 (Jaldin-Fincati et al., 2017) i vezikula koje sadrže CD36 molekule (Samovski et al., 2012), identičnim mehanizmom. Proteini uključeni u regulaciju vezikularnog transporta su mali GTP-vezujući proteini-Rab GTPaze. Rab GTPaze funkcionišu kao molekularni prekidači koji mogu prelaziti iz GTP-vezane aktivne forme u GDP-vezanu neaktivnu formu, i obrnuto. Konverzija iz GTP-vezanog oblika u GDP-vezanu formu se dešava putem hidrolize GTP, koja nije vođena samo intrinzičnom aktivnošću proteina, već je takođe katalizovana proteinima koji aktiviraju GTPazu (GAP, engl. *GTPase-Activating Protein*). U bazalnim uslovima ovi proteini onemogućavaju aktivnost Rab GTPaza na vezikulama i sprečavaju njihovu translokaciju na plazma membranu. Aktivirani Akt fosforiliše Rab GAP nazvan Akt supstrat od 160 kDa (AS160), i člana njegove porodice TBC1D1. Fosforilacija pomoću Akt dovodi do inaktivacije AS160 i TBC1D1, čime se njihov inhibitorski efekat na Rab GTPaze ukida i stimuliše se translokacija vezikula na plazma membranu (Jaldin-Fincati et al., 2017).

Akt takođe utiče i na aktivnost transkripcionih faktora FoxO (engl. *Forkhead Box O*) familije. Ova familija obuhvata četiri člana: FoxO1, FoxO3, FoxO4 i FoxO6, pri čemu su prva tri ekspimirana u srcu dok je FoxO6 ekspimiran u mozgu (Ronnebaum & Patterson, 2010). FoxO proteini pripadaju velikoj superfamiliji Fox proteina koji dele veoma sličan domen vezivanja na DNK molekulu označen kao *forkhead box* (Schmitt-Ney, 2020). U jedru, FoxO proteini se vezuju za konzerviranu sekvencu vezivanja na DNK, TTGTTTAC, i mogu se povezati sa različitim koaktivatorima (Ronnebaum & Patterson, 2010). Brunet i saradnici su prvi pokazali da Akt fosforiliše FoxO3 na ostacima Thr³², Ser²⁵³ i Ser³¹⁵, *in vitro* i *in vivo*, što dovodi do translokacije FoxO3 iz jedra u citoplazmu (Brunet et al., 1999). Fosforilacije od strane Akt nisu dovoljne da izazovu strukturne promene u domenu proteina koji je odgovoran za vezivanje na DNK molekulu, što znači da Akt ne utiče direktno na aktivnost ovih proteina, već omogućava generisanje mesta za vezivanje adaptorskih proteina 14-3-3 koji zatim omogućavaju izlazak iz jedra (Tzivion et al., 2011). Na ovaj način Akt vrši negativnu regulaciju transkripcione aktivnosti FoxO proteina. FoxO

proteini su uključeni u regulaciju metabolizma, autofagiju, apoptozu, starenje, ćelijski rast i diferencijaciju, te zaštitu od oksidativnog stresa (Schmitt-Ney, 2020). FoxO1 utiče na metabolizam glukoze u srcu tako što na transkripcionom nivou reguliše enzim PDK4 čime direktno smanjuje oksidaciju glukoze. S druge strane, inhibicija FoxO1 od strane Akt dovodi smanjene ekspresije enzima PDK4 i posledično do povećane oksidacije glukoze. Takođe FoxO1 ima značajnu ulogu i u regulaciji snabdevanja srca masnim kiselinama tako što utiče na translokaciju transportera CD36 na plazma membranu čime povećava njihov unos u srce i posledičnu oksidaciju (Puthanveetil et al., 2013).

Akt deluje i na proces sinteze glikogena u ćeliji tako što fosforiliše Ser/Thr kinazu glikogen sintaze 3 β (GSK-3 β , engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 β*) na ostatku Ser⁹ i dovodi do ukidanja njene aktivnosti. GSK-3 β je u ćeliji konstitutivno aktivna i tako održava glikogen sintazu (GS, engl. *Glycogen Synthase*) u neaktivnom fosforilisanom stanju. Insulin, preko Akt, uklanja inhibicioni efekat GSK-3 β sa GS i na taj način stimuliše sintezu glikogena (Singh et al., 2019). Akt obezbeđuje još jedan stimulus za sintezu glikogena, aktivacijom protein fosfataze 1 (PP1, engl. *Protein Phosphatase-1*) koja defosforiliše GS i tako je aktivira (Chandramouli et al., 2015).

Akt stimuliše i biosintetske procese aktivacijom kompleksa 1 ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (mTORC1, engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*). Akt vrši fosforilaciju proteina kompleksa 2 tuberozne skleroze (TSC2, engl. *Tuberous Sclerosis Complex 2*) koji funkcioniše u okviru kompleksa sa proteinima TSC1 i TBC1D7, što dovodi do inhibicije aktivnosti kompleksa. U svom aktivnom obliku, TSC2 deluje kao GAP specifičan za GTPazu Rheb i vrši konverziju Rheb-GTP u Rheb-GDP. Dakle, Akt svojim delovanjem ukida inhibicioni efekat TSC2 na Rheb i omogućava aktivaciju mTORC1 (Manning & Toker, 2017). Aktivirani mTORC1 stimuliše različite anaboličke procese, kao što su sinteza proteina, lipida i nukleotida, dok istovremeno inhibira katabolički proces autofagije (Manning & Toker, 2017). Najviše proučavani supstrati mTORC1 su S6K i eukariotski faktor inicijacije translacije 4E (eIF4E)-vezujući protein-1 (4E-BP1). mTORC1 fosforiliše i aktivira S6K, što zauzvrat promovise biogenezu iRNK i aktivira proces translacije proteina. Nasuprot tome, mTORC1 inhibira 4E-BP1 i omogućava formiranje eIF4E kompleksa koji pokreće translaciju zavisnu od 5' kape (Sciarretta et al., 2014). mTORC1 ima i važnu ulogu u inhibiciji PI3K/Akt puta povratnom spregom. Veliki deo ove regulacije se pripisuje mTORC1-zavisnoj degradaciji IRS-1 i IRS-2 kroz višestruke fosforilacije Ser na ovim proteinima posredovane mTORC1, S6K ili drugim nepoznatim nizvodnim protein kinazama, čime se u velikoj meri smanjuje aktivacija PI3K/Akt puta. Takođe S6K može vršiti fosforilaciju mTORC2 komponenti i smanjiti mTORC2-zavisnu fosforilaciju Akt (Manning & Toker, 2017).

1.2.1.3. Signalni put MAPK

Signalizacija preko IR može aktivirati MAPK signalni put uključen u regulaciju procesa ćelijske proliferacije, diferencijacije i ćelijske smrti (Bedinger & Adams, 2015). Familija enzima MAPK obuhvata kinaze regulisane vanćelijskim signalima (ERK, engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*), JNK (engl. *c-Jun N-terminal Kinase*) i p38 kinazu (Roberts, 2012). Signalizacija podrazumeva trokinazni modul u kojem se dve uzvodne protein kinaze aktiviraju tokom fosforilacione kaskade i dovode do aktivacije odgovarajuće MAPK (Pearson, 2001). U srcu ERK1/2 kaskada je ključni regulator mitogenog odgovora na insulin (Bedinger & Adams, 2015) i aktivira se kroz Ras/Raf/MEK kaskadu (Roberts, 2012). Kaskada započinje vezivanjem adaptornog proteina Shc preko PTB domena za aktivirani IR što dalje regrutuje kompleks proteina Grb2-SOS (engl. *Growth Factor Receptor Bound 2 – Son of Sevenless*) na plazma membranu. SOS deluje kao faktor razmene guanin nukleotida i aktivira malu GTPazu Ras. Ras zatim regrutuje i aktivira Raf koji inicira kinaznu kaskadu koja rezultuje u aktivaciji ERK1/2 (Poloz & Stambolic, 2015; Taniguchi et al., 2006). Puna aktivnost ERK1/2 zahteva fosforilaciju na Tyr i Thr ostacima (Ferrell & Bhatt,

1997). Aktivirani ERK1/2 funkcioniše kao kinaza koja fosforiliše različite ciljne molekule u citoplazmi i jedru. Među identifikovanim citoplazmatskim targetima su citoskeletni elementi, membranski receptori i ćelijski adhezivni proteini, dok u jedru targete predstavljaju uglavnom transkripcioni faktori (Gilbert et al., 2021). Put ERK1/2 uključen je u fazi razvoja srca ali takođe i u procesima kardioprotektivne i maladaptivne hipertrofije (Gallo et al., 2019; Wang, 2007).

1.3. Vitamin D

1.3.1. Hemijska struktura, sinteza i distribucija vitamina D

Vitamin D prema nomenklaturi spada u liposolubilne vitamine, dok je prema hemijskoj strukturi steroid, tačnije sekosteroid jer je veza između 9. i 10. ugljenikovog atoma u B prstenu ciklopentanoperhidrofenantrena prekinuta (Bouillon et al., 1995). Kada se govori o vitaminu D najčešće se podrazumevaju dve forme prohormona, holekalciferol (vitamin D3) i ergokalciferol (vitamin D2), koje se međusobno razlikuju u strukturi bočnog lanca. Obe forme vitamina D mogu se uneti hranom, holekalciferol putem obogaćenih namirnica (mleko i mlečni proizvodi, žitarice, margarini) ili iz masne ribe, životinjskih masti i žumanaca, dok se ergokalciferol nalazi u suplementima i prirodno kod pečuraka i kvasaca. Relativno mali broj namirnica obiluje ili je obogaćen vitaminom D zbog čega hrana predstavlja dopunski izvor vitamina D, dok je primarni izvor njegova sinteza u ćelijama kože životinja. Delovanjem UV-B zračenja na 7-dehidroholesterol (7-DHA), prekursor holesterola, nastaje pre-vitamin D3 u koži koji zatim podleže termalnoj izomerizaciji pri čemu nastaje holekalciferol (Jenkinson, 2019). Pre-vitamin D3 može dati i dva inertna jedinjenja, lumisterol i tahisterol, ili pak biti ponovo konvertovan u 7-DHA što predstavlja mehanizme zaštite od prekomernog izlaganja sunčevim zracima (Jenkinson, 2019). Smatra se da endogena produkcija obezbeđuje čak 80% dnevnih potreba organizma za vitaminom D (Borel et al., 2015). Produkcija u koži zavisi od endogenih faktora kao što su uzrast i pigmentacija kože. Starenjem dolazi do smanjenja nivoa 7-DHA i kapaciteta kože da produkuje holekalciferol (MacLaughlin & Holick, 1985). Efekat smanjenja produkcije ispoljava i melanin prisutan u koži koji efikasno apsorbuje UV-B zračenje. Zagađenje vazduha, godišnje doba, geografska širina i upotreba zaštitnih krema za sunčanje spadaju u grupu egzogenih faktora koji utiču na produkciju holekalciferola u koži (Holick, 1995). Ergokalciferol takođe može nastati endogeno delovanjem UV-B zračenja na ergosterol (Berretta et al., 2022).

Vitamin D unet hranom se apsorbuje u tankom crevu na isti način kao i TAG, holesterol i fosfolipidi (Borel et al., 2015), tako da u cirkulaciju ulazi u okviru hilomikrona što omogućava njegovo preuzimanje od strane masnog tkiva i mišića gde se može deponovati, pre nego što stigne do jetre (Jones, 2008). Sa druge strane, vitamin D koji nastaje u koži se transportuje direktno do jetre vezan za transportne proteine plazme, u najvećoj meri za protein koji vezuje vitamin D (DBP, engl. *Vitamin D Binding Protein*), i u manjoj meri za albumin i lipoproteine. DBP vezuje različite metabolite vitamina D različitim afinitetom, u poretku 25-hidroksivitamin D3 (25(OH)D3) = 24,25-dihidroksivitamin D3 (24,25(OH)₂D3) > 1,25-dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)₂D3) > vitamin D (Bouillon et al., 2020; Dusso et al., 2005). Skoro 99% metabolita vitamina D prisutnih u cirkulaciji je vezano za proteine što utiče na njihovu bioraspoloživost i poluživot (Dusso et al., 2005). Kod gojaznih osoba vitamin D se u značajnoj meri deponuje u masnom tkivu što smanjuje bioraspoloživost (Blum et al., 2008; Gil et al., 2018).

1.3.2. Metabolizam vitamina D

Metabolička konverzija dva prohormona je slična od trenutka kada se nađu u cirkulaciji i vodi nastanku mnogobrojnih metabolita od kojih je 1,25(OH)₂D₃ (kalcitriol) glavni aktivni oblik vitamina D (Slika 3.) (Gil et al., 2018). Put od inertnog do biološki aktivnog metabolita vitamina D podrazumeva dvostepeni proces hidroksilacije koji katalizuju enzimi koji pripadaju superfamiliji citohrom P450. U jetri, vitamin D podleže prvoj hidroksilaciji delovanjem enzima sa 25-hidroksilaznom aktivnošću, pri čemu nastaje 25(OH)D, najzastupljenija cirkulišuća forma vitamina D. Do danas je identifikovano najmanje šest enzima sa 25-hidroksilaznom aktivnošću (Jenkinson, 2019) ali se čini da kod ljudi primarno funkcioniše enzim CYP2R1 (engl. *Cytochrome P450 Family 2 Subfamily Member R1*) (Christakos et al., 2019). Prosečan poluživot 25(OH)D u plazmi je oko tri nedelje zbog čega njegova koncentracija ujedno predstavlja i parametar koji se koristi za određivanje statusa vitamina D u organizmu (Gil et al., 2018). Iz jetre, 25(OH)D se transportuje do proksimalnih tubula bubrega gde se dešava druga hidroksilacija od strane enzima sa 1 α -hidroksilaznom aktivnošću (CYP27B1, engl. *Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1*), pri čemu nastaje 1,25(OH)₂D₃ (Christakos et al., 2016). CYP27B1 je do danas jedini opisani enzim sa 1 α -hidroksilaznom aktivnošću i osim u bubrezima eksprimiran je i u drugim tkivima, poput epidermisa, kostiju, placente i ćelija imunskog sistema, što ukazuje na lokalnu produkciju aktivne forme vitamina D (Bikle & Christakos, 2020; Christakos et al., 2019). Aktivnost enzima CYP27B1 je strogo regulisan proces, i smatra se da samo mali deo ukupnog pula 25(OH)D iz cirkulacije podleže 1 α -hidroksilaciji. Regulacija aktivnosti CYP27B1 u bubrezima zavisi od paratireoidnog hormona (PTH), faktora rasta fibroblasta 23 (FGF23, engl. *Fibroblast Growth Factor 23*) i 1,25(OH)₂D₃ (Gil et al., 2018), dok u drugim tkivima regulaciju vrše uglavnom citokini i faktori rasta (Bikle & Christakos, 2020), na način koji nije dovoljno poznat.

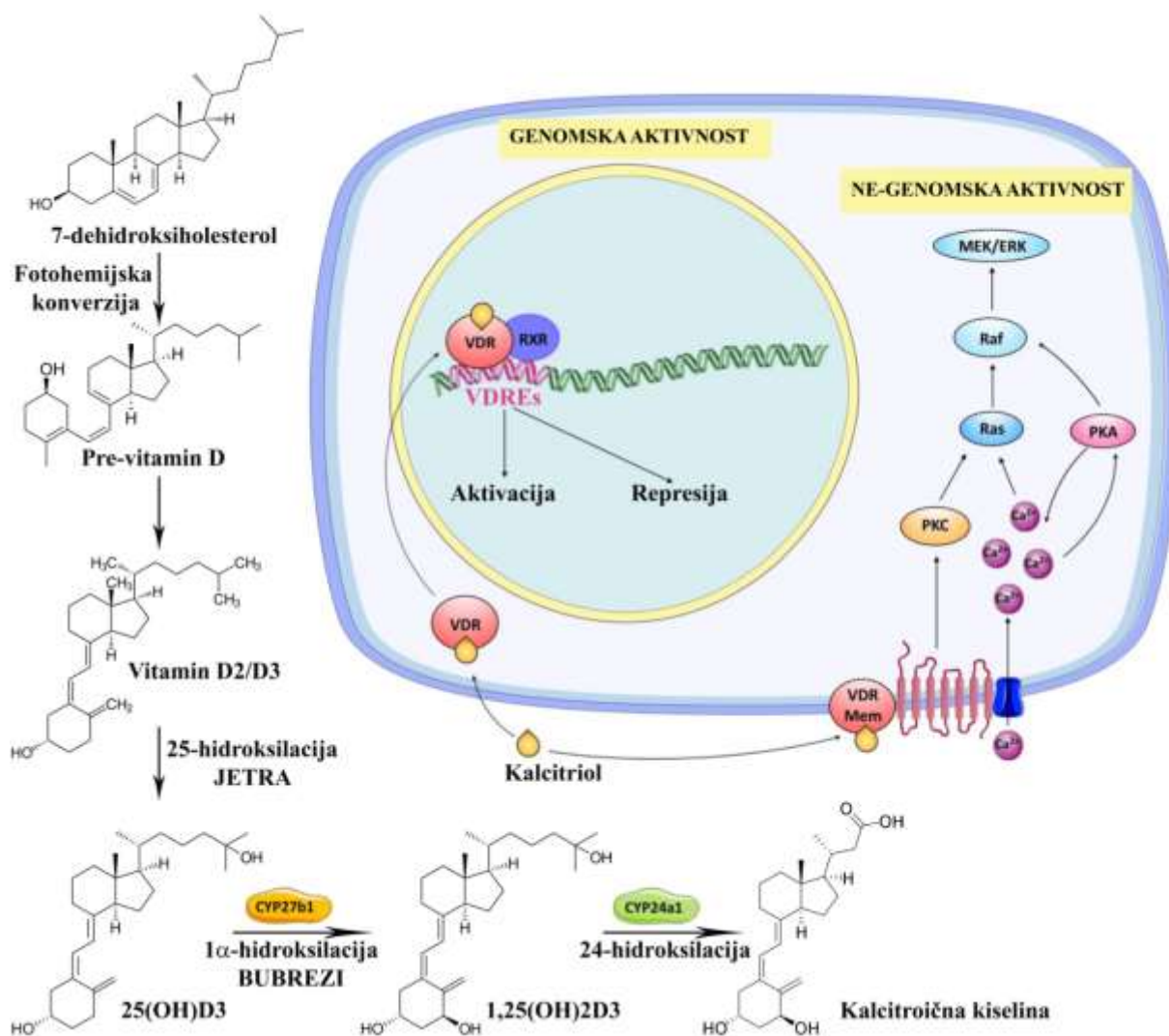
Enzim CYP24A1 (engl. *Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1*) katalizuje nekoliko reakcija u procesu degradacije 25(OH)D i 1,25(OH)₂D₃ koji kao rezultat daju metabolite sa hidroksilnim grupama na C-23 i C-24 atomu, pri čemu kao krajnji produkti nastaju 1 α ,25(OH)₂D₃-26,23-lakton i kalcitroična kiselina, respektivno. Kalcitroična kiselina se izlučuje putem žuči, ali se takođe može ekskretovati i putem urina nakon konjugacije (Jenkinson, 2019). CYP24A1 je do danas jedini opisani enzim koji može da katalizuje ove reakcije (Jenkinson, 2019). Ovaj enzim je široko eksprimiran, i nalazi se u svim ćelijama u kojima je eksprimiran receptor za vitamin D (VDR, engl. *Vitamin D Receptor*) što omogućava zaštitu od nekontrolisane aktivacije receptora (Gil et al., 2018). Aktivnost enzima regulisana je od strane PTH, FGF23 i 1,25(OH)₂D₃. Iako se generalno smatra da CYP24A1 ima glavnu ulogu u katabolizmu metabolita vitamina D, njegovom aktivnošću mogu nastati i biološki aktivni produkti, ali sa značajno manjom sposobnošću aktivacije VDR (Jenkinson, 2019).

1.3.3. Receptor za vitamin D

Biološku aktivnost 1,25(OH)₂D₃ ostvaruje vezivanjem za VDR koji pripada superfamiliji jedarnih receptora (Slika 3.). VDR je protein od 427 aminokiselinskih ostataka koji se nalazi u citoplazmi i jedru ćelija (Barsony et al., 1997) i sa najvećim afinitetom vezuje 1,25(OH)₂D₃, dok je afinitet za 25(OH)D i 24,25(OH)₂D₃ 100 puta manji (Dusso et al., 2005). Nakon vezivanja liganda dolazi do konformacione promene koja omogućava udruživanje sa neokupiranim RXR. Formirani heterodimer VDR-RXR se u jedru vezuje za specifične DNK sekvence označene kao elementi responsivni na vitamin D (VDREs, engl. *Vitamin D Responsive Elements*) koji se nalaze u okviru promotora ciljnih gena čiju ekspresiju reguliše (Lu et al., 2018). Vezivanje kompleksa VDR-RXR za VDREs inicira ili aktivaciju (regutacijom kompleksa proteina koji deluju kao koaktivatori) ili supresiju (regutacijom kompleksa proteina koji deluju kao korepresori) transkripcije ciljnih gena. Ekspresija VDR je identifikovana u gotovo svim ćelijama sa jedrom (Bouillon et al., 2008).

Mnogobrojne studije ispitivanja profila genske ekspresije pokazale su da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direktno ili indirektno reguliše ekspresiju velikog broja gena (Wang et al., 2005) i da može biti uključen u regulaciju mnogobrojnih ćelijskih procesa uključujući rast, diferencijaciju, apoptozu, DNK reparaciju, membranski transport, metabolizam, ćelijsku adheziju i oksidativni stres (Bouillon et al., 2008).

Poznato je da steroidni molekuli osim receptorom posredovane modulacije transkripcije gena mogu ostvariti i brze negenomske efekte (Slika 3.). Ovakve efekte ispoljavaju i metaboliti vitamina D. Nemere i saradnici (Nemere et al., 1984) su pokazali da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ značajno poveća transepitelno kretanje Ca^{2+} u perfundovanom dvanaestopalačnom crevu pilića, što je bio prvi zapaženi fenomen delovanja $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ koji ne zahteva aktivaciju genoma i *de novo* sintezu proteina, poznat kao transkaltahija (Nemere et al., 1984). Kasnije, u mnogobrojnim *in vitro* studijama je ustanovljeno da se negenomsko delovanje vitamina D može manifestovati kroz aktivaciju signalnih molekula kao što su fosfolipaza C i fosfolipaza A2 (PLA2, engl. *Phospholipase A2*), PI3K i p21ras, zatim stvaranje sekundarnih glasnika (Ca^{2+} , ciklični adenozin monofosfat, masne kiseline i 3-fosfoinoziditi), i aktivacija protein kinaza poput protein kinaze A (PKA, engl. *protein kinase A*), MAPK, PKC i kalmodulin zavisne kinaze 2 (CaMKII, engl. *CAM-Dependent Kinase II*) (Hii & Ferrante, 2016). Tada se postavilo pitanje postojanja receptora koji posreduje u negenomskim efektima. Najistaknutiji protein asociran sa membranom koji može vezivati metabolite vitamina D i za koji je pokazano da je kritičan za njihove brze efekte je član 3 protein disulfid izomeraze familije A (PDIA3, engl. *Protein Disulfide-Isomerase A3*). Kristalografske studije nisu uspele da dokažu postojanje vezujućeg mesta za steroidne hormone u strukturi PDIA3 tako da je pretpostavljeno da bi on mogao da služi kao molekularni šaperon za VDR ili DBP (Donati et al., 2022). Studija na osteoblastima pokazala je da aktivacija src i PLA2 posredovana $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zahteva i PDIA3 i VDR (Chen et al., 2013). Takođe je utvrđeno da VDR osim u jedru može biti lokalizovan i na membranama bogatim kaveolama, kao i da kolokalizuje sa PDIA3 i kaveolinom 1 (Chen et al., 2013). Ovakvi rezultati sugerišu da postoji mogućnost za selektivnu upotrebu VDR za različite negenomske/genomske signalne puteve.



Slika 3. Šematski pregled kanonskog metabolizma vitamina D i njegovih genomskih ili negenomskih efekata. VDR: receptor za vitamin D; VDR Mem: membranski receptor za vitamin D; RXR: retinoidni receptor X; VDREs: elementi responsivni na vitamin D; Raf: Ser/Thr specifična kinaza; Ras: mala GTP-aza; PKC: protein kinaza C; PKA: protein kinaza A; MEK: kinaza mitogenima aktivirane kinaze; ERK: kinaze regulisane vanćelijskim signalima. Preuzeto i modifikovano iz Gkotiakou et al., 2022.

1.3.4. Osnovna biološka dejstva vitamina D

Održavanje koncentracije Ca^{2+} u cirkulaciji na konstantnom nivou od 1mmol/l je strogo regulisan proces koji osim delovanja vitamina D uključuje i PTH i kalcitonin. Paratireoidna žlezda registruje pad koncentracije Ca^{2+} u cirkulaciji i u okviru nekoliko sekundi izlučuje PTH. PTH deluje na kosti, gde stimuliše resorpciju kostiju, i na bubrege gde stimuliše reapsorpciju Ca^{2+} , smanjuje reapsorpciju fosfora i aktivira 1α -hidroksilazu koja prevodi kalcidiol u kalcitriol. Ovako nastala aktivna forma vitamina D ostvaruje efekte na bubrege gde stimuliše reapsorpciju Ca^{2+} , na tanko crevo gde stimuliše apsorpciju Ca^{2+} i na kosti gde ostvaruje isti efekat kao i PTH (Jones et al., 1998). Smatra se da je glavni efekat vitamina D na održavanje homeostaze Ca^{2+} upravo apsorpcija Ca^{2+} u crevima (Christakos et al., 2019). Kada je koncentracija Ca^{2+} u optimalnom opsegu signal za sekreciju PTH se ukida ali je neophodno i delovanje kalcitonina koji nastaje i oslobađa se iz „C“ ćelija tiroidne žlezde i blokira proces resorpcije kostiju (Jones et al., 1998; Khundmiri et al., 2016). Nedostatak

vitamina D tokom razvoja kostiju dovodi do zaostatka u rastu i rahitisa, dok kod odraslih može izazvati sekundarni hiperparatireoidizam koji dovodi do osteoporoze i/ili osteomalacije (Christakos et al., 2019).

Uloga vitamina D u zdravlju kostiju je dobro poznata, ali predstavlja samo jedan aspekt plejotropnog funkcionalnog profila ovog molekula. Poslednjih decenija veliki broj istraživanja fokusiran je na ulogu vitamina D u funkcionisanju imunskog, kardiovaskularnog i reproduktivnog sistema, fiziologiji skeletnih mišića, kože i masnog tkiva, u metabolizmu glukoze, neurokognitivnim funkcijama, kao i modulaciji ćelijske proliferacije (Caprio et al., 2017). Uloga vitamina D u ovim procesima nije u potpunosti razjašnjena i zahteva dalja istraživanja.

1.3.5. Efekti vitamina D u kardiovaskularnom sistemu

KVB su značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta širom sveta. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije čak 17.9 miliona ljudi u 2019. godini umrlo je od posledica KVB, prevashodno od srčanog udara i šloga. Pored tradicionalnih faktora rizika za nastanak KVB, otkrivaju se novi faktori rizika sa potencijalno relevantnim prognostičkim i terapijskim implikacijama, među kojima je nedostatak vitamina D u fokusu interesovanja (Cosentino et al., 2021). Osamdesetih godina prošlog veka sezonske varijacije u incidenci KVB prvi put su pripisane sezonskim varijacijama u koncentraciji vitamina D u serumu i od tada su podstaknuta istraživanja o potencijalnim benefitima vitamina D na kardiovaskularno zdravlje (Pilz et al., 2016). Metaboliti vitamina D utiču na nekoliko tipova ćelija koje su relevantne za kardiovaskularnu fiziologiju i patologiju među kojima su endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije, kardiomiociti i ćelije imunskog sistema (Norman & Powell, 2014). VDR je prvi put identifikovan u zdravom srcu pacova 1986. godine (Walters et al., 1986), a kasnije je otkriveno da kardiomiociti i fibroblasti u srcu eksprimiraju i 1α -hidroksilazu (Chen et al., 2008), što je ukazalo na mogućnost lokalne produkcije i parakrinog/autokrinog delovanja vitamina D na srce i krvne sudove. Zaista, opservacione studije na ljudima su otkrile povezanost između nedostatka vitamina D i hipertenzije, hipertrofije leve komore i srčane insuficijencije (Al Mheid et al., 2011), a eksperimentalni modeli su pokazali da vitamin D ima nekoliko efekata na kardiovaskularni sistem, uključujući antihipertrofična svojstva, inhibiciju proliferacije kardiomiocita, stimulaciju proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, ekspresiju faktora rasta vaskularnog endotela, inhibiciju renin-angiotenzin aldosteronskog sistema (RAAS) i lučenje natriuretskog peptida (Cosentino et al., 2021).

Eksperimenti na globalnim VDR *knock-out* animalnim modelima su pokazali da nedostatak VDR uzrokuje hipertenziju koja je praćena povišenim nivoom atrijalnog natriuretičkog peptida. U ovim modelima, kao posledica hipertenzije javlja se i hipertrofija miokarda (Li et al., 2002; Xiang et al., 2005). Kasniji eksperimenti na miševima kod kojih ne postoji ekspresija VDR u kardiomiocitima (engl. *cardiomyocyte-specific VDR knock-out*) pokazali su da i u odsustvu hipertenzije dolazi do pojave hipertrofije miokarda, što je ukazalo na direktan uticaj vitamina D na prevenciju hipertrofije u srcu (Chen et al., 2011). Antihipertenzivna svojstva vitamina D uglavnom se pripisuju inhibiciji RAAS koji je uključen u regulaciju krvnog pritiska. VDREs su pronađeni u promotoru gena za renin, i inhibicija ekspresije renina delovanjem vitamina D potvrđena je *in vitro* i *in vivo*. Miševi sa globalnom delecijom VDR imaju povećane nivoe iRNK i proteina renina, kao i povećanu proizvodnju angiotenzina II u plazmi (Li et al., 2002). Sličan fenotip pokazuju i CYP27B1 *knock-out* miševi, kod kojih je tretman sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ smanjio aktivnost RAAS i normalizovao krvni pritisak (Zhou et al., 2008a). Studija Tomaschitz i saradnika pokazala je da niži nivoi vitamina D negativno koreliraju sa regulacijom RAAS, što neizbežno dovodi do hipertenzije (Tomaschitz et al., 2010). U drugoj studiji, pacijentima sa hipertenzijom i nedostatkom vitamina D davana je nedeljna doza holekalciferola tokom dva meseca, nakon čega su svi učesnici imali

snižene nivoe renina i aldosterona u plazmi (Carrara et al., 2014), što je u saglasnosti sa nalazima iz animalnih studija.

Metaboliti vitamina D utiču na diferencijaciju imunskih i inflamatornih ćelija i proizvodnju citokina, što znači da imaju ulogu u razvoju ateroskleroze i drugih poremećaja povezanih sa vaskularnom inflamacijom (Martens et al., 2020). Nuklearni faktor kapa B (NF- κ B, engl. *Nuclear Factor-kappa B*) deluje kao faktor transkripcije u jedru i stimuliše transkripciju proinflamatornih citokina kao što su IL-6, IL-8 i TNF- α koji su uključeni u progresiju koronarne arterijske bolesti (Legartha et al., 2020). Studija na svinjama je pokazala da vitamin D sprečava aktivnost NF- κ B u epikardijalnom masnom tkivu i na taj način može pozitivno uticati na prevenciju i tretman koronarne arterijske bolesti (Chen et al., 2016a). Vitamin D povećava endotelni NO, koji osim vazodilatornog efekta, ostvaruje inhibični efekat na agregaciju i adheziju trombocita i leukocita, što igra ulogu u ranom razvoju ateroskleroze (Menezes et al., 2014). Pored toga, uočeno je da vitamin D smanjuje apsorpciju holesterola od strane makrofaga, što je važan proces u nastanku ateroskleroze (Riek et al., 2013).

Studija Lee i saradnika je pokazala da vitamin D sprečava oksidativni stres i reguliše mitohondrijalnu aktivnost i na taj način smanjuje apoptozu izazvanu hipoksijom/reoksigenacijom (H/R) u ćelijama kardiomiocita. Takođe, navodi se da vitamin D ispoljava kardioprotektivne efekte tako što sprečava H/R-indukovanu mitohondrijalnu fisiju i mitofagiju inhibicijom ekspresije mitohondrijalnih fisionih proteina i mitohondrijalnog fisionog faktora (Lee et al., 2020). Kod ateroskleroze je takođe otkrivena mitohondrijalna disfunkcija, međutim, nejasno je da li vitamin D reguliše mitohondrijalnu disfunkciju u razvoju ateroskleroze (Mandarino et al., 2015; Poznyak et al., 2021).

Navedeni rezultati ukazuju na to da vitamin D/VDR signalizacija utiče na nekoliko aspekata kardiovaskularnog sistema i može pozitivno delovati na funkciju endotela krvnih sudova i kardiomiocita, međutim funkcionalni značaj delovanja vitamina D u fiziologiji kardiovaskularnog sistema zahteva dalja istraživanja.

1.3.6. Efekti vitamina D na insulinsko delovanje

Nedostatak vitamina D je široko rasprostranjen kod ljudi sa T1DM i T2DM (Al-Shoumer, 2015; Mathieu, 2015), dok je visok nivo vitamina D povezan sa manjim rizikom od nastanka bolesti (Pittas et al., 2012).

Literaturni podaci ukazuju na nekoliko mogućih mehanizama kojima vitamin D postiže pozitivne efekte na sistemsku glukoznu homeostazu. Pretpostavlja se da vitamin D može uticati na sintezu i sekreciju insulina u β -ćelijama pankreasa. VDR je eksprimiran u β -ćelijama pankreasa i smatra se da ima značajnu ulogu u regulaciji funkcije ovih ćelija (Bornstedt et al., 2020). Značaj uloge vitamina D u funkciji β -ćelija pankreasa potvrđuje i prisustvo 1α -hidroksilaze u ovim ćelijama čine su stvoreni uslovi da se vitamin D lokalno konvertuje u aktivni oblik (Bland et al., 2004). Studije su pokazale da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliše biosintezu insulina u β -ćelijama pankreasa pacova *in vitro* (Bourlon et al., 1999). Pokazano je da nedostatak vitamina D ima nepovoljne efekte na sekreciju insulina kod glodara (Cheng et al., 2013; Norman et al., 1980). Miševi bez funkcionalnog VDR imaju poremećenu sekreciju insulina nakon tretmana glukozom, kao i smanjenu sintezu insulina (Zeitz et al., 2003). Takođe, stimulacija glukozom povećava ekspresiju *Vdr* u β -ćelijama pankreasa ljudi i miševa što ukazuje da vitamin D može uticati na sekreciju insulina direktnim putem preko VDR (Kjalarsdottir et al., 2019). Osim toga, pokazano je i da preinkubacija β -ćelija pankreasa sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ povećava glukozom stimulisan influks Ca^{2+} regulacijom ekspresije gena za R-tip voltažno-zavisnog kalcijumovog kanala (VGCC, engl. *R-type Voltage-Gated Calcium Channel*),

ukazujući da vitamin D može uticati na sekreciju insulina i indirektno, preko regulacije fluksa Ca^{2+} u ovim ćelijama (Kjalarsdottir et al., 2019). Osim VGCC, sekrecija insulina iz β -ćelija pankreasa regulisana je i proteinima koji vezuju Ca^{2+} , poput kalbindina, koji je pod transkripcionom regulacijom vitamina D. Stoga je delovanje vitamina D na ovaj protein predloženo kao još jedan mehanizam indirektnog delovanja vitamina D na sekreciju insulina (Mohd Ghazali et al., 2022).

Pored uticaja na sintezu i lučenje insulina, vitamin D može učestvovati u održavanju glukoze homeostaze i kroz svoje efekte na insulinsku osetljivost. VDR je eksprimiran u skeletnim mišićima i masnom tkivu, koji su glavna metabolička tkiva. Zanimljivo je da ekspresija VDR u skeletnim mišićima opada sa godinama, slično kao i osetljivost na insulin (Alvarez & Ashraf, 2010). Molekularni mehanizmi odgovorni za vezu između vitamina D i insulinsku osetljivost su i dalje predmet rasprave i mogu biti tkivno-specifični (Mohd Ghazali et al., 2022). Pokazano je da kod ljudi promotor gena za IR sadrži VDREs (Maestro et al., 2003), kao i da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ povećava ekspresiju IR na nivou iRNK i proteina u humanim promonocitnim ćelijama (Leal et al., 1995; Maestro et al., 2000). Stoga bi vitamin D kroz povećanje ekspresije IR u ćelijama ciljnih tkiva mogao da utiče na poboljšanje insulinske osetljivosti. Sa druge strane, nedostatak vitamina D mogao bi da utiče na smanjenje ekspresije IR na ćelijama ciljnih tkiva insulina i na taj način doprinese nastanku insulinske rezistencije (Mohd Ghazali et al., 2022; Szymczak-Pajor & Śliwińska, 2019). Indirektno, vitamin D može uticati na insulinsku osetljivost preko PTH i RAAS. Nedostatak vitamina D može dovesti do povećanja nivoa PTH u cirkulaciji za koji je dokumentovano da smanjuje insulinom stimulirano preuzimanje glukoze, kao i do prekomerne aktivacije RAAS koji može inhibirati delovanje insulina u ciljnim tkivima (Mohd Ghazali et al., 2022; Szymczak-Pajor & Śliwińska, 2019). Poznato je da vitamin D ima imunomodulatorne i antiinflamatorne efekte, što može smanjiti perifernu insulinsku rezistenciju delovanjem na hroničnu inflamaciju niskog intenziteta koja je uključena u nastanak insulinske rezistencije, posebno kod T2DM (Nik et al., 2023).

Literaturni podaci iz kliničkih studija obiluju kontradiktornim podacima o uticaju suplementacije vitaminom D na metabolizam glukoze kod ljudi sa dijabetesom. Studija koju su sprovedi Breslavsky i saradnici pokazala je da suplementacija vitaminom D ne samo da smanjuje nivo glukoze u krvi već i povećava osetljivost na insulin kod dijabetičara (Breslavsky et al., 2013). Takođe je dokumentovano da rana suplementacija vitaminom D smanjuje rizik od razvoja T1DM kod genetski predisponiranih pedijatrijskih pacijenata, kao i da je unos vitamina D obrnuto povezan sa razvojem komplikacija kod T2DM (Nik et al., 2023). Sa druge strane, Seida i saradnici su sugerisali da suplementacija vitaminom D nije imala efekta na glukoznu homeostazu kao i na prevenciju razvoja dijabetesa kod zdravih odraslih osoba, kod preddijabetičara i pacijenata sa T2DM (Seida et al., 2014). Drugi autori su zaključili da dokazi o korisnim efektima suplementacije vitaminom D nisu dovoljni da bi ga preporučili kao sredstvo za poboljšanje kontrole glikemije kod pacijenata sa T2DM, jer narušava glikemiju natašte ili toleranciju na glukozu (George et al., 2012a). Lerchbaum i saradnici čak tvrde da tretman vitaminom D može imati negativan efekat na insulinsku osetljivost kod zdravih muškaraca (Lerchbaum et al., 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prethodne eksperimentalne studije na životinjama ukazuju da suplementacija vitaminom D poboljšava kontrolu glikemije i insulinsku osetljivost u stanjima insulinske rezistencije uključujući i T2DM. Smatra se da se uloga vitamina D u metaboličkoj kontroli postiže direktnim delovanjem na sintezu i sekreciju insulina u β -ćelijama pankreasa, kao i direktnim delovanjem na ciljna tkiva insulina (skeletni mišići, jetra, adipozno tkivo). Sa druge strane, vrlo malo se zna o ulozi vitamina D u regulaciji funkcije srca, koje je takođe organ čija fiziologija u velikoj meri zavisi od direktnih i indirektnih efekata insulina.

Na osnovu podataka iz literature koji ukazuju na:

- (1) postojanje VDR i 1α -hidroksilaze u srcu,
- (2) povezanost deficijencije vitamina D sa incidencom kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa, kao i
- (3) delovanje vitamina D u ciljnim tkivima insulina,

postavljena je hipoteza da vitamin D može ostvariti direktne efekte na procese regulisane insulinom u srcu.

Cilj ove studije je ispitivanje dejstva vitamina D u srcu u fiziološkim uslovima na molekule uključene u insulinski signalni put i procese regulisane insulinom kao što su transport i metabolizam glukoze i masnih kiselina i transport kalcijuma.

Ova studija treba da doprinese razumevanju efekata vitamina D u srcu na molekule i procese regulisane insulinom, u cilju razvoja novih terapijskih strategija koje bi mogle sprečiti nastanak i/ili razvoj poremećaja povezanih sa insulinskim delovanjem u srcu.

3. MATERIJAL I METODE

Sve eksperimentalne procedure su odobrene od strane Etičke komisije za upotrebu eksperimentalnih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (Uprava za veterinu) koje je izdalo Rešenje o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama, broj: 323-07-00046/2016-05.

3.1. Eksperimentalne životinje i dizajn eksperimenta

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar*. Životinje su gajene u vivarijumu Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22°C, svetlosni režim 12h svetlo/12h mrak, vlažnost vazduha 55%), u kavezima sa slobodnim (*ad libitum*) pristupom hrani i vodi.

Životinje stare 12 nedelja su odabrane tako da budu približne telesne mase i nasumično su podeljene u dve eksperimentalne grupe sa po 20 životinja:

- kontrolnu (K) i
- vitamin D (VitD) grupu.

Tokom 6 nedelja životinje iz VitD grupe su tretirane holekalciferolom (Santa Cruz Biotechnology) rastvorenim u kukuruznom ulju (D.O.O. UVITA), dok su životinje iz K grupe primale rastvarač. Holekalciferol je apliciran intraperitonealno, 3 puta nedeljno u dve različite doze (ponedeljkom i sredom u dozi od 25 µg/kg telesne mase što odgovara dozi od 1000IU, i petkom u dozi od 37,5 µg/kg što odgovara dozi od 1500IU), kako bi se na nedeljnom nivou postigao dnevni unos od 500IU vitamina D. Čest problem kod terapijske primene vitamina D je nastanak hiperkalcemije zbog ključne uloge koju vitamin D ima u regulaciji homeostaze Ca^{2+} . Doza vitamina D primenjena u eksperimentu odabrana je na osnovu literaturnih podataka koji su pokazali da ne postoji opasnost od nastanka hiperkalcemije (Salum et al., 2012). Injeciranje životinja tri puta nedeljno izabrano je radije nego svakodnevno kako bi se smanjio nivo stresa kod životinja.

Kako bi se ispitali efekti tretmana vitaminom D na insulinsku regulaciju fosforilacije i unutarćelijske lokalizacije ciljnih molekula, polovina životinja iz obe grupe primila je, 40 min pre žrtvovanja, intraperitonealnu injekciju insulina u dozi od 12IU/kg. Doza insulina i vremenski okvir odabrani su na osnovu prethodnih eksperimenata kojima je pokazano da ovakvi uslovi aplikacije omogućavaju detektovanje maksimalnih efekata insulina na nivo transportera glukoze i transportera masnih kiselina u plazma membrani, kao i na fosforilacije nekih od molekula insulinskog signalnog puta (Koricanac et al., 2011; Tepavcevic et al., 2011).

3.2. Izolovanje tkiva srca i plazme

Životinje su gladovale preko noći nakon čega su žrtvovane bez anestezije dekapitacijom na giljotini. Žrtvovanje je obavljeno 24h nakon poslednje injekcije holekalciferola. Prilikom žrtvovanja, srca su izolovana, isprana u fiziološkom rastvoru, ocedena, izmerena i čuvana na -80°C. Krv je sakupljana u litijum-heparinske vakutajne. Iz pune krvi, odmah nakon sakupljanja, merena je koncentracija glukoze, dok je za određivanje ostalih biohemijskih parametara izolovana plazma.

Krv je centrifugirana na kliničkoj centrifugi (Tehnica LC-321), 10 minuta na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja, dobijeni supernatant – plazma, čuvana je na -20°C do određivanja odgovarajućih biohemijskih parametara.

3.3. Biohemijske analize

3.3.1. Određivanje koncentracije glukoze u krvi

Koncentracija glukoze određena je iz uzoraka pune krvi upotrebom automatskog Accutrend glukozometra (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.3.2. Određivanje koncentracije triglicerida i holesterola u plazmi

Koncentracije triglicerida, HDL, LDL i ukupnog holesterola u uzorcima plazme određene su komercijalno, korišćenjem BioSystems analizatora A25 (Barcelona, Spain).

3.3.3. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi

Koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi određena je modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Duncombe-u (Duncombe, 1964). Metoda se zasniva na reakciji nastanka soli bakra koje formiraju slobodne masne kiseline u hloroformu sa odgovarajućim reagensom (trietanolaminski (TEA) pufer + $\text{Cu}(\text{NO})_3$), a potom se dodavanjem dietilditiokarbamata (DDC) formira kompleksno jedinjenje žute boje sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 436nm.

U staklenim šlifovanim epruvetama kratko su mešani uzorci plazme i TEA pufer, a nakon toga je dodat hloroform. Potom su epruvete prebačene u šejker gde su snažno mućkane 20 minuta. Inkubacione smeše su centrifugirane 10 minuta na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi (Tehnica LC-321), pri čemu je došlo do formiranja 3 sloja. Gornji, plavozeleni sloj je pažljivo uklonjen, dok je iz srednjeg hloroformskog sloja prenet 1 ml uzorka u posebne epruvete, gde je potom dodat 0.2% DDC. Nakon snažnog mešanja i inkubacije u trajanju od 20 min, uzorcima je merena apsorbanca na 436nm (Ultrospec II, LKB). Koncentracija slobodnih masnih kiselina u uzorcima očitana je sa standardne krive koja je napravljena na osnovu serije razblaženja palmitinske kiseline (od 0,25 mM do 2,5 mM).

3.3.4. Određivanje koncentracije 25(OH)D3 u plazmi

Koncentracije 25(OH)D3 u uzorcima plazme određene su komercijalno, hemiluminiscentnim esejom (Ral, Barcelona, Spain).

3.3.5. Određivanje koncentracije Ca^{2+} i fosfora u plazmi

Koncentracije Ca^{2+} i fosfora u uzorcima plazme određene su komercijalno, korišćenjem BioSystems analizatora A25 (Barcelona, Spain).

3.3.6. Određivanje koncentracije insulina u plazmi

Koncentracije insulina u uzorcima plazme određeni su komercijalno, radioimunološkom (RIA) metodom (INEP, Beograd).

3.3.7. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu

Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) urađen je nedelju dana pre žrtvovanja. Životinje su gladovale preko noći. Korišćen je rastvor glukoze koncentracije 500 mg/ml (Veterinarski zavod Subotica), pri čemu je životinjama injecirana doza od 2 g/kg telesne mase intraperitonealno. Uzorci krvi uzeti su iz repne vene neposredno pre injeciranja kao i 15, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injekcije. Koncentracija glukoze u svim vremenskim tačkama određena je upotrebom automatskog Accutrend glukozometra (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Za procenu tolerancije na glukozu korišćena je površina ispod krive (AUC, eng. *Area Under the Curve*) koja predstavlja nivo glukoze u funkciji vremena.

3.4. Molekularno-biološke analize

3.4.1. Priprema uzoraka za *Western blot* analizu

3.4.1.1. Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta srca

Tkivo je odležano a zatim homogenizovano na ledu Ultra-Turrax homogenizerom 3 puta po 30 sekundi u modifikovanom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA, engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*), 0.2% Na-deoksiholat, 0.2% natrijum dodecil sulfat (SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*), 1% Triton X-100) sa proteaznim (1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, engl. *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*), 10 µg/ml leupeptin, i 10 µg/ml aprotinin) i fosfataznim inhibitorima (10 mM natrijum fluorid i 1 mM natrijum ortovanadat), u odnosu 1:6 (m:V).

Homogenati su centrifugirani 30 minuta na 15000 x g (Beckman, J21 rotor) na 4°C. U dobijenim supernatantima, koji predstavljaju ukupan ćelijski ekstrakt srca, određena je koncentracija proteina metodom pomoću bicinhoninične kiseline (BCA, engl. *Bicinchoninic Acid*). Za *Western blot* analizu uzorci su svedeni na istu koncentraciju, a zatim su pomešani sa jednakom zapreminom 2 x *Laemmli* pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM β-merkaptioetanol, 4% SDS, 0,2% bromfenol plavo i 20% glicerol) i kuvani 5 min na 95°C nakon čega su čuvani na -20°C.

3.4.1.2. Izolovanje plazma membranske frakcije srca

Za izolaciju plazma membranske frakcije srca korišćen je protokol Luiken i sar. (Luiken et al., 2002). Uzorci tkiva srca su inkubirani 30 minuta na 4°C u preinkubacionom puferu (2 M NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM NaN₃, pH 7.4), a zatim su centrifugirani 5 minuta na 1000 x g (Beckman, J21 rotor). Nastali talozi su homogenizovani na ledu Ultra-Turrax homogenizerom 3 puta po 30 sekundi u TES puferu (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM saharoza, pH 7.4) sa proteaznim inhibitorima (1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, i 10 µg/ml aprotinin). Homogenati su centrifugirani 5 minuta na 1000 x g (Beckman, J21 rotor). Dobijeni talozi su rehomogenizovani u TES puferu u ručnom staklo-staklo homogenizeru, nakon čega su im dodati supernatanti. Nakon centrifugiranja (10 minuta, 100 x g (Beckman, J21 rotor)) odvojeni su supernatanti koji su potom centrifugirani 10

minuta na 5000 x g (Beckman, J21 rotor). Dobijeni talozi predstavljali su frakciju plazma membrana, u kojima je određena koncentracija proteina BCA metodom. Uzorci plazma membrana za *Western blot* analizu su pripremljeni na isti način kao i uzorci ukupnog ćelijskog ekstrakta srca.

3.4.1.3. Izolovanje citoplazmatične, jedarne i mikrozomalne frakcije srca

Izolacija navedenih ćelijskih frakcija rađena je po uzoru na metodu Evans i sar. (Evans et al., 1983). Uzorci tkiva srca su homogenizovani na ledu Ultra-Turrax homogenizerom 3 puta po 30 sekundi u TEMG puferu (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 12 mM monotioglicerol, 10% glicerol, pH 7,5) sa proteaznim (1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, i 10 µg/ml aprotinin) i fosfataznim inhibitorima (2 mM Na-ortovanadat, 100 mM natrijum fluorid), u odnosu 1:4 (m:V). Homogenati su profiltrirani kroz gazu, a potom su centrifugirani 15 minuta na 1000 x g (Beckman, J21 rotor) na 4°C. Formirani talozi (**T1**) su dalje korišćeni za dobijanje jedarne frakcije, dok su supernatanti (**S1**) korišćeni za dobijanje citoplazmatične i mikrozomalne frakcije.

Talozi (**T1**) su isprani jedanput sa TMG puferom (20 mM Tris-HCl, 12 mM monotioglicerol, 10% glicerol, pH 7,5) i dva puta sa TMG puferom u koji je dodat 0.2% Triton X-100. Između svakog ispiranja rađeno je centrifugiranje 15 minuta na 1000 x g (Beckman, J21 rotor). Isprani talozi su resuspendovani u puferu za liziranje jedara (TEMG pufer, 0.5 M KCl), i ostavljeni su 60 minuta na ledu uz mešanje staklenim štapićem svakih 15 minuta. Nakon liziranja, suspenzije su centrifugirane 60 minuta na 105000 x g (Beckman, Ti-50 rotor). Dobijeni supernatanti predstavljali su jedarnu frakciju u kojoj je određena koncentracija proteina metodom po Loriju i uzorci za *Western blot* analizu su pripremljeni na isti način kao i uzorci ukupnog ćelijskog ekstrakta srca.

Supernatanti (**S1**) su centrifugirani 30 minuta na 12000 x g (Beckman, Ti-50 rotor), a potom su dobijeni supernatanti centrifugirani 60 minuta na 100000 x g (Beckman, Ti-50 rotor), sve na 4°C. Supernatanti iz ovog centrifugiranja predstavljali su citoplazmatične frakcije, dok su talozi resuspendovani u TEMG puferu i oni su predstavljali mikrozomalne frakcije. U obe frakcije određena je koncentracija proteina metodom po Loriju i uzorci za *Western blot* analizu su pripremljeni na isti način kao i uzorci ukupnog ćelijskog ekstrakta srca.

3.4.2. Određivanje koncentracije proteina

3.4.2.1. BCA metoda

Koncentracija proteina u uzorcima ukupnog ćelijskog ekstrakta i plazma membranske frakcije srca određena je BCA metodom (Smith et al., 1985). Metoda predstavlja kombinaciju biuretske reakcije, tokom koje proteini u alkalnom medijumu redukuju Cu^{2+} do Cu^{1+} , i kolorimetrijske detekcije jona Cu^{1+} pomoću reagensa koji sadrži BCA. Tokom esejja se formira ružičasto obojeni produkt koji ima maksimum apsorbanije na 562 nm, a nastaje helacijom dva molekula BCA sa jednim jonom Cu^{1+} . Koncentracije proteina u uzorcima očitavane su sa standardne krive koja je napravljena sa poznatim koncentracijama rastvora goveđeg serum albumina (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) (20 µg/ml do 2000 µg/ml).

3.4.2.2. Metoda po Loriju

Koncentracija proteina u uzorcima citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije srca određena je metodom po Loriju (Lowry et al., 1951). Metoda je zasnovana na biuretskoj reakciji, tokom koje

proteini u alkalnom medijumu redukuju Cu^{2+} do Cu^{1+} , i oksido-redukujućoj reakciji pomoću Folinovog reagensa. Aromatične rezidue proteina i Cu^{1+} se oksiduju a Folinov reagens se redukuje pri čemu dolazi do nastanka molibden plavog koji ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Koncentracije proteina u uzorcima očitavane su sa standardne krive koja je napravljena sa poznatim koncentracijama BSA (20 µg/ml do 2000 µg/ml).

3.4.3. Western blot analiza

Proteini su razdvajani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Nakon elektroforeze vršen je transfer proteina na PVDF (engl. *Polyvinyl Difluoride*) membranu a zatim je rađena imunodetekcija i relativna kvantifikacija količine proteina nakon denzitometrijske detekcije signala.

3.4.3.1. SDS-PAGE

Elektroforeza je rađena na diskontinuiranom poliakrilamidnom gelu, debljine 1 ili 1,5 mm. Gel se sastojao od 4% gela za koncentrovanje i 7,5% ili 10% gela za razdvajanje. Na gelove su nanošeni uzorci (25 µg-50 µg proteina/bunariću) i standard molekulskih masa proteina ProteinPlus Prestained Ladder (Fermentas, Lithuania). Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi, u puferu za elektroforezu (0,0025 M Tris, 0,192 M glicin i 0,1% SDS, pH 8,3). Prvih 15 minuta elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 120 V i narednih 60 minuta pri konstantnom naponu od 100 V, u aparatu za vertikalnu elektroforezu Mini Protean Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.4.3.2. Transfer proteina sa gela na membranu

Nakon elektroforeze, gelovi su isprani u puferu za transfer (pufer za elektroforezu sa dodatkom 20% metanola), a zatim je formiran „sendvič“ kojim se omogućio kontakt gela sa nanetim razdvojenim proteinskim uzorcima i PVDF membranom (sunder, filter papir, gel, PVDF membrana, filter papir, sunder). Sendvič je spakovan u sistem za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio-Rad), naliven puferom za transfer i stavljen na prekonoćni prenos proteina sa gela na membranu pri konstantnoj jačini struje od 80 mA, na 4°C.

3.4.3.3. Imunodetekcija

Membrane su nakon prekonoćnog transfera obojene *Ponceau S* bojom (1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini) radi provere uspešnosti transfera. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, membrane su inkubirane u puferu za blokiranje (5% nemasno mleko u prahu ili 5% BSA rastvoreni u TBST puferu: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 7,75) 90 minuta na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje. Blokiranje membrane su poprečno isečene na osnovu proteinskog markera na željenim molekulskim masama i inkubirane preko noći na 4°C sa odgovarajućim primarnim antitelima (Tabela 1) uz blago mućkanje. Nakon toga, membrane su ispirane 5 x 5 minuta u TBST puferu, a zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (Tabela 2) 90 minuta na sobnoj temperaturi.

Tabela 1. Karakteristike primarnih antitela koja su korišćena u *Western blot* analizi.

Antitelo	Kataloški broj	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
anti-Insulin R β	sc-711	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-PTP1B	sc-1718	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-IRS-1 (Ser ³⁰⁷)	sc-33956	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-IRS-1 (Tyr ⁶³²)	sc-17196	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-IRS-1	sc-8038	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-Akt (Ser ⁴⁷³)	sc-7985	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-Akt (Thr ³⁰⁸)	sc-16646	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:500
anti-Akt	sc-8312	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-GSK3 β (Ser ⁹)	sc-11757	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1500
anti-GSK3 β	sc-9166	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-p-PFK (Ser ⁴⁶⁶)	sc-32966	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-PFK	sc-50956	koza	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:750
anti-p-Erk1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	#9101	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1500
anti-Erk1/2	#9102	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1500
anti-p-S6K (Thr ⁴²¹ /Ser ⁴²⁴)	#9204	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1000
anti-S6K	ab264128	zec	abcam	1:2000
anti-FoxO1	#2880	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1000
anti-VDR	sc-13133	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:500
anti-GLUT1	sc-7903	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:500
anti-GLUT4	sc-7938	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:500
anti-CD36	sc-9154	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-FATP1(ACSVL5)	sc-25541	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-lipin1	sc-98450	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-CPTI	sc-98834	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-PPAR α	sc-398394	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-PGC1 α	ab54481	zec	abcam	1:1000
anti-p-ACC (Ser ⁷⁹)	#3661S	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1000
anti-ACC	#3676S	zec	Cell Signaling Technology, SAD	1:1000
anti-L-type Ca ⁺⁺ CP α 1C	sc-398433	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-NCX1	sc-30304-R	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:1000
anti-SERCA2	sc-376235	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:2000
anti- β actin	sc-47778	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:2000
anti-Calnexin	ab22595	zec	abcam	1:2000

Tabela 2. Karakteristike sekundarnih antitela koja su korišćena u *Western blot* analizi.

Antitelo	Kataloški broj	Proizvođač	Razblaženje
goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2030	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:10000
donkey anti-goat IgG-HRP	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:10000
goat anti-mouse IgG-HRP	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, SAD	1:10000

Nakon inkubacije, membrane su ponovo ispirane 5 x 5 minuta u TBST puferu a zatim inkubirane 2 minuta sa supstratom za pojačanu hemiluminiscentnu (ECL, engl. *Enhanced Chemiluminescence*) detekciju koji je napravljen mešanjem jednake količine rastvora A (Luminol, p-kumarična kiselina) i rastvora B (30% H₂O₂, 1M Tris-HCl, pH 8,5). Membrane su zatim prebačene u kasete za razvijanje i inkubirane 2 minuta sa rendgen filmom (ORTHO CP-GU M, AGFA ili MXBE Film, Carestream).

Za analizu stepena fosforilacije ispitivanih molekula, nakon detektovanja signala fosforilisane forme, membrane su inkubirane na 50°C 30 minuta u puferu za stripovanje (100 mM β -merkaptotanol, 2% SDS i 62,5 mM Tris, pH 6,7), ispirane u TBST puferu 2 x 10 minuta, i zatim inkubirane u puferu za blokiranje 90 minuta. Nakon toga je procedura ponovljena od inkubacije sa primarnim antitelom za totalnu formu istog molekula.

Kvantifikacija dobijenih signala na filmovima vršena je denzitometrijskom analizom u programu za analizu slika ImageJ (NIH, USA). Izmerene vrednosti za optičku gustinu (OD) signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražavane u arbitrarnim jedinicama (count). Za kontrolu jednakog unosa proteina u svakom uzorku za ukupni ćelijski ekstrakt i citoplazmatsku frakciju korišćena je detektovana količina β aktina, za mikrozomalnu frakciju kalneksina, za jedarnu i plazma membransku frakciju korišćen je ukupan protein u uzorku dobijen bojenjem membrane *Ponceau S* bojom. Jedan uzorak odabran je kao interna kontrola i nanošen je na sve gelove, kako bi se omogućila normalizacija uzoraka iz različitih elektroforeza.

3.4.4. Reverzna transkripcija sa kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR)

Za analizu ekspresije gena korišćena je metoda kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR, eng. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) kojoj je prethodila reverzna transkripcija (RT, engl. *Reverse Transcription*).

3.4.4.1. Izolacija ukupne RNK

Ukupna RNK izolovana je iz uzoraka srca pacova koji su prethodno čuvani na -80°C . 100 mg tkiva je ručno homogenizovano sa 1ml reagensa za liziranje (TRI Reagent, Ambion) u staklo-staklo homogenizeru, nakon čega je homogenat centrifugiran (10 minuta, 4°C , $11900 \times g$ (Eppendorf 5417R)). Nakon centrifugiranja, odvojeni supernatant je temperiran u šejkeru (5 minuta, 30°C), a zatim mu je dodat hloroform. Uzorci su ručno promućkani a zatim su centrifugirani (10 minuta, 4°C , $11900 \times g$). Nakon centrifugiranja pažljivim pipetiranjem vodena faza u kojoj se nalazi RNK je prebačena u novi set mikrotuba, a zatim je dodat 3M Na-acetat u razmeri 1:10, a potom i 96% etanol u duplo većem volumenu u odnosu na vodenu fazu. Uzorci su potom ostavljeni na -20°C preko noći kako bi došlo do precipitacije RNK. Sledećeg dana, uzorci su centrifugirani (10 minuta, 4°C , $11900 \times g$), nakon čega je novonastali talog ispran dodatkom 1ml 75% etanola, i dodatnim centrifugiranjem (4 minuta, 4°C , $11900 \times g$). Nakon poslednjeg centrifugiranja 75% etanol je odliven i uzorci su ostavljeni 10 minuta da se prosuše. Nakon toga, svaki uzorak je resuspendovan u 100 μl DEPC (eng. *Diethylpyrocarbonate*) –tretirane vode. Izolovana ukupna RNK čuvana je na -20°C .

3.4.4.2. Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija dobijene RNK određena je spektrofotometrijskim merenjem na NanoDrop® aparatu (Thermo Scientific). Za dalju upotrebu korišćeni su RNK uzorci čiji je odnos izmerenih apsorbanacija na 260nm i na 280nm (A_{260}/A_{280}) bio između 1.8 i 2.2 što ukazuje na zadovoljavajući kvalitet izolovanih nukleinskih kiselina. Takođe, kvalitet i integritet dobijene RNK provereni su vizuelizacijom na UV transiluminatoru (GelDoc Imaging system) nakon elektroforeze na 1.5% agaroznom gelu u prisustvu etidijum-bromida.

3.4.4.3. Reverzna transkripcija RNK

Pre same reverzne transkripcije primenjen je protokol za uklanjanje genomske DNK iz uzoraka izolovane RNK (1 μg) korišćenjem komercijalnog kita „DNase I, RNase-free“ (Thermo Scientific), po uputstvu proizvođača.

Dobijena RNK (1µg) je prevedena u cDNK uz pomoć komercijalnog kita za reverznu transkripciju „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ (Applied Biosystems, ThermoFischer Scientific) na osnovu instrukcija proizvođača. Dobijena cDNK čuvana je na -20°C do daljeg korišćenja.

3.4.4.4. qPCR

Korišćen je komercijalni kit „Power SYBR® Green Master Mix“ (Applied Biosystems). Komponente reakcione smeše (10µl) u bunariću činili su 4 x razblažena cDNK uzorka, Master Mix, odgovarajući prajmeri (Tabela 3) i MilliQ voda pri čemu je udeo svake komponente određen po uputstvu proizvođača. Reakcije umnožavanja su rađene u duplikatu, u aparatu 7500 Real-Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems) pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 95°C 10 min, 40 ciklusa denaturacije na 95°C 15s i hibridizacija na 60°C 1min. Na osnovu apsolutne kvantifikacije koja je podrazumevala korišćenje serije razblaženja cDNK za svaki par prajmera gena određena je efikasnost amplifikacije kao i odgovarajuća radna koncentracija cDNK. Za svaku reakciju analizirana je kriva topljenja kako bi se potvrdilo umnožavanje specifičnog produkta. Vrednosti relativne ekspresije ciljnih gena su dobijene metodom $2^{-\Delta Ct}$, pri čemu je $\Delta Ct = Ct \text{ (ciljni gen)} - Ct \text{ (kontrolni gen)}$. Kao kontrolni gen korišćen je Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma.

3.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati su izražavani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (S.D.) od 10 uzoraka za *Western blot* analizu, odnosno 6 uzoraka za RT-qPCR analizu. Provera da li podaci podležu normalnoj raspodeli izvršena je upotrebom *Shapiro-Wilk* testa, dok je F-test korišćen za upoređivanje jednakosti varijanse između grupa. Za poređenje kontrolne i eksperimentalne grupe korišćen je Studentov t-test, pri čemu je vrednost $p < 0.05$ smatrana statistički značajnom.

Tabela 3. Oznake gena i sekvence prajmera koji su korišćeni u RT-qPCR analizi.

Oznaka gena	Naziv gena	Sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina fragmenta(bp)
<i>Hk2</i>	Heksokinaza 2	F: TGGGCTGGACAA CCTCAAAG R: CCTTGGCAAA GTGAGGATGAAG	74
<i>Acadl</i>	Acil-CoA dehidrogenaza veoma dugog lanca	F: GGAATGAAAGCCCCA GGACA CAG R: TCAAACATGAACTCACAGGCAGAAA	170
<i>Spt1</i>	Serin-palmitoil transferaza 1	F: CAGTGCA GCCTGCTTTGCTA R: GCCTTTCGAGGATTCTTTTGATC	141
<i>Pdk4</i>	Kinaza piruvat dehidrogenaze 4	F: GGATTACTGACCGCCTCTTTAGTT R: GCATTCCGTGAATTGTCCATC	73
<i>Ampk</i>	AMP-aktivirana protein kinaza	F: GGGATCCATCAGCAA CTATCG R: TTCCTGGTCTTGGA GCTACGT	140
<i>Vdr</i>	Receptor za vitamin D	F: TGACCCCA CCTACGCTGACT R: CCTTGGAGAATA GCTCCCTGTACT	79
<i>cyp27B</i>	1 α -hidroksilaza	F: GAGATCACA GCGCTGTGAAC R: TACAATCTCAACACTTCTTTGATCA	107
<i>cyp24A</i>	24-hidroksilaza	F: TGGATGAGCTGTGCGATGA R: TGCTTTCAAAGGACCA CTTGTTC	75
<i>Ucp3</i>	Dekuplujući protein 3	F: GACTCACAGGCA GCAAA GGAA R: GAGGAGATCA GCAAAACAGGC	131
<i>Ryr2</i>	Rijanodinski receptor tipa 2	F: GGCTTCTTCCGCATTGTCTC R: TCTCCTCGCACCTCATCCT	125
<i>Mlycd</i>	Malonil-CoA dekarboksilaza	F: ACTTCTTCTCCCA CTGCTCC R: GCTTTATGA GGAA GGTGCCG	216
<i>Rpl19</i>	Ribozomalni protein L19	F: TCGCCAATGCCAA CTCTC R: AGCCCGGGAATGGA CAGT	89

4. REZULTATI

4.1. Efekti vitamina D na telesnu masu i masu srca

Tretman vitaminom D nije uticao na telesnu masu životinja (Tabela 4). Takođe, masa srca izražena kao apsolutna i kao relativna vrednost u odnosu na masu tela, je ostala nepromenjena nakon tretmana (Tabela 4).

Tabela 4. Efekat vitamina D na masu tela, apsolutnu i relativnu masu srca.

	K	VitD
Masa tela (g)	479.65 ± 53.90	490.20 ± 54.67
Masa srca (g)	1.21 ± 0.15	1.22 ± 0.13
Relativna masa srca (x1000)	2.52 ± 0.15	2.50 ± 0.15

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± S.D. K: kontrola, VitD: vitamin D.

4.2. Efekti vitamina D na biohemijske karakteristike pacova

Parametar 25(OH)D, kao najstabilniji metabolit vitamina D u cirkulaciji, meren je u cilju potvrde tretmana. Kao što je prikazano u tabeli 5, koncentracija 25(OH)D je statistički značajno povećana kod grupe životinja tretirane vitaminom D ($p < 0.001$).

Izmerene koncentracije Ca^{2+} i fosfora u cirkulaciji ukazale su da tretman vitaminom D u trajanju od 6 nedelja nije doveo do poremećaja u homeostazi izmerenih jona (Tabela 5).

Statistički značajna promena nije uočena ni na nivou koncentracije insulina u krvi nakon tretmana vitaminom D (Tabela 5).

Insulinska stimulacija je potvrđena rezultatom da je aplikacija insulina 40 minuta pre žrtvovanja dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije glukoze u krvi pacova i u prisustvu (2.17 ± 0.23 ; $p < 0.001$ vs VitD) i u odsustvu vitamina D (2.36 ± 0.19 ; $p < 0.001$ vs K). Nasuprot tome, sam tretman vitaminom D nije statistički značajno uticao na koncentraciju glukoze u krvi (Tabela 5).

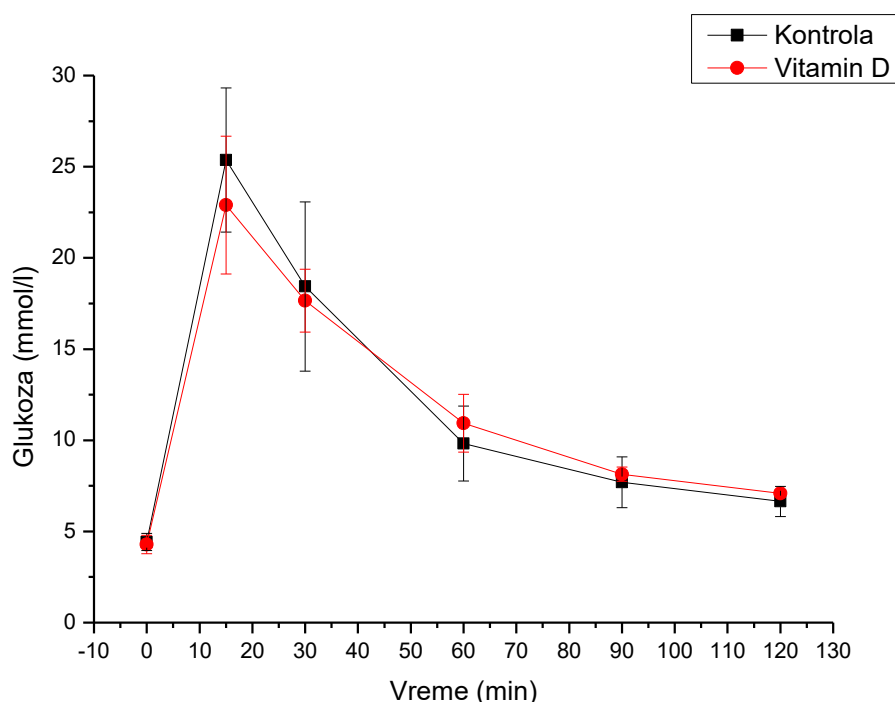
Za procenu insulinske osetljivosti korišćen je IPGTT (Slika 4) koji je pokazao da se površina ispod krive (parametar AUC) nije statistički značajno promenila nakon tretmana vitaminom D (Tabela 5).

Koncentracija triglicerida i holesterola u plazmi nije se statistički značajno promenila nakon tretmana vitaminom D (Tabela 5). Za razliku od njih, koncentracija NEFA u plazmi je statistički značajno smanjena nakon tretmana vitaminom D (Tabela 5).

Tabela 5. Efekat vitamina D na biohemijske parametre.

	K	VitD
25(OH)D (ng/ml)	35.94 ± 4.70	89.99 ± 13.48***
Kalcijum (mmol/l)	2.30 ± 0.05	2.34 ± 0.03
Fosfor (mmol/l)	1.58 ± 0.40	1.76 ± 0.23
Glukoza (mmol/l)	5.19 ± 0.46	5.02 ± 0.34
Insulin (IU/l)	16.43 ± 2.24	14.47 ± 1.96
AUC	1453.62 ± 253.19	1451.00 ± 97.35
HDL	0.81±0.14	0.84±0.16
LDL	0.17±0.04	0.15±0.06
Totalni HL	1.47±0.21	1.46±0.34
TG	0.53±0.15	0.47±0.12
NEFA (mmol/l)	0.64 ± 0.11	0.52 ± 0.12*

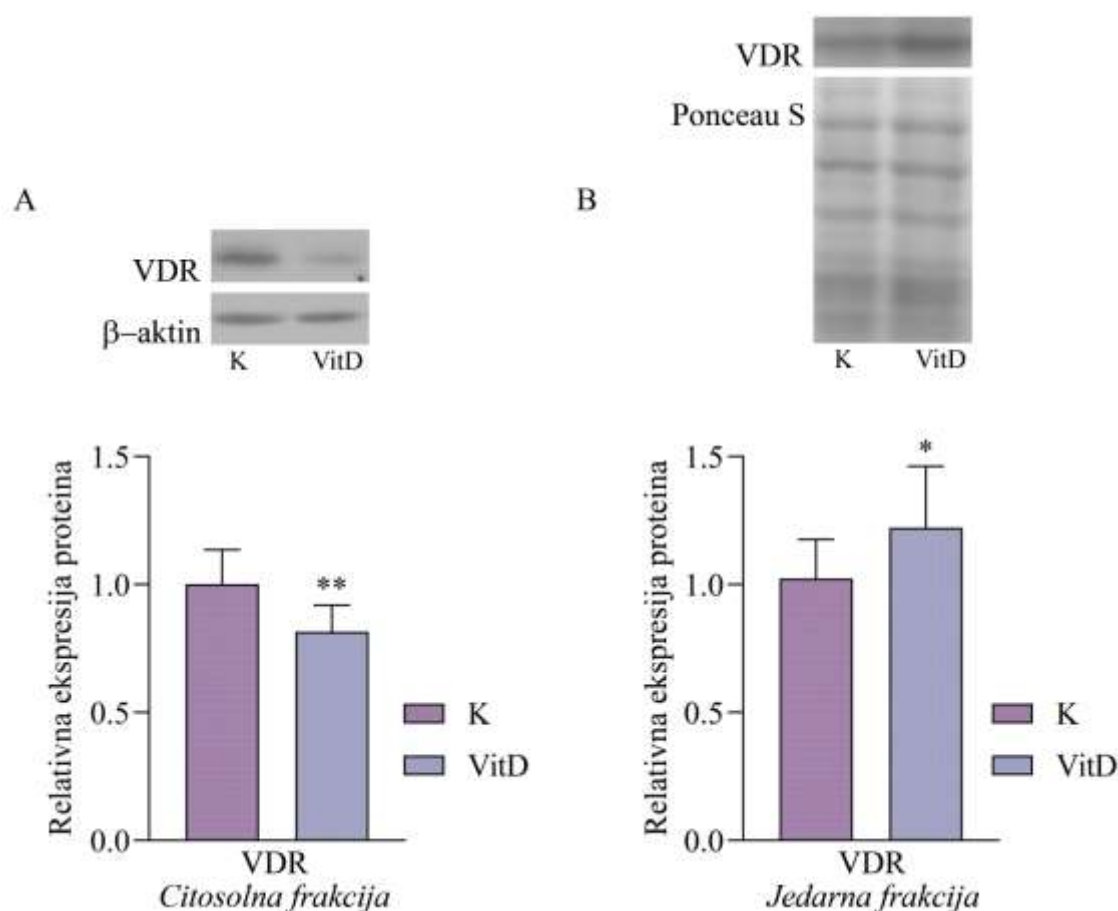
Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± S.D. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (*p<0.05, ***p<0.001). K: kontrola; VitD: vitamin D; 25(OH)D: 25-hidroksi vitamin D; AUC: engl. *Area Under the Curve*; HDL: engl. *High Density Lipoprotein*; LDL: engl. *Low Density Lipoprotein*; HL: holesterol; TG: trigliceridi; NEFA: engl. *Non-Esterified Fatty Acids*.



Slika 4. Rezultati IPGTT kontrolnih i vitaminom D tretiranih životinja. Koncentracija glukoze merena je u 6 vremenskih tačaka, neposredno pre injeciranja (0) i 15, 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injeciranja glukoze. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± S.D. (n=6).

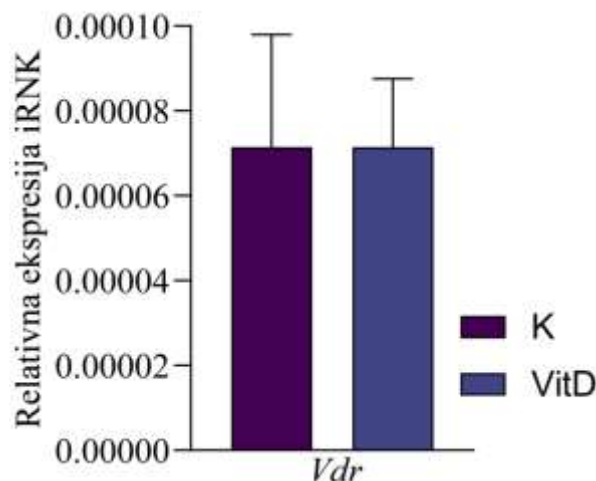
4.3. Efekti vitamina D na VDR i enzime uključene u metabolizam vitamina D

Tretman vitaminom D doveo je do statistički značajnog smanjenja nivoa proteina VDR u citosolnoj frakciji srca pacova (Slika 5; $p < 0.01$), dok je istovremeno uočeno statistički značajno povećanje nivoa ovog proteina u jedarnoj frakciji (Slika 5; $p < 0.05$).



Slika 5. Efekat tretmana vitaminom D na unutarćelijsku distribuciju proteina VDR između citosolne (A) i jedarne frakcije (B) srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina VDR u citosolnoj frakciji normalizovan je na β -aktin (A). Nivo VDR proteina u jedarnoj frakciji normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

RT-qPCR metodom ispitivana je relativna ekspresija iRNK za VDR i enzime 1α -hidroksilazu i 24-hidroksilazu u srcu pacova. Tretman vitaminom D nije doveo do promene u relativnoj ekspresiji iRNK za VDR (Slika 6). RT-qPCR metodom nisu detektovani produkti iRNK za 1α -hidroksilazu i 24-hidroksilazu.

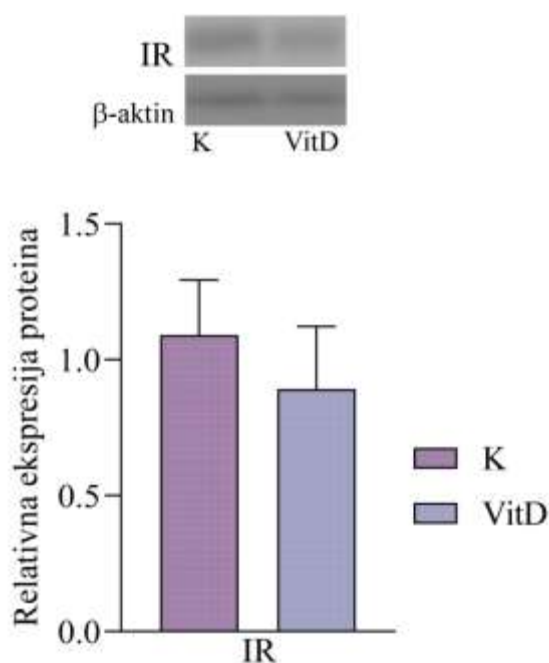


Slika 6. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za VDR (*Vdr*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

4.4. Efekti vitamina D na molekule insulinskog signalnog puta u srcu pacova

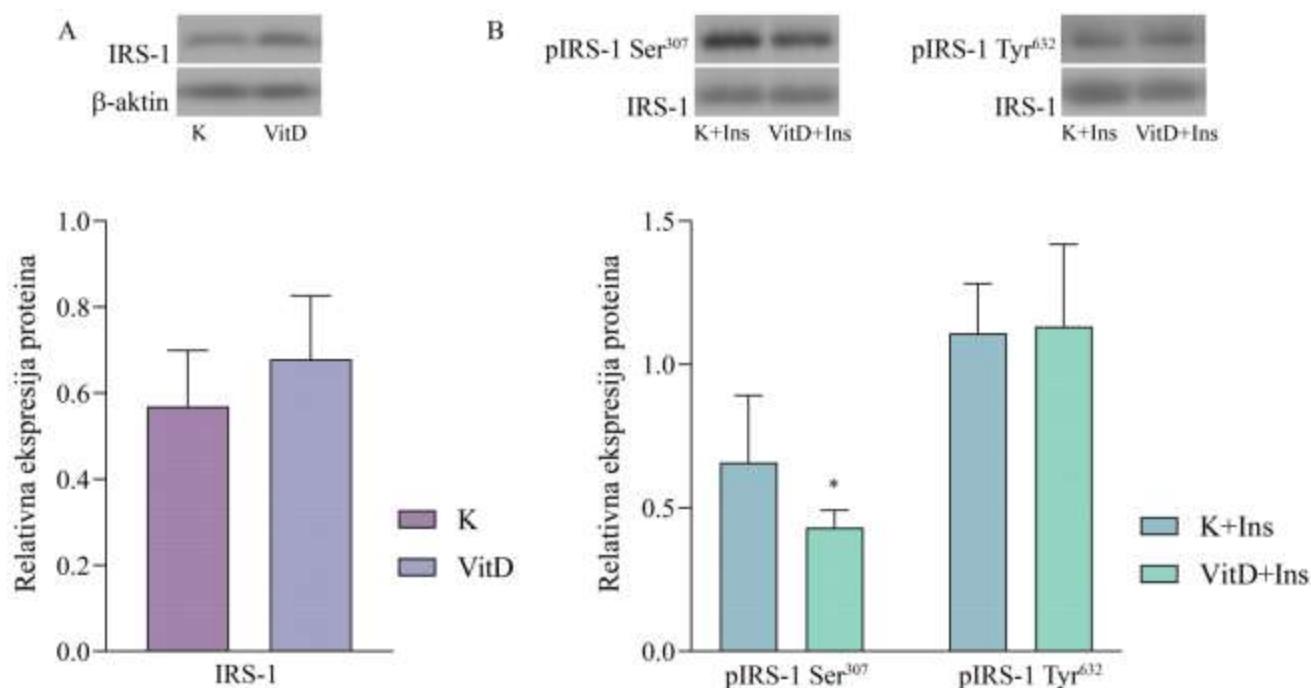
Korišćenjem *Western blot* metode ispitani su efekti tretmana vitaminom D na proteinski nivo ključnih molekula insulinskog signalnog puta (IR, IRS-1, PTP1B, S6K, Akt, ERK1/2) u ukupnom ćelijskom ekstraktu srca. Kod molekula kod kojih je praćen stepen fosforilacija koje su zavisne od insulina (pIRS-1 Ser³⁰⁷, pIRS-1 Tyr⁶³², pS6K Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴, pAkt Ser⁴⁷³, pAkt Thr³⁰⁸, pERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), za analizu su korišćeni uzorci srca pacova tretiranih insulinom.

Nivo proteina IR ostao je nepromenjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 7).



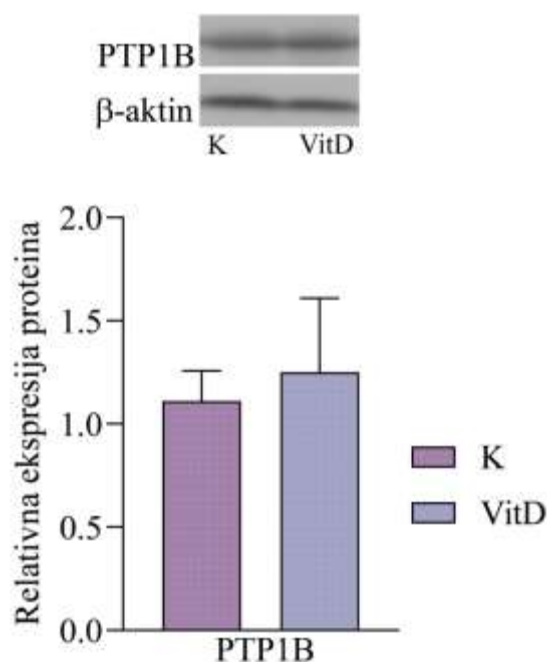
Slika 7. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina IR u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na β -aktin. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Dalje je određen ukupan nivo proteina IRS-1 kao i stepen dve funkcionalno značajne fosforilacije molekula. Fosforilacija IRS-1 na Ser³⁰⁷ je negativni regulator aktivnosti molekula dok je fosforilacija IRS-1 na Tyr⁶³² stimulirana insulinom i omogućava dalji prenos insulinskog signala. Ukupan nivo IRS-1 proteina nije se promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 8A). Takođe, u insulinom stimulisanim uslovima vitamin D nije uticao na stepen fosforilacije IRS-1 na Tyr⁶³² (Slika 8B), dok je detektovano statistički značajno smanjenje stepena fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ (Slika 8B; $p < 0.05$).



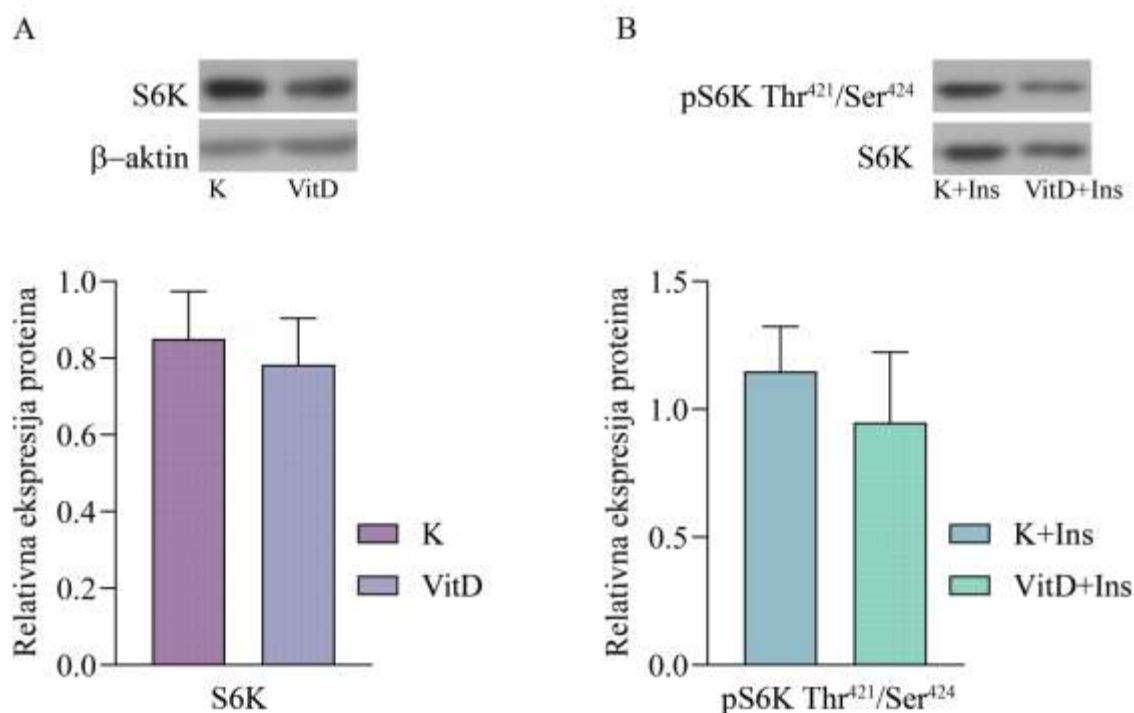
Slika 8. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo proteina IRS-1 (A) i stepen fosforilacije IRS-1 proteina na Ser³⁰⁷ i Tyr⁶³² u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme IRS-1 je normalizovan na ukupan nivo proteina IRS-1 (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom ($*p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

Ispitan je i ukupan sadržaj PTP1B koja uklanja aktivirajuće fosforilacije sa IR i IRS-1 proteina te tako može uticati na njihovu aktivnost. Ukupan sadržaj proteina PTP1B u ukupnom ćelijskom ekstraktu nije se promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 9).



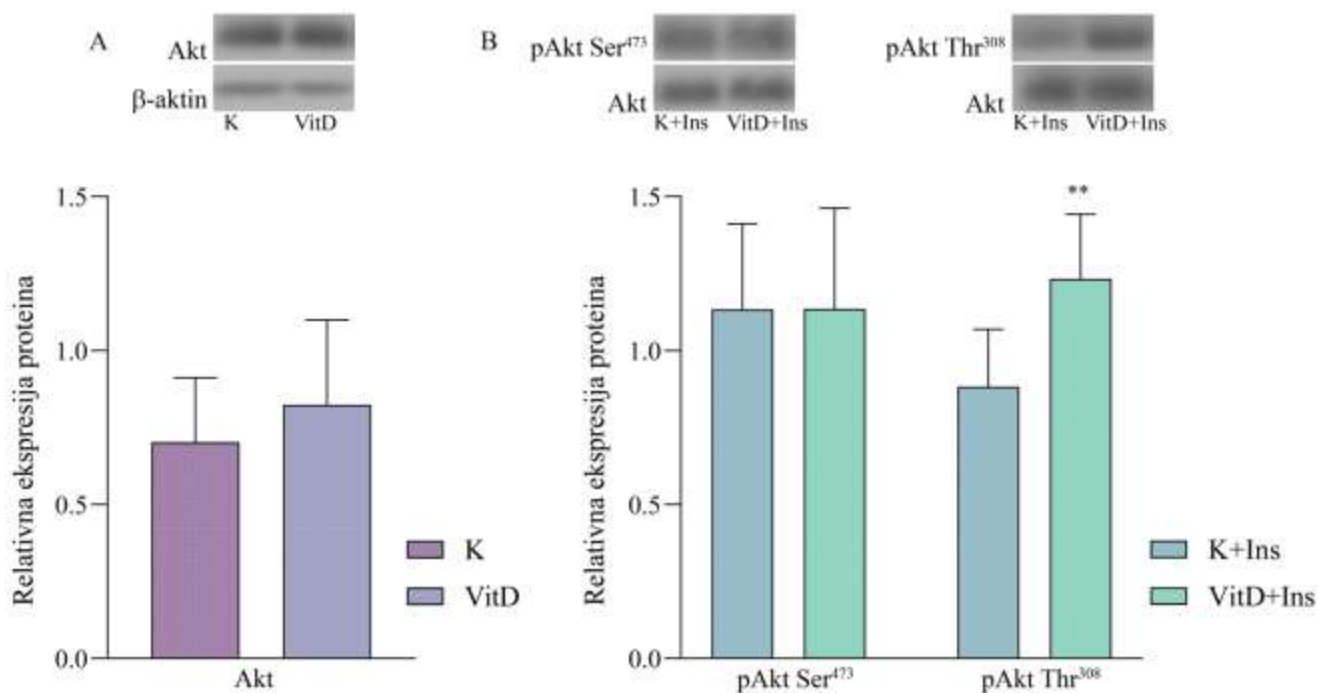
Slika 9. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina PTP1B u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na β -aktin. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Kako je uočena promena na fosforilaciji IRS-1 na Ser³⁰⁷, ispitali smo da li je vitamin D ovakav efekat ostvario preko S6K koja reguliše prenos insulinskog signala negativnom povratnom spregom tako što fosforiliše Ser ostatke IRS proteina i inhibira njihovu aktivnost. Vitamin D nije uticao na stepen fosforilacije S6K na Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ u uslovima insulinske stimulacije (Slika 10B). Takođe, ni ukupan nivo proteina S6K nije se statistički značajno promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 10A).



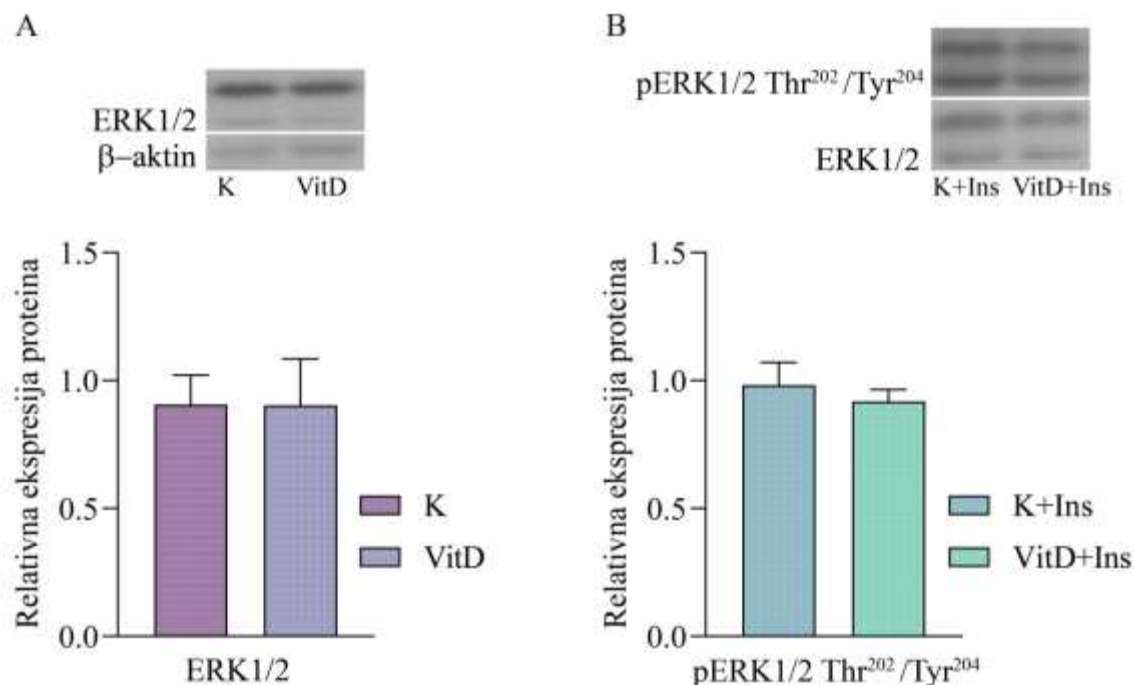
Slika 10. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo S6K (A) i stepen fosforilacije S6K na Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme S6K je normalizovan na ukupan nivo proteina S6K (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

Metabolički efekti insulina ostvaruju se aktivacijom PI3K signalnog puta u kojem centralnu ulogu ima molekul Akt. Efekat tretmana vitaminom D na Akt ispitivan je na osnovu ukupnog nivoa Akt proteina, kao i na osnovu dve aktivacione fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸. Ukupan nivo proteina Akt ostao je nepromenjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 11A). U uslovima insulinske stimulacije, vitamin D je statistički značajno povećao stepen fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ (Slika 11B; $p < 0.01$), za razliku od fosforilacije na Ser⁴⁷³ gde nije bilo promene (Slika 11B).



Slika 11. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo Akt (A) i stepen fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ i Thr³⁰⁸ u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme Akt je normalizovan na ukupan nivo proteina Akt (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

Druga grana insulinskog signalnog puta, mitogeni signalni put, ispitivan je preko ERK 1/2 kinaze. Tretman vitaminom D u trajanju od 6 nedelja nije doveo do promena ukupnog nivoa proteina ERK 1/2 (Slika 12A). Takođe, vitamin D nije uticao na stepen fosforilacije ERK 1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ u uslovima insulinske stimulacije (Slika 12B).

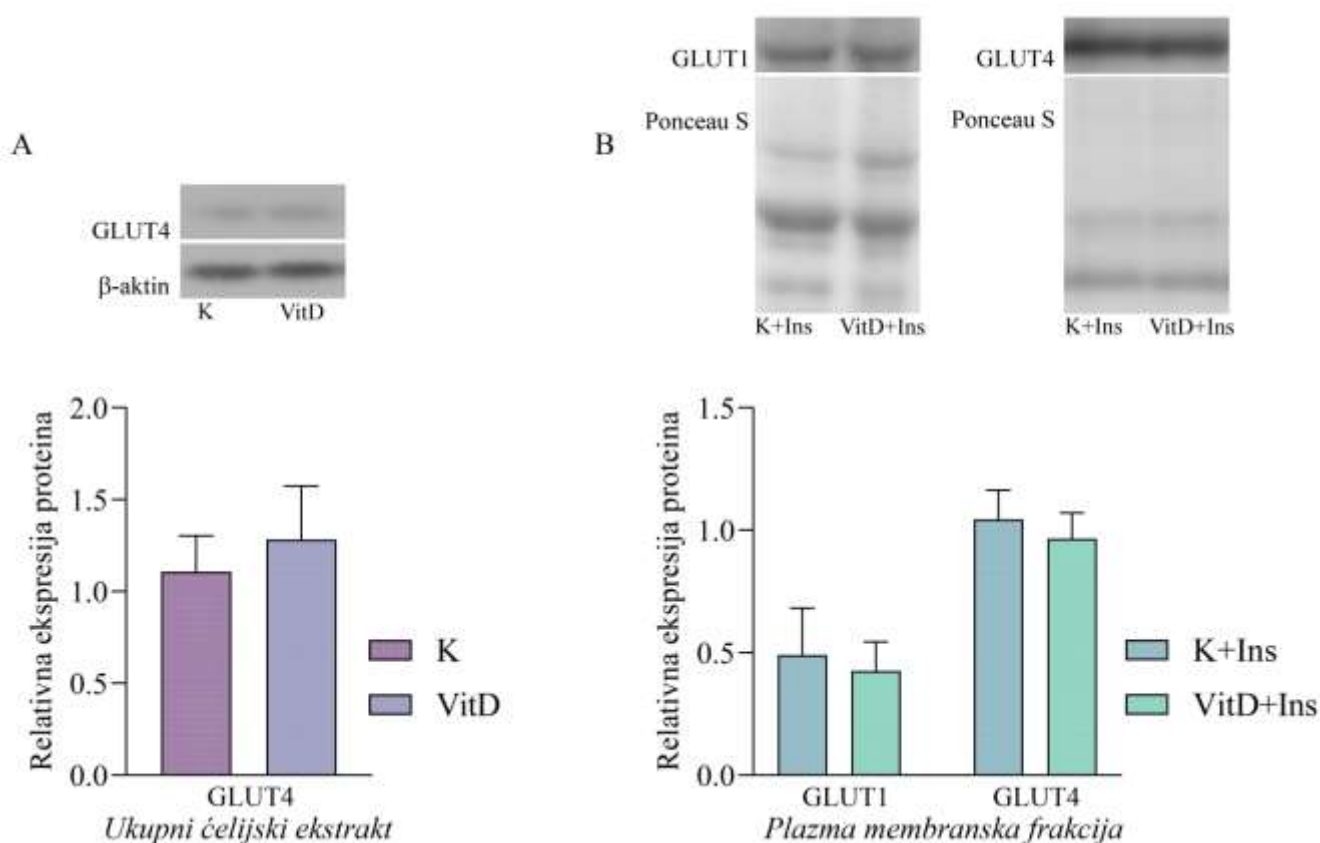


Slika 12. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo ERK1/2 (A) i stepen fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotoi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme ERK1/2 je normalizovan na ukupan nivo proteina ERK1/2 (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

4.5. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam glukoze u srcu pacova

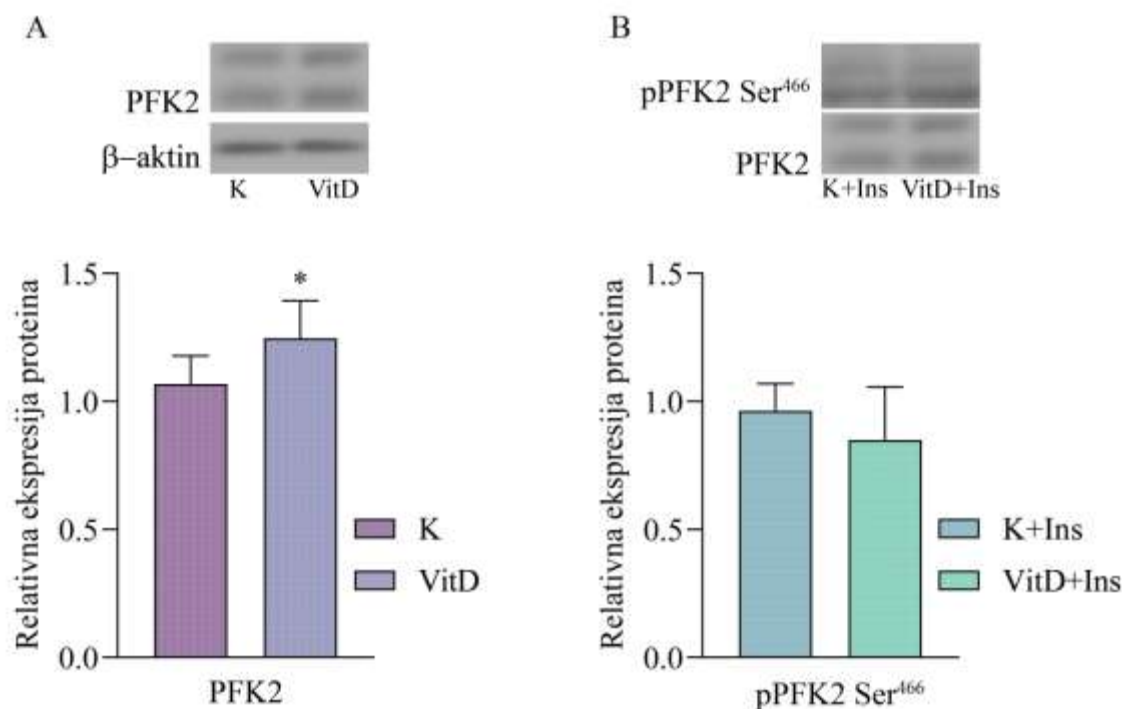
Korišćenjem *Western blot* metode ispitani su efekti tretmana vitaminom D na proteinsku ekspresiju molekula uključenih u transport (GLUT4, GLUT1) i metabolizam glukoze (GSK-3 β , PFK2, FoxO1) u srcu. RT-qPCR metodom određena je relativna ekspresija gena za molekule uključene u metabolizam glukoze (HK2, PDK4) u srcu. Proteinska ekspresija GLUT4, GLUT1, GSK-3 β , PFK2 i FoxO1, kao i relativna ekspresija gena za HK2 i PDK4, određeni su u uzorcima srca pacova koji nisu tretirani insulinom. Step en fosforilacije GSK-3 β na Ser⁹ i PFK2 na Ser⁴⁶⁶, kao i unutarćelijska lokalizacija FoxO1, GLUT4 i GLUT1 su pod direktnom insulinskom regulacijom, zbog čega su oni određeni u uslovima insulinske stimulacije.

Nivo proteina GLUT4 ostao je nepromenjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 13A). Takođe, vitamin D nije statistički značajno uticao na nivo proteina GLUT1 i GLUT4 u plazma membranskoj frakciji srca, u uslovima insulinske stimulacije (Slika 13B).



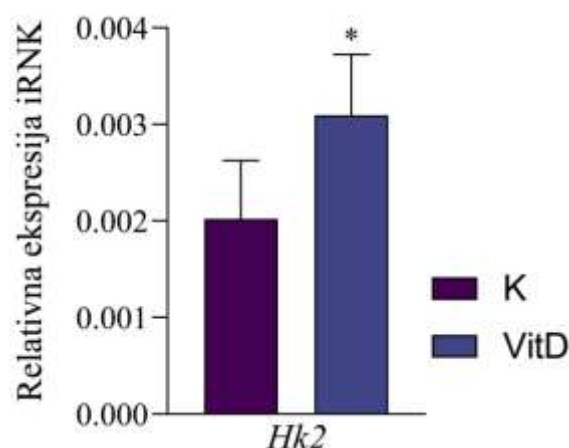
Slika 13. Efekat tretmana vitaminom D na nivo GLUT4 u ukupnom ćelijskom ekstraktu (A) i nivo GLUT1 i GLUT4 u plazma membranskoj frakciji u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina GLUT4 normalizovan je na β -aktin (A). Nivo proteina GLUT1 i GLUT4 normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

Ukupan nivo proteina PFK2 koji je uključen u regulaciju procesa glikolize povećan je nakon tretmana vitaminom D (Slika 14A; $p < 0.05$). Vitamin D nije uticao na stepen fosforilacije PFK2 na Ser⁴⁶⁶ u uslovima insulinske stimulacije (Slika 14B).



Slika 14. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo PFK2 (A) i stepen fosforilacije PFK2 na Ser⁴⁶⁶ u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotoi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme PFK2 je normalizovan na ukupan nivo proteina PFK2 (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

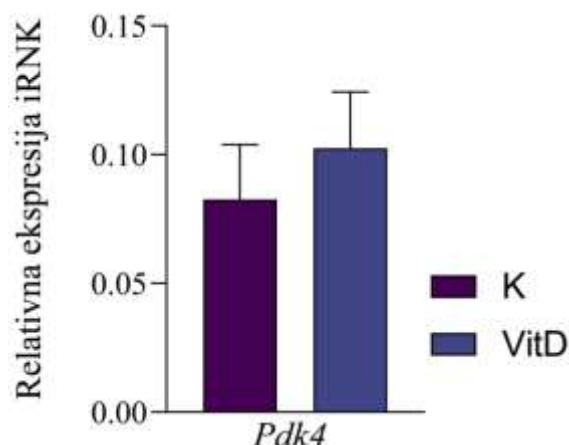
Naši rezultati pokazuju da tretman vitaminom D dovodi do povećanja relativne ekspresije iRNK za HK2 koja reguliše početni korak glikolize (Slika 15; $p < 0.05$).



Slika 15. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za HK2 (*Hk2*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjediniice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom ($*p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

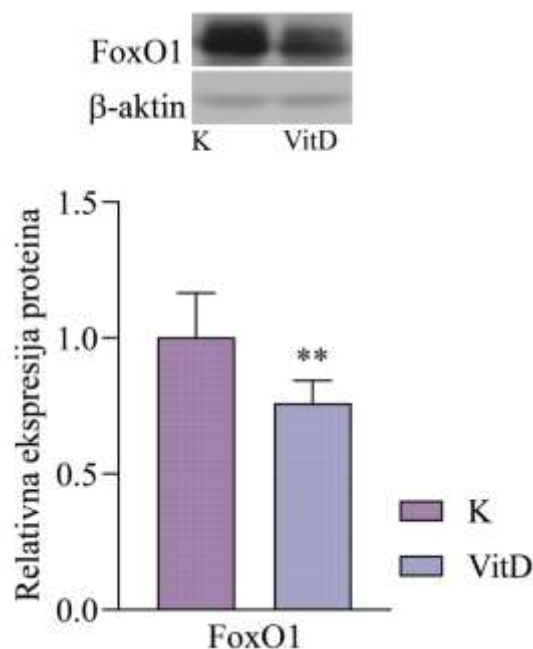
Nakon ispitivanja efekata vitamina D na molekule uključene u glikolizu i njenu regulaciju, ispitali smo i efekat vitamina D na gensku ekspresiju PDK4 koji je uključen u regulaciju aktivnosti enzima PDH koji omogućava dalji put razgradnje glukoze, odnosno oksidativnu dekarboksilaciju piruvata. Takođe ispitali smo i efekat vitamina D na ekspresiju i unutarćelijsku lokalizaciju molekula FoxO1 koji je ključni transkripcioni regulator PDK4.

Relativna ekspresija iRNK za PDK4 nije se statistički značajno promenila nakon tretmana vitaminom D (Slika 16).



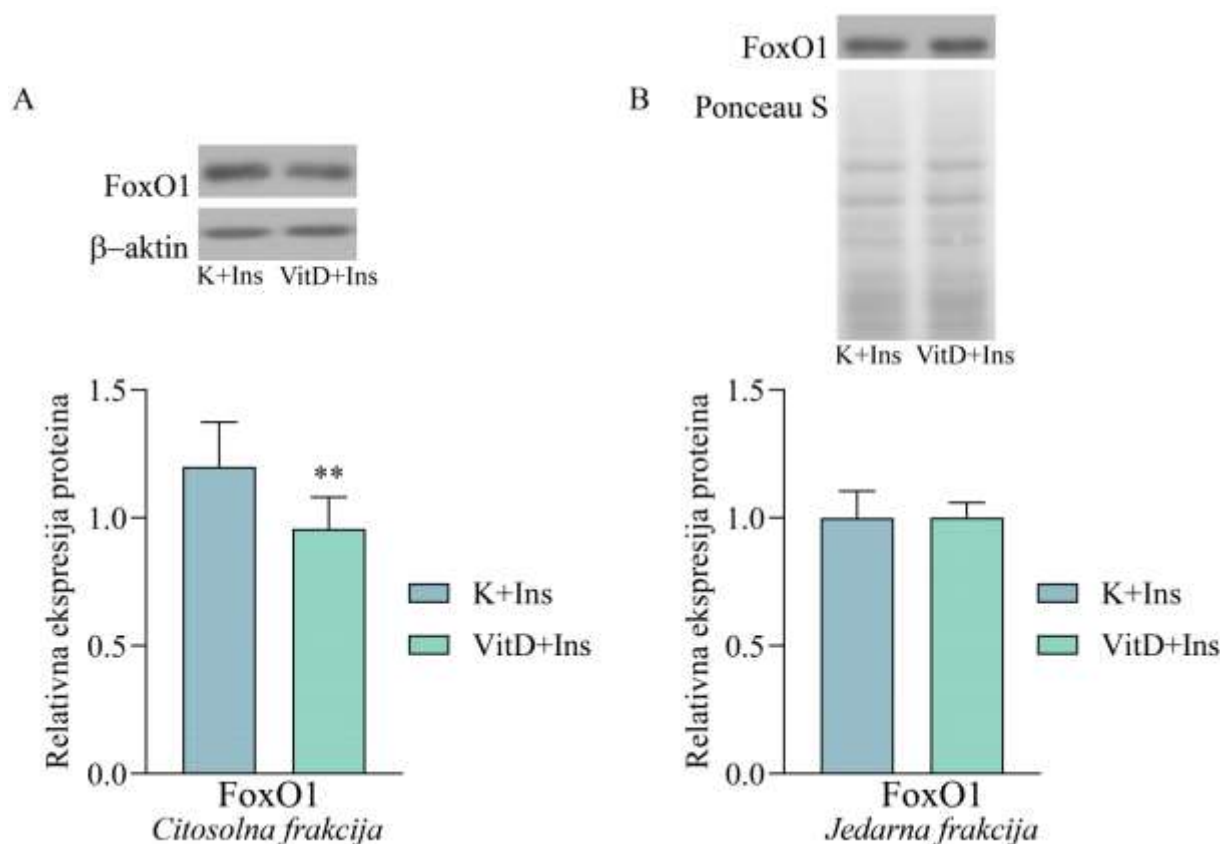
Slika 16. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za PDK4 (*Pdk4*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjediniice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Rezultati su pokazali da je ukupan nivo proteina FoxO1 u srcu pacova statistički značajno smanjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 17; $p < 0.01$).



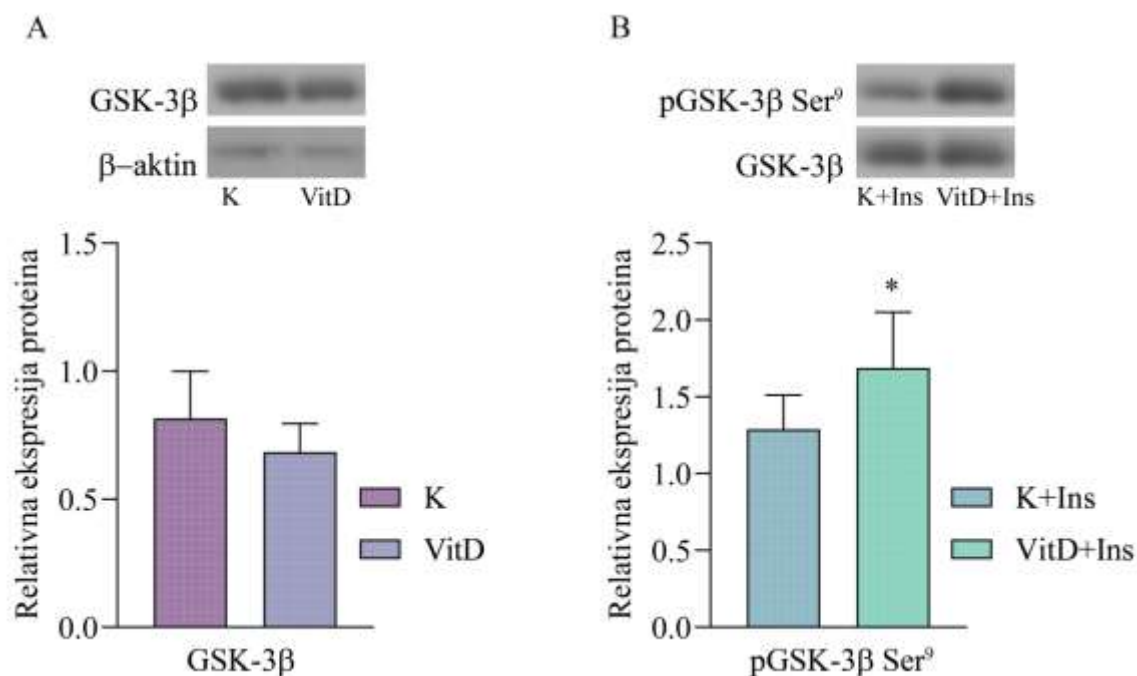
Slika 17. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina FoxO1 u ukupnom ćelijskom ekstraktu srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na β -aktin. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

U uslovima insulinske stimulacije, nivo proteina FoxO1 u citosolnoj frakciji je statistički značajno smanjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 18A; $p < 0.01$), dok je nivo proteina u jedarnoj frakciji ostao nepromenjen (Slika 18B).



Slika 18. Efekat tretmana vitaminom D, u uslovima insulinske stimulacije, na unutarćelijsku distribuciju proteina FoxO1 između citosolne (A) i jedarne frakcije (B) srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina FoxO1 normalizovan je na β -aktin (A). Nivo FoxO1 proteina normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

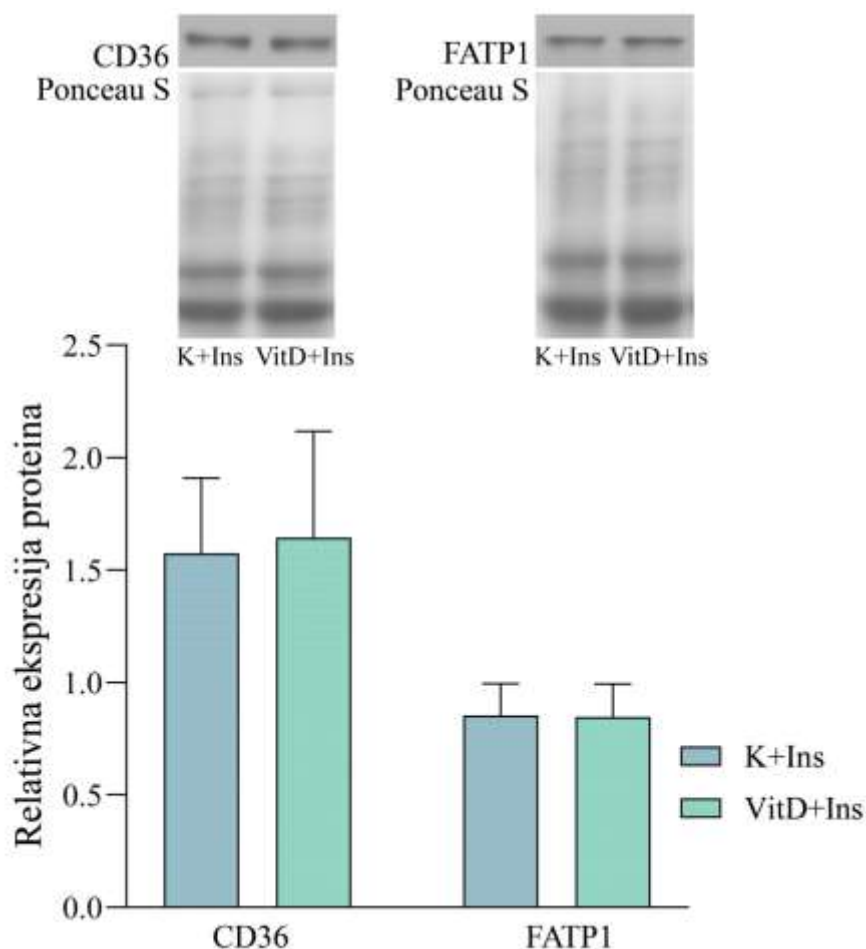
Proces sinteze glikogena u srcu, kao jedan od metaboličkih puteva u koje se glukoza može usmeriti, analiziran je preko molekula GSK-3 β koji je direktno uključen u regulaciju aktivnosti enzima GS. Ukupan nivo proteina GSK-3 β ostao je nepromenjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 19A). Sa druge strane, vitamin D je povećao stepen fosforilacije GSK-3 β na Ser⁹ u uslovima insulinske stimulacije (Slika 19B; $p < 0.05$).



Slika 19. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo GSK-3 β (A) i stepen fosforilacije GSK-3 β na Ser⁹ u uslovima insulinske stimulacije (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme GSK-3 β je normalizovan na ukupan nivo proteina GSK-3 β (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins: insulin.

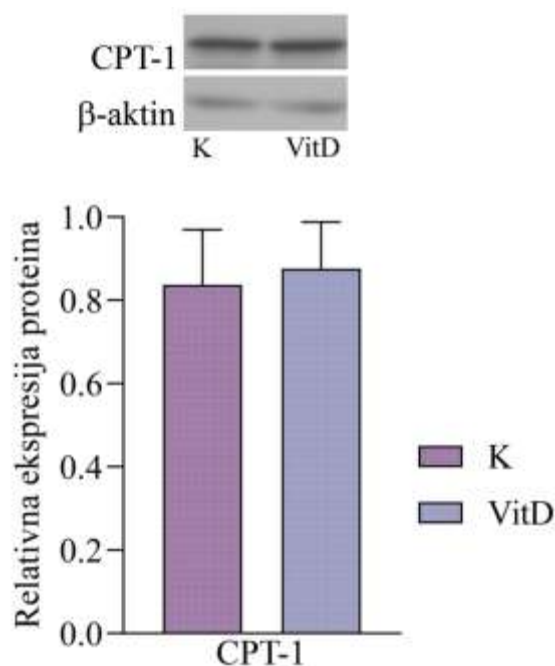
4.6. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam masnih kiselina u srcu pacova

Proteinski nivo glavnih transportera masnih kiselina, CD36 i FATP1, ostao je nepromenjen u plazma membranskoj frakciji srca pacova nakon tretmana vitaminom D u uslovima insulinske stimulacije (Slika 20).



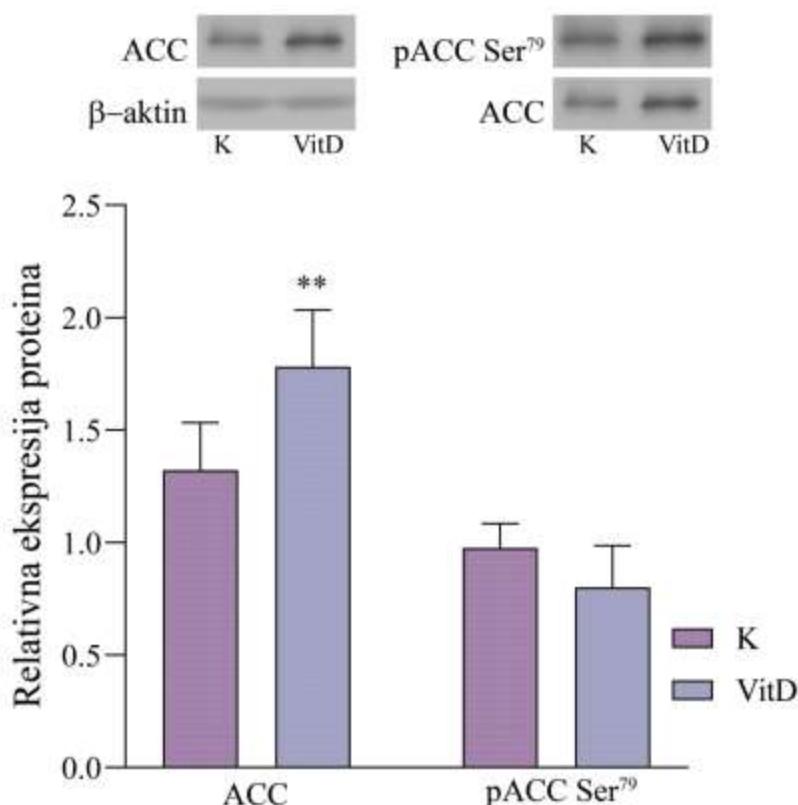
Slika 20. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina CD36 i FATP1 u plazma membranskoj frakciji srca pacova u uslovima insulinske stimulacije. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina je normalizovan na sadržaj ukupnih proteina na membrani. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D, Ins:insulin.

Većina masnih kiselina koje ulaze u srce usmeravaju se direktno u mitohondrije gde se odvija β -oksidacija. Ključnu ulogu u preuzimanju masnih kiselina iz citoplazme u mitohondrije ima protein CPT-1. Nivo proteina CPT-1 nije se promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 21).



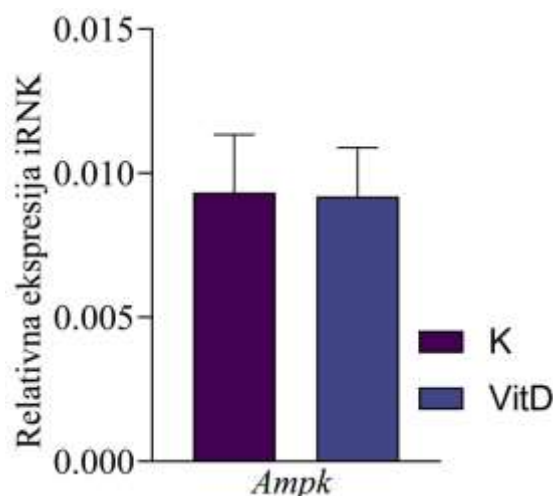
Slika 21. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina CPT-1 u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na β -aktin. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Kako je aktivnost CPT-1 proteina alosterički inhibirana interakcijom sa malonil-CoA, ispitivan je i efekat vitamina D na enzime ACC i MCD koji su uključeni u proces sinteze i degradacije ovog molekula. Pored toga, ključni regulator aktivnosti ACC proteina je protein AMPK koji vrši fosforilaciju ACC na Ser⁷⁹ čime inhibira njegovu enzimsku aktivnost zbog čega smo ispitali uticaj tretmana i na nivou ovog molekula. Stepen inhibitorne fosforilacije ACC na Ser⁷⁹ ostao je nepromenjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 22), dok je ukupan sadržaj ACC proteina statistički značajno povećan (Slika 22; $p < 0.01$).



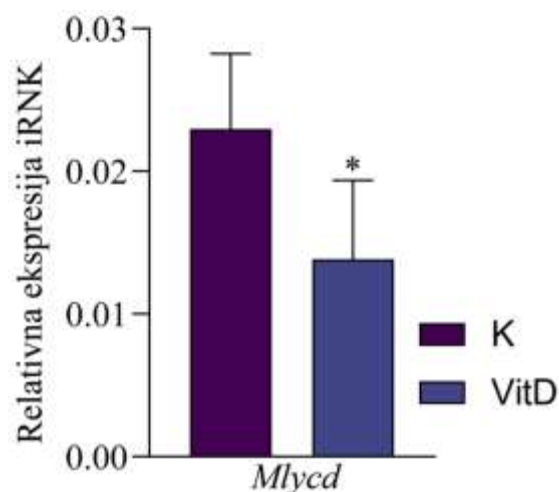
Slika 22. Efekat tretmana vitaminom D na ukupan nivo ACC (A) i stepen fosforilacije ACC na Ser⁷⁹ (B) u srcu pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Ukupan nivo proteina normalizovan je na β -aktin (A). Nivo fosforilisane forme ACC je normalizovan na ukupan nivo proteina ACC (B). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

Relativna ekspresija iRNK za AMPK kod pacova na tretmanu vitaminom D ostala je na nivou sličnom kao kod kontrolnih životinja (Slika 23).



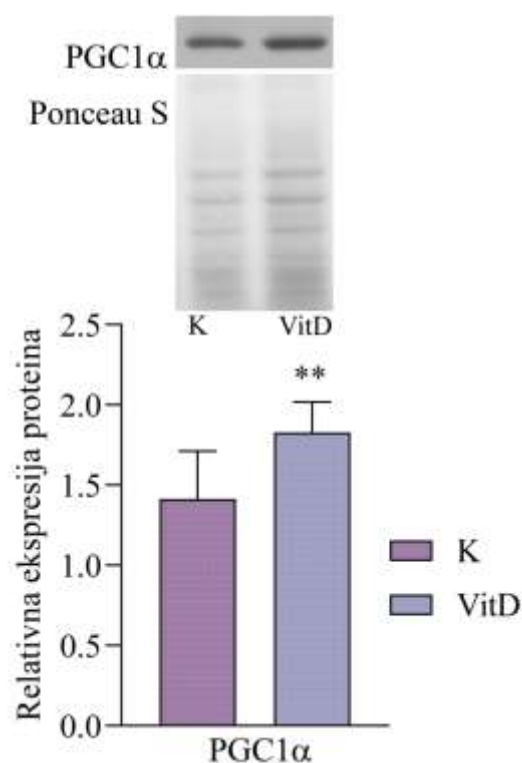
Slika 23. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za AMPK (*Ampk*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

MCD je enzim koji katalizuje reverzibilnu reakciju u odnosu na ACC, i prevodi nastali malonil-CoA u acetil-CoA. Tretman vitaminom D doveo je do statistički značajnog smanjenja relativne ekspresije iRNK za MCD u srcu pacova (Slika 24; $p < 0.05$).



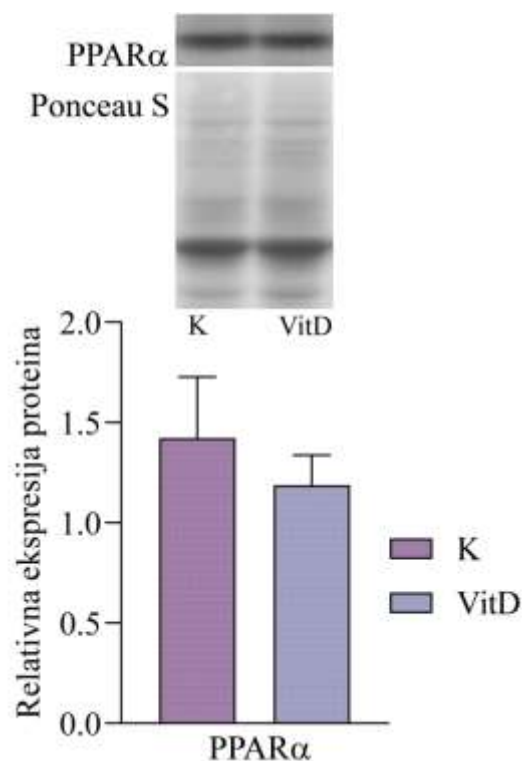
Slika 24. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za MCD (*Mlycd*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

Western blot metodom ispitana je proteinska ekspresija transkripcionih regulatora β -oksidacije (PGC1 α , PPAR α i lipin1). Nivo proteina PGC1 α u jedarnoj frakciji srca je statistički značajno povećan nakon tretmana vitaminom D (Slika 25; $p < 0.01$).



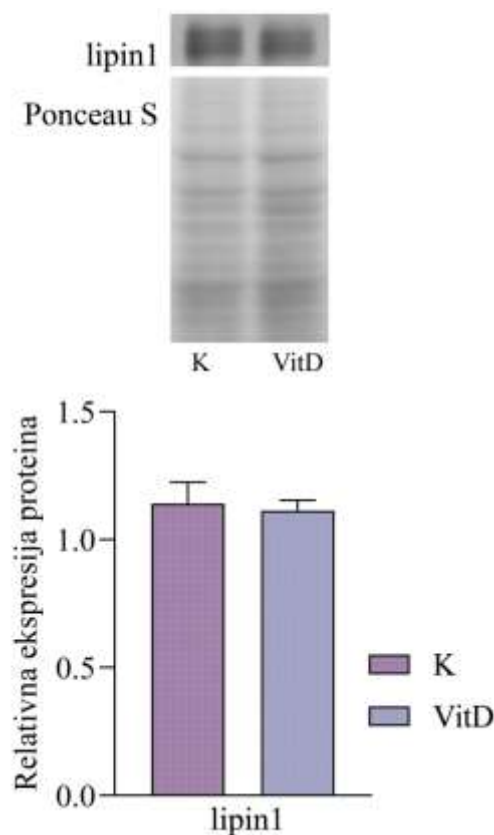
Slika 25. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina PGC1 α u jedarnoj frakciji srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

Nivo proteina PPAR α u jedarnoj frakciji srca nije se statistički značajno promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 26).



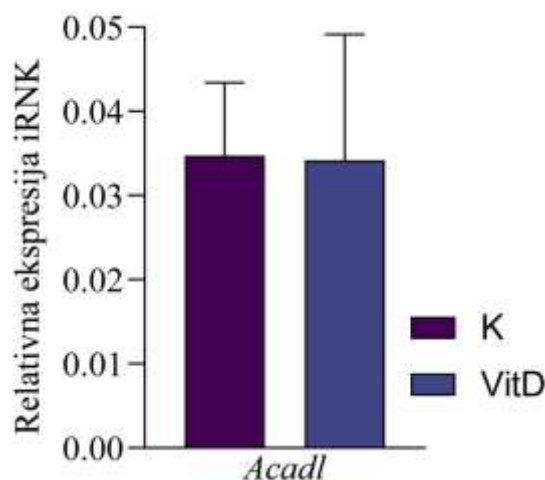
Slika 26. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina PPAR α u jedarnoj frakciji srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotoi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Nivo proteina lipin1 u jedarnoj frakciji srca nije se statistički značajno promenio nakon tretmana vitaminom D (Slika 27).



Slika 27. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina lipin1 u jedarnoj frakciji srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

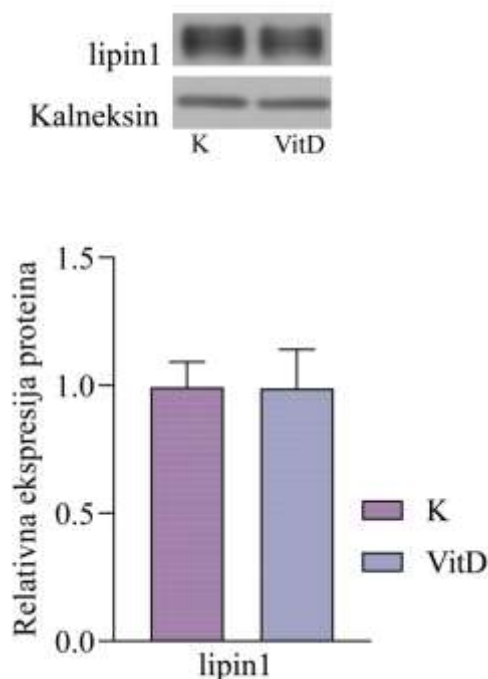
Relativna ekspresija iRNK za VLCAD, enzim koji katalizuje početnu reakciju u procesu β -oksidacije, ostala je nepromenjena nakon tretmana vitaminom D (Slika 28).



Slika 28. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za VLCAD (*Acadl*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

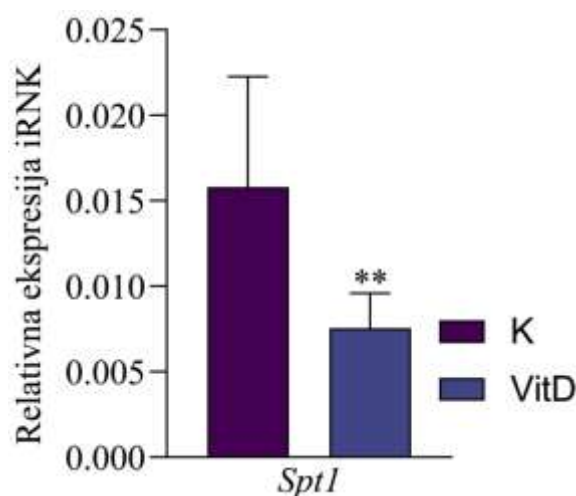
Kako su dobijeni rezultati pokazali da tretman vitaminom D indirektno može smanjiti dostupnost masnih kiselina za oksidaciju putem alosteričke inhibicije CPT-1, interesovalo nas je da li se masne kiseline preusmeravaju u puteve sinteze TAG ili ceramida.

Ukupan sadržaj proteina lipin1 određen je i u mikrozomalnoj frakciji srca gde ovaj protein učestvuje u procesu biosinteze TAG. Ekspresija proteina lipin1 nakon tretmana vitaminom D nije značajno promenjena u mikrozomalnoj frakciji (Slika 29).



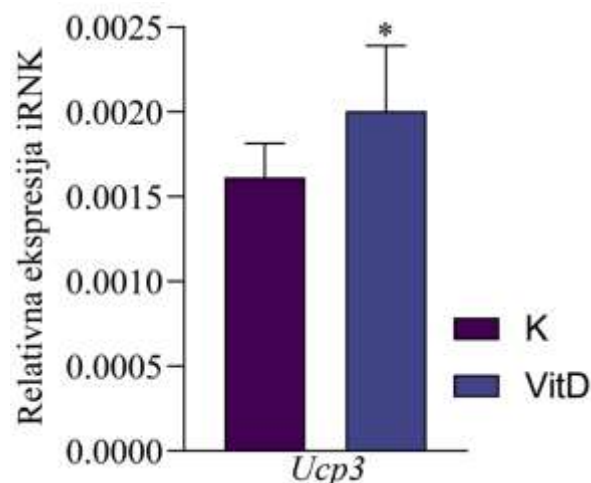
Slika 29. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina lipin1 u mikrozomalnoj frakciji srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina normalizovan je na kalneksin. Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom. K: kontrola, VitD: vitamin D.

Uticaj tretmana vitaminom D na biosintezu ceramida u srcu ispitan je preko analize ekspresije iRNK za SPT1 koji je ključni enzim uključen u ovaj proces. Tretman vitaminom D doveo je do smanjenja relativne ekspresije iRNK za SPT1 u srcu pacova (Slika 30; $p < 0.01$).



Slika 30. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za SPT1 (*Spt1*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom (** $p < 0.01$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

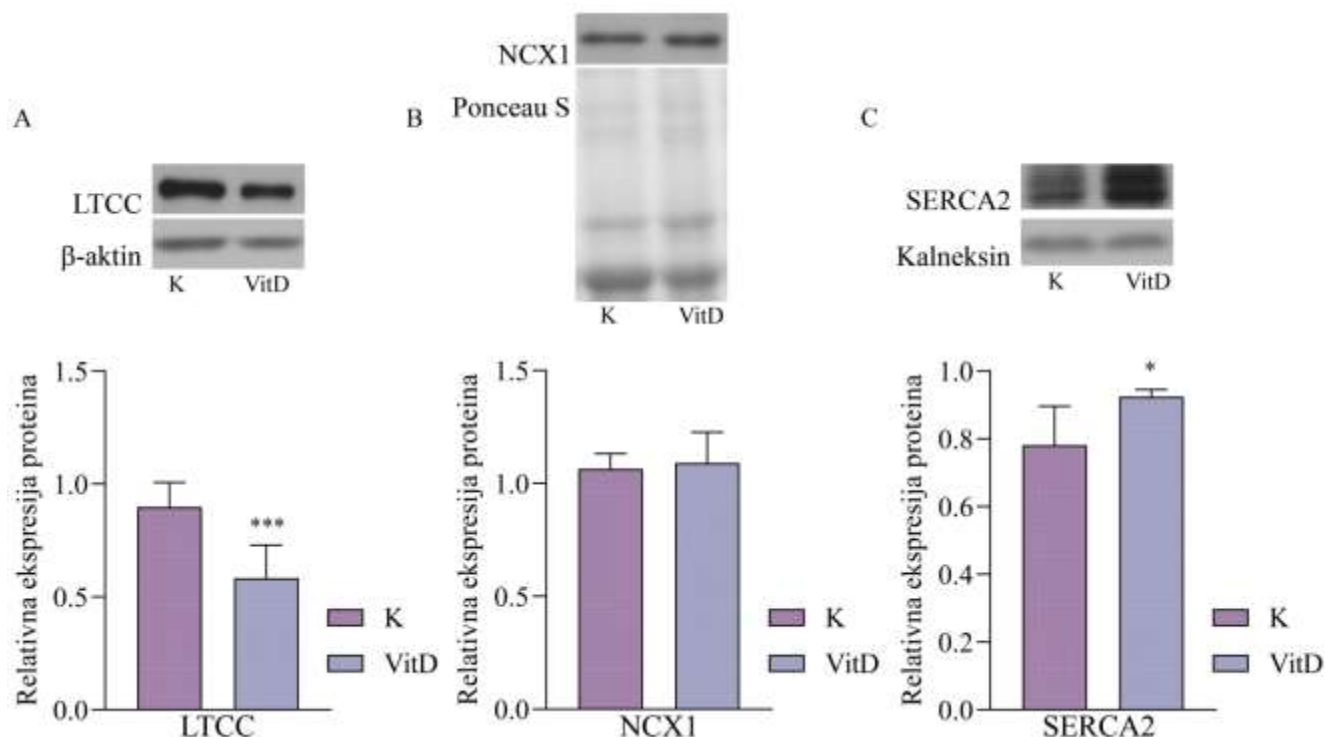
Kako se pretpostavlja da UCP proteini mogu uticati na metabolizam masnih kiselina, ispitali smo efekat tretmana na relativnu ekspresiju iRNK za UCP3 izoformu koja je eksprimirana u srcu. Tretman vitaminom D doveo je do statistički značajnog povećanja relativne ekspresije iRNK za UCP3 (Slika 31; $p < 0.05$).



Slika 31. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za UCP3 (*Ucp3*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za Rpl19 koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom ($*p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

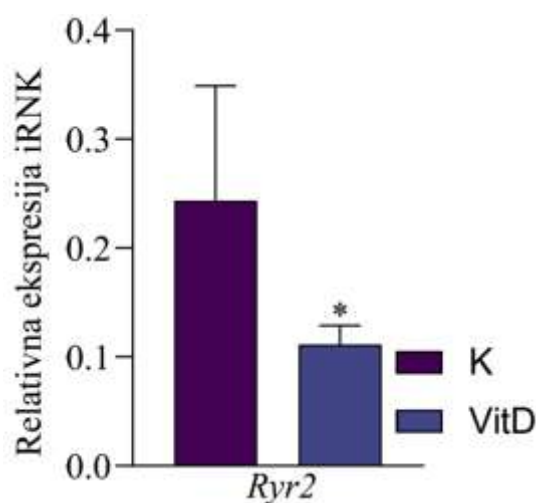
4.7. Efekti vitamina D na jonske kanale uključene u proces kontrakcije/relaksacije srca pacova

Kontraktilna aktivnost srca je energetski veoma zahtevan proces koji počiva na pravilnom i koordinisanom funkcionisanju jonskih kanala. Promene u dostupnosti nutrijenata kao i u njihovom metabolizmu u srcu mogu se odraziti i na aktivnost ovih molekula. U ukupnom ćelijskom ekstraktu srca nivo proteina LTCC je statistički značajno smanjen nakon tretmana vitaminom D (Slika 32A; $p < 0.001$). S druge strane, naši rezultati pokazuju da vitamin D nije uticao na nivo proteina NCX1 u plazma membranskoj frakciji srca (Slika 32B), dok je nivo proteina SERCA2 u mikrozomalnoj frakciji značajno povećan (Slika 32C; $p < 0.05$).



Slika 32. Efekat tretmana vitaminom D na nivo proteina LTCC u ukupnom ćelijskom ekstraktu (A), nivo proteina NCX1 u plazma membranskoj frakciji (B) i nivo proteina SERCA2 u mikrozomalnoj frakciji (C) srca pacova. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi i rezultati kvantifikacije traka na imunoblotovima koji su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Nivo proteina LTCC normalizovan je na β -aktin (A). Nivo proteina NCX1 normalizovan je na sadržaj ukupnih proteina na membrani (B). Nivo proteina SERCA2 normalizovan je na kalneksin (C). Statistička značajnost razlika između grupa ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

Tretman vitaminom D doveo je do statistički značajnog smanjenja relativne ekspresije iRNK za RyR2 u srcu pacova (Slika 33; $p < 0.05$).



Slika 33. Efekat tretmana vitaminom D na relativnu ekspresiju iRNK za RyR2 (*Ryr2*) u srcu pacova. Relativna ekspresija iRNK određena je metodom RT-qPCR. Za normalizaciju rezultata kao endogena kontrola korišćena je iRNK za *Rpl19* koji kodira protein 60S subjedinice ribozoma. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ S.D. Statistička značajnost razlika između kontrolne i tretirane grupe ispitana je Studentovim t-testom (* $p < 0.05$). K: kontrola, VitD: vitamin D.

5. DISKUSIJA

Činjenica da je VDR eksprimiran u skoro svim tkivima ukazuje da vitamin D ne reguliše samo homeostazu Ca^{2+} , već i imunitet, rast i diferencijaciju ćelija, kao i energetske metabolizam (Carlberg, 2022). Epidemiološke studije su pokazale vezu između niskog nivoa vitamina D u cirkulaciji i spektra KVB, naročito hipertenzije, ateroskleroze i srčane insuficijencije (Latic & Erben, 2020). Osim toga, nedostatak vitamina D je povezan i sa metaboličkim bolestima (Park et al., 2018; Pittas et al., 2007), poput dijabetesa, insulinske rezistencije i gojaznosti, a koje su udružene ili prethode kardiovaskularnim poremećajima. Iako epidemiološke studije dosledno pokazuju povezanost između niskog nivoa vitamina D u cirkulaciji i većeg rizika od kardiovaskularnih poremećaja i mortaliteta (Marquina et al., 2019), kliničke studije nisu uspele da dokažu da suplementacija vitaminom D može smanjiti rizik od KVB (Bouillon et al., 2022). Ove nedoslednosti mogu biti posledica heterogenosti studija (dizajn studije, veličina uzorka, kliničke karakteristike pacijenata, doza i trajanje suplementacije) ali takođe mogu ukazivati i na činjenicu da je suplementacija vitaminom D neophodna, ali nije dovoljna da bi se smanjio rizik od KVB (Trimarco et al., 2022). Očekivanja da primena vitamina D ima efekata u lečenju kardiometaboličkih bolesti su velika (Marquina et al., 2019). Nasuprot tome, informacije o fiziološkoj ulozi vitamina D u srcu su nepotpune i literatura obiluje kontroverznim podacima na ovu temu. Rezultati studija variraju od toga da se VDR ne može detektovati u ćelijama miokarda (Wang & DeLuca, 2011) do otkrića enzima koji učestvuju u metabolizmu vitamina D u ovim ćelijama, što ukazuje da aktivni oblik vitamina D može nastati i lokalno u srcu (Chanakul et al., 2013). Uprkos predloženim mehanizmima delovanja vitamina D u srcu, korisni efekti na kardiovaskularno zdravlje su i dalje diskutabilni (Gardner et al., 2013).

U literaturi postoji veliki broj animalnih studija koje ispituju efekat suplementacije vitaminom D kod različitih kardiometaboličkih poremećaja (Alrefaie et al., 2022; Derakhshanian et al., 2019; Lee et al., 2014; Panizo et al., 2013; Philouze et al., 2022), dok se ova studija fokusirala na izučavanje efekata vitamina D na metaboličke procese u zdravom srcu.

5.1. Efekti vitamina D na biohemijske parametre pacova

Koncentracija Ca^{2+} i fosfora u plazmi pacova nije se značajno promenila nakon tretmana holekalciferolom (Tabela 5), što ukazuje da efekti vitamina D na analizirane procese u srcu ne mogu biti posledica narušene mineralne homeostaze kod tretiranih životinja. U ovoj studiji je svakog drugog dana primenjivana doza holekalciferola od 12.5 $\mu\text{g/kg}$, i ona nije dovela do hiperkalcemije i kalcifikacije mekih tkiva kod pacova (Salum et al., 2012).

Tretman holekalciferolom je smanjio nivo NEFA u plazmi životinja, dok su ostali parametri lipidnog profila ostali nepromenjeni (Tabela 5). U studiji Oczkowicz i saradnika, lipidni profil zdravih pacova oba pola nije se promenio nakon 12 nedelja tretmana vitaminom D (Oczkowicz et al., 2021), što delimično potvrđuje rezultate naše studije. Smanjenje nivoa NEFA može biti posledica efekta vitamina D na nivou masnog tkiva jer je pokazano da vitamin D stimuliše lipogenezu i inhibira lipolizu (Shi et al., 2001; Wong et al., 2011). Studije u kojima je efekat vitamina D ispitivan kod životinja koje imaju izmenjen lipidni profil usled različitih intervencija, pokazuju da vitamin D blagotvorno utiče na lipidne parametre vraćajući ih u okvir kontrolnih vrednosti (Babaei et al., 2015; Moharir et al., 2022; Mostafa et al., 2016). Opservacione studije su pokazale da je nedostatak vitamina D kod ljudi povezan sa povećanom koncentracijom ukupnog HL, LDL i TAG u cirkulaciji. Međutim, interventne studije kod ljudi sa nedostatkom vitamina D nisu uspele da potvrde pozitivan efekat suplementacije vitaminom D na poboljšanje lipidnog profila (Challoumas, 2014). Visoka koncentracija NEFA u cirkulaciji povećava preuzimanje masnih kiselina i β -oksidaciju u kardiomiocitima što može biti štetno za srce (Pilz & März, 2008) i

povezano je sa mortalitetom od KVB (Xiong et al., 2015), zbog čega bi uočeni efekat holekalciferola na smanjenje NEFA u cirkulaciji u našoj studiji mogao biti kardioprotektivan. Pored toga, nivo masnih kiselina i njihov sastav mogu uticati i na odgovor ćelija na dejstvo insulina (Sears & Perry, 2015).

Literaturni podaci ukazuju da vitamin D može uticati na glukoznu homeostazu s obzirom da β -ćelije pankreasa eksprimiraju VDR i 1α -hidroksilazu (Alvarez & Ashraf, 2010). Takođe, sekrecija insulina je Ca^{2+} -zavisan proces, te vitamin D zbog svoje primarne uloge u homeostazi ovog jona može i indirektno uticati na sekretornu funkciju β -ćelija (Pittas et al., 2007). Kod pacova u našoj studiji nivo insulina u plazmi nije se značajno promenio nakon tretmana holekalciferolom, iako je postojala tendencija smanjenja (Tabela 5). Prethodne studije sugerišu da vitamin D ne utiče na bazalno oslobađanje insulina već da isključivo utiče na oslobađanje insulina u odgovoru na stimulaciju glukozom (Pittas et al., 2007). Studija Bornstedt i saradnika je pokazala da ćelije pankreasa, prethodno inkubirane sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ luče više insulina nakon stimulacije visokom dozom glukoze (22 mM) u odnosu na ćelije koje nisu tretirane vitaminom D, dok u odsustvu glukoze promene u sekreciji insulina između tretiranih i kontrolnih ćelija nisu primećene (Bornstedt et al., 2019). U skladu sa tim, nepromenjen nivo insulina u našoj studiji mogao bi biti posledica nepromenjenog nivoa glukoze u cirkulaciji (Tabela 5).

Animalne studije u kojima su ispitivani efekti vitamina D na homeostazu glukoze kod modela insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma, uglavnom ukazuju na pozitivan efekat suplementacije vitaminom D na parametre poput glikemije i HOMA (engl. *Homeostasis Model Assessment*) indeksa (Benetti et al., 2018; Derakhshanian et al., 2019; Hoseini et al., 2017; Mazzone et al., 2018). U studiji Mutt i saradnika u kojoj je nedostatak vitamina D doveo do nastanka insulinske rezistencije, suplementacija vitaminom D ostvarila je pozitivan efekat na insulinsku senzitivnost i HOMA indeks kod miševa na kontrolnoj ishrani, dok je kod miševa na ishrani bogatoj mastima i šećerima koristan efekat suplementacije vitaminom D izostao (Mutt et al., 2020). U studiji Mendes i saradnika kod pacova sa insulinskom rezistencijom, petodnevni tretman sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ doveo je do smanjenja glikemije dok razlike u glikemijskom profilu nisu uočene kod zdravih životinja pod tretmanom (Mendes et al., 2022). Navedeni rezultat se može uporediti sa rezultatima naše studije koja je takođe pokazala da se insulinska osetljivost zdravih životinja (Slika 4), merena IPGTT nije značajno promenila nakon tretmana holekalciferolom.

Na osnovu analize biohemijskih parametara moglo bi se zaključiti da suplementacija holekalciferolom u datoj dozi i režimu ne remeti homeostazu minerala u cirkulaciji i ne utiče na glikemiju i lučenje insulina kod zdravih pacova. Smanjenje koncentracije NEFA u cirkulaciji uočeno u našoj studiji moglo bi biti kardioprotektivno.

5.2. Efekti vitamina D na fizičke karakteristike pacova

Tretman holekalciferolom nije uticao na telesnu masu pacova (Tabela 4). Prema literaturi, suplementacija vitaminom D može imati blagotvorno dejstvo na regulaciju telesne mase prevashodno u uslovima prekomernog energetskeg unosa. Studija Cordeiro i saradnika je pokazala da suplementacija vitaminom D ne dovodi do promene u telesnoj masi kod životinja na standardnoj ishrani, dok je kod životinja koje su osim standardne hrane konzumirale i industrijski procesovanu hranu i gazirana pića, primećeno oko 34% manje povećanje telesne mase tokom perioda suplementacije (Cordeiro et al., 2021). Takođe, kod mišjeg animalnog modela gojaznosti koja je izazvana HFD, administracija vitamina D dovela je do smanjenja telesne mase i do smanjenja prirasta telesne mase, ali su ovi parametri i dalje bili statistički značajno veći u poređenju sa kontrolnim životinjama (Gomaa & El-Aziz, 2017). U našoj studiji pacovi su konzumirali standardnu hranu koja im je bila dostupna *ad libitum*, stoga je izostanak efekta tretmana na telesnu

masu u skladu sa literaturnim podacima. U našoj studiji nije došlo ni do značajnih promena relativne i apsolutne mase srca (Tabela 4), što je u skladu sa nepostojanjem promena na nivou ekspresije ERK1/2 molekula (Slika 12), koji je ključni efektor mitogenog signalnog puta u srcu, uključen u proces hipertrofije. Pokazano je da aktivirani VDR poseduje direktnu antihipertrofičnu aktivnost u srcu (Chen et al., 2011). Osim toga, vitamin D može igrati važnu ulogu u smanjenju hipertrofije leve komore kroz modulaciju RAAS (Carrara et al., 2014; Zhou et al., 2008a). Iako je antihipertrofično delovanje vitamina D uglavnom pokazano u animalnim modelima hipertrofije (Panizo et al., 2013; Zhang et al., 2018), jedna studija čak izveštava o blagom smanjenju relativne mase srca kod zdravih ženki pacova nakon suplementacije vitaminom D u visokoj dozi, dok isti efekat nije zabeležen kod mužjaka (Oczkowicz et al., 2021).

Iz navedenih rezultata zaključujemo da hronična suplementacija holekalciferolom kod zdravih pacova ne dovodi do promena u ukupnoj telesnoj masi i masi srca.

5.3. Efekti vitamina D na VDR i enzime uključene u metabolizam vitamina D

Ekspresija *Vdr* regulisana je PTH, retinoičnom kiselinom, glukokortikoidima i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Pike & Meyer, 2012). Pokazano je da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ povećava ekspresiju *Vdr* u ćelijama kostiju, bubrega i creva, mehanizmima koji su tkivno specifični (Lee et al., 2015). Tretman holekalciferolom u našoj studiji nije uticao na ekspresiju *Vdr* u srcu pacova (Slika 6). Neke studije na miševima su takođe pokazale da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nije imao uticaja na ekspresiju *Vdr* u srcu (Wang et al., 2012), dok su druge pokazale da je ekspresija *Vdr* povećana nakon tretmana sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Yang et al., 2021). Slično rezultatima naše studije, rezultati studije Oczkowicz i saradnika su pokazali da tretman vitaminom D u tri različite doze ne dovodi do promene ekspresije *Vdr* u jetri, bubrezima, mozgu i masnom tkivu pacova (Oczkowicz et al., 2021). Povećanje ekspresije transkriptata *Vdr* uočeno u crevima pacova nije se moglo detektovati 24h nakon administracije $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Strom et al., 1989), na osnovu čega se može zaključiti da osim tkivno-specifičnih razlika, rezultati mogu odstupati i u zavisnosti od dizajna studije. Kako je u našoj studiji žrtvovanje životinja i uzorkovanje sprovedeno 24h nakon poslednje aplikacije holekalciferola kako bi se izbegli akutni efekti tretmana, i dalje postoji mogućnost da holekalciferol akutno može uticati na ekspresiju *Vdr* u srcu, što je potrebno dodatno ispitati jer relevantni literaturni podaci o tome ne postoje. Uprkos nepromenjenoj ekspresiji iRNK za VDR, analiza ekspresije proteina u ovoj studiji je pokazala smanjenje nivoa VDR u citosolnoj frakciji (Slika 5A) uz istovremeno povećanje nivoa proteina u jedarnoj frakciji (Slika 5B). Uočena redistribucija VDR iz citosola u jedro implicira da efekti vitamina D na analizirane srčane procese mogu biti posledica direktnog delovanja vitamina D u srcu. Studija Tishkoff i saradnika je pokazala da se u kardiomiocitima miševa i pacova VDR translocira u jedro nakon tretmana sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Tishkoff et al., 2008), što podržava rezultate dobijene u našoj studiji. U ćelijama poput enterocita, gde je uloga vitamina D najviše izučavana, proces redistribucije VDR iz citoplazme u jedro nakon vezivanja liganda je takođe potvrđen (Klopot et al., 2007).

Za razliku od VDR, enzim koji je uključen u metabolizam vitamina D, 1α -hidroksilaza, nije detektovan u srcu ispitivanih životinja što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima (Zehnder et al., 2001). Međutim, postoje studije u kojima je dokumentovana ekspresija ovog enzima u srcu na nivou iRNK (Chanakul et al., 2013), kao i na nivou proteina (Chen et al., 2008).

Gore navedeni rezultati sugerišu da vitamin D ostvaruje direktne efekte u srcu, aktivacijom VDR koji se redistribuira iz citosolne u jedarnu frakciju. Odsustvo detekcije 1α -hidroksilaze u srcu sugeriše da aktivna forma vitamina D ne nastaje u srcu.

5.4. Efekti vitamina D na molekule insulinskog signalnog puta u srcu pacova

Insulin deluje direktno na srce posredstvom signalnog puta PKB/Akt (Iliadis et al., 2011). Stimulacijom ulaska glukoze koja postaje primarni izvor energije u ćelijama srca, insulin smanjuje potrošnju O_2 u miokardu i poboljšava srčanu efikasnost (Iliadis et al., 2011). Insulinska rezistencija, koja se definiše kao eksperimentalno ili kliničko stanje u kojem insulin ispoljava biološki efekat manji od očekivanog, je jedan od komorbiditeta koji se često povezuje sa KVB (Ormazabal et al., 2018). Insulinska rezistencija u srcu dovodi do poremećaja u insulinskom signalnom putu i preuzimanju glukoze, kao i do smanjenog oksidativnog kapaciteta mitohondrija (Abel, 2021). Animalne studije sugerišu da vitamin D ima uticaja na insulinski signalni put u skeletnim mišićima, masnom tkivu i jetri (Antinozzi et al., 2017; Gomes Castro et al., 2014; Mutt et al., 2020; Parker et al., 2016), dok su studije koje ispituju efekte u srcu veoma retke (Nizami et al., 2019). Pored toga što su retke, studije o efektima vitamina D u srcu uglavnom su sprovedene u patološkim uslovima, što otežava definisanje uloge vitamina D u fiziologiji srca, kao i definisanje mehanizama kojima se eventualni efekti postižu.

U našoj studiji, tretman holekalciferolom nije uticao na nivo proteina IR u srcu pacova (Slika 7). Pokazano je da kod ljudi promotor gena za IR sadrži VDREs (Maestro et al., 2003), kao i da $1,25(OH)_2D_3$ povećava ekspresiju IR na nivou proteina i iRNK u humanim promonocitnim ćelijama (Leal et al., 1995; Maestro et al., 2000). George i saradnici su pokazali da suplementacija vitaminom D povećava ekspresiju IR u jetri dijabetičnih pacova (George et al., 2012b). Sa druge strane, nekoliko studija je pokazalo odsustvo efekata suplementacije vitaminom D na ekspresiju IR u jetri dijabetičnih pacova (Calle et al., 2008) i jetri miševa na dijeti sa niskim ali i sa visokim sadržajem masti (Alkharfy et al., 2013). Studija na ćelijama jetre zebrice (*Danio rerio*) pokazala je da $1,25(OH)_2D_3$ statistički značajno povećava ekspresiju IR tipa A u uslovima visoke koncentracije glukoze, dok se ovi efekti nisu ispoljili u uslovima normoglikemije (Shao et al., 2022). Takođe, studija Calle i saradnika je pokazala da vitamin D ne utiče na ekspresiju gena za IR u bubrezima, jetri i adipoznom tkivu kod zdravih pacova (Calle et al., 2008). U istoj studiji, kod pacova kod kojih je dijabetes izazvan streptozotocinom, vitamin D je ostvario delimično pozitivan efekat na ekspresiju gena za IR u jetri i adipoznom tkivu, dok su u bubrezima izostali efekti i vitamina D i streptozotocina (Calle et al., 2008). Ovakvi podaci ukazuju da efekat vitamina D na ekspresiju IR može biti tkivno-specifičan i da u velikoj meri zavisi i od prisustva/odsustva patološkog stanja.

Nizvodno od IR dalje širenje insulinskog signala u ćeliju odvija se preko IRS proteina. Fosforilacije IRS-1 molekula su ključne tačke u insulinskom signalnom putu, pri čemu je kinazna aktivnost IR odgovorna za fosforilaciju Tyr ostatka IRS-1 proteina i posledično formiranje mesta za interakciju sa odgovarajućim nizvodnim efektorima (Taniguchi et al., 2006). U našoj studiji tretman holekalciferolom nije uticao na ukupan nivo IRS-1 proteina (Slika 8A) i na stepen insulinom stimulisane fosforilacije IRS-1 na Tyr⁶³² u srcu pacova (Slika 8B).

PTP defosfosforilišu tirozinske ostatke IR i IRS-1/2 proteina u roku od nekoliko minuta od insulinske stimulacije kako bi se insulinski signalni put inaktivirao (Tiganis, 2013). Jedna od PTP uključenih u negativnu regulaciju delovanja insulina je PTP1B. Ptp1n-*knock-out* miševi ispoljavaju povećanu osetljivost na insulin koja je povezana sa povećanom aktivacijom IR i nizvodnom fosforilacijom IRS-1 na Tyr ostacima u jetri i skeletnim mišićima (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000). U našoj studiji nije došlo do promene ukupnog nivoa PTP1B (Slika 9) što je u skladu sa nepromenjenim nivoom insulin-zavisne fosforilacije IRS-1 na Tyr⁶³². Literaturni podaci o efektu vitamina D na ekspresiju PTP1B u srcu ne postoje, dok studije na drugim tkivima pokazuju različite rezultate. Tako je tretman vitaminom D kod animalnog modela T2DM, smanjio ekspresiju gena i proteina PTP1B u jetri, na nivoe detektovane kod kontrolnih životinja (Yang et al., 2016), dok tretman vitaminom D nije imao uticaja na ekspresiju proteina PTP1B ni u jetri ni u masnom tkivu kod mišjeg modela Alchajmerove bolesti za koji su karakteristični višestruki metabolički poremećaji povezani sa starenjem (Rui et al., 2017).

Fosforilacije Ser/Thr ostataka IRS-1 proteina su ključni događaji u regulaciji insulinske signalizacije mehanizmom negativne povratne sprege i dovode do disocijacije IRS-1 proteina od IR, čime sprečavaju dalju fosforilaciju Tyr ostataka i inhibiraju interakciju sa nizvodnim efektorima (Boura-Halfon & Zick, 2009). Za razliku od nepromenjenog stepena fosforilacije IRS-1 na Tyr⁶³² u našoj studiji, stepen fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ je smanjen nakon tretmana holekalciferolom (Slika 8B). U studiji Benetti i saradnika uočeno je da ishrana bogata mastima i šećerima dovodi do značajnog povećanja stepena fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ u skeletnim mišićima pacova, a da je tretman vitaminom D uspešno smanjio stepen ove fosforilacije (Benetti et al., 2018). Slični rezultati dobijeni su i u kulturi ćelija skeletnih mišića u kojima je insulinska rezistencija, izazvana inkubacijom ćelija sa masnim kiselinama, dovela do povećanja stepena fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ i smanjenja stepena fosforilacije IRS-1 na Tyr⁶³², dok je tretman vitaminom D ublažio ove promene (Zhou et al., 2008b). U uslovima insulinske rezistencije najčešće uočena promena oglada se u povećanju nivoa inhibitorne fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷, stoga bi detektovano smanjenje stepena ove fosforilacije nakon tretmana vitaminom D u našoj studiji moglo da se protumači kao pozitivan efekat na prenos insulinskog signala u srcu.

Jedan od mehanizama koji bi mogao da bude u osnovi uočene promene na stepen fosforilacije IRS-1 je aktivacija S6K1 koja direktno fosforiliše IRS-1 na Ser³⁰⁷ *in vitro* (Harrington et al., 2004). Takođe, pokazano je da vitamin D-VDR kompleks defosforiliše/inaktivira S6K kroz aktivaciju fosfataza PP1c/PP2Ac *in vitro* (Bettoun et al., 2002). Rezultat naše studije, da holekalciferol nije promenio stepen fosforilacije S6K na Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ (Slika 10B), ukazuje da smanjeni nivo fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷, nije posredovan promenom aktivnosti S6K1 pod dejstvom vitamina D. S druge strane, proinflamatorni citokini i masne kiseline takođe mogu aktivirati druge Ser/Thr kinaze, poput PKC ζ i JNK, koje mogu negativno da utiču na insulinsku signalnu transdukciju (Zick, 2005). Inhibitorni efekti JNK na prenos insulinskog signala mogu se, bar delimično, pripisati njegovoj sposobnosti da fosforiliše IRS-1 na Ser³⁰⁷ (Zick, 2005). Pokazano je da predtretman vitaminom D inhibira aktivaciju JNK izazvanu stresom u ćelijama keratinocita (Ravid et al., 2002), a slični rezultati dobijeni su i u kulturi ćelija skeletnih mišića, gde je pokazano da tretman vitaminom D značajno smanjuje aktivaciju JNK stimulisanu povećanom koncentracijom masnih kiselina (Zhou et al., 2008b). Ovi rezultati impliciraju da bi i u srcu vitamin D mogao da deluje na stepen fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ kroz modulaciju aktivnosti JNK, što je neophodno dodatno ispitati.

Ukupan nivo Akt proteina, kao i stepen insulinom stimulisane fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ ostao je nepromenjen (Slika 11A i 11B), dok je stepen insulinom stimulisane fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ povećan nakon tretmana holekalciferolom (Slika 11B). Kod mišjeg modela Alchajmerove bolesti i kod vitamin D-deficijentnih miševa, suplementacija vitaminom D dovela je do povećanja stepena fosforilacije Akt na Ser⁴⁷³ u jetri, ali slično rezultatima naše studije u srcu, nije bilo efekta na stepen ove fosforilacije u masnom tkivu (Mutt et al., 2020; Rui et al., 2017). S obzirom da na proučavane fosforilacije Akt utiču dve različite kinaze (Huang et al., 2018; Manning & Toker, 2017), moglo bi se spekulisati da vitamin D ostvaruje svoj efekat preko PDK1.

ERK1/2 enzimi predstavljaju deo signalne kaskade MAPK koja indukuje reprogramiranje ekspresije gena i na taj način stimulišu ćelijski rast, proliferaciju, diferencijaciju i anti-apoptotičke efekte (Lorenz et al., 2009). U kardiomiocitima ovi proteini imaju jasnu ulogu u hipertrofiji i remodeliranju kardiomiocita (Gallo et al., 2019; Gilbert et al., 2021). U našoj studiji, tretman holekalciferolom nije promenio ukupan nivo ERK1/2 i stepen insulinom stimulisane fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (Slika 12A i 12B). Literaturni podaci ukazuju da vitamin D ispoljava antihipertrofično dejstvo. Nizami i saradnici su pokazali da kod pacova sa nedostatkom vitamina D dolazi do razvoja hipertrofije u srcu i indukcije fetalnog programa gena, što je praćeno povećanim nivoom fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (Nizami et al., 2019). U studiji na pacovima sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom koja je praćena hipertrofijom leve komore, tretman agonistima VDR smanjio je stepen fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (Panizo et al., 2013).

Takođe, u studiji na miševima kod kojih je hipertrofija zida leve komore srca uzrokovana hroničnom hipertenzijom, tretman vitaminom D je smanjio nivo fosforilacije ERK1/2 na Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, u odnosu na mišve sa hipertrofijom koji nisu tretirani vitaminom D (Zhang et al., 2018). Za razliku od navedenih studija u kojima je vitamin D smanjio aktivnost ERK1/2 u uslovima hipertrofije, rezultati naše studije ukazuju da vitamin D ne utiče na insulinom stimulisan ERK1/2 mitogeni put u srcu u fiziološkim uslovima.

Tretman holekalciferolom je ostvario selektivan efekat na nivou ključnih insulinom-indukovanih fosforilacija molekula u metaboličkom signalnom putu insulina. Smanjen stepen fosforilacije IRS-1 na Ser³⁰⁷ i povećan stepen fosforilacije Akt na Thr³⁰⁸ ukazuju na pozitivan efekat vitamina D na insulinsku osetljivost u srcu. Sa druge strane, naši rezultati sugerisu da vitamin D ne utiče na mitogeni signalni put insulina u fiziološkim uslovima.

5.5. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam glukoze u srcu pacova

Koncentracija glukoze u krvi održava se u uskom opsegu, zbog čega glukoza predstavlja najpouzdaniji izvor za proizvodnju energije. Važnost metabolizma glukoze putem glikolize izražena je u uslovima ishemije i hipertrofije srca, dok je uloga aerobnog metabolizma glukoze za podršku normalnoj kontraktilnoj funkciji manje izučavana, uglavnom zbog dobro poznate činjenice da su masne kiseline dominantno gorivo za proizvodnju energije u srcu (Depre et al., 1999). Transport glukoze u kardiomiocitima je regulisan transmembranskim gradijentom koncentracije glukoze i sadržajem glukoznih transportera u plazma membrani kardiomiocita. Stimulacija insulinom, povećan stepen kontrakcije ili ishemija su važni faktori koji povećavaju sadržaj glukoznih transportera u plazma membrani kardiomiocita, čime se povećava kapacitet za transport i preuzimanje glukoze unutar ćelije (Stanley et al., 2005).

U kulturi ćelija kardiomiocita kod kojih je ekspresija VDR smanjena korišćenjem shRNA smanjenjeno je insulinom stimulirano preuzimanje glukoze i translokacija GLUT4 što ukazuje na važnu ulogu VDR u regulaciji insulinske senzitivnosti miokarda (Nizami et al., 2019). Tretman holekalciferolom u našoj studiji je praćen tendencijom povećanja ukupnog nivoa GLUT4 proteina u srcu, iako ova promena nije bila statistički značajna (Slika 13A). Na nivou ekspresije GLUT1 i GLUT4 u plazma membrani nisu uočene promene nakon tretmana vitaminom D u uslovima insulinske stimulacije (Slika 13B). Osim naše i studije Nizami i saradnika, nema drugih studija koje su se bavile efektima vitamina D na izoforme GLUT u srcu, stoga relevantni literaturni podaci proističu iz studija na drugim ciljnim tkivima insulina. Tretman 1,25(OH)₂D₃ ne utiče na nivo GLUT4 i transport glukoze u 3T3L1 adipocitima (Manna & Jain, 2012), dok je u ćelijama skeletnih mišića primećen pozitivan efekat različitih VDR agonista na ukupan nivo i translokaciju GLUT4, kao i na preuzimanje glukoze (Antinozzi et al., 2017; Gomes Castro et al., 2014). Takođe, Gomes Castro i saradnici su pokazali da stimulacija preuzimanja glukoze u *m. soleus* pacova zahteva aktivnost 1,25(OH)₂D₃ u jedru (Gomes Castro et al., 2014). Studija na ćelijama skeletnih mišića, pokazala je da tretman 1,25(OH)₂D₃ u uslovima visoke koncentracije glukoze dovodi do povećane ekspresije GLUT4, dok je efekat izostao u uslovima optimalne koncentracije glukoze (Manna et al., 2018). U skladu sa tim, nepromenjena koncentracija glukoze u cirkulaciji nakon tretmana holekalciferolom u našoj studiji (Tabela 5) mogla bi biti povezana sa izostankom efekta holekalciferola na nivo i translokaciju GLUT4 u srcu. U kardiomiocitima, transport glukoze u bazalnim uslovima odvija se uglavnom preko GLUT1 (Kraegen et al., 1993), pri čemu se pojačan transport posredovan GLUT1 povezuje sa aktivacijom AMPK (Abbud et al., 2000; Barnes et al., 2002; Wu et al., 2013). U uslovima ćelijskog energetskeg stresa aktivacija AMPK povećava i translokaciju GLUT4 na plazma membranu kardiomiocita (Coven et al., 2003; Horie et al., 2008; Li et al., 2004), što predstavlja kardioprotektivni i adaptivni odgovor (Li et al., 2019). Nakon tretmana

holekalciferolom u našoj studiji nisu uočene promene u ekspresiji *Ampk* (Slika 24), što je u skladu sa prethodno navedenim rezultatima nepromenjenog nivoa GLUT1 i GLUT4 u plazma membrani (Slika 13B).

Insulin aktivira PFK2 u srcu kroz dve serinske fosforilacije (Ser⁴⁶⁶, Ser⁴⁸³) (Bertrand et al., 1999). U našoj studiji stepen fosforilacije PFK2 na Ser⁴⁶⁶ je ostao nepromenjen nakon tretmana holekalciferolom u insulinom stimulisanim uslovima (Slika 14B). Alternativno, fosforilaciju PFK2 na Ser⁴⁶⁶ vrši i AMPK čime stimuliše njenu aktivnost (Li et al., 2019; Marsin et al., 2000). Nepromenjen nivo ekspresije *Ampk* u našoj studiji (Slika 23) je u skladu sa nepromenjenim stepenom fosforilacije PFK2 na Ser⁴⁶⁶. Iako nismo detektovali povećanje nivoa aktivirajuće fosforilacije PFK2, tretman holekalciferolom u našoj studiji doveo je do povećanja ukupnog nivoa PFK2 (Slika 14A) i povećanja nivoa ekspresije *Hk2* (Slika 15). Rezultat naše studije da holekalciferol povećava ekspresiju *Hk2* u srcu je vrlo značajan jer je pokazano da smanjenje proteinskog nivoa HK2 dovodi do smanjene srčane funkcije i izmenjenog remodeliranja nakon ishemijske i reperfuzije (Wu et al., 2011). U skladu sa našim rezultatima, Santos i saradnici su pokazali da suplementacija vitaminom D povećava aktivnost glikolitičkih enzima PFK i laktat dehidrogenaze u srcu zdravih pacova (Santos et al., 2021). Takođe, u studiji koja koristi model nedostatka vitamina D, smanjena ekspresija gena glikolitičkih enzima HK i PFK u skeletnim mišićima pacova vraćena je na kontrolne vrednosti nakon prebacivanja životinja na ishranu koja je sadržala 2000 IU vitamina D /kg hrane (Gogulothu et al., 2020). Pozitivan efekat suplementacije vitaminom D na aktivnost enzima uključenih u procese glikolize i glukoneogeneze uočen je i u jetri dijabetičnih miševa kod kojih je postojalo smanjenje aktivnosti glikolitičkih enzima i povećanje aktivnosti enzima uključenih u glukoneogenezu (Meerza et al., 2012). Naši rezultati bi mogli ukazivati da vitamin D ostvaruje efekat u procesu glikolize na nivou transkripcione regulacije HK2 i regulacije proteinske ekspresije PFK2.

Nakon glikolize, nastali piruvat podleže oksidaciji delovanjem PDH. Insulin kontroliše PDH suprimirajući ekspresiju i aktivnost PDK4. Insulin inhibira ekspresiju PDK4 posredstvom PI3K/Akt puta. Aktivirani Akt fosforiliše FoxO transkripcione faktore koji se translociraju iz jedra u citoplazmu što onemogućava ekspresiju *Pdk4* (Kwon & Harris, 2004; Roche & Hiromasa, 2007). U našoj studiji vitamin D je smanjio nivo FoxO1 u ukupnom ćelijskom ekstraktu srca (Slika 17), što je u skladu sa nedavno dobijenim rezultatima koji pokazuju da vitamin D negativno reguliše ekspresiju FoxO1 u ćelijama srca (Guo et al., 2020) i skeletnih mišića (Chen et al., 2016b). Ovakav rezultat mogao bi biti direktna posledica povećane fosforilacije Akt (Slika 11), koja vodi povećanoj fosforilaciji FoxO1 i njegovom izlasku iz jedra, nakon čega podleže degradaciji u citosolu (Puthanveetil et al., 2013). Isti efekat suplementacije vitaminom D već je primećen u jetri miševa (Mutt et al., 2020). Međutim, naša studija pokazuje da na nivou unutarćelijske distribucije proteina FoxO1, tretman vitaminom D u uslovima insulinske stimulacije, dovodi do smanjenja nivoa ovog proteina isključivo u citosolnoj frakciji (Slika 18A), dok se promena nivoa u jedarnoj frakciji ne događa (Slika 18B). Studija Chen i saradnika pokazala je da je efekat vitamina D na translokaciju FoxO1 molekula iz jedra dozno-zavisan (Chen et al., 2016b), što može poslužiti i za objašnjenje naših rezultata. Ovakav profil promene ukazuje da vitamin D u našoj studiji reguliše nivo FoxO1 proteina u srcu na transkripcionom nivou, bez uticaja na aktivnost molekula u jedru. Tretman holekalciferolom nije doveo do promene u ekspresiji *Pdk4* (Slika 16), što je u skladu sa nepromenjenim nivoom ekspresije FoxO1 u jedarnoj frakciji (Slika 18B). Odsustvo promena u ekspresiji *Pdk4* se poklapa i sa nepromenjenim nivoom GLUT4 i GLUT1 na plazma membrani (Slika 13B), uzimajući u obzir literaturu koja sugerise da nivo PDK4 obrnuto korelira ne samo sa stepenom oksidacije glukoze već i stepenom preuzimanja glukoze u srcu (Li et al., 2017).

Tretman holekalciferolom u našoj studiji doveo je do povećanja nivoa insulinom stimulisane fosforilacije GSK-3 β na Ser⁹ (Slika 19B). Prema literaturnim podacima povećana fosforilacija GSK3 na Ser⁹ je ključna za insulinsku aktivaciju GS u srcu (Mora et al., 2005). Inhibicija aktivnosti GSK3 u izolovanom perfundovanom srcu pacova dovodi do povećane sinteze glikogena (Omar et

al., 2010). Osim toga, u ovoj studiji je otkriveno i povećanje ekspresije *Hk2* koja proizvodi glukozo 6-fosfat koji je alosterički stimulator GS. To takođe može ukazati na povećanu sintezu glikogena (Bouskila et al., 2010; McManus et al., 2005). Podaci o efektima vitamina D na sintezu glikogena u srcu ne postoje, ali je pokazano da tretman vitaminom D povećava sadržaj glikogena u jetri dijabetičnih pacova (George et al., 2012b). Takođe, suplementacija vitaminom D uticala je na povećanje sadržaja glikogena i fosforilacije GSK3 na Ser⁹ u jetri vitamin D-deficijentnih miševa (Mutt et al., 2020). GSK-3 β učestvuje u većem broju ćelijskih funkcija (Patel & Woodgett, 2017), što ukazuje da uočeno povećanje inhibitorne fosforilacije GSK-3 β pod delovanjem vitamina D u uslovima insulinske stimulacije, može da ima uticaja i na druge signalne puteve koji nisu povezani sa sintezom glikogena.

Tretman holekalciferolom nije uticao na nivo glukoznih transportera u plazma membranskoj frakciji srca u uslovima insulinske stimulacije što može ukazati na to da nije došlo do promena nivoa preuzimanja glukoze u srcu pacova. Međutim, povećana ekspresija *Hk2* ukazuje na stimulaciju glikolize, što potvrđuje i povećana ekspresija PFK2 molekula. Osim toga, HK2 stimuliše sintezu glikogena, što zajedno sa promenom na nivou GSK-3 β molekula može ukazati na pojačanu sintezu glikogena u srcu pod delovanjem vitamina D.

5.6. Efekti vitamina D na molekule uključene u transport i metabolizam masnih kiselina u srcu pacova

Regulacija upotrebe masnih kiselina kao izvora energije u srcu vrši se na različitim nivoima: od njihove dostupnosti u cirkulaciji, kroz transport preko sarkoplazmatične membrane i esterifikacije, do ulaska u mitohondrije i oksidacije (Oleinikov, 2019). Stopa preuzimanja masnih kiselina u srce je prvenstveno određena koncentracijom NEFA u plazmi (Stanley et al., 2005). Kod ljudi akutno smanjenje NEFA u cirkulaciji smanjuje preuzimanje masnih kiselina u ćelije srca za čak 80% (Tuunanen et al., 2006). Tretman holekalciferolom u našoj studiji je smanjio koncentraciju NEFA u cirkulaciji pacova, što bi moglo uticati na preuzimanje masnih kiselina u srcu kroz smanjenu dostupnost supstrata. Ipak, promene nivoa CD36 i FATP1, najvažnijih transportera masnih kiselina u plazma membrani ćelija srca, nisu uočene u uslovima insulinske stimulacije (Slika 20). Ovaj nalaz je u skladu sa studijom Yang i saradnika koji su takođe pokazali da se nivo CD36 transportera ne menja pod dejstvom vitamina D u srcu miševa na HFD, potvrđujući da vitamin D ne utiče direktno na transportere masnih kiselina u srcu (Yang et al., 2021). Povećan unos masnih kiselina je glavni faktor za indukciju ekspresije *Pdk4* (Jeon et al., 2021) koja se nije promenila nakon tretmana holekalciferolom u našoj studiji (Slika 16), što je u skladu sa odsustvom promena na nivou transportera. Međutim, bez obzira na to što je nivo transportera u plazma membranskoj frakciji ostao nepromenjen, ***smanjena koncentracija NEFA u cirkulaciji nakon tretmana vitaminom D mogla bi doprineti smanjenom preuzimanju masnih kiselina u srcu.***

U našoj studiji, ekspresija CPT-1 nije se promenila nakon tretmana holekalciferolom (Slika 21). Međutim, tretman je povećao ekspresiju ACC (Slika 22) i smanjio ekspresiju *Mlycd* (Slika 24). Kako je pokazano da inhibicija MCD dovodi do povećanja nivoa malonil-CoA u zdravom srcu (Wang et al., 2019), ***smanjena ekspresija *Mlycd* u našoj studiji mogla bi da ukazuje na povećanu sintezu malonil-CoA, koji alosterički inhibira aktivnost CPT-1.*** Prema našim saznanjima, efekti vitamina D na molekul CPT-1 u srcu zdravih životinja nisu do sada izučavani. Tretman vitaminom D smanjio je nivo CPT-1 u srcu dijabetičnih pacova (Lee et al., 2014) i miševa na HFD (Yang et al., 2021), kod kojih je nivo ovog proteina bio povećan. Studije na životinjama kod kojih je primenom specifičnog tipa ishrane izazvan poremećaj na nivou lipidnog metabolizma ukazuju da vitamin D ispoljava tkivno-specifične efekte (Marcotrichino et al., 2014; Park et al., 2016; Yin et al., 2012).

Dalje je ispitano kako tretman holekalciferolom utiče na ekspresiju molekula uključenih u transkripcionu regulaciju β -oksidacije. PPAR α -PGC1 α kompleks reguliše metabolički odgovor ćelije u uslovima povećane potrebe za korišćenjem masnih kiselina (Duncan & Finck, 2008). Povećan unos masnih kiselina u kardiomiocite, kao što je slučaj kod životinja sa dijabetesom, može dovesti do povećane signalizacije preko PPAR α (Bayeva et al., 2013). U našoj studiji, nivo PPAR α u jedru nije bio promenjen nakon tretmana holekalciferolom (Slika 26), dok je nivo PGC1 α u jedru bio povećan (Slika 25). Za razliku od naših rezultata u zdravom srcu, u studiji Lee i saradnika ekspresija PPAR α i PGC1 α u srcu dijabetičnih pacova je povećana, a tretman vitaminom D je uspešno ublažio ove promene (Lee et al., 2014). Lipin1 je ključni transkripcioni koaktivator koji deluje zajedno sa PPAR α i PGC1 α u indukciji gena za oksidaciju masnih kiselina u jetri (Finck et al., 2006). U srcu, lipin1 takođe utiče na metabolizam lipida (Chambers et al., 2021). Indukcija PGC1 α u zdravom srcu miša dovoljna je da izazove ekspresiju lipin1, što pokazuje da je lipin1 ciljni gen PGC1 α *in vivo* (Mitra et al., 2011). U našoj studiji, ekspresija lipin1 u jedru ostala je nepromenjena nakon tretmana holekalciferolom (Slika 27). S obzirom da nismo detektovali promene nivoa PPAR α i lipin1, postoji mogućnost da uočena promena nivoa PGC1 α u našoj studiji nije direktno povezana sa regulacijom β -oksidacije, već odslikava povezanost sa drugim procesima u srcu. Povećanje nivoa PGC1 α u jedru (Slika 25) bi moglo biti povezano sa povećanjem nivoa VDR u jedru (Slika 5B), s obzirom da su drugi autori pokazali da VDR formira kompleks sa PGC1 α i deluje kao njegov koaktivator u regulaciji ekspresije ciljnih gena (Savkur et al., 2005). U našoj studiji, holekalciferol nije uticao na ekspresiju *Acatl* (Slika 28), enzima koji katalizuje inicijalni korak u β -oksidaciji. Ovi rezultati, kao i prethodno navedeni rezultat neizmenjene ekspresije *Pdk4* (Slika 16), markera pojačane oksidacije masnih kiselina (Pettersen et al., 2019), ukazuju da ***u našoj studiji holekalciferol nije direktno uticao na proces oksidacije masnih kiselina u srcu zdravih pacova.***

Pored delovanja u jedru, sve izoforme lipina se kreću kroz citosol do membrana ER i mitohondrija gde imaju ulogu u sintezi prekursora TAG (Reue & Wang, 2019). TAG sintetisani/skladišteni u srcu doprinose proizvodnji ATP (Saddik & Lopaschuk, 1991), ali i obezbeđuju ligande koji aktiviraju PPAR α i stoga utiču na oksidaciju masnih kiselina. U skladu sa tim, nivo lipin1 određen je i u mikrozomalnoj frakciji srca gde takođe nisu detektovane promene (Slika 29). Ovaj rezultat ukazuje da ***tretman holekalciferolom nije uticao na proces sinteze TAG posredovane lipinom u srcu*** što je u skladu sa odsustvom promene u nivou PPAR α . U saglasnosti sa našim rezultatima su i rezultati studije Philouze i saradnika koji su pokazali da vitamina D ne ostvaruje efekat na sintezu TAG u srcu životinja kod kojih je izazvan T2DM (Philouze et al., 2022).

Smanjena ekspresija *Spt1* (Slika 30), enzima koji učestvuje u biosintezi ceramida, ukazuje na pozitivan efekat tretmana holekalciferolom na lipidni metabolizam u srcu. Utvrđeno je da je akumulacija ceramida povezana sa apoptozom u miokardu kod gojaznih Zucker pacova, kao i kod miševa sa povećanom ekspresijom PPAR γ ili dugolančane acil CoA sintetaze 1 u srcu (Chiu et al., 2001; Son et al., 2007; Zhou et al., 2000). Eksperimentalni tretmani koji dovode do smanjenja nivoa ceramida u srcu poboljšavaju srčanu funkciju kod gojaznih Zucker pacova i miševa sa povećanom ekspresijom lipoprotein lipaze u srcu (Park et al., 2008; Ussher et al., 2012). Philouze i saradnici su pokazali da je suplementacija holekalciferolom smanjila nivo ceramida i DAG u miokardu kod mišjeg modela T2DM (Philouze et al., 2022), što je u skladu sa rezultatima naše studije. Smanjena aktivnost SPT1 koja posledično ukazuje na smanjenu biosintezu ceramida u srcu može biti rezultat inhibicije aktivnosti MCD (Samokhvalov et al., 2012). U studiji Wang i saradnika, inhibicija aktivnosti MCD u srcu nakon ishemijske/reperfuzijske povrede takođe je praćena smanjenom ekspresijom SPT1 (Wang et al., 2019). Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima naše studije u kojoj je detektovano smanjenje ekspresije *Mlycd* istovremeno sa smanjenjem ekspresije *Spt1* (Slika 23 i 30). Ceramidi promoviraju insulinsku rezistenciju tako što aktiviraju kinazu koja fosforiliše i aktivira JNK koja potom fosforiliše IRS-1 na Ser³⁰⁷ i time onemogućava dalji prenos signala sa

aktiviranog IR ka PI3K (Kuzmenko & Klimentyeva, 2016). Osim ovog mehanizma, ceramidi deluju inhibitory i na nivou proteina Akt preko aktivacije PKC ζ (Powell et al., 2003) ili PP2A (Teruel et al., 2001). Utvrđeno je da smanjenje nivoa SPT1 u srcu gojaznih miševa sa insulinskom rezistencijom doprinosi poboljšanju insulinske osetljivosti miokarda i posledično korišćenju glukoze (Ussher et al., 2012). Ovakvi rezultati sugerisu da i u našoj studiji smanjenje ekspresije *Spt1* nakon tretmana vitaminom D doprinosi uočenom poboljšanju prenosa insulinskog signala u srcu.

Na osnovu svih rezultata vezanih za uticaj vitamina D na metabolizam masti u zdravom srcu možemo zaključiti da je vitamin D uticao na smanjenu dostupnost NEFA u cirkulaciji kao i na modulaciju aktivnosti CPT1 posredstvom alosteričke inhibicije od strane malonil-CoA, dok nije uticao na molekule uključene u proces β -oksidacije. Tretman holekalciferolom nije ostvario uticaj na sintezu TAG dok je smanjenjem ekspresije *Spt1* uticao na sintezu ceramida u zdravom srcu.

5.7. Efekti vitamina D na ekspresiju *Ucp3* u srcu pacova

Tretman holekalciferolom u našoj studiji doveo je do povećane ekspresije *Ucp3* u srcu pacova (Slika 31). Moguće je da vitamin D direktno reguliše ekspresiju *Ucp3* u srcu pacova, kao što je to pokazano u skeletnim mišićima miševa (Fan et al., 2016). Rezultati studija koje su analizirale ekspresiju *Ucp3* u srcu kao odgovor na HFD dosledno pokazuju povećanu ekspresiju u poređenju sa ekspresijom u srcu životinja na standardnoj ishrani (Alrefaie et al., 2022; Cole et al., 2011; Liu et al., 2014). Povećana ekspresija *Ucp3* kao odgovor na HFD se smatra korisnim odbrambenim mehanizmom za smanjenje proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika i zaštitu kardiomiocita od apoptoze (Bodyak et al., 2007). Zaista, poznato je da UCP proteini deluju tako da smanjuju proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika, oksidativni stres i lipotoksičnost, ali i povećavaju preživljavanje ćelija srca (Ruiz-Ramírez et al., 2016). Studija Alrefaie i saradnika pokazala je kardioprotektivne efekte vitamina D na markere apoptoze, oksidativnog stresa i inflamacije kod pacova na HFD, koji su povezani sa uticajem vitamina D na ekspresiju *Ucp3* (Alrefaie et al., 2022). Stoga se povećana ekspresija *Ucp3* kod pacova tretiranih holekalciferolom u našoj studiji takođe može tumačiti kao korisna za srce.

Pokazano je da postoji različit obrazac ekspresije UCP3 u srcu u zavisnosti od faze razvika, pri čemu se ekspresija UCP3 kod miševa detektuje tek nakon rođenja i ubrzo dostiže maksimalni nivo (Hilse et al., 2018). Ovo povećanje dovodi se u vezu sa povećanjem ekspresije markera β -oksidacije masnih kiselina, koja se dešava tek u danima nakon rođenja (Hilse et al., 2018). Pokazano je i da povećana koncentracija masnih kiselina stimuliše ekspresiju *Ucp3* aktivacijom PPAR α u skeletnim mišićima i srcu pacova (Brun et al., 1999; Young et al., 2001), što dodatno ukazuje na vezu između oksidacije masnih kiselina i UCP3. U odnosu na navedene podatke, povećana ekspresija *Ucp3* u našoj studiji nije u saglasnosti sa uočenim promenama u metabolizmu masnih kiselina zbog čega je teško dovesti ove promene u direktnu vezu. S druge strane, pokazano je da ekspresija *Ucp3* korelira sa aktivnošću Akt/GSK-3 β puta za preživljavanje (Chen et al., 2015b), za koji smo pokazali da je stimulisan u srcu pacova tretiranih holekalciferolom.

Tretman holekalciferolom doveo je do povećanja ekspresije *Ucp3* što bi moglo da se smatra kardioprotektivnim efektom zbog uloge ovog proteina u oksidativnoj zaštiti.

5.8. Efekti vitamina D na jonske kanale uključene u proces kontrakcije/relaksacije srca pacova

Kontraktilna aktivnost srca zahteva veliku potrošnju energije i preciznu regulaciju unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} . Ritmične kontrakcije i relaksacije kardiomiocita zahtevaju ciklične promene u unutarćelijskoj koncentraciji Ca^{2+} i regulišu se jonskim kanalima i izmenjivačima (Hamilton & Terentyev, 2018). Veliki deo ukupnog ATP proizvedenog u metaboličkim procesima troši se na kontrakciju srca (Bertero & Maack, 2018), pri čemu SERCA2 troši oko jedne trećine (Nagoshi et al., 2011). U našoj studiji, tretman holekalciferolom doveo je do povećanja ukupnog nivoa SERCA2 u mikrozomalnoj frakciji srca pacova (Slika 32C) što bi moglo da ukaže na povećan unos Ca^{2+} u SR tokom relaksacije miokarda. Vetter i saradnici su pokazali da povećana ekspresija i aktivnost SERCA2 u srcu dovodi do poboljšanja dijastole, ali indirektno i sistole, povećanjem količine Ca^{2+} u SR (Vetter et al., 2002). Pokazalo se i da povećana ekspresija SERCA2 u srcu poboljšava kontraktilnost miokarda kod dijabetičnih pacova i štiti od razvoja aritmija (Bayeva et al., 2013; Hamilton & Terentyev, 2018). U fiziološkim uslovima u kardiomiocitima PGC1 α indukuje ekspresiju SERCA2 (Chen et al., 2010), stoga bi povećan jedarni sadržaj PGC1 α mogao biti povezan sa povećanom ekspresijom SERCA2 u ovoj studiji (Slika 25 i 32C). Chen i saradnici su pokazali i da citosolnom klirensu Ca^{2+} izazvanom PGC1 α ne doprinosi razmena preko NCX1, već isključivo preko SERCA2 (Chen et al., 2010), što se takođe može uporediti sa rezultatima naše studije u kojoj nije uočena promena na nivou ekspresije NCX1 (Slika 32B). Ovi rezultati ukazuju na to da bi vitamin D preko PGC1 α mogao poboljšati kapacitet ventrikularne dijastole, ubrzavajući klirens Ca^{2+} preko SERCA2 što bi mogao biti jedan od mehanizama koji spaja energetske metabolizam srca sa unutarćelijskom regulacijom koncentracije Ca^{2+} i kontraktilnošću miokarda. Povećana aktivnost SIRT1 utiče na povećanje aktivnosti PGC1 α u jedru (Anderson et al., 2008) i na povećanje ekspresije SERCA2 (Sulaiman et al., 2010). Kako je pokazano da vitamin D povećava ekspresiju SIRT1 u srcu pacova (Qu et al., 2017), delovanje preko SIRT1 mogao bi biti mehanizam kojim vitamin D ostvaruje efekat na ove molekule. Ekspresija SERCA2a je negativno regulisana od strane GSK-3 β njegovim direktnim vezivanjem za promotor gena *atp2a2* (Flepisi et al., 2013). U skladu sa tim, uočeni efekat na povećanje stepena inhibitorne fosforilacije GSK-3 β (Slika 19B) mogao bi biti još jedan mehanizam kojim je vitamin D doveo do povećanja ekspresije SERCA2 u srcu pacova u našoj studiji. Sugerisano je i da VDR ima ulogu u regulaciji kontraktilnosti srca tako što se direktno vezuje za SERCA2 (Zhao & Simpson, 2010). Tishkoff i saradnici tvrde da je vitamin D važan za održavanje dijastole i da se poboljšanjem dijastolnih parametara obezbeđuje uspešno punjenje komora srca (Tishkoff et al., 2008). U srcu pacova tretiranih holekalciferolom, ekspresija molekula uključenih u povećanje sadržaja citosolnog Ca^{2+} tokom sistole miokarda, LTCC i *Ryr2*, je smanjena (Slika 32A i 33), što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima Tishkoff i saradnika koji pokazuju da vitamin D smanjuje brzinu kontrakcije i povećava brzinu relaksacije srca (Tishkoff et al., 2008). Iako su poremećene funkcije LTCC i *RyR2* uključene u patologije srca, posebno u nastanak aritmija (Hamilton & Terentyev, 2018), promene ekspresije ovih molekula izazvane vitaminom D u našoj studiji, mogu biti modulacija unutarćelijske regulacije nivoa Ca^{2+} unutar fiziološkog opsega.

Primećeno je da unutarćelijski nivo Ca^{2+} utiče na selekciju energetskih supstrata u srcu (Schönekeess et al., 1995). Sa druge strane, Aitken-Buck i saradnici predlažu da proizvodnja dugolančanih acilkarnitina od strane CPT-1 dovodi do povećanja Ca^{2+} u citosolu kardiomiocita (Aitken-Buck et al., 2020) što bi mogao biti potencijalni mehanizam koji povezuje uočene promene u metabolizmu masnih kiselina sa promenama u ekspresiji molekula uključenih u održavanje homeostaze Ca^{2+} . Smanjenje ekspresije LTCC i *Ryr2* (Slika 32A i 33), kao i povećanje nivoa SERCA2 (Slika 32C), detektovano u našoj studiji, mogu ukazivati na smanjenu aktivnost CPT-1, uprkos nepromenjenoj ekspresiji ovog proteina (Slika 21). Visoka koncentracija Ca^{2+} u citosolu povezana je sa povećanim nivoom GLUT4 i CD36 u plazma membrani kardiomiocita (Angin et al.,

2014) i sa povećanom oksidacijom masnih kiselina u skeletnim mišićima (Balu et al., 2016). Uzimajući u obzir uočene promene ekspresije molekula uključenih u proces regulacije unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} u ovoj studiji, indicovano je smanjenje Ca^{2+} u citosolu, što je u saglasnosti sa nepromenjenim nivoima GLUT4 (Slika 13B) i CD36 (Slika 20) u plazma membrani i nepromenjenim parametrima β -oksidacije. Studija Belke i saradnika pokazala je da kod miševa sa povećanom ekspresijom SERCA2 u srcu dolazi do povećanog korišćenja glukoze i smanjenog korišćenja masnih kiselina u oksidativnom metabolizmu (Belke et al., 2007), što je takođe u skladu sa rezultatima naše studije.

Promene uočene na molekulima uključenim u proces regulacije unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} nakon tretmana holekalciferolom ukazuju na povećan unos Ca^{2+} u SR i njegov smanjen sadržaj u citosolu, što se može pozitivno odraziti na kontraktilnost miokarda.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati naše studije predstavljaju originalni doprinos razumevanju efekata vitamina D na procese regulisane insulinom u zdravom srcu. Sagledani u celini, rezultati ukazuju da vitamin D u zdravom srcu ostvaruje direktne i indirektne efekte i favorizuje metabolizam glukoze u odnosu na metabolizam masnih kiselina.

Promene uočene na molekulima uključenim u insulinski signalni put i metabolizam glukoze ukazuju na stimulaciju prenosa insulinskog signala, glikolize i sinteze glikogena. Istovremeno, vitamin D indirektno deluje na smanjenje dostupnosti masnih kiselina što može da ukaže na modulaciju njihovog metabolizma u srcu. Pored toga, uočeni efekat na smanjenje sinteze ceramida ukazuje na kardioprotektivno delovanje vitamina D. Takođe, vitamin D ostvaruje efekat na molekule uključene u regulaciju unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} što se može odraziti na kontraktilnu funkciju srca.

S obzirom na široku upotrebu suplementacije vitamina D u humanoј populaciji, uočeni efekti u zdravom srcu ukazuju na neophodan oprez prilikom primene ovog vitamina/prohormona kod zdravih ljudi. S druge strane, naši rezultati idu u prilog tezi da vitamin D može imati pozitivan uticaj u patološkim stanjima srca, posebno onim koje su posledica insulinske rezistencije i dijabetesa. Dijabetična kardiomiopatija karakteriše se promenama u energetsom metabolizmu srca, naročito u pogledu odnosa oksidacije masnih kiselina i glukoze koji je pomećen ka povećanoj oksidaciji masnih kiselina. Takođe, ovo stanje karakteriše i poremećena kontraktilna funkcija, koja je između ostalog i posledica promena na nivou molekula uključenih u regulaciju unutarćelijske koncentracije kalcijuma. U ovom patološkom stanju vitamin D bi mogao da ostvari pozitivan efekat na kontraktilnost i ponovno uspostavljanje ravnoteže između metabolizma glukoze i masnih kiselina.

7. LITERATURA

- Abbud, W., Habinowski, S., Zhang, J.-Z., Kendrew, J., Elkairi, F. S., Kemp, B. E., Witters, L. A., & Ismail-Beigi, F. (2000). Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Associated with Enhancement of Glut1-Mediated Glucose Transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(2), 347–352. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1935>
- Abel, E. D. (2021). Insulin signaling in the heart. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 321(1), E130–E145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00158.2021>
- Abeyrathna, P., & Su, Y. (2015). The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, 74(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.008>
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., & Wakil, S. J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1444–1449. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1444>
- Adeva-Andany, M., Noemi, P., & Fern, C. (2016). *Liver glucose metabolism in humans*. 0, 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
- Aitken-Buck, H. M., Krause, J., Zeller, T., Jones, P. P., & Lamberts, R. R. (2020). Long-Chain Acylcarnitines and Cardiac Excitation-Contraction Coupling: Links to Arrhythmias. *Frontiers in Physiology*, 11(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.577856>
- Al-Shoumer, K. A. (2015). Is there a relationship between vitamin D with insulin resistance and diabetes mellitus? *World Journal of Diabetes*, 6(8), 1057. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i8.1057>
- Al Mheid, I., Patel, R., Murrow, J., Morris, A., Rahman, A., Fike, L., Kavtaradze, N., Uphoff, I., Hooper, C., Tangpricha, V., Alexander, R. W., Brigham, K., & Quyyumi, A. A. (2011). Vitamin D Status Is Associated With Arterial Stiffness and Vascular Dysfunction in Healthy Humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(2), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.02.051>
- Alán, L., Smolková, K., Kronusová, E., Šantorová, J., & Ježek, P. (2009). Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9201-2>
- Alkharfy, K. M., Al-Daghri, N. M., Yakout, S. M., Hussain, T., Mohammed, A. K., & Krishnaswamy, S. (2013). Influence of vitamin D treatment on transcriptional regulation of insulin-sensitive genes. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 11(4), 283–288. <https://doi.org/10.1089/met.2012.0068>
- Alrefaie, Z., Awad, H., Alsolami, K., & Hamed, E. A. (2022). Uncoupling proteins: are they involved in vitamin D3 protective effect against high-fat diet-induced cardiac apoptosis in rats? *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(2), 438–446. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1690526>
- Alvarez, J. A., & Ashraf, A. (2010). Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis. *International Journal of Endocrinology*, 2010(March 2009), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2010/351385>

- Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstenberger, M., Tmava Berisha, A., Martucci, G., Pilz, S., & Malle, O. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(11), 1498–1513. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0558-y>
- Anderson, R. M., Barger, J. L., Edwards, M. G., Braun, K. H., O'Connor, C. E., Prolla, T. A., & Weindruch, R. (2008). Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*, 7(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00357.x>
- Angin, Y., Schwenk, R. W., Nergiz-Unal, R., Hoebbers, N., Heemskerk, J. W. M., Kuijpers, M. J., Coumans, W. A., van Zandvoort, M. A. M. J., Bonen, A., Neumann, D., Glatz, J. F. C., & Luiken, J. J. F. P. (2014). Calcium signaling recruits substrate transporters GLUT4 and CD36 to the sarcolemma without increasing cardiac substrate uptake. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(2), E225–E236. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00655.2013>
- Antinozzi, C., Corinaldesi, C., Giordano, C., Pisano, A., Cerbelli, B., Migliaccio, S., Di Luigi, L., Stefanantoni, K., Vannelli, G. B., Minisola, S., Valesini, G., Ricciari, V., Lenzi, A., & Crescioli, C. (2017). Potential role for the VDR agonist elocalcitol in metabolic control: Evidences in human skeletal muscle cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 167, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.12.010>
- Aulbach, F. (1999). Insulin stimulates the L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 42(1), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00307-1)
- Babaei, P., Damirchi, A., & Hoseini, R. (2015). The interaction effects of aerobic exercise training and vitamin D supplementation on plasma lipid profiles and insulin resistance in ovariectomized rats. *The Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, 6(1), 173–182. <https://doi.org/10.5717/jenb.2015.19.3.173>
- Balu, D., Ouyang, J., Parakhia, R. A., Pitake, S., & Ochs, R. S. (2016). Ca²⁺ effects on glucose transport and fatty acid oxidation in L6 skeletal muscle cell cultures. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.007>
- Barnes, K., Ingram, J. C., Porras, O. H., Barros, L. F., Hudson, E. R., Fryer, L. G. D., Foulfelle, F., Carling, D., Hardie, D. G., & Baldwin, S. A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Cell Science*, 115(11), 2433–2442. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.11.2433>
- Baron, A. D. (1994). Hemodynamic actions of insulin. In *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (Vol. 267, Issues 2 30-2, pp. E187–E202). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.2.e187>
- Barsony, J., Renyi, I., & McKoy, W. (1997). Subcellular Distribution of Normal and Mutant Vitamin D Receptors in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5774–5782. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5774>
- Bayeva, M., Sawicki, K. T., & Ardehali, H. (2013). Taking Diabetes to Heart—Deregulation of Myocardial Lipid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), e000433–e000433. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000433>
- Bedinger, D. H., & Adams, S. H. (2015). Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.013>

- Belke, D. D., Betuing, S., Tuttle, M. J., Graveleau, C., Young, M. E., Pham, M., Zhang, D., Cooksey, R. C., McClain, D. A., Litwin, S. E., Taegtmeier, H., Severson, D., Kahn, C. R., & Abel, E. D. (2002). Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *Journal of Clinical Investigation*, 109(5), 629–639. <https://doi.org/10.1172/JCI200213946>
- Belke, D. D., Swanson, E., Suarez, J., Scott, B. T., Stenbit, A. E., & Dillmann, W. H. (2007). Increased expression of SERCA in the hearts of transgenic mice results in increased oxidation of glucose. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(4), H1755–H1763. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00884.2006>
- Benetti, E., Mastrocola, R., Chiazza, F., Nigro, D., D'Antona, G., Bordano, V., Fantozzi, R., Aragno, M., Collino, M., & Minetto, M. A. (2018). Effects of vitamin D on insulin resistance and myosteatosis in diet-induced obese mice. *PLOS ONE*, 13(1), e0189707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189707>
- Berretta, M., Quagliariello, V., Bignucolo, A., Facchini, S., Maurea, N., Di Francia, R., Fiorica, F., Sharifi, S., Bressan, S., Richter, S. N., Camozzi, V., Rinaldi, L., Scaroni, C., & Montopoli, M. (2022). The Multiple Effects of Vitamin D against Chronic Diseases: From Reduction of Lipid Peroxidation to Updated Evidence from Clinical Studies. *Antioxidants*, 11(6), 1090. <https://doi.org/10.3390/antiox11061090>
- Bertero, E., & Maack, C. (2018). Metabolic remodelling in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 15(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0044-6>
- Bertrand, L., Alessi, D. R., Deprez, J., Deak, M., Viaene, E., Rider, M. H., & Hue, L. (1999). Heart 6-Phosphofructo-2-kinase Activation by Insulin Results from Ser-466 and Ser-483 Phosphorylation and Requires 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-1, but Not Protein Kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30927–30933. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30927>
- Bertrand, L., Horman, S., & Beauloye, C. (2015). Glucose Uptake and Its Consequence on Cardiomyocyte Function. In *Glucose Intake and Utilization in Pre-Diabetes and Diabetes: Implications for Cardiovascular Disease*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800093-9.00012-0>
- Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C., & Vanoverschelde, J. L. (2008). Insulin signalling in the heart. In *Cardiovascular Research* (Vol. 79, Issue 2, pp. 238–248). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn093>
- Bettoun, D. J., Buck, D. W., Lu, J., Khalifa, B., Chin, W. W., & Nagpal, S. (2002). A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 24847–24850. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200187200>
- Bikle, D., & Christakos, S. (2020). New aspects of vitamin D metabolism and action — addressing the skin as source and target. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(4), 234–252. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0312-5>
- Bird, M. I., & Saggerson, E. D. (1984). Binding of malonyl-CoA to isolated mitochondria. Evidence for high- and low-affinity sites in liver and heart and relationship to inhibition of carnitine palmitoyltransferase activity. *Biochemical Journal*, 222(3), 639–647. <https://doi.org/10.1042/bj2220639>

- Bland, R., Markovic, D., Hills, C. E., Hughes, S. V., Chan, S. L. F., Squires, P. E., & Hewison, M. (2004). Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89–90, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.115>
- Blum, M., Dolnikowski, G., Seyoum, E., Harris, S. S., Booth, S. L., Peterson, J., Saltzman, E., & Dawson-Hughes, B. (2008). Vitamin D3 in fat tissue. *Endocrine*, 33(1), 90–94. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9051-4>
- Bodyak, N., Rigor, D. L., Chen, Y.-S., Han, Y., Bisping, E., Pu, W. T., & Kang, P. M. (2007). Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H829–H835. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01409.2006>
- Borel, P., Caillaud, D., & Cano, N. J. (2015). Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1193–1205. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.688897>
- Bornstedt, M. E., Gjerlaugsen, N., Olstad, O. K., Berg, J. P., Bredahl, M. K., & Thorsby, P. M. (2020). Vitamin D metabolites influence expression of genes concerning cellular viability and function in insulin producing β -cells (INS1E). *Gene*, 746(October 2019), 144649. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144649>
- Bornstedt, M. E., Gjerlaugsen, N., Pepaj, M., Bredahl, M. K. L., & Thorsby, P. M. (2019). Vitamin D Increases Glucose Stimulated Insulin Secretion from Insulin Producing Beta Cells (INS1E). *International Journal of Endocrinology and Metabolism, In Press(In Press)*, 15–19. <https://doi.org/10.5812/ijem.74255>
- Boudina, S., Bugger, H., Sena, S., O'Neill, B. T., Zaha, V. G., Ilkun, O., Wright, J. J., Mazumder, P. K., Palfreyman, E., Tidwell, T. J., Theobald, H., Khalimonchuk, O., Wayment, B., Sheng, X., Rodnick, K. J., Centini, R., Chen, D., Litwin, S. E., Weimer, B. E., & Abel, E. D. (2009). Contribution of Impaired Myocardial Insulin Signaling to Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in the Heart. *Circulation*, 119(9), 1272–1283. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.792101>
- Bouillaud, F., Alves-Guerra, M.-C., & Ricquier, D. (2016). UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2443–2456. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.013>
- Bouillon, R., & Bikle, D. (2019). Vitamin D Metabolism Revised: Fall of Dogmas. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(11), 1985–1992. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3884>
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., & Demay, M. (2008). Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), 726–776. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>
- Bouillon, R., Manousaki, D., Rosen, C., Trajanoska, K., Rivadeneira, F., & Richards, J. B. (2022). The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(2), 96–110. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00593-z>
- Bouillon, R., Marcocci, C., Carmeliet, G., Bikle, D., White, J. H., Dawson-Hughes, B., Lips, P., Munns, C. F., Lazaretti-Castro, M., Giustina, A., & Bilezikian, J. (2019). Skeletal and Extraskkeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. In *Endocrine Reviews* (Vol. 40, Issue 4). <https://doi.org/10.1210/er.2018-00126>

- Bouillon, R., Okamura, W. H., & Norman, A. W. (1995). Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine Reviews*, 16(2), 200–257. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-2-200>
- Bouillon, R., Schuit, F., Antonio, L., & Rastinejad, F. (2020). Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Frontiers in Endocrinology*, 10(January), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00910>
- Boura-Halfon, S., & Zick, Y. (2009). Chapter 12 Serine Kinases of Insulin Receptor Substrate Proteins. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 80, Issue C, pp. 313–349). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00612-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00612-2)
- Bourlon, P., Billaudel, B., & Faure-Dussert, A. (1999). Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *Journal of Endocrinology*, 160(1), 87–95. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1600087>
- Bouskila, M., Hunter, R. W., Ibrahim, A. F. M., Delattre, L., Pegg, M., van Diepen, J. A., Voshol, P. J., Jensen, J., & Sakamoto, K. (2010). Allosteric Regulation of Glycogen Synthase Controls Glycogen Synthesis in Muscle. *Cell Metabolism*, 12(5), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.10.006>
- Brand, M. D., & Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, 2(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.002>
- Breslavsky, A., Frand, J., Matas, Z., Boaz, M., Barnea, Z., & Shargorodsky, M. (2013). Effect of high doses of vitamin D on arterial properties, adiponectin, leptin and glucose homeostasis in type 2 diabetic patients. *Clinical Nutrition*, 32(6), 970–975. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.020>
- Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Viñas, O., Giralt, M., Iglesias, R., & Villarroya, F. (1999). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes*, 48(6), 1217–1222. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.6.1217>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Bugger, H., & Abel, E. D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 57(4), 660–671. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3171-6>
- Bugger, H., Riehle, C., Jaishy, B., Wende, A. R., Tuinei, J., Chen, D., Soto, J., Pires, K. M., Boudina, S., Theobald, H. A., Luptak, I., Wayment, B., Wang, X., Litwin, S. E., Weimer, B. C., & Abel, E. D. (2012). Genetic loss of insulin receptors worsens cardiac efficiency in diabetes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.02.001>
- Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2018.05.019>

- Calle, C., Maestro, B., & García-Arencibia, M. (2008). Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-65>
- Caprio, M., Infante, M., Calanchini, M., Mammi, C., & Fabbri, A. (2017). Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 22(1), 27–41. <https://doi.org/10.1007/s40519-016-0312-6>
- Carlberg, C. (2022). Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients*, 14(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu14071354>
- Carpentier, A. C. (2018). Abnormal Myocardial Dietary Fatty Acid Metabolism and Diabetic Cardiomyopathy. *Canadian Journal of Cardiology*, 34(5), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.12.029>
- Carrara, D., Bernini, M., Bacca, A., Rugani, I., Duranti, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S., & Bernini, G. (2014). Cholecalciferol administration blunts the systemic renin–angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 15(1), 82–87. <https://doi.org/10.1177/1470320312471149>
- Challoumas, D. (2014). Vitamin D supplementation and lipid profile: What does the best available evidence show? *Atherosclerosis*, 235(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.024>
- Chambers, K. T., Cooper, M. A., Swearingen, A. R., Brookheart, R. T., Schweitzer, G. G., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., Koves, T. R., Muoio, D. M., McCommis, K. S., & Finck, B. N. (2021). Myocardial Lipin 1 knockout in mice approximates cardiac effects of human LPIN1 mutations. *JCI Insight*, 6(9), 1–13. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134340>
- Chanakul, A., Zhang, M. Y. H., Louw, A., Armbrecht, H. J., Miller, W. L., Portale, A. A., & Perwad, F. (2013). FGF-23 Regulates CYP27B1 Transcription in the Kidney and in Extra-Renal Tissues. *PLoS ONE*, 8(9), e72816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072816>
- Chandramouli, C., Varma, U., Stevens, E. M., Xiao, R.-P., Stapleton, D. I., Mellor, K. M., & Delbridge, L. M. D. (2015). Myocardial glycogen dynamics: New perspectives on disease mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12370>
- Chen, J., Doroudi, M., Cheung, J., Grozier, A. L., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2013). Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 α ,25(OH)2D3. *Cellular Signalling*, 25(12), 2362–2373. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.020>
- Chen, M., Wang, Y., & Qu, A. (2010). PGC-1 α accelerates cytosolic Ca²⁺ clearance without disturbing Ca²⁺ homeostasis in cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4), 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.018>
- Chen, S., Glenn, D. J., Ni, W., Grigsby, C. L., Olsen, K., Nishimoto, M., Law, C. S., & Gardner, D. G. (2008). Expression of the Vitamin D Receptor Is Increased in the Hypertrophic Heart. *Hypertension*, 52(6), 1106–1112. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602>

- Chen, S., Law, C. S., Grigsby, C. L., Olsen, K., Hong, T.-T., Zhang, Y., Yeghiazarians, Y., & Gardner, D. G. (2011). Cardiomyocyte-Specific Deletion of the Vitamin D Receptor Gene Results in Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 124(17), 1838–1847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.032680>
- Chen, S., Swier, V. J., Boosani, C. S., Radwan, M. M., & Agrawal, D. K. (2016a). Vitamin D Deficiency Accelerates Coronary Artery Disease Progression in Swine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(8), 1651–1659. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307586>
- Chen, S., Villalta, S. A., & Agrawal, D. K. (2016b). FOXO1 Mediates Vitamin D Deficiency-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2729>
- Chen, Y., Liu, J., Zheng, Y., Wang, J., Wang, Z., Gu, S., Tan, J., Jing, Q., & Yang, H. (2015b). Uncoupling protein 3 mediates H₂O₂ preconditioning-afforded cardioprotection through the inhibition of MPTP opening. *Cardiovascular Research*, 105(2), 192–202. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu256>
- Chen, Y., Rui, B.-B., Tang, L.-Y., & Hu, C.-M. (2015a). Lipin family proteins--key regulators in lipid metabolism. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 66(1), 10–18. <https://doi.org/10.1159/000368661>
- Cheng, Q., Boucher, B. J., & Leung, P. S. (2013). Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin–angiotensin system in mice. *Diabetologia*, 56(3), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2801-0>
- Cheng, Z., Tseng, Y., & White, M. F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(10), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- Chiu, H.-C., Kovacs, A., Ford, D. A., Hsu, F.-F., Garcia, R., Herrero, P., Saffitz, J. E., & Schaffer, J. E. (2001). A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 813–822. <https://doi.org/10.1172/JCI10947>
- Choi, R. H., Tatum, S. M., Symons, J. D., Summers, S. A., & Holland, W. L. (2021). Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 18(10), 701–711. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00536-1>
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews*, 96(1), 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Christakos, S., Li, S., De La Cruz, J., & Bikle, D. D. (2019). New developments in our understanding of vitamin D metabolism, action and treatment. *Metabolism*, 98(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.06.010>
- Cole, M. A., Murray, A. J., Cochlin, L. E., Heather, L. C., McAleese, S., Knight, N. S., Sutton, E., Jamil, A. A., Parassol, N., & Clarke, K. (2011). A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Research in Cardiology*, 106(3), 447–457. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0156-1>

- Cordeiro, M. M., Biscaia, P. B., Brunoski, J., Ribeiro, R. A., Franco, G. C. N., & Scomparin, D. X. (2021). Vitamin D supplementation decreases visceral adiposity and normalizes leptinemia and circulating TNF- α levels in western diet-fed obese rats. *Life Sciences*, 278(March), 119550. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119550>
- Cosentino, N., Campodonico, J., Milazzo, V., De Metrio, M., Brambilla, M., Camera, M., & Marenzi, G. (2021). Vitamin D and Cardiovascular Disease: Current Evidence and Future Perspectives. *Nutrients*, 13(10), 3603. <https://doi.org/10.3390/nu13103603>
- Coven, D. L., Hu, X., Cong, L., Bergeron, R., Shulman, G. I., Hardie, D. G., & Young, L. H. (2003). Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(3), E629–E636. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00171.2003>
- D'Souza, K., Nzirorera, C., & Kienesberger, P. C. (2016). Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1513–1524. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.016>
- Demine, Renard, & Arnould. (2019). Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells*, 8(8), 795. <https://doi.org/10.3390/cells8080795>
- Depre, C., Vanoverschelde, J. J., & Taegtmeyer, H. (1999). Glucose for the Heart. *Circulation*, 99(4), 578–588. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.4.578>
- Deprez, J., Bertrand, L., Alessi, D. R., Krause, U., Hue, L., & Rider, M. H. (2000). Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *The Biochemical Journal*, 347 Pt 1(Pt 1), 305–312. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470305>
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., & Rider, M. H. (1997). Phosphorylation and Activation of Heart 6-Phosphofructo-2-kinase by Protein Kinase B and Other Protein Kinases of the Insulin Signaling Cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17269–17275. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17269>
- Derakhshanian, H., Djazayery, A., Javanbakht, M. H., Eshraghian, M. R., Mirshafey, A., Jahanabadi, S., Ghadbeigi, S., Zarei, M., Alvandi, E., & Djalali, M. (2019). Vitamin D downregulates key genes of diabetes complications in cardiomyocyte. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 21352–21358. <https://doi.org/10.1002/jcp.28743>
- Di, W., Lv, J., Jiang, S., Lu, C., Yang, Z., Ma, Z., Hu, W., Yang, Y., & Xu, B. (2018). PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism. *Current Issues in Molecular Biology*, 29–46. <https://doi.org/10.21775/cimb.028.029>
- Doenst, T., Nguyen, T. D., & Abel, E. D. (2013). Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Circulation Research*, 113(6), 709–724. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>
- Donati, S., Palmini, G., Aurilia, C., Falsetti, I., Miglietta, F., Iantomasi, T., & Brandi, M. L. (2022). Rapid Nontranscriptional Effects of Calcifediol and Calcitriol. *Nutrients*, 14(6), 1291. <https://doi.org/10.3390/nu14061291>
- Duncan, J. G., & Finck, B. N. (2008). The PPAR α -PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Research*, 2008(i), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2008/253817>

- Duncombe, W. G. (1964). The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 9(2), 122–125. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(64\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(64)90004-X)
- Dusso, A. S., Brown, A. J., & Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(1), F8–F28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>
- Dyck, J. R. B., Kudo, N., Barr, A. J., Davies, S. P., Hardie, D. G., & Lopaschuk, G. D. (1999). Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry*, 262(1), 184–190. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00371.x>
- Echtay, K. S., Bienengraeber, M., Mayinger, P., Heimpel, S., Winkler, E., Druhmann, D., Frischmuth, K., Kamp, F., & Huang, S.-G. (2018). Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 657(September), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.09.006>
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.-C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L., & Kennedy, B. P. (1999). Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science*, 283(5407), 1544–1548. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1544>
- Evans, R. W., Farwell, A. P., & Braverman, L. E. (1983). Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, 113(4), 1459–1463. <https://doi.org/10.1210/endo-113-4-1459>
- Fan, Y., Futawaka, K., Koyama, R., Fukuda, Y., Hayashi, M., Imamoto, M., Miyawaki, T., Kasahara, M., Tagami, T., & Moriyama, K. (2016). Vitamin D3/VDR resists diet-induced obesity by modulating UCP3 expression in muscles. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0271-2>
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulic, L., & Hemmings, B. A. (2010). Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. In *Assessment & Evaluation in Higher Education* (Vol. 37, Issue October, pp. 31–56). https://doi.org/10.1007/82_2010_58
- Ferrell, J. E., & Bhatt, R. R. (1997). Mechanistic Studies of the Dual Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 19008–19016. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.19008>
- Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., Lawrence, J. C., & Kelly, D. P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway. *Cell Metabolism*, 4(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.08.005>
- Flepisi, T. B., Lochner, A., & Huisamen, B. (2013). The Consequences of Long-Term Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition on Normal and Insulin Resistant Rat Hearts. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 27(5), 381–392. <https://doi.org/10.1007/s10557-013-6467-8>
- Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P., & Crepaldi, T. (2019). ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>
- Gardner, D. G., Chen, S., & Glenn, D. J. (2013). Vitamin D and the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(9), R969–R977. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00322.2013>

- George, N., Peeyush Kumar, T., Antony, S., Jayanarayanan, S., & Paulose, C. S. (2012b). Effect of vitamin D 3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Nutrition*, 108(8), 1410–1418. <https://doi.org/10.1017/S0007114511006830>
- George, P. S., Pearson, E. R., & Witham, M. D. (2012a). Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 29(8), e142-50. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03672.x>
- Gil, Á., Plaza-Diaz, J., & Mesa, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(2), 87–95. <https://doi.org/10.1159/000486536>
- Gilbert, C. J., Longenecker, J. Z., & Accornero, F. (2021). ERK1/2: An Integrator of Signals That Alters Cardiac Homeostasis and Growth. *Biology*, 10(4), 346. <https://doi.org/10.3390/biology10040346>
- Gkoutinakou, I.-M., Mylonis, I., & Tsakalof, A. (2022). Vitamin D and Hypoxia: Points of Interplay in Cancer. *Cancers*, 14(7), 1791. <https://doi.org/10.3390/cancers14071791>
- Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2010). Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 367–417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>
- Gogulothu, R., Nagar, D., Gopalakrishnan, S., Garlapati, V. R., Kallamadi, P. R., & Ismail, A. (2020). Disrupted expression of genes essential for skeletal muscle fibre integrity and energy metabolism in Vitamin D deficient rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 197(November 2019), 105525. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105525>
- Goldberg, I. J., Trent, C. M., & Schulze, P. C. (2012). Lipid Metabolism and Toxicity in the Heart. *Cell Metabolism*, 15(6), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.006>
- Gomaa, A. M. S., & El-Aziz, E. A. A. (2017). Vitamin D reduces high-fat diet induced weight gain and C-reactive protein, increases interleukin-10, and reduces CD86 and caspase-3. *Pathophysiology*, 24(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.01.003>
- Gomes Castro, A. J., Silva Frederico, M. J., Cazarolli, L. H., Bretanha, L. C., Tavares, L. de C., Buss, Z. da S., Dutra, M. F., Pacheco de Souza, A. Z., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2014). Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 48(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.020>
- Gum, R. J., Gaede, L. L., Koterski, S. L., Heindel, M., Clampit, J. E., Zinker, B. A., Trevillyan, J. M., Ulrich, R. G., Jirousek, M. R., & Rondinone, C. M. (2003). Reduction of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Increases Insulin-Dependent Signaling in ob/ob Mice. *Diabetes*, 52(1), 21–28. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.21>
- Guo, C. A., & Guo, S. (2017). Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. *Journal of Endocrinology*, 233(3), R131–R143. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0679>
- Guo, X., Lin, H., Liu, J., Wang, D., Li, D., Jiang, C., Tang, Y., Wang, J., Zhang, T., Li, Y., & Yao, P. (2020). 1,25-Dihydroxyvitamin D attenuates diabetic cardiac autophagy and damage by vitamin D receptor-mediated suppression of FoxO1 translocation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 80(2020), 108380. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108380>

- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hamilton, S., & Terentyev, D. (2018). Proarrhythmic Remodeling of Calcium Homeostasis in Cardiac Disease; Implications for Diabetes and Obesity. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01517>
- Harmancey, R., Wilson, C. R., & Taegtmeier, H. (2008). Adaptation and Maladaptation of the Heart in Obesity. *Hypertension*, 52(2), 181–187. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110031>
- Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N. R., Cheng, S., Shepherd, P. R., Gout, I., Downes, C. P., & Lamb, R. F. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology*, 166(2), 213–223. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403069>
- Hauton, D., Bennett, M. ., & Evans, R. . (2001). Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1533(2), 99–109. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00146-9)
- Hii, C., & Ferrante, A. (2016). The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*, 8(3), 135. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>
- Hilse, K. E., Rupprecht, A., Egerbacher, M., Bardakji, S., Zimmermann, L., Wulczyn, A. E. M. S., & Pohl, E. E. (2018). The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides With the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00747>
- Holick, M. (1995). Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 638S–645S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.638S>
- Holloway, C., Zhong, G., Kim, Y., Ye, H., Sampath, H., Hammerling, U., Isoherranen, N., & Quadro, L. (2022). Retinoic acid regulates pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) to modulate fuel utilization in the adult heart: Insights from wild-type and β -carotene 9',10' oxygenase knockout mice. *The FASEB Journal*, 36(9), 1–20. <https://doi.org/10.1096/fj.202101910RR>
- Hopkins, T. A., Dyck, J. R. B., & Lopaschuk, G. D. (2003). AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), 207–212. <https://doi.org/10.1042/bst0310207>
- Horie, T., Ono, K., Nagao, K., Nishi, H., Kinoshita, M., Kawamura, T., Wada, H., Shimatsu, A., Kita, T., & Hasegawa, K. (2008). Oxidative stress induces GLUT4 translocation by activation of PI3-K/Akt and dual AMPK kinase in cardiac myocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), 733–742. <https://doi.org/10.1002/jcp.21353>
- Hoseini, R., Damirchi, A., & Babaei, P. (2017). Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome. *Nutrition*, 36, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.06.010>

- Hossein-nezhad, A., & Holick, M. F. (2013). Vitamin D for Health: A Global Perspective. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(7), 720–755. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.05.011>
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
- Hue, L., & Rider, M. H. (1987). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochemical Journal*, 245(2), 313–324. <https://doi.org/10.1042/bj2450313>
- Hue, L., & Taegtmeier, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(3), E578–E591. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2009>
- Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2004). Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics. *Circulation Research*, 95(6), 568–578. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3>
- Iliadis, F., Kadooglou, N., & Didangelos, T. (2011). Insulin and the heart. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S86–S91. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70019-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70019-5)
- Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frendo-Cumbo, S., Bilan, P. J., & Klip, A. (2017). Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(8), 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.002>
- Jenkinson, C. (2019). The vitamin D metabolome: An update on analysis and function. *Cell Biochemistry and Function*, 37(6), 408–423. <https://doi.org/10.1002/cbf.3421>
- Jeon, J., Thoudam, T., Choi, E. J., Kim, M., Harris, R. A., & Lee, I. (2021). Loss of metabolic flexibility as a result of overexpression of pyruvate dehydrogenase kinases in muscle, liver and the immune system: Therapeutic targets in metabolic diseases. *Journal of Diabetes Investigation*, 12(1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/jdi.13345>
- Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(2), 582S–586S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.582S>
- Jones, G., Strugnelli, S. A., & DeLuca, H. F. (1998). Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*, 78(4), 1193–1231. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1193>
- Khundmiri, S. J., Murray, R. D., & Lederer, E. (2016). PTH and Vitamin D. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, Issue 2, pp. 561–601). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140071>
- Kienesberger, P. C., Pulinkunnil, T., Nagendran, J., & Dyck, J. R. B. (2013). Myocardial triacylglycerol metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.06.018>
- Kjalarsdottir, L., Tersey, S. A., Vishwanath, M., Chuang, J. C., Posner, B. A., Mirmira, R. G., & Repa, J. J. (2019). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances glucose-stimulated insulin secretion in mouse and human islets: a role for transcriptional regulation of voltage-gated calcium channels by the vitamin D receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185(June 2018), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.004>

- Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.-B., Sharpe, A. H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G. I., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2000). Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5479–5489. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.15.5479-5489.2000>
- Klopot, A., Hance, K. W., Peleg, S., Barsony, J., & Fleet, J. C. (2007). Nucleo-cytoplasmic cycling of the vitamin D receptor in the enterocyte-like cell line, Caco-2. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100(3), 617–628. <https://doi.org/10.1002/jcb.21087>
- Kodde, I. F., van der Stok, J., Smolenski, R. T., & de Jong, J. W. (2007). Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(1), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.014>
- Kolwicz, S. C., Purohit, S., & Tian, R. (2013). Cardiac Metabolism and its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 113(5), 603–616. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302095>
- Koricanac, G., Tepavcevic, S., Zakula, Z., Milosavljevic, T., Stojiljkovic, M., & Isenovic, E. R. (2011). Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase. *European Journal of Pharmacology*, 655(1–3), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.016>
- Kovacic, S., Soltys, C.-L. M., Barr, A. J., Shiojima, I., Walsh, K., & Dyck, J. R. B. (2003). Akt Activity Negatively Regulates Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase in the Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39422–39427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305371200>
- Kraegen, E. W., Sowden, J. A., Halstead, M. B., Clark, P. W., Rodnick, K. J., Chisholm, D. J., & James, D. E. (1993). Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochemical Journal*, 295(1), 287–293. <https://doi.org/10.1042/bj2950287>
- Kudo, N., Gillespie, J. G., Kung, L., Witters, L. A., Schulz, R., Clanachan, A. S., & Lopaschuk, G. D. (1996). Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1301(1–2), 67–75. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00013-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00013-6)
- Kuzmenko, D. I., & Klimentyeva, T. K. (2016). Role of ceramide in apoptosis and development of insulin resistance. *Biochemistry (Moscow)*, 81(9), 913–927. <https://doi.org/10.1134/S0006297916090017>
- Kwon, H.-S., & Harris, R. A. (2004). Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression. *Advances in Enzyme Regulation*, 44(1), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2003.11.020>
- Lagadic-Gossman, D., Buckler, K. J., Le Prigent, K., & Feuvray, D. (1996). Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 270(5), H1529–H1537. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.5.H1529>

- Lahiri, S. K., Aguilar-Sanchez, Y., & Wehrens, X. H. T. (2021). Mechanisms underlying pathological Ca^{2+} handling in diseases of the heart. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 473(3), 331–347. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02504-z>
- Latic, N., & Erben, R. G. (2020). Vitamin D and Cardiovascular Disease, with Emphasis on Hypertension, Atherosclerosis, and Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6483. <https://doi.org/10.3390/ijms21186483>
- Leal, M. A., Aller, P., Mas, A., & Calle, C. (1995). The Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Insulin Binding, Insulin Receptor mRNA Levels, and Isotype RNA Pattern in U-937 Human Promonocytic Cells. *Experimental Cell Research*, 217(2), 189–194. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1078>
- Lee, S. M., Meyer, M. B., Benkusky, N. A., O'Brien, C. A., & Pike, J. W. (2015). Mechanisms of Enhancer-mediated Hormonal Control of Vitamin D Receptor Gene Expression in Target Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(51), 30573–30586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693614>
- Lee, T.-I., Kao, Y.-H., Chen, Y.-C., Tsai, W.-C., Chung, C.-C., & Chen, Y.-J. (2014). Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. *International Journal of Cardiology*, 176(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.07.021>
- Lee, T.-L., Lee, M.-H., Chen, Y.-C., Lee, Y.-C., Lai, T.-C., Lin, H. Y.-H., Hsu, L.-F., Sung, H.-C., Lee, C.-W., & Chen, Y.-L. (2020). Vitamin D Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Injury by Reducing Mitochondrial Fission and Mitophagy. *Frontiers in Pharmacology*, 11(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.604700>
- Lee, W.-S., & Kim, J. (2017). Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(3), 404–421. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.208>
- Legarth, C., Grimm, D., Krüger, M., Wehland, M., & Infanger, M. (2020). Potential beneficial effects of vitamin d in coronary artery disease. *Nutrients*, 12(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu12010099>
- Lenzen, S. (2014). A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12189–12194. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.557314>
- Lerchbaum, E., Trummer, C., Theiler-Schwetz, V., Kollmann, M., Wölfler, M., Pilz, S., & Obermayer-Pietsch, B. (2019). Effects of Vitamin D Supplementation on Body Composition and Metabolic Risk Factors in Men: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 11(8), 1894. <https://doi.org/10.3390/nu11081894>
- Leroux, A. E., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. (2018). AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Seminars in Cancer Biology*, 48(June 2017), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.011>
- Li, J., Hu, X., Selvakumar, P., Russell, R. R., Cushman, S. W., Holman, G. D., & Young, L. H. (2004). Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 287(5 50-5), 834–841. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00234.2004>

- Li, T., Xu, J., Qin, X., Hou, Z., Guo, Y., Liu, Z., Wu, J., Zheng, H., Zhang, X., & Gao, F. (2017). Glucose oxidation positively regulates glucose uptake and improves cardiac function recovery after myocardial reperfusion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313(5), E577–E585. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00014.2017>
- Li, X., Liu, J., Lu, Q., Ren, D., Sun, X., Rousselle, T., Tan, Y., & Li, J. (2019). AMPK: a therapeutic target of heart failure—not only metabolism regulation. *Bioscience Reports*, 39(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BSR20181767>
- Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z.-F., Liu, S. Q., & Cao, L.-P. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *Journal of Clinical Investigation*, 110(2), 229–238. <https://doi.org/10.1172/JCI15219>
- Lipke, K., Kubis-Kubiak, A., & Piwowar, A. (2022). Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States—Current View of Knowledge. *Cells*, 11(5), 844. <https://doi.org/10.3390/cells11050844>
- Liu, J., Wang, P., Zou, L., Qu, J., Litovsky, S., Umeda, P., Zhou, L., Chatham, J., Marsh, S. A., Dell'Italia, L. J., & Lloyd, S. G. (2014). High-fat, low-carbohydrate diet promotes arrhythmic death and increases myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 307(4), H598–H608. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00058.2014>
- Liu, Y., Neumann, D., Glatz, J. F. C., & Luiken, J. J. F. P. (2018). Molecular mechanism of lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 136, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.06.002>
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S., & Stanley, W. C. (2010). Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 207–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>
- Lorenz, K., Schmitt, J. P., Vidal, M., & Lohse, M. J. (2009). Cardiac hypertrophy: Targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(12), 2351–2355. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.002>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, M., Taylor, B. V., & Körner, H. (2018). Genomic Effects of the Vitamin D Receptor: Potentially the Link between Vitamin D, Immune Cells, and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00477>
- Luiken, J. J. F. P., Coort, S. L. M., Willems, J., Coumans, W. A., Bonen, A., van der Vusse, G. J., & Glatz, J. F. C. (2003). Contraction-Induced Fatty Acid Translocase/CD36 Translocation in Rat Cardiac Myocytes Is Mediated Through AMP-Activated Protein Kinase Signaling. *Diabetes*, 52(7), 1627–1634. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1627>
- Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., & Neumann, D. (2015). Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(8), 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.002>

- Luiken, J. J. F. P., Koonen, D. P. Y., Willems, J., Zorzano, A., Becker, C., Fischer, Y., Tandon, N. N., Van Der Vusse, G. J., Bonen, A., & Glatz, J. F. C. (2002). Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*, 51(10), 3113–3119. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.3113>
- Lutkewitte, A. J., & Finck, B. N. (2020). Regulation of Signaling and Metabolism by Lipin-mediated Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. *Biomolecules*, 10(10), 1386. <https://doi.org/10.3390/biom10101386>
- MacLaughlin, J., & Holick, M. F. (1985). Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1536–1538. <https://doi.org/10.1172/JCI112134>
- Maestro, B., Campión, J., Dávila, N., & Calle, C. (2000). Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocrine Journal*, 47(4), 383–391. <https://doi.org/10.1507/endocrj.47.383>
- Maestro, B., Dávila, N., Carranza, M. C., & Calle, C. (2003). Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2–3), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00032-3)
- Maier, S., Aulbach, F., Simm, A., Lange, V., Langenfeld, H., Behre, H., Kersting, U., Walter, U., & Kirstein, M. (1999). Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovascular Research*, 44(2), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00229-1)
- Mandarino, N. R., Júnior, F. das C. M., Salgado, J. V. L., Lages, J. S., & Filho, N. S. (2015). Is Vitamin D Deficiency a New Risk Factor for Cardiovascular Disease? *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 9(1), 40–49. <https://doi.org/10.2174/1874192401509010040>
- Manna, P., Achari, A. E., & Jain, S. K. (2018). 1,25(OH)₂-vitamin D3 upregulates glucose uptake mediated by SIRT1/IRS1/GLUT4 signaling cascade in C2C12 myotubes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 444(1–2), 103–108. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3235-2>
- Manna, P., & Jain, S. K. (2012). Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine-γ-lyase (CSE) activation and H₂S formation in 3T3L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 42324–42332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407833>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. (2007). Facilitated Hexose Transporters: New Perspectives on Form and Function. *Physiology*, 22(4), 234–240. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2007>
- Marcotorchino, J., Tourniaire, F., Astier, J., Karkeni, E., Canault, M., Amiot, M.-J., Bendahan, D., Bernard, M., Martin, J.-C., Giannesini, B., & Landrier, J.-F. (2014). Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(10), 1077–1083. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.010>
- Marquina, C., Mousa, A., Scragg, R., & de Courten, B. (2019). Vitamin D and cardiometabolic disorders: a review of current evidence, genetic determinants and pathomechanisms. *Obesity Reviews*, 20(2), 262–277. <https://doi.org/10.1111/obr.12793>

- Marsin, A.-S., Bertrand[†], L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent[‡], M. F., Van den Berghe[‡], G., Carling, D., & Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology*, 10(20), 1247–1255. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00742-9)
- Martens, P., Gysemans, C., Verstuyf, A., & Mathieu, C. (2020). Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients*, 12(5), 1248. <https://doi.org/10.3390/nu12051248>
- Mathieu, C. (2015). Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Research and Clinical Practice*, 108(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.01.036>
- Mazzone, G., Morisco, C., Lembo, V., D'Argenio, G., D'Armiento, M., Rossi, A., Giudice, C., Trimarco, B., Caporaso, N., & Morisco, F. (2018). Dietary supplementation of vitamin D prevents the development of western diet-induced metabolic, hepatic and cardiovascular abnormalities in rats. *United European Gastroenterology Journal*, 6(7), 1056–1064. <https://doi.org/10.1177/2050640618774140>
- McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R., & Alessi, D. R. (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO Journal*, 24(8), 1571–1583. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600633>
- Meerza, D., Naseem, I., & Ahmed, J. (2012). Effect of 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ on glucose homeostasis and DNA damage in type 2 diabetic mice. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 26(5), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.05.013>
- Mendes, A. K. B., Sulis, P. M., Cavallari, F. C., Padilla, D. P. R., Aragón, M., Gaspar, J. M., & Silva, F. R. M. B. (2022). 1 α ,25-(OH)₂ vitamin D₃ prevents insulin resistance and regulates coordinated exocytosis and insulin secretion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, 108864. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108864>
- Menezes, A. R., Lamb, M. C., Lavie, C. J., & DiNicolantonio, J. J. (2014). Vitamin D and atherosclerosis. *Current Opinion in Cardiology*, 29(6), 571–577. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000108>
- Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/ncb2329>
- Mitra, M. S., Schilling, J. D., Wang, X., Jay, P. Y., Huss, J. M., Su, X., & Finck, B. N. (2011). Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α /estrogen related receptor axis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(1), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.04.009>
- Moharir, G., Naikawdi, A. A., Bharatha, A., & Hugar, L. (2022). Effect of Vitamin D Supplementation on Hepatic Function, Lipid Profile, and Diabetic Profile in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 13(4), 1365–1369. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.04.190>
- Mohd Ghazali, N., Giribabu, N., & Salleh, N. (2022). Mechanisms Linking Vitamin D Deficiency to Impaired Metabolism: An Overview. *International Journal of Endocrinology*, 2022, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2022/6453882>

- Mora, A., Sakamoto, K., McManus, E. J., & Alessi, D. R. (2005). Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Letters*, 579(17), 3632–3638. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.040>
- Mostafa, D. K., Nasra, R. A., Zahran, N., & Ghoneim, M. T. (2016). Pleiotropic protective effects of Vitamin D against high fat diet-induced metabolic syndrome in rats: One for all. *European Journal of Pharmacology*, 792(October), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.031>
- Munns, C. F., Shaw, N., Kiely, M., Specker, B. L., Thacher, T. D., Ozono, K., Michigami, T., Tiosano, D., Mughal, M. Z., Mäkitie, O., Ramos-Abad, L., Ward, L., DiMeglio, L. A., Atapattu, N., Cassinelli, H., Braegger, C., Pettifor, J. M., Seth, A., Idris, H. W., ... Högl, W. (2016). Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(2), 394–415. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2175>
- Mutt, S. J., Raza, G. S., Mäkinen, M. J., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Järvelin, M. R., & Herzig, K. H. (2020). Vitamin D Deficiency Induces Insulin Resistance and Re-Supplementation Attenuates Hepatic Glucose Output via the PI3K-AKT-FOXO1 Mediated Pathway. *Molecular Nutrition and Food Research*, 64(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900728>
- Nagoshi, T., Yoshimura, M., M. C. Rosano, G., D. Lopaschuk, G., & Mochizuki, S. (2011). Optimization of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Current Pharmaceutical Design*, 17(35), 3846–3853. <https://doi.org/10.2174/138161211798357773>
- Nemere, I., Yoshimoto, Y., & Norman, A. W. (1984). Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 115(4), 1476–1483. <https://doi.org/10.1210/endo-115-4-1476>
- Nik, W. N. F. H. W., Zulkeflee, H. A., Rahim, S. N. A., & Ismail, T. S. T. (2023). Association of vitamin D and magnesium with insulin sensitivity and their influence on glycemic control. *World Journal of Diabetes*, 14(1), 26–34. <https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i1.26>
- Nizami, H. L., Katare, P., Prabhakar, P., Kumar, Y., Arava, S. K., Chakraborty, P., Maulik, S. K., & Banerjee, S. K. (2019). Vitamin D Deficiency in Rats Causes Cardiac Dysfunction by Inducing Myocardial Insulin Resistance. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(17), 1900109. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900109>
- Norman, A. W., Frankel, J. B., Heldt, A. M., & Grodsky, G. M. (1980). Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4458), 823–825. <https://doi.org/10.1126/science.6250216>
- Norman, P. E., & Powell, J. T. (2014). Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 114(2), 379–393. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301241>
- Oczkowicz, M., Szymczyk, B., Świątkiewicz, M., Furgal-Dzierżuk, I., Koseniuk, A., Wierzbicka, A., & Steg, A. (2021). Analysis of the effect of vitamin D supplementation and sex on Vdr, Cyp2r1 and Cyp27b1 gene expression in Wistar rats' tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 212(March), 105918. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105918>
- Oleinikov, D. (2019). Myocardial Metabolism. In *Veterinary Anatomy and Physiology* (Vol. 49, Issue 5, pp. 1201–1215). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80870>

- Omar, M. A., Wang, L., & Clanachan, A. S. (2010). Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload. *Cardiovascular Research*, 86(3), 478–486. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp421>
- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. (2018). Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
- Ortiz-Huidobro, R. I., Velasco, M., Larqué, C., Escalona, R., & Hiriart, M. (2021). Molecular Insulin Actions Are Sexually Dimorphic in Lipid Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 12(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.690484>
- Panizo, S., Barrio-Vazquez, S., Naves-Diaz, M., Carrillo-Lopez, N., Rodriguez, I., Fernandez-Vazquez, A., Valdivielso, J. M., Thadhani, R., & Cannata-Andia, J. B. (2013). Vitamin D receptor activation, left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(11), 2735–2744. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft268>
- Paolisso, G., De Riu, S., Marrazzo, G., Verza, M., Varricchio, M., & D'Onofrio, F. (1991). Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. *Metabolism*, 40(9), 972–977. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(91\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(91)90075-8)
- Park, J. E., Pichiah, P. B. T., & Cha, Y.-S. (2018). Vitamin D and Metabolic Diseases: Growing Roles of Vitamin D. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*, 27(4), 223–232. <https://doi.org/10.7570/jomes.2018.27.4.223>
- Park, S., Kim, D. S., & Kang, S. (2016). Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR- γ expression in nonobese Type 2 diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.013>
- Park, T. S., Hu, Y., Noh, H. L., Drosatos, K., Okajima, K., Buchanan, J., Tuinei, J., Homma, S., Jiang, X. C., Abel, E. D., & Goldberg, I. J. (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research*, 49(10), 2101–2112. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800147-JLR200>
- Parker, L., Levinger, I., Mousa, A., Howlett, K., & de Courten, B. (2016). Plasma 25-Hydroxyvitamin D Is Related to Protein Signaling Involved in Glucose Homeostasis in a Tissue-Specific Manner. *Nutrients*, 8(10), 631. <https://doi.org/10.3390/nu8100631>
- Pascual, F., & Coleman, R. A. (2016). Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1425–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.014>
- Patel, P., & Woodgett, J. R. (2017). Glycogen Synthase Kinase 3. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 123, pp. 277–302). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.011>
- Pearson, G. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.153>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

- Pettersen, I. K. N., Tusubira, D., Ashrafi, H., Dyrstad, S. E., Hansen, L., Liu, X.-Z., Nilsson, L. I. H., Løvsletten, N. G., Berge, K., Wergedahl, H., Bjørndal, B., Fluge, Ø., Bruland, O., Rustan, A. C., Halberg, N., Røslund, G. V., Berge, R. K., & Tronstad, K. J. (2019). Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation. *Mitochondrion*, 49(April), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.009>
- Philouze, C., Martin, J.-C., Riva, C., Marziou, A., Defoort, C., Couturier, C., Berton, T., Astier, J., Jover, B., Gayraud, N., Reboul, C., Gayraud, S., Landrier, J.-F., & Obert, P. (2022). Vitamin D3 Supplementation Alleviates Left Ventricular Dysfunction in a Mouse Model of Diet-Induced Type 2 Diabetes: Potential Involvement of Cardiac Lipotoxicity Modulation. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 36(2), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07143-9>
- Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2012). The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 38(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.03.004>
- Pilz, S., & März, W. (2008). Free fatty acids as a cardiovascular risk factor. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(4), 429–434. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.118>
- Pilz, S., Verheyen, N., Grübler, M. R., Tomaschitz, A., & März, W. (2016). Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nature Reviews Cardiology*, 13(7), 404–417. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.73>
- Pittas, A. G., Lau, J., Hu, F. B., & Dawson-Hughes, B. (2007). The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(6), 2017–2029. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0298>
- Pittas, A. G., Nelson, J., Mitri, J., Hillmann, W., Garganta, C., Nathan, D. M., Hu, F. B., & Dawson-Hughes, B. (2012). Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Progression to Diabetes in Patients at Risk for Diabetes. *Diabetes Care*, 35(3), 565–573. <https://doi.org/10.2337/dc11-1795>
- Poloz, Y., & Stambolic, V. (2015). Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell Death & Disease*, 6(12), e2037–e2037. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.381>
- Powell, D. J., Hajduch, E., Kular, G., & Hundal, H. S. (2003). Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC ζ -Dependent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7794–7808. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7794-7808.2003>
- Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Wu, W.-K., Kirichenko, T. V., & Orekhov, A. N. (2021). Autophagy and Mitophagy as Essential Components of Atherosclerosis. *Cells*, 10(2), 443. <https://doi.org/10.3390/cells10020443>
- Puthanveetil, P., Wan, A., & Rodrigues, B. (2013). FoxO1 is crucial for sustaining cardiomyocyte metabolism and cell survival. *Cardiovascular Research*, 97(3), 393–403. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs426>
- Qu, H., Lin, K., Wang, H., Wei, H., Ji, B., Yang, Z., Peng, C., Xiao, X., & Deng, H. (2017). 1,25(OH) $_2$ D $_3$ improves cardiac dysfunction, hypertrophy, and fibrosis through PARP1/SIRT1/mTOR-related mechanisms in type 1 diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(5), 1600338. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600338>

- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*, 281(7285), 785–789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(63\)91500-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)91500-9)
- Ravid, A., Rubinstein, E., Gamady, A., Rotem, C., Liberman, U., & Koren, R. (2002). Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *Journal of Endocrinology*, 173(3), 525–532. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1730525>
- Reue, K. (2009). The lipin family: mutations and metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 20(3), 165–170. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832adee5>
- Reue, K., & Wang, H. (2019). Mammalian lipin phosphatidic acid phosphatases in lipid synthesis and beyond: metabolic and inflammatory disorders. *Journal of Lipid Research*, 60(4), 728–733. <https://doi.org/10.1194/jlr.S091769>
- Riek, A. E., Oh, J., & Bernal-Mizrachi, C. (2013). 1,25(OH)₂ vitamin D suppresses macrophage migration and reverses atherogenic cholesterol metabolism in type 2 diabetic patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 136(1), 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.019>
- Ritterhoff, J., & Tian, R. (2017). Metabolism in cardiomyopathy: every substrate matters. *Cardiovascular Research*, 113(4), 411–421. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx017>
- Roberts, R. (2012). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway: a potential therapeutic target in hypertension. *Journal of Experimental Pharmacology*, 2012, 77. <https://doi.org/10.2147/JEP.S28907>
- Roche, T. E., & Hiromasa, Y. (2007). Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), 830–849. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6380-z>
- Ronnebaum, S. M., & Patterson, C. (2010). The FoxO Family in Cardiac Function and Dysfunction. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 81–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135931>
- Rui, Y., Cheng, J., Qin, L., Shan, C., Chang, J., Wang, G., & Wan, Z. (2017). Effects of vitamin D and resveratrol on metabolic associated markers in liver and adipose tissue from SAMP8 mice. *Experimental Gerontology*, 93, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.03.017>
- Ruiz-Ramírez, A., López-Acosta, O., Barrios-Maya, M. A., & El-Hafidi, M. (2016). Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/9340654>
- Saddik, M., & Lopaschuk, G. D. (1991). Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8162–8170. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92956-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92956-X)
- Saltiel, A. R. (2015). Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Issue January, pp. 51–71). https://doi.org/10.1007/164_2015_14

- Salun, E., Kampus, P., Zilmer, M., Eha, J., Butlin, M., Avolio, A. P., Põdranägi, T., Arend, A., Aunapuu, M., & Kals, J. (2012). Effect of vitamin D on aortic remodeling in streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 11(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-58>
- Sambandam, N., Steinmetz, M., Chu, A., Altarejos, J. Y., Dyck, J. R. B., & Lopaschuk, G. D. (2004). Malonyl-CoA decarboxylase (MCD) is differentially regulated in subcellular compartments by 5'AMP-activated protein kinase (AMPK). *European Journal of Biochemistry*, 271(13), 2831–2840. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04218.x>
- Samokhvalov, V., Ussher, J. R., Fillmore, N., Armstrong, I. K. G., Keung, W., Moroz, D., Lopaschuk, D. G., Seubert, J., & Lopaschuk, G. D. (2012). Inhibition of malonyl-CoA decarboxylase reduces the inflammatory response associated with insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(12), E1459–E1468. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00018.2012>
- Samovski, D., Su, X., Xu, Y., Abumrad, N. A., & Stahl, P. D. (2012). Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase. *Journal of Lipid Research*, 53(4), 709–717. <https://doi.org/10.1194/jlr.M023424>
- Santos, P. P. dos, Rafacho, B. P. M., Gonçalves, A. F., Pires, V. C. M., Roscani, M. G., Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Fernandes, A. A. H., Tanni, S. E., Zornoff, L. A. M., & Paiva, S. A. R. de. (2021). Suplementação de Vitamina D Induz Remodelação Cardíaca em Ratos: Associação com a Proteína de Interação com a Tiorredoxina e a Tiorredoxina. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 116(5), 970–978. <https://doi.org/10.36660/abc.20190633>
- Saponaro, F., Saba, A., & Zucchi, R. (2020). An Update on Vitamin D Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6573. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
- Savkur, R. S., Bramlett, K. S., Stayrook, K. R., Nagpal, S., & Burris, T. P. (2005). Coactivation of the Human Vitamin D Receptor by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α . *Molecular Pharmacology*, 68(2), 511–517. <https://doi.org/10.1124/mol.105.012708>
- Schmitt-Ney, M. (2020). The FOXO's Advantages of Being a Family: Considerations on Function and Evolution. *Cells*, 9(3), 787. <https://doi.org/10.3390/cells9030787>
- Schönekeß, B., Brindley, P. G., & Lopaschuk, G. O. (1995). Calcium regulation of glycolysis, glucose oxidation and fatty acid oxidation in the aerobic and ischemic heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73(11), 1632–1640. <https://doi.org/10.1139/y95-725>
- Sciarretta, S., Volpe, M., & Sadoshima, J. (2014). Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation Research*, 114(3), 549–564. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302022>
- Scott, J. W., Norman, D. G., Hawley, S. A., Kontogiannis, L., & Hardie, D. G. (2002). Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *Journal of Molecular Biology*, 317(2), 309–323. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5316>
- Sears, B., & Perry, M. (2015). The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0123-1>

- Seida, J. C., Mitri, J., Colmers, I. N., Majumdar, S. R., Davidson, M. B., Edwards, A. L., Hanley, D. A., Pittas, A. G., Tjosvold, L., & Johnson, J. A. (2014). Effect of Vitamin D 3 Supplementation on Improving Glucose Homeostasis and Preventing Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(10), 3551–3560. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2136>
- Shao, D., & Tian, R. (2015). Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 331–351). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150016>
- Shao, R., Liao, X., Lan, Y., Zhang, H., Jiao, L., Du, Q., Han, D., Ai, Q., Mai, K., & Wan, M. (2022). Vitamin D regulates insulin pathway and glucose metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(5), e22330. <https://doi.org/10.1096/fj.202200334RR>
- Shi, H., Norman, A. W., Okamura, W. H., Sen, A., & Zemel, M. B. (2001). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D 3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *The FASEB Journal*, 15(14), 1–15. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0584fje>
- Singh, A. P., Umbarkar, P., Guo, Y., Force, T., Gupte, M., & Lal, H. (2019). Inhibition of GSK-3 to induce cardiomyocyte proliferation: a recipe for in situ cardiac regeneration. *Cardiovascular Research*, 115(1), 20–30. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy255>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Son, N.-H., Park, T.-S., Yamashita, H., Yokoyama, M., Huggins, L. A., Okajima, K., Homma, S., Szabolcs, M. J., Huang, L.-S., & Goldberg, I. J. (2007). Cardiomyocyte expression of PPAR γ leads to cardiac dysfunction in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2791–2801. <https://doi.org/10.1172/JCI30335>
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Strom, M., Sandgren, M. E., Brown, T. A., & DeLuca, H. F. (1989). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9770–9773. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9770>
- Sugden, M. C., Caton, P. W., & Holness, M. J. (2010). PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *Journal of Endocrinology*, 204(2), 93–104. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0359>
- Sulaiman, M., Matta, M. J., Sunderesan, N. R., Gupta, M. P., Periasamy, M., & Gupta, M. (2010). Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 298(3), H833–H843. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00418.2009>
- Swan, J. W., Anker, S. D., Walton, C., Godsland, I. F., Clark, A. L., Leyva, F., Stevenson, J. C., & Coats, A. J. S. (1997). Insulin Resistance in Chronic Heart Failure: Relation to Severity and Etiology of Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 30(2), 527–532. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(97\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(97)00185-X)

- Szablewski, L. (2017). Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *International Journal of Cardiology*, 230, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.083>
- Szymczak-Pajor, I., & Śliwińska, A. (2019). Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients*, 11(4), 794. <https://doi.org/10.3390/nu11040794>
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- Tepavcevic, S., Koricanac, G., Zakula, Z., Milosavljevic, T., Stojiljkovic, M., & Isenovic, E. R. (2011). Interaction Between Insulin and Estradiol in Regulation of Cardiac Glucose and Free Fatty Acid Transporters. *Hormone and Metabolic Research*, 43(08), 524–530. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280784>
- Teruel, T., Hernandez, R., & Lorenzo, M. (2001). Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- α in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State. *Diabetes*, 50(11), 2563–2571. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2563>
- Teshima, Y., Takahashi, N., Saikawa, T., Hara, M., Yasunaga, S., Hidaka, S., & Sakata, T. (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine sensitive CA²⁺ channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(4), 655–664. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1107>
- Tiganis, T. (2013). PTP1B and TCPTP - nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS Journal*, 280(2), 445–458. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08563.x>
- Tishkoff, D. X., Nibbelink, K. A., Holmberg, K. H., Dandu, L., & Simpson, R. U. (2008). Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility. *Endocrinology*, 149(2), 558–564. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0805>
- Tomaschitz, A., Pilz, S., Ritz, E., Grammer, T., Drechsler, C., Boehm, B. O., & März, W. (2010). Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system. *Clinica Chimica Acta*, 411(17–18), 1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.05.037>
- Trimarco, V., Manzi, M. V., Mancusi, C., Strisciuglio, T., Fucile, I., Fiordelisi, A., Pilato, E., Izzo, R., Barbato, E., Lembo, M., & Morisco, C. (2022). Insulin Resistance and Vitamin D Deficiency: A Link Beyond the Appearances. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.859793>
- Tuunanen, H., Engblom, E., Naum, A., Någren, K., Hesse, B., Airaksinen, K. E. J., Nuutila, P., Iozzo, P., Ukkonen, H., Opie, L. H., & Knuuti, J. (2006). Free Fatty Acid Depletion Acutely Decreases Cardiac Work and Efficiency in Cardiomyopathic Heart Failure. *Circulation*, 114(20), 2130–2137. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.645184>
- Tzivion, G., Dobson, M., & Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(11), 1938–1945. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.002>

- Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Keung, W., Fillmore, N., Jaswal, J. S., Cadete, V. J., Beker, D. L., Lam, V. H., Zhang, L., & Lopaschuk, G. D. (2012). Inhibition of Serine Palmitoyl Transferase I Reduces Cardiac Ceramide Levels and Increases Glycolysis Rates following Diet-Induced Insulin Resistance. *PLoS ONE*, 7(5), e37703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037703>
- Vetter, R., Rehfeld, U., Reissfelder, C., Weiß, W., Wagner, K., Günther, J., Hammes, A., Tschöpe, C., Dillmann, W., & Paul, M. (2002). Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase improves reticular Ca²⁺ handling in normal and diabetic rat hearts. *The FASEB Journal*, 16(12), 1657–1659. <https://doi.org/10.1096/fj.01-1019fje>
- Von Lewinski, D., Bruns, S., Walther, S., Kögler, H., & Pieske, B. (2005). Insulin causes [Ca²⁺]dependent and [Ca²⁺]-i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation*, 111(20), 2588–2595. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.497461>
- Walters, M. R., Wicker, D. C., & Riggle, P. C. (1986). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors identified in the rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 18(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(86\)80983-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(86)80983-x)
- Wanders, R. J. A., Ruiter, J. P. N., IJlst, L., Waterham, H. R., & Houten, S. M. (2010). The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5), 479–494. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9104-8>
- Wang, T.-T., Tavera-Mendoza, L. E., Laperriere, D., Libby, E., Burton MacLeod, N., Nagai, Y., Bourdeau, V., Konstorum, A., Lallemand, B., Zhang, R., Mader, S., & White, J. H. (2005). Large-Scale in Silico and Microarray-Based Identification of Direct 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(11), 2685–2695. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0106>
- Wang, W., Zhang, L., Battiprolu, P. K., Fukushima, A., Nguyen, K., Milner, K., Gupta, A., Altamimi, T., Byrne, N., Mori, J., Alrob, O. A., Wagg, C., Fillmore, N., Wang, S., Liu, D. M., Fu, A., Lu, J. Y., Chaves, M., Motani, A., ... Lopaschuk, G. D. (2019). Malonyl CoA Decarboxylase Inhibition Improves Cardiac Function Post-Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(3), 385–400. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.02.003>
- Wang, Y. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation*, 116(12), 1413–1423. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589>
- Wang, Y., & DeLuca, H. F. (2011). Is the Vitamin D Receptor Found in Muscle? *Endocrinology*, 152(2), 354–363. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1109>
- Wang, Y., Zhu, J., & DeLuca, H. F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>
- Wende, A. R., & Abel, E. D. (2010). Lipotoxicity in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.023>
- Wong, K. E., Kong, J., Zhang, W., Szeto, F. L., Ye, H., Deb, D. K., Brady, M. J., & Li, Y. C. (2011). Targeted Expression of Human Vitamin D Receptor in Adipocytes Decreases Energy Expenditure and Induces Obesity in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 286(39), 33804–33810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257568>

- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., & Cantley, L. C. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, 49(6), 1167–
- Wu, R., Smeele, K. M., Wyatt, E., Ichikawa, Y., Eerbeek, O., Sun, L., Chawla, K., Hollmann, M. W., Nagpal, V., Heikkinen, S., Laakso, M., Jujo, K., Wasserstrom, J. A., Zuurbier, C. J., & Ardehali, H. (2011). Reduction in Hexokinase II Levels Results in Decreased Cardiac Function and Altered Remodeling After Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research*, 108(1), 60–69. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223115>
- Xiang, W., Kong, J., Chen, S., Cao, L. P., Qiao, G., Zheng, W., Liu, W., Li, X., Gardner, D. G., & Li, Y. C. (2005). Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: Role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(1 51-1), 125–132. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00224.2004>
- Xiong, Z., Xu, H., Huang, X., Ärnlov, J., Qureshi, A. R., Cederholm, T., Sjögren, P., Lindholm, B., Risérus, U., & Carrero, J. J. (2015). Nonesterified Fatty Acids and Cardiovascular Mortality in Elderly Men with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(4), 584–591. <https://doi.org/10.2215/CJN.08830914>
- Yan, Y., Zhou, X., Xu, H., & Melcher, K. (2018). Structure and Physiological Regulation of AMPK. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3534. <https://doi.org/10.3390/ijms19113534>
- Yang, J., Zhang, Y., Pan, Y., Sun, C., Liu, Z., Liu, N., Fu, Y., Li, X., Li, Y., & Kong, J. (2021). The Protective Effect of 1,25(OH)2D3 on Myocardial Function is Mediated via Sirtuin 3-Regulated Fatty Acid Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.627135>
- Yang, Y., Liu, B., Gao, L., Wang, D., Chen, Q., Wang, Q., & Song, M. (2016). The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on liver damage, oxidative stress, and advanced glycation end products in experimental nonalcoholic- and alcoholic- fatty liver disease. *Int J Clin Exp Med*, 9(6), 9425–9430.
- Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., & Ling, W. (2012). Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>
- Young, M. E., Patil, S., Ying, J., Depre, C., Ahuja, H. S., Shipley, G. L., Stepkowski, S. M., Davies, P. J., & Taegtmeyer, H. (2001). Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(3), 833–845. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0351com>
- Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), 873–891. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6359-9>
- Zabolotny, J. M., Kim, Y.-B., Welsh, L. A., Kershaw, E. E., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2008). Protein-tyrosine Phosphatase 1B Expression Is Induced by Inflammation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14230–14241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>

- Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., Mcninch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M., & Hewison, M. (2001). Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), 888–894. <https://doi.org/10.1210/jc.86.2.888>
- Zeitz, U., Weber, K., Soegiarto, D. W., Wolf, E., Balling, R., & Erben, R. G. (2003). Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *The FASEB Journal*, 17(3), 1–14. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0424fje>
- Zhang, L., Yan, X., Zhang, Y.-L., Bai, J., Hidru, T. H., Wang, Q.-S., & Li, H.-H. (2018). Vitamin D attenuates pressure overload-induced cardiac remodeling and dysfunction in mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178(January), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.009>
- Zhao, G., & Simpson, R. U. (2010). Interaction between vitamin D receptor with caveolin-3 and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in adult rat cardiomyocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1–2), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.055>
- Zhou, C., Lu, F., Cao, K., Xu, D., Goltzman, D., & Miao, D. (2008a). Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney International*, 74(2), 170–179. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.101>
- Zhou, Q. G., Hou, F. F., Guo, Z. J., Liang, M., Wang, G. B., & Zhang, X. (2008b). 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24(6), 459–464. <https://doi.org/10.1002/dmrr.873>
- Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., & Unger, R. H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1784–1789. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1784>
- Zick, Y. (2005). Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Science's STKE*, 2005(268). <https://doi.org/10.1126/stke.2682005pe4>
- Zuurbier, C. J., Bertrand, L., Beauloye, C. R., Andreadou, I., Ruiz-Meana, M., Jespersen, N. R., Kula-Alwar, D., Prag, H. A., Eric Botker, H., Dambrova, M., Montessuit, C., Kaambre, T., Liepinsh, E., Brookes, P. S., & Krieg, T. (2020). Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 5937–5954. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15180>

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Тамара Д. Ивковић рођена је 01.10.1990. године у Београду. Након завршетка основног и средњег образовања, школске 2010/2011. године уписала је студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, смер Молекуларна биологија и физиологија. Дипломирала је 2014. године са просечном оценом 9,32. Мастер студије уписала је школске 2016/2017. године и исте године завршила одбраном рада под називом „Ефекат флуоксетина, клозапина и рутенијум комплекса на експресију *c-fos* у различитим регионима мозга пацова у условима хроничне изолације”.

Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биологија, модул Анимална и хумана физиологија, уписала је школске 2017/2018. године. У Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке „Винча“- Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, запослена је од 01.07.2018. године, као истраживач сарадник на пројекту др Горана Корићанца, научног саветника. У звање истраживач сарадник изабрана је 2021. године.

Тамара Д. Ивковић је публиковала седам радова у часописима међународног значаја, од чега два рада из теме дисертације, оба као први аутор. Такође је публиковала три конгресна саопштења на скуповима међународног и четири конгресна саопштења на скуповима националног значаја штампана у изводу.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Тамара Д. Ивковић**

Број индекса **Б3008/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Ефекат витамина Де на метаболичке процесе регулисане инсулином у срцу 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, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Тамара Д. Ивковић**

Број индекса **Б3008/2017**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **„Ефекат витамина Де на метаболичке процесе регулисане инсулином
у срцу пацова“**

Ментори **др Тијана Ђулафић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне
науке „Винча” - Институт од националног значаја за Републику
Србију, Универзитет у Београду**

**др Тања Јевђовић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у
Београду**

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Ефекат витамина Де на метаболичке процесе регулисане инсулином у срцу 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, _____

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.