

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Biljana N. Bursać

Metabolički sindrom izazvan ishranom bogatom fruktozom: uloga signalnih puteva regulisanih glukokortikoidnim hormonima u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu pacova

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Biljana N. Bursać

**Fructose-diet induced metabolic
syndrome: the role of glucocorticoid
signalling in the visceral adipose tissue and
hypothalamus of rats**

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

Dr Ana Đorđević, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Članovi komisije:

Dr Ana Đorđević, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Goran Korićanac, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Datum odbrane: _____

Mentors:

Dr. Ana Đorđević, Research Associate, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Dr. Gordana Matić, Full Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Committee members:

Dr. Ana Đorđević, Research Associate, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Dr. Gordana Matić, Full Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Dr. Goran Korićanac, Senior Research Associate, Institute for Nuclear Sciences “Vinča”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Defense date: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta *Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma - molekularni mehanizmi i kliničke implikacije* koji je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Matić.

Želela bih da izrazim svoju zahvalnost svima koji su na bilo koji način, posredno ili neposredno, doprineli realizaciji ove doktorske disertacije i otvorili mi vrata *sveta nauke*.

Veliku zahvalnost dugujem,

Mom mentoru, kolegini, i pre svega prijatelju, dr *Ani Đorđević* za svo znanje koje mi je prenela i svo vreme koje mi je posvetila, za nepresušnu inspiraciju i energiju koja me je gurala tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, na optimizmu i vedrom duhu koji mi je pomogao da istrajem i ostvarim naše ciljeve. Što je uvek bila pored mene i zajedno sa mnom prelazila ovaj put, na nesebičnim savetima, trudu i veri u mene, da uvek mogu (i moram) i više i bolje... Hvala na velikoj posvećenosti i neprocenjivoj pomoći u izradi ove disertacije, a najviše, HVALA NA PRIJATELJSTVU.

Prof. dr *Gordani Matić*, na ukazanom poverenju da postanem deo njenog naučnog carstva, na podršci, dragocenim sugestijama i pomoći u diskusiji rezultata i tokom svih faza izrade ove disertacije.

Mojoj dragoj kolegini i „ratnom drugu“ *Ani Vasiljević*, na neprocenjivoj pomoći u eksperimentalnom radu, podršci i prijateljstvu koje mi je pružila od samog početka našeg zajedničkog rada.

Dr *Danijeli Vojnović Milutinović*, za sve što me je naučila u eksperimentalnom radu, na svim prijateljskim savetima i nesebičnoj pomoći.

Koleginicama *Marini Nikolić*, dr *Nataši Veličković* i dr *Jadranci Dunderski* za podršku, pomoć i prijateljstvo.

Dr *Goranu Korićancu*, za vreme i strpljenje koje je kao član komisije za ocenu teme i disertacije posvetio ovom radu.

Dr *Jeleni Nestorov*, dr *Ivani Elaković*, *Sanji Kovačević* i svim ostalim kolegama sa Odeljenja za Biohemiju na pomoći i korisnim savetima u svakodnevnom radu.

Hvala svim kolegama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, kao i grupi dr Gorana Korićanca iz Instituta „Vinča“ koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Svi nabrojani su na različite načine bili deo ovog rada, ali ne mogu, a da se posebno ne zahvalim mojim roditeljima, *Ani i Nenadu*, i bratu *Nemanji*, koji su uvek verovali u mene, podržavali me i bili uz mene.

Hvala mom *Neši*, za svo razumevanje, podršku i ljubav. Bez tebe i *Bekca* bi sve ovo bilo mnogo teže.

Ovaj rad posvećujem *mojim Anama*,

jedna je od mene stvorila čoveka, a druga naučnika,

Hvala Vam

Metabolički sindrom izazvan ishranom bogatom fruktozom: uloga signalnih puteva regulisanih glukokortikoidnim hormonima u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu pacova

REZIME

Upotreba zašećerenih napitaka bogatih fruktozom predstavlja jedan od glavnih uzročnika povećanja prevalence gojaznosti i pridruženih metaboličkih poremećaja. Pokazano je da je fruktoza uključena u razvoj i progresiju metaboličkog sindroma putem poremećaja regulacije metaboličkih puteva u hipotalamusu i masnom tkivu, kao glavnim organima zaduženim za kontrolu unosa hrane i energetskog metabolizma. Takođe, poznato je da je ishrana bogata fruktozom povezana sa stanjem leptinske rezistencije u hipotalamusu. Postoje i dokazi da pojačana regeneracija glukokortikoida, posredovana enzimom 11 β hidrosisteroid dehidrogenazom tipa 1 (11 β HSD1), može doprineti razvoju adipoznosti i metaboličkih poremećaja. Glukokortikoidni hormoni su uključeni u regulaciju homeostaze triglicerida u masnom tkivu i mogu da modulišu i proces lipolize i proces lipogeneze putem povećanja ekspresije lipolitičkih enzima, kao što je lipaza osetljiva na dejstvo hormona (eng. *hormone-sensitive lipase*, HSL) ili posredstvom drugih regulatora metabolizma lipida, kao što su fosfoenolpiruvat karboksikinaza (eng. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PECK) i lipin-1. Proces adipogeneze u masnom tkivu odvija se uz učešće brojnih transkripcionih regulatora koji stimulišu ekspresiju gena lipogeneze među kojima se nalazi i gen koji kodira γ izoformu receptora koji aktivira proliferaciju peroksizoma (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , PPAR γ) i protein koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. *sterol regulatory element-binding protein-1*, SREBP-1). Poremećaj funkcije masnog tkiva u metaboličkom sindromu može biti i rezultat hronične inflamacije koja se

karakteriše akumulacijom makrofaga u masnom tkivu i povećanom sekrecijom proinflamatornih citokina.

Pretpostavili smo da se efekti glukokortikoidnih hormona na razvoj visceralne adipoznosti nakon dugoročne ishrane obogaćene fruktozom, ostvaruju putem promena u leptinskoj osetljivosti u hipotalamusu i putem promena transkripcionih regulatora adipogeneze u visceralnom masnom tkivu mužjaka pacova soja *Wistar*.

U tom cilju analizirani su efekti ishrane obogaćene 10% i 60% rastvorom fruktoze u trajanju od 9 nedelja na visceralnu adipoznost, dislipidemiju, insulinsku i leptinsku osetljivost, histološke promene u masnom tkivu i koncentraciju kortikosterona u plazmi i tkivu. Leptinska senzitivnost je analizirana određivanjem koncentracije leptina u plazmi, određivanjem proteinskog nivoa leptinskog receptora (Ob-Rb), kao i analizom nivoa iRNK za inhibitorni protein SOCS3 (eng. *suppressor of cytokine signaling*) i neuropeptid Y (NPY). Glukokortikoidna signalizacija u hipotalamusu i visceralnom masnom tkivu je analizirana na nivou prereceptorskog metabolizma, kao i na nivou ekspresije i subćelijske raspodele glukokortikoidnog receptora (GR). Takođe, izmereni su i nivoi iRNK za PEPCK i HSL kao ciljnih gena GR-a. Pored toga, određeni su i nivoi PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1 kao ključnih transkripcionih regulatora uključenih u procese adipogeneze i lipogeneze. U cilju procene inflamatornog stanja u masnom tkivu analizirani su proteinski nivo i subćelijska raspodela nuklearnog faktora *kappa* B (eng. *nuclear factor kappa B*, NF κ B), kao i nivoi iRNK za TNF- α , IL-6 i MIF.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da primenjene dijeta obogaćene fruktozom ostvaruju različit uticaj na razvoj visceralne adipoznosti, kao i na signalne puteve leptina i glukokortikoida. Povećanje količine visceralnog masnog tkiva je zapaženo samo nakon ishrane pacova 60% rastvorom fruktoze i praćeno je smanjenim nivoom leptinskog receptora u hipotalamusu i povećanim nivoima iRNK za SOCS3 i NPY. Zanimljivo je da je ishrana obogaćena 10% rastvorom

fruktoze dovela do pojačanja glukokortikoidne signalizacije i lipolize u masnom tkivu, dok je ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovela do utišavanja glukokortikoidne signalizacije i stimulacije transkripcionih regulatora adipogeneze. Pored toga, ishrana obogaćena fruktozom nije dovela do aktivacije transkripcionog regulatora NFκB i nije uticala na promenu proinflamatornih citokina u masnom tkivu, bez obzira koja koncentracija fruktoze je bila primenjena.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dugotrajna ishrana obogaćena fruktozom dovodi do pojave leptinske rezistencije u hipotalamusu i razvoja visceralne adipoznosti, ali samo pri visokim koncentracijama fruktoze. Rezultati su ukazali da efekti ishrane obogaćene fruktozom na pojavu adipoznosti najverovatnije uključuju međusobno zavisne efekte leptina i glukokortikoida na nivou centralnih puteva uključenih u kontrolu energetske bilansa.

Ključne reči: fruktoza; hipotalamus; visceralno masno tkivo; leptin; glukokortikoidi; adipogeneza; lipoliza; inflamacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

UDK broj: 577.114.3:577.175.5:[591.476+611.814]:636.028(043.3)

**Fructose-diet induced metabolic syndrome: the role of
glucocorticoid signalling in the visceral adipose tissue and
hypothalamus of rats**

ABSTRACT

The rise in consumption of refined sugars high in fructose appears to be an important factor for the development of obesity and metabolic syndrome. Fructose has been shown to be involved in genesis and progression of the syndrome through deregulation of metabolic pathways in the hypothalamus and adipose tissue as major organs for control of food intake and energy metabolism. Fructose consumption has been previously associated with the state of leptin resistance in the hypothalamus. Furthermore, there is evidence that enhanced glucocorticoids regeneration, mediated by the enzyme 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1), may contribute to adiposity and metabolic disease. Glucocorticoids are involved in the regulation of triglyceride homeostasis in the adipose tissue and can modulate both lipolysis and lipogenesis through increased synthesis of lipolytic enzymes, such as hormone-sensitive lipase (HSL), or through other regulators of lipid metabolism, like phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and lipin-1. During expansion, adipose tissue responds by increasing adipogenesis through a complex regulatory network of transcription factors including peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), both involved in stimulation of lipogenic gene expression. Adipose tissue dysfunction in metabolic syndrome may result from chronic inflammation characterized by accumulation of adipose tissue macrophages and higher secretion of proinflammatory cytokines.

We hypothesized that glucocorticoid signalling is involved in the effects of different long-term fructose diets on the development of visceral adiposity through alterations in hypothalamic leptin sensitivity and adipogenic transcription factors in the visceral adipose tissue of male Wistar rats.

We analyzed the effects of 9-week drinking of 10% and 60% fructose solutions on visceral adiposity, dyslipidemia, insulin and leptin sensitivity, adipose tissue histology and both plasma and tissue corticosterone levels. Leptin sensitivity was analyzed by measuring plasma leptin concentrations, hypothalamic leptin receptor (Ob-Rb) protein level and suppressor of cytokine signaling (SOCS3) and neuropeptide (NPY) mRNA level. Glucocorticoid signalling was assessed in both hypothalamus and visceral adipose tissue at the level of prereceptor metabolism and at the level of glucocorticoid receptor (GR) expression and compartmental redistribution. The level of expression of GR target genes PEPCCK and HSL was also determined. In addition, we analyzed the levels of PPAR γ , SREBP-1 and lipin-1 as a key transcriptional factors involved in adipogenesis and lipogenesis. To examine adipose tissue inflammatory state we analyzed protein level and intracellular redistribution of nuclear factor *kappa* B (NF κ B), as well as mRNA levels of TNF- α , IL-6 and MIF.

The results revealed different impact of applied fructose diets on visceral adiposity, leptin and glucocorticoid signalling. Only the rats kept on 60% fructose diet accumulated visceral fat and developed adiposity, which was paralleled with reduced hypothalamic Ob-Rb level and elevated SOCS3 and NPY levels. Interestingly, 10% fructose consumption led to enhanced glucocorticoid signalling and lipolysis in the adipose tissue, while consumption of 60% liquid fructose led to diminished glucocorticoid signalling, activation of adipogenic transcription factors and adipogenesis. In addition, fructose diet attenuated NF κ B activation and did not alter proinflammatory cytokines in the adipose tissue, regardless of fructose concentration.

In conclusion, these results propose that long-term fructose diet leads to hypothalamic leptin resistance and development of visceral adiposity, but only at higher fructose concentrations. The results also suggest that adiposity-related effects of fructose consumption may involve the interplay between leptin and glucocorticoid signalling at the level of central effector pathways that control energy balance.

Key words: fructose; hypothalamus; visceral adipose tissue; leptin; glucocorticoids; adipogenesis; lipolysis; inflammation

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Biochemistry and Molecular Biology

UDC number: 577.114.3:577.175.5:[591.476+611.814]:636.028(043.3)

SKRAĆENICE

ACC	karboksilaza acetil-koenzima A (eng. <i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
ACTH	adrenokortikotropni hormon (eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AgRP	peptid sličan <i>Agouti</i> proteinu (eng. <i>agouti-related protein</i>)
ANOVA	analiza varijanse (eng. <i>analysis of variance</i>)
ATGL	lipaza triglicerida adipocita (eng. <i>adipose triglyceride lipase</i>)
ATP	adenozin tri fosfat
AUC	površina ispod krive (eng. <i>area under curve</i>)
BA	β -aktin
B2M	β_2 -mikroglobulin
BMI	indeks telesne mase (eng. <i>body mass index</i>)
BSA	goveđi serum albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i>)
CART	transkript koji je regulisan kokainom i amfetaminom (eng. <i>cocaine and amphetamine related peptide</i>)
CBBG	<i>Coomassie</i> brilijantno plava boja tipa G (eng. <i>Coomassie Brilliant Blue G</i>)
cDNK	komplementarni lanac molekula DNK (eng. <i>complementary DNA</i> , cDNK)
C/EBP	protein koji se vezuje za pojačivač CCAAT (eng. <i>CCAAT/enhancer binding protein</i>)
CNS	centralni nervni sistem
CRF	kortikotropin oslobađajući faktor (eng. <i>corticotropin releasing factor</i>)
Ct	prag ciklusa (eng. <i>cycle threshold</i>)
DEPC	dietilpirokarbonat
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol
ECF	pojačana hemifluorescencija (eng. <i>enhanced chemifluorescence</i>)
EDTA	etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EGTA	etilenglikoltetrasirćetna kiselina
ELISA	enzimski imuno esej (eng. <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i>)
FAS	sintaza masnih kiselina (eng. <i>fatty acid synthase</i>)
FTO	protein koji je povezan sa masom masnog tkiva i gojaznošću (eng. <i>fat mass and obesity-associated protein</i>)
GLUT2	glukozni transporter tipa 2 (eng. <i>glucose transporter 2</i>)
GLUT5	glukozni transporter tipa 5 (eng. <i>glucose transporter 5</i>)
G6P	glukozo-6-fosfataza (eng. <i>glucose-6-phosphatase</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	regulatorna sekvenca DNK regulisana glukokortikoidima (eng. <i>glucocorticoid responsive element</i>)
HDL	lipoprotein visoke gustine (eng. <i>high-density lipoprotein</i>)
HEPES	hidroksietil-1-piperazinetansulfonska kiselina (eng. <i>hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HHA	hipotalamo-hipofizno-adrenalni
HOMA	model za određivanje homeostaze (eng. <i>homeostasis assessment model</i>)
H6PDH	heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>hexose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
HPRT	hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (eng. <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>)
HRP	peroksidaza iz rena (eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
11 β HSD1	11 β hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1
11 β HSD2	11 β hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2
HSL	lipaza osetljiva na dejstvo hormona (eng. <i>hormone-sensitive lipase</i>)
HSP	protein toplotnog šoka (eng. <i>heat shock protein</i>)
I κ B	inhibitor <i>kappa</i> B
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
IL-10	interleukin-10
IP-GTT	intraperitonealni test tolerancije na glukozu (eng. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)

JAK	kinaza <i>Janus</i> (eng. <i>Janus kinase</i>)
KORT	kortikosteron
LPL	lipaza lipoproteina (eng. <i>lipoprotein lipase</i>)
MCP-1	hemotaktični protein monocita-1 (eng. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
MGL	lipaza monoacilglicerola (eng. <i>monoacilglicerol lipase</i>)
MIF	faktor koji inhibira migraciju makrofaga (eng. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
MSC	mezenhimalna stem ćelija (eng. <i>mesenchymal stem cell</i>)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NFκB	nuklearni faktor <i>kappa B</i>
nGRE	negativna regulatorna sekvenca DNK regulisana glukokortikoidima
NPY	neuropeptid Y
Ob-R	leptinski receptor (eng. <i>obesity receptor</i>)
OD	optička gustina (eng. <i>optical density</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEPCK	fosfoenolpiruvat karboksikinaza (eng. <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
4PL	4-parametarska logistička kriva (eng. <i>4-parameter logistic curve</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
POMC	proopiomelanokortin
PPARγ	γ izoforma receptora koji aktivira proliferaciju peroksizoma (eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
PTP1B	fosfotirozin fosfataza 1B (eng. <i>phosphotyrosine phosphatase 1B</i>)
PVDF	poliviniliden fluorid
RNK	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
18S	18s rRNK
SD	standardna devijacija

SDS	natrijum dodecil sulfat
SEM	standardna greška srednje vrednosti (eng. <i>standard error of mean</i>)
SH2	homolog proteina <i>src</i> 2 (eng. <i>src homology 2</i>)
SOCS3	supresor signalnog puta citokina 3 (eng. <i>supressor of cytokine signaling 3</i>)
SREBP-1	protein koji se vezuje za element regulisan sterolom tipa 1 (eng. <i>sterol regulatory element-binding protein-1</i>)
STAT	protein koji učestvuje u transdukciji signala i aktivaciji transkripcije (eng. <i>signal transducers and activator of transcription</i>)
TBP	TATA vezujući protein (eng. <i>TATA binding protein</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin
TGF- β	transformišući faktor rasta tipa β (eng. <i>transforming growth factor β</i>)
TMB	tetrametilbenzidin
TNF- α	faktor nekroze tumora α (eng. <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
VLDL	lipoprotein veoma niske gustine (eng. <i>very-low-density-lipoprotein</i>)
WHR	odnos obima struka i kuka (eng. <i>waist to hip ratio</i>)

1. UVOD	1
1.1 DEFINICIJA METABOLIČKOG SINDROMA	4
1.2 PATOFIZIOLOGIJA METABOLIČKOG SINDROMA	7
1.2.1 GOJAZNOST	7
1.2.2 VISCERALNA GOJAZNOST	12
1.2.2.1 Visceralno masno tkivo i insulinska rezistencija	14
1.2.2.2 Visceralno masno tkivo i inflamacija	15
1.3 ETIOLOGIJA NASTANKA METABOLIČKOG SINDROMA	19
1.3.1 ISTORIJSKE PERSPEKTIVE UPOTREBE ŠEĆERA U ISHRANI ČOVEKA	19
1.4 ISHRANA BOGATA FRUKTOZOM KAO MODEL METABOLIČKOG SINDROMA	20
1.4.1 METABOLIZAM FRUKTOZE U JETRI	20
1.4.2 UTICAJ ISHRANE OBOGAĆENE FRUKTOZOM NA RAZVOJ KARAKTERISTIKA METABOLIČKOG SINDROMA	22
1.5 GLUKOKORTIKOIDNI HORMONI I RAZVOJ METABOLIČKOG SINDROMA	24
1.5.1 SINTEZA I SEKRECIJA GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA	25
1.5.1.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona	27
1.5.2 MOLEKULARNI MEHANIZMI DELOVANJA GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA	29
1.5.3 FIZIOLOŠKA ULOGA GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA	32
1.5.4 ULOGA GLUKOKORTIKOIDNIH HORMONA U METABOLIČKIM POREMEĆAJIMA	34
1.6 METABOLIZAM LIPIDA U MASNOM TKIVU	36
1.6.1 LIPOLIZA	36
1.6.2 LIPOGENEZA	37
1.6.3 HORMONSKA REGULACIJA METABOLIZMA LIPIDA U MASNOM TKIVU	38
1.6.3.1 Adipogeneza	41
1.7 ULOGA CNS-A U RAZVOJU METABOLIČKOG SINDROMA	43
1.7.1 KONTROLA UNOSA HRANE I REGULACIJA ENERGETSKOG BILANSA	43
1.7.1.1 Centralna regulacija unosa hrane i energetske bilansa	44
1.7.2 LEPTIN	46
1.7.2.1 Periferni efekti leptina	47
1.7.2.2 Centralni efekti leptina	47
1.7.3 LEPTINSKA REZISTENCIJA	49
2. CILJ	52
3. MATERIJAL I METODE	54
3.1 MATERIJAL	55
3.2 METODE	58
3.2.1 GAJENJE I TRETMAN EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA	58

3.2.2 ANALIZA FIZIOLOŠKIH PARAMETARA	58
3.2.3 PRIPREMA PLAZME I ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA	59
3.2.3.1 Određivanje koncentracije insulina i slobodnih masnih kiselina u plazmi	60
3.2.3.2 Određivanje koncentracije leptina i kortikosterona u plazmi i visceralnom masnom tkivu	60
3.2.4 ODREĐIVANJE PARAMETARA INSULINSKE OSETLJIVOSTI	61
3.2.5 IZOLOVANJE VISCERALNOG MASNOG TKIVA I HIPOTALAMUSA	62
3.2.6 HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA VISCERALNOG MASNOG TKIVA	62
3.2.7 IZOLACIJA RNK I REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije	63
3.2.7.1 Izolacija RNK	63
3.2.7.2 Reakcija reverzne transkripcije	64
3.2.8 REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA U REALNOM VREMENU	65
3.2.8.1 TaqMan Real-time PCR	65
3.2.8.2 SYBR Green Real-time PCR	66
3.2.9 IZOLOVANJE PROTEINA I PRIPREMA ČELIJSKIH FRAKCIJA	67
3.2.9.1 Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije	67
3.2.9.2 Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta	69
3.2.10 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	69
3.2.11 ELEKTROFOREZA NA SDS-POLIAKRILAMIDNOM GELU	70
3.2.12 DETEKCIJA PROTEINA METODOM „WESTERN BLOT“-A	70
3.2.13 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	72

4. REZULTATI **73**

4.1 PACOV HRANJEN FRUKTOZOM KAO MODEL METABOLIČKOG SINDROMA	74
4.1.1 UNOS HRANE I KALORIJSKI UNOS	74
4.1.2 MASA TELA I MASA VISCERALNOG MASNOG TKIVA	75
4.1.3 SLOBODNE MASNE KISELINE, TRIGLICERIDI I KORTIKOSTERON	76
4.1.4 PARAMETRI INSULINSKE OSETLJIVOSTI	77
4.2 SIGNALNI PUT GLUKOKORTIKOIDA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU PACOVA HRANJENOG 10% RASTVOROM FRUKTOZE	78
4.2.1 PRERECEPTORSKI METABOLIZAM GLUKOKORTIKOIDA	79
4.2.2 UNUTARĆELIJSKA PRERASPODELA GR-A	80
4.2.3 EKSPRESIJA GENA LIPIDNOG METABOLIZMA KOJI SU REGULISANI GR-OM	82
4.3 RAZVOJ METABOLIČKE INFLAMACIJE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU PACOVA HRANJENOG 10% RASTVOROM FRUKTOZE	83
4.4 HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA VISCERALNOG MASNOG TKIVA NAKON ISHRANE OBOGAĆENE 10% RASTVOROM FRUKTOZE	85
4.5 SIGNALNI PUT GLUKOKORTIKOIDA U VISCERALNOM MASNOM TKIVU PACOVA HRANJENOG 60% RASTVOROM FRUKTOZE	86
4.5.1 PRERECEPTORSKI METABOLIZAM GLUKOKORTIKOIDA	86
4.5.2 UNUTARĆELIJSKA PRERASPODELA GR-A	87

4.5.3	EKSPRESIJA GENA LIPIDNOG METABOLIZMA KOJI SU REGULISANI GR-OM	89
4.5.4	EKSPRESIJA GENA UKLJUČENIH U PROCESSE ADIPOGENEZE I LIPOGENEZE	90
4.6	RAZVOJ METABOLIČKE INFLAMACIJE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU PACOVA HRANJENOG 60% RASTVOROM FRUKTOZE	93
4.7	HISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ANALIZA VISCERALNOG MASNOG TKIVA NAKON ISHRANE OBOGAĆENE 60% RASTVOROM FRUKTOZOM	95
4.8	SIGNALNI PUT GLUKOKORTIKOIDA U HIPOTALAMUSU PACOVA HRANJENOG 60% RASTVOROM FRUKTOZE	98
4.8.1	EKSPRESIJA GENA ZA NPY	100
4.9	SIGNALNI PUT LEPTINA U HIPOTALAMUSU PACOVA HRANJENOG 60% RASTVOROM FRUKTOZE	100
5.	DISKUSIJA	103
5.1	FIZIOLOŠKA I BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PACOVA HRANJENOG FRUKTOZOM KAO MODELA METABOLIČKOG SINDROMA	105
5.2	METABOLIČKE PROMENE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU PACOVA NAKON ISHRANE OBOGAĆENE 10% RASTVOROM FRUKTOZE	110
5.3	METABOLIČKE PROMENE U VISCERALNOM MASNOM TKIVU I HIPOTALAMUSU PACOVA NAKON ISHRANE OBOGAĆENE 60% RASTVOROM FRUKTOZE	117
6.	ZAKLJUČCI	127
7.	LITERATURA	129
8.	PRILOZI	163

“Kašika je ubila više ljudi nego svi ratovi na svetu zajedno...”

1. UVOD

Sedamdesetih godina 20. veka, Erl Butz, tadašnji sekretar zadužen za poljoprivredu SAD-a, izbacio je iz igre male proizvođače kukuruza tako što je podsticao industrijsku proizvodnju ove žitarice. Nedugo zatim, Butz je otišao u Ameriku i doneo visoko fruktozni kukuruzni sirup (eng. High Fructose Corn Syrup, HFCS), koji se činio kao privlačna alternativa upotrebi saharoze. Naime, kukuruzni sirup je bio stabilan u kiselim pićima i jelima i nije im menjao ukus. Sirovina od koje se pravio je bila dostupna i jeftina. Prehrambena industrija ga je rado prihvatila i krenula sa njegovom masovnom upotrebom. Gojaznost, koja je danas epidemija, tada nije bila na radaru, pa se novi, jeftini zaslađivač koristio bez ograničenja. Bio je trostruko jeftiniji od šećera i tečan, zbog čega je industrija bezalkoholnih pića 80-tih godina počela masovno da ga koristi. Uskoro je završio u svim mogućim jelima, računajući i testa i mesa: pokazao se i kao dobar konzervans. Sve je postalo slađe. I kaloričnije. Potrošnja šećera po glavi stanovnika se drastično povećala.

A onda je eksplodirala epidemija gojaznosti, dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti.

U periodu od 1985. do 2010. godine počeli smo da unosimo u svoj organizam oko 8% kalorija više, da bismo sada imali čak 750% više osoba obolelih od dijabetesa. Ispostavilo se da ovakva statistika ima veze sa šećerom. I to nekim tačno određenim šećerom?

- ✓ Pre Drugog svetskog rata ljudi su na dan unosili 15 g fruktoze*
- ✓ Nakon Drugog svetskog rata unosili su 24 g fruktoze dnevno*
- ✓ Do 1978. godine ova brojka je porasla na 37 g fruktoze na dan*
- ✓ 1994. godine unos fruktoze se povećao na 55 g dnevno*
- ✓ Danas, ljudi uzimaju oko 72 g fruktoze na dan*

Danas populacija dece i tinejdžera unosi 12% dnevnih kalorija samo iz fruktoze. Glukoza nije ono što ljubitelji slatkog žele. Njen ukus nije toliko sladak. Fruktoza jeste i ona je „raj za nepca“.

U čemu je razlika između glukoze i fruktoze?

Glukoza je osnovna energija života.

- *Svi organi koriste glukozu: mišići, jetra, srce, mozak... Pirinač, ovas, krompir i druge skrobne namirnice se (sporije ili brže) „pretvaraju“ u glukozu i koriste kao energija. Za korišćenje energije u ćelijama je neophodan insulin, a glukoza ga stimuliše.*
- *Ako postoji višak energije, glukoza se „pretvara“ u rezerve: glikogen. Ovo se dešava sve dok se rezerve glikogena ne napune, i u jetri i u mišićima.*
- *Tek onda, kada su zalihe glikogena pune, novi višak se pretvara i u mast. Ono što je važno je da glikogen uskladišten u mišićima, mogu da koriste samo mišići i to u toku vežbanja!*

Fruktoza ne može da se koristi kao neposredni izvor energije, jer ne stimuliše lučenje insulina.

- *Kako ne može odmah da se koristi kao izvor energije, fruktoza se „pretvara“ u glikogen u jetri – ali ne i u mišićima. Ona se metaboliše samo u jetri.*
- *Pod uslovom da rezerve glikogena u jetri nisu pune, fruktoza će ih brzo popuniti. Telo niti može odmah da koristi fruktozu kao energiju, niti može da njome popuni mišićni „rezervoar“.*
- *Čim se zalihe u jetri popune – stvaraju se masti ispod kože, oko unutrašnjih organa i u krvi. I to nije sve: 1994. godine otkriven je leptin, hormon iz masnih ćelija, koji sugerise mozgu da je bilo dosta hrane i da smo siti. Fruktoza je šećer koji uopšte ne stimuliše sekreciju leptina. Nakon konzumiranja fruktoze nikada nećete dobiti signal da ste siti i da vam je fruktoza „popunila rezerve“. I naravno, iako je fruktoza prirodan šećer, nismo je nikada ranije unosili onako kako je danas unosimo: u sokovima, gaziranim napicima, keksu, zemičkama i hlebu, kečapu, perecama i drugim slanim i slatkim prehrambenim proizvodima. Fruktoza je u prirodi uvek bila zaštićena vlaknima, a više vlakana znači i veću sitost. Nije bilo lako da se dođe do velikih količina fruktoze. U prirodi nema neumerene konzumacije fruktoze. Ima je samo onda kada se konzumiraju prerađevine koje imaju kukuruzni (fruktozni) sirup.*

Čovek je prvi stavio na isti tanjir masti i ugljene hidrate (šećer). Tada smo postali gurmani. Onda, kada smo veštački natrpali i jedno i drugo u iste namirnice – postali smo gojazni.

(preuzeto i modifikovano sa www.vitkigurman.com)

Čovek je oduvek sanjao da živi u izobilju hrane. U poslednjih sto godina taj san mu se i ostvario, a paralelno sa tim opao je i nivo fizičke aktivnosti. Kao rezultat savremenog načina života javlja se sve veći broj metaboličkih poremećaja od kojih ljudi danas pate. Kada se više tih poremećaja objedini, govorimo o metaboličkom sindromu.

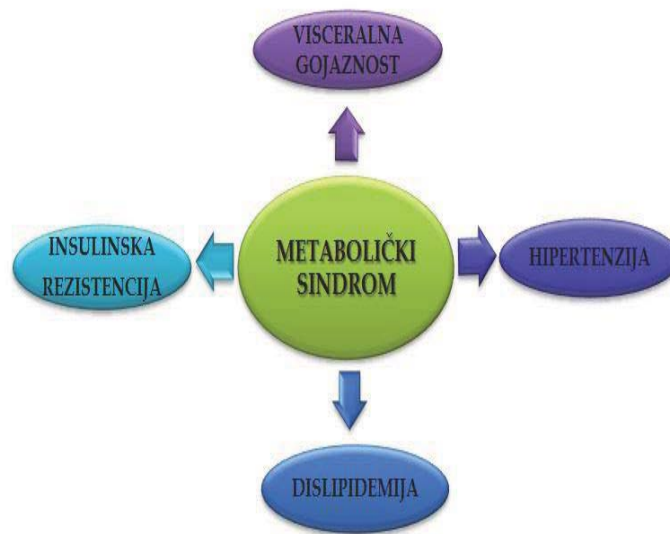
1.1 Definicija metaboličkog sindroma

Metabolički sindrom predstavlja skup međusobno povezanih metaboličkih poremećaja koji uključuje *visceralnu gojaznost, insulinsku rezistenciju, dislipidemiju i hipertenziju* (Basciano i saradnici, 2005). U zavisnosti od komponenti koje ga sačinjavaju, metabolički sindrom kao „majstor prerusavanja“ predstavlja kompleksno oboljenje koje tokom poslednjih godina zadobija epidemijske razmere (Eckel i saradnici, 2005; Kassi i saradnici, 2011).

Koncept metaboličkog sindroma, kao skupa međusobno povezanih faktora koji direktno povećavaju rizik za razvoj kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa tipa 2, postoji već 80 godina (Alberti i saradnici, 2005). Kylin je davne 1923. godine opisao pojedinačne komponente metaboličkog poremećaja koje predstavljaju faktore rizika za kardiovaskularne bolesti, grupišući hipertenziju, hiperglikemiju i giht. Kasnije, tokom 1947. godine, Vague je prvi put ukazao na značaj gojaznosti, a naročito telesne raspodele masnih naslaga tokom razvoja metaboličkih poremećaja (Vague, 1947). Savremeni koncept o metaboličkom sindromu započinje 1988. godine kada je Reaven grupisao dislipidemiju, hiperglikemiju i hipertenziju, i nazvao ih Sindrom X. On je smatrao da je insulinska rezistencija centralna komponenta sindroma (Reaven, 1988). Dvadeset godina kasnije Reaven-ov sindrom insulinske rezistencije postaje metabolički sindrom.

I pored brojnih pokušaja, još uvek ne postoji jasno definisan dijagnostički kriterijum, kao ni univerzalna definicija metaboličkog

sindroma. Prvu definiciju i kriterijume za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma dala je Svetska zdravstvena organizacija 1999. godine (eng. *World Health Organization, WHO*), a dve godine kasnije isto su učinili eksperti Nacionalnog edukacionog programa za holesterol (eng. *National Cholesterol Education Program's (NCEP) Adult Treatment Panel, NCEP/ATP III*)(Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III), 2001). Konsenzus oko definisanja dijagnostičkih kriterijuma postignut je 2005. godine od strane Međunarodne federacije za dijabetes (eng. *International Diabetes Federation, IDF*) (*Alberti i saradnici, 2005*).



Slika 1. Osnovne komponente metaboličkog sindroma. U osnovne komponente metaboličkog sindroma se ubrajaju insulinska rezistencija, visceralna gojaznost, dislipidemija i hipertenzija

Iako među njima postoje razlike u predloženim referentnim vrednostima za pojedinačne dijagnostičke kriterijume, sve predložene definicije se slažu oko osnovnih komponenti metaboličkog sindroma (*Kelliny i saradnici, 2008*) (**Slika 1**):

1. Insulinska rezistencija koja predstavlja patofiziološko stanje u kome su poremećeni i/ili oštećeni biološki odgovori tkiva na dejstva insulina oslobođenog iz pankreasa ili apliciranog egzogeno
2. Povećanje količine masnih naslaga u predelu abdomena koje dovodi do povećanja ukupne telesne težine i/ili abdominalne (visceralne) gojaznosti
3. Dislipidemija koja podrazumeva povećanje nivoa holesterola u sastavu lipoproteina veoma niske gustine (eng. *very-low-density-lipoprotein*, VLDL), smanjenje nivoa holesterola u sastavu lipoproteina visoke gustine (eng. *high-density lipoprotein*, HDL) i/ili visok nivo triglicerida u krvi
4. Hipertenzija ili visok krvni pritisak

U kliničkoj praksi se najčešće koristi NCEP ATP-III definicija, koja kao osnovni kriterijum za dijagnozu metaboličkog sindroma podrazumeva postojanje najmanje tri od pet pratećih faktora rizika u koje spadaju: visoka koncentracija glukoze (≥ 6.1 mmol/L), visok krvni pritisak ($\geq 130/85$ mmHg), visok nivo triglicerida (≥ 1.7 mmol/L), nizak HDL holesterol (< 1.0 mmol/L kod muškaraca, < 1.3 mmol/L kod žena) i visceralna (abdominalna) gojaznost (obim struka > 102 cm kod muškaraca, obim struka > 88 cm kod žena) (*Grundy i saradnici, 2005*).

U novije vreme, poremećaji kao što su hronično proinlamatorno i protrombinsko stanje, masna infiltracija jetre (nealkoholičarski steatohepatitis) (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*) i prestanak disanja tokom spavanja (eng. *sleep apnea*) se takođe spominju kao mogući činioci metaboličkog sindroma, čineći njegovu definiciju i patofiziologiju još složenijom (*Fan i Peng, 2007*).

1.2 Patofiziologija metaboličkog sindroma

„Gojaznost nije samo bolest za sebe, već i pretnja za razvoj drugih bolesti“
(Hipokrat)

Metabolički sindrom predstavlja široko, i još uvek nerazjašnjeno polje istraživanja. Najčešće korišćena hipoteza koja opisuje patofiziologiju metaboličkog sindroma se zasniva na insulinskoj rezistenciji. Smanjena osetljivost tkiva na delovanje insulina dovodi do povećane sinteze insulina i razvoja kompenzatorne hiperinsulinemije, poremećaja metabolizma lipida, inflamacije i porasta krvnog pritiska. Poslednjih godina sve veći broj podataka ukazuje na značaj gojaznosti kao centralne komponente u patofiziologiji metaboličkog sindroma (Alberti i Zimmet, 1998).

Prema najnovijem kriterijumu IDF-a, metabolički sindrom se označava i kao sindrom centralne gojaznosti (eng. *central obesity syndrome*) (Ko, 2006).

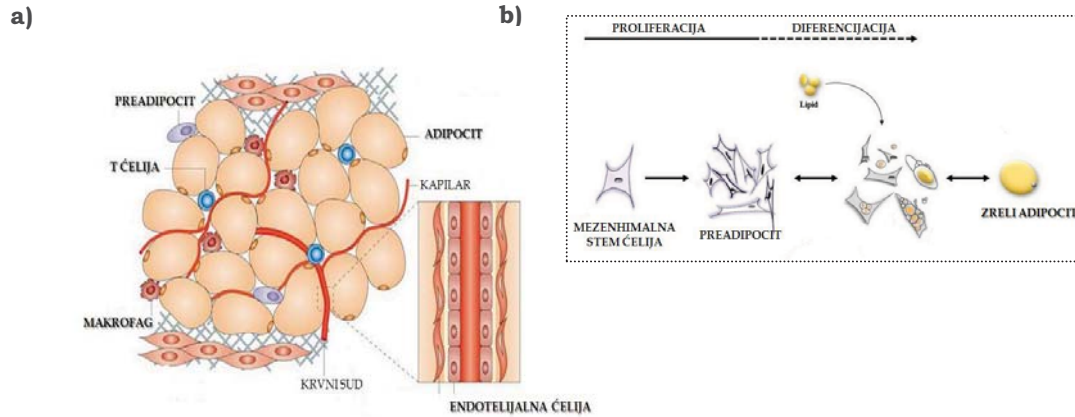
1.2.1 Gojaznost

Gojaznost je jedan od najstarijih metaboličkih poremećaja, a danas, kao osnovni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2, predstavlja vodeći uzročnik smrtnosti (Stothard i saradnici, 2009). Prema najnovijim podacima svetske zdravstvene organizacije, do 2015. godine u svetu će biti gojazno više od 700 miliona ljudi. Američka medicinska asocijacija na svom poslednjem zasedanju gojaznost definiše kao bolest (Carter i saradnici, 2013). Gojaznost nastaje kao posledica narušavanja ravnoteže između energetske unosa i potrošnje i karakteriše se povećanjem udela masnog tkiva u ukupnoj masi tela u meri koja dovodi do narušavanja zdravlja (Haslam i James, 2005).

Mutacije u genu za leptin (*ob/ob genotip*) ili leptinski receptor (*db/db genotip*) uzrokuju retke nasledne slučajeve monogenske

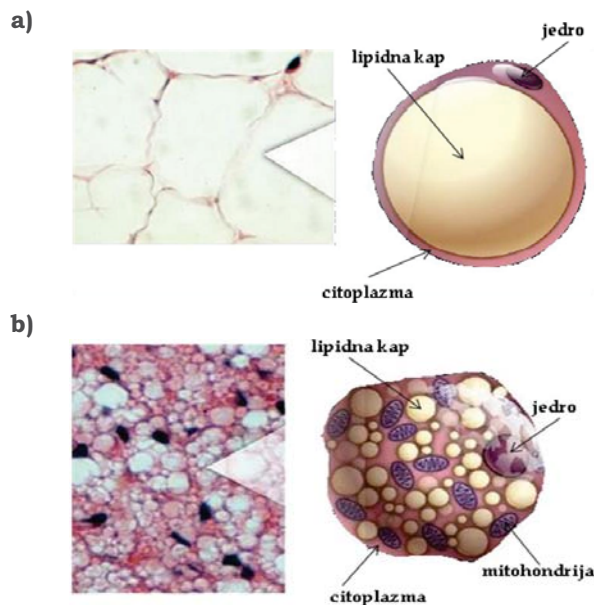
gojaznosti (*Clement i saradnici, 1998; Montague i saradnici, 1997*). Gojaznost može da nastane i usled urođenih poremećaja enzimskih sistema značajnih za metabolizam pojedinih nutrijenata, kao što je enzim FTO (eng. *fat mass and obesity-associated protein*) koji ima značajnu ulogu u metabolizmu masti i regulaciji unosa hrane (*Walley i saradnici, 2009*). Polimorfizmi u okviru prvog introna gena koji nosi informaciju za enzim FTO povezani su sa povećanjem mase tela i većom predispozicijom za razvoj gojaznosti (*Frayling i saradnici, 2007*). Pored naslednih faktora, i faktori spoljašnje sredine značajno doprinose razvoju gojaznosti. Ishrana koja sadrži veliku količinu masti i šećera, uz nedostatak fizičke aktivnosti predstavlja glavni uzročnik sve većeg porasta prevalencije gojaznosti, koja danas poprima karakteristike epidemije (*Dallman i saradnici, 2004; Friedman, 2000; Morton i saradnici, 2006*).

Masno tkivo (adipozno tkivo, telesna masnoća ili salo) predstavlja posebnu vrstu vezivnog tkiva koje se karakteriše heterogenošću ćelija koje ga sačinjavaju. Jednu trećinu masnog tkiva čine zrele masne ćelije (adipociti), dok preostale dve trećine masnog tkiva čine male mezenhimalne stem ćelije (eng. *mesenchymal stem cell*, MSC), T regulatorne ćelije, endotelijalne prekursorske ćelije, ćelije imunskog sistema (pre svega makrofagi) i preadipociti u različitim stadijumima razvoja. Preadipociti imaju sposobnost proliferacije i diferencijacije i tokom procesa adipogeneze od njih nastaju zreli adipociti (**Slika 2**) (*Symonds i saradnici, 2012*).



Slika 2. a) Čelije masnog tkiva. Jednu trećinu masnog tkiva čine zreli adipociti, dok preostale dve trećine čine različite ćelije koje imaju značajnu ulogu u razvoju i metabolizmu masnog tkiva; **b) Adipogeneza.** Proliferacija i diferencijacija mezenhimalne stem ćelije do stadijuma preadipocita koji nakon sinteze lipida postaje zreli adipocit

Adipociti se grupišu u određenim regionima tela i zajedno sa drugim ćelijskim tipovima formiraju depoe masnog tkiva. U telu postoje dva osnovna depoa masnog tkiva, belo i mrko masno tkivo. Adipociti poreklom iz belog masnog tkiva se karakterišu prisustvom jedne velike, unilokularne masne kapi koja zauzima najveći deo zapremine ćelije, dok se citoplazma i jedro nalaze na periferiji ćelije. Sa druge strane, adipociti mrkog masnog tkiva poseduju multilokularnu lipidnu kap i sadrže veliki broj mitohondrija (**Slika 3**) (Cinti, 2000; 2005).



Slika 3. Depoi masnog tkiva

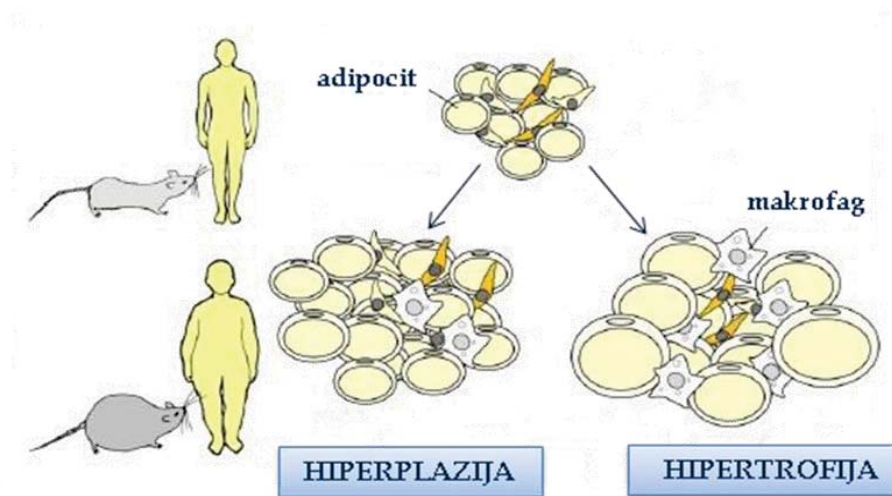
a) Belo masno tkivo - adipocit se sastoji od velike, centralno postavljene unilokularne masne kapi, a citoplazma i jedro se nalaze na periferiji ćelije

b) Mrko masno tkivo - najveći deo ćelije čini citoplazma u kojoj se nalazi veliki broj masnih kapi i mitohondrija. Jedro je kružnog oblika i nalazi se bliže centru ćelije

Na ćelijskom nivou, gojaznost se karakteriše povećanjem u broju adipocita (hiperplazija) i/ili povećanjem u njihovoj zapremini (hipertrofija) (**Slika 4**) (Hirsch, 1976).

Hipertrofija adipocita nastaje kao rezultat povećane akumulacije triglicerida u već postojećim adipocitima. Hiperplazija, koja često podrazumeva adipogenezu, nastaje kao rezultat stvaranja novih adipocita od prekursorskih ćelija u masnom tkivu (Bujalska i saradnici, 1999). Oba procesa se javljaju u odgovoru na pozitivni energetske bilans i nastaju kao posledica povećanog energetskeg unosa u poređenju sa energetskekom potrošnjom (Hausman i saradnici, 2001).

Stepen uhranjenosti i gojaznosti se procenjuje na osnovu dva parametra: indeksa telesne mase (eng. *body mass index*, BMI) i odnosa između obima struka i kuka (eng. *waist to hip ratio*, WHR). Indeks telesne mase predstavlja odnos telesne težine izražene u kilogramima i kvadrata telesne visine izražene u metrima (kg/m^2).



Slika 4. Hiperplazija i hipertrofija adipocita. U odgovoru na pozitivan energetske bilans tokom razvoja gojaznosti dolazi do povećanja broja adipocita (hiperplazija) i/ili povećanja u njihovoj zapremini (hipertrofija)

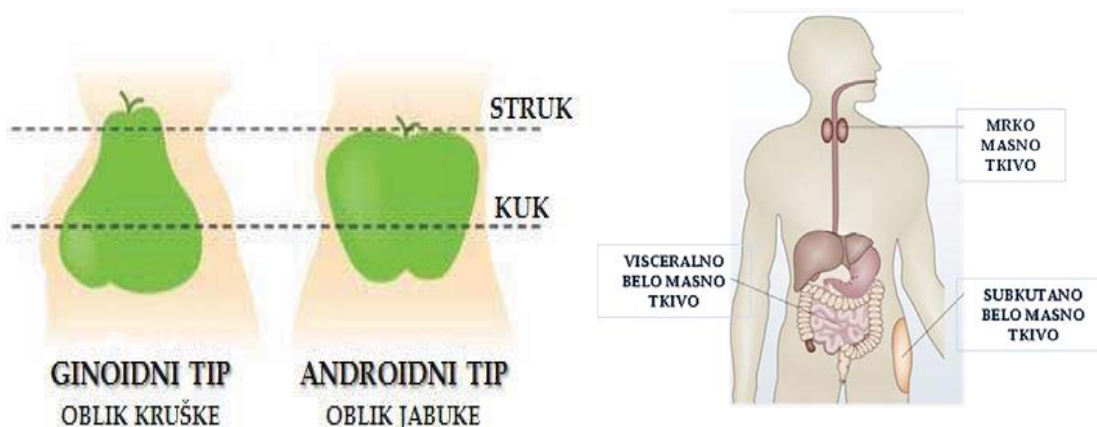
Odrasle osobe se smatraju gojaznim kada je indeks telesne mase jednak ili veći od 30 (Weisell, 2002). Za procenu stepena gojaznosti u kliničkoj praksi je pored određivanja indeksa telesne mase neophodno i poznavanje telesne distribucije masnog tkiva, što se postiže određivanjem vrednosti odnosa između obima struka i kuka izraženih u centimetrima (cm) (Pouliot i saradnici, 1994).

Prema distribuciji masnog tkiva u organizmu razlikuju se dva osnovna tipa gojaznosti: *ginoidni tip* ili periferna gojaznost i *androidni tip* poznat i kao centralna gojaznost (**Slika 5**) (Vague, 1946).

Ginoidni tip gojaznosti je karakterističan za žene i naziva se „gojaznost u obliku kruške“. Kod ovog tipa gojaznosti dolazi do nagomilavanja masnih ćelija pretežno u donjim delovima tela, oko karlice i na butinama. Često se označava kao periferna gojaznost i karakteriše se nagomilavanjem masnih naslaga potkožno (u obliku subkutanog masnog tkiva), pretežno u gluteofemoralnoj regiji.

Androidni tip gojaznosti je karakterističan za muškarce i naziva se i „gojaznost u obliku jabuke“. Kod ovog tipa gojaznosti masne naslage se nagomilavaju u gornjim delovima tela, u predelu ramena, grudnog koša i abdomena. Glavna karakteristika androidnog tipa gojaznosti je nakupljanje masnih naslaga u regionima oko unutrašnjih organa, unutar abdomena, pa se ove masne naslage nazivaju i intra-abdominalnim ili visceralnim masnim tkivom (**Slika 5**). U kliničkoj praksi se stoga ovaj tip gojaznosti naziva i centralna, abdominalna ili visceralna gojaznost. Visceralna gojaznost se procenjuje merenjem obima struka i kuka pri čemu su utvrđene granične vrednosti ovog parametra 0.94 za muškarce i 0.8 za žene.

VISCERALNA GOJAZNOST = obim struka/ obim kuka (cm) \geq **0.94** muškarci
 obim struka/ obim kuka (cm) \geq **0.8** žene



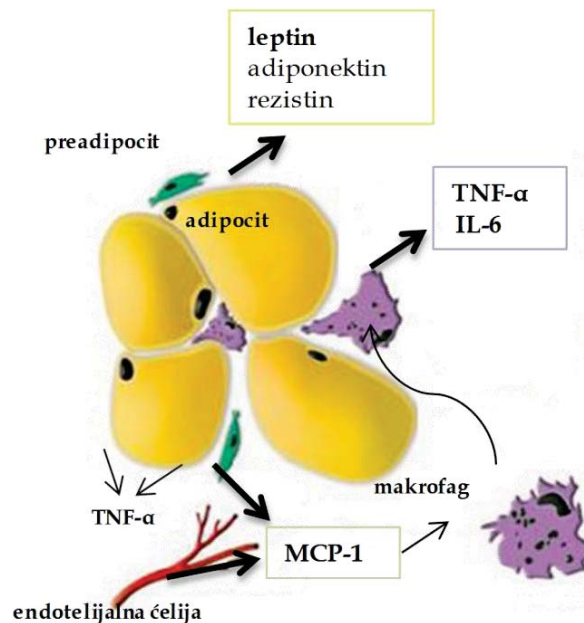
Slika 5. Ginoidni i androidni tip gojaznosti. Kod ginoidnog tipa gojaznosti („oblik kruške“) masne naslage se nagomilavaju potkožno, u obliku subkutanog masnog tkiva, dok se androidni tip gojaznosti („oblik jabuke“) karakteriše nakupljanem masnih naslaga u predelu oko unutrašnjih organa, u obliku visceralnog masnog tkiva

Prevalenca metaboličkog sindroma, kao i učestalost svake pojedinačne komponente sindroma povećava se direktno sa stepenom visceralne gojaznosti. Sa kliničko-epidemiološkog stanovišta, visceralna gojaznost je često najbolji pojedinačni prediktivni faktor rizika za razvoj metaboličkog sindroma.

1.2.2 Visceralna gojaznost

Tradicionalno shvatanje uloge masnog tkiva kao pasivnog organa čija je osnovna funkcija skladištenje energije u obliku triglicerida promenjeno je u poslednjih tridesetak godina. Otkrićem leptina 1994. godine, hormona poreklom iz masnog tkiva koji ima važnu ulogu u regulaciji unosa hrane, masno tkivo počinje da se posmatra kao aktivan metabolički i endokrini organ (*Wajchenberg, 2000*).

Sintezom i oslobađanjem solubilnih bioaktivnih peptida ili adipokina (**Slika 6**), masno tkivo učestvuje u regulaciji brojnih fizioloških procesa u organizmu kao što su metabolizam, rast, energetski bilans, homeostaza glukoze, imunski odgovor, funkcija simpatikusa i hipotalamusa, vaskularni tonus, reprodukcija i drugo (*Kershaw i Flier, 2004*).



Slika 6. Masno tkivo kao aktivan endokrini organ. Čelije masnog tkiva učestvuju u sintezi i oslobađanju brojnih hormona, citokina i faktora rasta (TNF- α -faktor nekroze tumora α ; IL-6-interleukin 6, MCP-1-hemotaktični protein monocita-1)

U adipokine se svrstavaju brojni hormoni, citokini i faktori rasta čija se ekspresija povećava sa akumulacijom visceralnog masnog tkiva i koji mogu ispoljavati svoje efekte, bilo lokalno, putem autokrine i parakrine sekrecije, bilo sistemski, putem endokrine sekrecije koja je kontrolisana neuroendokrinim signalima (*Freedland, 2004*).

Kao što je već pomenuto, telesna raspodela masnog tkiva ima važnu ulogu u patofiziologiji metaboličkog sindroma. S obzirom da je visceralno masno tkivo metabolički aktivnije u odnosu na subkutano, povećanje obima struka koje je praćeno nagomilavanjem masnih naslaga oko unutrašnjih organa predstavlja vodeći kardiometabolički

faktor rizika (*Larsson i saradnici, 1984*). Brojne studije na ljudima i laboratorijskim životinjama su pokazale da akumulacija visceralnog masnog tkiva doprinosi razvoju insulinske rezistencije i pridruženih metaboličkih poremećaja kao što su netolerancija na glukozu, nizak nivo HDL holesterola, povećanje nivoa triglicerida i hiperetenzija (*Pascot i saradnici, 2000*). Iako u literaturi ne postoji jasno definisan mehanizam koji objašnjava ulogu visceralne gojaznosti u razvoju karakteristika metaboličkog sindroma, veliki broj podataka ukazuje na značaj slobodnih masnih kiselina i citokina koji su poreklom iz visceralnog masnog tkiva.

1.2.2.1 Visceralno masno tkivo i insulinska rezistencija

Prema *teoriji lipotoksičnosti*, ćelije visceralnog masnog tkiva pokazuju veću osetljivost na lipolitičku stimulaciju od strane centralnog nervnog sistema (CNS) i slabiji odgovor na antilipolitičko dejstvo insulina, u odnosu na ćelije subkutanog masnog tkiva (*Faraj i saradnici, 2004*). Povećanje lipolitičke aktivnosti u visceralnom masnom tkivu doprinosi oslobađanju slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju. Njihov priliv u tkiva koja su osetljiva na dejstvo insulina, pre svega u jetru i mišiće, remeti homeostazu insulina, doprinosi smanjenju tolerancije na glukozu i utiče na razvoj insulinske rezistencije. Smanjena sposobnost insulina da u fiziološkim koncentracijama ostvari iskorišćavanje glukoze u tkivima dovodi do dodatne sekrecije ovog hormona iz pankreasa, u cilju održavanja optimalnog nivoa šećera u krvi, pri čemu vremenom dolazi do razvoja hiperinsulinemije (*Hamdy i saradnici, 2006*).

Brojne studije su pokazale da insulinska rezistencija u uslovima hiperinsulinemije dovodi do razvoja metaboličkih i biohemijskih poremećaja na nivou jetre, masnog tkiva i skeletnih mišića. Mehanizmi koji doprinose razvoju ovih poremećaja podrazumevaju smanjeno preuzimanje i iskorišćavanje glukoze u skeletnim mišićima, povećanje

produkcije glukoze u jetri procesom glukoneogeneze, povećanje sinteze triglicerida i VLDL holesterola i posledični razvoj dislipidemije (Boden, 1998; Svedberg i saradnici, 1990; Wajchenberg, 2000) (Slika 7).



Slika 7. Efekti visceralne gojaznosti na razvoj metaboličkog sindroma
Modifikovano prema Wajchenberg i sar. (2000)

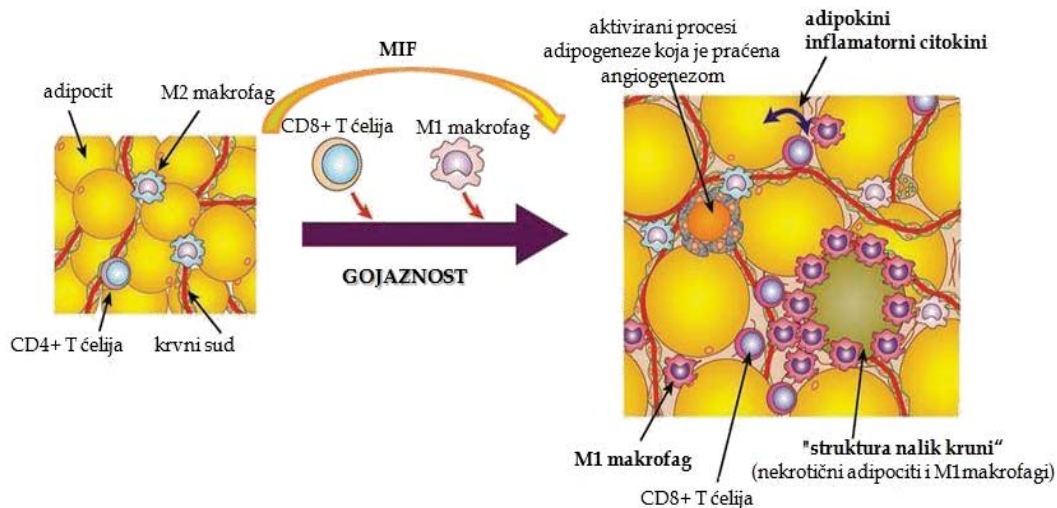
Takođe, smanjen broj insulinskih receptora u jetri usporava klirens insulina, što uz povećan priliv slobodnih masnih kiselina iz visceralnog masnog tkiva rezultuje nastankom masne infiltracije u jetri. Insulinska rezistencija u masnom tkivu dodatno doprinosi oslobađanju novih količina slobodnih masnih kiselina i utiče na povećanu produkciju proinflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora α (eng. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α), interleukin-1 (IL-1) i interleukin-6 (IL-6) (Miles i saradnici, 1997).

1.2.2.2 Visceralno masno tkivo i inflamacija

Visceralno masno tkivo doprinosi patogenezi metaboličkog sindroma i putem aktivacije inflamatornih procesa i razvoja metaboličke inflamacije. Gojaznost se često označava i kao stanje hronične inflamacije niskog intenziteta, koje se karakteriše izmenjenom

produkcijom adipokina i povećanom akumulacijom bioloških markera inflamacije, naročito makrofaga (*Weisberg i saradnici, 2003; Wellen i Hotamisligil, 2005*). Brojne studije su pokazale da je hronična inflamacija niskog intenziteta uključena u razvoj insulinske rezistencije i endotelijalne disfunkcije. Proinflamatorni citokini TNF- α i IL-6 narušavaju normalnu aktivnost insulina u adipocitima i mišićnim ćelijama i imaju značajnu ulogu tokom razvoja insulinske rezistencije (*Ierardi i saradnici, 2010*). Studije na pacovima su pokazale da je koncentracija TNF- α u cirkulaciji u korelaciji sa stepenom gojaznosti i insulinske rezistencije (*Tsigos i saradnici, 1999*). U visceralnom masnom tkivu gojaznih osoba glavni izvor TNF- α predstavljaju adipociti, ali je tokom poslednjih godina pokazano da oni nisu jedini izvor inflamatornih citokina. Naime, i neadipozne ćelije, kao što su preadipociti, endotelijalne ćelije, fibroblasti, leukociti, a naročito makrofagi, doprinose razvoju metaboličke inflamacije (*Galic i saradnici, 2010*). Kod osoba sa normalnom telesnom težinom makrofagi imaju značajnu ulogu u reparaciji tkiva i angiogenezi, i često se označavaju kao M2 ili „alternativno aktivirani“ makrofagi. Sa druge strane, jedna od glavnih morfoloških karakteristika koja se javlja tokom uvećanja masnog tkiva je povećan priliv M1 ili „klasično aktiviranih“ makrofaga iz cirkulacije u masno tkivo (*Gordon i Martinez, 2010; Gregor i Hotamisligil, 2011*). Ključnu ulogu u tim procesima ima proinflamatorni citokin, faktor koji inhibira migraciju makrofaga (eng. *macrophage migration inhibitory factor, MIF*) (*Kleemann i Bucala, 2010*).

Tokom razvoja gojaznosti, MIF funkcioniše kao hemoatraktant koji dovodi do infiltracije M1 makrofaga iz cirkulacije u hipertrofično masno tkivo. M1 makrofagi se potom nagomilavaju oko nekrotičnih adipocita ili oko ostataka njihovih lipidnih kapi i formiraju tzv. „strukture nalik kruni“ (eng. *crown-like structures*). Nekroza adipocita predstavlja poslednji korak u razvoju inflamacije u masnom tkivu (*Murano i saradnici, 2008; Nishimura i saradnici, 2009*) (**Slika 8**).



Slika 8. Infiltracija M1 makrofaga i formiranje „strukture nalik kruni“

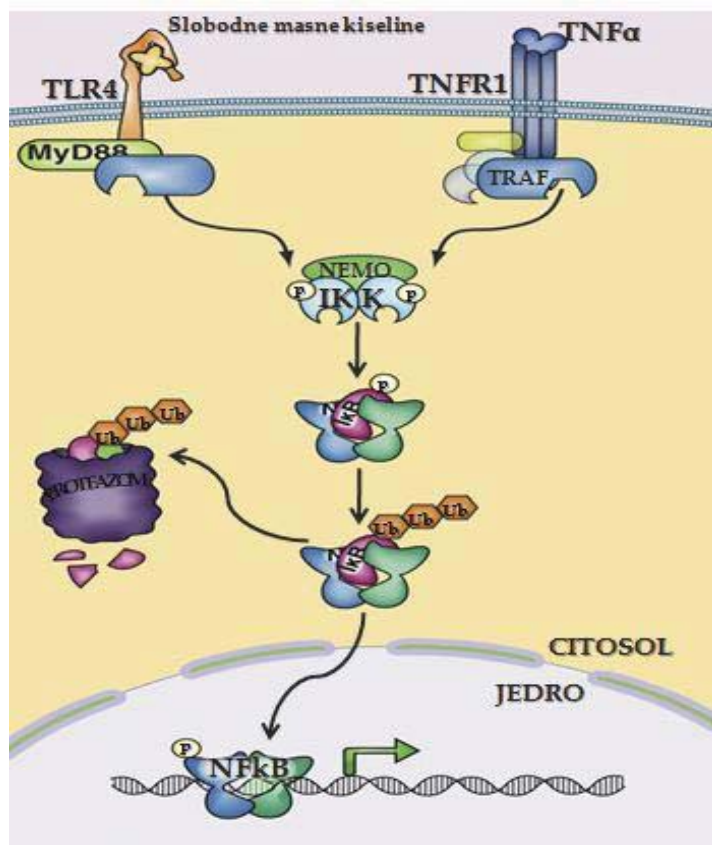
Modifikovano prema Nishimura i sar. (2008)

Makrofagi u okviru novoformiranih struktura oslobađaju nove količine citokina, i na taj način pogoršavaju inflamaciju u masnom tkivu. Glavnu ulogu u progresiji metaboličke inflamacije ima proinflamatorni citokin TNF- α koji dovodi do aktivacije signalnog puta nuklearnog faktora *kappa* B (eng. *nuclear factor kappa beta*, NF κ B) (Wisse, 2004).

Transkripcioni regulator NF κ B pripada familiji proteina NF κ B (poznata i kao Rel familija) koja se sastoji od pet članova: p50 (proizvod NF κ B1 gena), p52 (proizvod NF κ B2 gena), p65 (poznat i kao RelA), c-Rel i RelB. Članovi familije proteina NF κ B funkcionišu kao dimeri i svih pet subjedinica imaju sposobnost da grade homodimere ili heterodimere i da stupaju u interakciju sa inhibitornim proteinima I κ B. NF κ B se u citoplazmi nalazi u neaktivnoj formi, u vidu heterodimera koji je vezan sa inhibitornim proteinima I κ B. Stimulusi koji aktiviraju signalni put NF κ B, kao što su citokini TNF- α i IL-1, aktiviraju kompleks I κ B kinaze. I κ B kinaza fosforiliše I κ B i dovodi do njegovog obeležavanja molekulima ubikvitina, što za posledicu ima njegovu degradaciju u proteazomu.

Degradacija I κ B-a i izlaganje DNK-vezujućeg domena transkripcionog regulatora NF κ B obezbeđuje njegov prelazak u jedro, u kome on ostvaruje svoju funkciju u regulaciji ekspresije brojnih proinflamatornih gena (**Slika 9**) (Baker i saradnici, 2011; Karin i saradnici, 2004).

Visceralno masno tkivo doprinosi razvoju metaboličke inflamacije i preko produkcije slobodnih masnih kiselina. Višak slobodnih masnih kiselina dovodi do akumulacije bioaktivnih lipida diacilglicerola i ceramida koji takođe učestvuju u aktivaciji signalnog puta NF κ B (Hajer i saradnici, 2008; Nguyen i saradnici, 2007) (**Slika 9**).



Slika 9. Aktivacija signalnog puta transkripcionog regulatora NF κ B. Stimulusi (citokini i slobodne masne kiseline) putem vezivanja za specifične receptore (TNFR1 i TLR4) dovode do aktivacije I κ B kinaze koja fosforiliše I κ B, dovodi do njegove degradacije i obezbeđuje oslobađanje i prelazak transkripciono aktivne subjedinice NF κ B u jedro. Modifikovano prema Baker i sar. (2011); IKK-I κ B kinaza, NEMO-regulatorna subjedinica IKK, MyD88 i TRAF-adaptorski proteini, NF κ B-nuklearni faktor *kappa* B

1.3 Etiologija nastanka metaboličkog sindroma

„Ako želiš da nešto razumeš, posmatraj njegov početak i razvoj“
(Aristotel)

Tokom svoje istorije, kada voda i hrana nisu bili lako dostupni, čovek je razvio efikasan metabolički sistem za korišćenje i skladištenje energije. Prema „hipotezi siromašnog gena“ (eng. *the “thrifty gene hypothesis”*) upravo raznovrsnost i brojnost gena koji su uključeni u regulaciju energetskeg metabolizma organizma omogućili su mu evolutivnu prednost u smislu adaptacije na izazove sredine i opstanak vrste. Danas, kada su ljudi smanjili nivo fizičke aktivnosti i kada su okruženi izobiljem hrane visoke energetske vrednosti, čovek nosi teret svog evolucionog nasleđa. Gojaznost, insulinska rezistencija, poremećaji u metabolizmu lipida i glukoze, hipertenzija, metabolička inflamacija i brojni drugi metabolički poremećaji predstavljaju progresivne adaptacije na novonastale uticaje iz spoljašnje sredine. Veliki broj istraživanja tokom poslednjih decenija imao je za cilj identifikovanje faktora rizika i objašnjenje patogeneze ovih stanja. Ipak, etiologija nastanka metaboličkog sindroma je i dalje samo delimično izučena.

1.3.1 Istorijske perspektive upotrebe šećera u ishrani čoveka

Čovek nije oduvek bio konzument velike količine šećera, kao što je danas. U dalekoj prošlosti ljudi su hranu dobijali lovom i sakupljanjem plodova i njihova ishrana se uglavnom bazirala na mesu. U nutritivnom pogledu, naši preci su unosili veliku količinu proteina, nešto malo masnoća, dok je unos ugljenih hidrata bio veoma mali. Voće i bobice su predstavljali glavni izvor ugljenih hidrata. Tokom XV i XVI veka glavni zaslađivač je bio med, ali je i on korišćen u ograničenim količinama. Sve do Krstaških ratova Evropljani nisu bili upoznati sa šećerom, koji se koristio samo na Bliskom istoku. Konzumacija šećera u Evropi je bila niska sve do XVIII veka, kada je počela interkontinentalna

trgovina sa dalekim zemljama koje su proizvodile šećer. Istovremeno je došlo i do unapređenja njegove tehnološke obrade. Šećer se danas nalazi u gotovo svim prehrambenim proizvodima. U velikim količinama se nalazi u gaziranim bezalkoholnim pićima, prerađevinama od mesa, mlečnim i pekarskim proizvodima. Takav uticaj prehrambene industrije doveo je do značajnog povećanja unosa fruktoze u ishrani savremenog čoveka (*Basciano i saradnici, 2005*).

1.4 Ishrana bogata fruktozom kao model metaboličkog sindroma

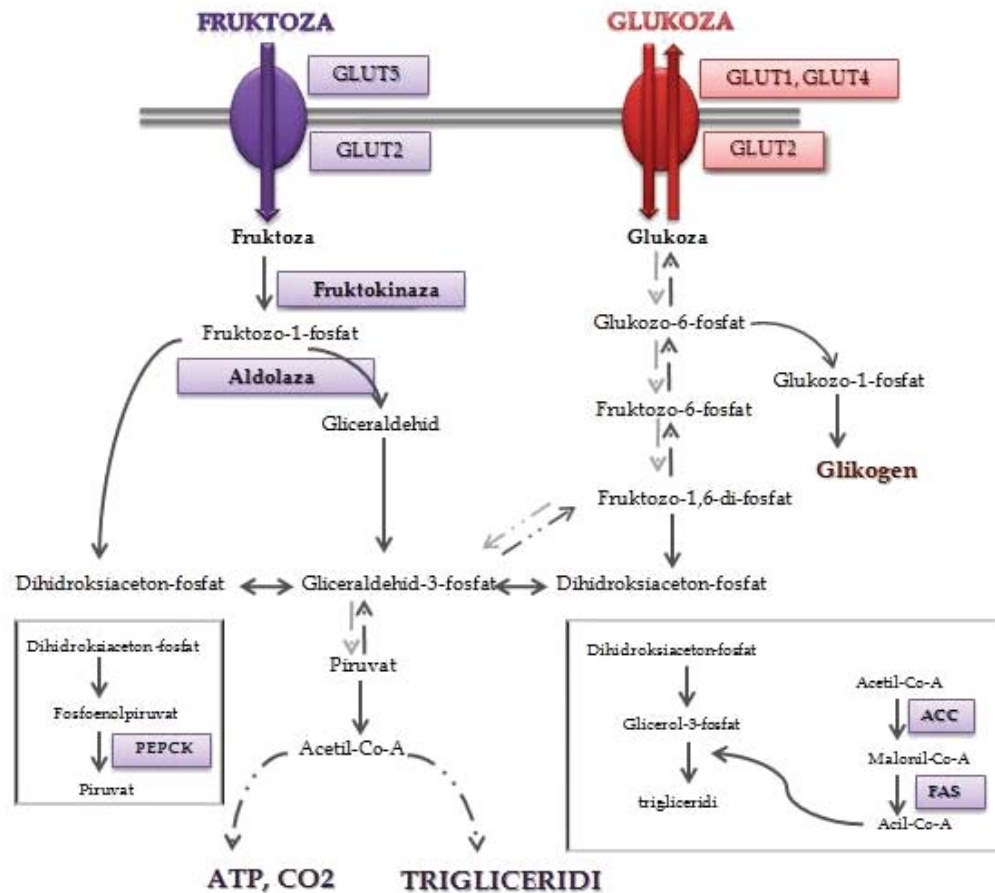
To slatko prokletstvo...

Fruktoza ili voćni šećer je ugljeni hidrat koji, zajedno sa glukozom i galaktozom, pripada grupi monosaharida. Nalazi se u hrani biljnog porekla, a glavni prirodni izvori fruktoze su voće i med. U industrijskoj proizvodnji najčešće se dobija iz šećerne repe, šećerne trske i kukuruza i upotrebljava se u obliku kristalne forme, visoko-fruktoznog kukuruznog sirupa koji predstavlja mešavinu fruktoze (55%), glukoze (42%) i vode (3%) ili u obliku saharoze (beli šećer) (*Hardinge i saradnici, 1965; Southgate i saradnici, 1978*).

1.4.1 Metabolizam fruktoze u jetri

Iako je fruktoza po hemijskoj strukturi slična glukozu, njihov metabolizam se znatno razlikuje. Glukoza se apsorbuje iz creva pomoću kotransportera zavisnog od natrijuma, dok se apsorpcija fruktoze u crevima dešava procesom olakšanog transporta preko transportnog proteina za glukozu GLUT5 (eng. *glucose transporter 5*). U jetri, fruktoza se brzo apsorbuje iz portalne krvi putem transportnog proteina GLUT2

(eng. *glucose transporter 2*) (Corpe i saradnici, 1999; Douard i Ferraris, 2008) (Slika 10).



Slika 10. Metabolizam fruktoze i glukoze u jetri. Za razliku od glukoze, metabolizam fruktoze započinje fosforilacijom fruktoze u fruktozo-1-fosfat pri čemu se preskače glavni regulatorni korak glikolize. Intermedijeri metabolizma fruktoze predstavljaju glavne prekursore u sintezi triglicerida. PEPCK-fosfoenolpiruvat karboksikinaza; ACC-karboksilaza acetil-koenzima A; FAS-sintaza masnih kiselina; GLUT-transporter za glukozu

Za razliku od glukoze koja se metaboliše u skoro svim tkivima, fruktoza se metaboliše skoro isključivo u jetri. Prvi korak u metabolizmu fruktoze je fosforilacija fruktoze u fruktozo-1-fosfat uz pomoć enzima fruktokinaze. Fruktozo-1-fosfat podleže hidrolizi od strane enzima aldolaze B i transformiše se u dve trioze, gliceraldehid i dihidroksiaceton-fosfat, koji je intermedijer glikolize. Fruktoza, dakle,

ulazi u glikolitički put preskačući prvih nekoliko koraka u ovom procesu, u koje je uključena fosfofruktokinaza kao glavni regulatorni enzim glikolize. Zbog visokog afiniteta enzima fruktokinaze prema fruktozi i odsustva negativne povratne inhibicije fosfofruktokinaze ATP-om i citratom, razgradnja fruktoze je praktično nekontrolisana i dovodi do produkcije viška triozofosfata (Mayes, 1993). Nastali produkti metabolizma fruktoze učestvuju u glukoneogenezi, kao i u putevima sinteze masnih kiselina i triglicerida (Henry i saradnici, 1991). Glicerinaldehid podleže fosforilaciji do glicerinaldehid-3-fosfata, koji se uključuje u formiranje glukoze ili glikogena, ili se dalje razlaže do piruvata i oksiduje do CO₂ i H₂O tokom ciklusa trikarboksilnih kiselina.

Jedan deo ugljenikovih atoma poreklom iz metabolizma fruktoze može se naći i u molekulima masnih kiselina, putem procesa *de novo* lipogeneze. Unos velike količine fruktoze povećava produkciju piruvata što dovodi do formiranja acetil-koenzima A (eng. *acetyl-Co-A*), glavnog supstrata za sintezu masnih kiselina. Dihidroksiaceton-fosfat koji nastaje u prvim koracima metabolizma fruktoze prevodi se u glicerol-3-fosfat, a potom i u molekul glicerola koji zajedno sa tri molekula masnih kiselina procesom esterifikacije formira molekul triglicerida (Mayes, 1993). S obzirom da su intermedijeri metabolizma fruktoze glavni prekursori za sintezu triglicerida, fruktoza predstavlja jedan od najlipogenijih nutrijenata (Dekker i saradnici, 2010; Sheludiakova i saradnici, 2012).

1.4.2 Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma

Kao što je već rečeno, upotreba gaziranih i negaziranih bezalkoholnih napitaka u kojima se fruktoza najčešće nalazi u vidu visoko-fruktoznog kukuruznog sirupa je dramatično povećana tokom poslednjih nekoliko decenija i smatra se jednim od glavnih uzročnika

povećanja prevalence gojaznosti i sa njom pridruženih metaboličkih poremećaja (*Basciano i saradnici, 2005; Elliott i saradnici, 2002; Marriott i saradnici, 2009; Miller i Adeli, 2008*). Zaslađeni napici sadrže takozvane „prazne“ kalorije (eng. *empty calories*) koje imaju visoku energetska, ali nisku hranljivu vrednost. U odnosu na čvrstu hranu, tečna hrana ima drugačiji uticaj na osećaj sitosti, pri čemu lako dolazi do njenog prekomernog unosa. Tečna hrana ne zahteva žvakanje, što dovodi do smanjenog odgovora pankreasa i do smanjene sekrecije insulina. Ona brže prolazi kroz želudac u odnosu na čvrstu hranu i ne uzrokuje dovoljnu produkciju hormona grelina, koji služi kao signal iz gastrointestinalnog trakta za inhibiciju unosa hrane (*Havel, 2005*).

Studije u kojima su analizirani endokrini i metabolički efekti napitaka zaslađenih glukozom i fruktozom su pokazale da od svih šećera koji se koriste kao zaslađivači fruktoza najviše doprinosi poremećajima u regulaciji unosa hrane i razvoju gojaznosti (*Stanhope i Havel, 2008a*). Dugoročna ishrana koja sadrži veliku količinu fruktoze dovodi do razvoja leptinske i insulinske rezistencije, poremećaja u metabolizmu lipida i razvoja visceralne gojaznosti (*Tappy i Le, 2010*). Fruktoza izaziva osećaj sitosti koji kraće traje nego osećaj sitosti poreklom od iste količine glukoze. Za razliku od glukoze, povećan unos fruktoze dovodi do poremećaja u signalnim putevima nekoliko neuroendokrinih faktora koji imaju važnu ulogu u dugoročnoj regulaciji energetske bilansa (*Aller i saradnici, 2011; Bray i saradnici, 2004*). U odnosu na glukozu, fruktoza izaziva manji nivo sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa, najverovatnije usled nedostatka transportera GLUT5 na membranama β -ćelija (*Curry, 1989*). Iako fruktoza ne stimuliše sekreciju insulina, pokazano je da nakon ishrane koja je obogaćena fruktozom dolazi do smanjene osetljivosti na insulin i razvoja hiperinsulinemije i/ili insulinske rezistencije (*Le i saradnici, 2009; Reaven i saradnici, 1990*). Takođe, pokazano je da fruktoza doprinosi poremećajima u regulaciji unosa hrane i na nivou CNS-a putem smanjenja produkcije leptina i razvoja leptinske rezistencije (*Botezelli i saradnici, 2010; Shapiro i saradnici,*

2008). Poremećaji u leptinskoj signalizaciji predstavljaju jedan od mogućih mehanizama kojim ishrana koja sadrži veliku količinu fruktoze doprinosi razvoju gojaznosti i metaboličkog sindroma (*Scarpace i Zhang, 2009*).

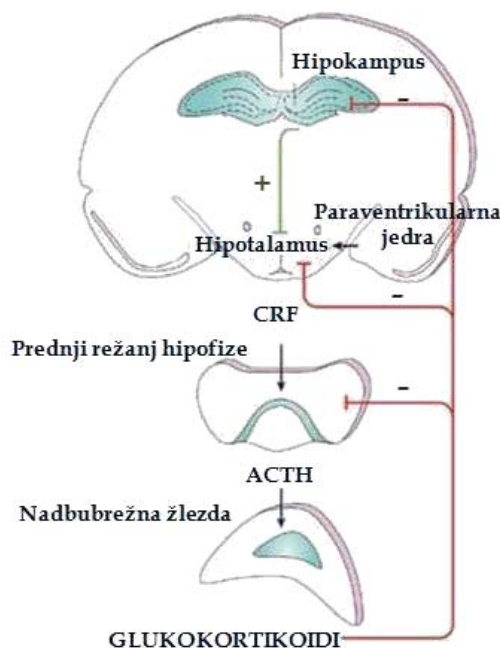
Istraživanja koja su poredila pojedinačne efekte fruktoze, glukoze i saharoze na povećanje telesne težine pokazala su da fruktoza, ali ne i glukoza, stimuliše *de novo* lipogenezu u jetri i doprinosi povećanju koncentracije triglicerida u cirkulaciji nakon obroka (*Khitan i Kim, 2013; Tappy i saradnici, 2013*). Istraživanja na ljudima i laboratorijskim pacovima su pokazala da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do smanjenja nivoa lipidne oksidacije, što zajedno sa povećanom količinom triglicerida doprinosi akumulaciji masnih naslaga i razvoju gojaznosti (*Kelley i saradnici, 2004; Le i saradnici, 2009*). Kao rezultat povećane lipogene aktivnosti, fruktoza dovodi do povećanja nivoa lipida i u neadipoznim tkivima, jetri i mišićima (ektopična mast), što rezultuje razvojem masne infiltracije jetre i sistemske insulinske rezistencije, koje zajedno sa visceralnom gojaznošću čine osnovu metaboličkog sindroma (*Havel, 2005; Jurgens i saradnici, 2005*).

1.5 Glukokortikoidni hormoni i razvoj metaboličkog sindroma

Glukokortikoidni hormoni, zajedno sa mineralokortikoidnim i polnim hormonima, pripadaju klasi steroidnih hormona. Glukokortikoidi se nazivaju i hormonima stresa jer spadaju u najvažnije hormone koji se sekretuju u odgovoru organizma na stres (*Datson i saradnici, 2001; McEwen, 2008*).

1.5.1 Sinteza i sekrecija glukokortikoidnih hormona

Glukokortikoidi se sintetišu iz holesterola i oslobađaju iz kore nadbubrežne žlezde pod kontrolom hipotalamusa i hipofize, kao krajnji produkti hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalne (HHA) ose (**Slika 11**).



Slika 11. Hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalna osa.

Paraventrikularna jedra hipotalamusa oslobađanjem kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRF) kontrolišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize. ACTH stimuliše oslobađanje kortikosterona ili kortizola iz korteksa nadbubrežne žlezde

Hipotalamus, i to posebno paraventrikularna jedra hipotalamusa, predstavljaju primarnu strukturu CNS-a koja je uključena u regulaciju HHA ose. Ova jedra su glavno mesto sinteze peptida, oslobađajućeg faktora kortikotropina (eng. *corticotrophin releasing factor*, CRF), koji je glavni regulator sinteze i sekrecije adrenokortikotropnog hormona (eng. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) iz hipofize. CRF putem hipofiznih portalnih sudova dospeva do prednjeg režnja hipofize, gde dovodi do stimulacije sinteze i sekrecije prekursorskog peptida ACTH, proopiomelanokortina (POMC), i posledično samog ACTH. ACTH oslobođen u krvotok indukuje sintezu i sekreciju glukokortikoidnih hormona iz fascikularne zone kore adrenalne žlezde (*Engelmann i saradnici, 2004*). Sintetisani glukokortikoidi dospevaju u krv, gde se

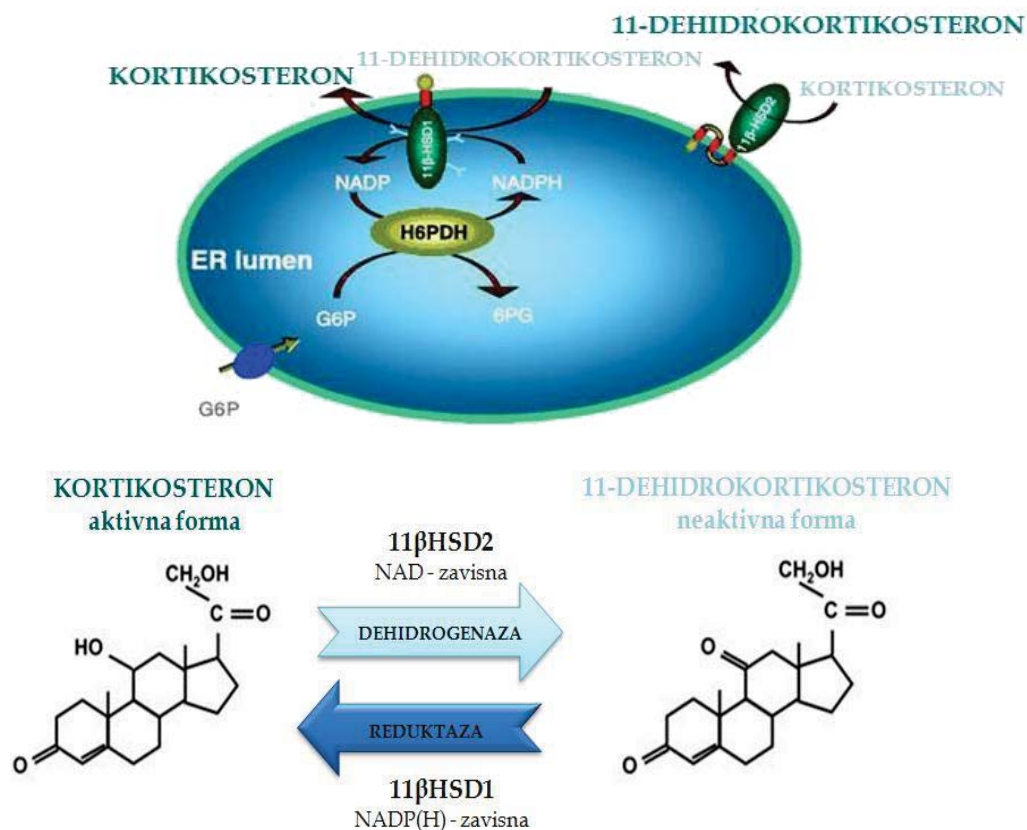
neaktivne forme najvećim delom transportuju u slobodnom obliku, dok se aktivni glukokortikoidi vezuju za kortikosteroid-vezujući globulin, i delom za albumin (*Dunn i saradnici, 1981*). Obrazac sekrecije glukokortikoidnih hormona ima cirkadijalni ritam. Kod ljudi, maksimum sekrecije aktivnih formi glukokortikoida se javlja u ranim jutarnjim časovima, dok se minimum javlja oko ponoći. Situacija je obrnuta kod životinja koje su aktivne noću, kao što su pacovi (*Wang, 2005*). Aktivnost HHA ose je regulisana mehanizmom negativne povratne sprege koja funkcioniše na nekoliko nivoa. Kada su u cirkulaciji prisutne visoke koncentracije glukokortikoida, oni mehanizmom negativne povratne sprege deluju na adenohipofizu i hipotalamus, inhibirajući sintezu hormona CRF i ACTH (*Keller-Wood i Dallman, 1984*). Pored ove, dugačke negativne povratne sprege, postoji i kratka, kao i ultrakratka negativna povratna sprega. Kratkom povratnom spregom ACTH deluje na hipotalamus inhibirajući sintezu CRF, a ultrakratkom CRF iz sistemske cirkulacije inhibira sopstvenu sintezu (*Calogero i saradnici, 1988*) **(Slika 11)**.

U ćeliji se glukokortikoidi nalaze u dve forme: aktivnoj (kortizol kod ljudi i kortikosteron kod pacova) i neaktivnoj formi (kortizon kod ljudi i 11-dehidrokortikosteron kod miševa i pacova) (*Joels i de Kloet, 1994*).

Koncentracija aktivnih formi glukokortikoidnih hormona u ćeliji je regulisana na više načina. Endokrina kontrola putem aktivnosti HHA ose obezbeđuje konstantan nivo glukokortikoida u cirkulaciji. Sa druge strane, unutarćelijska koncentracija glukokortikoidnih hormona se znatno menja u odgovoru na fiziološke uslove u ćeliji i pod kontrolom je enzima koji učestvuju u unutarćelijskom metabolizmu hormona koji se označava i kao prereceptorski metabolizam (*Tomlinson i saradnici, 2004a*).

1.5.1.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona

Prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona predstavlja važan faktor regulacije unutarćelijske koncentracije glukokortikoida putem interkonverzije aktivnih formi glukokortikoida (kortizola i kortikosterona) i njihovih neaktivnih, 11-keto metabolita (kortizona i dehidrokortikosterona), koju katalizuje enzim 11 β hidroksisteroid dehidrogenaza (11 β HSD) (Seckl i Walker, 2001; Walker i saradnici, 2001). Okarakterisane su dve izoforme enzima 11 β HSD koje su odgovorne za tkivno-specifičnu interkonverziju glukokortikoidnih hormona: 11 β hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (11 β HSD1) i 11 β hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2 (11 β HSD2) (Slika 12) (Draper i Stewart, 2005).



Slika 12. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida.
 Modifikovano prema Draper i sar. (2005). G6P-glukoza-6-fosfat;
 6PG-6-fosfoglukonat

Izoforme su proizvodi različitih gena i imaju različite katalitičke sposobnosti, fiziološke uloge i tkivnu rasprostranjenost (*Tomlinson i saradnici, 2004b; Walker i Stewart, 2003*).

Enzim 11β HSD2 je dehidrogenaza zavisna od nikotinamid adenin dinukleotida (NAD-a) koja katalizuje oksidaciju aktivnih formi glukokortikoida u metabolički neaktivne forme (*Gathercole i Stewart, 2010; Sandeep i Walker, 2001*). Ovaj enzim pre svega služi za inaktivaciju glukokortikoidnih hormona u ciljnim tkivima mineralokortikoidnih hormona, kao što su bubrezi, placenta, pljuvačne i znojne žlezde (*Brown i saradnici, 1996; Sandeep i saradnici, 2004*). Na ovaj način, mineralokortikoidni receptor se štiti od vezivanja glukokortikoidnih hormona za koje ima visok afinitet i povećava se njegova specifičnost za vezivanje aldosterona (Stewart, Corrie et al. 1988; Funder, Pearce et al. 1990). Tokom razvića, u placenti i tkivima fetusa postoji visok nivo 11β HSD2, čime se fetus štiti od dejstva glukokortikoidnih hormona majke koji mogu da utiču na smanjenje telesne težine novorođenčeta, ali i na razvoj hipertenzije, hiperglikemije i poremećaja u ponašanju u odraslom dobu (*Diaz i saradnici, 1998; Nyirenda i saradnici, 1998*).

Za razliku od enzima 11β HSD2, 11β HSD1 je oksoreduktaza/dehidrogenaza zavisna od nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP(H)*). Enzim 11β HSD1 predominantno funkcioniše kao reduktaza i dovodi do lokalnog povećanja koncentracije aktivnih formi glukokortikoida u metabolički aktivnim organima, kao što su jetra, masno tkivo, mozak, pluća, skeletni mišići i gonade (*Gathercole i Stewart, 2010; Sandeep i Walker, 2001*). Njegova reduktazna aktivnost je zavisna od prisustva kofaktora NADPH, čija je sinteza rezultat aktivnosti enzima heksozo-6-fosfat dehidrogenaze (eng. *hexose-6-phosphate dehydrogenase, H6PDH*). Naime, NADPH nastaje od NADP^+ u reakciji u kojoj enzim H6PDH prevodi glukozo-6-fosfat

poreklom iz citoplazme u 6-fosfoglukonat unutar lumena endoplazmatskog retikuluma (**Slika 12**) (*Draper i Stewart, 2005*). Protein H6PDH je fizički spregnut sa enzimom 11 β HSD1 na unutrašnjoj površini membrana endoplazmatskog retikuluma gde održava redukcionu potencijal neophodan za aktivnost 11 β HSD1 i predstavlja glavnu kontrolnu tačku njegove enzimske aktivnosti (*Bujalska i saradnici, 2005*). Istraživanja na miševima kojima nedostaje enzim H6PDH (*knockout* H6PDH -/- miševi) su pokazala da u odsustvu H6PDH ne dolazi do aktivacije glukokortikoidnih hormona. U takvim uslovima, enzim 11 β HSD1 funkcioniše kao dehidrogenaza (*Atanasov i saradnici, 2008; Banhegyi i saradnici, 2004; Bujalska i saradnici, 2005*).

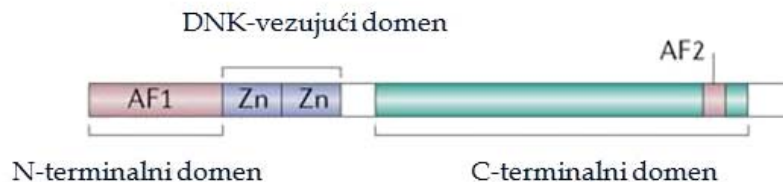
1.5.2 Molekularni mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona

Glukokortikoidni hormoni svoje efekte na različite ćelijske procese ostvaruju vezivanjem za specifični unutarćelijski receptor, glukokortikoidni receptor (GR).

Glukokortikoidni receptor pripada filogenetski konzerviranoj superfamiliji jedarnih receptora u koje spadaju i receptori za druge steroidne hormone (mineralokortikoide, androgene, progestine, estrogene), receptori za vitamin D, tireoidne hormone i retinoičnu kiselinu, kao i veliki broj „receptora siročića“ (eng. *orphan receptors*) za koje još nisu identifikovani specifični ligandi (*Evans, 1988*).

GR se sastoji iz tri funkcionalna domena (**Slika 13**): N-terminalnog domena (eng. *N-terminal transactivation domain*, NTD), centralnog domena za vezivanje za DNK (eng. *DNA-binding domain*, DBD) koji u svojoj strukturi sadrži Zn²⁺-prste i C-terminalnog domena za vezivanje hormona (eng. *ligand-binding domain*, LBD). C-terminalni domen pokazuje i transaktivirajuću funkciju (region AF-2), dok

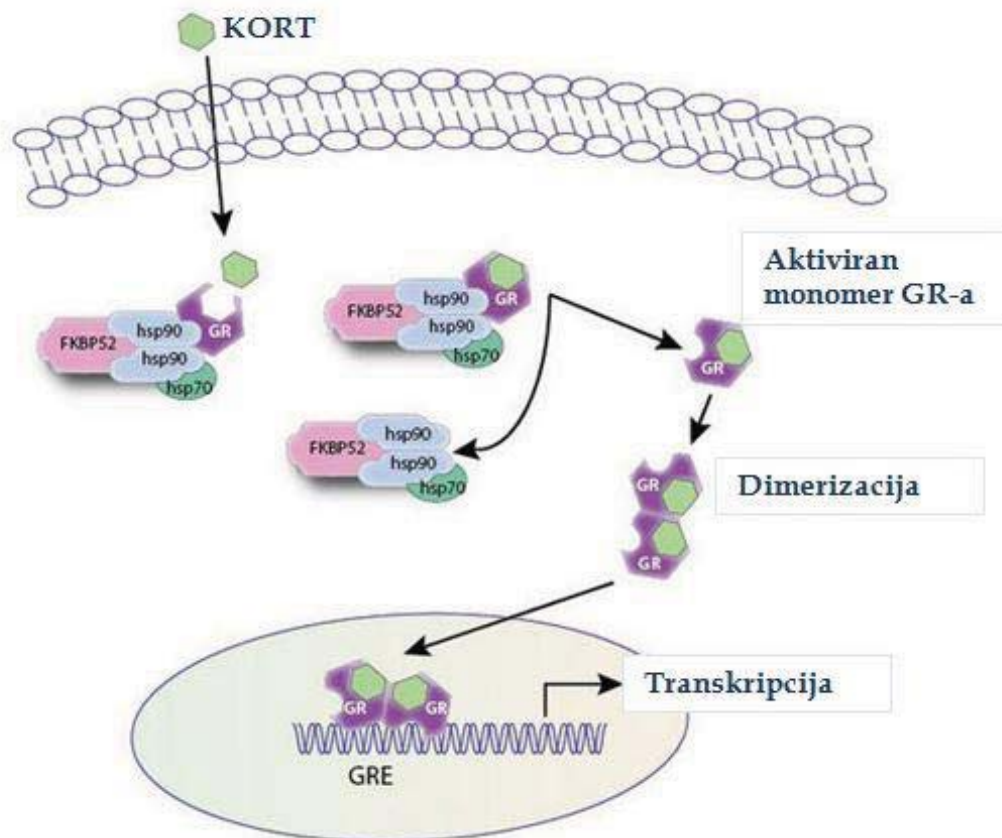
N-terminalni region reguliše transkripciju nezavisno od vezivanja hormona (region AF-1) (McMaster i Ray, 2007).



Slika 13. Funkcionalni domeni glukokortikoidnog receptora

U odsustvu liganda GR se u citoplazmi nalazi u okviru multiproteinskog šaperonskog kompleksa molekulske mase 300 kDa (Pratt i saradnici, 2004) u čiji sastav ulazi sam receptor, odnosno subjedinica veličine 94 kDa koja vezuje steroid (apo-receptor), dva molekula proteina toplotnog šoka Hsp90 (eng. *heat shock protein*, Hsp), po jedan molekul Hsp56 i Hsp70, protein molekulske mase 59 kDa (p59), imunofilini FK506-vezujuće klase i rapamicin-vezujuće klase i protein molekulske mase 23 kDa (p23) (Pratt i saradnici, 1996) (Slika 14). U odsustvu hormona, multiproteinski kompleks je neaktivan i prolazi kroz stalne cikluse disocijacije, kao i ATP-zavisne i Hsp70-zavisne reasocijacije (Hutchison i saradnici, 1993). Nakon ulaska u ćeliju procesom olakšane difuzije, glukokortikoidni hormoni se reverzibilno vezuju za GR i formiraju aktivni kompleks hormon-receptor. Kao posledica ove interakcije dolazi do niza alosteričnih promena receptora koje su označene kao aktivacija ili transformacija. Tokom procesa aktivacije dolazi do ireverzibilne disocijacije receptora iz multiproteinskog kompleksa, dimerizacije i delimično fosforilisan receptor postaje hiperfosforilisan. Konformacionim promenama dolazi do izlaganja dela receptora koji nosi signal za lokalizaciju u jedro što omogućava kompleksu hormon-receptor da pređe u jedro. U jedru dolazi do aktivacije njegove aktivnosti kao transkripcionog regulatora. Aktivirani receptor može da utiče na transkripciju na dva načina: direktno, vezivanjem za specifičnu regulatornu sekvencu regulisanu

glukokortikoidima (eng. *glucocorticoid responsive element*, GRE) (Slika 14) ili indirektno, interakcijom sa drugim transkripcionim regulatorima bez direktnog vezivanja za DNK (Bamberger i saradnici, 1996; Lu i Cidlowski, 2004; Schaaf i Cidlowski, 2002). U promotorima nekih gena vezivanje aktiviranog kompleksa hormon-receptor za negativne GRE (nGRE) sekvence dovodi do inhibicije transkripcije, s tim što u interakciji sa drugim transkripcionim regulatorima (NF κ B) može dovesti i do stimulacije (Almawi i Melemedjian, 2002).



Slika 14. Aktivacija signalnog puta GR-a. Neaktivni GR se nalazi u citoplazmi vezan za multimerni šaperonski kompleks. Vezivanjem liganda dolazi do disocijacije šaperona i aktivacije receptora

1.5.3 Fiziološka uloga glukokortikoidnih hormona

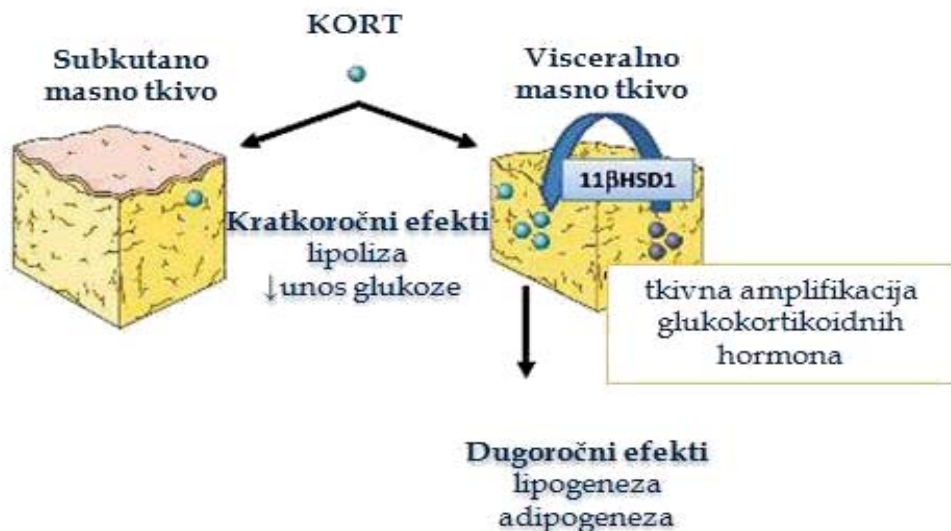
Glukokortikoidni hormoni modulišu veliki broj fizioloških funkcija uključenih u metaboličke, inflamatorne i bihevioralne procese. Ovi hormoni imaju nezaobilaznu ulogu u održavanju homeostaze i njihovi efekti se ostvaruju u svakom organskom sistemu organizma. Tokom kratkoročnog delovanja glukokortikoidi omogućavaju organizmu da se na adekvatan način izbori sa fizičkim i psihičkim stresom. Oni stimulišu razlaganje ugljenih hidrata i proteina i imaju efekte na skladištenje i razlaganje lipida (*Havel, 2001; Wang, 2005*).

Metabolički efekti glukokortikoida su povezani sa poremećajima koji se javljaju u stanju hepatične i periferne insulinske rezistencije, gojaznosti, dislipidemije, unosa hrane i poremećaja u metabolizmu glukoze (*Walker, 2006*).

Glukokortikoidni hormoni deluju kao antagonisti insulina, povećavaju nivo šećera u krvi i smanjuju unos šećera u periferna tkiva čime doprinose razvoju insulinske rezistencije. Ovi hormoni stupaju u interakciju sa transporterima za glukozu i sprečavaju njihovu translokaciju na plazma membranu, i na taj način smanjuju unos glukoze u jetru i periferna tkiva (*Dallman i saradnici, 2004*). Glukokortikoidi deluju i na β -ćelije pankreasa gde inhibiraju sekreciju insulina (*Delaunay i saradnici, 1997*), dok u jetri povećavaju aktivnost enzima koji su uključeni u procese sinteze masnih kiselina i glukoneogeneze. Naime, glukokortikoidni hormoni povećavaju transkripciju gena za glavne enzime uključene u proces glukoneogeneze, kakvi su fosfoenolpiruvat karboksikinaza (eng. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCCK) i glukozo-6-fosfataza (eng. *glucose-6-phosphatase*, G6P) (*Hanson i Reshef, 2003*).

Pored opisanih funkcija, glukokortikoidi imaju značajnu ulogu i kao važni regulatori homeostaze lipida. Ovi hormoni mogu da ostvaruju različite metaboličke funkcije u masnom tkivu, u zavisnosti od dužine

trajanja, energetskog statusa u ćeliji i tipa masnog tkiva (**Slika 15**). U visceralnom masnom tkivu, oni mogu da utiču na diferencijaciju adipocita koja je praćena sintezom lipida, što dovodi do povećanja mase masnog tkiva (*Ailhaud i saradnici, 1991; Samra i saradnici, 1998*).



Slika 15. Dvojaka uloga glukokortikoidnih hormona u metabolizmu lipida

Nasuprot tome, u subkutanom masnom tkivu glukokortikoidi utiču na procese oksidacije i razlaganje lipida što dovodi do oslobađanja masnih kiselina u cirkulaciju i razvoja sistemske insulinske rezistencije (*Bjorntorp, 1996; Mattsson i Olsson, 2007*).

Glukokortikoidni hormoni su i važni regulatori imunskog sistema i inflamatornih procesa. Pokazano je da mogu da utiču na smanjenje ekspresije brojnih proinflamatornih citokina kao što su IL-1, TNF- α i IL-6, ali i na povećanje ekspresije antiinflamatornih citokina kao što su interleukin 10 (IL-10) i transformišući faktor rasta tipa β (eng. *transforming growth factor β* , TGF- β) (*Franchimont i saradnici, 2002*). Glukokortikoidi deluju i kao imunomodulatori, jer u zavisnosti od koncentracije i vremena delovanja mogu da dovedu i do aktivacije i do supresije imunskog odgovora u ćeliji. Tokom inflamacije,

proinflatorni citokini aktiviraju HHA osu što dovodi do povećane produkcije glukokortikoida, koji sa druge strane svojim imunosupresivnim dejstvom utiču na smanjenje inflamacije u ćeliji (Grundy i saradnici, 2008).

Glukokortikoidni hormoni imaju važnu ulogu i u CNS-u gde učestvuju u regulaciji kognitivnih i neuroendokrinih funkcija, kao i u promenama raspoloženja i ponašanja. Posebno značajan aspekt delovanja ovih hormona na CNS predstavlja njihova sposobnost da modulišu unos hrane (Buckingham, 2006; Chrousos i Kino, 2007). Naime, glukokortikoidni hormoni, sa jedne strane, a insulin i leptin, sa druge, imaju recipročne efekte na unos hrane i skladištenje energetske rezerve u perifernim tkivima. Pokazano je da u CNS-u, insulin i leptin inhibiraju, dok glukokortikoidi stimulišu apetit. Pretpostavlja se da glukokortikoidi svoje efekte na unos hrane i energetske homeostazu ostvaruju delovanjem na centre za glad u specifičnim regionima mozga i stimulacijom ekspresije neuropeptida Y (eng. *neuropeptide Y*, NPY) (Schwartz i saradnici, 2000; Strack i saradnici, 1995). Kod ljudi i pacova povećan nivo glukokortikoida dovodi do stimulacije unosa hrane koja sadrži velike količine šećera i koja se naziva i „hranom utehe“ (eng. *comfort foods*) (Peckett i saradnici, 2011).

1.5.4 Uloga glukokortikoidnih hormona u metaboličkim poremećajima

Vague i Garrigues su još davne 1956. godine ukazali na značaj glukokortikoida u telesnoj distribuciji masnih naslaga, naročito na akumulaciju u predelu oko unutrašnjih organa i razvoj visceralne gojaznosti (Vague i Garrigues, 1956).

Dugoročni efekti glukokortikoida dovode do razvoja brojnih metaboličkih poremećaja i kliničkih sindroma. Najbolji primer za to su

osobe sa Kušingovim sindromom (eng. *Cushing's syndrome*), kod kojih hronično visoki nivo glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji uzrokuje razvoj gojaznosti, hipertenzije, poremećaja u metabolizmu lipida i imunskom odgovoru. Kod pacijenata sa Kušingovim sindromom uočava se redistribucija masnog tkiva u telu i dolazi do akumulacije masnih naslaga u predelu abdomena, vrata i obraza i povećava se količina visceralnog masnog tkiva (*Macfarlane i saradnici, 2008*). Takav obrazac centralne akumulacije masnog tkiva, koji je praćen i poremećajima u metabolizmu glukoze i insulinskom rezistencijom, veoma je sličan kliničkoj slici metaboličkog sindroma i ukazuje na značajnu ulogu glukokortikoidnih hormona u njegovoj patogenezi (*Newell-Price, 2008*).

Povećan nivo glukokortikoida, bilo da je posledica povećane aktivnosti HHA ose (*Rebuffe-Scrive i saradnici, 1988*), ili mutacija u određenim genima (*Liu i saradnici, 2003*), povezan je sa razvojem gojaznosti, insulinske rezistencije i dislipidemije (*Friedman i saradnici, 1996; Veyrat-Durebex i saradnici, 2012*). Za razliku od Kušingovog sindroma, koji se karakteriše povećanjem nivoa aktivnih formi glukokortikoidnih hormona u plazmi, osobe sa metaboličkim sindromom imaju normalan, ili čak smanjen, nivo glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji usled povećanog klirensa reduktazama A-prstena (5 α i 5 β reduktaze) (*Drake i saradnici, 2005; Tomlinson i saradnici, 2008*). U slučaju metaboličkog sindroma dolazi do promene u metabolizmu glukokortikoida u metabolički aktivnim tkivima, pre svega do povećanja nivoa aktivnih formi glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu (*Seckl i saradnici, 2004*).

Istraživanja na ljudima i pacovima su pokazala da enzim 11 β HSD1 ima važnu ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma i gojaznosti. Kod gojaznih ljudi (*Wake i saradnici, 2003*), kao i kod eksperimentalnih životinja koje su model gojaznosti (*Livingstone i saradnici, 2000*), povećana je ekspresija iRNK za enzim 11 β HSD1 u visceralnom masnom tkivu. Miševi kojima nedostaje enzim 11 β HSD1

(*knockout* 11 β HSD1 -/- miševi) su vijabilni, sposobni za normalnu reprodukciju i imaju normalan životni vek. Ishrana koja sadrži veliki količinu masnoće kod njih ne dovodi do narušavanja tolerancije na glukozu i insulinske osetljivosti (Kotelevtsev i saradnici, 1997; Masuzaki i saradnici, 2001; Morton i saradnici, 2004). Sa druge strane, kod miševa koji imaju povećan nivo enzima 11 β HSD1 u jetri dolazi do razvoja insulinske rezistencije, dislipidemije i hipertenzije, ali ne i do gojaznosti (Paterson i saradnici, 2004). Suprotno tome, povećan nivo 11 β HSD1 u masnom tkivu doprinosi razvoju visceralne gojaznosti, hiperinsulinemije i insulinske rezistencije, i koristi se kao mišji model metaboličkog sindroma (Masuzaki i saradnici, 2001).

1.6 Metabolizam lipida u masnom tkivu

Masno tkivo ima važnu regulatornu ulogu u održavanju energetske homeostaze putem skladištenja ili oslobađanja energije u zavisnosti od energetske potrebe organizma. Tokom perioda pozitivnog energetske stanja u ćeliji (povećan unos hrane i/ili nizak nivo fizičke aktivnosti) višak energije se skladišti u masnom tkivu u formi triglicerida procesom lipogeneze. U uslovima energetske deficita (gladovanje i/ili povećana fizička aktivnost) aktivira se proces lipolize koja putem hidrolize triglicerida dovodi do oslobađanja masnih kiselina u cirkulaciju.

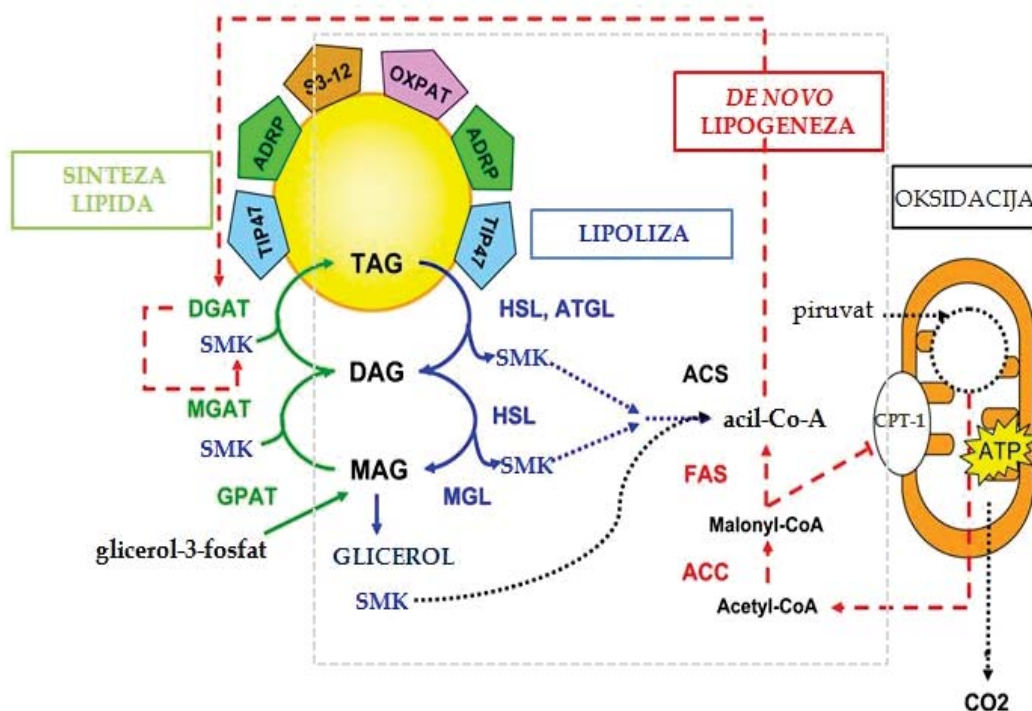
1.6.1 Lipoliza

Lipoliza ili razlaganje lipida skladištenih u formi triglicerida je višestepeni proces oslobađanja energije koji je regulisan aktivnošću tri enzima: lipaze triglicerida adipocita (eng. *adipose triglyceride lipase*, ATGL), lipaze osetljive na dejstvo hormona (eng. *hormone-sensitive lipase*, HSL) i lipaze monoacilglicerola (eng. *monoacylglycerol lipase*, MGL).

U ćelijama masnog tkiva, ATGL katalizuje prvi korak lipolize pri čemu se molekul triacilglicerola prevodi u molekul diacilglicerola uz oslobađanje jednog molekula masnih kiselina. Primarna funkcija enzima HSL je razlaganje molekula diacilglicerola na monoacilglicerol i još jedan molekul masne kiseline. Enzim MGL katalizuje poslednji korak lipolize i odgovoran je za razlaganje monoacilglicerola na glicerol i treći molekul masnih kiselina (*Carmen i Victor, 2006; Zechner i saradnici, 2012*) (**Slika 16**). Masne kiseline se kroz cirkulaciju prenose vezane za albumin ili u formi triglicerida unutar hilomikrona ili VLDL-a (*Large i saradnici, 2004*). Enzim lipaza lipoproteina (eng. *lipoprotein lipase, LPL*), koja se nalazi na spoljašnjoj površini adipocita, katalizuje oslobađanje masnih kiselina iz hilomikrona ili VLDL-a omogućavajući na taj način njihov unos u adipocite, gde masne kiseline podležu reesterifikaciji i skladištenju u formi triglicerida (*Macfarlane i saradnici, 2008*).

1.6.2 Lipogeneza

Ishrana koja sadrži veliku količinu ugljenih hidrata značajno doprinosi povećanju *de novo* lipogeneze. *De novo* lipogeneza predstavlja metabolički put sinteze masnih kiselina poreklom od supstrata koji nisu lipidne prirode (*Strable i Ntambi, 2010*). Novija istraživanja pokazuju da pored jetre, i masno tkivo ima značajnu ulogu u procesima *de novo* lipogeneze. Glavnu ulogu u tim procesima imaju enzim karboksilaza acetil-koenzima A (eng. *acetyl-CoA carboxylase, ACC*) i multifunkcionalni enzim sintaza masnih kiselina (eng. *fatty acid synthase, FAS*). Enzimi ACC i FAS katalizuju sintezu masnih kiselina polazeći od centralnog metaboličkog intermedijera, acetil-koenzima A (*Breton, 2013; Moro i saradnici, 2008*) (**Slika 16**).



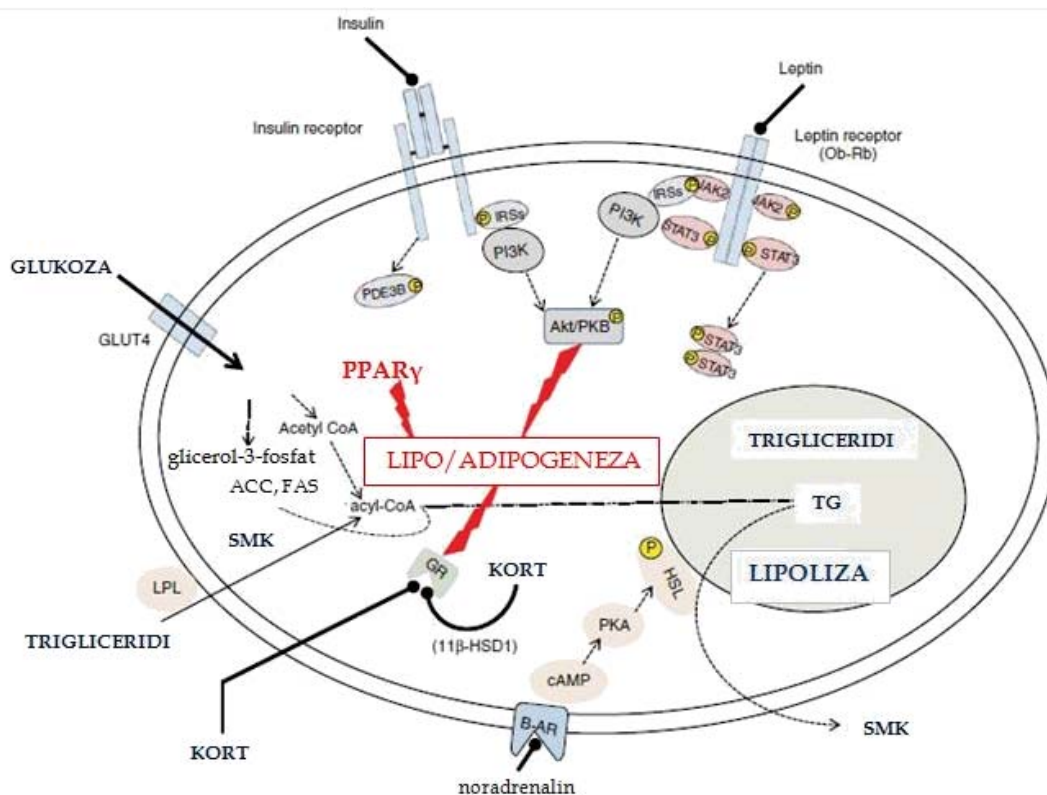
Slika 16. Metabolizam lipida. Modifikovano prema *Moro i sar.* (2008)

SMK-slobodne masne kiseline; TAG-triacilglicerol; DAG-diacilglicerol; MAG-monoacilglicerol; HSL-lipaza osetljiva na dejstvo hormona; ATGL-lipaza triglicerida adipocita; MGL-lipaza monoacilglicerola; ACS-sintaza acil-koenzima A; FAS-sintaza masnih kiselina; ACC-karboksilaza acetyl-koenzima A; DGAT-aciltransferaza diglicerida; MGAT-aciltransferaza monoglicerida; GPAT-aciltransferaza glicerol fosfata; CPT-1-palmitoiltransferaze karnitina tipa 1

1.6.3 Hormonska regulacija metabolizma lipida u masnom tkivu

Glukokortikoidni hormoni su, pored insulina i kateholamina, ključni regulatori energetskog metabolizma u masnom tkivu (*Peckett i saradnici, 2011*). Iako su molekularni mehanizmi samo delimično izučeni, veliki broj podataka ukazuje da glukokortikoidni hormoni ostvaruju višestruke, dozno-zavisne efekte na metabolizam lipida u masnom tkivu. U zavisnosti od količine, vremena izlaganja, energetskog statusa u ćeliji kao i tipa masnog tkiva, glukokortikoidni hormoni utiču na aktivaciju lipolize, ali i na aktivaciju lipogeneze i/ili adipogeneze (*Dallman i saradnici, 2007; Rosmond i Bjorntorp, 2000; Wang i saradnici, 2012b*) (**Slika 17**).

Delujući antagonistički u odnosu na insulin, glukokortikoidni hormoni stimulišu oslobađanje masnih kiselina iz zrelih adipocita putem povećanja transkripcije gena koji nose informaciju za glavne enzime lipolize, HSL i ATGL (*Campbell i saradnici, 2011; Xu i saradnici, 2009*). Iako se na ulogu glukokortikoida u metabolizmu lipida dugi niz godina gledalo u svetlu njihove lipolitičke aktivnosti, sve veći broj podataka ukazuju i na antilipolitičku aktivnost glukokortikoidnih hormona i njihovu ulogu u razvoju gojaznosti (*Peckett i saradnici, 2011*). Delujući zajedno sa insulinom, glukokortikoidi povećavaju ekspresiju gena koji su uključeni u procese sinteze triglicerida i važni su regulatori diferencijacije adipocita (*Azzout-Marniche i saradnici, 2000*). Iako molekularni mehanizmi nisu potpuno razjašnjeni, podaci ukazuju da povišen nivo glukokortikoidnih hormona u masnom tkivu može doprineti razvoju lipogeneze i/ili adipogeneze (*Peckett i saradnici, 2011*). Takođe, pokazano je da tokom diferencijacije adipocita dolazi do značajnog povećanja nivoa enzima 11 β HSD1, naročito u visceralnom masnom tkivu (*Stears i Byrne, 2001*). Naime, glukokortikoidi povećavaju aktivnost enzima LPL, što omogućava unos masnih kiselina iz cirkulacije u masno tkivo i njihovo skladištenje u formi triglicerida. Procesi lipogeneze stimulisani su glukokortikoidnim hormonima putem regulacije transkripcije i aktivacije gena za glavne enzime *de novo* sinteze masnih kiselina, kao što su ACC i FAS. Jedan od mehanizama kojim regeneracija glukokortikoida u tkivu, kao i posledična aktivacija GR-a, učestvuju u procesima adipogeneze je aktivacija i transkripciona regulacija dva ključna regulatora diferencijacije adipocita: proteina koji se vezuju za pojačivač CCAAT (eng. *CCAAT/enhancer binding proteins, C/EBPS*) (*Cao i saradnici, 1991*) i γ izoforme receptora koji aktivira proliferaciju peroksizoma (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ*) (*Wu i saradnici, 1995*).



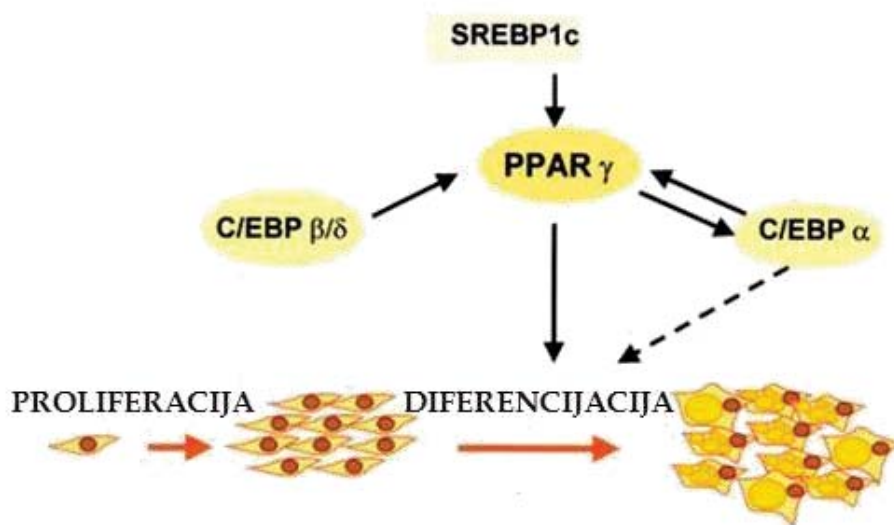
Slika 17. Hormonska regulacija metabolizma lipida u adipocitima. Glukokortikoidni hormoni imaju pretežno lipolitičku aktivnost u masnom tkivu, ali pod određenim uslovima deluju sinergistički i sa insulinom i dovode do aktivacije lipogeneze i adipogeneze. Modifikovano prema *Breton i sar. (2013)*. SMK-slobodne masne kiseline, KORT-kortikosteron

Najveći broj podataka o morfološkim promenama i molekularnim mehanizmima koji se odigravaju tokom adipogeneze dobijeni su analizom ćelijskih kultura adipocita, i to najčešće 3T3-L1 ćelijske linije. Naime, u *in vitro* studijama je pokazano da deksametazon, potentan sintetički glukokortikoid, može da indukuje diferencijaciju 3T3-L1 preadipocita (*Pantoja i saradnici, 2008*) u uslovima kada je njihova diferencijacija pod kontrolom dva glavna transkripciona regulatora adipogeneze PPAR- γ i C/EBP- α (*Tontonoz i saradnici, 1995*). Dakle, glukokortikoidni hormoni su identifikovani kao „adipogeni“ stimulusi koji

doprinosu diferencijaciji adipocita, ali nisu neophodni tokom održavanja morfoloških i biohemijskih karakteristika diferenciranih adipocita (Gregoire i saradnici, 1998).

1.6.3.1 Adipogeneza

Adipogeneza je višestepeni proces nastanka novih, zrelih adipocita tokom kojeg se kroz kaskadu transkripcionih faktora reguliše tkivno-specifična ekspresija gena koji su uključeni u diferencijaciju adipocita i metabolizam lipida (Lesterova i Lazar, 2009). Dosadašnja istraživanja su pokazala da glavnu ulogu u tim procesima imaju tri transkripciona regulatora: C/EBP, PPAR γ i protein koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. *sterol regulatory element-binding protein-1*, SREBP-1) (Slika 18) (Brun i Spiegelman, 1997; Rosen i saradnici, 2000):



Slika 18. Adipogeneza. Transkripcioni regulatori uključeni u regulaciju procesa adipogeneze

C/EBP je klasa transkripcionih regulatora čiji su članovi C/EBP α , C/EBP β , i C/EBP δ . Aktiviraju se u ranim fazama diferencijacije adipocita i imaju važnu ulogu tokom kasnijih faza adipogeneze kada aktiviraju gene koji učestvuju u određivanju funkcionalnih

karakteristika zrelih adipocita. C/EBP β i C/EBP δ se aktiviraju u odgovoru na glukokortikoidne hormone i insulin i učestvuju u aktivaciji transkripcionog regulatora PPAR γ (Brun i saradnici, 1996).

PPAR γ je član superfamilije jedarnih receptora koji je neophodan tokom održavanja diferenciranog stanja adipocita. Do sada su opisana još dva člana PPAR familije, PPAR α i PPAR β , koje imaju različitu tkivnu ekspresiju i funkciju. PPAR γ je specifičan za masno tkivo i smatra se glavnim transkripcionim regulatorom adipogeneze. *In vitro* eksperimenti u kojima je praćena uloga PPAR γ u diferencijaciji prekursora adipocita su pokazali da PPAR γ zajedno sa glukokortikoidnim hormonima dovodi do diferencijacije adipocita, kao i do akumulacije lipida u novonastalim diferenciranim adipocitima (Brun i Spiegelman, 1997; Moreno i saradnici, 2010). PPAR γ učestvuje u esterifikaciji slobodnih masnih kiselina i sintezi triglicerida putem regulacije enzima LPL i PEPCCK (Bogacka i saradnici, 2004; Kersten, 2001).

SREBP-1 je transkripcioni regulator koji ima značajnu ulogu tokom sinteze lipida u adipocitima putem povećanja ekspresije gena za enzime uključene u *de novo* sintezu masnih kiselina, kao što su FAS i ACC (Fajas i saradnici, 1999). Pokazano je i da ćelije koje eksprimiraju aktivnu formu SREBP-1 proizvode lipidne molekule, najverovatnije derivate masnih kiselina, koji služe kao ligandi za transkripcioni regulator PPAR γ i dovode do njegove transkripcione aktivacije (Kim i Spiegelman, 1996; Kim i saradnici, 1998).

Diferencijacija adipocita i lipogeneza su međusobno zavisni i regulisani procesi, na šta ukazuje i uloga enzima lipina-1. Lipin-1 pripada familiji enzima fosfataza fosfatidne kiseline (eng. *phosphatidic acid phosphatase*, PAP). Lipin-1 katalizuje defosforilaciju fosfatidata u diacilglicerol, prekursor triglicerida, i stoga ima važnu ulogu u metabolizmu i razvoju masnog tkiva (Zhang i saradnici, 2012). Visok nivo lipina-1 se javlja u ranim fazama diferencijacije adipocita, da bi se zatim

vratio na osnovni nivo, a potom dostigao najviši nivo u zrelim adipocitima koji su puni lipida. Ovakav obrazac ekspresije gena ukazuje na važnu ulogu lipina-1 tokom uspostavljanja programa adipogeneze, kao i u akumulaciji triglicerida u zrelim adipocitima. Lipin-1 učestvuje i u diferencijaciji preadipocita putem regulacije transkripcionog regulatora PPAR γ (Reue i Brindley, 2008; Zhang i saradnici, 2008).

1.7 Uloga CNS-a u razvoju metaboličkog sindroma

1.7.1 Kontrola unosa hrane i regulacija energetske bilansa

Periferni organi i CNS su međusobno povezani kako bi obezbedili dovoljno energije za funkcionisanje ćelija u normalnim uslovima, ali i dovoljno energetske zaliha za periode energetske oskudice. Jedan od mehanizama kojima se energija može obezbediti jeste nagomilavanje masti u masnom tkivu. Unos hrane je precizno kontrolisan od strane CNS-a i favorizovan je u odnosu na energetske potrebe kako bi se organizam prilagodio na različite uslove spoljašnje sredine, a naročito na periode kada hrana nije dostupna. Kada se uslovi spoljašnje sredine promene i kada fizička aktivnost nije neophodna za obezbeđivanje energije i reprodukciju, prekomerni unos hrane doprinosi narušavanju energetske bilansa i dolazi do razvoja gojaznosti (Dietrich i Horvath, 2013; Morton i saradnici, 2006).

CNS vrši integraciju i regulaciju energetske unosa i potrošnje, kao i regulaciju ukupne energetske homeostaze organizma (eng. *whole-body energy homeostasis*) u kojoj važno mesto zauzima hipotalamus. Hipotalamus se sastoji od velikog broja manjih neuronskih grupa (jedara) koje regulišu brojne fiziološke funkcije i predstavljaju funkcionalnu i anatomske veze između CNS-a i endokrinog sistema organizma. Glavno mesto regulacije energetske bilansa predstavlja arkuatno jedro (eng. *arcuate nucleus*) hipotalamusa. Arkuatno jedro

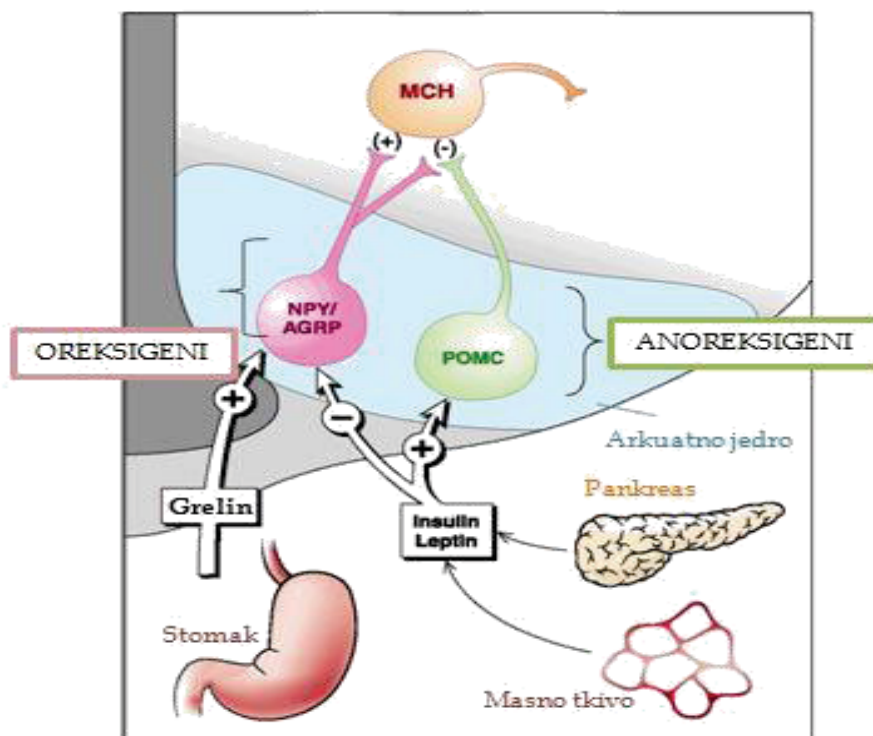
sadrži specifične populacije neurona koje su uključene u integraciju signala sitosti i gladi poreklom iz masnog tkiva, pankreasa i gastrointestinalnog trakta, kao i brojnih hranljivih materija iz cirkulacije (Erlanson-Albertsson, 2005). Ukupan unos hrane nastaje kao rezultat ravnoteže u aktivnosti oreksigenih neurona koji stimulišu uzimanje hrane i anoreksigenih neurona koji inhibiraju unos hrane (Schwartz i saradnici, 2000).

Veliki broj podataka ukazuje da poremećaji na nivou centralne regulacije energetske homeostaze mogu dovesti do razvoja gojaznosti i metaboličkih poremećaja i imati značajnu ulogu tokom patogeneze metaboličkog sindroma (Morrison, 2009; Morton i saradnici, 2006).

1.7.1.1 Centralna regulacija unosa hrane i energetske bilansa

Uloga hipotalamusa u kontroli unosa hrane je prvi put uočena u studijama na pacovima kod kojih je pokazano da lezija ventromedijalnog hipotalamusa uzrokuje povećanje unosa hrane ili hiperfagiju i razvoj ekstremne gojaznosti. Sa druge strane, lezija lateralnog hipotalamusa dovodi do smanjenog unosa hrane ili afagije, pa čak i do smrti usled gladovanja (Sahu, 2004). Definisana su dva anatomska i funkcionalno različita regiona hipotalamusa: ventromedijalni, ekscitatorni region ili „centar za sitost“ i lateralni, inhibitorni region ili „centar za glad“. Centri za sitost i glad su međusobno povezani kompleksnom mrežom neurona i zajedno sa neuronima arkuatnog jedra hipotalamusa formiraju neuralnu mrežu centralne regulacije energetske homeostaze (Schwartz i saradnici, 2000).

U okviru arkuatnog jedra hipotalamusa razlikuju se dve glavne populacije neurona (**Slika 19**):



Slika 19. Neuralna i endokrina kontrola energetske homeostaze.

Jednu populaciju neurona čine NPY/AgRP neuroni koji eksprimiraju NPY i AgRP (eng. *agouti-related protein*), glavne oreksigene neuropeptide koji doprinose povećanju unosa hrane i/ili smanjenju energetske potrošnje (White, 1993). Drugu populaciju čine neuroni POMC/CART koji eksprimiraju prekursor ACTH, neuropeptid POMC i transkript koji je regulisan kokainom i amfetaminom (eng. *cocaine and amphetamine related peptide*, CART). POMC i CART su anoreksigeni neuroni koji dovode do smanjenja unosa hrane i/ili povećanja energetske potrošnje (Robson i saradnici, 2002; Swart i saradnici, 2002).

Obe grupe neurona su regulisane nutritivnim statusom ćelije i hormonom leptinom (Coppari i saradnici, 2005). Tokom gladovanja ili prilikom smanjenja energetske rezerve u organizmu ekspresija NPY i AgRP je stimulirana, dok je ekspresija POMC i CART inhibirana. Sa

druge strane, nakon obroka dolazi do inhibicije NPY/AgRP neurona i aktivacije POMC/CART neurona (*Kalra i saradnici, 1999*).

1.7.2 Leptin

Uloga hipotalamusa u regulaciji energetske bilansa je dodatno potvrđena otkrićem leptina, anoreksigenog hormona koji se sintetisuje i luči iz masnog tkiva. Iako je uloga masnog tkiva kao centralnog energetskeg rezervoara poznata vekovima, tek poslednjih pedeset godina istraživanja su ukazala na postojanje cirkulišućeg signala koji putem negativne povratne sprege deluje na CNS u cilju regulacije energetske unosa i potrošnje. Leptin deluje na specifične neurone hipotalamusa i dovodi do smanjenja unosa hrane i povećanja energetske potrošnje.

Naziv leptin potiče od grčke reči *leptos*, što znači tanak ili mršav. Leptin je otkriven uz pomoć genetičkih analiza specifičnih sojeva gojaznih miševa, kod kojih je identifikovano postojanje mutacije u genu *ob* (eng. *obesity*). Humani homolog mišijeg *ob* gena je gen za leptin. Mutacije u ovom genu kod ljudi dovode do nekontrolisanog apetita i razvoja patološke gojaznosti (*Cohen i saradnici, 1996*).

Glavni izvor leptina kod odraslih osoba su adipociti belog masnog tkiva. Koncentracija leptina u cirkulaciji je u pozitivnoj korelaciji sa indeksom telesne mase i masom masnog tkiva i to pretežno subkutanog depoa masnog tkiva. Sinteza leptina je stimulisana insulinom, glukokortikoidnim hormonima, estrogenom i proinflamatornim citokinima, a inhibirana je adrenergičkom stimulacijom i testosteronom (*Lonnqvist i saradnici, 1997; Van Harmelen i saradnici, 1998; Wabitsch i saradnici, 2001*).

1.7.2.1 Periferni efekti leptina

Periferni efekti leptina su uključeni u regulaciju metabolizma lipida i glukoze u perifernim organima, pretežno u jetri, masnom tkivu i mišićima. Glavna periferna uloga leptina je usmeravanje akumulacije lipida u subkutane depoe belog masnog tkiva, čime se sprečava razvoj visceralne gojaznosti. U jetri i mišićima, leptin stimuliše β -oksidaciju masnih kiselina i inhibira sintezu triglicerida, što sprečava deponovanje ektopične masti u ovim organima i povećava insulinsku osetljivost (*Muoio i saradnici, 1997; Nowak i saradnici, 1998*). U belom masnom tkivu leptin stimuliše lipolizu (*Fruhbeck i Gomez-Ambrosi, 2001*) i funkcioniše kao proinflamatorni adipokin putem povećanja produkcije proinflamatornih medijatora kao što su TNF- α i IL-6 (*La Cava i Matarese, 2004*).

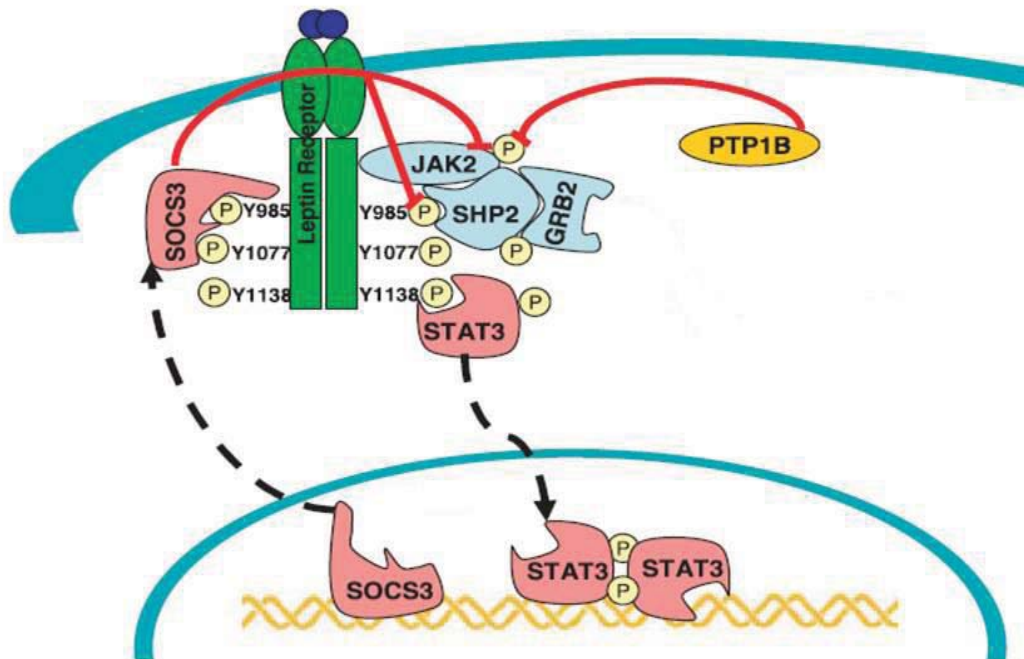
1.7.2.2 Centralni efekti leptina

Centralni efekti leptina su uključeni u regulaciju energetske homeostaze i unosa hrane i imaju važnu ulogu u patofiziologiji metaboličkog sindroma.

U uslovima povećanja količine masnog tkiva, u adipocitima dolazi do povećane produkcije leptina koji se oslobađa i cirkulacijom dospeva u mozak. Leptin prolazi kroz krvno-moždanu barijeru procesom olakšane difuzije i vezuje se za specifične receptore u hipotalamusu. Leptinski receptori (eng. *obesity receptor*, Ob-R) pripadaju grupi receptora za citokine, i kao i svi membranski receptori aktiviraju se vezivanjem liganda. Do sada je identifikovano 6 izoformi receptora koje nastaju alternativnom obradom iRNK za gen Ob-R (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re i Ob-Rf). Sve izoforme imaju homologe vanćelijske domene koji su odgovorni za vezivanje leptina, ali se razlikuju po dužini i sekvenci unutarćelijskih domena (*Dardeno i saradnici, 2010*). Kratke forme leptinskog receptora (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re i Ob-Rf) imaju

kratak unutarćelijski domen i ne aktiviraju signalni put leptina. Ob-Ra učestvuje u transportu leptina kroz krvno-moždanu barijeru, dok solubilni leptinski receptor Ob-Re vezuje leptin iz cirkulacije i reguliše koncentraciju biološki aktivnog leptina (*Galic i saradnici, 2010*)

Fiziološka uloga leptina u kontroli unosa hrane je posredovana dugom formom leptinskog receptora (Ob-Rb) (*Tartaglia i saradnici, 1995*). Ob-Rb izoforma se karakteriše prisustvom dugog citoplazmatskog domena koji učestvuje u prenosu leptinskog signala kroz ćeliju. Ob-Rb, kao i svi receptori za citokine, pripada klasi receptora spregnutih sa tirozin kinazama. Po vezivanju leptina, homodimerizacija Ob-Rb-a omogućava vezivanje tirozin kinaze JAK2 (eng. *Janus kinase 2*) za citoplazmatski region receptora pri čemu dolazi do njene aktivacije procesom unakrsne fosforilacije. Po aktiviranju kinaze JAK2 protein STAT3 (eng. *signal transducers and activator of transcription*) se preko svog domena SH2 usmerava do kompleksa receptora i kinaze i biva fosforilisan na tirozinskim ostacima od strane kinaze JAK2. Fosforilisani STAT3 disosuje sa receptora, dimerizuje i odlazi u jedro gde aktivira transkripciju ciljnih gena (*Tartaglia, 1997; White i saradnici, 1997*). Jedan od ciljnih gena transkripcionog regulatora STAT3 je i gen koji kodira protein SOCS3 (eng. *supressor of cytokine signaling 3*). U slučaju signalnog puta leptina, vezivanje proteina SOCS3 za leptinski receptor dovodi do negativne regulacije ovog signalnog puta (*Bjorbaek i saradnici, 1999*). Signalni put leptina može biti regulisan i fosfatazama kao što je fosfotirozin fosfataza 1B (eng. *phosphotyrosine phosphatase 1B, PTP1B*) koja katalizuje defosforilaciju kinaze JAK2, što dovodi do smanjenja fosforilacije proteina STAT3 (**Slika 20**).



Slika 20. Signalni put leptina. Prenos signala preko leptinskog receptora može biti negativno regulisan proteinima SOCS3, STAT3 i PTP1B. Modifikovano prema Yang i Barouch (2007)

Gen za Ob-Rb je predominantno eksprimiran u jedrima hipotalamusa koja su uključena u regulaciju unosa hrane, gde leptin svoje anoreksigeno dejstvo ostvaruje putem inhibicije transkripcije neuropeptida NPY i AgRP i stimulacije transkripcije neuropeptida POMC (Zhang i Scarpace, 2006). Poremećaji u signalnom putu leptina, usled odsustva leptina, leptinskog receptora ili usled poremećaja u normalnom funkcionisanju leptina kod životinja i ljudi dovodi do razvoja hiperfagije i patološke gojaznosti, kao i niza pridruženih metaboličkih i neuroendokrinih poremećaja (Sahu, 2004).

1.7.3 Leptinska rezistencija

S obzirom na fiziološku ulogu leptina u smanjenju unosa hrane i/ili povećanju energetske potrošnje, nakon otkrića leptina pretpostavljeno je da bi se njegovom terapijskom primenom mogla lečiti

prekomerna težina. Ipak, primena rekombinantnog leptina kod gojaznih ljudi i životinja nije bila efikasna. Kod gojaznih ljudi dolazi do povećane produkcije leptina i razvoja hiperleptinemije, koja je u korelaciji sa ukupnom količinom telesne masnoće (*Wauters i saradnici, 2000*) i ne doprinosi smanjenju unosa hrane i telesne težine. Stanje smanjene osetljivosti na biološku ulogu leptina, uključujući i odsustvo anoreksigenog dejstva leptina nakon njegove spoljašnje aplikacije, definiše se kao leptinska rezistencija (*Morrison, 2009; Scarpace i Zhang, 2009*).

Svi mehanizmi koji se nalaze u osnovi nastanka leptinske rezistencije su još uvek nerazjašnjeni, ali su za sada poznata tri mehanizma (*Munzberg i saradnici, 2005; Munzberg i Myers, 2005; Myers i saradnici, 2012*): poremećaj u transportu leptina kroz krvno-moždanu barijeru, smanjena ekspresija gena za leptinski receptor i/ili smanjen nivo proteina leptinskog receptora i poremećaji u signalnim putevima leptina unutar specifičnih moždanih regiona.

Poremećaji na nivou transporta leptina kroz krvno-moždanu barijeru predstavljaju vid periferne rezistencije na leptin i najčešće se javljaju kod onih oblika gojaznosti koji su uzrokovani ishranom koja sadrži veliku količinu masti i ugljenih hidrata (*Scarpace i Zhang, 2009*). Mehanizam koji se nalazi u osnovi ove rezistencije je povišen nivo triglicerida, za koje je pokazano da interferiraju sa transportom leptina i dovode do smanjenja njegovog nivoa unutar specifičnih regiona hipotalamusa (*Banks i saradnici, 2004*). Poznato je da je koncentracija leptina u cerebrospinalnoj tečnosti srazmerna njegovoj koncentraciji u cirkulaciji. Međutim, kod gojaznih osoba dolazi do smanjenja nivoa leptina u cerebrospinalnoj tečnosti, u odnosu na cirkulaciju, što ukazuje na poremećaje u transportu kroz krvno-moždanu barijeru (*Schwartz i saradnici, 1996*). Istraživanja na pacovima su pokazala da visok nivo leptina kod gojaznih pacova utiče na smanjenje ekspresije Ob-Rb i Ob-Re izoforme leptinskog receptora u hipotalamusu, što za posledicu

ima odsustvo anoreksigenog efekta leptina i razvoj centralne leptinske rezistencije (*Liu i saradnici, 2007; Scarpace i Zhang, 2007*). Treći pretpostavljeni mehanizam leptinske rezistencije se odnosi na poremećaje u unutarćelijskim signalnim putevima leptina u odgovoru na centralno dejstvo leptina. Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ćelijske leptinske rezistencije su povišen nivo dva glavna negativna regulatora signalnog puta leptina, SOCS3 i PTP1B (*Bjorbaek i saradnici, 1999; Dube i Tremblay, 2005*).

Leptinska rezistencija se često javlja istovremeno sa hiperinsulinemijom, dislipidemijom i visceralnom gojaznošću. Sve veći broj podataka ukazuje na značajnu ulogu leptinske rezistencije tokom patogeneze metaboličkog sindroma (*Kalra, 2008*). Dodatni koncept koji se odnosi na definisanje metaboličkog sindroma i njegovih osnovnih parametara i faktora rizika odnosi se na ulogu leptinske rezistencije u patogenezi metaboličkog sindroma (*Unger, 2003*).

"Usuditi se – to je cena napretka"

2. CILJ

Ishrana koja sadrži veliku količinu šećera, naročito fruktoze, jedan je od vodećih faktora rizika za razvoj gojaznosti i metaboličkog sindroma. Pacov hranjen fruktozom razvija metaboličke karakteristike slične karakteristikama metaboličkog sindroma kod ljudi, tako da je u ovoj studiji korišćen kao životinjski model metaboličkog sindroma.

Imajući u vidu da visceralno masno tkivo i hipotalamus imaju ključnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze, cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita da li ishrana obogaćena različitim količinama fruktoze dovodi do razvoja i progresije metaboličkog sindroma putem poremećaja u signalnom putu glukokortikoida.

Naša hipoteza bila je da se promene u signalnom putu glukokortikoida izazvane prekomernim konzumiranjem fruktoze mogu odraziti na metabolizam lipida i inflamaciju u visceralnom masnom tkivu, na sistemsku i perifernu osetljivost na insulin, kao i na osetljivost na leptin u hipotalamusu pacova. Kako bismo ostvarili postavljeni cilj analizirali smo prereceptorski metabolizam glukokortikoida, ekspresiju i unutarćelijsku preraspodelu GR-a, ekspresiju enzima lipidnog metabolizma regulisanih GR-om, nivo inflamatornih medijatora i insulinsku osetljivost u visceralnom masnom tkivu pacova koji su putem tečnosti unosili različite količine fruktoze. U hipotalamusu istih životinja ispitivali smo komunikaciju između signalnih puteva glukokortikoida i leptina.

3. MATERI JAL I METODE

3.1 Materijal

U eksperimentima su korišćene hemikalije *p.a.* stepena čistoće.

Od firme Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, nabavljeni su natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), fenilmetilsulfonyl hlorid (PMSF), Tween-20, Nonidet-P40, CBBG (eng. *Coomassie Brilliant Blue G*), Brom Fenol Plavo, saharoza, natrijum fluorid, natrijum ortovanadat, natrijum pirofosfat, kalcijum hlorid, β -merkaptotanol, ditiotreititol (DTT), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (Na_2EDTA), akrilamid, bisakrilamid, HEPES (eng. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*), Tris baza, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), dietilpirokarbonat (DEPC), agaroza i albumin iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*, BSA).

Od firme SERVA electrophoresis, Heidelberg, Nemačka, nabavljene su sledeće hemikalije: glicin, boja *Ponceau S* i proteazni inhibitori aprotinin, leupeptin i antipain.

Od firme LACH-NER, Češka, nabavljene su sledeće hemikalije: etanol, metanol, fosforna kiselina, ksilol, izopropanol, hloroform i kalijum fosfat.

Od firme Zorka Šabac, Srbija, nabavljeni su glicerol i urea. Trizol® je nabavljen od firme Ambion, Nemačka. Od firme Veterinarski zavod Subotica, Srbija, je nabavljena komercijalna hrana za pacove i glukoza, dok je fruktoza nabavljena od firme API-PEK Bečej, Srbija.

Za prepisivanje RNK u cDNK korišćen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit firme Applied Biosystems, USA. Hemikalije korišćene za lančanu polimeraznu reakciju u realnom vremenu su proizvodi firme Applied Biosystems, USA. Za TaqMan Real-time PCR analizu korišćeni su eseji prikazani u **Tabeli 1**, firme Applied Biosystems, USA. Prajmeri korišćeni za SYBR® Green Real-time PCR analizu su proizvodi firme Metabion, Martinsried, Nemačka i prikazani su u **Tabeli 2**.

Tabela 1. Identifikacioni brojevi eseja endogenih kontrola i ciljnih gena korišćenih u TaqMan Real-Time PCR analizi

Oznaka gena	Ime gena	Identifikacioni broj eseja
BA	β -aktin	Rn00667869_m1
B2M	β_2 mikroglobulin	Rn00560865_m1
18S	18s rRNK	Hs99999901_s1
HPRT1	Hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza	Rn01527840_m1
TBP	TATA-vezujući protein	Rn01455646_m1
GR	Glukokortikoidni receptor	Rn00561369_m1
11 β HSD1	11 β hidrosisteroid dehidrogenaza tipa 1	Rn00567167_m1
H6PDH	Heksozo-6-fosfat dehidrogenaza	Rn01519771_m1
LIPE	Lipaza osetljiva na dejstvo hormona	Rn00563444_m1
PEPCK	Fosfoenolpiruvat karboksikinaza	Rn01529014_m1
FAS	Sintaza masnih kiselina	Rn01463550_m1
SOCS3	Supresor signalnog puta citokina	Rn00585674_s1
NPY	Neuropeptid Y	Rn01410145_m1
IL-6	Interleukin-6	Rn01410330_m1

Tabela 2. Sekvence parova prajmera korišćenih u SYBR® Green Real-Time PCR analizi

Ime gena	Parovi prajmera
TNF- α	F 5' - TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC-3' R 5' - CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC-3'
β -aktin	F 5' - CCC TGG CTC CTA GCA CCA T-3' R 5' - GAG CCA CCA ATC CAC ACA GA-3'

Primarna antitela i njihova razblaženja korišćena u „Western blot“ analizi su prikazana u **Tabeli 3**. Sva sekundarna antitela su proizvodi

firme Amersham Biosciences, Velika Britanija. Za fluorescentnu detekciju proteina metodom „Western blot“ je korišćen koncentrovani ECF supstrat (eng. *enhanced chemifluorescence*) proizvođača Amersham Biosciences, Velika Britanija.

Tabela 3. Primarna antitela korišćena u „Western blot“ analizi

Primarno antitelo	Oznaka	Poreklo	Korišćeno razblaženje	Proizvođač
β -aktin	AC-15	miš	1:10000	Sigma-Aldrich
GR	PA1-511	kunić	1:1000	Affinity Bioreagents
11 β HSD1	ab393364	kunić	1:1000	Abcam
Ob-Rb	ab5593	kunić	1:250	Abcam
H6PDH	sc-67394	kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
PPAR γ	sc-9000	miš	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Lipin-1	sc-98450	kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
SREBP-1	sc-366	kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Za ispitivanje koncentracije kortikosterona u plazmi i visceralnom masnom tkivu eksperimentalnih životinja korišćen je Corticosterone High Sensitivity EIA kit, Immunodiagnosics, Velika Britanija. Koncentracija leptina u plazmi eksperimentalnih životinja je određena korišćenjem Rat Leptin ELISA kit, Millipore, Italija.

3.2 Metode

3.2.1 Gajenje i tretman eksperimentalnih životinja

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar*, čija je starost bila 21 dan na početku tretmana. Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 20 ± 2 °C i konstantnoj vlažnosti vazduha. Prostorija je imala pravilnu izmenu svetla i mraka u intervalima od po 12 h. Životinje su nasumično raspoređene u tri eksperimentalne grupe, pri čemu je u svakoj grupi bilo po 9 životinja, i gajene su u standardnim laboratorijskim kavezima u grupama po 3. Prvu eksperimentalnu grupu su činile kontrolne životinje (K) koje su imale slobodan pristup komercijalnoj hrani i vodi. Drugu i treću eksperimentalnu grupu su činile životinje podvrgnute izmenjenom režimu ishrane. Druga eksperimentalna grupa je imala slobodan pristup komercijalnoj hrani i 10% rastvoru fruktoze u vodi (F10), dok je treća eksperimentalna grupa imala slobodan pristup komercijalnoj hrani i 60% rastvoru fruktoze u vodi (F60). U cilju održavanja homeostatske ravnoteže, životinjama koje su bile podvrgnute ishrani obogaćenoj visokoprocenatnim rastvorom fruktoze (60%) je bila dostupna i voda *ad libitum*.

Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, u skladu sa pravilima i nacrtima evropskog etičkog komiteta (*EEC Directive (86/609/EEC)*).

3.2.2 Analiza fizioloških parametara

U cilju utvrđivanja efekata ishrane obogaćene fruktozom na razvoj hiperfagije tokom eksperimentalnog tretmana praćen je dnevni unos hrane i tečnosti (vode, 10% rastvora fruktoze i 60% rastvora fruktoze).

Ukupan kalorijski unos je izražen kao količina unete energije u kJ po životinji po danu. Kalorijski unos je izračunat za svaku eksperimentalnu grupu po sledećim formulama:

- kontrolna grupa: količina pojedene hrane u gramima x 11 kJ
- životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze: količina pojedene hrane u gramima x 11 kJ + količina popijenog 10% rastvora fruktoze u mililitrima x 1.72 kJ
- životinje hranjene 60% rastvorom fruktoze: količina pojedene hrane u gramima x 11 kJ + količina popijenog 60% rastvora fruktoze x [6 x 1.72] kJ

Doprinos ishrane obogaćene fruktozom razvoju gojaznosti praćen je merenjem ukupne telesne mase i mase visceralnog masnog tkiva kontrolnih i fruktozom hranjenih životinja. Telesne mase su merene jednom nedeljno, dok su mase visceralnog masnog tkiva izmerene u trenutku žrtvovanja. Odnos ukupne telesne mase i mase visceralnog masnog tkiva je uzet kao mera adipoznosti eksperimentalnih životinja.

3.2.3 Priprema plazme i određivanje biohemijskih parametara

Po isteku tretmana u trajanju od devet nedelja životinje su nakon prekononoćnog gladovanja žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus). Krv je sakupljana u epruvete obložene antikoagulansom (6% EDTA) i odmah se pristupilo određivanju koncentracije glukoze i triglicerida korišćenjem komercijalnih traka MultiCare (Biochemical Systems International, Italija). Krv je centrifugirana (1600 xg, 10 min) i dobijena krvna plazma je čuvana na -70°C do određivanja koncentracije biohemijskih parametara (insulin, slobodne masne kiseline, leptin i kortikosteron).

3.2.3.1 Određivanje koncentracije insulina i slobodnih masnih kiselina u plazmi

Za određivanje koncentracije insulina u krvnoj plazmi korišćen je radioimunoesej, osetljivosti od 0.6 mIU/l i sa inter-esejskim koeficijentom varijacije od 5.24%. Kao standard je korišćen pacovski insulin (INEP, Srbija).

Za određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi primenjen je modifikovan kolorimetrijski metod (*Duncombe, 1964*).

3.2.3.2 Određivanje koncentracije leptina i kortikosterona u plazmi i visceralnom masnom tkivu

Za određivanje koncentracije leptina i kortikosterona korišćen je kompetitivni ELISA esej u kome je za unutrašnju površinu mikrotitar ploče vezano poliklonsko antitela za leptin, odnosno kortikosteron. Kalibratori (standardi), kontrolni uzorci i razblaženi uzorci nepoznate koncentracije leptina ili kortikosterona nanošeni su na mikrotitar ploče u duplikatu i inkubirani sa antitelom konjugovanim sa peroksidazom iz rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP). Ploče su zatim tri puta sukcesivno ispirane i dodat je hromogeni supstrat TMB (tetrametilbenzidin) koji dovodi do razvijanja boje. Nakon prekidanja enzimske reakcije rastvorom 0.5 M hlorovodonične kiseline izmerene su apsorbance na specifičnim talasnim dužinama pomoću automatskog ELISA čitača za mikrotitar ploče (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska). Za određivanje koncentracije leptina izmerene su apsorbance na talasnim dužinama od 450 nm i 590 nm (590 nm je korekciona OD), dok je za određivanje koncentracije kortikosterona merenje vršeno na talasnim dužinama od 450 nm i 650 nm (650 nm je korekciona OD). Na osnovu vrednosti očitanih sa spektrofotometra izračunate su koncentracije leptina i kortikosterona korišćenjem 4PL

krive (eng. *4-parameter logistic curve*, Prism, GraphPad Software, Inc.). Koncentracije leptina i kortikosterona su izražene u ng/ml za krvne plazme, odnosno u ng/mg proteina za koncentraciju kortikosterona u tkivu.

3.2.4 Određivanje parametara insulinske osetljivosti

Kao parametri insulinske osetljivosti korišćeni su intraperitonealni test tolerancije na glukozu (eng. *intraperitoneal glucose tolerance test*, IP-GTT) i indeks HOMA (eng. *homeostasis assessment model*).

IP-GTT je najčešće korišćen test za određivanje stepena tolerancije na glukozu kod laboratorijskih životinja, uglavnom pacova i miševa. Tri dana pre završetka eksperimentalnog tretmana kontrolne životinje i životinje na ishrani obogaćenoj fruktozom su podvrgnute prekonoćnom gladovanju i u tom periodu im je bila dostupna samo voda. Životinjama je intraperitonealno davano 2 g glukoze/kg telesne mase. Koncentracije glukoze su izmerene iz krvi životinja zasecanjem repne vene neposredno pre injeciranja rastvora glukoze (500 mg/ml rastvor glukoze) kao i u 15., 30., 60., 90. i 120. minutu nakon injeciranja. Za određivanje stepena tolerancije na glukozu korišćen je matematički izveden parametar površina ispod krive (eng. *area under curve*, AUC_{gluk}) prema prethodno opisanim metodama proračuna (Ahren i Filipsson, 2000).

Indeks HOMA je metoda koja se često koristi za procenu stepena insulinske rezistencije. Indeks HOMA je određen iz vrednosti izmerenih koncentracija glukoze u krvi i insulina u plazmi eksperimentalnih životinja nakon prekonoćnog gladovanja pomoću sledeće formule: $insulin (mU/l) \times [glukoza (mmol/l)/22.5]$.

3.2.5 Izolovanje visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa

Visceralno masno tkivo i hipotalamus su izolovani odmah nakon dekapitacije životinja. Mozak je izolovan, brzo prebačen na led i zatim je izolovan hipotalamus koji je trenutno zamrzavan i čuvan u tečnom azotu do dalje obrade. Visceralno masno tkivo je izolovano operativnim putem, oprano je ohlađenim fiziološkim rastvorom i izmereno. Jedan deo visceralnog masnog tkiva je odvojen za histološku analizu, dok je ostatak tkiva trenutno zamrzavan i čuvan u tečnom azotu do dalje obrade.

Za izolovanje proteina i RNK iz visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa kombinovana su tkiva od tri životinje koje pripadaju istoj eksperimentalnoj grupi (n=9), kako bi se dobila dovoljna količina materijala za analize.

Za potrebe histološke analize visceralnog masnog tkiva uzorci masnog tkiva pojedinačnih kontrolnih životinja i životinja na ishrani obogaćenoj fruktozom su fiksirani u 10% formalinu u trajanju od 24 časa. Nakon fiksacije, tkiva su dehidrirana u rastućem gradijentu etanola, prosvetljena u ksilolu i ukalupljena u parafin.

3.2.6 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva

Ukalupljeni uzorci visceralnog masnog tkiva sečeni su na preseke debljine 10 μm i bojeni hematoksilin eozin metodom. Dobijeni histološki preparati su analizirani pomoću mikroskopa (Olympus, BX-51, Olympus Corp., Japan) sa CCD video kamerom (PixeLINK, Ottawa, ON, Kanada) koji je povezan sa monitorom i koji je pod kontrolom softvera newCAST (Visiopharm Integrator System, verzija 3.2.7.0, Visiopharm, Danska). Za analizu adipocita manjeg prečnika korišćeno je uveličanje

od 20 puta, dok su adipociti većeg prečnika analizirani na uvećanju od 10 puta.

Morfometrijska analiza je urađena na digitalnim fotografijama visoke rezolucije i obuhvatala je određivanje prečnika i površine adipocita korišćenjem komercijalno dostupnog softvera Adiposoft (automatizovanog softvera specijalizovanog za histološku analizu belog masnog tkiva).

3.2.7 Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije

3.2.7.1 Izolacija RNK

Ukupna RNK iz visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa je izolovana korišćenjem Trizol[®] reagensa. Smrznuto tkivo je homogenizovano u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru u odnosu 1 ml Trizol[®]-a na 100 mg tkiva visceralnog masnog tkiva ili hipotalamusa. Dobijeni homogenati su inkubirani 5 min na 30°C kako bi nukleoproteinski kompleksi potpuno disosovali. U svaki homogenat je dodato 0.2 ml hloroforma, ependorfice su snažno mučkane a potom i inkubirane 3 min na temperaturi od 30°C. Nakon centrifugiranja uzoraka (12000 xg, 15 min, 4°C) dolazi do razdvajanja faza: donja (organska) faza, interfaza i gornja (vodena) faza. RNK koja se nalazi u vodenoj fazi pažljivo je prenetu u nove ependorfice i dodato je 0.5 ml izopropanola. Smeša je inkubirana 10 min na 30°C i centrifugirana (12000 xg, 10 min, 4°C). Nakon centrifugiranja talog je resuspendovan u jednoj zapremini 75% etanola i potom centrifugiran (12000 xg, 5 min, 4°C). Dobijeni talog je osušen na vazduhu i rastvoren u 100 µl 0.1% DEPC vode. Koncentracija izolovane RNK je određena merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm na spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf). Aparat je automatski izračunavao

koncentraciju RNK prema formuli $c = (40 \times A_{260} \times \text{faktor razblaženja})$, polazeći od toga da apsorbanca od jedne optičke jedinice na 260 nm odgovara količini od 40 $\mu\text{g/ml}$ RNK u uzorku. Za određivanje čistoće uzorka i eventualne kontaminacije proteinima korišćen je odnos apsorpcija na 260 nm i 280 nm. Odnos $A_{260}/A_{280} > 1.8$ smatran je zadovoljavajućim, odnosno ukazivao je da nije došlo do kontaminacije uzoraka izolovane RNK. Kako bi se proverio integritet dobijene RNK rađena je elektroforeza ukupne RNK na 2% agaroznom gelu, u trajanju od 30 min i pri konstantnoj voltaži od 100 V.

3.2.7.2 Reakcija reverzne transkripcije

Reakcija reverzne transkripcije je proces tokom koga se na osnovu RNK molekula kao matrice sintetiše komplementarni lanac molekula DNK (eng. *complementary DNA*, cDNK).

Za postupak reverzne transkripcije korišćen je komplet „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“. Reakcionu smešu, ukupne zapremine 20 μl , sačinjavali su: 2 μg ukupne RNK, smeša četiri dezoksiribonukleozidtrifosfata (100 mM 25 x dNTP Mix), smeša nasumičnih prajmera (10 x RT Primers), reverzna transkriptaza MultiScribe™ (50 U/ μl), reakcioni pufer (10 x TaqMan RT Buffer) i ribonukleazni inhibitor. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se po sledećem temperaturnom profilu: 10 min na 25°C, potom 120 min na 37°C i zaustavljena je zagrevanjem 5 min na 85°C. Ovako dobijena cDNK je čuvana na -70°C do dalje upotrebe.

3.2.8 Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Za određivanje nivoa genske ekspresije korišćena je lančana polimerazna reakcija (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) u realnom vremenu (Real-time PCR). Analiza relativnih nivoa iRNK za pojedine gene je urađena u aparatu za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection Applied Biosystems, USA) korišćenjem dva tipa tehnologije: TaqMan i SYBR Green.

3.2.8.1 TaqMan Real-time PCR

Da bi se odredili optimalni uslovi Real-time PCR reakcije potrebni za pouzdanu kvantifikaciju ciljnih gena urađen je odabir optimalne endogene kontrole. Kao endogene kontrole koriste se geni koji se konstitutivno eksprimiraju u svim ćelijama (eng. *housekeeping genes*), čija je ekspresija stabilna i ne menja se pod različitim uslovima, tretmanima i/ili u patofiziološkim stanjima primenjenim u eksperimentu. Ispitani su i upoređeni nivoi ekspresije i efikasnost amplifikacija 5 najčešće korišćenih endogenih kontrola: β_2 -mikroglobulin (B2M), β -aktin (BA), 18s rRNK (18S), hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (eng. HPRT1) i TATA vezujući protein (eng. *TATA binding protein*, TBP). Validacija potencijalnih endogenih kontrola je urađena korišćenjem programa GeNorm (*Vandesompele i saradnici, 2002*) i NormFinder (*Andersen i saradnici, 2004*) koji na osnovu količine RNK transkripata izračunavaju stabilnost genske ekspresije, intergrupnu i intragrupnu varijabilnost, kao i najstabilniju kombinaciju endogenih kontrola. Nakon izbora HPRT1 kao odgovarajuće endogene kontrole za analizu ekspresije gene od interesa u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu urađene su TaqMan Real-time PCR reakcije za ciljne gene. U analizi su korišćeni komercijalni eseji prikazani u **Tabeli 1**. Reakcionu smešu, ukupne

zapremine 25 μ l, sačinjavali su: 1 \times TaqMan Universal Master Mix, 1 \times TaqMan Gene Expression Assay Mix i 20 ng cDNK. PCR reakcija se odvijala u sledećim uslovima: 2 min na 50°C, potom 10 min na 95°C, i 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Na svaku ploču je nanošen uvek isti uzorak cDNK koji je služio kao kalibrator za dalja poređenja. Za procenu čistoće reakcionih komponenti na svaku ploču je nanošena negativna kontrola za svaki esej, koja je sadržala sve reagense za PCR, izuzev cDNK. Sve reakcije su izvedene u triplikatu na mikrotitar pločama od 96 mesta.

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena primenjena je komparativna $\Delta\Delta C_t$ metoda ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) prema kojoj su C_t vrednosti za gene od interesa normalizovane prema C_t vrednostima endogene kontrole HPRT1 i kalibratora (*Livak i Schmittgen, 2001*). Dobijeni rezultati su analizirani pomoću programskog paketa Sequence Detection RQ Study Add ON za 7000 System SDS, verzija 1.2.3 (Applied Biosystem, USA), sa intervalom poverenja od 95% ($p \leq 0.05$).

3.2.8.2 SYBR Green Real-time PCR

SYBR Green Real-time PCR analiza je korišćena za određivanje nivoa ekspresije gena za TNF- α u visceralnom masnom tkivu. U analizi su korišćeni Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, specifični prajmeri i 20 ng cDNK kao matrica. Sekvence specifičnih prajmera su prikazane u **Tabeli 2**. PCR reakcija, ukupnog volumena 25 μ l, odvijala se u standardnim uslovima: 2 min na 50°C, potom 10 min na 95°C, i 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Po završetku umnožavanja produkata postepeno je snižena temperatura PCR reakcije i konstruisana je kriva topljenja. Ovaj korak obezbeđuje proveru kontaminacije uzoraka genomskom DNK kao i eventualnog nastanka tzv. „dajmer prajmera“. Za procenu čistoće reakcionih komponenti na

ploču je nanošena negativna kontrola koja je sadržala sve reagense za PCR, izuzev cDNK. Sve reakcije su izvedene u triplikatu na mikrotitar pločama od 96 mesta.

Nivo ekspresije gena od interesa standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i β -aktina. Dobijeni rezultati su analizirani pomoću programskog paketa Sequence Detection RQ Study Add ON za 7000 System SDS, verzija 1.2.3 (Applied Biosystem), sa intervalom poverenja od 95% ($p \leq 0.05$).

3.2.9 Izolovanje proteina i priprema ćelijskih frakcija

Za određivanje nivoa različitih proteina kod kontrolnih životinja i životinja hranjenih fruktozom korišćene su citosolna, jedarna i mikrozomalna frakcija visceralnog masnog tkiva i ukupni ćelijski ekstrakt hipotalamusa.

3.2.9.1 Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije

Subćelijske frakcije su dobijene metodom diferencijalnog centrifugiranja. Tkivo je homogenizovano u homogenizeru Ultra-Turrax (T25, Junke & Kunkel, Nemačka) u jednoj zapremini hladnog (4°C) 20 mM Tris-HCl pufera (pH 7.4) koji je sadržao 10% glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , 1 mM EGTA- Na_2 , 2 mM DTT, proteazne inhibitore (20 mM Na_2MoO_4 , 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ antipain, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$, i 25 mM NaF). Dobijeni homogenat je profiltriran kroz gazu i centrifugiran (2000 xg , 10 min, 4°C) nakon čega je supernatant

korišćen za dobijanje citosola i mikrozoma, a talog za dobijanje jedarnog ekstrakta.

Za dobijanje citosolne i mikrozomalne frakcije supernatant je centrifugiran na srednjoj brzini (10000 xg , 30 min, 4°C), a potom i u ultracentrifugi (105000 xg , 90 min, 4°C, Beckman L8-M). Dobijeni supernatant, koji predstavlja čistu frakciju citosola, alikvotiran je i čuvan na -70°C do dalje upotrebe. Talog je korišćen za dobijanje mikrozomalne frakcije tako što je opran u 100 mM Na-pirofosfatnom puferu (pH 7.4), a zatim i centrifugiran u ultracentrifugi (105000 xg , 90 min, 4°C, Beckman L8-M). Dobijeni talog je resuspendovan u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu (pH 7.4), koji je sadržao 0.1 mM EDTA- Na_2 , 20% glicerol i 0.1 mM DTT, sonifikovan tri puta po 5 s sa pauzama od 30 s (1A, 50/60 Hz, 30% amplitude; Hielscher Ultrasound Processor) i čuvan na -70°C kao čista mikrozomalna frakcija.

Talog dobijen nakon centrifugiranja homogenata je ispran dva puta (2000 xg , 10 min, 4°C) u puferu za pranje jedara koji je sadržao 25 mM HEPES, pH 7.6, 10% glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , 1mM EGTA- Na_2 , 2 mM DTT, proteazne inhibitore (20 mM Na_2MoO_4 , 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 $\mu g/ml$ antipain, 5 $\mu g/ml$ leupeptin, 5 $\mu g/ml$ aprotinin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $Na_4P_2O_7 \times 10H_2O$, i 25 mM NaF). Nakon pranja, prečišćena jedra u talogu su resuspendovana u jednoj zapremini pufera za liziranje jedara koji je sadržao 25 mM HEPES, pH 7.6, 1 M ureu, 300 mM NaCl i 1% deterdžent Nonidet P-40. Resuspendovana jedra su inkubirana na ledu najmanje 60 min, uz intenzivno vorteksovanje, a zatim centrifugirana (14000 rpm , 10 min, 4°C). Dobijeni supernatant je korišćen kao jedarni ekstrakt i čuvan na -70°C do dalje upotrebe (*Spencer i saradnici, 2000*).

3.2.9.2 Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta

Tkivo hipotalamusa je homogenizovano u staklo-teflon homogenizeru (Potter-Elvehjem) sa 20 zaveslaja tučkom, u jednoj zapremini hladnog (4°C) RIPA pufera koji je sadržao 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA- Na_2 , 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% deterdžent Nonidet P-40, proteazne inhibitore (20 mM Na_2MoO_4 , 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β -glicerofosfat, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ i 25 mM NaF). Dobijeni homogenat je sonifikovan tri puta po 5 s sa pauzama od 30 s (1A, 50/60 Hz, 30% amplitude; Hielscher Ultrasound Processor), inkubiran na ledu 60 min uz intenzivno vorteksovanje, a zatim centrifugiran (16000 xg , 20 min, 4°C). Dobijeni supernatant je korišćen kao ukupni ćelijski ekstrakt i čuvan na -70°C do dalje upotrebe.

3.2.10 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina u pripremljenim ćelijskim frakcijama visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa je urađeno kolorimetrijskom metodom po modifikovanoj metodi *Bradford-a* (Spector, 1978).

U 20 μl adekvatno razblaženog uzorka i standarda (albumin iz seruma govečeta, eng. *bovine serum albumin*, BSA) dodato je 180 μl Spektorovog reagensa (0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.8% etanol i 8.5% fosforna kiselina) i nakon 5 min inkubacije očitana je apsorbanca na 595 nm u mikrotitar pločama od 96 mesta, upotrebom spektrofotometra (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska).

Koncentracija proteina je određena na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu merenja apsorbance u rastvorima standarda u opsegu koncentracija od 15 µg/ml do 250 µg/ml i izražena je kao mg proteina/ml uzorka.

3.2.11 Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu

Proteini su razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama metodom denaturišuće SDS-poliakrilamid gel (SDS-PAG) elektroforeze, po modifikovanoj metodi *Laemmli*-ja (1970) na aparatu Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad).

Uzorci subćelijskih frakcija visceralnog masnog tkiva i ukupnog ćelijskog ekstrakta hipotalamusa (50 µg) su pripremani kuvanjem (5 min na 100°C) u jednakoj zapremini pufera za uzorke sa dvostruko većom koncentracijom (0.125 M Tris-Hcl pH 6.8, 0.4% β-merkaptanol, 4% SDS, 1% Brom Fenol Plavo i 20% glicerol). Proteini su razdvojeni na 10% poliakrilamidnim denaturišućim gelovima u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.025 M Tris bazu, 0.192 M glicin i 0.1% SDS, u trajanju od 90 min i pri konstantnom naponu od 120 V. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za „Western blot” analizu. Kao molekulski marker korišćena je smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 170 kDa, Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Litvanija).

3.2.12 Detekcija proteina metodom „Western blot“-a

Proteini od interesa su detektovani metodom „Western blot”, koja pored elektroforetskog razdvajanja proteina uključuje i prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (poliviniliden fluorid) membranu i njihovu detekciju pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitela.

Nakon završene elektroforeze poliakrilamidni gelovi su potopljeni u pufer za transfer (0.192 M glicin, 20% metanol i 25 mM Tris, pH 8.3)

u trajanju od 30 min. PVDF membrane (Immobilon-FL, veličine pora 0.45 μm , Millipore Corporation, Italija) su aktivirane 100% metanolom, a potom i inkubirane u puferu za transfer. Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se metodom mokrog transfera preko noći, pri konstantnoj struji od 135 mA po gelu, na temperaturi od 4°C u aparaturi Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija). Kvalitet transfera proveravan je bojenjem membrana 1% rastvorom *Ponceau S* u 5% sirćetnoj kiselini. Nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama blokirana su inkubiranjem u puferu za blokiranje [PBS pufer (0.137 M NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 16.3 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl) sa 5% nemasnim mlekom], u trajanju od 60 min na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima specifičnim za protein od interesa preko noći na 4°C (**Tabela 3**). Nakon ispiranja primarnih antitela, membrane su inkubirane 90 min na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelima koja su konjugovana sa alkalnom fosfatazom. Između svakog od ovih koraka sledile su serije ispiranja membrana u PBST puferu (0.1% Tween-20 u PBS-u). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom membrane su inkubirane sa ECF supstratom. Alkalna fosfataza katalizuje konverziju ECF supstrata u fluorescentni proizvod koji je detektovan pomoću skenera za fluorescenciju, STORM (Amersham Bioscience, Velika Britanija). Intenzitet izmerene fluorescencije je proporcionalan koncentraciji ciljnog proteina u uzorku.

Kvantitativno određivanje relativne optičke gustine traka na membranama je urađeno korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant, GE Healthcare). Intenzitet svake imunoreaktivne trake je normalizovan prema intenzitetu trake β -aktina, kao kontrole za nanetu količinu totalnih proteina.

3.2.13 Statistička obrada rezultata

Statistička analiza biokemijskih i fizioloških parametara je urađena korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse (One-way ANOVA), praćene *post-hoc* Tukey testom. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Za sva merenja pretpostavljena statistička značajnost je $P < 0.05$.

Statistička obrada morfometrijske analize visceralnog masnog tkiva je urađena korišćenjem Studentovog t-testa. Analiza je urađena na 5 životinja u svakoj eksperimentalnoj grupi, za svaku životinju analizirana su tri preseka i po tri slike po svakom preseku ($n=9$ po životinji). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM, pri čemu je $P < 0.05$ smatrana statistički značajnom razlikom.

Statistička obrada rezultata dobijenih u ELISA esejima je urađena korišćenjem Studentovog t-testa. Za određivanje koncentracije leptina i kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja merenja su vršena u duplikatu za 9 životinja iz svake grupe. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Za određivanje koncentracije kortikosterona u masnom tkivu pomešana je citosolna frakcija od tri životinje iz iste eksperimentalne grupe kako bi se dobilo dovoljno materijala za analizu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost od tri kombinovane citosolne frakcije \pm SEM ($n=9$). Za sva merenja pretpostavljena statistička značajnost je $P < 0.05$.

Statistička obrada rezultata dobijenih u „Western blot” i Real-time PCR eksperimentima je urađena korišćenjem Studentovog t-testa. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, pri čemu su kombinovana tkiva od tri životinje koje pripadaju istoj eksperimentalnoj grupi ($n=9$). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM. Za sva merenja pretpostavljena statistička značajnost je $P < 0.05$.

"Nauka nam je potvrdila, bez senke sumnje, da šeĆer u našoj ishrani u bezbroj svojih oblika uzima sve veĆi danak od našeg zdravlja"

4. REZULTATI

Polazeći od postavljenih ciljeva istraživanja, u ovoj disertaciji su analizirani efekti ishrane bogate fruktozom (10% i 60% rastvor fruktoze) na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma i na promene u signalnim putevima glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu mužjaka pacova.

4.1 Pacov hranjen fruktozom kao model metaboličkog sindroma

4.1.1 Unos hrane i kalorijski unos

Kao što je prikazano u **Tabeli 4** životinje koje su tokom tretmana u trajanju od devet nedelja hranjene 10% i 60% rastvorom fruktoze imale su statistički značajno smanjen unos hrane u poređenju sa životinjama na standardnoj ishrani ($*P<0.05$). Ipak, kod ovih životinja je, u odnosu na kontrolne životinje, zabeleženo povećanje ukupnog kalorijskog unosa ($*P<0.05$) i to poreklom od fruktoze (**Tabela 4**). Ovi rezultati ukazuju da u ishrani obogaćenoj fruktozom dolazi do poremećaja u regulaciji apetita.

Tabela 4. Fiziološki parametri kontrolnih životinja i životinja hranjenih fruktozom

	Kontrola	10% fruktoza	60% fruktoza
Unos hrane (g/dan/životinja)	21.73 ± 3.44	15.55 ± 1.39*	16.99 ± 3.06*
Unos fruktoze (ml/dan/životinja)	/	74.10 ± 11.38	13.32 ± 1.66
Kalorijski unos (kJ/dan/životinja)	239.05 ± 4.65	284.02 ± 10.22*	324.35 ± 11.89*
Masa tela (g)	333.50 ± 11.43	337.50 ± 8.95	345.64 ± 9.94
Masa visceralnog masnog tkiva (g)	4.37 ± 0.66	4.22 ± 0.40	6.26 ± 0.49*#
Odnos mase visceralnog masnog tkiva i ukupne telesne mase (×1000)	13.26 ± 1.93	12.39 ± 1.06	18.21 ± 1.40*#

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD. Rezultati su obrađeni One way ANOVA analizom praćenom *post-hoc* Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu i # $P < 0.05$ za 10% rastvor fruktoze u odnosu na 60% rastvor fruktoze

4.1.2 Masa tela i masa visceralnog masnog tkiva

Uprkos povećanom kalorijskom unosu, životinje na izmenjenom režimu ishrane obogaćene fruktozom nisu bile gojazne, što je potvrđeno odsustvom povećanja ukupne telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Tabela 4**). Iako fruktoza nije dovela do razvoja gojaznosti, doprinos fruktoze narušavanju metaboličke i energetske homeostaze praćen je na nivou odnosa mase visceralnog masnog tkiva i ukupne telesne mase. Ishrana životinja 10% rastvorom fruktoze nije uticala na masu visceralnog masnog tkiva, dok je kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze masa visceralnog masnog tkiva bila statistički značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu (**Tabela 4**, * $P < 0.05$). Kod ovih životinja je došlo do razvoja visceralne adipoznosti što je potvrđeno statistički značajnim povećanjem odnosa mase

visceralnog masnog tkiva u odnosu na ukupnu telesnu masu u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (**Tabela 4**, * $P < 0.05$) i grupom životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze (**Tabela 4**, # $P < 0.05$).

4.1.3 Slobodne masne kiseline, trigliceridi i kortikosteron

Kao što je prikazano u **Tabeli 5** statistički značajno povećanje koncentracije triglicerida kod životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze (** $P < 0.01$) primećeno je i nakon dugoročne ishrane 60% rastvorom fruktoze (* $P < 0.05$). Nasuprot tome, statistički značajno povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina koje je izmereno u plazmi životinja nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze (* $P < 0.05$) nije bilo uočeno nakon ishrane životinja 60% rastvorom fruktoze. Koncentracija kortikosterona u plazmi životinja je ostala nepromenjena kod obe eksperimentalne grupe koje su hranjene fruktozom u odnosu na kontrolnu grupu (**Tabela 5**).

Tabela 5. Biohemijski parametri kontrolnih životinja i životinja hranjenih fruktozom

	Kontrola	10% fruktoza	60% fruktoza
Slobodne masne kiseline (mmol/L)	0.61 ± 0.06	0.71 ± 0.06*	0.62 ± 0.13
Trigliceridi (mmol/L)	1.32 ± 0.25	1.9 ± 0.3**	1.55 ± 0.32*
Kortikosteron (ng/ml)	126.1 ± 90.23	238.38 ± 69.34	68.05 ± 45.82

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD. Rezultati su obrađeni One way ANOVA analizom praćenom *post-hoc* Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ i ** $P < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu

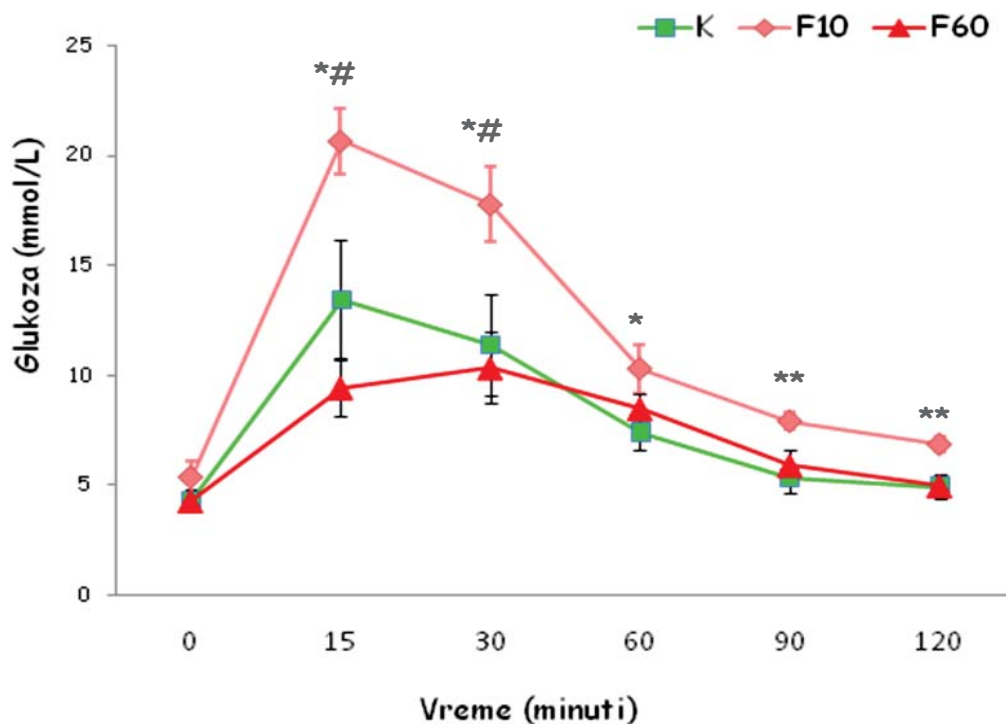
4.1.4 Parametri insulinske osetljivosti

Koncentracija glukoze koja je izmerena nakon prekonocnog gladovanja i indeks HOMA su bili nepromenjeni kod obe grupe životinja koje su bile na izmenjenom režimu ishrane obogaćene fruktozom u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, između eksperimentalnih grupa nije zabeležena statistički značajna promena u koncentraciji insulina (**Tabela 6**). Određivanjem površine ispod krive (AUC_{gluk}) procenjen je stepen tolerancije na glukozu. U skladu sa povećanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina nakon ishrane pacova obogaćene 10% rastvorom fruktoze (**Tabela 5**, $*P<0.05$), zabeleženo je i statistički značajno povećanje u vrednosti AUC_{gluk} u poređenju sa kontrolnom grupom kao i grupom životinja koje su hranjene 60% rastvorom fruktoze (**Slika 21**, $*P<0.05$, $\#P<0.05$). Ovaj nalaz ukazuje da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovodi do smanjenja tolerancije na glukozu.

Tabela 6. Parametri insulinske osetljivosti kontrolnih životinja i životinja hranjenih fruktozom

	Kontrola	10% fruktoza	60% fruktoza
Glukoza (mmol/L)	4.36 ± 0.52	4.60 ± 0.32	3.88 ± 0.24
Insulin (mIU/L)	13.09 ± 4.75	8.35 ± 4.69	13.49 ± 4.21
Indeks HOMA	2.86 ± 1.21	1.43 ± 1.09	1.58 ± 1.32
IP-GTT glukoza AUC	941.63 ± 86.9	1395.82 ± 67.48* [#]	912.38 ± 58.37

Rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD. Rezultati su obrađeni One way ANOVA analizom praćenom *post-hoc* Tukey testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu i $\#P<0.05$ za 10% rastvor fruktoze u odnosu na 60% rastvor fruktoze



Slika 21. IP-GTT kontrolnih životinja i životinja hranjenih fruktozom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Rezultati su obrađeni One way ANOVA i *post-hoc* Tukey testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu i $\#P<0.05$ za 10% rastvor fruktoze u odnosu na 60% rastvor fruktoze. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze; F60-60% rastvor fruktoze)

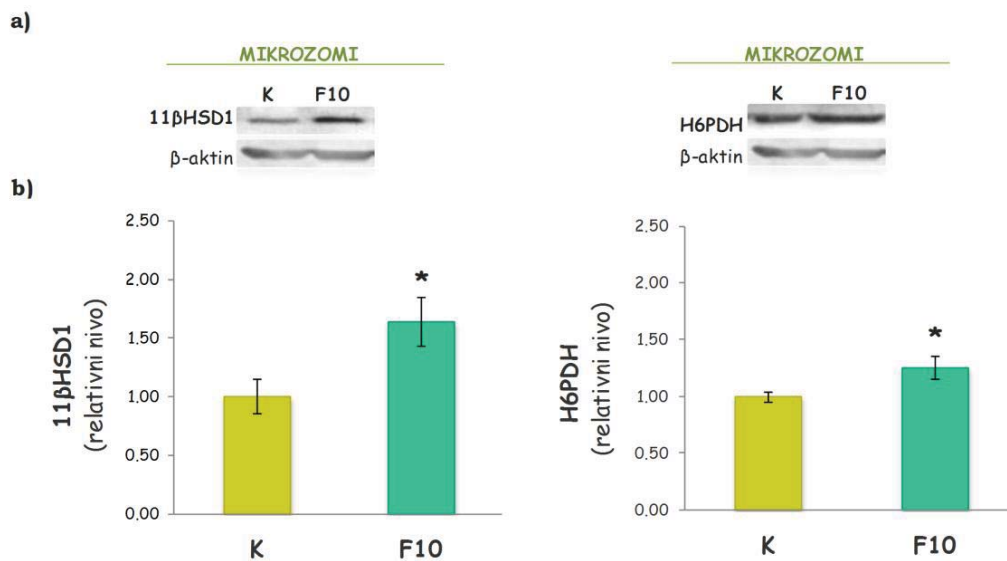
4.2 Signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu pacova hranjenog 10% rastvorom fruktoze

Efekti ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze u visceralnom masnom tkivu pacova su praćeni analizom glukokortikoidne signalizacije i inflamacije, kao i histološkom analizom adipocita.

4.2.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

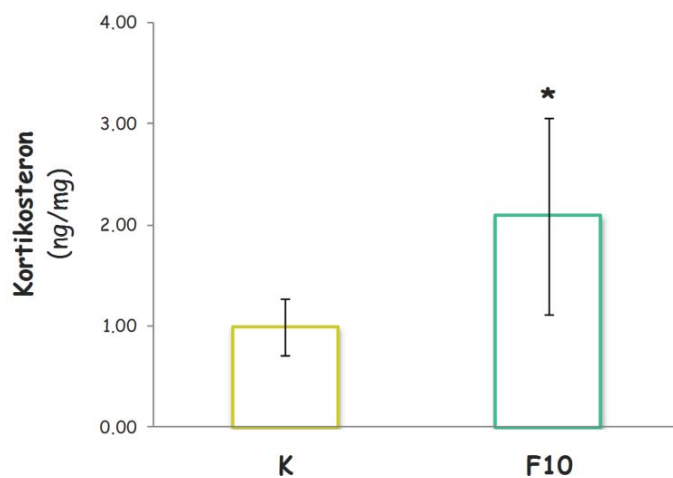
Prereceptorski metabolizam glukokortikoida je analiziran na nivou proteina uključenih u unutarćelijsku regeneraciju glukokortikoidnih hormona kao i određivanjem koncentracije kortikosterona, kao aktivne forme glukokortikoida, u visceralnom masnom tkivu pacova.

Konverzija neaktivne forme glukokortikoida (dehidrokortikosterona) u aktivnu formu (kortikosteron) je rezultat aktivnosti mikrozomalnih enzima 11β HSD1 i H6PDH. „Western blot“ analiza je pokazala značajno povećanje nivoa 11β HSD1 i H6PDH (**Slika 22**, $*P<0.05$) u mikrozomalnoj frakciji visceralnog masnog tkiva nakon ishrane životinja 10% rastvorom fruktoze.



Slika 22. a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za enzime 11β HSD1 (levo) i H6PDH (desno) u mikrozomima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo 11β HSD1 (levo) i H6PDH (desno) u mikrozomima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

Kao što je i očekivano, ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze stimulisala je prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona rezultujući statistički značajnim povećanjem koncentracije tkivnog kortikosterona (**Slika 23**, $*P<0.05$) u odnosu na kontrolu.

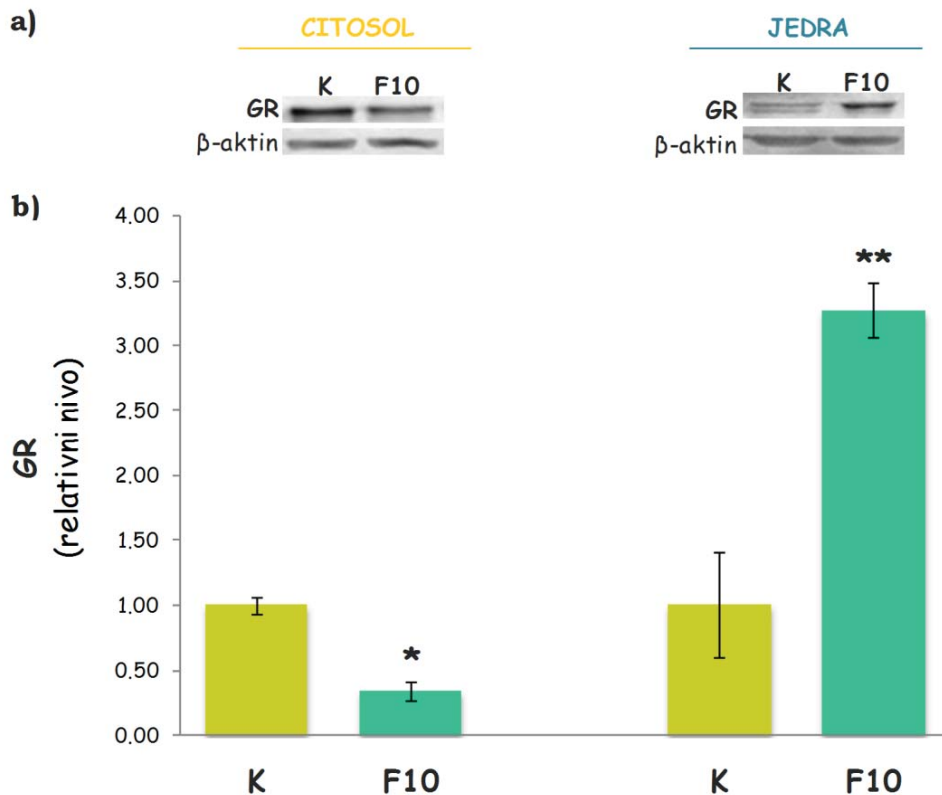


Slika 23. Koncentracija kortikosterona (ng/mg) u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

4.2.2 Unutarćelijska preraspodela GR-a

Kako bi se utvrdilo da li povećanje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu dovodi do aktivacije GR-a, praćena je unutarćelijska preraspodela ovog transkripcionog regulatora (**Slika 24**).

Povećanje koncentracije kortikosterona nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze ogleda se u značajnom smanjenju proteinskog nivoa GR-a u citosolnoj frakciji (**Slika 24** levo, $*P<0.05$) i istovremenom povećanju u jedarnoj frakciji (**Slika 24** desno, $**P<0.01$) visceralnog masnog tkiva. Ovi rezultati ukazuju da u odgovoru na ishranu pacova 10% rastvorom fruktoze dolazi do aktivacije GR-a i njegovog prelaska iz citoplazme u jedra.



Slika 24.

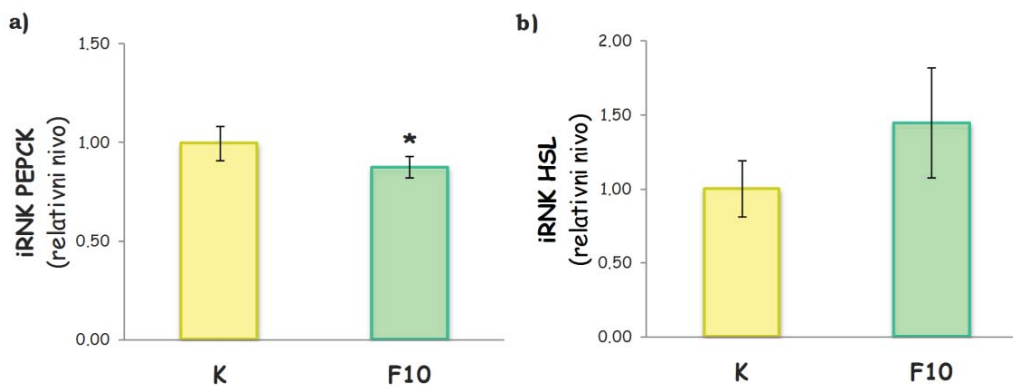
a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za GR u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze.

b) Relativni nivo GR-a u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P < 0.05$ i $**P < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

4.2.3 Ekspresija gena lipidnog metabolizma koji su regulisani GR-om

Iako veliki broj podataka ukazuje na značajnu ulogu glukokortikoidnih hormona u regulaciji lipidne homeostaze, malo se zna o ulozi GR-a kao transkripcionog regulatora gena uključenih u procese lipolize i lipogeneze u visceralnom masnom tkivu.

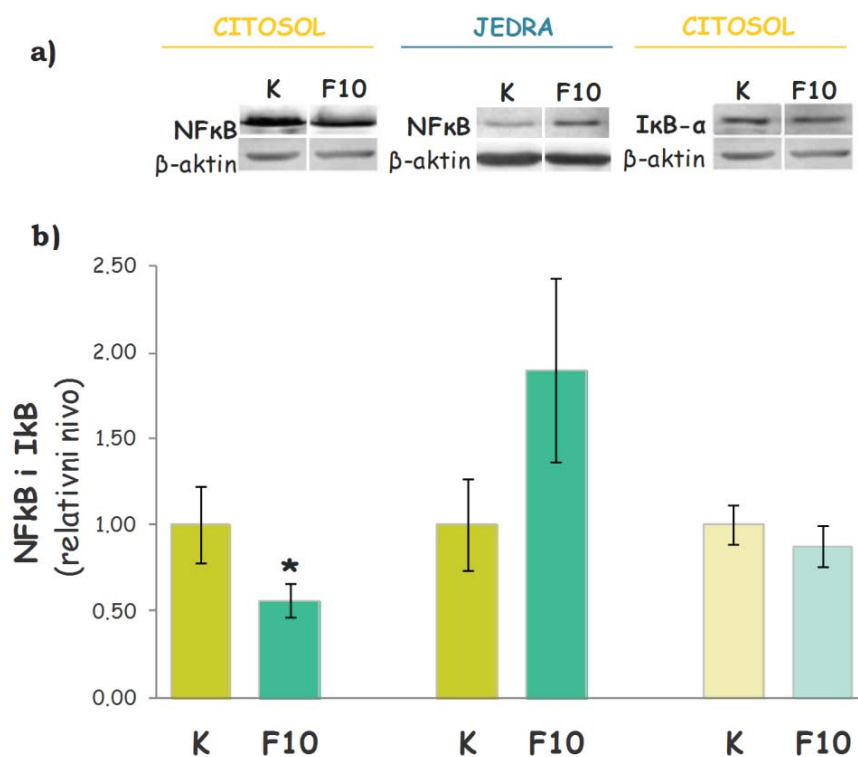
Kako bi se utvrdilo da li transkripciona aktivacija GR-a u odgovoru na ishranu obogaćenu 10% rastvorom fruktoze vodi ka stimulaciji lipolize ili lipogeneze, analizirani su nivoi iRNK za HSL i PEPCK. Pokazano je da dugoročna ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovodi do značajnog smanjenja nivoa transkripcije gena za PEPCK (**Slika 25a**, $*P<0.05$), dok je nivo iRNK za HSL ostao nepromenjen u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 25b**).



Slika 25. Relativna koncentracija iRNK za PEPCK **a)** i HSL **b)** u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

4.3 Razvoj metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu pacova hranjenog 10% rastvorom fruktoze

Kao posledica narušavanja lipidne homeostaze u okviru metabolički aktivnog visceralnog masnog tkiva dolazi do razvoja hronične inflamacije niskog intenziteta koja se označava kao metabolička inflamacija. Metabolička inflamacija se karakteriše povećanom produkcijom bioloških markera inflamacije, među kojima ključnu ulogu imaju transkripcioni regulator NFκB i proinflamatorni citokini kao što su TNF-α, IL-6 i MIF.

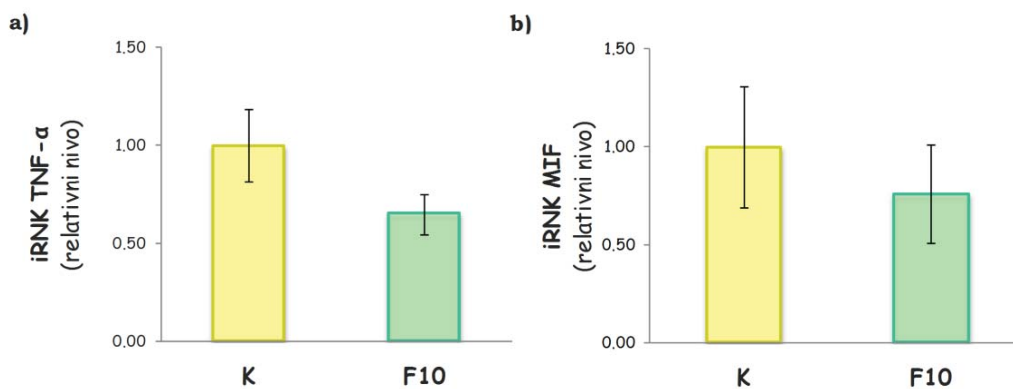


Slika 26.

a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za NFκB u citosolu (levo) i jedrima (sredina) i IκB-α u citosolu (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo NFκB u citosolu (levo) i jedrima (sredina) i nivo IκB-α u citosolu (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

U cilju određivanja efekata ishrane obogaćene 10% rastvorom na razvoj metaboličke inflamacije analizirana je unutarćelijska raspodela transkripciono aktivne subjedinice proteina NFκB (p65) i njegovog inhibitornog proteina (IκB-α). Kao što je prikazano na **Slici 26** nivo p65 subjedinice proteina NFκB je bio značajno smanjen u citosolu (* $P < 0.05$), dok je nivo u jedrima ostao nepromenjen nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze. Nivo inhibitornog proteina IκB-α u citosolu visceralnog masnog tkiva je ostao nepromenjen kod životinja na izmenjenom režimu ishrane u odnosu na kontrolnu grupu, ukazujući na odsustvo prelaska transkripciono aktivne subjedinice p65 u jedro (**Slika 26**).

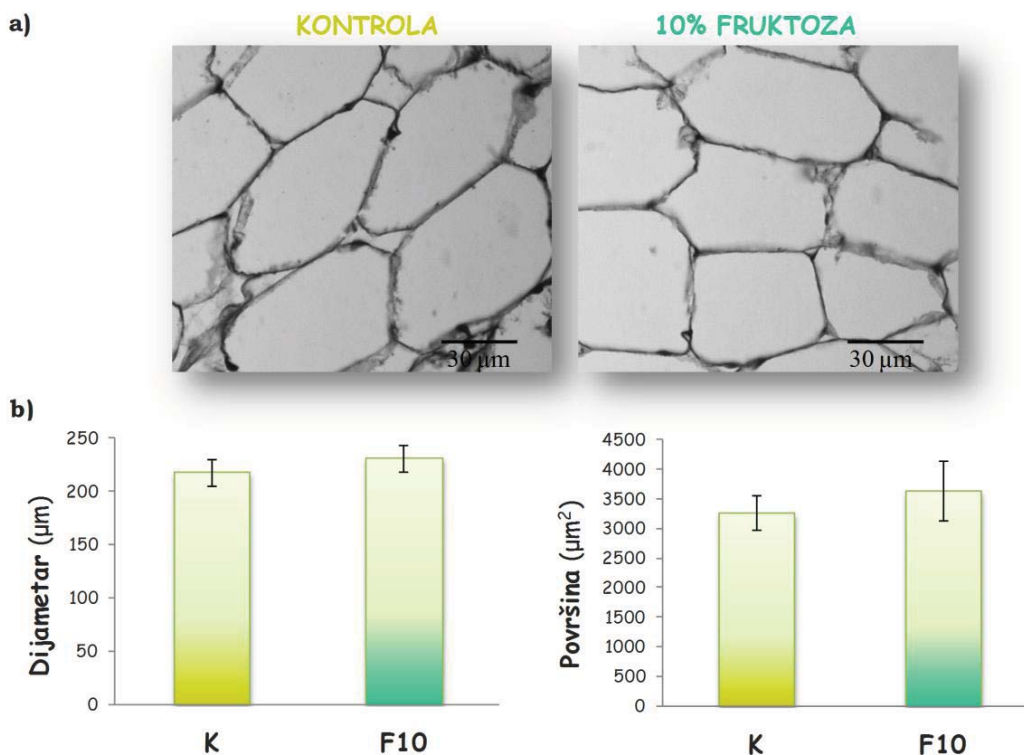
Pored analize efekata dugoročne ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze na subćelijsku raspodelu i aktivaciju proteina NFκB, praćene su i promene u nivou iRNK za TNF-α, IL-6 i MIF. Pokazano je da kod grupe životinja koja je bila izložena izmenjenom režimu ishrane ne dolazi do promene u koncentraciji iRNK za TNF-α i MIF u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Slika 27**), dok je IL-6 bio nedetektabilan i u kontrolnim i u tretiranim životinjama.



Slika 27. Relativna koncentracija iRNK za TNF-α **a)** i MIF **b)** u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

4.4 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze

Nakon hematoksilin eozin bojenja nisu uočene značajne razlike u obliku i veličini adipocita kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze (**Slika 28a**). Daljom morfometrijskom analizom je potvrđeno da ishrana životinja 10% rastvorom fruktoze ne utiče na promenu dijametra i površine adipocita u odnosu na iste parametre kod kontrolne grupe životinja (**Slika 28b**).

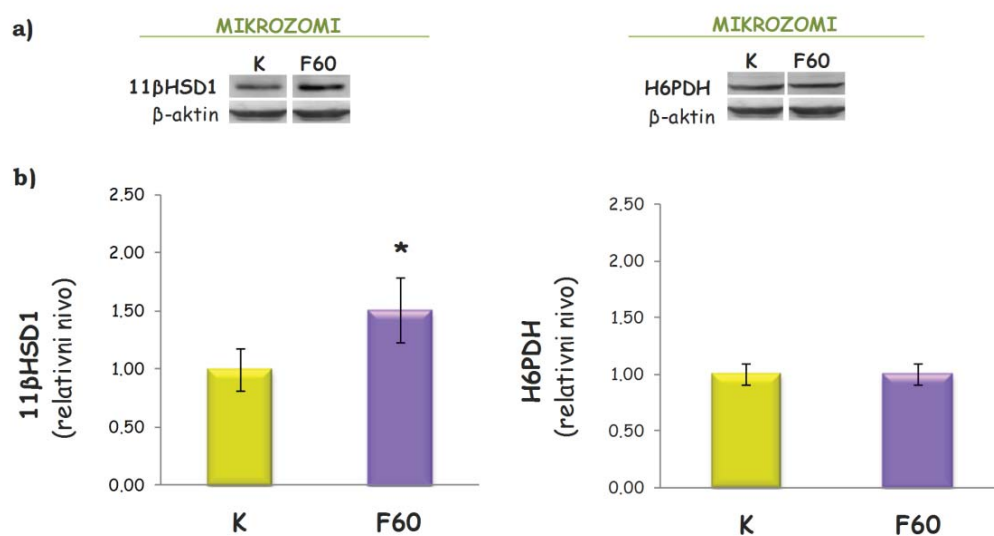


Slika 28. a) Histološki preparati visceralnog masnog tkiva nakon bojenja hematoksilin eozinom b) Morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze. Rezultati su analizirani korišćenjem softverskog programa Adiposoft, predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. (K-kontrola; F10-10% rastvor fruktoze)

4.5 Signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu pacova hranjenog 60% rastvorom fruktoze

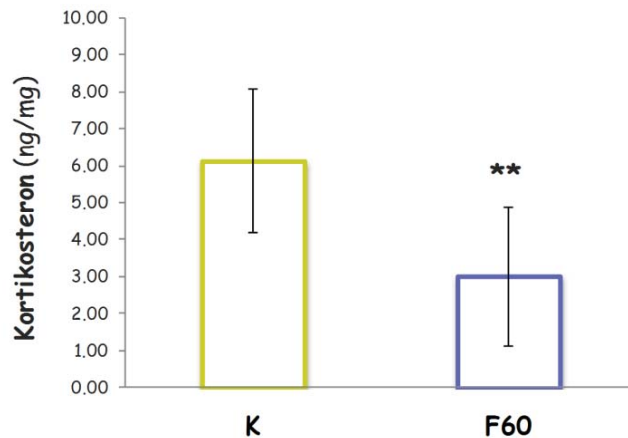
4.5.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

„Western blot“ analizom je pokazano da dugoročna ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa 11 β HSD1 u mikrozomalnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (**Slika 29** levo, * $P < 0.05$). Sa druge strane, izmenjeni režim ishrane nije doveo do promene u nivou mikrozomalnog enzima H6PDH (**Slika 29** desno).



Slika 29. a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za enzime 11 β HSD1 (levo) i H6PDH (desno) u mikrozomima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. b) Relativni nivo 11 β HSD1 i H6PDH u mikrozomima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Za razliku od tkivne regeneracije glukokortikoidnih hormona nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, koncentracija unutarćelijskog kortikosterona u visceralnom masnom tkivu je bila značajno smanjena nakon ishrane životinja 60% rastvorom fruktoze (**Slika 30**, $**P<0.01$) u odnosu na kontrolu.

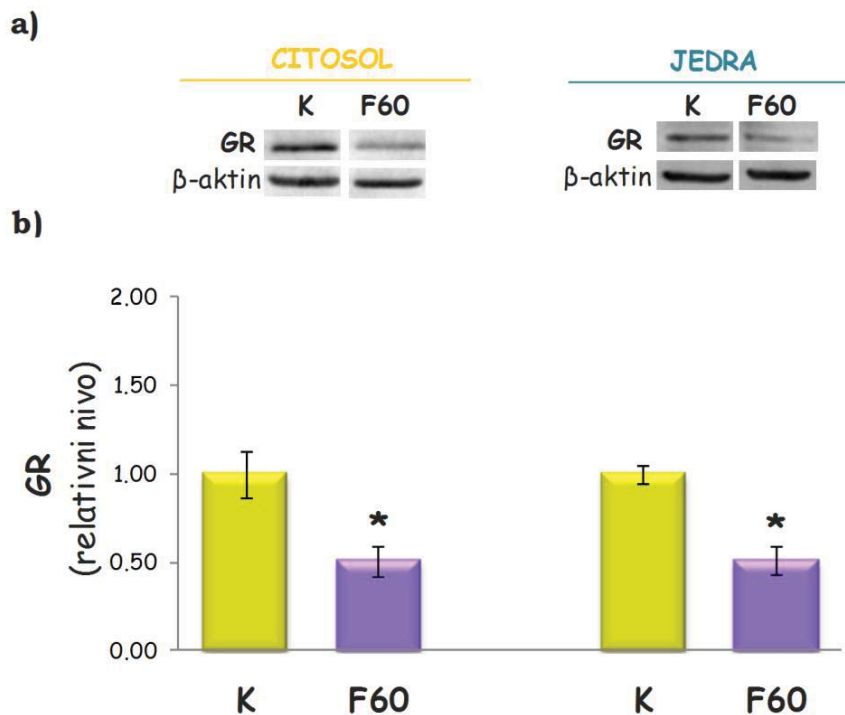


Slika 30. Koncentracija kortikosterona (ng/mg) u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $**P<0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

4.5.2 Unutarćelijska preraspodela GR-a

Kao što je očekivano, smanjenje koncentracije aktivne forme glukokortikoidnih hormona nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze je bilo praćeno i odsustvom aktivacije GR-a i njegovog prelaska u jedra.

Analizom unutarćelijske raspodele GR-a između citosolne i jedarne frakcije visceralnog masnog tkiva pokazano je da kod životinja na izmenjenom režimu ishrane dolazi do značajnog smanjenja proteinskog nivoa GR-a u obe posmatrane frakcije (**Slika 31**, $*P<0.05$) u odnosu na kontrolu.



Slika 31.

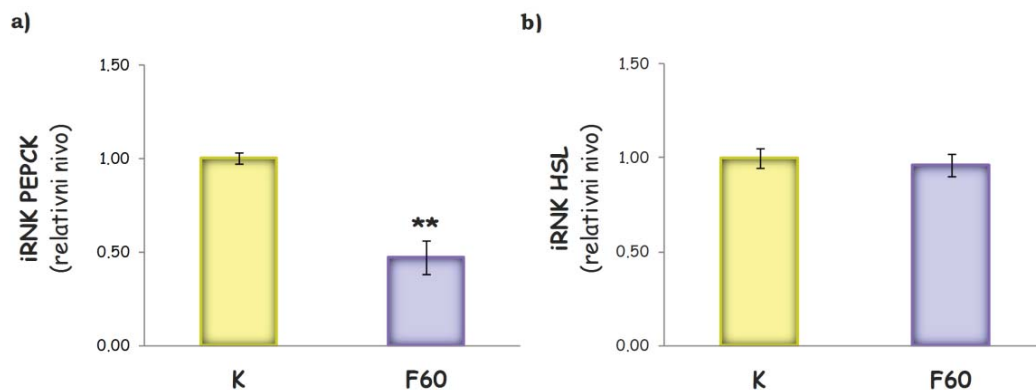
a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za GR u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze.

b) Relativni nivo GR-a u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Niska koncentracija tkivnog kortikosterona u odgovoru na ishranu obogaćenu 60% rastvorom fruktoze ne dovodi do aktivacije GR-a i njegovog prelaska iz citoplazme u jedra.

4.5.3 Ekspresija gena lipidnog metabolizma koji su regulisani GR-om

U cilju utvrđivanja efekata ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na ekspresiju gena lipidnog metabolizma regulisanih GR-om određeni su nivoi iRNK za gene PEPCK i HSL (**Slika 32**).



Slika 32. Relativna koncentracija iRNK za PEPCK **a)** i HSL **b)** u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $**P < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

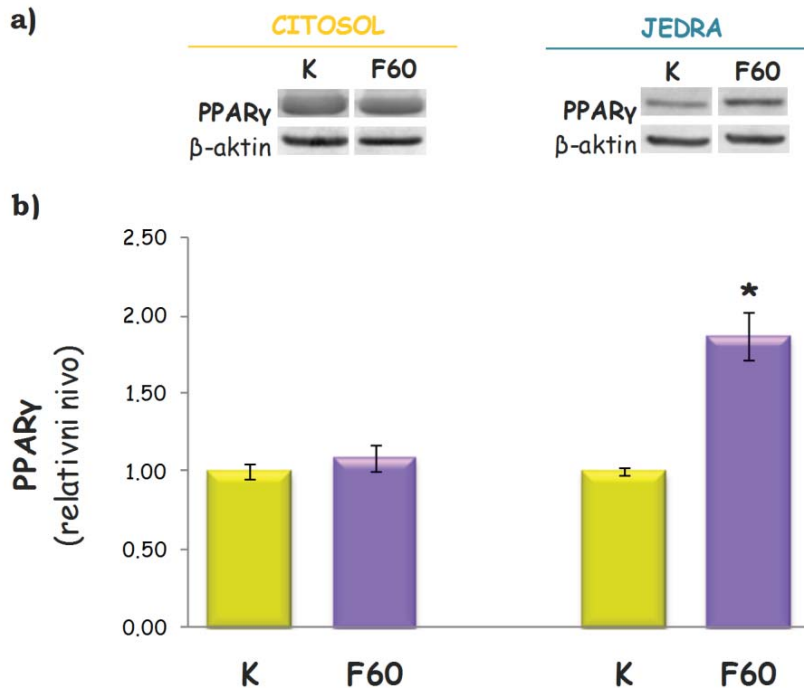
Dugoročna ishrana životinja 60% rastvorom fruktoze dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa iRNK za PEPCK (**Slika 32a**, $**P < 0.01$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. S druge strane, nivo iRNK za HSL je ostao nepromenjen kod tretirane grupe životinja (**Slika 32b**).

Ovi rezultati ukazuju da dugoročna ishrana životinja 60% rastvorom fruktoze ne dovodi do stimulacije lipolize, najverovatnije usled smanjene transkripcione aktivnosti GR-a, i da visceralna adipoznost uočena nakon fiziološke i biohemijske karakterizacije modela nije rezultat promena na nivou gena koji su regulisani GR-om.

4.5.4 Ekspresija gena uključenih u procese adipogeneze i lipogeneze

Povećanje količine masnog tkiva može nastati kao rezultat dva različita procesa: proliferacije i diferencijacije novih adipocita što je poznato kao adipogeneza, i sinteze i skladištenja triglicerida u formiranim, zrelim adipocitima što je proces poznat kao lipogeneza.

Analiza adipogeneze i lipogeneze je urađena određivanjem unutarćelijske distribucije i nivoa transkripcionih regulatora PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1, kao i određivanjem koncentracije iRNK za FAS.

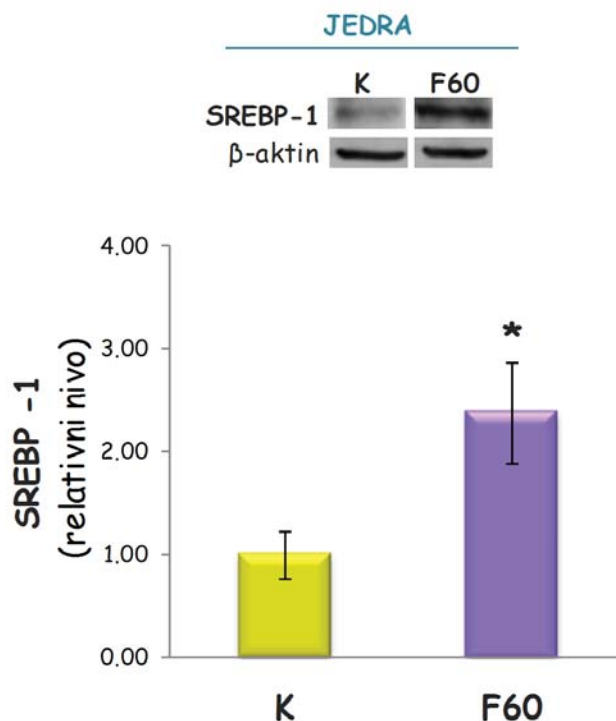


Slika 33.

a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za PPAR γ u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo PPAR γ u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Kao što je prikazano na **Slici 33**, ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze je dovela do značajnog povećanja nivoa proteina PPAR γ u jedrnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (* $P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu.

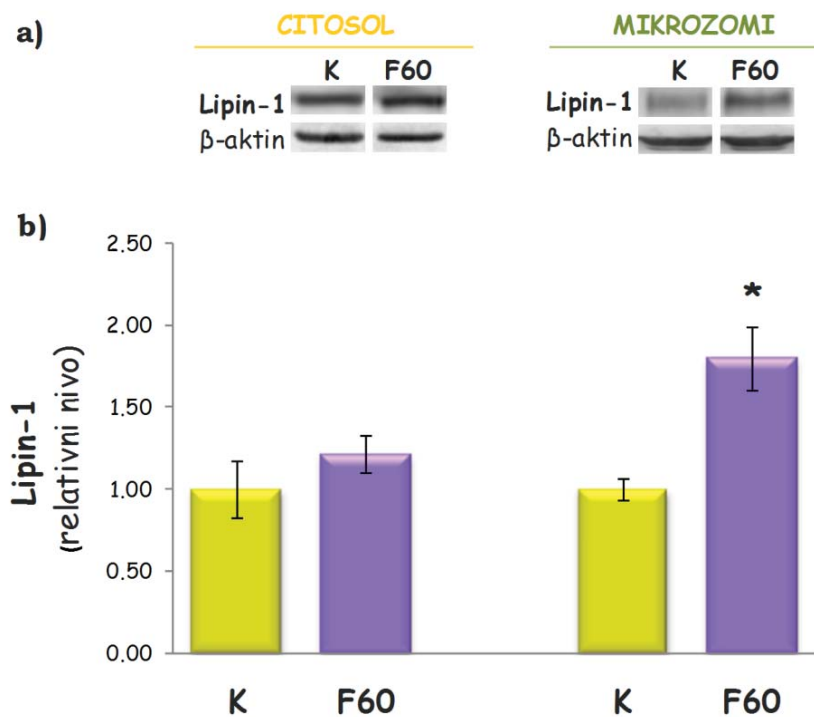
Ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze doprinosi adipogenezi i putem stimulacije transkripcionog regulatora SREBP-1. Naime, pokazano je da je proteinski nivo SREBP-1 bio značajno povećan u jedrima životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Slika 34**, * $P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 34.

a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za SREBP-1 u jedrima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo SREBP-1 u jedrima visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

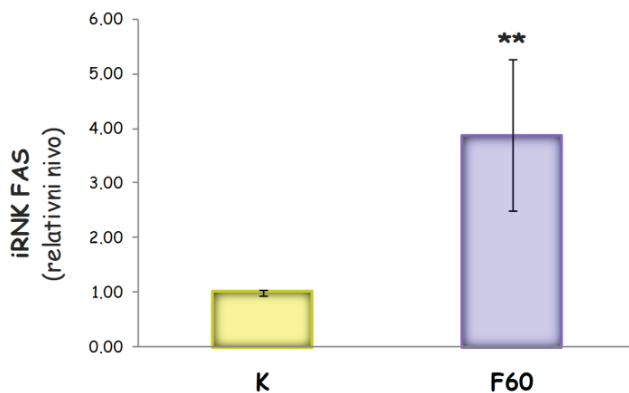
Nakon analize unutarćelijske raspodele lipina-1 između citosolne i mikrozomalne frakcije potvrđeno je da izmenjen režim ishrane utiče i na aktivaciju procesa lipogeneze. Iako je nivo lipina-1 u citosolu životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze ostao nepromenjen u odnosu na kontrolu (**Slika 35** levo), povećanje u mikrozomalnoj frakciji (**Slika 35** desno, $*P<0.05$) ukazuje na stimulaciju njegove enzimske aktivnosti u visceralnom masnom tkivu životinja u odgovoru na ishranu obogaćenu 60% rastvorom fruktoze.



Slika 35.

a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za lipin-1 u citosolu (levo) i mikrozosomima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo lipina-1 u citosolu (levo) i mikrozosomima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P<0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Pored analize ekspresije lipina-1, efekti ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na lipogenezu su procenjeni i analizom ekspresije gena za FAS. Kao što je prikazano na **Slici 36**, nivo iRNK za FAS je značajno povećan kod grupe životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (** $P < 0.01$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



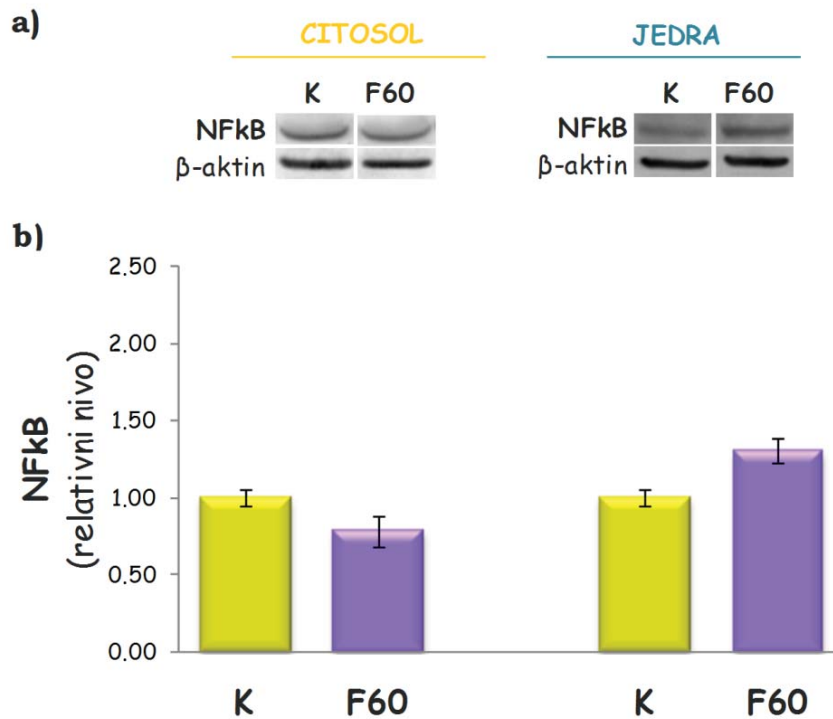
Slika 36. Relativna koncentracija iRNK za FAS u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao ** $P < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

4.6 Razvoj metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu pacova hranjenog 60% rastvorom fruktoze

U cilju analize efekata ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na inflamatorne procese u visceralnom masnom tkivu analizirana je ekspresija ključnih medijatora metaboličke inflamacije, transkripcionog regulatora NF κ B na nivou proteina i proinflamatornih citokina TNF- α i IL-6 na nivou iRNK.

Kao što je prikazano na **Slici 37**, ishrana životinja 60% rastvorom fruktoze nije dovela do značajnih promena u unutarćelijskoj raspodeli i

nivou transkripciono aktivne subjedinice proteina NFκB (p65) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

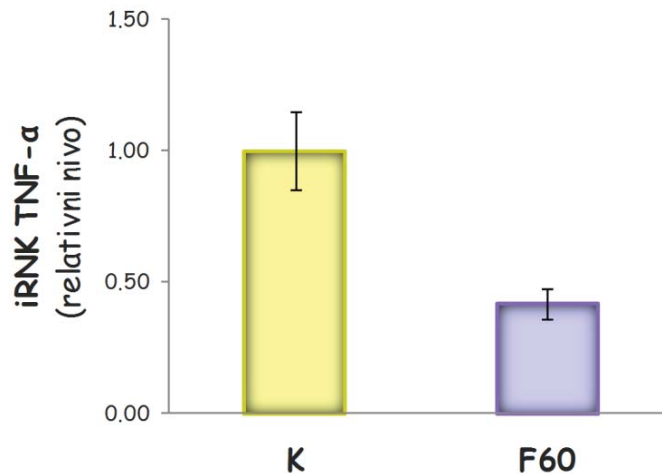


Slika 37.

a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za NFκB u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. **b)** Relativni nivo NFκB u citosolu (levo) i jedrima (desno) visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM i obrađeni Studentovim t-testom. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Analizom nivoa iRNK za TNF-α i IL-6 je dodatno potvrđeno da u odgovoru na dugoročnu ishranu životinja 60% rastvorom fruktoze ne dolazi do razvoja metaboličke inflamacije. Nivo iRNK za TNF-α bio je nepromenjen kod grupe životinja koje su hranjene 60% rastvorom fruktoze u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Slika 38**), dok je nivo

IL-6 bio nedetektabilan kao i u slučaju životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze.



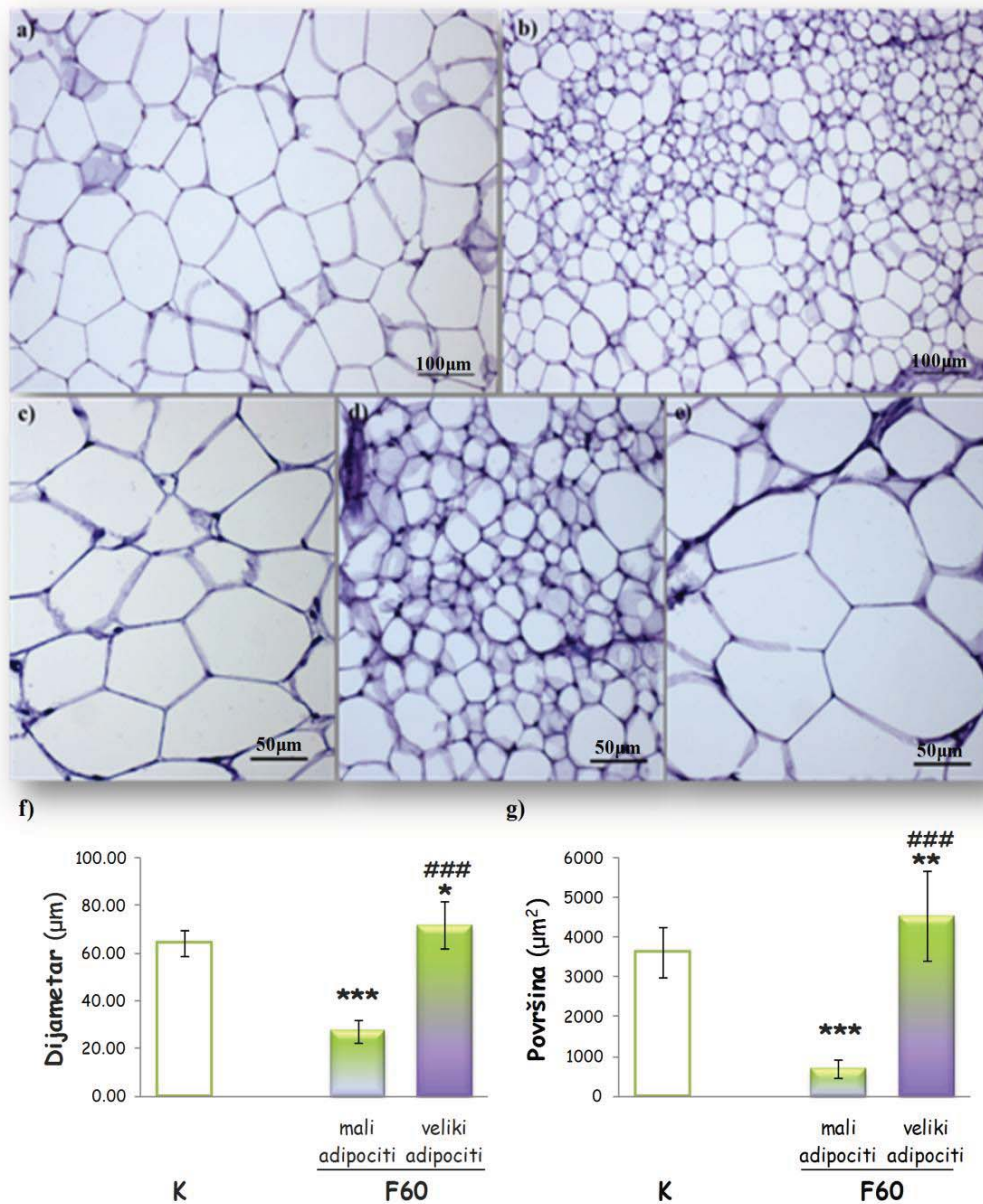
Slika 38. Relativna koncentracija iRNA za TNF- α u visceralnom masnom tkivu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNA je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNA za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

4.7 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktozom

Za razliku od ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, gde histološka analiza nije pokazala razlike u visceralnom masnom tkivu između eksperimentalnih grupa, analizom histoloških preparata visceralnog masnog tkiva nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze uočene su značajne razlike.

Kao što je prikazano na **Slici 39**, nakon bojenja hematoksilin eozinom uočene su dve jasno izdvojene populacije adipocita kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Slika 39b**). Populaciju velikih adipocita (**Slika 39e**) kod ovih životinja činile su ćelije koje su morfološki bile slične adipocitima kontrolnih životinja (**Slika 39c**). Veliki adipociti su se karakterisali prisustvom velike masne kapi koja je bila okružena debelim slojem citoplazme i čije je jedro bilo jasno vidljivo i u obliku polumeseca. Daljom morfometrijskom analizom je pokazano da su i dijametar (**Slika 39f**, $*P<0.05$) i površina (**Slika 39g**, $**P<0.01$) velikih adipocita životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze značajno veći u poređenju sa adipocitima kontrolnih životinja. Populaciju malih ćelija činili su adipociti okarakterisani tankim slojem citoplazme i jasnim ovalnim jedrom (**Slika 39d**). Morfometrijskom analizom je pokazano da su i dijametar i površina ovih ćelija bili značajno manji u odnosu na adipocite kontrolnih životinja (**Slika 39f i 39g**, $***P<0.001$), kao i u odnosu na velike adipocite životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Slika 39f i 39g**, $###P<0.001$).

Ovi rezultati ukazuju da se na osnovu histološke analize visceralnog masnog tkiva može zaključiti da ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do jasnih promena na nivou izgleda i veličine adipocita.

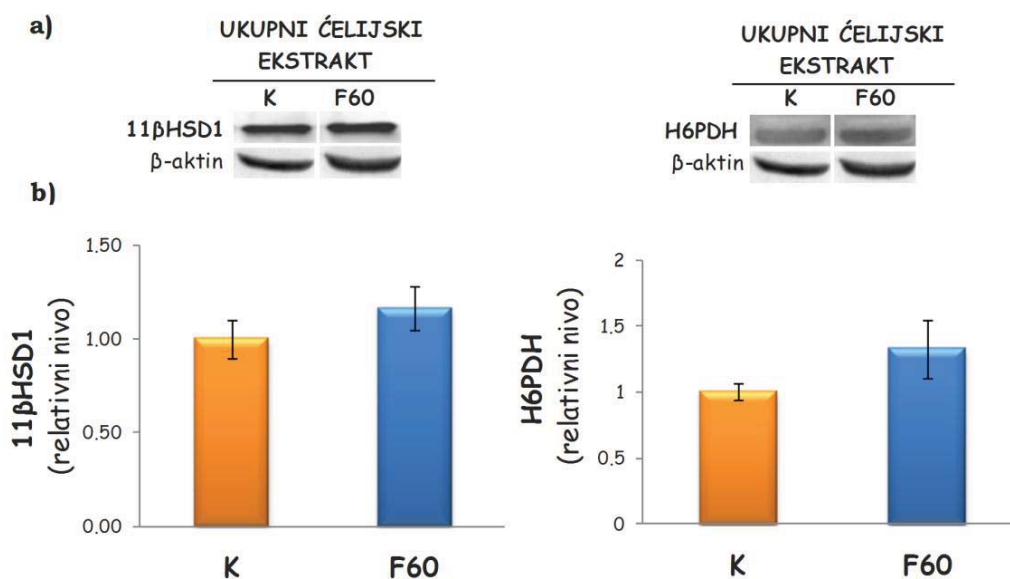


Slika 39. Hematoksilin eozin bojenje visceralnog masnog tkiva kontrolnih životinja **a)** i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze **b)**. 20x uvećanje adipocita kontrolnih životinja **c)** 20x uvećanje malih adipocita **d)** i velikih adipocita životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze **e)**. Morfometrijska analiza kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze **f)** i **g)**. Rezultati su analizirani korišćenjem softverskog programa Adiposoft, predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni One way ANOVA praćene *post-hoc* Tukey testom. Vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao *** $P < 0.001$ adipociti kontrolnih životinja vs mali adipociti životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze, ### $P < 0.001$ mali vs veliki adipociti životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze i ** $P < 0.01$ kontrolni adipociti vs veliki adipociti životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

4.8 Signalni put glukokortikoida u hipotalamusu pacova hranjenog 60% rastvorom fruktoze

Efekti ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na razvoj karakteristika metaboličkog sindroma su praćeni i na nivou analize signalnih puteva u hipotalamusu, regionu mozga koji zauzima centralno mesto u održavanju energetske homeostaze.

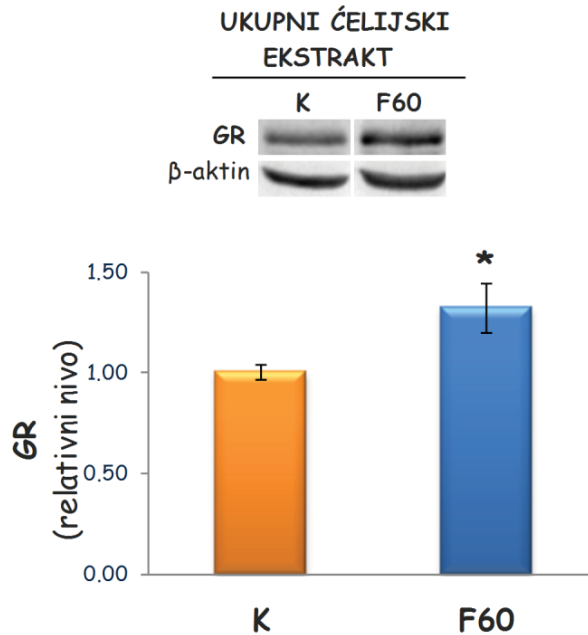
Kako bi se utvrdilo da li ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do razvoja visceralne adipoznosti putem promena na nivou glukokortikoidne signalizacije u hipotalamusu, analiziran je prereceptorski metabolizam glukokortikoda i nivo proteina GR-a.



Slika 40. a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za enzime 11βHSD1 (levo) i H6PDH (desno) u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. b) Relativni nivo 11βHSD1 (levo) i H6PDH (desno) u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β-aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a vrednost $P < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Prereceptorski metabolizam je analiziran određivanjem proteinskog nivoa 11 β HSD1 i H6PDH u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa. Nakon dugoročne ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze koncentracije oba enzima uključenih u tkivnu regeneraciju glukokortikoidnih hormona bile su nepromenjene u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Slika 40**).

Analiza proteinskog nivoa GR-a je pokazala da u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze dolazi do značajnog povećanje nivoa GR-a (**Slika 41**, * $P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 41.

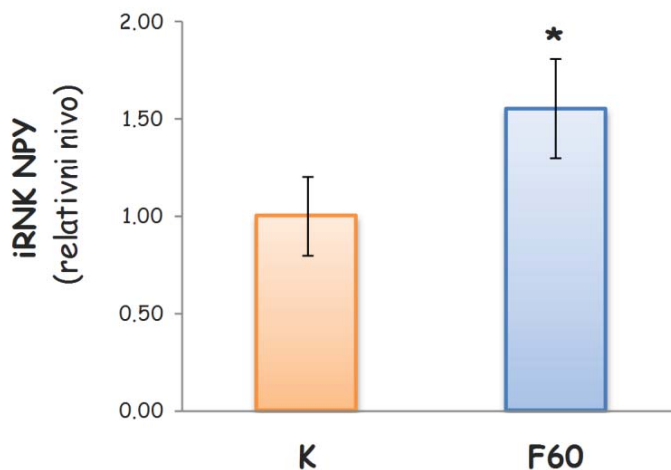
a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za GR u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze.

b) Relativni nivo GR-a u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

4.8.1 Ekspresija gena za NPY

Iako ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze nije uticala na regeneraciju aktivnih formi glukokortikoida u hipotalamusu, povećanje proteinskog nivoa GR-a kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze ukazuje na njegovu aktivaciju. To je i potvrđeno analizom ekspresije gena za NPY, oreksigeni neuropeptid čija je ekspresija regulisana GR-om.

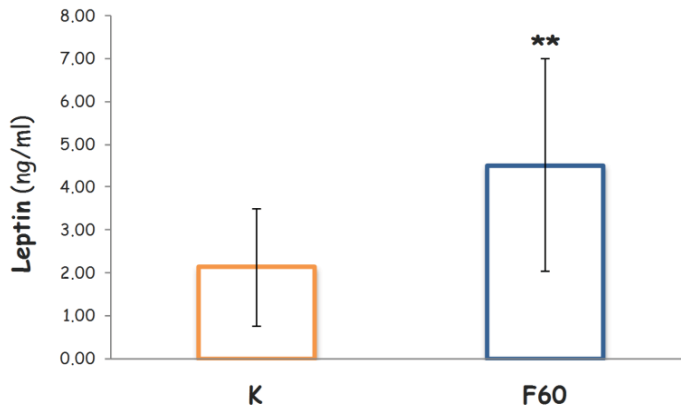
Kao što je prikazano na **Slici 42**, ishrana životinja 60% rastvorom fruktoze dovodi do značajnog povećanja nivoa iRNK za NPY (* $P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 42. Relativna koncentracija iRNK za NPY u hipotalamusu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

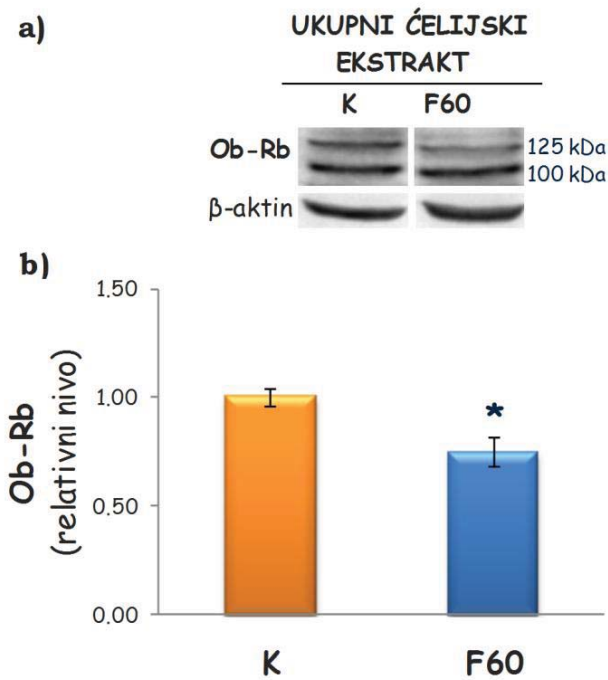
4.9 Signalni put leptina u hipotalamusu pacova hranjenog 60% rastvorom fruktoze

Efekti ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na signalne puteve leptina su praćeni analizom nivoa leptina u plazmi kao i analizom nivoa leptinskog receptora (Ob-Rb) i nivoa iRNK za SOCS3 u hipotalamusu. Nakon ishrane životinja rastvorom fruktoze koncentracije 60%, koncentracija leptina u plazmi je bila značajno povećana u odnosu na životinje na normalnoj ishrani (**Slika 43**, ** $P < 0.01$).



Slika 43. Koncentracija leptina (ng/ml) u plazmi kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SD. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao ** $P < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

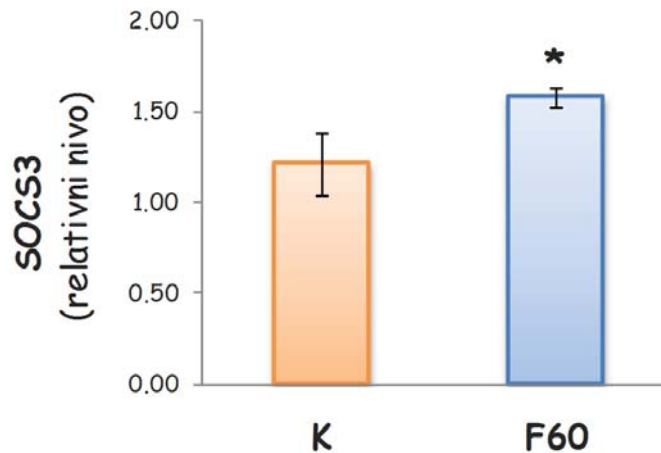
„Western blot“ analizom je pokazano da kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze dolazi do značajnog smanjenja nivoa duge izoforme leptinskog receptora [Slika 44, Ob-Rb, 125 kDa ($*P < 0.05$)] u odnosu na kontrolu. S obzirom da je Ob-Rb izoforma odgovorna za prenos leptinskog signala kroz ćeliju, zabeleženi rezultati mogu da ukažu na smanjenu osetljivosti na hormon leptin u odgovoru na ishranu obogaćenu 60% rastvorom fruktoze.



Slika 44. a) Reprezentativni „Western blot“ eksperimenti za Ob-R (Ob-Rb-duga izoforma, 125 kDa) u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. b) Relativni nivo Ob-R (Ob-Rb-duga izoforma, 125 kDa) u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. β -aktin je korišćen kao kontrola nanošenja jednake količine proteina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom, a statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao $*P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

Doprinos ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze na smanjenu osetljivost na hormon leptin i razvoj leptinske rezistencije potvrđen je i analizom ekspresije gena za glavni inhibitorski protein signalnog puta leptina, SOCS3.

U skladu sa pretpostavljenim mehanizmom leptinske rezistencije, primećen je značajno povećan nivo iRNK za SOCS3 kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Slika 45**, * $P < 0.05$).



Slika 45. Relativna koncentracija iRNK za SOCS3 u hipotalamusu kontrolnih životinja i životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1 kao endogenu kontrolu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM i obrađeni Studentovim t-testom. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su predstavljene kao * $P < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. (K-kontrola; F60-60% rastvor fruktoze)

"Smrt od šećera" možda i nije prejak izraz

5. DISKUSIJA

Hronične bolesti kao što su gojaznost, dijabetes tipa 2 i hipertenzija, zajedno obuhvaćene terminom metabolički sindrom, nastaju kao posledica savremenog načina života i predstavljaju vodeće uzročnike smrtnosti današnjeg čoveka (*Simmons i saradnici, 2010*). Razumevanje etiologije i patofiziologije metaboličkog sindroma je od velikog značaja s obzirom da u kliničkoj praksi još uvek nije definisan univerzalan obrazac faktora rizika i kliničkih simptoma sindroma. Povećan unos fruktoze, pre svega putem bezalkoholnih pića u kojima se ovaj šećer koristi kao zaslađivač, smatra se bitnim etiološkim faktorom u razvoju metaboličkog sindroma (*Bray, 2013; Bray i Champagne, 2004; Tappy i saradnici, 2013*). Veliki broj studija na životinjama je pokazao da ishrana bogata fruktozom, putem poremećaja signalnih i metaboličkih puteva u metabolički aktivnim tkivima (*Ferder i saradnici, 2010; Miller i Adeli, 2008*) dovodi do razvoja gojaznosti, insulinske i leptinske rezistencije, dislipidemije, hipertenzije i inflamacije (*Shapiro i saradnici, 2008; Stanhope i Havel, 2009; Tran i saradnici, 2009; Yokozawa i saradnici, 2008*).

Uzimajući u obzir navedene podatke, dugotrajna ishrana pacova različitim rastvorima fruktoze (10% i 60% rastvor fruktoze) je odabrana kao životinjski model metaboličkog sindroma, pri čemu je bilo bitno utvrditi i da li efekti fruktoze na razvoj metaboličkog sindroma zavise od koncentracije fruktoze u rastvoru kojim su životinje hranjene. Postavljena je hipoteza da fruktoza dovodi do razvoja gojaznosti i metaboličkog sindroma putem poremećaja u molekularnim mehanizmima kojim glukokortikoidni hormoni regulišu energetske homeostazu. Iako se zna da su glukokortikoidni hormoni važni regulatori energetske bilansa i da imaju značajnu ulogu tokom razvoja gojaznosti (*Dallman i saradnici, 2007*), bilo je neophodno analizirati molekularne mehanizme delovanja glukokortikoida u odabranom životinjskom modelu, s obzirom da je njihova uloga u patogenezi metaboličkog sindroma samo delimično razjašnjena. U tom cilju,

praćeni su efekti ishrane bogate fruktozom na promene u signalnim putevima glukokortikoidnih hormona u centralnim organima energetskog metabolizma, hipotalamusu i visceralnom masnom tkivu. U cilju testiranja postavljene hipoteze analiziran je prereceptorski metabolizam glukokortikoida, kao i nivo GR-a i njegova preraspodela između subćelijskih frakcija u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu mužjaka pacova. U visceralnom masnom tkivu su izučavani efekti ishrane bogate fruktozom na ekspresiju gena uključenih u metabolizam masnog tkiva (PPAR γ , SREBP-1, lipina-1, HSL, PEPCCK i FAS), kao i markera inflamatornih procesa (NF κ B, TNF- α , IL-6 i MIF). U hipotalamusu je izučavana ekspresija leptinskog receptora kao i ekspresija gena koji su uključeni u signalni put leptina (SOCS3 i NPY).

5.1 Fiziološka i biohemijska karakterizacija pacova hranjenog fruktozom kao modela metaboličkog sindroma

Pacov hranjen fruktozom se često koristi kao životinjski model metaboličkog sindroma (Mayes, 1993). Najveći broj istraživanja u ovoj oblasti zasniva se na ispitivanjima efekata fruktoze koja se unosi putem čvrste hrane, dok je broj podataka koji se odnose na efekte fruktoze u tečnom stanju daleko manji (Korićanac i saradnici, 2013). U zavisnosti od toga da li ishrana sadrži različitu količinu fruktoze i/ili se unosi u kombinaciji sa drugim vrstama šećera ili mastima, zatim u zavisnosti od toga da li je fruktoza u tečnom ili čvrstom obliku, ali i u zavisnosti od dužine tretmana, dolazi do razvoja različitih fizioloških i biohemijskih karakteristika metaboličkog sindroma (Axelsen i saradnici, 2010; Sanchez-Lozada i saradnici, 2007). Najznačajniji izvor fruktoze u ljudskoj ishrani predstavljaju gazirana pića i zaslađeni voćni sokovi u kojima je koncentracija fruktoze između 7% i 15% (Dills, 1993).

Procenjeno je da u ishrani čoveka oko 8% od ukupnog dnevnog kalorijskog unosa vodi poreklo od fruktoze (Havel, 2005). U našoj studiji, *ad libitum* ishrana pacova standardnom laboratorijskom hranom i 10% rastvorom fruktoze je odabrana u cilju izučavanja metaboličkih poremećaja koji kod čoveka nastaju usled prosečnog unosa fruktoze putem zaslađenih napitaka (Vos i saradnici, 2008). Istraživanja drugih autora su pokazala da ishrana pacova čvrstom hranom koja sadrži veliku količinu fruktoze (50% ili 60% fruktoza) doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja koji su slični onima koji se javljaju kod osoba obolelih od metaboličkog sindroma (Hwang i saradnici, 1987; Nagai i saradnici, 2002; Nakagawa i saradnici, 2006). Na osnovu literaturnih podataka, pacovi koji imaju *ad libitum* pristup standardnoj laboratorijskoj hrani i 60% rastvoru fruktoze su odabrani kao model za proučavanje metaboličkih promena koje kod čoveka nastaju usled prekomernog unosa napitaka u kojem se fruktoza koristi kao zaslađivač.

Nakon dugoročne ishrane životinja rastvorima fruktoze različitih koncentracija kod obe grupe životinja na izmenjenom režimu ishrane dolazi do značajnog povećanja u kalorijskom unosu u odnosu na kontrolnu grupu životinja (**Tabela 4**). Dobijeni podaci su u saglasnosti sa studijama u kojima je pokazano da ishrana bogata fruktozom, nezavisno od koncentracije fruktoze, doprinosi povećanju ukupnog kalorijskog unosa (Sanchez-Lozada i saradnici, 2007). Povećanje kalorijskog unosa nastaje verovatno kao posledica prekomernog unosa fruktoze, s obzirom da je kod ovih životinja uočen smanjen unos hrane (**Tabela 4**). Naime, pokazano je da fruktoza putem delovanja na oreksigene neuropeptide u okviru jedara hipotalamusa povećava želju za unosom ugljenih hidrata, mnogo više nego za unosom ostalih vrsta hranjivih materija (Ammar i saradnici, 2000; Benoit i saradnici, 2005; Stanley i saradnici, 1985; Stanley i Leibowitz, 1985). Važno je napomenuti da fruktoza ne dovodi do stimulacije oslobađanja insulina

iz pankreasa kao što to čine druge vrste šećera (Havel, 2005; Rizkalla, 2010). Pored toga, ako je fruktoza prisutna u tečnom obliku, ona ne uzrokuje dovoljnu produkciju hormona grelina, čime dolazi do njenog prekomernog unosa i posledično se javlja energetska višak (Mourao i saradnici, 2007). Kako je telesna masa zavisna od energetskog bilansa (Tappy i Mittendorfer, 2012), moglo bi se pretpostaviti da povećanje ukupnog kalorijskog unosa doprinosi i povećanju telesne mase. Međutim, u našoj studiji životinje na režimu ishrane obogaćene fruktozom nisu bile gojazne, što je potvrđeno nepromenjenom ukupnom telesnom masom (**Tabela 4**). I pored brojnih studija na laboratorijskim životinjama u kojima je praćen uticaj fruktoze na povećanje ukupne telesne mase i razvoj gojaznosti, u literaturi se mogu naći različiti podaci. Pojedine studije ukazuju da fruktoza doprinosi povećanju ukupne telesne mase (Jurgens i saradnici, 2005; Kanarek i Orthen-Gambill, 1982; Williams i Szepesi, 1983), dok su drugi autori pokazali da fruktoza nema takav efekat (Hallfrisch i saradnici, 1982; Reiser i Hallfrisch, 1977; Vrana i saradnici, 1973). Iako fruktoza nije dovela do razvoja gojaznosti kod životinja u našoj studiji, njen doprinos narušavanju metaboličke i energetske homeostaze ogledao se povećanjem mase visceralnog masnog tkiva. Uočeno je da ishrana životinja 10% rastvorom fruktoze ne dovodi do promena u masi visceralnog masnog tkiva (**Tabela 4**). Nasuprot tome, kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze masa visceralnog masnog tkiva kao i relativan odnos mase visceralnog masnog tkiva i ukupne telesne mase je bio značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu, kao i na grupu životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze (**Tabela 4**). Na osnovu dobijenih rezultata zaključili smo da je dugoročna ishrana životinja rastvorom fruktoze veće koncentracije dovela do razvoja visceralne adipoznosti.

Bitna karakteristika ishrane obogaćene fruktozom je povećanje sinteze triglicerida i *de novo* lipogeneze, koje se pretežno odigrava u jetri

i mišićima (*Dekker i saradnici, 2010; Rizkalla, 2010*). *Stanhope i saradnici* su pokazali da povećan unos fruktoze dovodi do razvoja visceralne gojaznosti, promoviše dislipidemiju i povećava insulinsku rezistenciju. Jedan od pretpostavljenih mehanizama koji se nalazi u osnovi razvoja dislipidemije nakon ishrane obogaćene fruktozom je povećana produkcija triglicerida i smanjen nivo klirensa triglicerida usled smanjene stimulacije sekrecije insulina od strane fruktoze (*Stanhope i Havel, 2008b*). U našoj studiji, ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze je dovela do značajnog povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji (**Tabela 5**). Ovo zapažanje je bilo u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da fruktoza dovodi do povećanja koncentracije triglicerida i slobodnih masnih kiselina, kao i krvnog pritiska kod pacova (*Nandhini i Anuradha, 2004; Reddy i saradnici, 2009; Rodriguez-Calvo i saradnici, 2009*). Može se pretpostaviti da je jedan od razloga za odsustvo gojaznog fenotipa nakon ishrane pacova obogaćene 10% rastvorom fruktoze ektopična akumulacija triglicerida koja nastaje kao rezultat usmeravanja viška slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije u neadipogena tkiva, pre svega jetru i mišiće (*Fabbrini i saradnici, 2009*). Povećanje koncentracije triglicerida je uočeno i nakon dugoročne ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze, ali kod ove grupe životinja nisu zabeležene promene u koncentraciji slobodnih masnih kiselina (**Tabela 5**). Ovaj rezultat je ukazao na moguće postojanje razlika u osetljivosti na insulin između dva različita modela metaboličkog sindroma. Naime, poznato je da je koncentracija slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji u pozitivnoj korelaciji sa razvojem insulinske rezistencije (*Bjorntorp, 1992; Lebovitz i Banerji, 2005*). Rezultati naših istraživanja su pokazali da nezavisno od količine fruktoze kojom su životinje hranjene, koncentracije insulina i glukoze u plazmi ostaju nepromenjene (**Tabela 6**). Ovakav rezultat je bio očekivan, s obzirom da je poznato da u odgovoru na fruktozu dolazi do slabe stimulacije sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa (*Elliott i saradnici, 2002*). Pored određivanja koncentracije insulina i glukoze,

stepen insulinske rezistencije procenjen je i na nivou parametara insulinske osetljivosti korišćenjem metode IP-GTT i određivanjem indeksa HOMA. Kao što smo i očekivali na osnovu nepromenjenih koncentracija insulina i glukoze, indeks HOMA je bio nepromenjen kod obe grupe životinja koje su bile na ishrani obogaćenoj fruktozom. Ipak, primenom metode IP-GTT uočeno je da nakon ishrane životinja 10% rastvorom fruktoze dolazi do smanjenja osetljivosti na insulin, što je potvrđeno značajnim povećanjem površine ispod krive (AUC_{gluk}) koja predstavlja vremensku zavisnost koncentracije glukoze u krvi posle opterećenja glukozom (**Tabela 6** i **Slika 21**). Povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji predstavlja jedan od vodećih uzroka razvoja i progresije insulinske rezistencije (*Griffin i saradnici, 1999; McGarry, 1994*). Poznato je da tokom perioda energetske viška dolazi do povećanja oslobađanja uskladištene energije u vidu triglicerida unutar masnog tkiva (*Nielsen i saradnici, 2004*). Kao posledica oslobađanja velike količine slobodnih masnih kiselina i medijatora inflamacije u cirkulaciju (*Fontana i saradnici, 2007*) dolazi do razvoja insulinske rezistencije (*Dekker i saradnici, 2010*). U skladu sa tim, poremećaji u osetljivosti na insulin nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze verovatno nastaju kao posledica povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi, koje je pokazano samo kod ove grupe životinja (**Tabela 5**). Nakon ishrane obogaćene rastvorom fruktoze koncentracije 60% nisu zabeležene promene ni u sistemskoj ni u lokalnoj insulinskoj osetljivosti (**Tabela 6**). Dobijeni podaci su bili u saglasnosti sa nepromenjenom koncentracijom slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji koja je zabeležena kod ove grupe životinja (**Tabela 5**). Na osnovu dobijenih rezultata, pretpostavljeno je da razlike u koncentraciji slobodnih masnih kiselina i brzini preuzimanja glukoze iz krvi, koje su uočene nakon ishrane obogaćene različitim koncentracijama fruktoze vode poreklo od različitih molekularnih promena u visceralnom masnom tkivu životinja, a koje će biti predmet diskusije u daljem tekstu.

5.2 Metaboličke promene u visceralnom masnom tkivu pacova nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze

Glukokortikoidni hormoni imaju značajnu ulogu u održavanju energetske homeostaze, ali je njihova uloga u patogenezi metaboličkog sindroma još uvek nedovoljno razjašnjena. Razlog tome je njihova dvojak uloga u regulaciji lipidne homeostaze u masnom tkivu. Kao što je već rečeno, u zavisnosti od koncentracije i dužine izlaganja, glukokortikoidi mogu da utiču na mobilizaciju ili skladištenje masti putem stimulacije procesa lipolize ili lipogeneze u adipocitima (*Wang i saradnici, 2012a*). To su potvrdili rezultati *in vivo* i *in vitro* studija u kojima je pokazano da i kratkoročno povećanje koncentracije kortizola u fiziološkim uslovima utiče na metabolizam masnog tkiva. *In vitro* studije su pokazale da glukokortikoidi pretežno doprinose oslobađanju slobodnih masnih kiselina iz adipocita i da su efekti glukokortikoida na lipolizu veoma značajni u uslovima kada je nivo insulina nizak, kao što je to slučaj kod pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2 (*Johnston i saradnici, 1982; Schade i saradnici, 1978*). Slično *in vitro* eksperimentima, i rezultati studija u kojima su praćeni efekti kratkoročne *in vivo* infuzije glukokortikoidnih hormona pokazali su da tokom stanja akutne hiperkortizolemije dolazi do povećanja lipolize i oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva (*Campbell i saradnici, 2011; Samra i saradnici, 1998*). Ovi literaturni podaci su u saglasnosti sa našim rezultatima koji su pokazali da nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze dolazi do povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji (**Tabela 5**) i da je povećana mobilizacija lipida nastala kao posledica povećanja aktivnosti glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu mužjaka pacova (*Bursać i saradnici, 2013*).

U cilju boljeg razumevanja uloge glukokortikoida u razvoju i progresiji metaboličkog sindroma analiziran je prereceptorski metabolizam glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu. Povećanje koncentracije aktivnih formi glukokortikoida (kortizola kod ljudi, i kortikosterona kod pacova) predstavlja jednu od osnovnih karakteristika metaboličkog sindroma i nastaje kao rezultat povećane lokalne regeneracije glukokortikoida koju katalizuje enzim 11 β HSD1 (*London i Castonguay, 2009; Seckl i Walker, 2004*). Kao što je i očekivano, ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze stimulisala je regeneraciju glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu, rezultujući značajnim povećanjem koncentracije tkivnog kortikosterona (**Slika 23**). Lokalna regeneracija glukokortikoida je potvrđena i na nivou proteina 11 β HSD1 koji je bio značajno povećan kod životinja hranjenih rastvorom 10% fruktoze (**Slika 22**). Dobijeni rezultati su bili u skladu sa rezultatima drugih studija koji su, i na humanim i na životinjskim modelima, pokazali da fruktoza dovodi do povećanja aktivnosti enzima 11 β HSD1 u masnom tkivu (*London i saradnici, 2007; Morton i saradnici, 2004; Senesi i saradnici, 2010*). Naime, *London i saradnici* su zaključili da fruktoza specifično indukuje promene u ekspresiji 11 β HSD1 tokom 24 h i da je poremećaj u glukokortikoidnoj signalizaciji događaj koji prethodi fenotipskim promenama koje nastaju kao posledica ishrane bogate fruktozom (*London i Castonguay, 2011*). Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze je dovela i do značajnog povećanja proteinskog nivoa H6PDH (**Slika 22**), na osnovu čega smo zaključili da je povećanje koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu pacova rezultat povećane aktivnosti enzima 11 β HSD1 i H6PDH. U saglasnosti sa dobijenim rezultatima su i literaturni podaci koji ukazuju da se redukcioni potencijal enzima 11 β HSD1, a samim tim i sposobnost prevođenja glukokortikoida u aktivne forme, održava putem regeneracije kofaktora NADPH u endoplazmatičnom retikulumu koju katalizuje enzim H6PDH (*White i saradnici, 2007*). Važno je napomenuti da

produkt metabolizma fruktoze, fruktozo-6-fosfat može da uđe u endoplazmatski retikulum, gde se prevodi u glukozo-6-fosfat i služi kao supstrat za H6PDH (*Senesi i saradnici, 2010*). Na taj način, fruktoza održava redukcionu aktivnost enzima 11 β HSD1, stimuliše prereceptorsku regeneraciju glukokortikoidnih hormona i specifično povećava njihovu aktivnost unutar visceralnog masnog tkiva.

Pored izučavanja prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, signalni put glukokortikoidnih hormona analiziran je i na nivou aktivnosti GR-a. *Campbell i saradnici* su pokazali da je sposobnost glukokortikoida da stimulišu proces lipolize u *in vitro* uslovima zavisna od prisustva aktiviranog receptora (*Campbell i saradnici, 2009*). Rezultati naše studije su pokazali da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovodi do značajnog smanjenja proteinskog nivoa GR-a u citosolnoj frakciji visceralnog masnog tkiva i njegovog istovremenog povećanja u jedarnoj frakciji (**Slika 24**). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da povećan prereceptorski metabolizam glukokortikoida rezultuje aktivacijom GR-a i posledično vodi ka promenama u ekspresiji gena uključenih u metabolizam lipida koji su regulisani ovim transkripcionim regulatorom. Jedan od gena čija je transkripcija regulisana glukokortikoidima je gen koji kodira enzim PEPCCK (*Reshef i saradnici, 2003*). Nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze uočeno je smanjenje nivoa mRNA za PEPCCK (**Slika 25a**), što je bilo u skladu sa povećanjem koncentracije glukokortikoidnih hormona i pretpostavljenom aktivacijom GR-a u visceralnom masnom tkivu pacova. Naime, gen koji nosi informaciju za enzim PEPCCK je različito regulisan od strane GR-a u zavisnosti od tipa tkiva (*Nechushtan i saradnici, 1987*). U jetri, aktivirani GR stimuliše transkripciju ovog gena, dok je u masnom tkivu inhibira (*Olswang i saradnici, 2003*). S obzirom da je PEPCCK uključena u akumulaciju lipida unutar adipocita i inhibiciju oslobađanja slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju (*Bogacka i saradnici, 2004; Tordjman i saradnici,*

2003), zaključili smo da je smanjenje nivoa enzima PEPCCK jedan od mogućih mehanizama kojim aktivirani GR ograničava lipogenezu. Takvo zapažanje je bilo u skladu sa studijama *Campbell-a i saradnika* koji su pokazali da je povećana aktivnost glukokortikoida u masnom tkivu, posredovana promenama u aktivnosti enzima 11 β HSD1 i proteinskom nivou GR-a, dovela do stimulacije lipolize kod gojaznih pacova koji su bili podvrgnuti fizičkoj aktivnosti (*Campbell i saradnici, 2009*). Kao što je već naglašeno, analizom biohemijskih parametara je uočeno da nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze dolazi do značajnog povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. Imajući na umu činjenicu da je lipoliza poreklom iz visceralnog masnog tkiva glavni izvor slobodnih masnih kiselina, zaključili smo da aktivacija GR-a u odgovoru na ishranu obogaćenu 10% rastvorom fruktoze dovodi do pomeranje ravnoteže između lipolize i lipogeneze u smeru stimulacije lipolitičkih procesa.

Pored gena koji kodira PEPCCK, glukokortikoidi regulišu i transkripciju gena koji kodiraju glavne lipolitičke enzime u masnom tkivu. Jedan od njih je i gen za enzim HSL. Poznato je da se u promotorskom regionu gena koji kodira HSL nalazi sekvenca GRE i da su glukokortikoidni hormoni glavni aktivatori njegove ekspresije (*Campbell i saradnici, 2011; Yu i saradnici, 2010*). *Slavin i saradnici* su pokazali da deksametazon preko povećanja nivoa iRNK za HSL doprinosi razvoju insulinske rezistencije, hipertenzije i poremećaja u metabolizmu lipida (*Slavin i saradnici, 1994*). Iako je u visceralnom masnom tkivu životinja došlo do povećanja nivoa tkivnih glukokortikoida, rezultati naše studije su pokazali da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze nije dovela do promene na nivou iRNK za HSL (**Slika 25b**). Ipak, mora se uzeti u obzir i činjenica da nivo iRNK nije jedini činilac koji određuje aktivnost HSL, već da je ključni faktor njene aktivacije fosforilacija (*Anthonsen i saradnici, 1998; Watt i saradnici, 2006*). Pretpostavljena aktivacija lipolize potvrđena je i

histološkom analizom visceralnog masnog tkiva. Primenom histološke i morfometrijske analize (**Slika 28**) pokazano je da nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze ne dolazi do promena u prečniku i površini adipocita, kao ni do akumulacije lipida unutar adipocita. Dobijeni rezultati naveli su nas da zaključimo da je povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze posledica akutnog povećanja kortikosterona i aktivacije lipolitičkih signalnih puteva u visceralnom masnom tkivu (*Bursać i saradnici, 2013*).

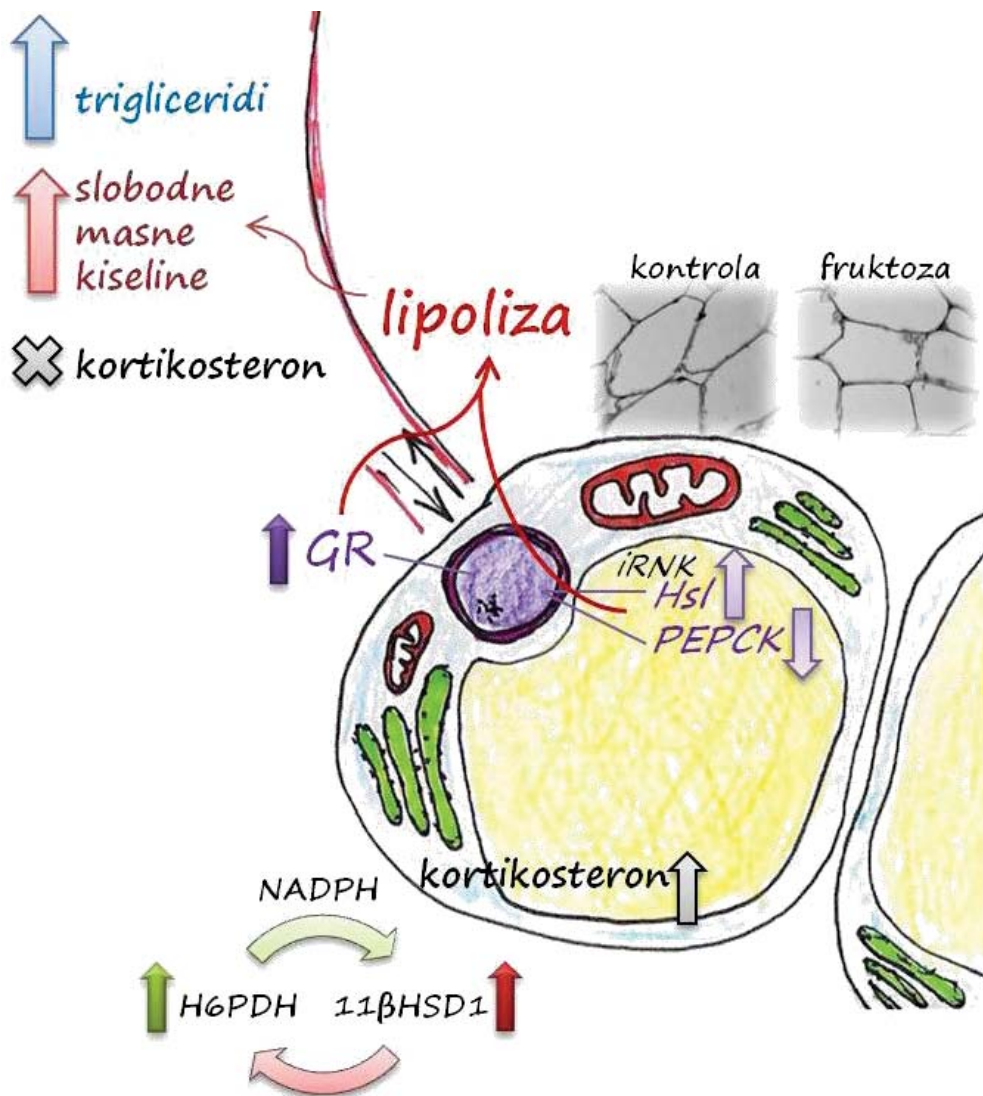
Studije na ljudima i životinjama su pokazale da ishrana bogata fruktozom ima značajnu ulogu i u razvoju tzv. hronične inflamacije niskog intenziteta ili metaboličke inflamacije, naročito u visceralnom masnom tkivu i jetri (*Dekker i saradnici, 2010; Rayssiguier i saradnici, 2006; Wada i saradnici, 2010*). Među brojnim citokinima, MIF se smatra jednim od glavnih markera metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu (*Kleemann i Bucala, 2010*). Tokom razvoja gojaznosti, MIF dovodi do infiltracije makrofaga u visceralno masno tkivo i učestvuje u razvoju inflamacije preko sinteze TNF- α , koji je poznati aktivator signalnog puta NF κ B (*Kleemann i Bucala, 2010*). Kako su makrofagi i T ćelije adipocita glavno mesto sinteze i sekrecije ovog adipokina tokom perioda uvećanja visceralnog masnog tkiva (*Lue i saradnici, 2002*), nepromenjen nivo iRNK za MIF u masnom tkivu pacova hranjenih 10% rastvorom fruktoze je bio očekivan s obzirom da ove životinje nisu bile gojazne (**Slika 27b** i **Tabela 4**). Odsustvo aktivacije inflamatornih procesa potvrđeno je i na nivou transkripcionog regulatora NF κ B. Iako je poznato da ishrana koja sadrži veliku količinu masti doprinosi povećanju aktivnosti NF κ B kod miševa i pacova (*Carlsen i saradnici, 2009; Chung i saradnici, 2012*), efekti ishrane bogate fruktozom su do sada uglavnom neispitani. Rezultati naših istraživanja su pokazali da ishrana 10% rastvorom fruktoze dovodi do smanjenja nivoa transkripciono aktivne subjediniice NF κ B-a u

citoplazmi (**Slika 26**). Nepromenjen nivo inhibitornog proteina I κ B u citoplazmi, kao i odsustvo prelaska NF κ B u jedra dodatno govori u prilog činjenici da signalni put NF κ B nije bio aktiviran nakon ishrane obogaćene 10% fruktozom (**Slika 26**). Ovo zapažanje je dalje potvrđeno i na nivou iRNK za proinflamatorne citokine, TNF- α i IL-6, čija je ekspresija pod kontrolom transkripcionog regulatora NF κ B (*Tang i saradnici, 2010*). Naime, nivo iRNK za TNF- α je ostao nepromenjeni nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze (**Slika 27a**), dok je iRNK za IL-6 bila nedetektibilna. Zaključili smo da aktivirani GR, kao poznati negativni regulator transkripcionog regulatora NF κ B (*De Bosscher i saradnici, 1997*), doprinosi supresiji metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze. Sa druge strane, povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina koja je nastala usled aktivacije lipolize u visceralnom masnom tkivu dodatno je doprinela razvoju metaboličke inflamacije u jetri (*Vasiljević i saradnici, 2013*) i imala je značajnu ulogu u razvoju periferne insulinske rezistencije (*Djordjevic i saradnici, 2013*).

S obzirom da je razumevanje etiologije gojaznosti u patofiziologiji metaboličkog sindroma od velikog značaja, može se zaključiti da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze ne uzrokuje sama po sebi razvoj gojaznosti ili povećanje visceralnog masnog tkiva, ali može doprineti narušavanju fiziološkog miljea organizma, i na taj način dovesti do razvoja metaboličkih poremećaja.

Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključili smo da dugoročna ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze dovodi do pojačanja prereceptorskog metabolizma glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu mužjaka pacova. Povećanje unutarćelijske koncentracije glukokortikoidnih hormona doprinosi aktivaciji GR-a i njegovom prelasku iz citoplazme u jedro gde vrši transkripcionu regulaciju gena uključenih u metabolizam lipida i imunski odgovor. Stanje pojačane aktivnosti glukokortikoida, povećanje koncentracije slobodnih masnih

kiselina i triglicerida u cirkulaciji i odsustvo povećanja mase visceralnog masnog tkiva ukazuje da je ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze uticala na balans između lipolize i lipogeneze u masnom tkivu, stimulišući procese lipolize (Slika 46).



Slika 46. Shematski prikaz metaboličkih promena u visceralnom masnom tkivu pacova nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze (autor ilustracije Ana Đorđević)

5.3 Metaboličke promene u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu pacova nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze

Kompleksna uloga glukokortikoidnih hormona u regulaciji energetske homeostaze potvrđena je i u eksperimentima u kojima je ishrana životinja bila obogaćena rastvorom fruktoze visoke koncentracije. Rezultati studije su pokazali da dugoročna ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do razvoja visceralne adipoznosti kod mužjaka pacova, što je praćeno povećanjem koncentracije triglicerida u cirkulaciji, dok je insulinska osetljivost ostala nepromenjena. Uočeni efekti bili su različiti od onih koji su detektovani nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, ukazujući da je količina fruktoze koja je prisutna u ishrani važan činiac u patogenezi metaboličkog sindroma.

Pored razlika u fiziološkim i biohemijskim parametrima koje su se javile u odgovoru na ishranu obogaćenu različitim koncentracijama fruktoze (**Tabela 4** i **Tabela 5**), uočena je i značajna razlika u signalnom putu glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu. Za razliku od pojačane tkivne regeneracije aktivnih formi glukokortikoidnih hormona nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, ishrana životinja 60% rastvorom fruktoze je dovela do značajnog smanjenja unutarćelijske koncentracije kortikosterona (**Slika 30**). Analizom prereceptorskog metabolizma glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu pokazano je značajno povećanje nivoa 11β HSD1, dok je nivo enzima H6PDH ostao nepromenjen (**Slika 29**). Smanjenje tkivne regeneracije aktivnih formi glukokortikoida može biti posledica nepromenjenog proteinskog nivoa H6PDH, čija aktivnost je neophodna za održavanje redukcionog potencijala enzima 11β HSD1. Takođe, moguće je da dolazi i do povećanja klirensa aktivnih formi glukokortikoida, imajući na umu činjenicu da kod gojaznih osoba dolazi

do povećanja nivoa enzima 5 α -reduktaze (Tomlinson i saradnici, 2008) i povećanja aktivnosti enzima 11 β HSD2 (Milagro i saradnici, 2007; Mussig i saradnici, 2008). Kao što je očekivano, usled smanjene koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu nije došlo ni do aktivacije GR-a. Naime, nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze došlo je do smanjenja proteinskog nivoa GR-a i u citosolnoj i u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (**Slika 31**), ukazujući na potpuno utišavanje signalnog puta GR-a. Takođe, potvrđena je i hipoteza o dvojakom delovanju glukokortikoidnih hormona, koji u zavisnosti od količine i energetskeg statusa u ćeliji mogu da aktiviraju različite procese u metabolizmu lipida (Campbell i saradnici, 2011; Samra i saradnici, 1998). Za razliku od aktivacije GR-a nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, povećanje mase visceralnog masnog tkiva nakon ishrane životinja 60% rastvorom fruktoze je bilo praćeno odsustvom aktivacije signalnih puteva glukokortikoidnih hormona. To je potvrđeno i na nivou ekspresije gena za HSL, koja je bila nepromenjena nakon ishrane životinja 60% fruktozom (**Slika 32b**). U skladu sa izostankom lipolitičke aktivnosti zabeležena je i nepromenjena koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi ovih životinja (**Tabela 5**). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je nepromenjen nivo iRNK za enzim HSL, i posledično nepromenjena koncentracija slobodnih masnih kiselina, rezultat smanjene transkripcione aktivnosti GR-a u visceralnom masnom tkivu nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze.

Regulacija metabolizma lipida je kompleksan proces u kome učestvuje veliki broj enzima i transkripcionih regulatora. Među njima značajno mesto zauzima PPAR γ koji funkcioniše kao glavni transkripcioni regulator diferencijacije adipocita i metabolizma lipida, naročito u odgovoru na nutritivni status u ćeliji (Semple i saradnici, 2006). Hipoteza o ulozi PPAR γ u procesima adipogeneze je dodatno podržana istraživanjima u kojima je pokazano da je njegova ekspresija

značajno povećana u visceralnom masnom tkivu gojaznih osoba (Auwex, 1999). Imajući na umu činjenicu da ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze ne dovodi do stimulacije signalnih puteva glukokortikoidnih hormona, moglo se pretpostaviti da je povećanje visceralne adipoznosti posledica aktivnosti drugih transkripcionih regulatora, pre svega PPAR γ . Ova pretpostavka se zasniva na činjenici da enzim proteinska fosfataza 5 ima značajnu ulogu u modulaciji aktivnosti transkripcionih regulatora GR-a i PPAR γ . Naime, proteinska fosfataza 5 funkcioniše kao recipročni modulator ova dva transkripciona regulatora, antagonizujući lipolitičku aktivnost GR-a uz simultano promovisanje aktivnosti PPAR γ u adipogenezi (Hinds i saradnici, 2011). Rezultati iz ove doktorske disertacije su pokazali da ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do značajnog povećanja nivoa PPAR γ u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (**Slika 33**), ukazujući na njegovu stimulaciju. Uloga PPAR γ u razvoju visceralne adipoznosti je potvrđena i analizom ekspresije njegovih ciljnih gena koji imaju značajnu ulogu u lipogenezi i diferencijaciji. Suprotno od rezultata studija koje su pokazale da PPAR γ učestvuje u procesima adipogeneze putem stimulacije transkripcije gena za PEPCK (Huang i saradnici, 2012; Savage, 2005), rezultati naših istraživanja su pokazali da je uloga PPAR γ u adipogenezi verovatno posredovana nekim drugim mehanizmom. Naime, ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze je uzrokovala smanjenje nivoa iRNK za PEPCK (**Slika 32a**), što je naše istraživanje usmerilo na analizu drugih potencijalnih medijatora adipogeneze. Jedan od njih je i SREBP-1 koji učestvuje u transkripcionoj regulaciji gena koji kodira PPAR γ (Fajas i saradnici, 1999). Kao što je bilo i očekivano, povećanje nivoa PPAR γ u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze je bilo praćeno i povećanjem nivoa transkripcionog regulatora SREBP-1 (**Slika 34**). SREBP-1 ostvaruje značajnu ulogu i tokom sinteze lipida u adipocitima putem stimulacije transkripcije gena za FAS, glavni enzim *de novo* sinteze masnih kiselina (Kim i Spiegelman,

1996; Takahashi i saradnici, 2013). Ovaj način ishrane je doveo i do povećanja nivoa iRNK za FAS (**Slika 36**), ukazujući na ubrzanje *de novo* lipogeneze u visceralnom masnom tkivu pacova. Efekti ishrane obogaćene fruktozom na lipogenezu potvrđeni su i nakon analize unutarćelijske distribucije enzima lipina-1. Nivo lipina-1 je bio značajno povećan u mikrozomalnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (**Slika 35**) koja predstavlja glavno mesto njegove enzimske aktivnosti tokom procesa lipogeneze (Harris i Finck, 2011). Pored toga, lipin-1 učestvuje i u stimulaciji aktivnosti transkripcionog regulatora PPAR γ , i na taj način promoviše adipogenezu i razvoj zrelih adipocita (Koh i saradnici, 2008). Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su stimulacija adipogeneze i povećana sinteza triglicerida, kao rezultat delovanja transkripcionih regulatora PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1, glavni molekularni događaji koji doprinose razvoju visceralne adipoznosti nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze.

Molekularne promene uočene u visceralnom masnom tkivu životinja hranjenih 60% fruktozom potvrđene su i na ćelijskom nivou. Povećanje mase visceralnog masnog tkiva nastalo usled skladištenja energetskog viška nakon ishrane obogaćene rastvorom fruktoze visoke koncentracije je bilo praćeno hipertrofijom i hiperplazijom adipocita. Kako je masa masnog tkiva kod odraslih osoba u korelaciji sa brojem adipocita, za očekivati je da svako povećanje njegove mase bude praćeno i proliferacijom adipocita (Smith i saradnici, 2006), što je u našim istraživanjima i potvrđeno. Naime, kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze uočene su dve jasno izdvojene populacije adipocita (**Slika 39**). Populaciju velikih adipocita (**Slika 39e**) su činile ćelije koje su morfološki bile slične adipocitima kontrolnih životinja (**Slika 39c**). Međutim, morfometrijskom analizom je pokazano da su i dijametar i površina (**Slika 39f i g**) velikih adipocita značajno veći u poređenju sa adipocitima kontrolnih životinja, ukazujući na njihovu hiperplaziju. Analiza populacije malih ćelija (**Slika 39d**) je pokazala da su i dijametar

i površina ovih ćelija bili značajno manji u odnosu na adipocite kontrolnih životinja, kao i u odnosu na velike adipocite životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Slika 39f i g**). Na osnovu dobijenih rezultata zaključili smo da je prisustvo jasno odvojene populacije malih adipocita u visceralnom masnom tkivu životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze rezultat hiperplazije adipocita i stimulacije adipogeneze od strane dva glavna transkripciona regulatora uključena u proliferaciju i sazrevanje adipocita, PPAR γ i SREBP-1.

Prisustvo velikog broja malih adipocita je povezano i sa povećanom insulinskom osetljivošću (*Faraj i saradnici, 2004*), što je bilo u skladu sa našim zapažanjima o nenarušenoj toleranciji na glukozu kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Tabela 6**). S obzirom da je insulinska rezistencija najčešće rezultat povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina poreklom iz masnog tkiva i jetre (*Tomlinson i saradnici, 2008*), odsustvo indikatora insulinske rezistencije nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze može biti i posledica nepromenjene koncentracije slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji ovih životinja (**Tabela 5**). S druge strane, aktivacija transkripcionog regulatora PPAR γ i stimulacija diferencijacije adipocita dovodi do usmeravanja akumulacije masnih depoa u okviru masnog tkiva i na taj način štiti druge organe od formiranja ektopične masti i razvoja insulinske rezistencije. Poznato je da agonisti PPAR γ služe kao veoma moćni lekovi za povećanje insulinske osetljivosti (eng. *insulin-sensitizers*) (*Bhatia i Viswanathan, 2006*). Veliki broj podataka ukazuje da se njihova aktivnost ostvaruje putem inhibicije proinflamatornog citokina TNF- α (*Miles i saradnici, 1997*; *Peraldi i saradnici, 1997*). TNF- α ima važnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije (*Hotamisligil i saradnici, 1993*), naročito u uslovima kada je ona posledica gojaznosti izazvane ishranom (*Uysal i saradnici, 1997*). Normalna insulinska osetljivost nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze je bila u saglasnosti sa nepromenjenom ekspresijom

inflamatornih medijatora i povećanom aktivnošću transkripcionog regulatora PPAR γ . Naime, ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze nije uticala na razvoj metaboličke inflamacije u visceralnom masnom tkivu pacova. Markeri metaboličke inflamacije, transkripcioni regulator NF κ B (**Slika 37**), kao i proinflamatorni citokin TNF- α (**Slika 38**) su bili nepromenjeni u odgovoru na ishranu obogaćenu fruktozom. Dobijeni rezultati ukazuju da aktivacija PPAR γ putem inhibicije aktivnosti TNF- α doprinosi smanjenju inflamacije i povećanju insulinske osetljivosti u visceralnom masnom tkivu (*Murase i saradnici, 1998; Solomon i saradnici, 1997; Szalkowski i saradnici, 1995*). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da normalna insulinska osetljivost i odsustvo metaboličke inflamacije uz povećanje mase visceralnog masnog tkiva predstavlja jedan od mehanizama adaptivnog odgovora organizma na uslove narušene energetske homeostaze i stanje pozitivnog energetskog bilansa nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze.

S obzirom da kod životinja hranjenih 10% rastvorom fruktoze nije došlo do povećanja mase visceralnog masnog tkiva, prepostavili smo da se u osnovi razvoja visceralne adipoznosti kod životinja hranjenih rastvorom fruktoze veće koncentracije nalaze poremećaji na nivou regulacije energetske homeostaze. Veliki broj podataka ukazuje da poremećaji centralne regulacije energetske homeostaze doprinose razvoju gojaznosti i imaju značajnu ulogu tokom patogeneze metaboličkog sindroma (*Morrison, 2009; Morton i saradnici, 2006*). Leptinska rezistencija predstavlja moguću vezu između ishrane koja sadrži visoki procenat fruktoze i razvoja visceralne gojaznosti (*Lee i saradnici, 2006; Scarpace i Zhang, 2009*). Naime, pokazano je da ishrana obogaćena fruktozom kod životinja dovodi do povećanja koncentracije triglicerida i leptina u cirkulaciji (*Huang i saradnici, 2006*). Slično rezultatima drugih autora (*Shapiro i saradnici, 2011a; Shapiro i saradnici, 2008; Shapiro i saradnici, 2011b*), i rezultati naše

studije su pokazali da dugoročan neograničen pristup 60% rastvoru fruktoze uzrokuje povećanje koncentracije triglicerida (**Tabla 5**) i leptina (**Slika 43**) u cirkulaciji. Činjenica da je ukupan unos kalorija bio veći nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze (**Tabla 4**), uprkos povećanoj koncentraciji leptina u cirkulaciji, ukazao je na moguće prisustvo leptinske rezistencije. Postoji nekoliko predloženih mehanizama koji se nalaze u osnovi razvoja leptinske rezistencije (*Schwartz i saradnici, 2000*) i u ovoj studiji su svi potvrđeni. Jedan od mehanizama predlaže da se leptinska rezistencija javlja zbog poremećenog transporta leptina kroz krvno-moždanu barijeru (*Banks i saradnici, 2004; Van Heek i saradnici, 1997*) koji može biti posledica povećanog nivoa triglicerida (*Banks i saradnici, 2004*). Uzimajući u obzir da je u okviru naše studije zabeležen povišen nivo triglicerida kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze može se pretpostaviti da se na ovaj način, barem delimično, onemogućuje transport leptina u hipotalamus i na taj način smanjuje fiziološki odgovor na leptin. Smanjen nivo proteina Ob-Rb kod životinja hranjenih 60% rastvorom fruktoze (**Slika 44**) takođe doprinosi razvoju leptinske rezistencije, s obzirom da je poznato da ona može da nastane i usled smanjene ekspresije gena koji kodira leptinski receptor (*Friedman, 2002; Levin i Dunn-Meynell, 2002*). Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti i sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da je nedostatak funkcionalnog Ob-Rb-a odgovoran za razvoj gojaznosti i metaboličkog sindroma u *db/db* mišijem modelu (*White i Tartaglia, 1996*). Pored toga, SOCS3 ima važnu ulogu u razvoju leptinske rezistencije, posebno kod gojaznosti koja je izazvana ishranom (*Munzberg i saradnici, 2004*). U saglasnosti sa rezultatima drugih studija (*Mori i saradnici, 2004; Vila i saradnici, 2008*), ishrana obogaćena fruktozom dovela je do povećanja nivoa iRNK za SOCS3 (**Slika 45**), ukazujući da je negativna regulacija signalnog puta leptina jedan od mehanizama kojim fruktoza doprinosi razvoju leptinske rezistencije.

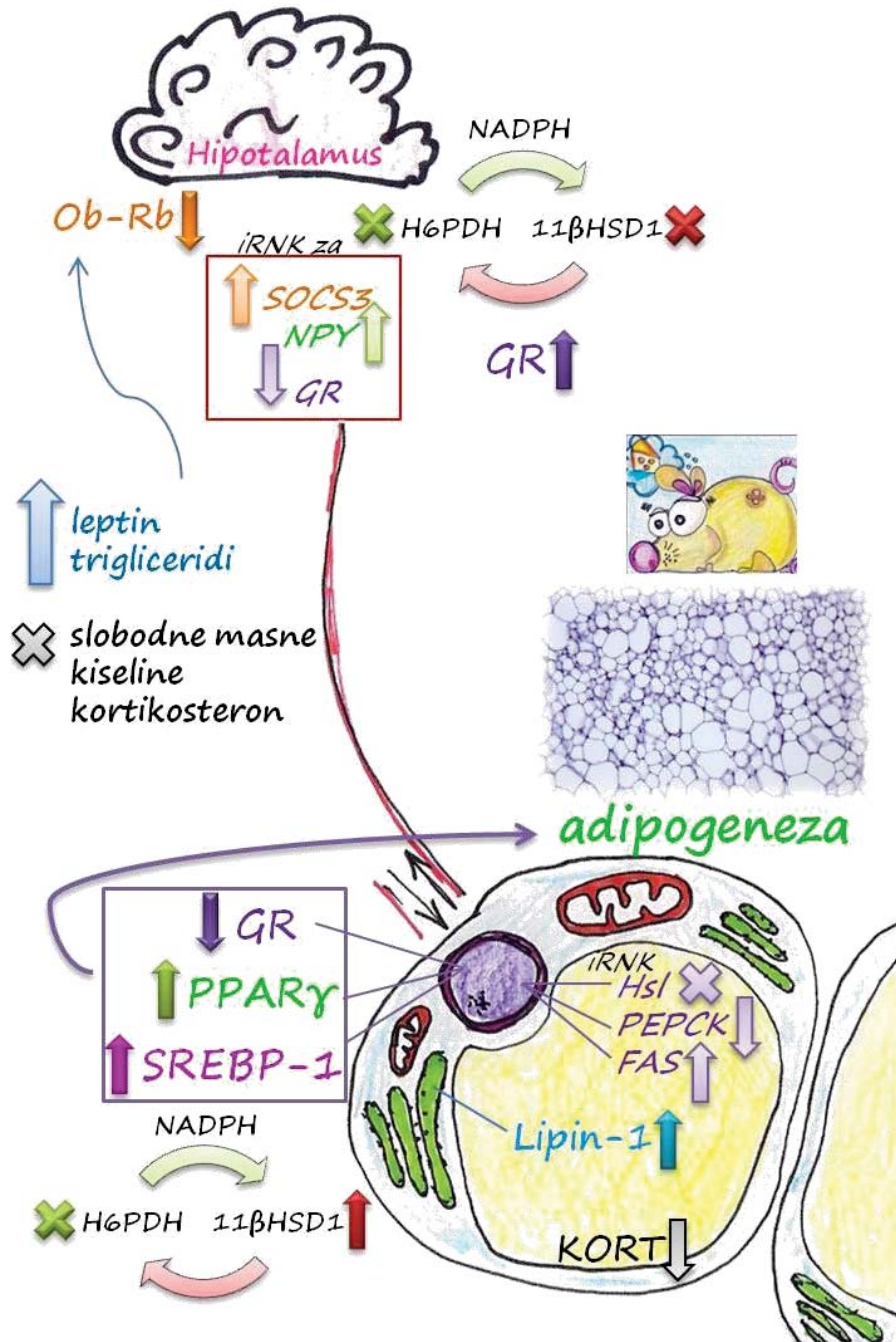
Uočeno stanje leptinske rezistencije je bilo povezano i sa promenjenom ekspresijom gena za glavni oreksigeni neuropeptid u hipotalamusu. Naime, nivo iRNK za NPY je bio značajno povećan kod životinja koje su bile na režimu ishrane obogaćenom fruktozom (**Slika 42**). Dobijeni rezultati ukazuju da se efekti 60% fruktoze na razvoj visceralne adipoznosti najverovatnije ostvaruju putem narušene leptinske signalizacije i povećane aktivnosti oreksigenog peptida NPY. Ovi rezultati su u saglasnosti i sa studijama drugih autora koji su pokazali da se oreksigeni efekti fruktoze u mozgu pacova ostvaruju putem aktivacije NPY sistema i to posebno putem povećanja iRNK za NPY u hipotalamusu (*Beck, 2006*). Takođe, istraživanja na pacovima su pokazala da injeciranje NPY u lateralni region hipotalamusa dovodi do povećanja želje za unosom ugljenih hidrata, naročito rastvora saharoze (*Stanley i saradnici, 1985; Stanley i Leibowitz, 1985*). Mi smo pretpostavili da je smanjen unos hrane, uočen kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze, kompenzovan upravo povećanim unosom fruktoze koji je podstaknut od strane oreksigenog peptida NPY.

Veliki broj podataka ukazuje da pored leptina, i glukokortikoidni hormoni imaju značajnu ulogu u održavanju energetske homeostaze (*Freedman i saradnici, 1985; Uchoa i saradnici, 2009*). Najverovatnije mesto aktivnosti glukokortikoidnih hormona u centralnoj regulaciji unosa hrane jesu NPY pozitivni neuroni u hipotalamusu (*Peckett i saradnici, 2011; Shimizu i saradnici, 2008; Zakrzewska i saradnici, 1999*). Poznato je da insulin inhibira, dok kortikosteroidi stimulišu ekspresiju gena za NPY u arkuatnom jedru hipotalamusa (*Dallman i saradnici, 2006*). Takođe, *Jeanrenaud i saradnici* su pokazali da je aktivnost glukokortikoidnih hormona u okviru CNS-a neophodna za realizaciju oreksigenih efekata NPY (*Jeanrenaud i Rohner-Jeanrenaud, 2000*). Iako postoje studije koje ukazuju da se hiperfagija, koja nastaje kao posledica leptinske rezistencije, smanjuje nakon adrenaletomije (*York, 1996*), do sada je samo nekoliko studija ukazalo na funkcionalnu

vezu između leptinske rezistencije i aktivnosti glukokortikoidnih hormona (Havel, 2001). Kako bismo ispitali da li je ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze povezana sa promenama u nivou i aktivnosti glukokortikoida u hipotalamusu, analiziran je prereceptorski metabolizam glukokortikoida, kao i ekspresija gena za GR. Interesantno, ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze nije dovela do promene u nivou 11β HSD1 i H6PDH (**Slika 40**). Iako ovakav tip ishrane nije uticao na regeneraciju aktivnih formi glukokortikoida putem prereceptorskog metabolizma, uočeno je statistički značajno povećanje proteinskog nivoa GR-a (**Slika 41**). Povećanje nivoa GR-a, zajedno sa povećanjem nivoa iRNK za NPY podržava pretpostavljenu ulogu glukokortikoidnih hormona kao pozitivnih regulatora ovog oreksigenog peptida (Peckett i saradnici, 2011). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da glukokortikoidi ostvaruju važnu ulogu u održavanju, kako centralne, tako i ukupne energetske homeostaze. Povećanjem ekspresije gena za NPY u hipotalamusu, glukokortikoidi doprinose razvoju visceralne adipoznosti u odgovoru na ishranu obogaćenu 60% rastvorom fruktoze.

Ukratko, dugoročna ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze je dovela do razvoja visceralne adipoznosti koja je bila praćena dislipidemijom i razvojem leptinske rezistencije u hipotalamusu. Ukrštanje signalnih puteva leptina i glukokortikoida u hipotalamusu predstavlja moguću vezu između prekomernog unosa fruktoze i razvoja adipoznosti. Rezultati molekularnih analiza visceralnog masnog tkiva su pokazali da je balans između GR-a i transkripcionih regulatora adipogeneze, PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1 pomeren u pravcu adipogeneze, s obzirom da je kod životinja nakon ishrane obogaćene rastvorom fruktoze visoke koncentracije uočeno prisustvo populacije malih adipocita sposobnih za skladištenje lipida. Pretpostavljeni mehanizam čuvanja masnih depoa unutar visceralnog masnog tkiva u odgovoru na energetske višak predstavlja adaptivni odgovor koji doprinosi smanjenju

oslobađanja masnih kiselina iz masnog tkiva u cirkulaciju i druga tkiva, što predstavlja ključni događaj u razvoju insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 (Slika 47).



Slika 47. Shematski prikaz metaboličkih promena u visceralnom masnom tkivu pacova nakon ishrane obogaćene 60% rastvorom fruktoze (autor ilustracije Ana Đorđević)

"Neka tvoja hrana bude tvoj lek, a tvoj lek neka bude tvoja hrana"

Hipokrat

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu analize rezultata dobijenih u okviru ove studije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ⊗ Količina fruktoze koja je prisutna u ishrani je važan činilac patogeneze metaboličkog sindroma
- ⊗ Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze ne uzrokuje, sama po sebi, razvoj gojaznosti ili povećanje visceralnog masnog tkiva, ali doprinosi narušavanju fiziološkog miljea organizma i može dovesti do razvoja metaboličkih poremećaja putem:
 - ✓ pojačanja glukokortikoidne signalizacije i pomeranja ravnoteže u metabolizmu lipida u smeru lipolize
 - ✓ povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina i triglicerida u cirkulaciji i narušavanja insulinske osetljivosti
- ⊗ Dugoročna ishrana obogaćena 60% rastvorom fruktoze dovodi do razvoja visceralne adipoznosti i leptinske rezistencije u hipotalamusu
- ⊗ Pretpostavljeni mehanizam čuvanja masnih depoa unutar visceralnog masnog tkiva predstavlja adaptivni odgovor na energetski višak u odgovoru na ishranu obogaćenu 60% rastvorom fruktoze putem:
 - ✓ smanjenja oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u cirkulaciju
 - ✓ pomeranja ravnoteže između GR-a i transkripcionih regulatora adipogeneze (PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1) u pravcu adipogeneze
 - ✓ hipertrofije i hiperplazije adipocita

7. LITERATURA

- Ahren B, Filipsson K, 2000. The effects of PACAP on insulin secretion and glucose disposal are altered by adrenalectomy in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 251-258.
- Ailhaud G, Amri E, Bardon S, Barcellini-Couget S, Bertrand B, Catalioto RM, et al., 1991. Growth and differentiation of regional adipose tissue: molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obes* 15 Suppl 2, 87-90.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, 2005. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366, 1059-1062.
- Alberti KG, Zimmet PZ, 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15, 539-553.
- Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA, 2011. Starches, sugars and obesity. *Nutrients* 3, 341-369.
- Almawi WY, Melemedjian OK, 2002. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28, 69-78.
- Ammar AA, Sederholm F, Saito TR, Scheurink AJ, Johnson AE, Sodersten P, 2000. NPY-leptin: opposing effects on appetitive and consummatory ingestive behavior and sexual behavior. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R1627-1633.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C, 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to

- isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* 273, 215-221.
- Atanasov AG, Nashev LG, Gelman L, Legeza B, Sack R, Portmann R, et al., 2008. Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1536-1543.
- Auwerx J, 1999. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42, 1033-1049.
- Axelsen LN, Lademann JB, Petersen JS, Holstein-Rathlou NH, Ploug T, Prats C, et al., 2010. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R1560-1570.
- Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Foufelle F, 2000. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 350 Pt 2, 389-393.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S, 2011. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13, 11-22.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews* 17, 245-261.
- Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S, 2004. Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 27017-27021.
- Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, et al., 2004. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53, 1253-1260.
- Basciano H, Federico L, Adeli K, 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2, 5.

- Beck B, 2006. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1159-1185.
- Benoit SC, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ, 2005. The role of previous exposure in the appetitive and consummatory effects of orexigenic neuropeptides. *Peptides* 26, 751-757.
- Bhatia V, Viswanathan P, 2006. Insulin resistance and PPAR insulin sensitizers. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 891-897.
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS, 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Bjorntorp P, 1992. Regional fat distribution--implications for type II diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16 Suppl 4, S19-27.
- Bjorntorp P, 1996. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 291-302.
- Boden G, 1998. Free fatty acids (FFA), a link between obesity and insulin resistance. *Front Biosci* 3, d169-175.
- Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR, 2004. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care* 27, 1660-1667.
- Botezelli JD, Dalia RA, Reis IM, Barbieri RA, Rezende TM, Pelarigo JG, et al., 2010. Chronic consumption of fructose rich soft drinks alters tissue lipids of rats. *Diabetol Metab Syndr* 2, 43.
- Bray GA, 2013. Potential health risks from beverages containing fructose found in sugar or high-fructose corn syrup. *Diabetes Care* 36, 11-12.
- Bray GA, Champagne CM, 2004. Obesity and the Metabolic Syndrome: implications for dietetics practitioners. *J Am Diet Assoc* 104, 86-89.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM, 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79, 537-543.

- Breton C, 2013. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol* 216, R19-31.
- Brown RW, Chapman KE, Murad P, Edwards CR, Seckl JR, 1996. Purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 from human placenta utilizing a novel affinity labelling technique. *Biochem J* 313 (Pt 3), 997-1005.
- Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiook S, Spiegelman BM, 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol* 8, 826-832.
- Brun RP, Spiegelman BM, 1997. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J Endocrinol* 155, 217-218.
- Buckingham JC, 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S258-268.
- Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, et al., 2005. Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol* 34, 675-684.
- Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM, 1999. Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140, 3188-3196.
- Bursać BN, Djordjevic AD, Vasiljevic AD, Milutinovic DD, Velickovic NA, Nestorovic NM, et al., 2013. Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem* 24, 1166-1172.
- Calogero AE, Gallucci WT, Gold PW, Chrousos GP, 1988. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. *J Clin Invest* 82, 767-774.
- Campbell JE, Fediuc S, Hawke TJ, Riddell MC, 2009. Endurance exercise training increases adipose tissue glucocorticoid

- exposure: adaptations that facilitate lipolysis. *Metabolism* 58, 651-660.
- Campbell JE, Peckett AJ, D'Souza A M, Hawke TJ, Riddell MC, 2011. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C198-209.
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL, 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-1552.
- Carlsen H, Haugen F, Zadelaar S, Kleemann R, Kooistra T, Drevon CA, et al., 2009. Diet-induced obesity increases NF-kappaB signaling in reporter mice. *Genes Nutr* 4, 215-222.
- Carmen GY, Victor SM, 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18, 401-408.
- Carter S, Caron A, Richard D, Picard F, 2013. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging* 8, 829-844.
- Chrousos GP, Kino T, 2007. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress* 10, 213-219.
- Chung MY, Park HJ, Manautou JE, Koo SI, Bruno RS, 2012. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice by decreasing oxidative and nitrative stress responses induced by proinflammatory enzymes. *J Nutr Biochem* 23, 361-367.
- Cinti S, 2000. Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord* 5, 132-142.
- Cinti S, 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al., 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401.

- Cohen SL, Halaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, et al., 1996. Human leptin characterization. *Nature* 382, 589.
- Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al., 2005. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 1, 63-72.
- Corpe CP, Burant CF, Hoekstra JH, 1999. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 364-374.
- Curry DL, 1989. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas* 4, 2-9.
- Dallman MF, Akana SF, Pecoraro NC, Warne JP, la Fleur SE, Foster MT, 2007. Glucocorticoids, the etiology of obesity and the metabolic syndrome. *Curr Alzheimer Res* 4, 199-204.
- Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF, 2004. Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology* 145, 2633-2638.
- Dallman MF, Pecoraro NC, La Fleur SE, Warne JP, Ginsberg AB, Akana SF, et al., 2006. Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res* 153, 75-105.
- Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS, 2010. Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol* 31, 377-393.
- Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E, 2001. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur J Neurosci* 14, 675-689.
- De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G, 1997. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct

- interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13504-13509.
- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K, 2010. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E685-694.
- Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling ZC, Andersson A, et al., 1997. Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest* 100, 2094-2098.
- Diaz R, Brown RW, Seckl JR, 1998. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* 18, 2570-2580.
- Dietrich MO, Horvath TL, 2013. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 36, 65-73.
- Dills WL, Jr., 1993. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am J Clin Nutr* 58, 779S-787S.
- Djordjevic A, Bursac B, Velickovic N, Vasiljevic A, Matic G, 2013. The impact of different fructose loads on insulin sensitivity, inflammation, and PSA-NCAM-mediated plasticity in the hippocampus of fructose-fed male rats. *Nutr Neurosci*.
- Douard V, Ferraris RP, 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E227-237.
- Drake AJ, Livingstone DE, Andrew R, Seckl JR, Morton NM, Walker BR, 2005. Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology* 146, 913-919.

- Draper N, Stewart PM, 2005. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* 186, 251-271.
- Dube N, Tremblay ML, 2005. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1754, 108-117.
- Duncombe W, 1964. The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta* 9, 122-125.
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D, 1981. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53, 58-68.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415-1428.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ, 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76, 911-922.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT, 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25, 132-149.
- Erlanson-Albertsson C, 2005. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97, 61-73.
- Evans RM, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). 2001. *JAMA* 285, 2486-2497.
- Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al., 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is

- linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15430-15435.
- Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, et al., 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 5495-5503.
- Fan JG, Peng YD, 2007. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6, 572-578.
- Faraj M, Lu HL, Cianflone K, 2004. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol* 82, 170-190.
- Ferder L, Ferder MD, Inserra F, 2010. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 12, 105-112.
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S, 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010-1013.
- Fortino MA, Lombardo YB, Chicco A, 2007. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition* 23, 489-497.
- Franchimont D, Kino T, Galon J, Meduri GU, Chrousos G, 2002. Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art. NIH clinical staff conference. *Neuroimmunomodulation* 10, 247-260.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al., 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.

- Freedland ES, 2004. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)* 1, 12.
- Freedman MR, Castonguay TW, Stern JS, 1985. Effect of adrenalectomy and corticosterone replacement on meal patterns of Zucker rats. *Am J Physiol* 249, R584-594.
- Friedman JM, 2000. Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 632-634.
- Friedman JM, 2002. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60, S1-14; discussion S68-84, 85-17.
- Friedman TC, Mastorakos G, Newman TD, Mullen NM, Horton EG, Costello R, et al., 1996. Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM. *Endocr J* 43, 645-655.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, 2001. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell Signal* 13, 827-833.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR, 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.
- Gathercole LL, Stewart PM, 2010. Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1-7.
- Gordon S, Martinez FO, 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS, 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809.
- Gregor MF, Hotamisligil GS, 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29, 415-445.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al., 1999. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270-1274.

- Grundy SM, Adams-Huet B, Vega GL, 2008. Variable contributions of fat content and distribution to metabolic syndrome risk factors. *Metab Syndr Relat Disord* 6, 281-288.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al., 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112, 2735-2752.
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL, 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29, 2959-2971.
- Hallfrisch J, Blakely SR, al. e, 1982. Long-term effects of moderate fructose feeding on lipogenic parameters in Wistar rats. *Nutr Rep Int* 25, 675-685.
- Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E, 2006. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2, 367-373.
- Hanson RW, Reshef L, 2003. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85, 1199-1205.
- Hardinge MG, Swarner JB, Crooks H, 1965. Carbohydrates in Foods. *J Am Diet Assoc* 46, 197-204.
- Harris TE, Finck BN, 2011. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 22, 226-233.
- Haslam DW, James WP, 2005. Obesity. *Lancet* 366, 1197-1209.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ, 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2, 239-254.
- Havel PJ, 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 963-977.

- Havel PJ, 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 63, 133-157.
- Henry RR, Crapo PA, Thorburn AW, 1991. Current issues in fructose metabolism. *Annu Rev Nutr* 11, 21-39.
- Hinds TD, Jr., Stechschulte LA, Cash HA, Whisler D, Banerjee A, Yong W, et al., 2011. Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma). *J Biol Chem* 286, 42911-42922.
- Hirsch J, 1976. Editorial: The adipose-cell hypothesis. *N Engl J Med* 295, 389-390.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM, 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Huang DY, Boini KM, Friedrich B, Metzger M, Just L, Osswald H, et al., 2006. Blunted hypertensive effect of combined fructose and high-salt diet in gene-targeted mice lacking functional serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R935-944.
- Huang JV, Greyson CR, Schwartz GG, 2012. PPAR-gamma as a therapeutic target in cardiovascular disease: evidence and uncertainty. *J Lipid Res* 53, 1738-1754.
- Hutchison KA, Scherrer LC, Czar MJ, Stancato LF, Chow YH, Jove R, et al., 1993. Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. *Ann N Y Acad Sci* 684, 35-48.
- Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM, 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10, 512-516.
- Ierardi E, Margiotta M, Giorgio F, Rosania R, Zotti M, Prencipe S, et al., 2010. Tumor necrosis alpha serum levels parallels isolated

- hypertransaminasemia in the third trimester of pregnancy. *Ann Hepatol* 9, 211-212.
- Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F, 2000. CNS-periphery relationships and body weight homeostasis: influence of the glucocorticoid status. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2, S74-76.
- Joels M, de Kloet ER, 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43, 1-36.
- Johnston DG, Gill A, Orskov H, Batstone GF, Alberti KG, 1982. Metabolic effects of cortisol in man--studies with somatostatin. *Metabolism* 31, 312-317.
- Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, Dombrowski F, et al., 2005. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res* 13, 1146-1156.
- Kalra SP, 2008. Disruption in the leptin-NPY link underlies the pandemic of diabetes and metabolic syndrome: new therapeutic approaches. *Nutrition* 24, 820-826.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS, 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 20, 68-100.
- Kanarek RB, Orthen-Gambill N, 1982. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr* 112, 1546-1554.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM, 2004. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3, 17-26.
- Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G, 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* 9, 48.
- Keller-Wood ME, Dallman MF, 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.

- Kelley GL, Allan G, Azhar S, 2004. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology* 145, 548-555.
- Kelliny C, William J, Riesen W, Paccaud F, Bovet P, 2008. Metabolic syndrome according to different definitions in a rapidly developing country of the African region. *Cardiovasc Diabetol* 7, 27.
- Kershaw EE, Flier JS, 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.
- Kersten S, 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2, 282-286.
- Khitan Z, Kim DH, 2013. Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab* 2013, 682673.
- Kim JB, Spiegelman BM, 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10, 1096-1107.
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM, 1998. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4333-4337.
- Kleemann R, Bucala R, 2010. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators Inflamm* 2010, 610479.
- Ko GT, 2006. Metabolic syndrome or "central obesity syndrome"? *Diabetes Care* 29, 752.
- Koh YK, Lee MY, Kim JW, Kim M, Moon JS, Lee YJ, et al., 2008. Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem* 283, 34896-34906.
- Korićanac G, Djordjevic A, Žakula Z, Vojnović Milutinović D, Tepavcević S, Veličković N, et al., 2013. Gender modulates development of

- metabolic syndrome phenotype in fructose fed rats. *Arch Biol Sci* 65, 455-464.
- Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmol D, Jamieson P, et al., 1997. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14924-14929.
- La Cava A, Matarese G, 2004. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 371-379.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M, 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.
- Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G, 1984. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288, 1401-1404.
- Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, et al., 2009. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 89, 1760-1765.
- Lebovitz HE, Banerji MA, 2005. Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care* 28, 2322-2325.
- Lee YC, Ko YH, Hsu YP, Ho LT, 2006. Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. *Life Sci* 78, 1155-1162.
- Lefterova MI, Lazar MA, 2009. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20, 107-114.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA, 2002. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R941-948.

- Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T, et al., 2003. Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes* 52, 1409-1416.
- Liu ZJ, Bian J, Liu J, Endoh A, 2007. Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Horm Metab Res* 39, 489-494.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, et al., 2000. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology* 141, 560-563.
- London E, Castonguay TW, 2009. Diet and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *J Nutr Biochem* 20, 485-493.
- London E, Castonguay TW, 2011. High fructose diets increase 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral adipose in rats within 24-h exposure. *Obesity (Silver Spring)* 19, 925-932.
- London E, Lala G, Berger R, Panzenbeck A, Kohli AA, Renner M, et al., 2007. Sucrose access differentially modifies 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *J Nutr* 137, 2616-2621.
- Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thorne A, Schalling M, Arner P, 1997. Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest* 99, 2398-2404.
- Lu NZ, Cidlowski JA, 2004. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 102-123.

- Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J, 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 4, 449-460.
- Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR, 2008. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol* 197, 189-204.
- Marriott BP, Cole N, Lee E, 2009. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr* 139, 1228S-1235S.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, et al., 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166-2170.
- Mattsson C, Olsson T, 2007. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Curr Med Chem* 14, 2918-2924.
- Mayes PA, 1993. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 58, 754S-765S.
- McEwen BS, 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583, 174-185.
- McGarry JD, 1994. Disordered metabolism in diabetes: have we underemphasized the fat component? *J Cell Biochem* 55 Suppl, 29-38.
- McMaster A, Ray DW, 2007. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol* 92, 299-309.
- Milagro FI, Campion J, Martinez JA, 2007. 11-Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in white adipose tissue is strongly correlated with adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 81-84.
- Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Razaat K, Olefsky JM, 1997. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46, 1678-1683.

- Miller A, Adeli K, 2008. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 24, 204-209.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al., 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
- Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, et al., 2010. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res* 2010.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, et al., 2004. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10, 739-743.
- Moro C, Bajpeyi S, Smith SR, 2008. Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E203-213.
- Morrison CD, 2009. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim Biophys Acta* 1792, 401-408.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW, 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295.
- Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Fievet C, et al., 2004. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes* 53, 931-938.
- Mourao DM, Bressan J, Campbell WW, Mattes RD, 2007. Effects of food form on appetite and energy intake in lean and obese young adults. *Int J Obes (Lond)* 31, 1688-1695.
- Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr., 2005. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 62, 642-652.

- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C, 2004. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880-4889.
- Munzberg H, Myers MG, Jr., 2005. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8, 566-570.
- Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA, 1997. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46, 1360-1363.
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al., 2008. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 49, 1562-1568.
- Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H, 1998. Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 41, 257-264.
- Mussig K, Remer T, Haupt A, Gallwitz B, Fritsche A, Haring HU, et al., 2008. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity is elevated in severe obesity and negatively associated with insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1256-1260.
- Myers MG, Jr., Heymsfield SB, Haft C, Kahn BB, Laughlin M, Leibel RL, et al., 2012. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metab* 15, 150-156.
- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A, 2002. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1180-1190.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, et al., 2006. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F625-631.

- Nandhini AT, Anuradha CV, 2004. Hoe 140 abolishes the blood pressure lowering effect of taurine in high fructose-fed rats. *Amino Acids* 26, 299-303.
- Nechushtan H, Benvenisty N, Brandeis R, Reshef L, 1987. Glucocorticoids control phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specific manner. *Nucleic Acids Res* 15, 6405-6417.
- Newell-Price J, 2008. Cushing's syndrome. *Clin Med* 8, 204-208.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al., 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282, 35279-35292.
- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD, 2004. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 113, 1582-1588.
- Nishimura S, Manabe I, Nagai R, 2009. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med* 8, 55-60.
- Nowak KW, Mackowiak P, Nogowski L, Szkudelski T, Malendowicz LK, 1998. Acute leptin action on insulin blood level and liver insulin receptor in the rat. *Life Sci* 63, 1347-1352.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR, 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 101, 2174-2181.
- Olswang Y, Blum B, Cassuto H, Cohen H, Biberman Y, Hanson RW, et al., 2003. Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem* 278, 12929-12936.

- Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR, 2008. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* 19, 4032-4041.
- Pascot A, Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Nadeau A, Prud'homme D, et al., 2000. Contribution of visceral obesity to the deterioration of the metabolic risk profile in men with impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 43, 1126-1135.
- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, et al., 2004. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7088-7093.
- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC, 2011. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 60, 1500-1510.
- Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM, 1997. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 100, 1863-1869.
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, et al., 1994. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 73, 460-468.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB, 2004. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16, 857-872.
- Pratt WB, Gehring U, Toft DO, 1996. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS* 77, 79-95.
- Rayssiguier Y, Gueux E, Nowacki W, Rock E, Mazur A, 2006. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. *Magnes Res* 19, 237-243.
- Reaven GM, 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.

- Reaven GM, Ho H, Hoffman BB, 1990. Effects of a fructose-enriched diet on plasma insulin and triglyceride concentration in SHR and WKY rats. *Horm Metab Res* 22, 363-365.
- Rebuffle-Scrive M, Krotkiewski M, Elfverson J, Bjorntorp P, 1988. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 1122-1128.
- Reddy SS, Ramatholisamma P, Ramesh B, Baskar R, Saralakumari D, 2009. Beneficiary effect of *Tinospora cordifolia* against high-fructose diet induced abnormalities in carbohydrate and lipid metabolism in Wistar rats. *Horm Metab Res* 41, 741-746.
- Reiser S, Hallfrisch J, 1977. Insulin sensitivity and adipose tissue weight of rats fed starch or sucrose diets ad libitum or in meals. *J Nutr* 107, 147-155.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, et al., 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 278, 30413-30416.
- Reue K, Brindley DN, 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res* 49, 2493-2503.
- Rizkalla SW, 2010. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutr Metab (Lond)* 7, 82.
- Robson AJ, Rousseau K, Loudon AS, Ebling FJ, 2002. Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol* 14, 697-709.
- Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Coll T, Sanchez RM, Merlos M, et al., 2009. Atorvastatin prevents carbohydrate response element binding protein activation in the fructose-fed rat by activating protein kinase A. *Hepatology* 49, 106-115.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM, 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293-1307.

- Rosmond R, Bjorntorp P, 2000. Occupational status, cortisol secretory pattern, and visceral obesity in middle-aged men. *Obes Res* 8, 445-450.
- Sahu A, 2004. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145, 2613-2620.
- Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, Frayn KN, 1998. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 626-631.
- Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, et al., 2007. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F423-429.
- Sandeep TC, Walker BR, 2001. Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab* 12, 446-453.
- Sandeep TC, Yau JL, MacLulich AM, Noble J, Deary IJ, Walker BR, et al., 2004. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition improves cognitive function in healthy elderly men and type 2 diabetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6734-6739.
- Savage DB, 2005. PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert Rev Mol Med* 7, 1-16.
- Scarpace PJ, Zhang Y, 2007. Elevated leptin: consequence or cause of obesity? *Front Biosci* 12, 3531-3544.
- Scarpace PJ, Zhang Y, 2009. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R493-500.
- Schaaf MJ, Cidlowski JA, 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 37-48.

- Schade DS, Eaton RP, Standefer J, 1978. Modulation of basal ketone body concentration by cortisol in diabetic man. *J Clin Endocrinol Metab* 47, 519-528.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr., 1996. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2, 589-593.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG, 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR, 2004. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog Horm Res* 59, 359-393.
- Seckl JR, Walker BR, 2001. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142, 1371-1376.
- Seckl JR, Walker BR, 2004. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. *Trends Endocrinol Metab* 15, 418-424.
- Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S, 2006. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116, 581-589.
- Senesi S, Legeza B, Balazs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, et al., 2010. Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 151, 4830-4839.
- Shapiro A, Cheng KY, Gao Y, Seo DO, Anton S, Carter CS, et al., 2011a. The act of voluntary wheel running reverses dietary hyperphagia and increases leptin signaling in ventral tegmental area of aged obese rats. *Gerontology* 57, 335-342.
- Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ, 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1370-1375.

- Shapiro A, Tumer N, Gao Y, Cheng KY, Scarpace PJ, 2011b. Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br J Nutr* 106, 390-397.
- Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA, 2012. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr* 51, 445-454.
- Shimizu H, Arima H, Watanabe M, Goto M, Banno R, Sato I, et al., 2008. Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 149, 4544-4553.
- Simmons RK, Alberti KG, Gale EA, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, et al., 2010. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia* 53, 600-605.
- Slavin BG, Ong JM, Kern PA, 1994. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 35, 1535-1541.
- Smith J, Al-Amri M, Dorairaj P, Sniderman A, 2006. The adipocyte life cycle hypothesis. *Clin Sci (Lond)* 110, 1-9.
- Solomon SS, Mishra SK, Cwik C, Rajanna B, Postlethwaite AE, 1997. Pioglitazone and metformin reverse insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in liver cells. *Horm Metab Res* 29, 379-382.
- Southgate DA, Paul AA, Dean AC, Christie AA, 1978. Free sugars in foods. *J Hum Nutr* 32, 335-347.
- Spector T, 1978. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* 86, 142-146.
- Spencer RL, Kalman BA, Cotter CS, Deak T, 2000. Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and

- activation in rat brain using western blot analysis. *Brain Res* 868, 275-286.
- Stanhope KL, Havel PJ, 2008a. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr* 88, 1733S-1737S.
- Stanhope KL, Havel PJ, 2008b. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 19, 16-24.
- Stanhope KL, Havel PJ, 2009. Fructose consumption: considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *J Nutr* 139, 1236S-1241S.
- Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF, 1985. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 6, 1205-1211.
- Stanley BG, Leibowitz SF, 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3940-3943.
- Stears AJ, Byrne CD, 2001. Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 3, 129-142.
- Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J, 2009. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 301, 636-650.
- Strable MS, Ntambi JM, 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45, 199-214.
- Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF, 1995. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268, R142-149.

- Svedberg J, Bjorntorp P, Smith U, Lonroth P, 1990. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 39, 570-574.
- Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA, 2002. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R1020-1026.
- Symonds ME, Pope M, Budge H, 2012. Adipose tissue development during early life: novel insights into energy balance from small and large mammals. *Proc Nutr Soc* 71, 363-370.
- Szalkowski D, White-Carrington S, Berger J, Zhang B, 1995. Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 136, 1474-1481.
- Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, et al., 2013. Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One* 8, e64605.
- Tang T, Zhang J, Yin J, Staszkiwicz J, Gawronska-Kozak B, Jung DY, et al., 2010. Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure. *J Biol Chem* 285, 4637-4644.
- Tappy L, Egli L, Lecoultré V, Schneider P, 2013. Effects of fructose-containing caloric sweeteners on resting energy expenditure and energy efficiency: a review of human trials. *Nutr Metab (Lond)* 10, 54.
- Tappy L, Le KA, 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90, 23-46.
- Tappy L, Mittendorfer B, 2012. Fructose toxicity: is the science ready for public health actions? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15, 357-361.
- Tartaglia LA, 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 6093-6096.

- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.
- Tomlinson JW, Finney J, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM, 2008. Reduced glucocorticoid production rate, decreased 5 α -reductase activity, and adipose tissue insulin sensitization after weight loss. *Diabetes* 57, 1536-1543.
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, et al., 2004a. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: A tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews* 25, 831-866.
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, et al., 2004b. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25, 831-866.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM, 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5, 571-576.
- Tordjman J, Khazen W, Antoine B, Chauvet G, Quette J, Fouque F, et al., 2003. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie* 85, 1213-1218.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH, 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 332, 145-159.
- Tsigos C, Kyrou I, Chala E, Tsapogas P, Stavridis JC, Raptis SA, et al., 1999. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism* 48, 1332-1335.
- Uchoa ET, Sabino HA, Ruginsk SG, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, 2009. Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is

- associated with an increased activation of satiety-related responses. *J Appl Physiol* 106, 596-604.
- Unger RH, 2003. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14, 398-403.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS, 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389, 610-614.
- Vague J, 1946. [Not Available]. *Gaz Hop Civ Mil Empire Ottoman* 119, 113-116.
- Vague J, 1947. [Not Available]. *Presse Med* 55, 339.
- Vague J, Garrigues JC, 1956. [Demonstration of steroids in human fatty tissue]. *Folia Endocrinol Mens Incretologia Incretoterapia* 9, 299-312.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonngqvist F, et al., 1998. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 47, 913-917.
- Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, et al., 1997. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99, 385-390.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Vasiljević A, Velickovic N, Bursac B, Djordjevic A, Milutinovic DV, Nestorovic N, et al., 2013. Enhanced prereceptor glucocorticoid metabolism and lipogenesis impair insulin signaling in the liver of fructose-fed rats. *J Nutr Biochem* 24, 1790-1797.
- Veyrat-Durebex C, Deblon N, Caillon A, Andrew R, Altirriba J, Odermatt A, et al., 2012. Central glucocorticoid administration promotes weight gain and increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in white adipose tissue. *PLoS One* 7, e34002.

- Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC, 2008. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 48, 1506-1516.
- Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM, 2008. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med* 10, 160.
- Vrana A, Fabry P, Kazdova L, 1973. Effect of dietary fructose on fatty acid synthesis in adipose tissue and on triglyceride concentration in blood in the rat. *Nutr Metab* 15, 305-313.
- Wabitsch M, Ballauff A, Holl R, Blum WF, Heinze E, Remschmidt H, et al., 2001. Serum leptin, gonadotropin, and testosterone concentrations in male patients with anorexia nervosa during weight gain. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2982-2988.
- Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, et al., 2010. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology* 151, 2040-2049.
- Wajchenberg BL, 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 21, 697-738.
- Wake DJ, Rask E, Livingstone DE, Soderberg S, Olsson T, Walker BR, 2003. Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3983-3988.
- Walker BR, 2006. Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet Med* 23, 1281-1288.
- Walker EA, Clark AM, Hewison M, Ride JP, Stewart PM, 2001. Functional expression, characterization, and purification of the

- catalytic domain of human 11-beta -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Biol Chem* 276, 21343-21350.
- Walker EA, Stewart PM, 2003. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab* 14, 334-339.
- Walley AJ, Asher JE, Froguel P, 2009. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet* 10, 431-442.
- Wang JC, Gray NE, Kuo T, Harris C, 2012a. Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. *Cell Biosci* 2, 19.
- Wang JC, Gray NE, Kuo T, Harris CA, 2012b. Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. *Cell Biosci* 2, 19.
- Wang M, 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2, 3.
- Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE, et al., 2006. Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E500-508.
- Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF, 2000. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143, 293-311.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Weisell RC, 2002. Body mass index as an indicator of obesity. *Asia Pac J Clin Nutr* 11 Suppl 8, S681-684.
- Wellen KE, Hotamisligil GS, 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119.
- White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA, 1997. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272, 4065-4071.
- White DW, Tartaglia LA, 1996. Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 303-309.

- White JD, 1993. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regul Pept* 49, 93-107.
- White PC, Rogoff D, McMillan DR, Lavery GG, 2007. Hexose 6-phosphate dehydrogenase (H6PD) and corticosteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 89-92.
- Williams VP, Szepesi B, 1983. Effect of dietary carbohydrates on food efficiency and body composition in adult male rats during normal growth and during recovery from food restriction. *Nut Res* 5, 457-468.
- Wisse BE, 2004. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 15, 2792-2800.
- Wu Z, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR, 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 9, 2350-2363.
- Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S, et al., 2009. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol* 23, 1161-1170.
- Yokozawa T, Kim HJ, Cho EJ, 2008. Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. *J Agric Food Chem* 56, 5026-5032.
- York DA, 1996. Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25, 781-800.
- Yu CY, Mayba O, Lee JV, Tran J, Harris C, Speed TP, et al., 2010. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PLoS One* 5, e15188.
- Zakrzewska KE, Sainsbury A, Cusin I, Rouru J, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F, 1999. Selective dependence of intracerebroventricular neuropeptide Y-elicited effects on central glucocorticoids. *Endocrinology* 140, 3183-3187.

- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al., 2012. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* 15, 279-291.
- Zhang P, O'Loughlin L, Brindley DN, Reue K, 2008. Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *J Lipid Res* 49, 1519-1528.
- Zhang P, Takeuchi K, Csaki LS, Reue K, 2012. Lipin-1 phosphatidic phosphatase activity modulates phosphatidate levels to promote peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) gene expression during adipogenesis. *J Biol Chem* 287, 3485-3494.
- Zhang Y, Scarpace PJ, 2006. Circumventing central leptin resistance: lessons from central leptin and POMC gene delivery. *Peptides* 27, 350-364.

8. PRILOZI

Biografija autora

Biljana (Nenad) Bursać je rođena 27. avgusta 1985. godine u Pakracu, Republika Hrvatska.

Kao đak generacije, osmogodišnje školovanje je završila u Zrenjaninu, gde je 2004. godine završila Zrenjaninsku gimnaziju kao dobitnik Vukove diplome. Školske 2004/2005. godine je upisala studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Studije je završila kao redovan student finansiran iz budžeta, sa prosečnom ocenom 9.51. Za vreme osnovnih studija je bila stipendista Fonda za mlade talente Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Diplomski rad iz oblasti forenzike pod nazivom „Analiza sekvence citohrom B gena u cilju forenzičke diskriminacije viših kičmenjaka“ je uradila u okviru Centra za humanu molekularnu genetiku pod mentorstvom dr Dušana Keckarevića, gde je volontirala do diplomiranja 2010. godine.

Od 2011. godine je zaposlena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta *Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinnoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma - molekularni mehanizmi i kliničke implikacije* koji je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Matić. Iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu, na odseku Molekularna biologija.

Dobitnik je stipendije *European Society of Endocrinology* za učešće u Letnjoj školi endokrinologije u Bregenzu, Austrija, 2012. godine, kao i *COST-FENS/IBRO* stipendije za učešće u Letnjoj školi neuroendokrinologije, Prato, Italija, 2013 godine.

U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu, Biljana Bursać je objavila 7 radova u vodećim međunarodnim časopisima, od kojih 2 kao prvi autor.