

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja R. Kovačević

RAZVOJ METABOLIČKOG SINDROMA
IZAZVANOG KOMBINACIJOM STRESA I ISHRANE
OBOGAĆENE FRUKTOZOM – DOPRINOS
GLUKOKORTIKOIDA U VISCERALNOM
MASNOM TKIVU I HIPOTALAMUSU ŽENKE
PACOVA

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sanja R. Kovačević

THE DEVELOPMENT OF METABOLIC
SYNDROME INDUCED BY THE COMBINATION
OF STRESS AND FRUCTOSE ENRICHED DIET –
THE CONTRIBUTION OF GLUCOCORTICOIDS IN
VISCERAL ADIPOSE TISSUE AND
HYPOTHALAMUS OF FEMALE RATS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTORI

dr Ivana Elaković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Ivana Elaković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Selma Kanazir, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta “Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“ (ev. br. III41009, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije) i SCOPES projekta „Interactions between stress and dietary fructose in the development of the metabolic syndrome: role of glucocorticoids“ (IZ73Z0_152331, Swiss National Science Foundation).

Veliko Hvala,

Prof Dr Gordani Matić na poverenju koje mi je ukazala primivši me u svoj naučni tim, na dragocenim savetima, posvećenosti i podršci koje mi je pružila tokom izrade ove disertacije,

Mojoj mentorki Dr Ivani Elaković na velikom trudu, radu i zalaganju koje je uložila u mene, na izdvojenom vremenu koje je posvetila mom napretku i rastu, na velikom znanju koje je nesebično delila sa mnom, na svim savetima i kritikama koje će od mene da načine boljeg naučnika, na podršci i veri koje ima u moj rad, još jednom Veliko Hvala!

Dr Selmi Kanazir na savetima i lepoj saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije,

Dr Ani Đorđević, dr Danijeli Vojnović Milutinović, dr Jeleni Nestorov i dr Nataši Veličković na korisnim savetima, podršci i pomoći koju su mi pružile,

Dr Ani Teofilović, dr Bilji Bursać i dr Marini Nikolić na prijatnim razgovorima, podršci i lepoj saradnji,

Ljupki Gligorovskoj na nepresušnoj energiji, optimizmu i smehu koji je unela u našu laboratoriju a posebno na velikoj podršci i lepom prijateljstvu,

Sofiji, Anji, Marku, Bokiju, Sonji, Jasmini i Ivani na ohrabrenju i podršci koju su mi pružili, na svim savetima, neophodnim i korisnim pauzama za ručak i lepom prijateljstvu,

Svim kolegamicama i kolegama sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ koji su učinili da Institut bude prijatno mesto za rad i boravak kao i svima onima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije,

*Za neizmernu i bezuslovnu podršku tokom izrade i pisanja doktorske disertacije, za bezrezervnu veru u mene i moje mogućnosti, za sve odluke i sve pobeđe, za veliku pažnju i ljubav posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i mom Đorđu. **Veliko vam Hvala!***

Razvoj metaboličkog sindroma izazvanog kombinacijom stresa i ishrane obogaćene fruktozom – doprinos glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu ženke pacova

Sažetak

Savremen način života karakterišu prekomeran unos fruktoze i svakodnevni stres koji koincidiraju sa pojavom metaboličkog sindroma (MetS), vodećeg faktora rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 i bolesti srca. Narušen signalni put glukokortikoidnih hormona (GH), regulatora metabolizma i odgovora na stres, može biti uključen u patofiziologiju MetS-a.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se testira hipoteza da fruktoza u kombinaciji sa hroničnim stresom dovodi do poremećaja u signalnom putu GH odgovornih za razvoj karakteristika MetS-a kod ženki pacova. U tom cilju ispitani su efekti devetonedelnog izlaganja ishrani obogaćenoj fruktozom i nepredvidivom stresu na preceptorski metabolizam GH, ekspresiju i funkciju glukokortikoidnog receptora i njime regulisanih gena uključenih u metabolizam masti u visceralnom masnom tkivu (VMT). Pod istim uslovima ispitani su i leptinski signalni put u hipotalamusu i inflamatorni status oba pomenuta tkiva.

Rezultati pokazuju da dugoročna ishrana obogaćena fruktozom stimuliše adipogenezu i *de novo* lipogenezu u VMT-u, dok hronični nepredvidivi stres promoviše lipolizu. Iako suprotni, ovi efekti su najverovatnije posledica aktivnosti GH. Nijedan od tretmana nije uticao na leptinski signalni put niti na regulaciju unosa hrane u hipotalamusu. Takođe, rezultati sugerišu da je inflamacija u VMT-u jedna od prvih posledica konzumiranja fruktoze budući da se razvija pre nego što se mogu uočiti gojaznost i inflamacija u hipotalamusu.

Sumarno, fruktoza svojim lipogenim uticajem uzrokuje metaboličke i fiziološke promene koje doprinose razvoju metaboličkog sindroma, dok su posledice hroničnog stresa izraženije u odnosu na efekte fruktoze i predominantno usmeravaju metabolizam ka potrošnji energije, pri čemu u oba slučaja GH ostvaruju značajan doprinos.

Ključne reči: glukokortikoidni hormoni; glukokortikoidni receptor; fruktoza; hronični nepredvidivi stres; visceralno masno tkivo; metabolizam lipida; hipotalamus; leptin; inflamacija; mlade i adultne ženke pacova;

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

The development of metabolic syndrome induced by the combination of stress and fructose enriched diet – the contribution of glucocorticoids in visceral adipose tissue and hypothalamus of female rats

Abstract

Hallmarks of modern lifestyle, fructose overconsumption and daily exposure to unpredictable stress, coincide with the onset of metabolic syndrome (MetS), leading risk factor for the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Glucocorticoid hormones (GC), main regulators of metabolism and response to stress, could be involved in the pathophysiology of MetS.

The aim of this doctoral dissertation was to test the hypothesis that the combination of fructose diet and chronic unpredictable stress evokes disturbances in GC signaling responsible for the development of MetS in female rats. We analyzed the effects of 9 week exposure to fructose enriched diet and stress on GC prereceptor metabolism, expression and function of glucocorticoid receptor and receptor regulated genes involved in lipid metabolism in visceral adipose tissue (VAT). Also, we analyzed leptin signaling in hypothalamus and inflammation in both tissues.

Results showed that long term fructose overconsumption stimulated adipogenesis and *de novo* lipogenesis in VAT, while chronic stress promoted lipolysis. Although opposing, these effects probably result from the GC activity. Leptin signaling and appetite regulation in hypothalamus were not affected by these treatments. Also, results suggest that VAT inflammation is one of the first consequences of fructose overconsumption as it was developed before the onset of obesity and inflammation in hypothalamus.

In summary, lipogenic effects of fructose elicit metabolic and physiologic disturbances that contribute to the development of MetS, while chronic stress predominantly directs metabolism to energy expenditure and exceeds the effects of fructose. In both cases, GC play a significant role.

Key words: glucocorticoid hormones; glucocorticoid receptor; fructose; chronic unpredictable stress; visceral adipose tissue; lipid metabolism; hypothalamus; leptin; inflammation; young and adult female rats;

Research area: Biology

Area of special interest: Biochemistry and molecular biology

Skraćenice

ACC	acetil-CoA karboksilaza (eng. <i>Acetyl-CoA carboxylase</i>)
Acetil-CoA	acetil-koenzim A (eng. <i>Acetyl-coenzyme A</i>)
ACTH	adrenokortikotropni hormon (eng. <i>Adrenocorticotrophic hormone</i>)
AF-1 ili τ 1	transaktivacioni domen nezavisan od liganda (eng. <i>Activation function domain 1</i>)
AF-2	transaktivacioni domen zavisian od liganda (eng. <i>Activation function domain 2</i>)
AgRP	protein povezan sa aguti fenotipom (eng. <i>Agouti-related peptide</i>)
AP-1	transkripcioni regulator AP-1 (eng. <i>Activator protein-1</i>)
ATGL	lipaza triglicerida adipocita (eng. <i>Adipose triglyceride lipase</i>)
ATP	adenozin-trifosfat (eng. <i>Adenosine triphosphate</i>)
BMI	indeks telesne mase (eng. <i>Body mass index</i>)
C/EBP	transkripcioni regulator koji se vezuje za pojačivač CCAAT (eng. <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat (eng. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CART	(eng. <i>Cocaine and amphetamine related transcript</i>)
CNS	centralni nervni sistem
CPT1	karnitin palmitoil transferaza 1 (eng. <i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>)
CREB	protein koji se vezuje za regulatorne sekvence koje odgovaraju na cAMP (eng. <i>cAMP-response element-binding protein</i>)
CRH	kortikotropni oslobađajući hormon (eng. <i>Corticotropin-releasing hormone</i>)
DBD	domen za vezivanje za DNK (eng. <i>DNA binding domain</i>)
DNaza 1	dezoksiribonukleaza 1
dNTP	dezoksiribonukleotidtrifosfat
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
FAS	sintaza masnih kiselina (eng. <i>Fatty acid synthase</i>)
GILZ	(eng. <i>Glucocorticoid-induced leucine zipper</i>)
GLUT	glukozni transporter

GR	glukokortikoidni receptor
GRE	sekvence DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (eng. <i>Glucocorticoid response elements</i>)
H6PDH	heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>Hexose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
HDL	lipoprotein visoke gustine (eng. <i>High density lipoprotein</i>)
HFCS	visoko fruktozni kukuruzni sirup (eng. <i>High fructose corn syrup</i>)
HHA	hipotalamo-hipofizno-adrenokortikalna osa
HPRT1	hipoksantin fosforibozil transferaza 1
HSD1	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1
HSD2	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2
HSL	hormon senzitivna lipaza
Hsp	protein toplotnog šoka (eng. <i>Heat shock protein</i>)
IKK	kinaza koja fosforiliše I κ B (eng. <i>IκB kinase</i>)
IL	interleukin
I κ B	inhibitorski protein κ B (eng. <i>Inhibitor of κB</i>)
JAK2	janus kinaza tipa 2
KLF	familija faktora sličnih Kruppel-u (eng. <i>Kruppel-like factor family</i>)
LBD	domen za vezivanje liganda (eng. <i>Ligand binding domain</i>)
LPL	lipoproteinska lipaza
Malonil-CoA	malonil-koenzim A (eng. <i>Malonil-coenzyme A</i>)
MC4-R	receptor koji vezuje melanokortin tipa IV (eng. <i>Melanocortin 4 receptor</i>)
MCP-1	hemoatraktantni protein-1 za monocite (eng. <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MIF	inhibitorski faktor migracije makrofagi (eng. <i>Macrophage migration inhibitory factor</i>)
MNGL	lipaza monoacilglicerola (eng. <i>Monoacylglycerol lipase</i>)
NADP ⁺ /H	oksidovano/redukovani nikotinamid dinukleotid fosfat (eng. <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF κ B	nuklearni faktor κ B (eng. <i>Nuclear factor κB</i>)
NPY	neuropeptid Y
NTD	N-terminalni domen

ObR	receptor za leptin (eng. <i>Obesity receptor</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PVDF	polivinildifluorid
PEPCK	fosfoenol piruvat karboksikinaza (eng. <i>Phosphoenol pyruvate carboxykinase</i>)
POMC	proopiomelanokortin (eng. <i>Proopiomelanocortin</i>)
PPAR γ	receptor γ aktiviran peroksizomskim proliferatorom (eng. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
PTP1B	proteinska tirozin fosfataza 1B (eng. <i>Phosphotyrosine phosphatase 1B</i>)
SOCS3	supresor signalnog puta citokina 3 (eng. <i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>)
SREBP1c	protein 1c koji se vezuje za element regulisan sterolom (eng. <i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i>)
STAT	protein koji prenosi signal i aktivira transkripciju (eng. <i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
TLR	Toll receptor (eng. <i>Toll-like receptors</i>)
TNF α	faktor nekroze tumora α (eng. <i>Tumor necrosis factor α</i>)
VLDL	lipoprotein veoma niske gustine (eng. <i>Very low-density lipoprotein</i>)
α MSH	hormon koji stimulise α melanocit (eng. <i>α melanocyte stimulating hormone</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Metabolički sindrom	2
1.1.1 Gojaznost u metaboličkom sindromu – doprinos visceralnog masnog tkiva	3
1.1.2 Polne razlike u metaboličkom sindromu	6
1.2 Uloga fruktoze u razvoju metaboličkog sindroma	8
1.2.1 Metabolizam fruktoze – lipogeni potencijal.....	10
1.3 Stres	13
1.3.1 Stres i metabolički sindrom	16
1.4 Glukokortikoidni hormoni i metabolički sindrom	19
1.4.1. Uloge glukokortikoida	21
1.4.2. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida	23
1.4.3. Glukokortikoidni receptor	25
1.4.4. Efekti glukokortikoida u masnom tkivu.....	29
1.4.4.1. Uloga glukokortikoida u adipogenezi.....	29
1.4.4.2. Lipogeni i lipolitički efekti glukokortikoida	30
1.5 Regulacija unosa hrane i energetskega balansa	34
1.5.1. Leptin.....	37
1.5.1.1. Regulacija sekrecije leptina.....	37
1.5.1.2. Leptinski signalni put	38
1.5.1.3. Uloge leptina.....	39
1.5.1.4. Leptinska rezistencija.....	41
1.5.2. Uloga glukokortikoida u regulaciji unosa hrane	42
1.6 Inflamacija i metabolički sindrom	44
1.6.1. Inflamatorni odgovor	45
1.6.2. Metabolička inflamacija	45
1.6.2.1. Razvoj metaboličke inflamacije u masnom tkivu	46
1.6.2.2. Razvoj metaboličke inflamacije u hipotalamusu	49
1.6.3. Stres i inflamacija – uloga glukokortikoida.....	50
2. CILJ	53
3. MATERIJAL I METODE	56
3.1. Materijal	57
3.2. Tretman životinja	58
3.3. Karakterizacija animalnog modela	58
3.4. Priprema kompartmana visceralnog masnog tkiva	59
3.5. Priprema ukupnih ćelijskih ekstrakata hipotalmusa	60
3.6. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	60
3.7. Western blot metoda	61
3.8. Izolovanje RNK	61
3.9. DNazni tretman i reverzna transkripcija.....	62
3.10. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR)	62
3.11. Određivanje ravnotežnih parametara vezivanja hormona za receptor.....	63
3.12. Određivanje koncentracije kortikosterona i leptina	64
3.13. Određivanje koncentracije proteina i RNK	64

3.14.	Histološka analiza visceralnog masnog tkiva	65
3.15.	Statistička analiza	65
4.	REZULTATI.....	66
4.1.	Fiziološki i biohemijski parametri ženki pacova	67
4.2.	Visceralno masno tkivo	69
4.2.1.	Histološka analiza visceralnog masnog tkiva ženki pacova	69
4.2.2.	Prereceptorski metabolizam glukokortikoida	70
4.2.3.	Nivo GR proteina i njegova unutarćelijska distribucija.....	72
4.2.4.	Ravnotežni parametri vezivanja hormona za GR	73
4.2.5.	Ekspresija gena lipidnog metabolizma regulisanih GR-om.....	75
4.2.6.	Nivo transkripcionih regulatora uključenih u metabolizam lipida	75
4.2.7.	Nivo enzima CPT1.....	77
4.2.8.	Inflamatorni status visceralnog masnog tkiva.....	78
4.3.	Hipotalamus	82
4.3.1.	Prereceptorski metabolizam glukokortikoida	83
4.3.2.	Nivo GR proteina	84
4.3.3.	Ekspresija gena za oreksigene neuropeptide	84
4.3.4.	Nivo leptina, ObRb-a i inhibitora leptinskog puta	85
4.3.5.	Inflamatorni status hipotalamusa	88
5.	DISKUSIJA	91
5.1.	Efekat fruktoze i/ili hroničnog nepredvidivog stresa na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu.....	93
5.2.	Efekti ishrane bogate fruktozom, hroničnog stresa i njihove kombinacije na razvoj inflamacije u visceralnom masnom tkivu.....	108
5.3.	Efekat ishrane bogate fruktozom i/ili hroničnog nepredvidivog stresa na regulaciju unosa hrane u hipotalamusu.....	116
5.4.	Efekti ishrane bogate fruktozom, hroničnog stresa i njihove kombinacije na razvoj inflamacije u hipotalamusu	126
6.	ZAKLJUČCI	130
7.	LITERATURA.....	133

1. Uvod

1.1 Metabolički sindrom

Istorijski posmatrano koncept metaboličkog sindroma prvi put se pojavio još 20-tih godina prošlog veka, kada je švedski lekar Kylin ukazao na povezanost visokog krvnog pritiska (hipertenzije) i visoke koncentracije glukoze u krvi (hiperglikemije) sa razvojem gihta (Kylin, 1923). Dvadesetak godina kasnije Vague je ukazao da se visceralna gojaznost nalazi u vezi sa metaboličkim poremećajima koji se javljaju u okviru dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti (Vague, 1947). Godine 1988. Reaven je prvi upotrebio termin „sindrom X” i istakao klinički značaj pojave sledećih poremećaja u kombinaciji: hipertenzije, promenjene tolerancije na glukozu, visokog nivoa triglicerida (hipertrigliceridemije) i niskog nivoa lipoproteina visoke gustine (eng. *High-density lipoprotein*; HDL)¹ (Reaven, 1988). Godinu dana kasnije Kaplan je preimenovao sindrom u „smrtonosnu četvorku”, ukazujući na posebnu važnost pojave visceralne gojaznosti, koja je kod Reaven-a bila zanemarena, u jedinstvu sa hipertenzijom, hipertrigliceridemijom i smanjenom tolerancijom na glukozu. U narednim periodima korišćeni su brojni drugi izrazi poput „sindrom insulinske rezistencije”, „polimetabolički sindrom”, „sindrom civilizacije” i drugi. Danas se smatra da je za skup visceralne gojaznosti, hiperglikemije, insulinske rezistencije, hipertenzije i dislipidemije², najadekvatniji termin metabolički sindrom i kao takav se najčešće koristi u literaturi (Aydin i sar., 2014; Kaur i Jaspinder, 2014).

Poteškoće u definisanju metaboličkog sindroma praćene su i problemima u standardizaciji dijagnostičkih kriterijuma. Internacionalna federacija za dijabetes definisala je metabolički sindrom kao prisustvo visceralne gojaznosti u kombinaciji sa bilo koja dva faktora od sledećih:

- koncentracija triglicerida viša od 150 mg/dL (1,7 mmol/L)

¹ HDL – lipoproteini krvne plazme koji poseduju visok sadržaj proteina i nizak sadržaj triglicerida i holesterola, koreliraju sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti i označavaju se kao „dobar holesterol”.

² Dislipidemija – povećan nivo triglicerida i lipoproteina niske gustine, uz smanjen nivo HDL-a.

- koncentracija HDL-a niža od 40 mg/dL (1,03 mmol/L) kod muškaraca odnosno 50 mg/dL (1,29 mmol/L) kod žena
- povišen krvni pritisak (sistolni krvni pritisak iznad 130 mm Hg ili dijastolni krvni pritisak iznad 85 mm Hg)
- koncentracija glukoze u plazmi nakon gladovanja viša od 100 mg/dL (5,6 mmol/L).

Velika svetska zdravstvena udruženja pridaju izuzetnu važnost metaboličkom sindromu, zbog toga što on predstavlja značajnu predispoziciju za razvoj dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i bolesti bubrega. Nažalost, kako je istaknuto, dijagnozu metaboličkog sindroma nije lako uspostaviti, a u lečenju se upotrebljava isključivo simptomatska terapija. Situaciju otežava činjenica da se ne javljaju svi opisani simptomi kod svakog pacijenta, već se najčešće prvo javlja jedan od simptoma koji potom povećava verovatnoću pojave sledećih. Ipak, visceralna gojaznost se smatra najčešćom i najizraženijom karakteristikom metaboličkog sindroma.

1.1.1 Gojaznost u metaboličkom sindromu – doprinos visceralnog masnog tkiva

Svetska zdravstvena organizacija je uvrstila gojaznost u epidemiju svetskih razmera, s obzirom da je broj gojaznih osoba na svetskom nivou više nego udvostručen u odnosu na 1980. godinu. Tako je 2014. godine procenjeno da postoji čak 1,9 milijardi gojaznih osoba u svetu (“WHO | Obesity and overweight,” 2016). Kriterijum gojaznosti se menjao kroz vekove i kulture. Danas se kao mera gojaznosti najčešće koristi indeks telesne mase (eng. *Body mass index*; BMI) koji su 1972. godine uveli Keys i sar., (Keys i sar., 1972), a računa se kao količnik mase tela izražene u kilogramima (kg) i kvadrata visine izražene u metrima (m).

$$\text{BMI} = \text{telesna masa (kg)} / (\text{telesna visina (m)})^2$$

U zavisnosti od vrednosti BMI određene su kategorije gojaznosti (**Tabela 1**) pri čemu se gojaznom smatra odrasla osoba čiji je BMI jednak ili veći od 30 (“WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic,” 2015).

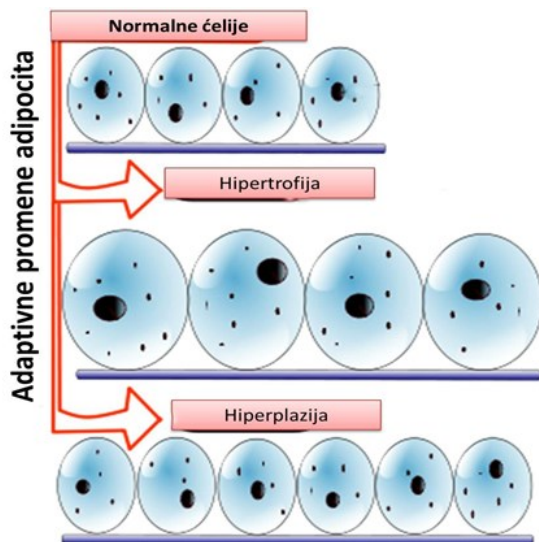
Tabela 1. Određivanje tipa gojaznosti zasnovano na vrednosti BMI.

Tip gojaznosti	BMI
Gojaznost tipa I	30 – 34,9
Gojaznost tipa II	34,9 – 39,9
Gojaznost tipa III (Morbidna gojaznost)	≥ 40

BMI- indeks telesne mase (eng. Body mass index);
Preuzeto iz ("WHO | Obesity: preventing and
managing the global epidemic," 2015).

Međutim, veliki problem sa definisanjem gojaznosti putem BMI vrednosti je u tome što on nije pouzdan pokazatelj sadržaja i distribucije masti u organizmu. Tako osobe sa visokim BMI mogu imati nizak sadržaj masti i obrnuto. Najbolji primer su sportisti koji imaju veliku mišićnu masu i starije osobe kod kojih su mišićna masa i gustina kostiju smanjene. Stoga se, kao dodatni kriterijum pri dijagnostikovanju gojaznosti često koriste obim struka kao i odnos obima struka i kuka, koji daju bolji uvid u distribuciju masnog tkiva u telu (Pouliot i sar., 1994).

Gojaznost nastaje kao posledica narušenog balansa unosa i potrošnje energije. Višak energije se u vidu triglicerida akumulira u masnom tkivu što dovodi do širenja masnog tkiva na dva načina – povećanjem zapremine adipocita usled akumulacije masti (hipertrofija) i sazrevanjem novih adipocita putem adipogeneze (hiperplazija) ([Slika 1](#)).



Slika 1. Rast masnog tkiva hipertrofijom i hiperplazijom.

Preuzeto i modifikovano sa sajta:

https://bs.wikipedia.org/wiki/Hyperplasia_vs_Hypertrophy.svg

Akumulacija masnog tkiva u abdominalnom regionu karakteristična je za takozvani visceralni odnosno centralni vid gojaznosti koji češće korelira sa povećanim rizicima za razvoj dijabetesa, hipertenzije, hiperlipidemije i kardiovaskularnih oboljenja nego u slučaju akumulacije masnog tkiva u perifernom, gluteo-femoralnom i subkutanom regionu (Donahue i sar.,

1987; Lapidus i sar., 1984). Brojna istraživanja doprinosa različitih masnih depoa metaboličkim promenama kod gojaznih ljudi ukazuju da se za razliku od subkutane, visceralna gojaznost nalazi u korelaciji sa nivoom holesterola i triglicerida u serumu (Fujioka i sar., 1987), kao i da doprinosi stvaranju lipidnog profila koji promoviše nakupljanje masnih plaka u krvnim sudovima (Nieves i sar., 2003). Povećana masa visceralnog masnog tkiva kod premenopauzalnih žena povezana je sa povećanjem krvnog pritiska, dok kod gojaznih žena sa razvijenom hipertenzijom redukcija mase ovog masnog depoa dovodi do smanjenja krvnog pritiska (Kanai i sar., 1996). Čak i kod osoba koje nisu gojazne, uvećanje visceralnog masnog tkiva povezano je sa razvojem srčanih oboljenja i povećanim rizikom od srčanog udara (Nakamura i sar., 1994). Desetogodišnje ispitivanje uticaja visceralne gojaznosti na razvoj dijabetesa pokazalo je da je upravo ovaj tip gojaznosti predhodi pojavi dijabetesa tipa 2, čak i nezavisno od nivoa insulina, glikemije, BMI i porodične anamneze (Boyko i sar., 2000). Stoga, visceralna gojaznost predstavlja značajan faktor rizika za nastanak i razvoj metaboličkog sindroma.

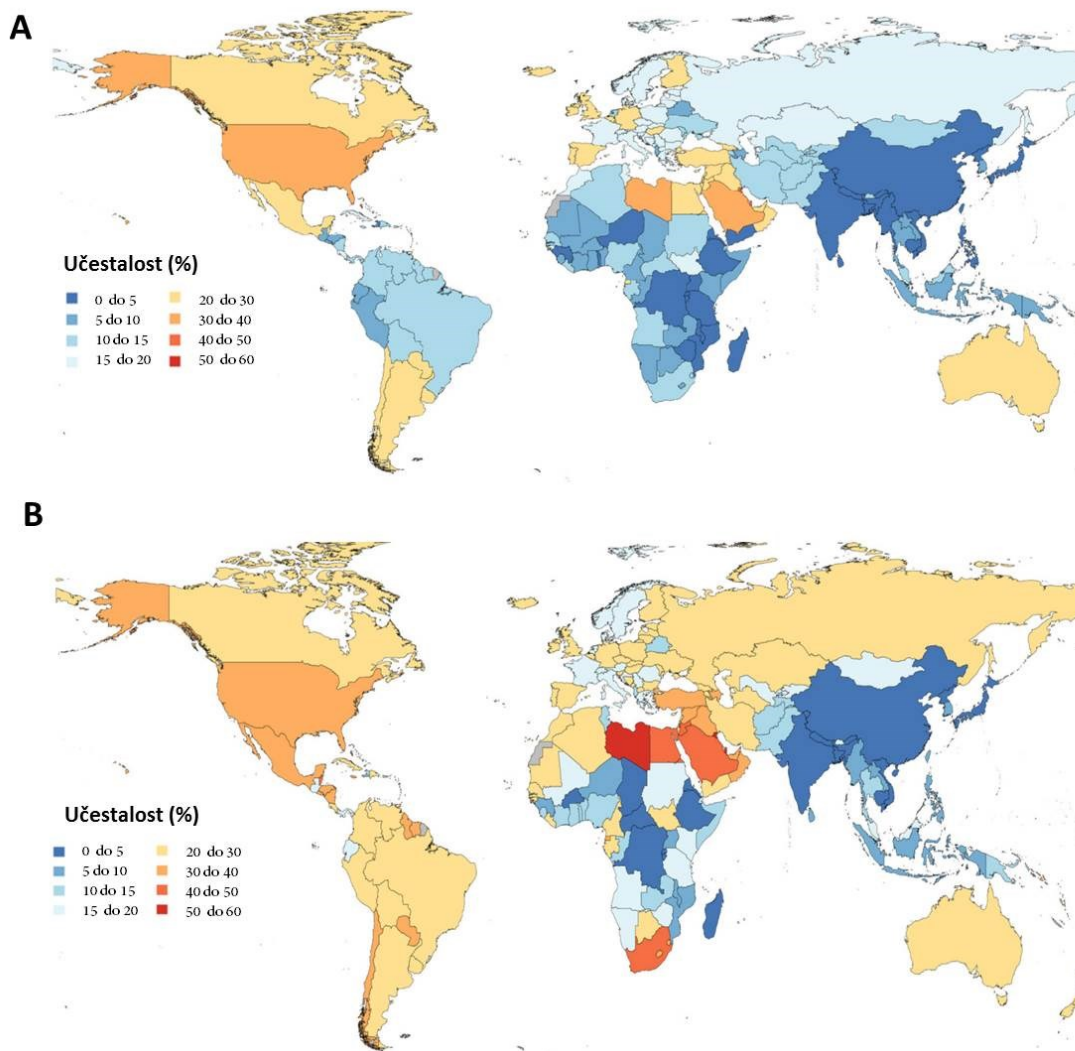
Razlozi zbog kojih visceralna gojaznost ima tako alarmantne posledice po zdravlje pored same anatomske lokalizacije jesu i bogata vaskularizacija kao i veća metabolička aktivnost ovog depoa masnog tkiva u odnosu na ostale (Tchernof i

Després, 2013; Wajchenberg i sar., 2002). Već dugi niz godina je poznato da masno tkivo nije samo pasivan depo u kome se akumuliraju masti već da predstavlja i aktivan metabolički centar koji sintetizira i sekretuje čitav niz proteina koji se označavaju kao adipokini. U zavisnosti od energetskeg statusa u masnom tkivu, adipociti sekretuju različiti set adipokina koji ostvaruju autokrino, parakrino i/ili endokrino dejstvo na metaboličke organe poput jetre i pankreasa kao i na centre regulacije unosa hrane u mozgu modulišući tako njihovu funkciju i usklađujući je sa energetskeim potrebama organizma (Rezaee, 2013). Povećanje mase masnog tkiva u gojaznosti, naročito visceralnog, dovodi do izmenjene funkcije adipocita i disbalansa u sekreciji adipokina što doprinosi poremećaju energetskeg metabolizma i razvoju patoloških posledica povezanih sa njim (Gimeno i Klamann, 2005; Matsuzawa, 2006).

1.1.2 Polne razlike u metaboličkom sindromu

Sve više studija ukazuje da postoje značajne razlike u incidenci metaboličkog sindroma između polova. Takođe, polne razlike se uočavaju i u verovatnoći pojave pojedinačnih poremećaja koji čine metabolički sindrom kao i u tome da će njihov skup dovesti do razvoja metaboličkog sindroma. Istraživanja ukazuju da hiperglikemija, povećani BMI i obim struka kao i smanjen nivo HDL-a više doprinose razvoju metaboličkog sindroma kod žena u odnosu na muškarce kod kojih su se kao značajniji parametri izvojili povećan nivo triglicerida i hipertenzija (Beigh i Jain, 2012). Interesantno, polovi se razlikuju i po dominantnom tipu gojaznosti koji razvijaju. Za muškarce je karakterističan abdominalni tip gojaznosti, koji se upravo iz ovog razloga naziva androidni tip, dok je kod žena češći gluteo-femoralni označen i kao ginoidni tip gojaznosti (Vague, 1947). Iako je dominantni tip gojaznosti koji se javlja kod žena u manjoj korelaciji sa metaboličkim sindromom *per se*, procenat gojaznosti među ženama značajno je porastao poslednjih godina povlačeći i povećan razvoj komplikacija koje su u vezi sa njom. Podaci ukazuju da je 2012. godine u Sjedinjenim Američkim Državama bilo oko 2 miliona više gojaznih žena nego muškaraca, a slični podaci prijavljeni su i za zemlje u razvoju na jugo-istoku Azije (Fezeu i sar., 2007; Jahan i sar., 2007) (**Slika 2**). Takođe, žene su podložnije razvijanju morbidne gojaznosti. Dodatno, nakon menopauze centralni tip gojaznosti postaje dominantan i kod žena, noseći sa

sobom sve prateće rizike i povećanu prevalencu metaboličkog sindroma kod ove populacije žena (Marjani i Moghasemi, 2012; Ponholzer i sar., 2008). Stoga, nije iznenađujuće što rezultati mnogih studija ukazuju da je pojava metaboličkog sindroma učestalija kod žena nego kod muškaraca (Park i sar., 2006; Sidorenkov i sar., 2010). Ipak, najveći broj animalnih istraživanja vezanih za metabolički sindrom sprovodi se na mužjacima.

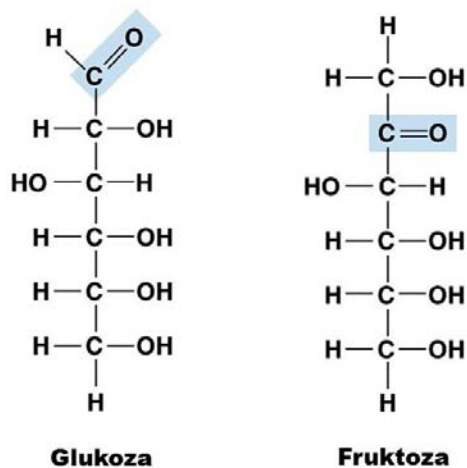


Slika 2. Učestalost gojaznosti ($BMI \geq 30$) kod muškaraca (A) i žena (B). Prikazani su podaci za 2013.godinu i populaciju stariju od 20. godina. Preuzeto i modifikovano iz (Ng i sar., 2014)

1.2 Uloga fruktoze u razvoju metaboličkog sindroma

Iako istraživanja pokazuju da genetički faktori imaju značajnu ulogu u razvijanju metaboličkih poremećaja koji prate sindrom (Rankinen i sar., 2002), brzina kojom se metabolički sindrom raširio po svetu kao i raznolikost populacije koju pogađa ukazuje da faktori sredine imaju značajniju ulogu u njegovom razvoju. Kako je metabolički sindrom bolest modernog doba, sve je više pokušaja da se njegovi uzroci prepoznaju u načinu života modernog čoveka, prevashodno u ishrani i stresnom okruženju. Visokokalorična hrana bogata šećerima, naročito fruktozom, postala je neizostavan deo ljudske ishrane, a unos fruktoze je u znatnom porastu poslednjih decenija.

Fruktoza je monosaharid sačinjen od šest ugljenikovih atoma. Iako ima istu hemijsku formulu kao glukoza, $C_6H_{12}O_6$, fruktoza poseduje keto-grupu na drugom ugljenikovom atomu dok se na prvom ugljenikovom atomu glukoze nalazi aldehidna-grupa (Slika 3). Upravo ova hemijska razlika povlači za sobom potpuno drugačiju sudbinu dva tako slična monosaharida.



Slika 3. Strukturna formula glukoze (levo) i fruktoze (desno).

Evolutivno posmatrano fruktoza je oduvek prisutna u ishrani čoveka. Najveći sadržaj fruktoze u prirodi ima voće, povrće i med, koji su bili jedini izvori fruktoze koje je čovek koristio. Međutim, u ishrani savremenog čoveka fruktoza je zastupljena u mnogo većoj količini nego što je to ranije bio slučaj. Veliki doprinos u tome imao je razvoj visoko fruktoznog kukuruznog sirupa (eng. *High fructose corn syrup*; HFCS),

kada je tehnologija prehrambene industrije omogućila konverziju glukoze u fruktozu. Jeftina proizvodnja HFCS-a i činjenica da je fruktoza slađa od glukoze i saharoze doprineli su da HFCS postane najčešće korišćen zaslađivač širom sveta (Dornas i sar., 2015). Smatra se da najveći doprinos u povećanom unosu fruktoze u savremenom društvu imaju napici zaslađeni fruktozom i HFCS-om (Popkin i sar., 2006; Samuel, 2011), čije se konzumiranje drastično povećalo u poslednje tri decenije (Lindqvist i sar., 2008) (Slika 4). Posebno alarmantnim smatraju se podaci da preko 30% dece uzrasta od 1-5 godina konzumira veštački zaslađene napitke (Fulgoni i Quann, 2012), kao i da adolescenti u Sjedinjenim Američkim Državama konzumiraju u proseku 72,8 g fruktoze dnevno i to najvećim delom upravo kroz zaslađene napitke (Vos i sar., 2008).



Slika 4. Prikaz unosa fruktoze u Sjedinjenim Američkim Državama u periodu 1966.-2006. godine. Preuzeto i modifikovano sa sajta Centra za ekonomska istraživanja Sjedinjenih Američkih Država: <https://www.ers.usda.gov/>

Povećan unos fruktoze u svakodnevnoj ishrani inicirao je brojna istraživanja o uticaju ovog šećera na metabolizam. Studije na animalnim modelima su pokazale da ishrana bogata fruktozom utiče na razvoj gojaznosti, hipertenzije, hiperlipidemije i insulinske rezistencije kod pacova, miševa, hrčaka i pasa (Dekker i sar., 2010; Jürgens i sar., 2005). Epidemiološki podaci pokazuju da povećana upotreba fruktoze korelira sa sve učestalijom pojavom visceralne gojaznosti, insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2,

hipertrigliceridemije, kardiovaskularnih bolesti i potpuno razvijenog metaboličkog sindroma kod dece i odraslih (Brown i sar., 2008; Perez-Pozo i sar., 2010; Pollock i sar., 2012). Treba istaći da se prilikom unosa zaslađenih napitaka unos energije reguliše manje precizno nego kada se unosi čvrsta hrana. Naime, pokazano je da konzumiranje zaslađenih pića dovodi do većeg povećanja telesne mase kod oba pola nego što je to slučaj kada se ista količina šećera unese u vidu čvrste hrane (DiMeglio i Mattes, 2000). Od izuzetnog značaja je činjenica da za razliku od glukoze, fruktoza ne dovodi do izlučivanja insulina nakon konzumiranja kao i da metabolizam fruktoze nije regulisan ovim hormonom (Dekker i sar., 2010), što može doprineti povećanom unosu hrane i razvoju gojaznosti. Ipak, kada se fruktoza unosi kroz voće i povrće, prateće komponente obezbeđuju porast insulina i pravovremenu regulaciju sitosti. Ovo je i razlog zbog koga unos fruktoze na ovaj način ne predstavlja faktor rizika za poremećaje u metabolizmu i razvoj metaboličkog sindroma. S druge strane, kada se fruktoza unosi putem tečnosti, kroz sokove i različite bezalkoholne napitke, informacije o lako unetoj velikoj količini energije se ne procesuiraju adekvatno i ne prenose do centara regulacije energetskog balansa i apetita.

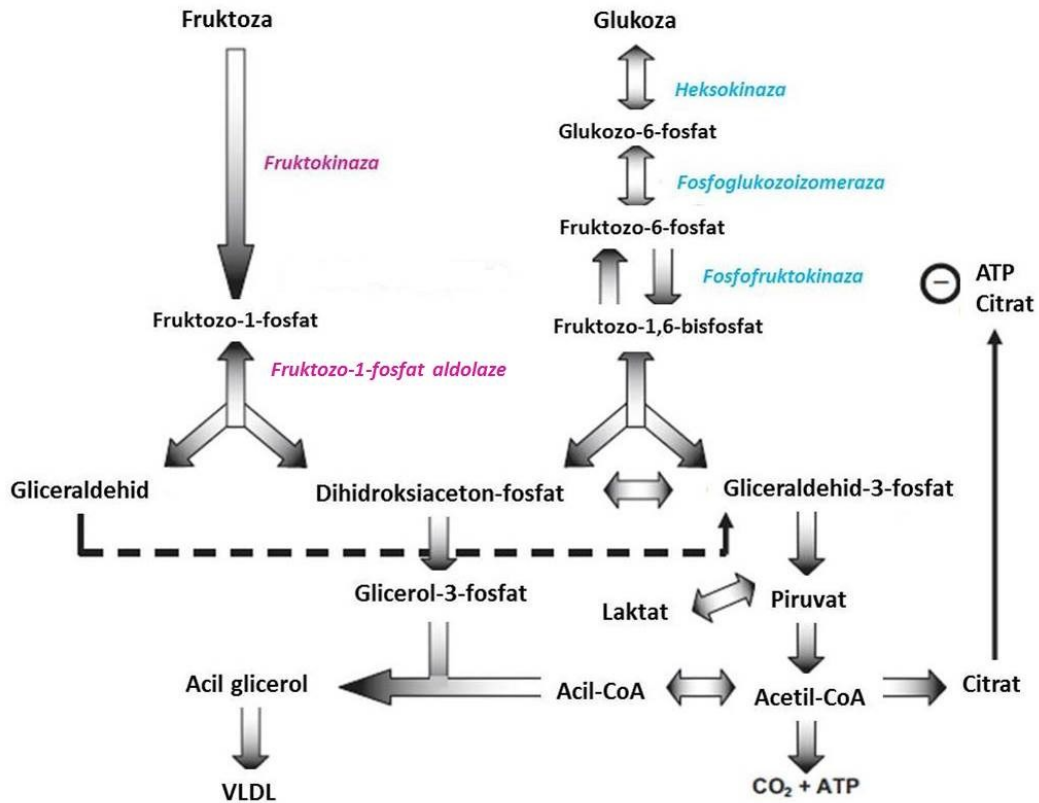
1.2.1 Metabolizam fruktoze – lipogeni potencijal

Razlog nastanka metaboličkih poremećaja usled preterane konzumacije fruktoze mogao bi delom da leži i u načinu na koji se ona metaboliše. Naime, metabolizam fruktoze se razlikuje od metabolizma glukoze počevši od same apsorpcije. Glukoza se u ćelije unosi pomoću više transportera (GLUT) koji se razlikuju po svojoj kinetici i distribuciji u različitim tipovima ćelija a njihova regulacija čini važan vid kontrole nivoa glukoze u krvi, proces u kome insulin ostvaruje značajnu ulogu. Nasuprot glukozi, fruktoza se apsorbuje pomoću specifičnog transportera GLUT5 koji nije regulisan insulinom ni energetskim statusom u ćeliji. Dodatno, nivo ekspresije GLUT5 na ćelijama pankreasa je veoma nizak, gotovo zanemarljiv, te se informacija o unetoj fruktozi ne detektuje u ovom organu što je i najverovatniji razlog nedostatka efekata fruktoze na sekreciju insulina (Aydin i sar., 2014). Fruktoza se alternativno može transportovati i preko GLUT2, bidirekcionog transportera niskog afiniteta, koji se smatra glavnim transporterom za unos fruktoze u ćelije jetre. Dva pomenuta

transportera dovoljna su za distribuiranje fruktoze u organizmu (Douard i Ferraris, 2008).

Fruktoza iz krvi najvećim delom biva preuzeta od strane ćelija jetre, gde se razgrađuje u procesu glikolize ali na nešto drugačiji način od glukoze (**Slika 5**). Naime, fruktoza se u glikolizu uključuje nekoliko koraka nishodno nego što to čini glukoza. Prvi enzim glikolize, heksokinaza poseduje i do 20 puta manji afinitet za fruktozu u odnosu na glukozu (Voet i Voet, 2011). S obzirom da u jetri postoji visok nivo glukoze i da nivo enzima heksokinaze nije visok, fruktoza se ne može uključiti u glikolizu konverzijom u glukozo-6-fosfat. Stoga, kada se nađe u jetri, ona prvo postaje supstrat enzimu fruktokinazi koji je fosforiliše do fruktozo-1-fosfata. Ova forma fruktoze se pomoću enzima fruktozo-1-fosfat aldolaze prevodi u gliceraldehid i dihidroksiaceton fosfat. Dihidroksiaceton fosfat se izomerizacijom može prevesti u gliceraldehid-3-fosfat dok će sam gliceraldehid do te tačke doći fosforilacijom (**Slika 5**). Enzimi fruktokinaza i fruktozo-1-fosfat aldolaza kao supstrat koriste isključivo fruktozu odnosno fruktozo-1-fosfat i njihova aktivnost nije regulisana ni insulinom ni energetske statusom u ćeliji. Stoga, ključni aspekt metabolizma fruktoze u jetri jeste što ona zaobilazi regulaciju na nivou heksokinaze i fosfofruktokinaze, te prilikom povećanog unosa fruktoze, značajan deo molekula nastavlja da obezbeđuje intermedijere glikolize distalno od mesta delovanja ovih enzima (Voet i Voet, 2011). Kao rezultat najveći deo fruktoze se brzo konvertuje u gliceraldehid i dihidroksiaceton fosfat u ćelijama jetre čime se obezbeđuju supstrati za sintezu masnih kiselina i triglicerida nezavisno od energetske statusa. Nastali trigliceridi se u ćelijama jetre pakuju u VLDL (eng. *Very low-density lipoprotein*; VLDL) partikule koje se oslobađaju u krvotok. Zaista, istraživanja ukazuju da ishrana obogaćena fruktozom remeti lipidnu homeostazu. Tako, dugotrajno konzumiranje fruktoze povećava nivo triglicerida u cirkulaciji, povećava ektopično nakupljanje masti u jetri i mišićima (Le i sar., 2009) i doprinosi steatozi jetre kod muškaraca (Lê i sar., 2006). Čak i nakon akutnog konzumiranja tečnosti zaslađene fruktozom, žene optimalne telesne mase imaju povećan nivo triglicerida u krvi u odnosu na izokalorijski unet napitak zaslađen glukozom (Teff i sar., 2004). Genetička inhibicija fruktokinaze kod miševa sprečava nastanak poremećaja metabolizma i razvoj metaboličkog sindroma što govori o doprinosu koji specifičan način metabolizma fruktoze ima u formiranju posledica njenog preteranog unosa (Ishimoto i sar., 2012).

Stoga, povećan unos fruktoze može dovesti do povećanja nivoa triglicerida u cirkulaciji, njihove akumulacije u masnom tkivu, čime se uzrokuje gojaznost, ali i ektopičnog nakupljanja masti koje dovodi do masne jetre (Rutledge i Adeli, 2007). Upravo zbog ove osobine fruktoza se naziva i lipogenim šećerom i njen uticaj na razvoj metaboličkih poremećaja zauzima sve veću pažnju naučne javnosti.



Slika 5. Uporedni prikaz puteva razgradnje glukoze i fruktoze. Razgradnja fruktoze zaobilazi ključne kontrolne tačke glikolitičkog puta, enzime heksokinazu i fosfofruktokinazu koji su regulisani ATP-om i citratom, tako da se razgranja glukoze uskladuje sa energetske statusom ćelije. Kako se fruktoza u glikolizu uključuje nishodno od mesta delovanja ovih enzima, razgradnja fruktoze nastavlja da obezbeđuje intermedijere za sintezu masnih kiselina i triglicerida nezavisno od energetske potreba. Preuzeto i modifikovano iz (Rutledge i Adeli, 2007)

1.3 Stres

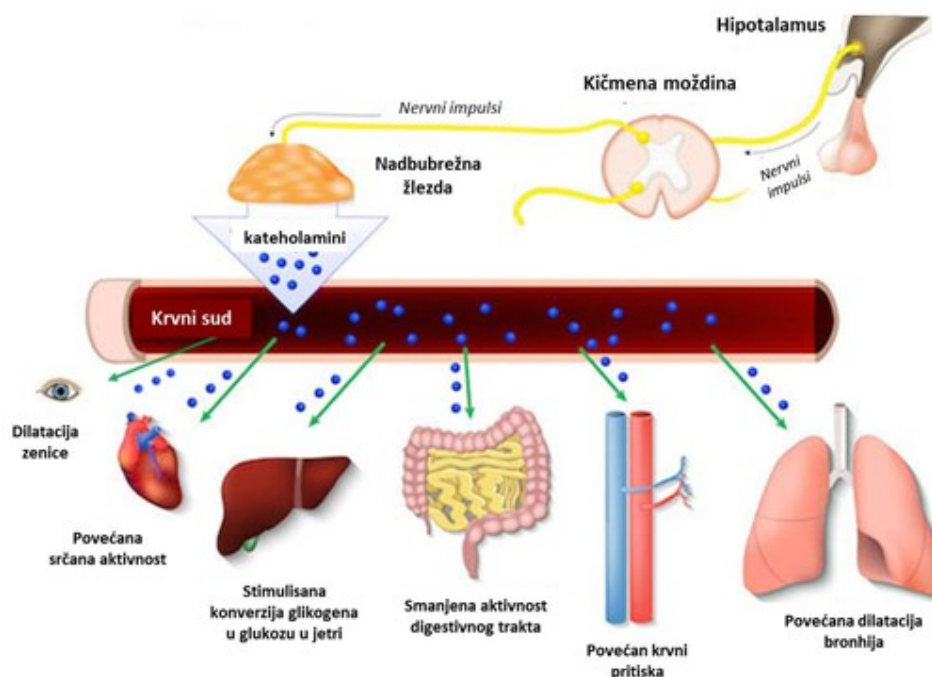
Izloženost stresu postala je svakodnevnica savremenog čoveka. Istovremeno, u savremenom društvu se povećala incidenca gojaznosti, hipertenzije, dijabetesa tipa 2, autoimunih bolesti, alergija kao i poremećaja poput anksioznosti, insomnije, depresije (Chrousos, 2009). Upravo se iz ovog razloga javila potreba da se ispita da li i na koji način stres doprinosi pojavi i razvoju bolesti i metaboličkih poremećaja među kojima se nalazi i metabolički sindrom.

Vitalni fiziološki sistemi u telu su evolutivno usmereni ka očuvanju homeostaze. Međutim, dinamička ravnoteža koja karakteriše homeostazu se nalazi pod stalnim pritiskom unutrašnjih i spoljašnjih uticaja koji se jednim imenom označavaju kao stresori. Stres se stoga može definisati kao stanje ugrožene homeostaze ili nesklada izazvanog fizičkim, psihološkim, infektivnim ili sredinskim faktorima (Kyrou i sar., 2006). Stresori se po svojoj prirodi dele na: fizičke (trauma, operacija, intenzivna hladnoća ili vrućina), hemijske (smanjeno snabdevanje kiseonikom, poremećena kiselo-bazna ravnoteža), fiziološke (prejako vežbanje, hemoragični šok, intezivan bol), psihičke ili emotivne (strah, tuga, anksioznost) i socijalne (lični konflikti, promene stila života) (Torres i Nowson, 2007). Po dužini trajanja stresori mogu biti kratkotrajni (akutni) ili se mogu javljati svakodnevno (hronični).

Svi stresori, nezavisno od svoje prirode, pokreću opšti odgovor organizma na stres (Selye, 1998) Prisustvo i delovanje stresora se registruje u perifernim tkivima i organima pogođenim stresorom kao i u više moždanih centara poput moždanog stabla, hipokampusu, hipotalamusu, amigdale i prefrontalnog koretaksa. Glavno mesto integracije svih ovih signala i formiranja odgovora organizma na stres lokalizovano je u hipotalamusu. Kao rezultat aktivacije odgovora na stres pokreću se brojne fizičke, hemijske i promene u ponašanju, koje se dešavaju sa ciljem da se ponovo uspostavi homeostaza i poveća šansa za preživljavanjem. Adaptacije u ponašanju su usmerene tako da obezbede povećanje kognitivne sposobnosti, koncentraciju, budnost i oprez, dok se inhibiraju vegetativne funkcije i ponašanje vezano njih, poput reprodukcije i potrage za hranom. Fizičke adaptacije se odigravaju u funkciji obezbeđivanja dovoljno energije za borbu u stresnoj situaciji, poboljšanja procesa zarastanja rana i intenziviranja

detoksikacije sa ciljem brzog uklanjanja toksičnih supstrata i metaboličkih međuproizvoda nastalih tokom izlaganja stresu (Ulrich-Lai i Herman, 2009).

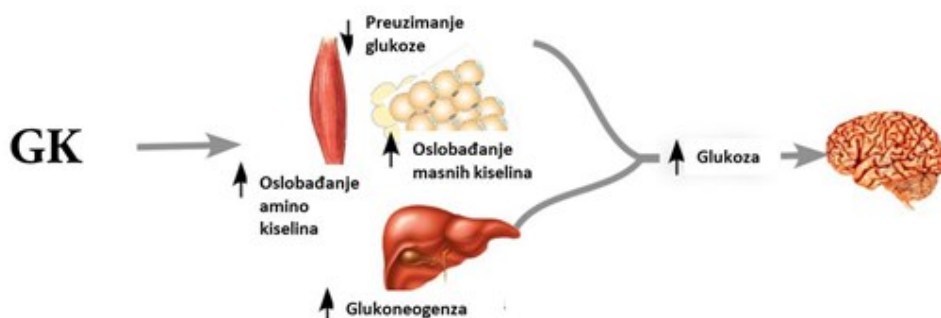
Smatra se da su za prve promene koje se uočavaju prilikom izlaganja stresoru pretežno zaslužni kateholamini, krajnji efektori autonomne komponente odgovora na stres koju čini hipotalamusno-simpatičko-adrenomedularna osa (Carrasco i Van De Kar, 2003) (Slika 6).



Slika 6. Uticaj kateholamina na funkcije tkiva i organa u odgovoru organizma na stres. Prisustvo stresora aktivira hipotalmusno-simpatičko-adrenomedularnu osu koja za rezultat ima sekreciju kateholamina. Putem cirkulacije kateholamini dospevaju do ciljnih tkiva modulišući njihove funkcije u cilju povećavanje verovatnoće preživljavanja i adaptiranja na stresne uslove. Preuzeto i modifikovano sa: <https://www.linkedin.com/pulse/stress-what-mark-shields-ceo-life-practice-group>.

Neuroendokrinu komponentu odgovora na stres čini hipotalamusno-hipofizno-adrenokortikalna osa (HHA), koja se završava sintezom i sekrecijom glukokortikoidnih hormona. Iako se efekti ovih hormona jednim delom preklapaju sa efektima kateholamina, glukokortikoidi ostvaruju značajniju ulogu u redistribuciji energije u organizmu tokom odgovora na stres. Naime, glukokortikoidi pospešuju porast nivoa glukoze u krvi povećavajući na taj način izvor energije za centralni nervni sistem (CNS) i vitalne organe koji se u stresnim situacijama nalaze pod posebnim opterećenjem. To postižu stimulacijom sinteze glukoze u jetri uz istovremenu

inhibiciju njenog preuzimanja i deponovanja u jetri, masnom tkivu i mišićima. Energija se obezbeđuje i povećanjem razgradnje masti u masnom tkivu (Macfarlane i sar., 2008) (iako u masnom tkivu ostvaruju i lipogenu i adipogenu ulogu koja će biti detaljnije opisana u narednim poglavljima) i degradacijom proteina u više različitih tkiva (Burt i sar., 2007), čime se obezbeđuju dodatni supstrati za sintezu glukoze (**Slika 7**).



Slika 7. Uticaj glukokortikoida na redistribuciju energije tokom izlaganja stresu. Povećan nivo glukokortikoida u stresnim uslovima stimuliše glukoneogenezu u jetri, lipolizu u masnom tkivu i razgradnju proteina u mišićima. Dodatno, glukokortikoidi sprečavaju preuzimanja glukoze od strane jetre, masnog tkiva i mišića. Svi pomenuti efekti za posledicu imaju povećanje nivoa glukoze u cirkulaciji povećavajući na taj način izvor energije za centralni nervni sistem. GK-glukokortikoidi. Preuzeto i modifikovano iz (R. Patel i sar., 2014).

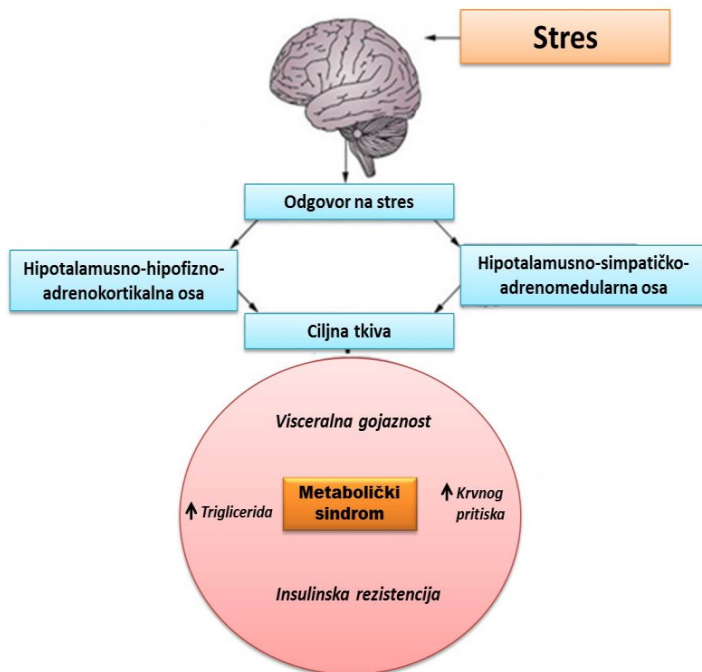
Paralelno sa prethodnim, glukokortikoidi i komponente aktivirane HHA ose, negativno regulišu tiroidnu osu, gonadnalnu osu i osu hormona rasta, tako inhibirajući energetske procese koje ove ose kontrolišu (Kyrou i sar., 2006).

Iz svega prethodno navedenog jasno je da odgovor na stres dovodi do velikih promena u organizmu. Međutim, te promene imaju protektivno dejstvo samo ukoliko deluju u ograničenom vremenskom periodu tokom trajanja stresne situacije. Veoma važna uloga glukokortikoida je da oni omogućavaju i oporavak organizma nakon delovanja trenutnog stresora kao i pripremu organizma za borbu sa narednim stresorima.

Formiranje adekvatnog i dobro regulisanog odgovora na stres koji omogućava borbu organizma sa trenutnim i budućim stresorima je od izuzetne važnosti za održavanje homeostaze. Promene u sposobnosti organizma da adekvatno odgovori na dejstvo stresora, poput pojačanog ili produženog odgovora, mogu prouzrokovati pojavu mnogih poremećaja i bolesti.

1.3.1 Stres i metabolički sindrom

Kako je hronični stres prepoznat kao sveprisutna karakteristika savremenog života, sve je više studija koje ukazuju na vezu hroničnog stresa sa metaboličkim sindromom (Kyrou i sar., 2006) (**Slika 8**). Pa tako, prisustvo i svakodnevno izlaganje psihosocijalnim stresovima je povezano sa nastankom i razvojem metaboličkog sindroma (Rosmond, 2005). Radnici koji su svakodnevno tokom posla izloženi stresu imaju dvostruko veću verovatnoću za razvoj metaboličkog sindroma u odnosu na ljude koji posao obavljaju bez stresa (Chandola i sar., 2006). Takođe, prisustvo stresa i stresnih situacija povećava rizik od nastanka pojedinačnih poremećaja koji se javljaju u okviru metaboličkog sindroma. Naime, studije ukazuju da hronična izloženost stresu može dovesti do razvoja hipertenzije kod ljudi (Spruill, 2010) i pacova (Henry i sar., 1993). Poznato je da organizam kao odgovor na akutni stres ubrzava srčani ritam i povećava krvni pritisak. Međutim, hronično izlaganje stresu se povezuje sa razvojem hipertenzije koja se najverovatnije javlja kao posledica učestalih povećanja krvnog pritiska u kombinaciji sa smanjenom kontrolom vraćanja pritiska na fiziološki nivo (Spruill, 2010). Posledice hipertenzije doprinose razvoju bolesti kardiovaskularnog sistema a kada se one jave u kombinaciji sa ostalim parametrima metaboličkog sindroma incidenca smrtnosti od srčanih oboljenja se značajno uvećava (Rosmond, 2005).



Slika 8. Šemastki prikaz uticaja stresa na razvoj metaboličkog sindroma. Stres pokreće dve ključne ose odgovora organizma na stres koje za rezultat imaju sekreciju glukokortikoida i kateholamina koji ostvaruju svoja dejstva na gotovo sve organe. Međutim, ukoliko je dejstvo stresa hronično, produžena aktivnost osa doprinosi razvoju karakteristika metaboličkog sindroma. Preuzeto i modifikovano iz (Vaccarino i Bremner, 2005)

Kliničke studije ukazuju na postojanje veze između hroničnog stresa i visceralne gojaznosti (Dallman i sar., 2003; Karagiannides i sar., 2014). Meta analiza longitudinalnih studija o efektima stresa ističe da stres kojem su ljudi svakodnevno izloženi na poslu ima uticaja na povećanje adipoznosti (Wardle i sar., 2011). Veoma često, osobe koje su doživele stresne događaje karakteriše viši BMI (Morris i sar., 2014), a promene u BMI vrednosti se mogu predvideti i praćenjem psihosocijalnih stresora sa kojima se ljudi bore (Nyberg i sar., 2012). Međutim, uticaj stresa na telesnu masu nije tako jednostavan i jednoznačan. Studije ukazuju da neki ljudi u prisustvu svakodnevnog stresa dobijaju dok drugi gube na masi (Dallman i sar., 2003). Analiza promena u telesnoj masi kod studenata pokazala je da je hronični stres kojem su studenti izloženi tokom prve godine studija povezan sa povećanim rizikom kako za povećanjem tako i za smanjenjem telesne mase, naročito među ženskom populacijom (Serlachius i sar., 2007). Slična dihotomija u efektima stresa na telesnu masu detektovana je i u široj populaciji naročito nakon izlaganja stresorima koji se vezuju za tip posla, poslovne zahteve i socijalno okruženje na poslu (Kivimäki i sar., 2006). Takođe, različiti protokoli stresa primenjeni na eksperimentalnim životinjama dovode do različitih metaboličkih fenotipova, pri čemu neki dovode do povećanja (Karagiannides i sar., 2014; Shively i

sar., 2009) a neki do smanjenja telesne mase (Matsuura i sar., 2015). Stoga, odnos između stresa i gojaznosti ostaje nedovoljno razjašnjen.

Različitim ishodima hroničnog stresa na telesnu masu mogu doprineti razlike u regulaciji unosa hrane. Naime, poznato je da stres može značajno uticati na regulaciju apetita. Komponente odgovora organizma na stres su usko uključene u centralne nervne mreže koje regulišu unos hrane, te ostvaruju direktne ili indirektne efekte na centre za apetit i energetske balans u hipotalamusu. Pod uticajem akutnog stresa, poput pretnje za ličnu sigurnost ili život, aktivira se „bori se ili beži” odgovor na stres koji inhibira sve vegetativne funkcije pa i osećaj gladi i apetit. Sa druge strane, hroničan stres indukuje složeniji odgovor, te neke osobe izložene hroničnom stresu izbegavaju hranu dok druge počinju da unose veće količine hrane naročito one sa povećanim sadržajem energije (Oliver i sar., 2000; Schiffman i sar., 2000). Ljudi pod stresom često posežu za takozvanom „utešnom“ hranom, koja je posebno prijatnog ukusa jer najčešće obiluje ugljenim hidratima i mastima (Fachin i sar., 2008). Pomenuti obrazac ponašanja primećen je i kod životinja kojima se tokom izlaganja stresu ponudi ovaj tip hrane (Kuo i sar., 2007).

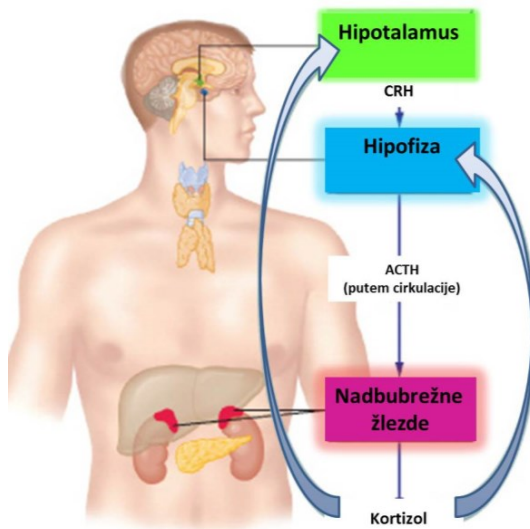
Studije ukazuju da stres može dovesti i do promena u lipidnom profilu, te osobe koje su doživele velike stresne događaje poput zemljotresa, iznenadnog gubitka posla i finansijskih prihoda pokazuju povećan nivo triglicerida i holesterola u krvi (Kelishadi, 2012). Izloženost hroničnom stresu uvećava rizik za povećanje holesterola i razvoj dislipidemije kod muškaraca nezavisno od zdravstvenog statusa i činilaca poput gojaznosti, slabe fizičke aktivnosti, pušenja i alkohola (Siegrist i sar., 1988, 1997). Povećan nivo holesterola u krvi pokazan je i kod hronično stresiranih žena koje rade u policiji u odnosu na ostatak ženske populacije (Yoo i Franke, 2011). Stoga, stres i nezavisno od razvoja gojaznosti može doprineti razvoju metaboličkih promena i komplikacija koje doprinose metaboličkom sindromu.

Mehanizam putem koga izlaganje stresu utiče na razvoj metaboličkih poremećaja nije u potpunosti razjašnjen. Kao što je predhodno opisano, delovanje stresora praćeno je aktiviranjem odgovora organizma na stres koji podrazumeva sekreciju glukokortikoida. Glukokortikoidi su i važni regulatori energetskog metabolizma i njihovom sekrecijom tokom stresnih situacija se obezbeđuje dovoljno energije za preživljavanje organizma, ubrzava oporavak i vraćanje u stanje homeostaze

(Sapolsky i sar., 2000). Stoga, glukokortikoidi predstavljaju veoma značajnu vezu između regulacije energetskeg statusa i odgovora organizma na stres. Hronično izlaganje stresu dovodi se u vezu sa promenama u regulaciji sekrecije i aktivnosti glukokortikoidnih hormona, a kako pacijenti sa hroničnim povećanjem nivoa glukokortikoida pokazuju karakteristike metaboličkog sindroma, javila se potreba za ispitivanjem uloge glukokortikoida u razvoju metaboličkog sindroma.

1.4 Glukokortikoidni hormoni i metabolički sindrom

Glukokortikoidi predstavljaju klasu steroidnih hormona koje sintetišu i luče adrenalne žlezde. Ime su dobili po sposobnosti da promovišu konverziju proteina i lipida u glukozu, naročito tokom stresnih situacija (Gross i Cidlowski, 2008). Dva osnovna člana glukokortikoidne familije steroidnih hormona su aktivni kortizol i neaktivni kortizon kod ljudi, odnosno aktivni kortikosteron i neaktivni 11-dehidrokortikosteron kod pacova. Aktivne i neaktivne forme glukokortikoida nastaju u ćelijama *zona fasciculata* adrenalnih žlezda pod regulacijom HHA ose. Naime, hipotalamus, kao odgovor na stimuluse iz spoljašnje sredine i samog organizma, sintetiše kortikotropni oslobađajući hormon (eng. *Corticotropin-releasing hormone*; CRH), koji stimuliše sekreciju adrenokortikotropnog hormona (eng. *Adrenocorticotropic hormone*, ACTH) iz prednjeg režnja hipofize. Upravo ovaj hipofizni hormon ostvaruje direktnu pozitivnu regulaciju na adrenalne žlezde, stimulišući sintezu i oslobađanje glukokortikoida. Pod normalnim fiziološkim uslovima, HHA osa biva regulisana negativnom povratnom spregom, pri čemu svaki hormon u kaskadi inhibira sekreciju prethodnog (Slika 9).



Slika 9. Šematski prikaz HHA ose. U odgovoru na stimulse iz spoljašnje sredine i iz samog organizma hipotalamus sintetise i sekretuje CRH, koji stimuliše sekreciju ACTH iz prednjeg režnja hipofize. Upravo ovaj hipofizni hormon ostvaruje direktnu pozitivnu regulaciju na adrenalne žlezde, stimulišući sintezu i oslobađanje kortizola. HHA osa je regulisana negativnom povratnom spregom, pri čemu svaki hormon u kaskadi inhibira sekreciju prethodnog. HHA-hipotalamusno-hipofizno-adrenokortikalna osa; CRH- kortikotropni oslobađajući hormon; ACTH- adrenokortikotropni hormon. Preuzeto i modifikovano: <https://drsimonsayscience.org/tag/amphetamine>

Sintetisani i oslobođeni glukokortikoidi dospevaju u krv, gde se neaktivne forme najvećim delom transportuju u slobodnom obliku dok se aktivni glukokortikoidi vezuju za kortikosteroid-vezujuć globulin i delom za albumin (Dunn i sar., 1981). Sekrecija glukokortikoida pokazuje cirkadijalni obrazac, visoko konzervisan tokom evolucije sisara. Maksimum sekrecije aktivnih formi glukokortikoida ostvaruje se u ranim jutarnjim satima, što se dovodi u vezu sa procesom buđenja, dok se minimum javlja oko ponoći (Biddie i sar., 2012). Situacija je obrnuta kod životinja koje su aktivne noću, kao što je to slučaj sa pacovima, kod kojih se maksimum sekrecije glukokortikoida ostvaruje u ponoć, a minimum u jutarnjim časovima. Pulsatornost se smatra važnom osobinom signalnog puta glukokortikoida (Biddie i sar., 2012). Amplituda i frekvencija pulseva visoko su varijabilni, a studije na pacovima ukazuju i na postojanje polnih razlika (Atkinson i Waddell, 1997). Sekrecija neaktivnih formi, međutim, ne pokazuje značajniju povezanost sa cirkadijalnim ritmom (Atkinson i Waddell, 1997).

Degradacija glukokortikoida odvija se u jetri. Krajnji metaboliti, 5α - i 5β -tetrahidrokortizol i 5β -tetrahidrokortizon, odstranjuju se iz organizma putem mokraće i njihov nivo se može koristiti kao biološki marker metabolizma glukokortikoida (Wang, 2005).

1.4.1. Uloge glukokortikoida

Potreba za sintezom i sekrecijom glukokortikoida javlja se još u periodu fetalnog razvića. Glavna uloga glukokortikoida u tom periodu je da se obezbedi pravilan i blagovremeni prenatalni razvoj i sazrevanje organa poput pluća, srca, jetre, bubrega, (Drake i sar., 2007) kao i enzimatskih sistema koji će omogućiti opstanak van materice. Nakon pravilnog razvića, efekti glukokortikoida pretežno su usmereni na regulaciju metaboličkih procesa, imunog sistema i odgovora organizma na stres. Njihova sekrecija tokom stresnih situacija omogućava obezbeđivanje dovoljno energije za preživljavanje organizma, brz oporavak i vraćanje u stanje homeostaze, kao i pripremu za odgovor na naredne stresore i izazove pa je drugi naziv za glukokortikoide i „hormoni stresa”. Delujući na centre CNS-a koji regulišu unos hrane i potrošnju energije, glukokortikoidi doprinose održavanju energetske homeostaze u organizmu (Sapolsky i sar., 2000). Kao što je već prethodno istaknuto glukokortikoidi ostvaruju uticaj i na nivou perifernih organa, deluju na jetru, pankreas, masno tkivo i mišiće, regulišući nivo dostupnih nutrijenata prevashodno glukoze. Naime, glukokortikoidi stimulišu proces *de novo* sinteze glukoze (glukoneogenezu) i proces razgradnje glikogena (glikogenolizu) u jetri pozitivnom regulacijom ekspresije gena koji kodiraju enzime ovih metaboličkih puteva. Stoga, u uslovima energetskog deficita ili velikih energetskih zahteva poput izlaganja stresu glukokortikoidi stimulišu povećanje nivoa glukoze u krvi. Istovremeno, ovi hormoni sprečavaju preuzimanje glukoze i deponovanje energije u masnom tkivu. To se postiže zahvaljujući inhibitornoj ulozi koju glukokortikoidi ostvaruju na sintezu insulina iz β ćelija pankreasa (Lambillotte i sar., 1997). Dodatno, tretman glukokortikoidima negativno reguliše nivo receptora za insulin i nivo nishodnih komponenti signalnog puta insulina u ćelijama masnog tkiva, što kao posledicu ima smanjenje nivoa glukoznog transportera na površini ovih ćelija i smanjeno preuzimanje glukoze (Caperuto i sar., 2006). Stoga, kao posledica delovanja glukokortikoida razvija se umanjena tolerancija na glukozu i hiperglikemija, koje mogu postati perzistentne i doprineti razvoju metaboličkog sindroma u slučaju produženog izlaganja glukokortikoidima i smanjene kontrole njihovih efekata. Efekti koje glukokortikoidi ostvaruju u masnom tkivu veoma su kompleksni te se sve više naučne pažnje poklanja ispitivanju doprinosa koji

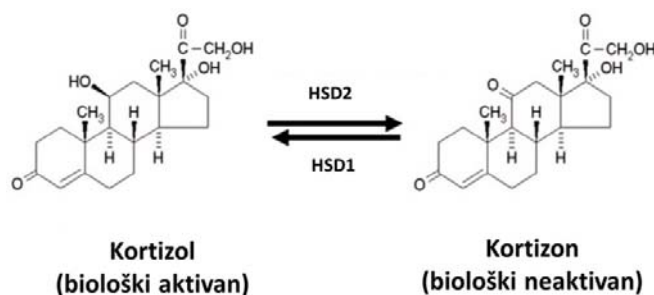
glukokortikoidi u masnom tkivu mogu imati na nastanak metaboličkih poremećaja, prevashodno metaboličkog sindroma.

S obzirom na širok spektar procesa koji regulišu glukokortikoidi, narušavanje funkcije ovog hormonskog sistema može predstavljati veliku pretnju za organizam. Istraživanja ukazuju da povećana koncentracija glukokortikoida u prenatalnom periodu, nezavisno od etiologije, može da uslovi razvijanje hipertenzije, hiperglikemije i hiperinsulinemije u adultnom priodu (Drake i sar., 2007).

Poremećaj izazvan dugotrajnim izlaganjem organizma visokim koncentracijama kortizola označava se kao Kušingov sindrom. Klinička slika osoba sa ovim poremećajem uključuje smanjenu toleranciju na glukozu, hipertenziju, smanjenu mišićnu masu, povećan nivo triglicerida, izraženu redistribucija masnog tkiva u smislu akumulacije masnih naslaga u centralnom (visceralnom) regionu i smanjenja subkutanog masnog tkiva (Lönn i sar., 1994). Pojava visceralne gojaznosti zajedno sa hipertenzijom, hipetrigliceridemijom i smanjenom tolerancijom na glukozu, ukazuje na velike sličnosti između kliničkih karakteristika Kušinogovog i metaboličkog sindroma. Zaista, postoje studije koje ukazuju da bi suptilne promene u glukokortikoidnoj signalizaciji mogle biti važan činilac u patogenezi metaboličkog sindroma i metaboličkih poremećaja koji ga čine. Istraživanja su pokazala da je nivo kortizola povećan kod starijih osoba koje imaju jednu ili više karakteristika metaboličkog sindroma kao i da postoji korelacija između ukupnih metabolita glukokortikoida u urinu i broja karakteristika metaboličkog sindroma kod ovih pacijenata (Andrew i sar., 2002). Takođe, studije na široj populaciji su pokazale vezu između povećane aktivnosti glukokortikoida i hipertenzije, hiperglikemije i insulinske rezistencije (Filipovský i sar., 1996; Walker i sar., 1998). Međutim, gojazne osobe najčešće nemaju povećan nivo glukokortikoida u cirkulaciji, već pokazuju lokalnu hiperkortizolemiju u metabolički aktivnim organima poput masnog tkiva, jetre i skletnih mišića (Salehi i sar., 2005; Seckl i Walker, 2001). Za ovu pojavu je zaslužan prereceptorski metabolizam glukokortikoida o čijim karakteristikama i ulogama u metaboličkim poremećajim će biti reči u nastavku.

1.4.2. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

Važan aspekt regulacije glukokortikoida odvija se na nivou prereceptorskog metabolizma koji predstavlja unutarćelijsku aktivaciju glukokortikoidnih hormona regulisanu aktivnošću dva mikrozomska enzima označena kao 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1 (HSD1) i 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2 (HSD2) (Slika 10.). Enzimi su produkti odvojenih gena a njihova ekspresija je regulisana na tkivno-specifičan način (Walker i Stewart, 2003). Enzim HSD1 redukuje neaktivnu formu glukokortikoida u aktivnu. Kofaktor ovog enzima je NADPH (eng. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), kojeg generiše heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (eng. *Hexose-6-phosphate dehydrogenase*, H6PDH), enzim koji je fizički spregnut sa HSD1, na unutrašnjoj strani endoplazmatičnog retikuluma (Banhegyi i sar., 2004). Naime, molekul NADPH nastaje od NADP⁺ u reakciji u kojoj se glukozo-6-fosfat, transportovan iz citoplazme u endoplazmatični retikulum, prevodi u 6-fosfoglukonolakton. Na ovaj način, zahvaljujući aktivnosti H6PDH, enzim HSD1 ima na raspolaganju NADPH u neposrednoj blizini delovanja, što inače ne bi bilo moguće imajući u vidu da je membrana endoplazmatičnog retikuluma nepropustljiva za piridinske nukleotide (Dallman i sar., 2004).



Slika 10. Reverzibilna konverzija kortizola i kortizona posredstvom enzima HSD1 i HSD2. HSD1-11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1; HSD2-11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2; Preuzeto i modifikovano iz (Hu i sar., 2013).

Enzim HSD1 je eksprimiran kako kod ljudi (Ricketts i sar., 1998), tako i kod pacova (Lakshmi i sar., 1991) u velikom broju tkiva i organa uključujući jetru, masno tkivo, skeletne mišiće, srce i glatke mišiće krvnih sudova, prednji režanj hipofize,

hipotalamus, hipokampus i koru nadbubrežne žlezde (Bujalska i sar., 1997; Lakshmi i sar., 1991; Shimojo i sar., 1996; Tannin i sar., 1991). Široka rasprostranjenost enzima HSD1 u metabolički važnim tkivima i organima ukazuje na značajno prisustvo aktivnih glukokortikoida u centrima regulacije metabolizma.

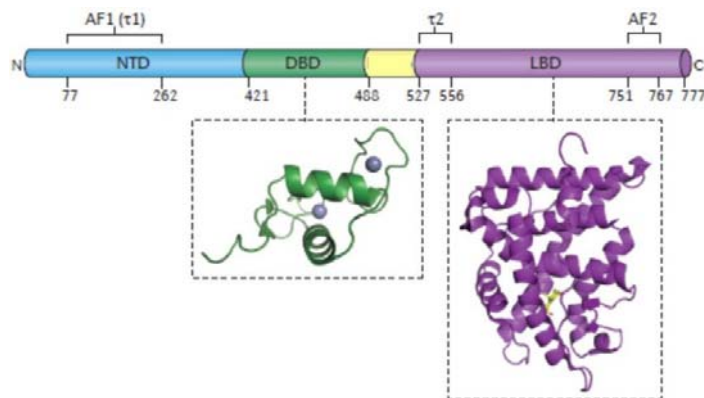
Nasuprot prethodnom, HSD2 omogućava odvijanje reakcije u suprotnom smeru, odnosno vrši konverziju glukokortikoida iz aktivnih u neaktivne forme uz pomoć NAD-a kao kofaktora. Glavna uloga ovog enzima je da spreči da se aktivna forma glukokortikoida nađe u neposrednoj blizini mineralokortikoidnog receptora, koji poseduje visoki afinitet prema hormonu. Iako se eksprimira u brojnim tkivima tokom fetalnog razvoja uključujući i placentu, kod odraslih jedinki enzim HSD2 je prisutan samo u tkivima poput bubrega, pljuvačnih žlezda i debelog creva, u kojima mineralokortikoidi ostvaruju svoje efekte u regulaciji nivoa soli u organizmu i kontroli krvnog pritiska (Seckl i sar., 2004). Čelije poseduju mehanizme regulacije ekspresije gena koji utiču na selektivnu aktivaciju promotora gena za HSD1 ili 2, čime se postiže fina modulacija uticaja koji glukokortikoidi ostvaruju na ćeliju (Gross i Cidlowski, 2008).

Promene u nivou i aktivnosti enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida određuju nivo aktivnih hormona unutar tkiva te se uticaj koji glukokortikoidi ostvaruju može povećati ili smanjiti u samom tkivu nezavisno od nivoa u cirkulaciji. Jedan od mehanizama kojima glukokortikoidi mogu doprineti razvoju patofizioloških promena je unutarćelijsko povećanje njihove koncentracije usled izmenjene regulacija nivoa ovih enzima. Zaista, istraživanja metaboličkih poremećaja pokazuju da gojazne osobe imaju povećan nivo HSD1 u masnom tkivu (Desbriere i sar., 2006), kao i da se aktivnost enzima u ovom tkivu nalazi u pozitivnoj korelaciji sa vrednosti BMI kod žena (Rask i sar., 2002). Analizirajući metabolizam jednojajčanih blizanaca Kannisto i sar., (2004) su pokazali da se razlike u BMI u okviru para nalaze u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom HSD1 u masnom tkivu (Kannisto i sar., 2004). Dodatno, transgeni miševi koji selektivno ekspimiraju HSD1 u masnom tkivu u meri koja je detektovana kod gojaznih osoba, razvijaju dislipidemiju, insulinsku rezistenciju i visceralnu gojaznost, glavne odlike metaboličkog sindroma (Masuzaki i sar., 2001). Nasuprot tome, miševi koji ne poseduju HSD1 pokazuju smanjenu akumulaciju visceralnog masnog tkiva nakon ishrane bogate mastima i ne razvijaju gojaznost ni

dijabetes, bez obzira na povećan kalorijski unos u odnosu na genetički neizmenjene miševе na istoj ishrani (Morton i sar., 2004). Dodatno, tačkasti polimorfizmi u sekvenci gena koji nosi informaciju za HSD1 povezani su sa stepenom progresije insulinske rezistencije i pojavom hipertenzije i dijabetesa čak i nezavisno od razvoja gojaznosti (Nair i sar., 2004). Stoga, izmenjena regulacija ekspresije i aktivnosti HSD1, enzima prereseptorskog metabolizma glukokortikoida, mogla bi biti značajan činilac u razvoju metaboličkog sindroma.

1.4.3. Glukokortikoidni receptor

Glukokortikoidni hormoni ostvaruju svoje efekte posredstvom glukokortikoidnog receptora (GR) koji pripada superfamiliji nuklearnih receptora regulisanih ligandom (Evans, 1988). Kao i drugi članovi familije nuklearnih receptora i GR poseduje modularnu strukturu (Evans, 1988), u kojoj se razlikuju tri različita funkcionalna domena: domen za vezivanje liganda (eng. *Ligand binding domain*; LBD), domen za vezivanje DNK (eng. *DNA binding domain*; DBD) i N-terminalni domen (NTD) (Slika 11).



Slika 11. Struktura glukokortikoidnog receptora. Preuzeto i modifikovano iz (Weikum i sar., 2017)

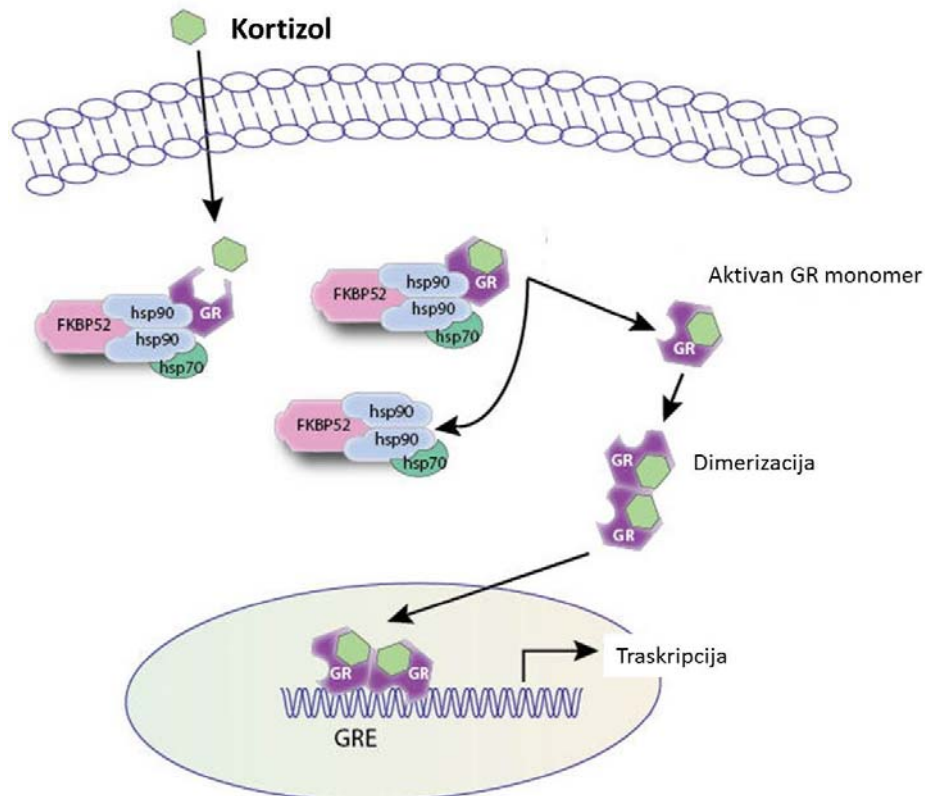
C-terminalni domen receptora, LBD, sadrži dva subdomena τ2 i AF-2 (eng. *Activation function domain-2*), čija je aktivacija strogo zavisna od prisustva liganda te je ključno mesto GR-a za prepoznavanje i vezivanje steroidnih hormona (Evans, 1988). Pored toga, ovaj region je odgovoran za povezivanje sa šaperonima, poput Hsp90 (eng.

Heat shock protein 90), tokom procesa aktivacije receptora, učestvuje u homodimerizaciji receptora a poseduje i sekvencu za jedarnu lokalizaciju, koja obezbeđuje translokaciju receptora u jedro (Zhou i Cidlowski, 2005).

Interakcija GR-a sa DNK se ostvaruje posredstvom DBD-a, visoko konzervisanog domena koji čini centralni deo polipeptidnog lanca receptora. U ovom domenu izdvajaju se dve strukture označene kao „cinkani prsti” pomoću kojih receptor ostvaruje interakciju sa molekulom DNK (Härd i sar., 1990; Luisi i sar., 1991). U okviru DBD-a nalazi se i dodatna sekvenca za jedarnu lokalizaciju koja uz već pomenutu u LBD-u obezbeđuje da receptor, nakon aktivacije napusti citoplazmu i uđe u jedro, kao i signal za napuštanje jedra, zahvaljujući kome receptor ima mogućnost povratka u citoplazmu (Heitzer i sar., 2007; Zhou i Cidlowski, 2005).

U okviru NTD-a smešten je region označen kao transaktivacioni domen nezavisan od liganda; $\tau 1$ ili AF-1 (eng. *Activation function domain-1*). Još pre više od dve decenije primećeno je, a potom i potvrđeno, da transkripciona aktivnost receptora zavisi od NTD-a, tačnije od njegovog AF-1 regiona (Dieken i Miesfeld, 1992; O'Malley, 1990). Naime, AF-1 subdomen ima nestrukturiranu prirodu i tek kada se veže za određeni molekul sa kojim GR stupa u interakciju dolazi do uspostavljanja stabilnije konformacije AF1 regiona koja predstavlja platformu za vezivanje koregulatora (Khan i sar., 2011). Stoga, uslovljeno savijanje AF-1 ključno je za sposobnost receptora da stupa u interakcije sa širokim spektrom proteina koji mogu da odrede krajnji efekat koji će se ostvariti na transkripciju ciljnih gena. Smatra se da je ova osobina receptora zaslužna za različite efekte koje on ostvaruje na ekspresiju velikog broja gena kao i za razlike u efektima koje ostvaruje u različitim tipovima ćelija.

Kada za GR nije vezan hormon on se predominantno nalazi u citoplazmi u sastavu dinamičnog šaperonskog multiproteinskog heterokompleksa koji konstantno prolazi kroz cikluse disocijacije i reasocijacije (Hu i sar., 1994; Picard i Yamamoto, 1987) (**Slika 12**).



Slika 12. Glukokortikoidni signalni put. Kada nije vezan za hormon, GR se nalazi u citoplazmi u multiproteinskom šaperonskom kompleksu. Po vezivanju hormona, sastav ovog kompleksa se menja i GR premešta iz citoplazme u jedro gde će ostvariti svoju ulogu transkripcionog regulatora. GR-glukokortikoidni receptor, GRE-eng. *Glucocorticoid-responsive elements*, Hsp-proteini toplotnog šoka, FKBP52-eng. *FK506 binding protein 52*. Preuzeto i modifikovano sa <http://jimlund.org/blog/?p=168>.

Šaperonski kompleks obezbeđuje pravilno savijanje receptora koje dovodi do njegovog sazrevanja u konformaciju koja vezuje hormon sa visokim afinitetom (Pratt i Toft, 1997). Naime, Hsp70 se uz pomoć nekoliko košaperona vezuje za hidrofobne delove novosintetisanog, nesavijenog receptora i dovodi do njegovog savijanja. Ključnu ulogu u sazrevanju receptora ima Hsp90 čije vezivanje za LBD dovodi do otvaranja hidrofobnog džepa receptora u koji se smešta hormon (Grenert i sar., 1999; Nemoto i sar., 1990). Zbog toga GR ima čak sto puta niži afinitet za vezivanje glukokortikoida ukoliko nije u kompleksu sa Hsp90 (Nemoto i sar., 1990). Pored otvaranja hidrofobnog džepa, Hsp90 vezuje odgovarajuće imunofiline što dovodi do konačnog sazrevanja GR-a koji ima visok afinitet za vezivanje glukokortikoida.

Receptor se aktivira vezivanjem hormona. Nakon vezivanja, hormon postaje integralni deo hidrofobnog jezgra receptora, a GR trpi kontinuirano savijanje LBD-a

praćeno hiperfosforilacijom (Bodwell i sar., 1993). Male promene konformacije hidrofobnog džepa izazvane vezivanjem hormona se prenose u ostale delove LBD-a što za posledicu ima disocijaciju nekih komponenti šaperonskog heterokompleksa (Sanchez i sar., 1987). Disocijacija Hsp90 dovodi do demaskiranja DBD-a i signala za dimerizaciju receptora u okviru njega (Schowalter i sar., 1991) kao i do demaskiranja sekvenci za jedarnu lokalizaciju (Picard i Yamamoto, 1987). Na ovaj način se GR po vezivanju hormona premešta iz citoplazme u jedro gde će ostvariti svoju ulogu transkripcionog regulatora.

U jedru GR ostvaruje ulogu transkripcionog regulatora vezivanjem za DNK sekvence koje se nalaze u okviru promotora gena čiju ekspresiju reguliše receptor kao i interakcijom sa drugim transkripcionim regulatorima (Chandler i sar., 1983; Strähle i sar., 1988).

Receptor se u formi homodimera vezuje za regulatorne sekvence DNK koje su označene kao GRE (eng. *Glucocorticoid-responsive elements*). Razlikuju se dve vrste GRE, pozitivne i negativne (nGRE), u zavisnosti od efekta koji receptor ostvaruje vezujući se za njih. Homodimer vezan za pozitivnu GRE sekvencu čini osnovu odnosno skelu za koju se vezuju koaktivatori koji olakšavaju regrutovanje medijatorskog kompleksa, opštih transkripcionih faktora i RNK polimeraze stimulišući tako transkripciju ciljnog gena. Pozitivne GRE se mogu naći i u okviru složenih promotora koji pored samih GRE poseduju i regulatorna mesta za koje se vezuju drugi transkripcioni regulatori (Cole i sar., 1995). Vezivanje GR-a za sekvence nGRE dovodi do strukturnih promena na površini receptora koje prepoznaju proteini sa ulogom korepresora koji regrutuju komplekse histon deacetilaza što uzrokuje kondenzovanje hromatina, čineći gen nedostupnim za transkripciju. Pored toga, u mnogim slučajevima, nGRE se preklapaju sa mestima vezivanja drugih transkripcionih regulatora. Tada, vezivanje receptora za nGRE, fizički onemogućava druge transkripcione regulatore da učine isto, te transkripcija gena izostaje. Postoje i složeni promotori u čijem se sastavu nalaze nGRE. U ovom slučaju interakcija koju GR ostvaruje sa drugim transkripcionim regulatorima vezanim za kompleksni promotor dovodi do inhibicije transkripcije gena (Heitzer i sar., 2007).

Pored opisanih mehanizama, GR stupa u protein-protein interakcije sa drugim transkripcionim regulatorima u jedru (Li i sar., 2003), čime najčešće ostvaruje negativnu

regulaciju ekspresije gena. Ovo je od posebnog značaja kada su u pitanju proinflamatorni transkripcioni regulatori kao što su NF- κ B (eng. *Nuclear factor κ B*) i AP-1 (eng. *Activator protein-1*), što predstavlja mehanizam kojim glukokortikoidi ostvaruju svoje antiinflamatorne efekte.

1.4.4. Efekti glukokortikoida u masnom tkivu

Sve je više podataka da glukokortikoidi utiču na gotovo sve aspekte masnog tkiva od diferencijacije ćelija masnog tkiva do metabolizma i endokrine funkcije. Smatra se da glukokortikoidi regulišu ekspresiju oko 20 % gena koji se eksprimiraju u adipocitima dok je od 8840 lokacija na genomu koje su identifikovane kao regioni vezivanja GR-a, veći deo specifičan za adipocite (Lee i sar., 2014).

1.4.4.1. Uloga glukokortikoida u adipogenezi

Proces diferencijacije adipocita od pekursorskih ćelija do potpuno zrelih adipocita prati veoma precizan redosled vremenski regulisanih događaja. Naime, prekursorske ćelije masnog tkiva se formiraju od mezenhimalnih matičnih ćelija nastalih iz mezodermalnog sloja embriona. Ove pluripotentne ćelije primaju vanćelijske signale koje ih usmeravaju ka preadipocitnoj ćelijskoj liniji. Adipogeneza je kontrolisana čvrsto regulisanom transkripcionom kaskadom, u kojoj transkripcioni regulatori aktiviraju ili inhibiraju ekspresiju jedni drugih. Kaskada događaja u adipogenezi se može podeliti na bar dva odvojena talasa transkripcionih regulatora neophodnih za ostvarivanje programa diferencijacije adipocita. Prvi talas podrazumeva aktivaciju ekspresije nekoliko regulatora rane faze adipogeneze poput C/EBP β / δ (eng. *CCAAT/enhancer binding protein β/δ*), KLF (eng. *Kruppel-like factor family*), CREB (eng. *cAMP-response element-binding protein*) i SREBP1c (eng. *Sterol regulatory element binding protein 1c*). Ovi transkripcioni regulatori potom iniciraju ekspresiju regulatora drugog talasa od kojih su najznačajniji C/EBP α i PPAR γ (eng. *Peroxisome proliferator activated receptor γ*) koji su zaslužni za aktiviranje gena koji će dovesti do sazrevanja adipocita. Mnogi od navedenih transkripcionih regulatora poput SREBP1c i PPAR γ , koji imaju važne funkcije u adipogenezi, ostvaruju i značajne efekte na regulaciju gena uključenih u lipidni metabolizam u adipocitima. Ipak, PPAR γ se smatra

glavnim molekulom u regulaciji adipogeneze budući da je jedini transkripcioni regulator bez koga ovaj proces ne može da se odigra i još uvek nije identifikovan molekul koji bi mogao da bude njegova funkcionalna zamena u ovom procesu (Lee i Ge, 2014).

Podaci ukazuju da su za potpunu diferencijaciju adipocita neophodni i glukokortikoidi. Naime, još 80-tih godina prošlog veka Champan i sar. (1985) su primetili da se adipogeneza odigrava brže i efikasnije u prisustvu ovih hormona. Pokazano je da tretman deksametazonom stimuliše kako morfološke tako i biohemijske promene adipocita u kulturi, povećavajući broj ćelija koje akumuliraju lipide kao i nivo transkripcije gena specifičnih za adipocite (Chapman i sar., 1985). Asada i sar., (2011) su pokazali da inhibicija aktivnosti GR- α , upotrebom antagonista RU486, kao i delecija gena za GR ili mutacija receptora tako da ne poseduje DBD, sprečavaju diferencijaciju humanih mezenhimskih ćelija i mišijih embrionalnih fibroblasta u zrele adipocite (Asada i sar., 2011). Efekti glukokortikoida na adipogenezu pokazani su i *in vivo* istraživanjima. Najbolji primer su pacijenti sa hroničnim povećanjem nivoa glukokortikoidnih hormona kod kojih je kao posledica stimulisana adipogeneza (Ferraù i Korbonits, 2015). Dodatno, hronično izlaganje pacova glukokortikoidima stimuliše proces diferencijacije preadipocita u zrele adipocite naročito u visceralnom masnom tkivu (Campbell i sar., 2011). Danas je poznato da i kortizol i deksametazon stimulišu diferencijaciju adipocita po dozno-zavisnom obrascu. Zbog svega navedenog deksametazon se nalazi u širokoj upotrebi kao neophodna komponenta koktela za *in vitro* adipogenezu.

1.4.4.2. Lipogeni i lipolitički efekti glukokortikoida

Davno je napušteno mišljenje da masno tkivo ima samo ulogu pasivnog depoa masnih kiselina u organizmu. Danas je poznato da ono reguliše metabolizam masnih kiselina u zavisnosti od energetske potrebe organizma ali i da predstavlja veoma važan endokrini centar koji obaveštava CNS i periferna tkiva o energetske statusu i zajedno sa njima reguliše unos hrane. Naime, kada je dostupnost nutritijenata visoka a fizička aktivnost niska, višak energije se skladišti u masnom tkivu u formi triglicerida, koji nastaju od slobodnih masnih kiselina i glicerola u procesu esterifikacije. Kada se obavljaju energetske zahtevne radnje poput vežbanja ili nastupi period gladovanja, na pad u energiji masno tkivo reaguje lipolizom, odnosno razlaganjem triglicerida na

glicerol i slobodne masne kiseline koje se oslobađaju u cirkulaciju gde postaju dostupne drugim organima (Peckett i sar., 2011). Održavanje balansa između procesa sinteze lipida odnosno lipogeneze i procesa lipolize veoma je važno za organizam, a glukokortikoidi se smatraju ključnim regulatorima energetskog fluksa u adipocitima.

Dugo se smatralo da je glavna uloga glukokortikoida u lipolizi permisivna – da olakšavaju i pojačavaju efekte drugih činilaca (Exton i sar., 1972). Međutim, tretman adipocita u kulturi deksametazonom uzrokuje oslobađanje slobodnih masnih kiselina i glicerola, na dozno-zavistan način (Xu i sar., 2009). Višestruko povećanje slobodnih masnih kiselina u plazmi detektovano je i nakon subkutane aplikacije deksametazona kod pacova, pri čemu masno tkivo tretiranih životinja karakteriše povećan efluks glicerola u odnosu na netretirane životinje (Xu i sar., 2009). Kako masno tkivo ne poseduje enzim glicerol kinazu koji je neophodan za transport glicerola u adipocite, nivo glicerola u sistemske cirkulaciji smatra se direktnom merom lipolize u masnom tkivu (Macfarlane i sar., 2008). Direktan uticaj glukokortikoida na lipolizu postao je, stoga, očigledniji.

Proces lipolize obavljaju enzimi lipaze koji vode višestepeni proces razlaganja triglicerida. Prvi korak lipolize je uklanjanje jedne masne kiseline i nastanak intermedijera diacilglicerola što katalizuje enzim ATGL (eng. *Adipose triglyceride lipase*). Hormon senzitivna lipaza (HSL) prevodi diacilglicerol u monoacilglicerol uklanjanjem još jedne masne kiseline, dok završni korak, odvajanje treće i poslednje masne kiseline od glicerola obavlja enzim MNGL (eng. *Monoacylglycerol lipase*). Smatra se da se sve tri lipaze nalaze pod regulacijom glukokortikoidima. Enzimi ATGL (Villena i sar., 2004) i HSL (Slavin i sar., 1994) predstavljaju ključne enzime lipolize a njihova ekspresija pozitivno je regulisana glukokortikoidima. Naime, tretman deksametazonom pozitivno reguliše HSL i ATGL, kako na transkripcionom tako i na translacionom nivou, dovodeći pri tome do povećanja aktivnosti ovih lipaza u adipocitima (Xu i sar., 2009). Iako je pokazano prisustvo GRE u genima koji kodiraju HSL i MNGL, takve sekvence još uvek nisu identifikovane u genu za ATGL (Wang i sar., 2012; Yu i sar., 2010). Kao posledica pozitivne regulacije lipaza glukokortikoidima dolazi do oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u cirkulaciju, koje mogu biti preuzete od strane okolnih tkiva za oksidaciju ili skladištenje. Međutim, u slučaju produženog delovanja glukokortikoidnih hormona, može doći do nakupljanja

masti u tkivima poput jetre i bubrega, kao i do smanjene tolerancije na glukozu usled prisustva povećane koncentracije masnih kiselina u krvi (Jaworski i sar., 2007).

Pored uticaja koji ostvaruju na razgradnju već deponovanih triglicerida, glukokortikoidi povećavaju dostupnost masnih kiselina tkivima regulacijom enzima lipoproteinske lipaze (LPL). Naime, trigliceridi se u cirkulaciji nalaze kao deo kompleksa VLDL-a ili hilomikrona u zavisnosti od toga da li vode poreklo iz jetre ili iz digestivnog trakta, redom. Smatra se da je LPL primarni enzim zadužen za hidrolizu triglicerida iz ovih kompleksa i posledično usmeravnje masnih kiselina u tkiva. Ljudi sa deficijencijom LPL-a razvijaju ozbiljnu hipertrigliceridemiju i pankreatitis dok miševi umiru u roku od 24 h (Goldberg i sar., 2009). Nasuprot prethodnom, tkivno specifično povećanje ekspresije LPL-a uzrokuje unutarćelijsko nakupljanje triglicerida i razvoj insulinske rezistencije samog tkiva (Kim i sar., 2001). Masno tkivo, kao organ koji ima veliki kapacitet za unos masnih kiselina, ima posebno izraženu ekspresiju LPL-a (Gonzales i Orlando, 2007). Studije ukazuju da glukokortikoidi pozitivno regulišu LPL na transkripcionom nivou a region za vezivanje GR-a identifikovan je uzvodno od mesta početka transkripcije *Lpl* gena u adipocitima (Yu i sar., 2010). Dodatno, tretman kortizolom u trajanju od dva dana višestruko povećava sintezu i aktivnost LPL enzima u masnom tkivu *in vitro* (Ottosson i sar., 1994), dok se nakon upotrebe antagonista GR-a zapažaju suprotni efekti (Ottosson i sar., 1995). Takođe, smatra se da glukokortikoidi regulišu LPL i na posttranslacionom nivou, pretežno promovišući smanjenje degradacije ovog enzima (Appel i Fried, 1992).

Kako su glukokortikoidi pretežno katabolički hormoni, ispitivanje lipolitičkih efekata ovih hormona zauzelo je centralno mesto u istraživanjima. Međutim, glukokortikoidi ostvaruju veoma značajne efekte na proces lipogeneze. Acetil CoA karboksilaza (ACC) je enzim koji prevodi acetyl-CoA u malonil-CoA, što je ujedno i važna tačka regulacije procesa sinteze masnih kiselina. Naime, *in vivo* i *in vitro* studijama je potvrđeno da se ekspresija ACC nalazi pod pozitivnom regulacijom glukokortikoida (Gathercole i sar., 2011; Slavin i sar., 1994). U mišjim adipocitima identifikovani su regioni za koje se vezuje GR u okviru promotora i u njegovoj neposrednoj blizini kao i u intronskim sekvencama *Acc* gena (Yu i sar., 2010). Još jedan značajan enzim za odvijanje procesa lipogeneze i njegovu regulaciju je sintaza masnih kiselina (eng. *Fatty acid synthase*, FAS). U promotoru *Fas* gena nalazi se GRE

sekvenca putem koje glukokortikoidi pozitivno regulišu ekspresiju ovog gena (Lu i sar., 2001; Wang i sar., 2012). U prilog tome govori i studija u kojoj tretman deksametazonom povećava ekspresiju reporterskog gena pod promotorom *Fas* gena (Soncini i sar., 1995). Uticaj glukokortikoida na regulaciju FAS-a pokazan je u mnogim tkivima poput masnog tkiva, jetre i pluća (Sul i Wang, 1998).

Pored pozitivnog uticaja na proces sinteze masnih kiselina, glukokortikoidi pospešuju i proces sinteze triglicerida pozitivnom regulacijom ekspresije gena koji kodiraju glavne enzime ovog metaboličkog puta (Wang i sar., 2012).

Akumulacija TG u ćelijama masnog tkiva je dinamičan proces u kome se hidroliza i re-esterifikacija stalno smenjuju. Promene u balansu ova dva procesa i njihovoj regulaciji mogu doprineti nastanku metaboličkog sindroma (Ayala-Summano i sar., 2013). Dok je za hidrolizu triglicerida između ostalih enzima zaslužan već pomenuti HSL, proces re-esterifikacije masnih kiselina do triglicerida u adipocitima odvija se pod regulacijom enzima fosfoenol piruvat karboksikinaze (eng. *Phosphoenol pyruvate carboxykinase*; PEPCK). Pored pomenute uloge, PEPCK ostvaruje i veoma važnu ulogu u procesu *de novo* sinteze glicerol-3-fosfata iz piruvata i amino kiselina, čime se obezbeđuje prekursor za sintezu triglicerida (Reshef i sar., 2003). Transkripcija gena za PEPCK je regulisana glukokortikoidima i to pozitivno u jetri a negativno u masnom tkivu, te je PEPCK primer kompleksne funkcije glukokortikoida u različitim tkivima.

Različiti depoi masnog tkiva pokazali su različitu osetljivost na efekte glukokortikoida. Visceralno masno tkivo poseduje veću koncentraciju enzima HSD1 (Bujalska i sar., 1997) i GR-a (Masuzaki i sar., 2001) od subkutanog depoa i adipociti visceralnog masnog tkiva poseduju veću sposobnost vezivanja glukokortikoida (Sjögren i sar., 1994). Dodatno, smatra se da je pozitivan efekat glukokortikoida na ekspresiju i aktivnost LPL-a posebno izražen u visceralnom masnom tkivu što doprinosi akumulaciji masnih naslaga upravo u ovom regionu (Fried i sar., 1998). Na ovaj način glukokortikoidi doprinose redistribuciji masnog tkiva u telu. Ovaj efekat je najuočljiviji na primeru pacijenata sa hronično visokim nivoom glukokortikoida koje karakteriše jabučasti fenotip usled povećanja visceralnog masnog tkiva. Iako nije lako napraviti razliku između primarne gojaznosti i rasta masnog tkiva usled delovanja glukokortikoida poređenje mase visceralnog masnog tkiva gojaznih žena i žena sa

endogenom hiperkortizolemijom pokazuje da žene sa endogenom hiperkortizolemijom imaju značajno više visceralnog masnog tkiva u poređenju sa gojaznim ženama iste telesne mase, BMI vrednosti, odnosa obima struka i kuka kao i godina starosti, što ukazuje na to da glukokortikoidi zaista pospešuju rast visceralnog masnog tkiva (Fried i sar., 1998).

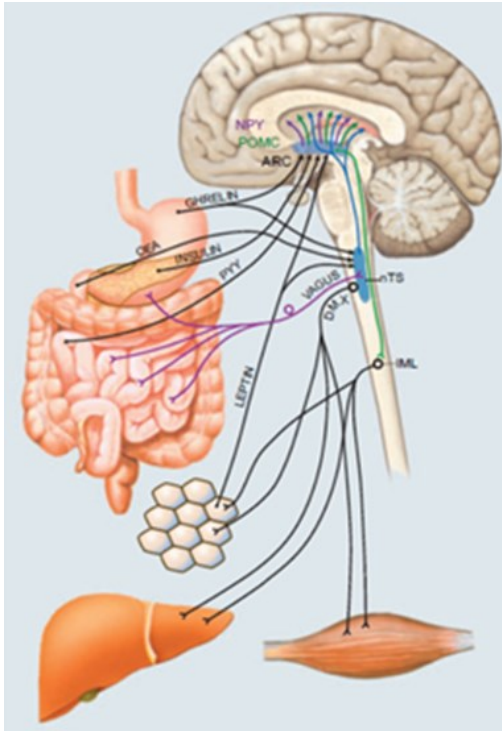
1.5 Regulacija unosa hrane i energetskeg balansa

Regulacija energetske homeostaze i održavanje optimalne telesne mase je veoma kompleksan proces. Započinje regulacijom unosa hrane koja se odigrava u CNS-u, pri čemu je odgovornost podeljena između više regiona, od kičmene moždine pa do viših centara u kori velikog mozga. Uspešna regulacija energetske homeostaze zasnovana je na sposobnosti mozga da primi, interpretira i intergriše širok spektar signala koji nose informacije o nutritivnom i energetskeg statusu organizma i da na osnovu tih informacija moduliše unos hrane ali i potrošnju energije.

Glavni centar mozga za održavanje energetske homeostaze u organizmu je hipotalamus. Regioni hipotalamusa uključeni u regulaciju unosa hrane i energetske homeostaze su nukleus arkuatus, paraventrikularni nukleus kao i ventromedijalni i lateralni hipotalamus. Neuronski putevi koji povezuju pomenute regione su organizovani u kompleksne mreže putem kojih utiču na unos hrane i potrošnju energije. Kliničke studije na pacijentima sa lezijama u različitim strukturama hipotalamusa dovele su do razvoja teorije o dualnim centrima regulacije, koja predlaže postojanje diskretnog centra za sitost i centra za glad u hipotalamusu (Stellar, 1994). Detaljne analize neurona koji čine različite regione hipotalamusa ukazuju da je regulacija u njima mnogo kompleksnija. Tako signali za stimulaciju unosa hrane idu preko nukleusa arkuatusa i lateralnog hipotalamusa dok nukleus arkuatus, paraventrikularni nukleus i ventromedijalni hipotalamus prenose signale za sitost i posledičnu inhibiciju apetita. Međutim, nukleus arkuatus se smatra ključnim regionom hipotalamusa u kontroli energetskeg balansa i lezije u ovom regionu imaju za posledicu gojaznost i hiperfagiju (Olney, 1969). Anatomska pozicija nukleusa arkuatusa je takva da obezbeđuje neposrednu blizinu krvno-moždanoj barijeri. Ova strateška pozicija je izuzetno važna.

Naime, pankreas, masno tkivo, kao i različiti regioni digestivnog trakta, sintetišu i oslobađaju hormone u zavisnosti od metaboličkog statusa i potreba. Neuronu nukleusa arkuatusa poseduju receptore za ove hormone te prvi registruju signale koji putem krvotoka pristižu iz perifernih tkiva i organa. Integrišući i modulišući signale o energetsom statusu na periferiji nukleusa arkuatus luči neuropeptide kojima šalje informacije drugim regionima hipotalamusa i drugim centrima mozga i tako prilagođava unos hrane metaboličkim potrebama organizma (**Slika 13**).

U zavisnosti od tipa neuropeptida koje sekretuju, neuronu nukleusa arkuatusa dele se na dve populacije. Prva inhibira apetit sintezom i lučenjem takozvanih anoreksigenih neuropeptida – transkripta koji je regulisan kokainom i amfetaminom (eng. *Cocaine and amphetamine related transcript*; CART) kao i proopiomelanokortina (POMC). U nukleusu arkuatusu, POMC je prekursor za α MSH (eng. *α melanocyte stimulating hormone*) koji sprovodi signal za inhibiciju unosa hrane na paraventricularni nukleus i nekoliko drugih regiona mozga vezivanjem za jedan od pet tipova receptora, od kojih je najistaknutiji MC4-R (eng. *Melanocortin 4 receptor*) (Cone, 2005). Druga populacija neurona eksprimira neuropeptide AgRP (eng. *Agouti-related peptide*) i neuropeptid Y (NPY) koji delujući preko svojih receptora stimulišu unos hrane te se označavaju i kao oreksigeni neuropeptidi. NPY se eksprimira i u mnogim drugim moždanim centrima i predstavlja jedan od najrasprostranjenijih neuropeptida u mozgu, dok se AgRP sintetiše gotovo isključivo u neuronima nukleusa arkuatusa (Cansell i sar., 2012). Svoje pozitivne efekte na unos hrane, AgRP ostvaruje kao inverzni agonist MC4-R, kako na samim POMC neuronima u nukleusu arkuatusu tako i u drugim nukleusima hipotalamusa (Woods i sar., 2008). POMC neuronu poseduju i NPY-Y1 tip receptora, koji po vezivanju NPY dovodi do inhibicije aktivnosti ovih neurona. Stoga, kada je jedna populacija neurona u nukleusu arkuatusu aktivna druga posledično biva inhibirana. Balans između aktivnosti dve grupe neurona determiniše da li će biti stimulisan unos hrane i punjenje energetske zaliha ili će apetit biti suprimiran a depoi masti podvrgnuti razlaganju u cilju dobijanja energije (Woods i sar., 2008).



Slika 13. Integracija signala o energetsom statusu različitih organa obavlja se u nukleusu arkuatusu. Preuzeto i modificirano iz (Broberger, 2005).

Obe pomenute populacije neurona nukleusa arkuatusa imaju projekcije i ka drugim jedrima hipotalamusa poput paraventrikularnog nukleusa, ventromedijalnog i lateralnog hipotalamusa. Veoma značajna je veza nukleusa arkuatusa sa paraventrikularnim nukleusom. Naime, paraventrikularni nukleus sintetizira CRH koji se sekretuje iz hipotalamusa ka hipofizi čime se aktivira HHA osa što je naročito izraženo tokom stresa. Krajnji produkti HHA ose, glukokortikoidni hormoni, predstavljaju regulatore metaboličkih procesa, glukoneogeneze i glikogenolize u jetri, lipolize i lipogeneze u masnom tkivu kao i procesa razgradnje proteina u skeletnim mišićima. Na ovaj način

signali o energetsom stanju i potrebama organizma prikupljeni i integrisani u nukleusu arkuatusu pokreću HHA osu kao efektorni mehanizam koji moduliše metaboličke procese usklađujući ih sa zahtevima organizma. Dodatno, CRH se pored sekrecije ka hipofizi usmerava i u nukleus arkuatus u kome inhibira ekspresiju NPY i AgRP (Currie, 2003; Heinrichs i sar., 1993) te ostvaruje anoreksigene efekte (Uchoa i sar., 2010).

U proces regulacije unosa hrane uključeni su i drugi centri mozga. Naime, informacije o energetsom statusu prenose se od hipotalamusa do centara odgovornih za memoriju, motivaciju, planiranje, učenje i motorne obrazce neophodne za dopremanje i uzimanje hrane (Slika 13.). Stoga, mnogi signalni putevi koji regulišu energetske balans počinju i/ili se završavaju u hipotalamusu u kome modulišu nivoe oreksigenih i anoreksigenih neuropeptida. Pod njih spadaju kako kratkoročni mehanizmi kontrole, sa primarnom ulogom da spreče preteran unos hrane tokom svakog pojedinačnog obroka tako i sistemi za dugoročnu regulaciju, koji utiču na održavanje nivoa energetske rezervi u formi masti u organizmu. Upravo iz ovog razloga adekvatna i efikasna

integracija signala od strane hipotalamusa je ključni događaj koji dalje determiniše na koji način i u kom smeru će se odigrati adaptabilne promene u organizmu.

1.5.1. Leptin

Leptin je hormon koji igra važnu ulogu u regulaciji unosa hrane i potrošnje energije. Otkriće leptina predstavljalo je veliki korak u razumevanju komunikacije između centara u mozgu i periferije, posebno masnog tkiva. Naime, leptin se sintetise u adipocitima i oslobađa u cirkulaciju kao signal pozitivnog energetskog statusa organizma i u mozgu inhibira apetit i stimuliše potrošnju energije.

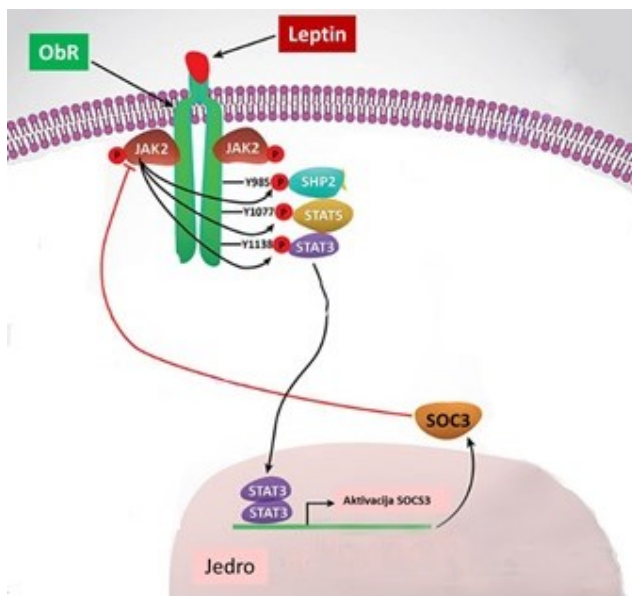
1.5.1.1. Regulacija sekrecije leptina

Kao što je istaknuto, glavno mesto sinteze i sekrecije leptina je masno tkivo, dok se u manjim količinama može sekretovati i iz placente, kostne srži, želuca, hipofize, mozga i mišića. Međutim, značaj leptina sekretovanog van masnog tkiva nije u potpunosti razjašnjen (Ribiere i Plut, 2005). S obzirom na to da je sekrecija leptina uslovljena povoljnim energetskim statusom i da je njegova koncentracija u masnom tkivu i plazmi direktno srazmerna masi masnog tkiva (Ahima i sar., 2000) ne iznenađuje što se leptin smatra značajnim markerom količine masnog tkiva u telu (Bastard i sar., 2006). Zaista, nivo leptina u cirkulaciji kao i nivo njegove ekspresije u masnom tkivu nalaze se u snažnoj korelaciji sa BMI i masom masnog tkiva. Sekrecija leptina ima pulsatorni karakter i podleže cirkadijalnoj regulaciji nezavisno od efekata koje masa masnog tkiva i telesna masa ostvaruju na njegov nivo (Harris, 2014). Pulsatorna sekrecija leptina zadržava se i kod gojaznih osoba, ali je amplituda pulseva kod ovih osoba veća u odnosu na mršave (Dardeno i sar., 2010). Dnevne fluktuacije nivoa leptina kod ljudi podrazumevaju porast njegovog nivoa u kasnim večernjim satima i dostizanje pika oko ponoći dok u ranim jutarnjim satima dolazi do smanjenja nivoa leptina (Licinio i sar., 1997). Smatra se da je ovaj obrazac sekrecije kod ljudi u vezi sa inhibicijom unosa hrane tokom noci odnosno aktivnim hranjenjem tokom dana. Osobe kod kojih je nivo leptina poremećen razvijaju takozvani „sindrom noćnog prejedanja“, poremećaj u ishrani koji se manifestuje izmenjenim ciklusom spavanja i konzumiranjem velike količine hrane tokom noći (Boston i sar., 2008). Dodatno, kada se pacovima

rotira period unosa hrane sa noćnog na dnevni, dolazi do rotacije i u obrazcu sekrecije leptina (Bodosi i sar., 2004). Negativni energetska balans takođe ostvaruje efekte na nivo leptina te izostanak obroka uzrokuje drastičan pad nivoa leptina kod ljudi, a nakon dvodnevno gladovanja leptin gotovo da nije prisutan u cirkulaciji (Chan i sar., 2003). Zato se smatra da, pored korelacije sa masom masnog tkiva i dugoročnim energetska statusom, leptin predstavlja i senzor kratkotrajnih promena u energetska balansu i da su dnevne fluktuacije nivoa leptina najvećim delom uslovljene unosom hrane. Novije studije pokazuju da je ekspresija leptina regulisana glavnim regulatorima cirkadijalnog ritma, te da poremećaji u cirkadijalnom ritmu mogu inhibirati dnevne varijacije u nivou leptina nezavisno od unosa hrane i telesne mase (Kettner i sar., 2015). Dakle, regulacija nivoa leptina uslovljena je cirkadijalnim ritmom, unosom hrane, energetska statusom i količinom masnog tkiva. Takođe, drugi regulatori energetska metabolizma modulišu nivo leptina, te insulin i glukokortikoidi povećavaju a adrenergički hormoni smanjuju njegov nivo. Primećene su i razlike u nivou leptina između polova. Nivo leptina je viši kod žena nego kod muškaraca istih godina i telesne mase. Jedan od razloga za ovu polnu razliku bi mogao biti različiti uticaj koji gonadalni hormoni ostvaruju na leptin, pri čemu androgeni inhibiraju a estrogeni stimulišu njegovu ekspresiju (Coll i sar., 2007).

1.5.1.2. Leptinski signalni put

Leptin ostvaruje svoje efekte posredstvom leptinskog receptora (eng. *Obesity receptor*; ObR), koji pripada familiji citokinskih receptora klase I. Receptor čine vanćelijski domen za koji se vezuje ligand, transmembranski i unutarćelijski domen. Postoji više varijanti ObR iRNK koje nastaju kao produkt alternativnog splajsovanja i koje nose informacije za bar pet izoformi leptinskog receptora (ObRa,b,c,d,f). Sve izoforme imaju identičan transmembranski domen ali se razlikuju po unutarćelijskom domenu.



Slika 14. Leptinski signalni put. Preuzeto i modificirano: <https://themedicalbiochemistrypage.org/adipose-tissue.php>

Slika 14). Naime, ObRb ne poseduje sopstvenu enzimsku aktivnost već prenos signala započinje aktivacijom JAK2 koji je nekovalentno asociran sa unutarćelijskim domenom receptora. Aktivirani JAK2 se autofosforiliše i fosforiliše tirozinske ostatake na 985, 1077, i 1138. poziciji ObRb-a (Myers i sar., 2008) nakon čega se za receptor i JAK2 vezuju proteini koji svojim domenima za prepoznavanje fosfotirozinskih ostataka specifično prepoznaju različite fosforilisane pozicije. Od prirode ovih proteina zavisi da li će ishod signalnog puta biti aktivacionog ili inhibitornog karaktera. Tako STAT3 i STAT5 (eng. *Signal transducer and activator of transcription*) pozitivno regulišu transkripciju ciljnih gena kao odgovor na vezivanje leptina za receptor, dok SOCS3 (eng. *Supressor of cytokine signaling 3*) i PTP1B (eng. *Proteinska tirozin fosfataza 1B*) dovode do prekida signalnog puta leptina. Dodatno, aktivirani STAT3 između ostalih gena pozitivno reguliše i gen za SOCS3 te tako doprinosi kontroli i blagovremenom prekidanju leptinskog signala. Na taj način signalni put leptina podleže autoregulaciji povratnom spregom (Myers i sar., 2008).

1.5.1.3. Uloge leptina

Glavno mesto delovanja leptina u CNS-u je hipotalmus pri čemu je koncentracija leptinskog receptora najviša u neuronima koji čine nukleuse uključene u

Smatra se da je glavna izoforma receptora preko koje leptin ostvaruje svoje funkcije, duga izoforma – ObRb, s obzirom da je ona jedina sposobna da po aktivaciji pokrene proces transdukcije signala (Ribiere i Plut, 2005). Vezivanje leptina za ObRb inicira konformacionu promenu receptorskog homodimera koja omogućava aktivaciju janus kinaze tipa 2 (JAK2;

regulaciju unosa hrane: paraventrikularni nukleus, ventromedialni i lateralni hipotalamus i prevashodno, nukleus arkuatus. Leptin se sekretuje kada su energetske uslovi povoljni i uloga mu je da inhibira oreksigene i stimuliše anoreksigene neuronske populacije u nukleusu arkuatusu, izazivajući osećaj sitosti i prestanak unosa hrane (Cammisotto i Bendayan, 2007). Vezivanje leptina za receptor stimuliše sintezu POMC i sekreciju α MSH i inhibira oslobađanja NPY i AgRP (Cowley i sar., 2001; Myers i sar., 2008). Pored uticaja na hipotalamus, leptin ostvaruje efekte i na jedra moždanog stabla stimulišući simpatički nervni sistem čime povećava potrošnju energije.

Iako mnogi efekti leptina proističu iz njegove direktne uloge u hipotalamusu, funkcionalni leptinski receptori su identifikovani i na ćelijama jetre, bubrega, srca, pluća, masnog tkiva i mišića (Margetic i sar., 2002). Smatra se da je glavna uloga leptina u ovim tkivima zaštita organa od lipotoksičnosti i nagomilavanja masti u periodima pozitivnog energetskog balansa (Unger, 2002; Unger i Roth, 2015). Tako je ektopična akumulacija lipida kod miševa i pacova sa urođenim nedostatkom leptina na ishrani koja sadrži 6% masti veća nego kod kontrolnih jedinki na ishrani sa 60% masti (Lee i sar., 2001). Leptin učestvuje i u regulaciji nivoa glukoze te povećava osetljivost tkiva na insulin i u sadejstvu sa insulinom pospešuje preuzimanje glukoze iz krvi. Dodatno, kada su zalihe energije niske, usled pada nivoa leptina dolazi do smanjenja aktivnosti gonadalne i tireoidne ose, inhibicije remodelovanja i rasta tkiva kao i do promocije oksidacije masnih kiselina (Dardeno i sar., 2010; Myers i sar., 2008).

Studije ukazuju da leptin može obavljati modulaciju imunskog sistema (Wisse, 2004). Struktura leptina veoma je slična citokinima, a kako leptinski receptor pripada porodici citokinskih receptora klase I, mnogi leptin ubrajaju i u kategoriju citokina (Wisse, 2004). Smatra se da leptin ima važnu ulogu u pravilnom razvoju imunskog sistema. Naime, nedostatak leptina dovodi do narušavanja kortiko-medularne strukture timusa koja je praćena apoptozom $CD4^+$ i $CD8^+$ populacije timocita, a neuhranjenost dovodi do atrofije timusa. Egzogeno unošenje ili prevencija pada nivoa leptina u takvim okolnostima sprečava oštećenja timusa (Härle i Straub, 2006).

Međutim, povećan nivo leptina, naročito ukoliko je hronično visok, podstiče razvoj inflamacije. Tako je pokazano da leptin stimuliše oslobađanje reaktivnog kiseonika iz neutrofila, promovira diferencijaciju i preživljavanje dendritskih antigen prezentujućih ćelija, povećava proliferaciju i citotoksičnost ćelija označenih kao

prirodne ubice i štiti ih od apoptoze (Yarandi i sar., 2011). U masnom tkivu, leptin utiče na infiltraciju makrofagi povećanjem pokretljivosti monocita niz zidove endotelnih ćelija kapilara i stimulacijom oslobađanja MCP-1 (eng. *Monocyte chemoattractant protein-1*), ključnog faktora za privlačenje makrofagi ka adipocitima (Li i sar., 2006). Uloga leptina u razvoju imunskog sistema kao i proinflamatorni efekti njegove povećane koncentracije čine leptin važnom karikom koja povezuje energetski status organizma sa imunskim sistemom. Pored toga što leptin doprinosi razvoju inflamacije, proinflamatorni citokini povećavaju nivo leptina (Sarraf i sar., 1997) zatvarajući krug. Na ovaj način leptin putem inflamacije može pospešiti rasplamsavanje patofizioloških posledica gojaznosti i nastanak metaboličkog sindroma (Ouchi i sar., 2011).

1.5.1.4. Leptinska rezistencija

Nakon otkrića da suprimira apetit, leptin je delovao kao veoma dobar kandidat za razvoj terapije kod osoba povišene telesne mase i apetita. Međutim, gojazne osobe pokazuju pojačan apetit i unos hrane bez obzira na visok nivo leptina u cirkulaciji (Frederich i sar., 1995). Razlog za ovakvu pojavu je nastanak leptinske rezistencije, odnosno smanjenje osetljivosti organizma na leptin. Naime, leptin se od masnog tkiva transportuje cirkulacijom do krvno-moždane barijere koju prolazi posredstvom transporterata, nakon čega nastavlja svoj put mikrocirkulacijom do različitih moždanih regiona gde se vezuje za leptinski receptor (Banks i sar., 2004). Leptinska rezistencija se može javiti kao posledica inhibicije transporta leptina do receptora u mozgu, defekta leptinskog receptora i smanjenja njegove sposobnosti prenosa signala kao i blokade nishodnih neuronskih puteva. Razvoj leptinske rezistencije je razlog zbog koga leptinska terapija gotovo i ne smanjuje unos hrane i telesnu masu kada je gojaznost već prisutna (Thaler i Schwartz, 2010).

Različiti modeli leptinske rezistencije kod pacova su pokazali da ona povećava verovatnoću razvoja gojaznosti (Scarpace i Zhang, 2008). Smanjena osetljivost hipotalamusa na leptin, onemogućava sprovođenje anoreksigenog signala te dolazi do povećanja apetita, naročito tokom konzumiranja energetski bogate hrane, čime se stvaraju uslovi za razvoj gojaznosti. Pored toga, studije pokazuju da se nivo leptina u krvi nalazi u pozitivnoj korelaciji sa parametrima metaboličkog sindroma poput hipertenzije i insulinske rezistencije čak i nezavisno od gojaznosti (Huang i sar., 2004;

Patel i sar., 2008). Naime, poznato je da je leptin važan regulator lipidne homeostaze i van masnog tkiva te tako leptinska rezistencija dovodi do povećane akumulacije triglicerida u jetri, pankreasu i skeletnim mišićima što uzorkuje lipotoksičnost i doprinosi smanjenoj osetljivosti ovih organa na insulin i razvoju insulinske rezistencije (Unger, 2002). Desetogodišnje kliničko istraživanje je pokazalo da hiperleptinemija može predvideti nastanak metaboličkog sindroma, i pogoršanje kliničke slike pacijenata sa ovim sindromom (Franks i sar., 2005). Nebalansirana ishrana koja ima visok sadržaj masti i/ili šećera može biti uzrok leptinske rezistencije (Vasselli i sar., 2013). Dugoročna ishrana bogata fruktozom može dovesti do hiperleptinemije i razvoja leptinske rezistencije (Alzamendi i sar., 2009; Bursać i sar., 2014). Na dominantan efekat fruktoze ukazali su i Shapiro i sar., (2011) pokazavši da ishrana bogata kombinacijom masti i fruktoze uzrokuje hiperleptinemiju i leptinsku rezistenciju kod pacova, dok se efekti gube nakon izbacivanja fruktoze iz ishrane (Shapiro i sar., 2011). Dodatno, šestomesečna ishrana bogata fruktozom pokazala je razvoj leptinske rezistencije kod pacova iako su telesna masa i nivo leptina u cirkulaciji nakon tretmana bili nepromenjeni u odnosu na standardno hranjenu grupu (Shapiro i sar., 2008). Izgleda da ishrana bogata fruktozom isključuje leptin iz regulatorne mreže koja održava enegetski balans čime se stvara značajna predispoziciju za razvoj gojaznosti.

Kako su hiperleptinemia i leptinska rezistencija usko povezani sa nastankom i razvojem metaboličkog sindroma (Patel i sar., 2008), regulacija leptina bi mogla biti jedan od mehanizama putem koga ishrana bogata fruktozom doprinosi pojavi metaboličkog sindroma.

1.5.2. Uloga glukokortikoida u regulaciji unosa hrane

Davno je primećeno da glukokortikoidi imaju sposobnost modulacije unosa hrane. Najočigledniji primer su pacijenti sa Kušingovim sindromom kod kojih se visok nivo glukokortikoida dovodi u vezu sa povećanim apetitom (Geer i sar., 2016). Suprotno, nizak nivo glukokortikoida kod pacijenata sa Adisonovom bolešću doprinosi gubitku apetita i razvoju simptoma anoreksije (Nieman i Chanco Turner, 2006). Takođe, adrenalektomija kod pacova dovodi do redukcije apetitita dok naknadno dodavanje glukokortikoida ostvaruje reverzibilni efekat (Uchoa i sar., 2010). Injeciranje

deksametazona u lateralnu komoru stimuliše unos hrane i povećanje telesne mase pacova (Jeanrenaud i Rohner-Jeanrenaud, 2000) što takođe potvrđuje da glukokortikoidi utiču na regulaciju unosa hrane u CNS-u. Kako CRH ostvaruje anoreksigene efekte u nukleusu arkuatusu (Currie, 2003; Heinrichs i sar., 1993; Uchoa i sar., 2010) inhibicija sinteze i sekrecije CRH u hipotalamusu putem negativne povratne sprege bi mogla biti jedan od mehanizama kojima glukokortikoidi ostvaruju oreksigeno dejstvo. Dodatno, glukokortikoidi regulišu ekspresiju gena koji kodiraju neuropeptide uključene u regulaciju unosa hrane. Naime, GR je visoko eksprimiran u neuronima koji sekretuju NPY/AgRP i POMC u nukleusu arkuatusu, a GRE sekvence su prisutne u samim promotorima ili njihovoj neposrednoj blizini gena koji kodiraju POMC, NPY i AgRP (Cintra i Bortolotti, 1992; Lee i sar., 2013; Misaki i sar., 1992). Takođe, efekti NPY na povećanje unosa hrane i telesne mase se ne odvijaju bez prisustva glukokortikoida (Jeanrenaud i Rohner-Jeanrenaud, 2000). Na primeru animalnog modela Kušingovog sindroma pokazan je pojačan apetit kao posledica povišenog nivoa glukokortikoida koji stimulišu ekspresiju AgRP-a u nukleusu arkuatusu hipotalamusa (Nakayama i sar., 2011).

Međutim, uticaj glukokortikoida na unos hrane nije tako jednoznačan te neka istraživanja ističu smanjenje apetita i telesne mase kao posledicu delovanja glukokortikoida. Intraperitonealna infuzija deksametazona u periodu od 3 dana rezultovala je u smanjenom unosu hrane i telesne mase kod pacova (Zakrzewska i sar., 1999). Nešto duži tretmani glukokortikoidima takođe značajno smanjuju apetit (Konno i sar., 2008; De Vos i sar., 1995). Dodatno, tretman različitim dozama glukokortikoida smanjuje ekspresiju gena za NPY i AgRP kod gojaznih pacova, a više doze dovode do istih efekata kod pacova normalne mase (Liu i sar., 2011).

Pored uticaja na centralne komponente regulacije unosa hrane, krajnji efekat koji će glukokortikoidi ostvariti na energetske balans zavisi i od njihovog uticaja na metabolizam u perifernim tkivima i interakcije sa drugim regulatorima uključenim u održavanje energetske homeostaze. Treba istaći da glukokortikoidi povećavaju sintezu i sekreciju leptina u adipocitima (Sliker i sar., 1996; Won Jahng i sar., 2008; Zakrzewska i sar., 1999), dok adrenalektomija dovodi do smanjenja nivoa leptina u plazmi životinja hranjenih *ad libitum* (Savontaus i sar., 2002) Takođe, nivo leptina u plazmi životinja koje su nahranjene nakon gladovanja ne može da raste bez prisustva

glukokortikoida (Uchoa i sar., 2012). Glukokortikoidi pozitivno regulišu transkripciju gena koji kodira leptin u masnom tkivu u čijem su promotoru detektovane GRE sekvence (Gong i sar., 1996). Međutim, iako glukokortikoidi stimulišu ekspresiju leptina u masnom tkivu, istraživanja navode da glukokortikoidi utiču i na ograničavanje efekata koje ovaj adipokin ostvaruje. Naime, pokazano je da leptin ostvaruje znatno jači i dugotrajniji efekat na unos hrane kod adrenalektomisanih pacova nego kod intaktnih kontrola, a dodavanje deksametazona ovim životinjama, smanjuje dejstvo leptina na dozna zavisani način (Zakrzewska i sar., 1997). U jednoj humanoj studiji tretman žena glukokortikoidima je i pored povećanja nivoa leptina povećao i unos hrane i telesnu masu (Uddén i sar., 2003). Pretpostavljeno je da glukokortikoidi smanjuju osetljivost hipotalamusa na leptin. Zaista, adrenalektomija povećava nivo iRNK za leptinski receptor i ekspresiju STAT-3 a smanjuje ekspresiju SOCS3, inhibitora signalnog puta leptina (Madiehe i sar., 2001). Centralni tretman glukokortikoidima smanjuje nivo fosforilisane forme STAT-3, koja nastaje po vezivanju leptina za receptor i neophodna je za sprovođenje aktivirajućeg signala (Ishida-Takahashi i sar., 2004). Dodatno, leptin ima sposobnost negativne regulacije nivoa glukokortikoida uticajem na ekspresiju CRH u paraventrikularnom jedru (Huang i sar., 2006) i delovanjem na adrenalne žlezde (Bornstein i sar., 1997). Šta sve determiniše koji će biti krajnji ishod interakcije glukokortikoida i leptina na unos hrane kao i u kojoj meri bi način ishrane ili izloženost stresu usmerili njihove efekte, nije u potpunosti razjašnjeno.

1.6 Inflamacija i metabolički sindrom

U naporima da se metabolički sindrom okarakteriše iz više uglova zapaženo je da je sindrom praćen hroničnom inflamacijom niskog intenziteta (Monteiro i Azevedo, 2010) te je ispitivanje inflamatornog statusa i njegovog doprinosa nastanku i razvoju metaboličkog sindroma postalo fokus brojnih istraživanja.

1.6.1. Inflamatorni odgovor

Inflamacija predstavlja fiziološki odgovor organizma na unutarćelijska oštećenja ili vanćelijske štetne stimuluse, koji iniciraju sekreciju proinflamatornih medijatora. Cilj inflamacije je uklanjanje oštećujućeg agensa i ponovno uspostavljanje funkcije oštećenog tkiva. Inflamaciju iniciraju ćelije samog oštećenog tkiva, kao i mast ćelije i makrofagi nastanjeni u tkivu, oslobađanjem proinflamatornih medijatora koji uključuju bioaktivne amine, lipidne medijatore i citokine, naročito interleukine 1 i 6 (IL1 i IL6) i faktor nekroze tumora α (eng. *Tumor necrosis factor α* ; TNF α). Ovi signalni molekuli dovode do vazodilatacije, povećane propustljivosti endotela kapilara i migracije leukocita i monocita/makrofagi u oštećeno tkivo (Coutinho i Chapman, 2011).

NF κ B je inducibilni transkripcioni regulator koga aktivira veliki broj inflamatornih i sredinskih faktora. Sastoji se iz familije od pet članova, koji formiraju homo ili heterodimere. U neaktivnom stanju dimeri NF κ B su lokalizovani u citoplazmi i asocirani sa inhibitornim proteinima I κ B (inhibitorni protein κ B). U prisustvu odgovarajućeg stimulusa dolazi do aktivacije kinaze koja fosforiliše I κ B (eng. *I κ B kinase*; IKK) koja fosforiliše I κ B proteine čime oni postaju supstrat za ubikvitinizaciju i posledičnu degradaciju. Tako oslobođeni NF κ B dimeri prelaze u jedro gde se vezuju za specifične sekvence DNK i regulišu transkripciju ciljnih gena (Sun i Andersson, 2002).

Signalni put NF κ B je uključen u razvoj bolesti u čijoj osnovi bi se mogla naći inflamacija poput astme, artritisa, autoimunskih bolesti i metaboličkog sindroma. Proinflamatorni citokini aktiviraju NF κ B nakon čega on aktivira ekspresiju gena koji kodiraju proinflamatorne citokine, čime se stvara začarani krug. Kako proinflamatorni citokini deluju i parakrino i endokrino aktivacija NF κ B i inflamacija se mogu širiti od ćelije do ćelije i dalje.

1.6.2. Metabolička inflamacija

Inflamacija koja prati metabolički sindrom se ne javlja kao posledica infekcije ili povrede, već narušene metaboličke ravnoteže te se označava još i kao “metainflamacija” (Hotamisligil, 2006). Intenzitet ove inflamacije je uvek nizak iako je ona dugotrajna i poprima hronični karakter. Nekad se za nju navodi i termin “parainflamacija” da ukaže

na intermedijarni status između bazalnog i jakog inflamatornog stanja. Bezobzira na nizak intenzitet inflamacije, smatra se da dugotrajno prisustvo proinflamatornih markera pospešuje nastanak brojnih metaboličkih poremećaja (Yudkin i sar., 1999). Naime, istraživanja su pokazala prisustvo povećanog nivoa proinflamatornih citokina IL1, IL6 i TNF α u masnom tkivu i cirkulaciji gojaznih osoba (Kern i sar., 1995; Ziccardi i sar., 2002). Ekspresija gena za IL1 u visceralnom masnom tkivu nalazi se u pozitivnoj korelaciji sa obimom struka (Esser i sar., 2013), a nivo TNF α u cirkulaciji u korelaciji sa BMI (Mendall i sar., 1997). Dugoročni tretman IL1 uzrokuje insulinsku rezistenciju u mišijim i humanim adipocitima (Lagathu i sar., 2006). Takođe, klinička istraživanja ukazuju da prisustvo inflamatornih markera na sistemskom nivou doprinosi razvoju insulinske rezistencije kod mladih (Herder i sar., 2007; Moran i sar., 2005) i odraslih (Festa i sar., 2000; Wu i sar., 2002). Progresija insulinske rezistencije ka dijabetesu tipa 2 praćena je stanjem hronične inflamacije niskog intenziteta (Yusuf i sar., 2004), a nivo proinflamatornih citokina IL6 i TNF α je povećan u serumu obolelih od dijabetesa tipa 2 (Cardellini i sar., 2007; Mohamed-Ali i sar., 1997)

1.6.2.1. Razvoj metaboličke inflamacije u masnom tkivu

Povećanje mase masnog tkiva uzrokuje promene u njegovoj endokrinoj i metaboličkoj funkciji koje mogu doprineti razvoju metaboličkih poremećaja. Gojaznost je praćena hroničnom inflamacijom niskog intenziteta pri čemu preko 50% iRNK transkriptata koji se sintetišu u masnom tkivu tokom gojaznosti nastaju prepisivanjem gena uključenih u razvoj inflamacije (Xu i sar., 2003). Pre nešto više od 20 godina Hotamisligil i sar. (1993) su među prvima ukazali na vezu između gojaznosti i inflamacije, pokazavši da se TNF α prekomerno eksprimira u masnom tkivu gojaznih miševa (Hotamisligil i sar., 1993). Kasnije studije detektovale su povećan nivo proinflamatornih citokina (naročito IL1, IL6 i TNF α) u masnom tkivu (Kern i sar., 1995; Ziccardi i sar., 2002) nezavisno od uzroka gojaznosti (Xu i sar., 2003). Kako se u gojaznosti inflamacija u masnom tkivu može detektovati i u momentu kada je u drugim organima, poput jetre, mišića i pankreasa, još uvek nema, smatra se da je masno tkivo primarno mesto nastanka inflamacije u gojaznosti (Xu i sar., 2003). Gojazne osobe imaju povećan nivo proinflamatornih citokina u cirkulaciji ukazujući da promene u masnom tkivu imaju potencijal ka širenju i na druge organe i tkiva. S druge strane,

smanjenje telesne mase dovodi do snižavanja nivoa proinflamatornih citokina kao i ublažavanja simptoma metaboličkog sindroma kod dece i odraslih (Bastard i sar., 2000; Dandona i sar., 1998; Martos i sar., 2009). Stoga se inflamatorni status masnog tkiva izdvojio kao važan prognostički parametar.

Adipociti imaju sposobnost da sintetišu i oslobađaju znatne količine proinflamatornih adipokina i citokina, uključujući TNF α , IL1 i IL6 (Monteiro i Azevedo, 2010). Takođe, eksprimiraju i gene koji kodiraju hemoatraktantne proteine i receptore uključene u stimulaciju T-limfocita (Meijer i sar., 2011), zbog čega su adipociti sposobni da privlače imunske ćelije u masno tkivu i propagiraju inflamaciju. U skladu s tim, mnoge studije pokazuju da je gojaznost praćena infiltracijom makrofagi u masno tkivo miševa i ljudi (Weisberg i sar., 2003; Xu i sar., 2003). Takođe, bez obzira na etiologiju gojaznosti, u visceralnom masnom tkivu se može detektovati povećana ekspresija gena koji se specifično eksprimiraju u makrofagima (Xu i sar., 2003).

Inflamatorni putevi pokrenuti u adipocitima prepliću se sa signalnim putevima insulina (Hotamisligil i sar., 2010), te proinflamatorni citokini koje luči masno tkivo gojaznih osoba mogu doprineti razvoju drugih metaboličkih poremećaja poput insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2. Zaista, nivo IL6 i TNF α u serumu gojaznih žena se nalazi u pozitivnoj korelaciji sa razvojem dijabetesa tipa 2 (Tangvarasittichai i sar., 2016). Takođe, IL1, IL6 i TNF α mogu izazvati insulinsku rezistenciju u adipocitima (Grimble, 2002; Hrnčiar i sar., 1999), dok kod gojaznih miševa kojima nedostaje TNF α usled indukovanе mutacije u genu koji ga kodira, insulinski signalni put nije narušen (Hotamisligil i sar., 1997). Pored toga što proinflamatorni citokini ostvaruju lipolitičke efekte, lipoliza je favorizovana usled insulinske rezistencije u adipocitima (Plomgaard i sar., 2008; Xu i sar., 2003) što sveukupno povećava oslobađanje slobodnih masnih kiselina u cirkulaciju. Same masne kiseline pospešuju razvoj insulinske rezistencije u jetri i skeletnim mišićima (Krssak i sar., 1999; Yu i sar., 2002). Dakle, razvoj inflamacije u masnom tkivu gojaznih osoba mogao bi doprineti pojavi metaboličkih poremećaja poput insulinske rezistencije i dijabetesa čime se stvaraju uslovi za nastanak metaboličkog sindroma.

Nisu u potpunosti poznati uzroci razvoja inflamacije u masnom tkivu gojaznih osoba. Jedan od predloženih mehanizama uključuje preopterećenje nutrijentima, prevashodno masnim kiselinama. Poznato je da tokom unosa hrane kod zdravih osoba

normalne telesne mase dolazi do blage inflamacije u krvotoku koja nestaje nakon metabolisanja hranljivih materija (Calder i sar., 2011). Kod gojaznosti ili unosom prevelikih količina hrane, ova inflamacija se može intenzivirati. Naime, intenzivan metabolizam masnih kiselina bi mogao izazvati stres endoplazmatičnog retikuluma i uzrokovati razvoj oksidativnog stresa u ćelijama što je usko povezano sa pokretanjem proinflamatornih signalnih puteva (Emanuela i sar., 2012). Pored energetskog tereta za organizam, preopterećenje hranljivim materijama može predstavljati i sredinski faktor koji prepoznaju ćelije urođenog imunskog odgovora, uzrokujući inflamaciju (Schenk i sar., 2008; Shoelson i Goldfine, 2009). Postoje podaci da se TLR (eng. *Toll like receptor*), evolutivno konzervirani receptor sa funkcijom prepoznavanja patogena, može aktivirati zasićenim masnim kiselinama iz cirkulacije ili tkiva, i tako pokrenuti unutarćelijski inflamatorni signalni put (Thaler i Schwartz, 2010). Iako se prvobitno smatralo da jedino ćelije imunskog sistema poseduju TLR, danas je poznato da se funkcionalni receptor eksprimira i u mnogim drugim ćelijama uključujući i adipocite (Schäffler i sar., 2007). Još jedan od pretpostavljenih mehanizama je nastanak hipoksije usled rasta i širenja masnog tkiva tokom razvoja gojaznosti povećanjem veličine postojećih adipocita i stimulacijom diferencijacije adipocita iz prekursorskih ćelija. U takvim uslovima, često dolazi do nedovoljnog snabdevanja rastućeg masnog tkiva kiseonikom i faktorima iz krvi što dovodi do nekroze. Poznato je da nekroza kao tip ćelijske smrti dovodi do izlivanja ćelijskog sadržaja što je signal za akumulaciju ćelija imunskog sistema, prevashodno makrofagi, unutar tkiva i do aktiviranja imunskog odgovora (Monteiro i Azevedo, 2010).

Visceralno masno tkivo sekretuje više proinflamatornih citokina po gramu tkiva nego subkutani depo, što ističe značaj visceralnog depoa u stvaranju inflamacije u gojaznosti (Fain, 2006). Dodatno, hirurško uklanjanje isključivo subkutanog masnog tkiva ne dovodi do snižavanja nivoa proinflamatornih citokina (Klein i sar., 2004) što je uočljivo nakon smanjenja mase visceralnog masnog tkiva (Ziccardi i sar., 2002). Smatra se da sistemska inflamacija niskog intenziteta karakteristična za metabolički sindrom vodi poreklo od visceralnog masnog tkiva.

1.6.2.2. Razvoj metaboličke inflamacije u hipotalamusu

Pored sistemske inflamacije, u metaboličkom sindromu se može detektovati i inflamacija u CNS-u, posebno u hipotalamusu (Cai, 2013a; Thaler i Schwartz, 2010; Zhang i sar., 2008). Naime, inflamacija niskog intenziteta u hipotalamusu, okarakterisana aktivacijom NF κ B signalnog puta, detektovana je u gojaznosti ali i poremećajima koji su povezani sa njom poput hipertenzije, leptinske i insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 (Cai, 2013b; Kleinriders i sar., 2009; Purkayastha i sar., 2011). Slično kao kod inflamacije u masnom tkivu, preopterećenje hranljivim materijama se smatra jednim od okidača inflamacije u mozgu. Istraživanja pokazuju da akutno izlaganje CNS-a glukozi i lipidima dovodi do aktivacije IKK β /NF κ B kompleksa i pokretanja NF κ B signalnog puta u hipotalamusu (Zhang i sar., 2008). Dugoročna ishrana bogata mastima izaziva promenu obrazca ekspresije proinflamatornih citokina kao i povećanu aktivaciju NF κ B-a u hipotalamusu (De Souza i sar., 2005). Takođe, povećan unos fruktoze može dovesti do povećanja ekspresije IL1, IL6 i TNF α u hipotalamusu (Li i sar., 2015).

Mehanizam putem koga hranljive materije izazivaju neuroinflamaciju mogao bi da uključuje stres endoplazmatskog retikuluma usled preopterećenja u sintezi i obradi proteina, razvoj oksidativnog stresa kao posledicu povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika ili njihovog slabijeg ukljanjanja tokom pojačanog metabolizma hranljivih materija, kao i aktivaciju citokinskih i TLR receptora na površini ćelija koji potom pokreću inflamatorni odgovor (Cai, 2013a). Iako su masne kiseline predominantni aktivatori TLR-a, pokazano je da fruktoza povećava njegovu ekspresiju u hipotalamusu (Li i sar., 2015) te bi stoga mogla indirektno doprineti povećanoj osetljivosti ovog dela mozga na razvoj inflamacije. Dalje, neke studije pokazuju da ishrana bogata mastima povećava nivo endotoksina i da životinje na takvoj ishrani razvijaju prenaplašeni odgovor na njihovo prisustvo povećavajući ekspresiju gena za proinflamatorne citokine (Thaler i Schwartz, 2010).

Bez obzira na uzrok nastanka, inflamacija u hipotalamusu narušava regulaciju unosa hrane i energetskeg balansa što može dovesti do razvoja gojaznosti i sa njom povezanih poremećaja. Naime, u uslovima optimalne ishrane, nivo I κ B proteina, glavnog regulatora aktivnosti NF κ B signalnog puta, visoko je ekspimiran u hipotalamusu te je aktivnost NF κ B-a negativno regulisana u ovom delu mozga pri

fiziološkim uslovima. Dodatno, *in situ* hibridizacijom je pokazano da se IKK β predominantno eksprimira u delu hipotalamusa u kome su smešteni centri regulacije unosa hrane i energetskog balansa, što zbirno ukazuje na posebnu osetljivost ovog dela hipotalamusa na uticaj proinflammatoryh signala i razvoj inflamacije (Zhang i sar., 2008). Upravo je u neuronima nukleusa arcuatusa koji sekretuju AgRP/NPY i POMC, povišena aktivacija NF κ B signalnog puta u odgovoru na povećano prisustvo hranljivih materija (Zhang i sar., 2008).

Inflamacija u hipotalamusu može narušiti leptinsku i insulinsku osetljivost neurona koji sekretuju AgRP/NPY i POMC. Naime, proinflammatoryh markeri mogu uticati na pozitivnu regulaciju inhibitora leptinskog i insulinskog signalnog puta poput proteina SOCS3 (Thaler i Schwartz, 2010). Promotor gena za SOCS3 poseduje dva mesta za vezivanje NF κ B transkripcionog regulatora i delecija bilo kog od ovih mesta značajno umanjuje aktivnost promotora. Tretman ćelija TNF α citokinom uzokuje povećanje SOCS3 na nivou iRNK i proteina.

1.6.3. Stres i inflamacija – uloga glukokortikoida

Veliki procenat populacije svakodnevno je izložen stresu različite etiologije, što ne samo da narušava opšti utisak dobrog stanja organizma već i uzrokuje hiperosetljivost imunskog sistema stimulišući razvoj alergija, astme i raznih autoimunskih oboljenja (Thaler i Schwartz, 2010). Procene različitih izvora su da je i do 75% poseta lekaru zasnovano na posledicama stresa što govori o širini i ozbiljnosti efekata koje stres ostvaruje na zdravlje ljudi (Marshall, 2011). Komponente odgovora organizma na stres mogu pojačati ili inhibirati neke aspekte imunskog sistema (Dhabhar, 2002; Glaser i sar., 2000). Rane studije o ulozi stresa u razvoju inflamacije ukazale su da stres ostvaruje imunosupresivne efekte, povećavajući verovatnoću pojave infekcije i smanjujući reakciju organizma na vakcine (Yang i Glaser, 2002). Ipak, mehanizam delovanja stresa na imunski sistem i dalje ima mnogo nepoznanica. Smatra se da centralnu ulogu nema supresija imunskog sistema već poremećena regulacija koja dovodi do neadekvatnog odgovora, izmenjene dužine trajanja, balansa medijatora i efekatora inflamacije kao i poremećaja anti-inflamatorne zaštite. Zbog uticaja stresa na ovako kompleksnu regulaciju imunskog sistema, postoje oprečni literaturni podaci po

kojima stres može imati i pro- i anti-inflamatorne efekte. Tako se hronični stres istovremeno dovodi u vezu sa redukovanjem ćelijskog imunskog odgovora leukocita i monocita i njihovom smanjenom produkcijom proinflamatornih citokina (Bauer i sar., 2000; Kiecolt-Glaser i sar., 1996, 1995) kao i sa povećanjem inflamatornih markera i izazivanjem inflamacije u masnom tkivu i cirkulaciji (Karagiannides i sar., 2014). Na krajnji rezultat efekta stresa na imunski sistem utiče i intenzitet stresora kao i dužina i učestalost izlaganja, čineći uticaj stresa na imunski sistem još složenijim.

Glukokortikoidi, kao glavni akteri u odgovoru organizma na stres, ostvaruju interakcije sa imunskim sistemom modulišući njegov odgovor. Naime, prirodni i sintetički glukokortikoidi su u širokoj upotrebi u lečenju kako akutnih tako i hroničnih inflamacija. Svoje anti-inflamatorno dejstvo, glukokortikoidi ostvaruju od prvih etapa u razvoju inflamacije tako što sprečavaju vazodilataciju i povećanje propustljivosti kapilara i smanjuju migraciju leukocita na mesto inflamacije (Coutinho i Chapman, 2011). Takođe, mogu izazvati apoptozu neutrofila, bazofila, eozinofila i T limfocita ali i modulaciju funkcija B limfocita, monocita, makrofagi i granulocita i na taj način smanjiti inflamaciju (Sorrells i Sapolsky, 2007). U makrofagima, glukokortikoidi inhibiraju p38 kinazu, modulišući produkciju citokina (Bhattacharyya i sar., 2007). Glukokortikoidi inhibiraju ekspresiju gena koji kodiraju proinflamatorne citokine i hemokine, molekule za adheziju ćelija kao i ključne enzime uključene u inicijaciju i održavanje inflamacije (Coutinho i Chapman, 2011), dok istovremeno pozitivno regulišu ekspresiju anti-inflamatornih gena (Uhlenhaut i sar., 2013).

Glukokortikoidi inhibiraju NFκB signalni put delujući preko više različitih mehanizama zasnovanih na protein-protein interakcijama. Naime, pokazano je da GR direktno stupa u interakciju sa p65 subjednicom u samom jedru, čime je onemogućena transaktivaciona funkcija ove subjedinice NFκB (Liden i sar., 1997). Dalje, GR može da blokira regrutovanje transkripcionog elongacionog faktora na promotore za koje je vezan NFκB te time spreči početak transkripcije proinflamatornih gena regulisanih NFκB-om (Luecke i Yamamoto, 2005). Regrutovanje histon dezacetilaze na promotore koje reguliše NFκB (Ito i sar., 2006), ili pak sprečavanje interakcije NFκB sa histon acetiltransferazama (McKay i Cidlowski, 2000) su primeri kako glukokortikoidi mogu i na epigenetičkom nivou da negativno regulišu aktivnost NFκB-a. Glukokortikoidi aktiviraju i ekspresiju GILZ proteina (eng. *Glucocorticoid-induced leucine zipper*) za

koga je pokazano da dovodi do inhibicije NF κ B signalnog puta još uvek nedovoljno razjašnjenim mehanizmom (Ayroldi i Riccardi, 2009).

2. Cilj

Savremeni način života karakteriše povećan unos prerađene, visokokalorične hrane bogate fruktozom i svakodnevna izloženost stresu. Primećeno je da ovi faktori koreliraju sa sve učestalijom pojavom metaboličkog sindroma koji u poslednjih nekoliko decenija alarmira svetsku zdravstvenu javnost budući da predstavlja vodeći faktor rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Na osnovu činjenice da se u metaboličkom sindromu ispoljavaju i simptomi hiperkortizolemije pretpostavljeno je da je u patogenezu ovog sindroma uključen signalni put glukokortikoidnih hormona.

Hipotalamus je jedan od ključnih regiona centralnog nervnog sistema za održavanje energetske i metaboličke homeostaze u organizmu kao i za regulaciju odgovora organizma na delovanje stresora. Danas je poznato da i masno tkivo predstavlja vrlo aktivan metabolički centar koji učestvuje u regulaciji energetske homeostaze. Dodatno, visceralna gojaznost je jedna od najizrazitijih karakteristika metaboličkog sindroma te su upravo visceralno masno tkivo i hipotalamus fokus naših ispitivanja.

Iako se metabolički sindrom češće javlja kod žena, najveći broj animalnih studija koje se bave patogenezu ovog sindroma sprovedena je na mužjacima. Zbog toga su istraživanja na ženkama od izuzetnog značaja za bolje razumevanje molekularnih mehanizama nastanka i razvoja sindroma.

Imajući sve prethodno u vidu, cilj ove doktorske disertacije bio je da se testira hipoteza da ishrana bogata fruktozom u kombinaciji sa hroničnim stresom dovodi do promena u glukokortikoidnoj signalizaciji u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu koje doprinose razvoju karakteristika metaboličkog sindroma kod ženki pacova. Posebni ciljevi ove doktorske disertacije bili su da se odgovori na sledeća pitanja:

- Da li ishrana bogata fruktozom, hronični nepredvidivi stres i/ili njihova kombinacija dovode do promena u nivou ekspresije enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida (HSD1 i H6PDH), unutarćelijske distribucije i funkcionalnih karakteristika GR-a kao i ekspresije gena regulisanih GR-om koji su uključeni u metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu ženki pacova.
- Da li postoje razlike u prereceptorskom metabolizmu glukokortikoida, nivou GR-a i ekspresiji oreksigenih neuropeptida regulisanih ovim receptorom u

hipotalamusu ženki pacova nakon ishrane bogate fruktozom, hroničnog nepredvidivog stresa i njihove kombinacije.

- Da li nakon primenjenih tretmana dolazi do promena ekspresije leptina u masnom tkivu i njegovog nivoa u cirkulaciji, kao i do promena ekspresije ObRb-a i inhibitora leptinske signalizacije u hipotalamusu, koje mogu da dovedu do razvoja leptinske rezistencije.
- Da li pomenuti tretmani dovode do promena u inflamatornom statusu visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa, kao i da li se efekti fruktoze na markere inflamacije u visceralnom masnom tkivu razlikuju kod mladih i adultnih ženki pacova.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

Fruktoza je nabavljena od firme Apipek (Bečej, Srbija). Neobeleženi sintetički glukokortikoid deksametazon i mišje monoklonsko antitelo na β Aktin (AC-15) proizvodi su firme Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Radioaktivno obeleženi [1,2,4 - ^3H] deksametazon ($[^3\text{H}]\text{Dex}$, specifična radioaktivnost 36,0 Ci/mmol), polivinildifluoridna (PVDF) membrana, i komplet za detekciju “Western blotting reagent pack” u čijem sastavu su: kozji IgG (na mišja i zečja antitela) konjugovan sa alkalnom fosfatazom, kao i hemifluorescentni (ECF) supstrat za detekciju kupljeni su od firme Amersham (Pharmacia Biotech, UK). Korišćena su zečja poliklonska antitela na: GR (PA1-511A), nabavljeno od firme Affinity BioReagents-a (Golden, CO, USA); HSD1 (ab109554) od firme Abcam (Cembridge, UK); H6PDH (sc-67394), SREBP1c (sc-366), karnitin palmitoil transferaza 1 (eng. *Carnitine palmitoyltransferase 1*; CPT1) (sc-98834), NF κ B/p65 (sc-372), I κ B (sc-371), ObRb (sc-8391) kao i mišje monoklonsko antitelo na PPAR γ (sc-7273) kupljeni su od firme Santa Cruise biotechnology (Santa Cruise, CA, USA). Markeri korišćeni za elektroforetsko određivanje molekulskih masa proteina su proizvod kompanije Thermo Fisher Scientific Inc. Komplet za kvantitativno određivanje koncentracije kortikosterona u serumu i plazmi je proizvod firme Immunodiagnostic systems ltd. (UK). Komplet za reverznu transkripciju „High capacity cDNA reverse transcription kit”; mikrotitar reakcione ploče od 96 mesta, inhibitor RNaze, prajmeri i probe za: ACC (Rn00573474_m1), FAS (Rn00685720_m1), LPL (Rn00561482_m1), Leptin (Rn00565158_m1), HSL (Rn00563444_m1), PEPCCK (Rn01529014_m1), IL1 (Rn00580432_m1), IL6 (Rn01410330_m1), TNF α (Rn01525859_g1), SOCS3 (Rn00585674_s1), AgRP (Rn01431703_g1), NPY (Rn01410145_m1), ObRb (Rn00561369_m1) i hipoksantin fosforibozil transferaza 1 (HPRT1) (Rn01527840_m1); kao i „TaqMan Universal Master Mix” kupljeni su od firme Applied Biosystems. Dezoksiribonukleaza I je kupljena od firme Fermentas, a reagens TRIzol[®] od firme Ambion. Voda „RNase-DNase free water” proizvod je firme Eppendorf.

3.2. Tretman životinja

U studiji su korišćene dve starosne grupe ženki pacova soja Wistar, starosti 21 dan i 2.5 meseca na početku eksperimenta kada su nasumično raspoređene 3 po kavezu i dalje podeljene u eksperimentalne grupe. Mlade ženke su podeljene na osnovu ishrane kojoj će biti podvrgnute u dve eksperimentalne grupe: K – mlade ženke hranjene standardnom hranom i pijaćom vodom i F – mlade ženke hranjene istom hranom i 10% rastvorom fruktoze umesto vode. Adultne ženke su podeljene u četiri eksperimentalne grupe: K – životinje hranjene standardnom laboratorijskom hranom i pijaćom vodom; F – životinje hranjene istom hranom i 10% rastvorom fruktoze umesto vode; S – životinje hranjene na isti način kao kontrolne i izlagane hroničnom, nepredvidivom stresu; i SF – životinje koje su uz ishranu obogaćenu fruktozom izlagane i hroničnom nepredvidivom stresu. Primenjeni protokol stresa predstavlja izmenjeni protokol Joelsa i sar., (Joëls i sar., 2004) i uključuje sledeće dnevne stresore: prinudno plivanje u hladnoj vodi tokom 10 min, fizičko ograničenje kretanja tokom 60 min, boravak u hladnoj sobi na 4°C tokom 50 min, mokru prostirku u periodu od 4 h, zamenu kaveza u trajanju od 2 h, klackanje kaveza tokom 1 h i nagnut kavez pod uglom od 45° tokom noći. Vreme početka i tip dnevnog stresora su nasumično odabrani na početku eksperimenta. Sve eksperimentalne životinje su imale *ad libitum* prisup hrani i tečnosti i boravile su na konstantnoj temperaturi od 22°C i definisanom dnevno-noćnom ciklusu sa smenom na 12 sati. Studija je urađena u skladu sa etičkim načelima Evropske komisije za zaštitu životinja 2010/63/EU i odobrena od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (No 3-12/12).

3.3. Karakterizacija animalnog modela

Unos hrane i tečnosti meren je svakodnevno tokom 9 nedelja tretmana i na osnovu dobijenih podataka izračunat je unos energije poreklom od hrane (1 g=11 KJ) i fruktoze (1 ml=1,72 KJ) dok je ukupan energetski unos dobijen iz njihovog zbira. Telesna masa merena je prvog i poslednjeg dana eksperimenta dok je masa masnog tkiva merena neposredno nakon žrtvovanja i na osnovu nje je izračunat odnos mase masnog tkiva i telesne mase poslednjeg dana eksperimenta.

Životinje su žrtvovane brзом dekapitacijom. Noć pred žrtvovanje svim životinjama je uklonjena hrana a grupama na fruktoznom režimu i fruktoza, koja je zamenjena pijaćom vodom. Sve životinje su žrtvovane u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa, određenoj analizom vaginalnih briseva pod mikroskopom. Krv iz trupa pojedinačnih životinja prikupljana je u odvojenim tubama obloženim sa EDTA i centrifugirana na 3000g 10 min, nakon čega se kao supernatant izdvaja krvna plazma. Plazme su čuvane na -20°C do upotrebe. Koncentracija triglicerida merena je iz pune krvi neposredno nakon žrtvovanja MultiCare dijagnostičkim trakama. Nivoi slobodnih masnih kiselina i mokraćne kiseline u plazmi određeni su komercijalno.

3.4. Priprema kompartmana visceralnog masnog tkiva

Izolovano visceralno masno tkivo (retroperitonealno, perirenalno i omentalno) je odmah zamrznuto i do daljeg korišćenja čuvano u tečnom azotu. Nakon odmrzavanja tkivo je izmereno i u odnosu 1:1 (m/z) homogenizovano u hladnom homogenizacionom puferu, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, koji sadrži 10% glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM EGTA-Na₂, 2 mM ditioneitol, 20 mM Na₂MoO₄, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM fenilmetilsulfonilfluorid, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml inhibitor tripsina, 20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇, 25 mM NaF. Deo homogenata je sonifikovan na ledu, 3 × 15 s na 1A i 50/60 Hz, sa amplitudom 30% (Hielscher Ultrasound Processor) i potom centrifugiran 1 h na 105000 g, 4°C. Dobijeni supernatanti su korišćeni kao ukupni ćelijski ekstrakti. Preostali deo homogenata je centrifugiran 10 min, na 2000 g, 4°C. Supernatant (S1) je korišćen za dobijanje citosola i mikrozomske frakcije. Talog (T1) je ispran homogenizacionim puferom (10 min, 2000 g, 4°C), nakon čega je resuspendovan u jednakoj zapremini (m/z) NUN pufera (25 mM HEPES, pH 7,6, koji sadrži 1 M ureu, 300 mM NaCl, 1% NP40, 2 mM ditioneitol, 20 mM Na₂MoO₄, 0,15 mM spermidin, 0,1 mM fenilmetilsulfonilfluorid, 20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇ i 25 mM NaF) i inkubiran 1 h na ledu uz često mešanje na vibracionoj mešalici. Po završetku inkubacije suspenzija je centrifugirana 10 min na 8000 g, 4°C i supernatant je korišćen kao jedarni ekstrakt. Supernatant S1 je centrifugiran 1 h na 105000 g, 4°C, nakon čega je supernatant korišćen kao citosol, dok je talog koji predstavlja mikrozomsku frakciju opran sa 100 mM Na₄P₂O₇, pH 7,4 (1 h,

105.000 g, 4°C) i resuspendovan u fosfatnom puferu (50 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 0,1 mM EDTA, 20% glicerol i 0,1 mM ditioneitol, pH 7,4).

3.5. Priprema ukupnih ćelijskih ekstrakata hipotalmusa

Izolovani hipotalamusi su odmah zamrznuti i do dalje upotrebe čuvani u tečnom azotu. Nakon odmrzavanja tkivo je homogenizovano u hladnom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, koji sadrži 150 mM NaCl, 10 mM EDTA-Na₂, 10 mM EGTA-Na₂, 0,5% Triton X, 1% NP40, 0,1% SDS, 2 mM ditioneitol, 20 mM Na₂MoO₄, 0,1 mM fenilmetilsulfonilfluorid, 5 µg/ml antipain, 5 mM Na₄P₂O₇, 25 mM NaF) u odnosu 1:4 (m/z). Homogenati su sonifikovani 3×5 s, 1A, 50/60 Hz na ledu i vorteksovani, pa potom centrifugirani 20 min na 14000g, 4°C. Izdvojeni supernatanti su korišćeni kao ukupni ćelijski ekstrakti hipotalmusa.

3.6. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Razdvajanje proteina prema molekulskim masama izvršeno je elektroforezom na poliakrilamidnim gelovima u aparaturi Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Svaki gel bio je sačinjen iz dva funkcionalno različita dela, gornjeg gela za koncentrovanje (4% akrilamid / 0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) i donjeg gela za razdvajanje proteina molekulskih masa između 50 i 100 kDa (7,5% akrilamid / 0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8) odnosno gela za razdvajanje proteina manjih molekulskih masa (12% akrilamid / 0,43% bisakrilamid, 0,1% SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijum persulfat i 0,033% TEMED.

Uzorci su pripremljeni kuvanjem 5 min na 100°C u jednakoj zapremini redukujućeg 2 puta koncentrovanog pufera za uzorke (125 mM Tris, pH 6,8 koji sadrži 20% t/z glicerol, 4% t/z SDS i 10% β-merkaptotanol), nakon čega su nanošeni na gel i razdvajani pri konstantnom naponu od 120 V na 4°C u trajanju oko 90 min (pufer za rezervoare: 192 mM glicin, 0,1% SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3).

3.7. Western blot metoda

Transfer proteina sa gelova na PVDF membrane vršen je u aparaturi Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), preko noći pri konstantnoj struji od 135 mA po gelu na 4°C, u 25 mM Tris puferu, pH 8,3, koji sadrži 192 mM glicin i 20% (t/z) metanol. Nakon transfera PVDF membrane su bojene 1% rastvorom Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini, kako bi se proverila efikasnost transfera. Mesta na membranama koja nisu zauzeta proteinima, blokirana su inkubacijom 1 h na sobnoj temperaturi u PBS puferu (1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl, pH 7,2) koji sadrži 1% nemasnog mleka u prahu. Za detekciju GR-a, HSD1, H6PDH, CPT1, SREBP1c, PPAR γ , NF κ B, I κ B, ObRb i β aktina korišćena su primarna antitela: PA1-511A, ab109554, sc-67394, sc-98834, sc-366, sc-7273, sc-372, sc-371, sc-8391 i AC-15, redom. Membrane su sa primarnim antitelima inkubirane preko noći na 4°C uz mešanje, a zatim ispirane 4 puta po 5 min PBS puferom koji sadrži 0,1% Tween 20 i inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa alkalnom fosfatazom, tokom 1 h na sobnoj temperaturi. β -aktin je korišćen za svaki uzorak kao kontrola jednakog nanošenja uzoraka na gel. Pre izvođenja enzimske reakcije membrane su isprane PBS puferom koji sadrži 0,1% Tween 20, a zatim čistim PBS puferom. Imunopozitivne trake na membranama su vizuelizovane inkubacijom sa ECF supstratom za alkalnu fosfatazu i skenirane na skeneru za detekciju fluorescencije STORM (Amersham, UK). Kvantitativna analiza relativnih integrisanih optičkih gustina imunopozitivnih traka izvršena je ImageQuant softverom. Nakon detekcije svakog od proteina vezana antitela su uklonjena pomoću 0,2 M NaOH, membrane ponovo blokirane i dalje inkubirane sa narednim antitelom.

3.8. Izolovanje RNK

Ukupna RNK iz visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa ženki pacova izolovana je upotrebom reagensa TRIzol[®] prema uputstvima proizvođača. Ukratko, tkiva su homogenizovana u reagensu TRIzol[®] 1:10 (m/z) i homogenati su centrifugirani (10 min, 12.000 g, 4°C) nakon čega je odbačen gornji lipidni sloj, a supernatant je inkubiran 5 min na 30°C. Zatim je dodat hloroform i centrifugiranjem (10 min, 12.000 g, 4°C) je izdvojena površinska, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, koja je

potom precipitirana preko noći na -20°C dodavanjem 3M Na-acetata, pH 5,0 i izopropanola. Precipitirana RNK je prana 75% etanolom (10 min, 14.000 g, 4°C) i rastvorena u vodi u kojoj nema RNaza i DNaza. Alikvot RNK je odvojen za određivanje koncentracije i čistoće RNK, a u ostatak je dodat inhibitor RNaza i tako pripremljeni uzorci su zamrznuti i čuvani na -80°C do upotrebe.

3.9. DNazni tretman i reverzna transkripcija

Moguća kontaminacija pripremljenih uzoraka RNK sa DNK uklonjena je enzimskim tretmanom. Enzim dezoksiribonukleaza I (DNaza I) je endonukleaza koja vrši digestiju jednolančane i dvolančane DNK. Enzim je dodat u uzorke RNK i nakon polučasovne inkubacije na 37°C , reakcija je zaustavljena zagrevanjem na 65°C u prisustvu EDTA. Za prevođenje RNK u cDNK korišćen je komplet za reverznu transkripciju „High capacity cDNA reverse transcription kit” prema uputstvu proizvođača. Reverzna transkripcija je izvršena u reakcionoj smeši zapremine 20 μl , u kojoj su se pored RNK uzorka nalazili enzim reverzna transkriptaza (MultiScribeTM), smeša dezoksiribonukleotidtrifosfata (dNTP) i nasumično konstruisani prajmeri. Reakcija se odvijala po sledećem tempereturnom režimu: 10 min na 25°C , a zatim 2 sata na 37°C i zaustavljena je zagrevanjem na 85°C . Uz svaku pojedinačnu reakciju reverzne transkripcije odvijala se i dodatna reakcija bez prisustva enzima reverzne transkriptaze koja je služila kao negativna kontrola. Sintetisana cDNK čuvana je na -80°C do dalje upotrebe.

3.10. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

(Real-time PCR)

Ispitana je ekspresija gena koji kodiraju ACC, FAS, LPL, PEPCK, HSL i Leptin u visceralnom masnom tkivu, NPY, AgRP, SOCS3 i ObRb u hipotalamusu, dok je nivo ekspresije gena koji kodiraju IL1, IL6 i TNF α određivan u oba ispitivana tkiva. Sve lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*; PCR) u realnom vremenu, takođe poznate pod nazivom kvantitativni PCR (qPCR), izvođene su u aparatu AB Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 25 μl , a činili su je: 1x „TaqMan Universal PCR Master

Mix”, 1x „TaqMan Gene Expression Assay” i kao matrica 20 ng cDNK sintetisane reverznom transkripcijom na RNK izolovanoj iz visceralnog masnog tkiva odnosno hipotalamusa eksperimentalnih životinja. „TaqMan Universal Master Mix” sadrži AmpliTaq Gold DNK polimerazu, dNTP uz dUTP, AmpErase uracil N glikozilazu i kao pasivnu referencu ROX boju „TaqMan Gene Expression Assay” za odabrani gen sadrži par neobebeženih prajmera i TaqMan MGB (eng. Minor groove binder) probu obeleženu reporterskom FAM fluorescentnom bojom na 5' kraju, a na 3' kraju se nalazi hvatač (eng. *Quencher*) koji služi da suprimira fluorescenciju reporterske boje kada se nalazi u njenoj blizini, odnosno kada je proba intaktna. Da bi se izbegla kontaminacija genomskom DNK korišćeni su prajmeri koji se prostiru preko spoja egzon-egzon.

Faza inicijacije PCR reakcije ostvarena je inkubacijom 2 min na 50°C u toku koje se aktivira uracil-N-glikozilaza i 10 min na 95°C tokom koje se aktivira AmpliTaq Gold DNK polimeraza, nakon čega sledi 40 ciklusa od po 15 s denaturacije na 95°C praćenih sa po 60 s na 60°C u toku kojih dolazi do hibridizacije i elongacije prajmera. Svako merenje je uključivalo „slepu” probu, kao negativnu kontrolu u kojoj je izostavljena cDNK. Sve reakcije su izvedene u triplikatu na mikrotitar ploči sa 96 mesta. Da bi se smanjile varijacije, za amplifikaciju svih gena u jednom uzorku korišćena je ista cDNK smeša, dok je svaki pojedinačni gen ispitan u različitim uzorcima na jednoj PCR ploči. Kao referentni gen korišćen je HPRT1.

3.11. Određivanje ravnotežnih parametara vezivanja hormona za receptor

Ravnotežni parametri interakcije hormon-receptor, konstanta disocijacije (K_D) i broj vezivnih mesta za hormon (B_{max}) određeni su u citosolima visceralnog masnog tkiva ženki pacova. Alikvoti (50 μ l) citosola su inkubirani 18 h na ledu sa 7 različitih koncentracija [3 H]Dex-a u rasponu od 1-70 nM u prisustvu i odsustvu 100 puta veće koncentracije Dex-a. Nevezani hormon je uklonjen adsorbicijom na ugalj-dekstran inkubacijom 10 min na 0°C sa suspenzijom koja sadrži 3,75% aktivnog uglja i 0,375% dekstrana. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 1 min na 12000 g, 4°C i supernatanti su direktno unošeni u scintilacioni koktel radi merenja radioaktivnosti

(Rackbeta scintilacioni brojač za tečne uzorke, LKB, sa efikasnošću od oko 48%). Sva merenja su rađena u triplikatu.

Dobijene krive zasićenja imaju oblik pravougla hiperbole i predstavljaju zavisnost broja kompleksa hormon-receptor od koncentracije raspoloživog hormona. Krive zasićenja su fitovane pomoću programa GrapHPAd Prism III i iz njih su izračunate numeričke vrednosti za K_D i B_{max} .

3.12. Određivanje koncentracije kortikosterona i leptina

Koncentracija kortikosterona u citosolima visceralnog masnog tkiva i nivo kortikosterona i leptina u plazmi ženki pacova određivani su upotrebom kompleta za kvantitativno određivanje koncentracije kortikosterona i leptina enzimskim imunoesejem prema uputstvima proizvođača. Apsorbanca je merena spektrofotometrom Multiscan Spectrum (Thermo ELECTRON CORPORATION, Finland) u mikrotitar pločama sa 96 mesta.

3.13. Određivanje koncentracije proteina i RNK

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana metodom po Spektoru (Spector 1978). Standardna kriva je konstruisana na osnovu merenja apsorbance rastvora albumina goveđeg seruma poznatih koncentracija. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 595 nm, spektrofotometrom Multiscan Spectrum (Thermo ELECTRON CORPORATION, Finland) u mikrotitar pločama sa 96 mesta.

Koncentracija RNK je određena merenjem apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 260 nm spektrofotometrom BioPhotometer (Eppendorf). Imajući u vidu da apsorbanca od jedne jedinice, merena na 260 nm odgovara 40 $\mu\text{g/ml}$ RNK, koncentracija RNK je automatski izračunata po formuli:

$$C = 40 \times A_{260} \times \text{faktor razblaženja}$$

Za proveru čistoće RNK uziman je odnos apsorbance na 260, 280 i 230 nm. Apsorpcija na 280 nm ukazuje na prisustvo proteina u uzorku, dok apsorpcija na 230 nm ukazuje na kontaminaciju uzorka ugljenim hidratima, peptidima, fenolima i aromatičnim jedinjenjima. Odnosi $A_{260}/A_{280} > 1.8$ i $A_{260}/A_{230} > 1.8$ smatrani su zadovoljavajućim.

3.14. Histološka analiza visceralnog masnog tkiva

Deo visceralnog masnog tkiva pojedinačnih životinja izdvojen je odmah nakon izolovanja i fiksiran u 4% paraformaldehidu. Nakon isteka 24 h, tkiva su dehidratizovana u serijskim razblaženjima etanola (30%-100%) i ksilenu. Tkiva su potom ukalupljena u parafinske blokove (Histolab Product Ab, Göteborg, Sweden) i sečena rotacionim mikrotomom (RM 2125RT Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) na preseke debljine 10 µm. Deparafizovani i rehidratizovani preseki visceralnog masnog tkiva potom su bojani hematoksilinom i eozinom. Morfometrijska analiza izvedena je programom Adiposoft (automatizovanim softverom za analizu ćelija masnog tkiva iz histoloških preseka). Slike preseka za analizu dobijene su mikroskopom (Olympus, BX-51, Olympus Corp., Tokyo, Japan) opremljenim sa CCD video kamerom (PxeLINK, Ottawa, ON, Canada) kojim upravlja softverski paket newCAST (Visiopharm Integrator System, version 3.2.7.0, Visiopharm, Denmark). Analizirani su broj i dijametar adipocita na 100 ćelija po preseku, na tri preseka po životinji i pet životinja po eksperimentalnoj grupi.

3.15. Statistička analiza

U cilju određivanja efekata koje ostvaruju fruktoza i hronični, nepredvidivi stress, samostalno i u kombinaciji, primenjena je dvostruka ANOVA praćena posthoc Tukey statističkim testom. Nivo verovatnoće manji od 0,05 smatran je statistički značajnim.

4. Rezultati

4.1. Fiziološki i biohemijski parametri ženki pacova

Karakterizacija animalnog modela primenjenog u ovoj studiji je izvršena analizom svakodnevnog unosa hrane i tečnosti, merenjem mase tela životinja, kao i merenjem mase visceralnog masnog tkiva. Dodatno, određena je koncentracija triglicerida, slobodnih masnih kiselina i mokraćne kiseline u krvnoj plazmi nakon žrtvovanja.

Dnevni unos energije, izračunat po formuli hrana (g) \times 11 + fruktoza (ml) \times 1,72 i izražen u KJ, bio je sličan kod svih adultnih ženki nezavisno od režima ishrane ili primenjenog stresa (**Tabela 4.1.**). Ipak, dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat stresa [F (1,11)=5,48; P<0,05] i fruktoze [F (1,11)=131,63; P<0,0001] u energetsom unosu poreklom od hrane. Naime, obe grupe životinja koje su pile fruktozu su unele značajno manje energije poreklom od hrane u odnosu na životinje na standardnoj hrani i pijaćoj vodi (P<0,001), što je u ukupnom energetsom unosu kompenzovano energijom poreklom od fruktoze.

Dvostruka ANOVA pokazala je da stres ima izraziti efekat na masu tela [F (1,37)=13,17; P<0,001], masu visceralnog masnog tkiva [F (1,37)=23,45; P<0,0001], kao i na odnos mase masnog tkiva i telesne mase [F (1,37)=17,94; P<0,001] kod adultnih ženki. Naime, post-hoc test ukazao je na značajno smanjenje mase tela adultnih životinja koje su pile fruktozu u kombinaciji sa izlaganjem stresu u poređenju sa kontrolnim (P<0,01) i nestresiranim ženkama hranjenim fruktozom (P<0,05). Dalje, i apsolutna i relativna masa visceralnog masnog tkiva bila je smanjena kod adultnih životinja izlaganih stresu na standardnoj (P<0,001) ali i na ishrani bogatoj fruktozom (P<0,01 za apsolutnu, P<0,05 za relativnu masu) u odnosu na kontrolnu grupu adultnih ženki (**Tabela 4.1.**). Telesna masa mladih ženki koje su konzumirale fruktozu nije se značajno promenila ali je apsolutna i relativna masa visceralnog masnog tkiva bila povećana (P<0,05), što ukazuje na povećanu visceralnu adipoznost ovih ženki (**Tabela 4.2.**).

Nivo triglicerida i slobodnih masnih kiselina u plazmi se nije razlikovao između četiri ispitivane eksperimentalne grupe adultnih ženki (**Tabela 4.1.**).

Značajan efekat fruktoze [F (1,35)=7,83; P<0,01], ali i stresa [F (1,35)=6,67; P<0,05], ostvaren je na nivo mokraćne kiseline u plazmi adultnih nestresiranih ženki

koje su pile fruktozu, što je povećalo njen nivo ($P<0,05$) kod ovih ženki u odnosu na adultne netretirane ženke (**Tabela 4.1.**).

Tabela 4.1. Energetski unos, masa tela i visceralnog masnog tkiva i biohemijski parametri

	Kontrola	Fruktoza	Stres	Stres + Fruktoza
Energija od hrane (kJ)	259,66 ± 6,87	175,27 ± 6,88 ***	253,04 ± 3,98	142,01 ± 12,28 *** ^{SSS}
Energija od fruktoze (kJ)	/	125,94 ± 7,76	/	142,96 ± 17,95
Ukupan energetski unos (kJ)	259,66 ± 6,87	301,22 ± 14,42	253,043 ± 3,98	284,97 ± 15,50
Masa tela (g)	274,17 ± 6,16	272,63 ± 9,64	258,00 ± 5,82	239,70 ± 5,79** #
Masa visceralnog masnog tkiva (g)	10,65 ± 0,95	9,67 ± 1,17	5,69 ± 0,51 ***	6,53 ± 0,61 **
Masa visceralnog masnog tkiva/ Masa tela (x1000)	3,85 ± 0,27	3,54 ± 0,42	2,21 ± 0,20 ***	2,74 ± 0,26 *
Slobodne masne kiseline (mM)	0,82 ± 0,08	0,92 ± 0,13	0,84 ± 0,09	0,99 ± 0,08
Trigliceridi (mM)	1,01 ± 0,06	1,07 ± 0,09	1,00 ± 0,12	1,10 ± 0,08
Mokraćna kiselina (μmol/L)	100,36 ± 6,79	136,72 ± 12,75 *	89,88 ± 9,41	102,24 ± 5,26

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM; Energetski unos je izražen po danu po životinji; * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, promene u odnosu na K; # $P<0,05$, promene u odnosu F; ^{SSS} $P<0,001$, promene u odnosu na S.

Tabela 4.2. Masa tela i visceralnog masnog tkiva mladih ženki

	Kontrola	Fruktoza
Masa tela (g)	259,00 ± 9,55	271,23 ± 8,48
Masa visceralnog masnog tkiva (g)	3,20 ± 0,44	5,06 ± 0,82*
Masa visceralnog masnog tkiva / Masa tela (x1000)	12,43 ± 1,74	18,29 ± 2,51*

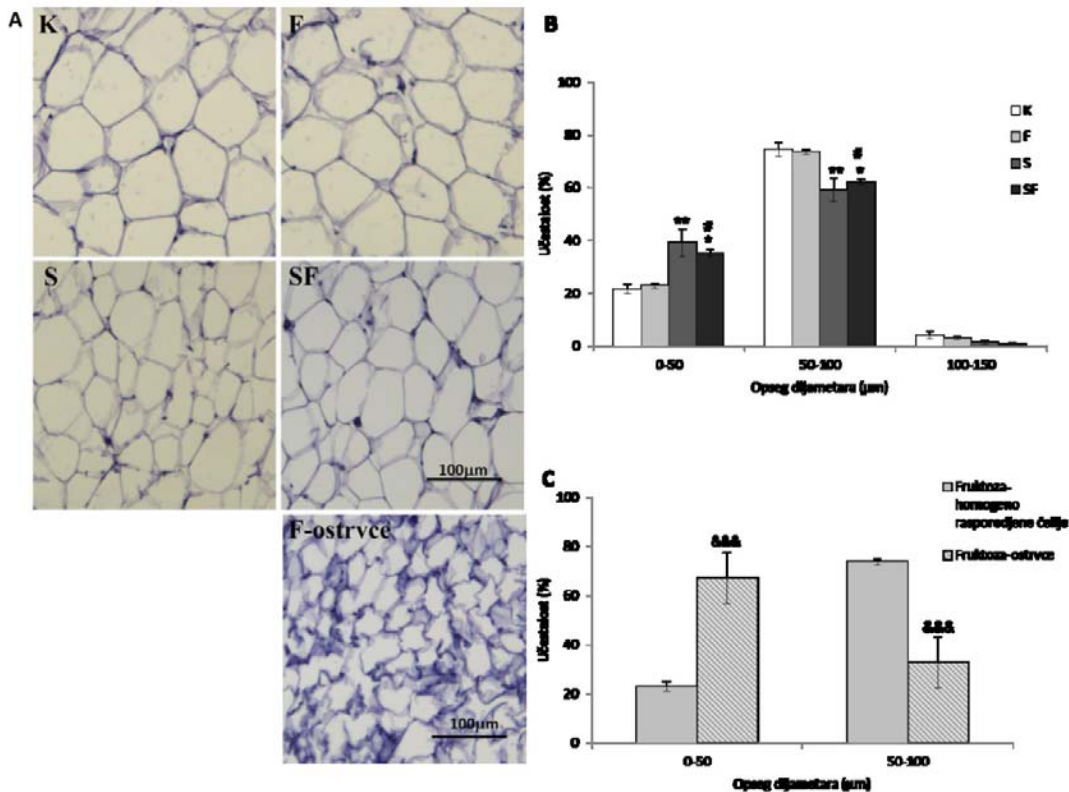
Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SEM; Energetski unos je izražen po danu po životinji;
*P<0,05, između tretiranih i netretirane životinja.

4.2. Visceralno masno tkivo

4.2.1. Histološka analiza visceralnog masnog tkiva ženki pacova

Preseci visceralnog masnog tkiva obojeni hematoksilinom i eozinom analizirani su uz pomoć programa Adiposoft. Rezultati analize su pokazali da su ćelije manjeg (0-50 µm) i većeg (50-100 µm) dijametra homogeno distribuirane u svim eksperimentalnim grupama, dok su jasno definisana ostrvca manjih adipocita primećena samo u F grupi (**Slika 4.1.A**). Prisustvo adipocita većih od 100 µm bilo je zanemarljivo.

Dvostruka ANOVA je pokazala značajan efekat stresa na veličinu adipocita [F (1,16)=27,75; P<0,0001] i to tako da je izlaganje hroničnom stresu povećalo zastupljenost ćelija manjeg dijametra kod životinja izlaganih stresu na standardnoj (P<0,01) i ishani bogatoj fruktozom (P<0,05) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Posledično, učestalost većih adipocita bila je smanjena kod obe grupe izlagane stresu, i to S (P<0,01) i SF (P<0,05) grupe u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 4.1.B**). Kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu učestalost malih adipocita je bila 3 puta veća (P<0,001) u ostrvcima u poređenju sa homogeno distribuiranim ćelijama iste eksperimentalne grupe (**Slika 4.1.C**).



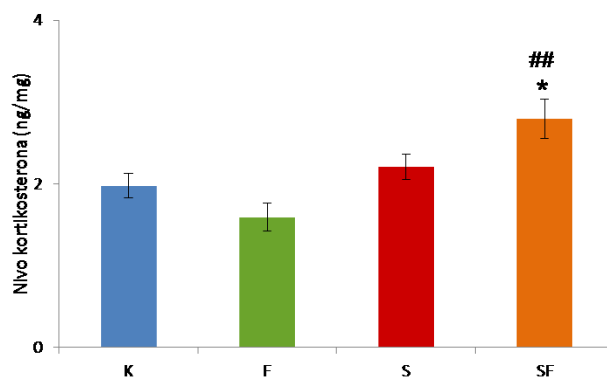
Slika 4.1. Histološka i morfometrička analiza visceralnog masnog tkiva adultnih ženki. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. **A)** Reprezentativni preseki visceralnog masnog tkiva obojeni hematoksilinom i eozinom (uveličanje $\times 10$) i ostrvca malih adipocita iz F grupe (F-ostvrce). **B)** Distribucija veličine adipocita (u intervalima od 50 μm) za sve četiri eksperimentalne grupe. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM (tri polja po preseku, tri preseka po životinji i pet životinja po eksperimentalnoj grupi). Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P < 0,05$, SF u odnosu na K; ** $P < 0,01$, S u odnosu na K; # $P < 0,05$, SF u odnosu na F. **C)** Distribucija veličine adipocita (sa intervalima od 50 μm) iz ostrvaca malih adipocita F grupe (F-ostvrce) u poređenju sa homogeno distriuiranim ćelijama iste grupe. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM (tri polja po preseku, tri preseka po životinji i pet životinja po eksperimentalnoj grupi). Statistička značajnost (Studentov t-test): &&& $P < 0,001$, F-ostvrce u odnosu na homogeno distribuirane ćelije.

4.2.2. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

Nivo glukokortikoidnih hormona u krvnoj plazmi i visceralnom masnom tkivu ispitan je ELISA metodom. S obzirom da se glukokortikoidni hormoni pre vezivanja za receptor prevode iz neaktivne u aktivnu formu posredstvom enzima HSD1 i H6PDH,

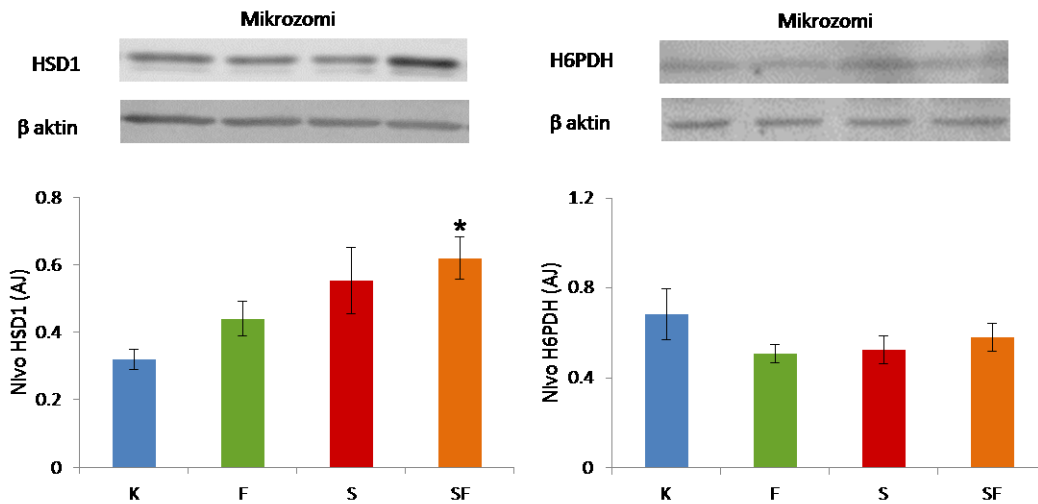
Western blot metodom ispitan je proteinski nivo ova dva enzima koji čine prereceptorski metabolizam glukokortikoida.

Iako nije bilo značajne promene u nivou kortikosterona u plazmi (rezultati nisu prikazani), dvostruka ANOVA je pokazala značajan efekat stresa [F (1,24)=13,85; P<0,01] i interakcije faktora [F (1,24)=6,39; P<0,05] na nivo kortikosterona u citosolima visceralnog masnog tkiva. Rezultati post-hoc testa ukazali su na povećanje koncentracije kortikosterona u citosolima visceralnog masnog tkiva životinja koje su pile fruktozu i bile izlagane stresu u odnosu na kontrolne (za 40,9%, P<0,05) i nestresirane životinje koje su pile fruktozu (za 75,5%, P<0,01) ([Slika 4.2.](#)).



Slika 4.2. Koncentracija kortikosterona u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Koncentracija kortikosterona merena je ELISA metodom u citosolima visceralnog masnog tkiva Prikazane su srednje vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05, SF u odnosu na K; ^{##}P<0,01, SF u odnosu na F.

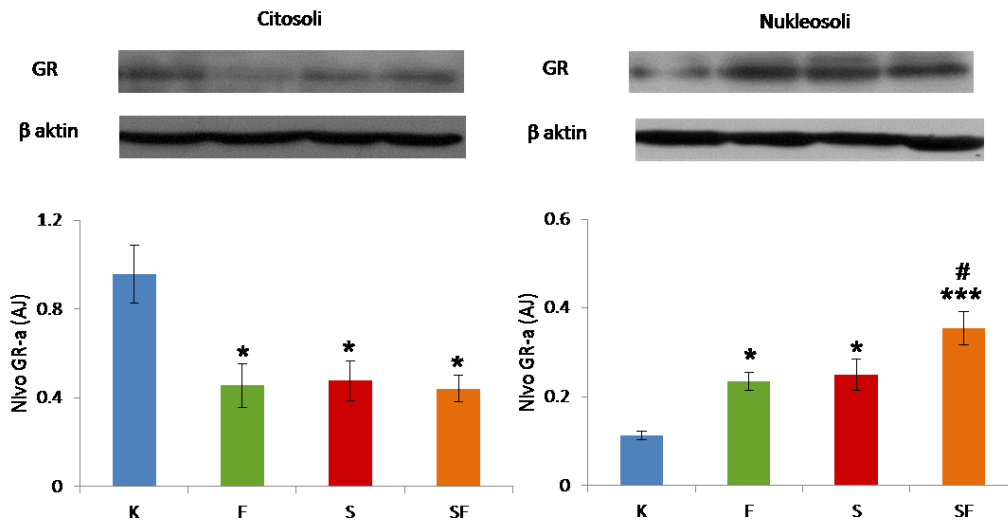
Semikvantitativna analiza intenziteta imunopozitivnih traka proteina HSD1 u mikrozomima visceralnog masnog tkiva i dvostruka ANOVA pokazali su dvostruko veći (P<0,05) nivo ovog proteina kod stresiranih životinja koje su pile fruktozu u odnosu na netretirane životinje, a kao posledica značajnog efekta stresa [F (1,17)=10,16; P<0,01]. Statistički značajne promene u nivou H6PDH proteina nisu primećene ([Slika 4.3.](#)).



Slika 4.3. Nivo HSD1 i H6PDH proteina u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Mikrozosomska frakcija visceralnog masnog tkiva analizirana je Western blot metodom. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju HSD1, H6PDH i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta HSD1, H6PDH i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo HSD1 i H6PDH je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P < 0,05$, SF u odnosu na K.

4.2.3. Nivo GR proteina i njegova unutarćelijska distribucija

Da bi se ispitalo kako ishrana obogaćena fruktozom i izloženost hroničnom nepredvidivom stresu utiče na nivo GR proteina i njegovu unutarćelijsku distribuciju u visceralnom masnom tkivu, uzorci citosola i nukleosola ovog tkiva su ispitani Western blot metodom. Na nivou citoplazme, dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat stresa [$F(1,10)=5,87$; $P < 0,05$], fruktoze [$F(1,10)=6,95$; $P < 0,05$], kao i njihove interakcije [$F(1,10)=5,20$; $P < 0,05$] na nivo GR proteina, kao i da su tretmani smanjili nivo GR-a za čak 50% ($P < 0,05$) kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Paralelno sa prethodnim, detektovan je značajan efekat stresa [$F(1,12)=20,81$; $P < 0,001$] i fruktoze [$F(1,12)=16,51$; $P < 0,01$] na jedarnu akumulaciju receptora. Analiza rezultata pokazala je dvostruko povećanje ($P < 0,05$) nivoa GR-a u nukleosolima nakon odvojeno primenjenih tretmana i trostruko povećanje ($P < 0,001$) nakon njihove kombinacije u odnosu na netetirane životinje (Slika 4.4.).

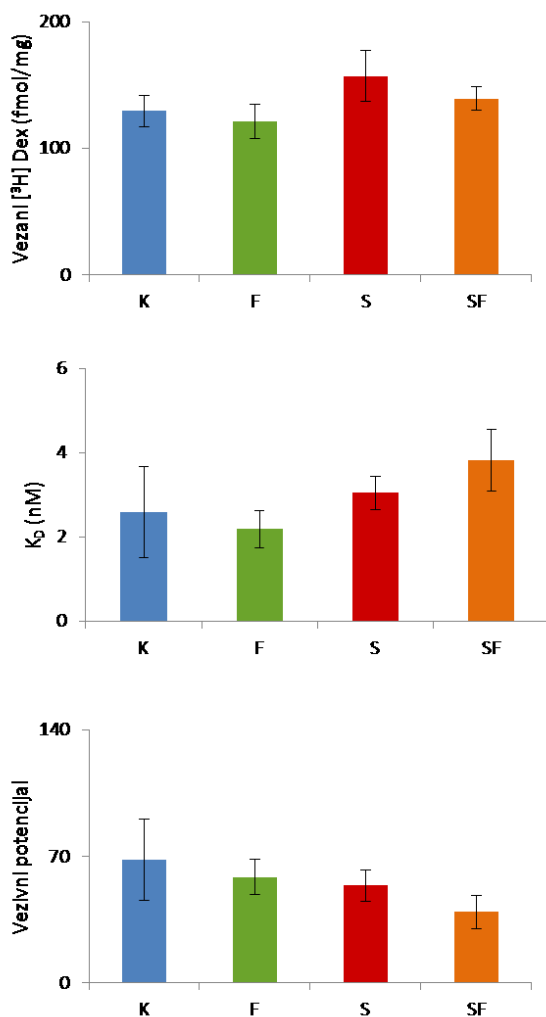


Slika 4.4. Nivo GR proteina i njegova unutarćelijska distribucija u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo GR-a određen je Western blot metodom u citosolima i nukleosolima visceralnog masnog tkiva. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju GR-u i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta GR-a i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo GR-a je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P < 0,05$, F, S ili SF u odnosu na K (citosoli); * $P < 0,05$, F ili S u odnosu na K; *** $P < 0,001$, SF u odnosu na K; # $P < 0,05$, SF u odnosu na F (nukleosoli).

4.2.4. Ravnotežni parametri vezivanja hormona za GR

Prilikom ispitivanja signalnog puta glukokortikoida, posebnu pažnju treba obratiti i na funkcionalne parametre GR-a. Stoga je pored promena u relativnim koncentracijama GR proteina, u citosolima visceralnog masnog tkiva analiziran i uticaj fruktoze, stresa i njihove kombinacije na ravnotežne parametre vezivanja hormona za receptor. Određeni su ravnotežna konstanta disocijacije (K_D), koja odgovara koncentraciji hormona pri kojoj se postiže zasićenje polovine vezivnih mesta receptora, a obrnuto je proporcionalna afinitetu receptora, i B_{max} koji predstavlja maksimalan broj vezivnih mesta za hormon. Numeričke vrednosti ovih funkcionalnih parametara GR-a izračunate su iz tipičnih krivih zasićenja koje su dobijene praćenjem kompetitivnog vezivanja radioaktivno obeleženog [3H]Dex-a i neobeleženog Dex-a za GR u inkubacionim smešama sa različitim koncentracijama hormona. Nakon toga, izračunat

je i vezivni potencijal GR-a koji predstavlja odnos B_{max}/K_D . Statistička analiza (dvostruka ANOVA) rezultata ukazuje da nema značajnih promena ni u jednoj od ispitanih karakteristika receptora između tretiranih i netretiranih adultnih ženki (Slika 4.5).



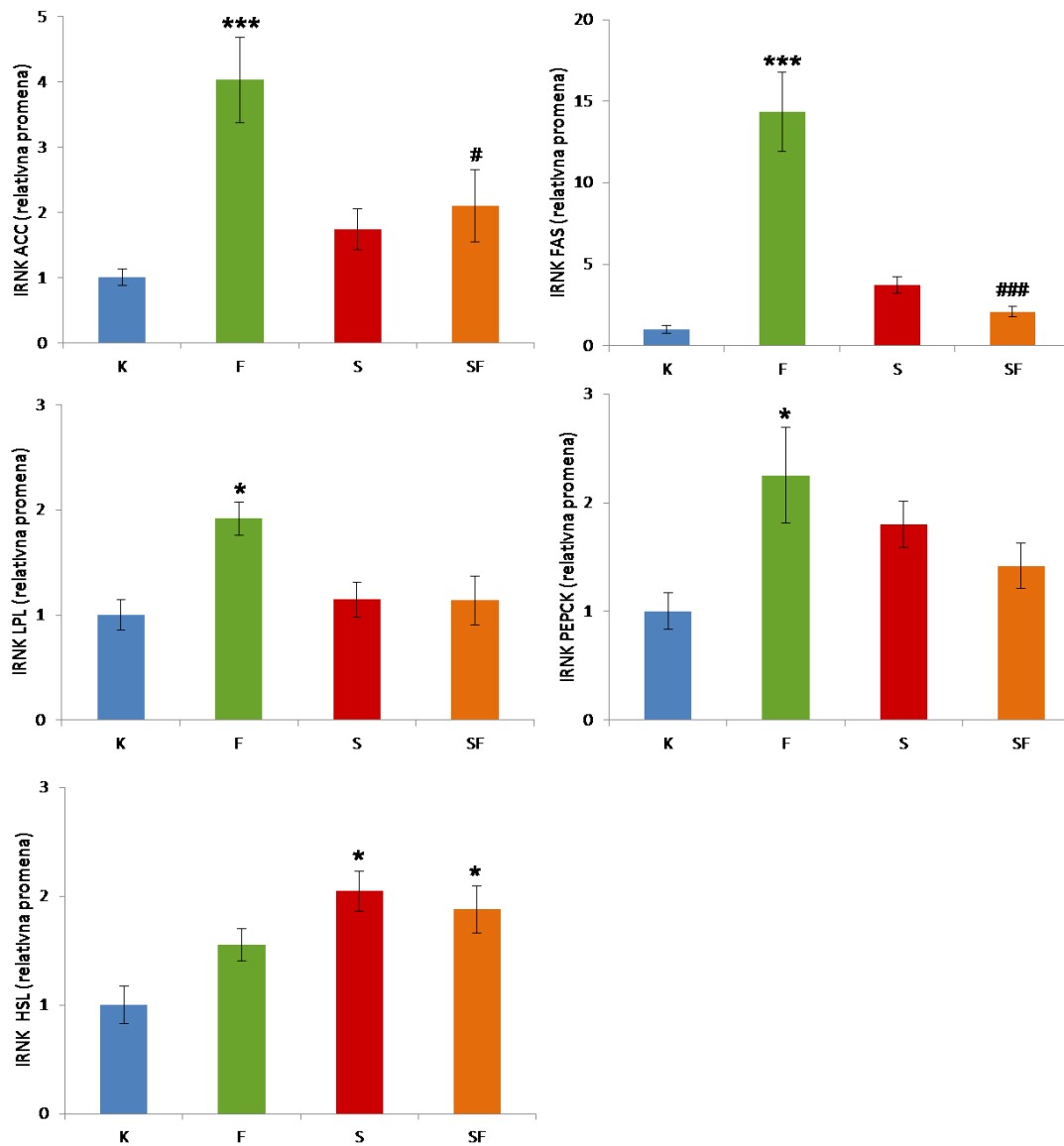
Slika 4.5. Ravnotežni parametri vezivanja deksametazona za GR u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Alikvoti citosola visceralnog masnog tkiva adultnih ženki inkubirani su (18 h, 0°C) sa 7 različitih koncentracija [³H]deksametazona (1-70 nM) u prisustvu i odsustvu 100 puta veće koncentracije neobeženog deksametazona. Nevezani steroid je uklonjen adsorpcijom na dekstran obložen aktivnim ugljem. Krive zasićenja iz kojih su izračunate numeričke vrednosti za ravnotežnu konstantu disocijacije – K_D i broj vezivnih mesta za hormona – B_{max} , fitovane su pomoću softverskog paketa GraphPad Prism v4.0. Veživni potencijal GR-a je izračunat kao odnos B_{max}/K_D . Sva merenja su rađena u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Nije bilo statistički značajnih promena između grupa (dvostruka ANOVA).

4.2.5. Ekspresija gena lipidnog metabolizma regulisanih GR-om

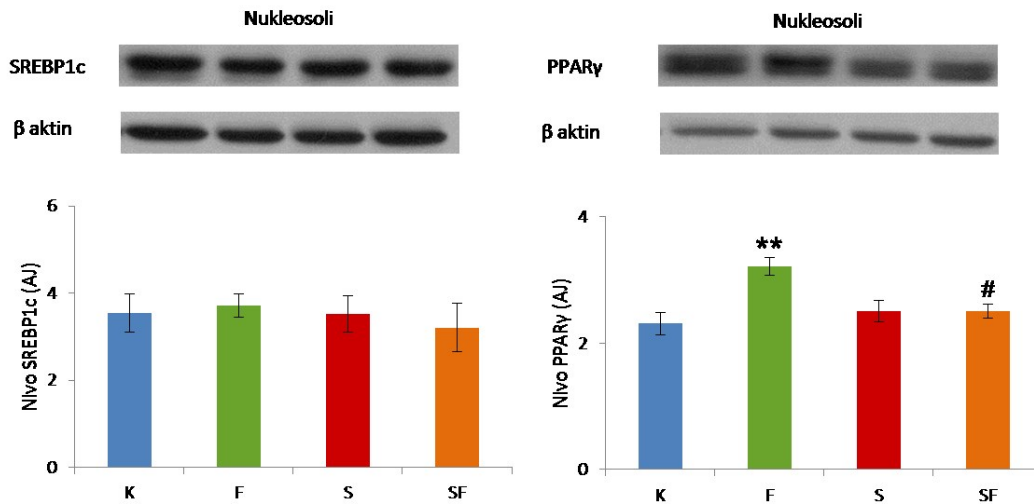
Ekspresija gena uključenih u regulaciju lipidnog metabolizma u visceralnom masnom tkivu a koji su regulisani GR-om ispitana je RT-PCR metodom. Značajan efekat fruktoze detektovan je za gene koji kodiraju enzime uključene u proces lipogeneze: LPL [F (1,26)=6,24; P<0,05], ACC [F (1,29)=16,34; P<0,001], FAS [F (1,24)=21,83; P<0,0001] kao i efekat interakcije fruktoze i stresa za: LPL [F (1,26)=6,46; P<0,05], ACC [F (1,29)=7,18; P<0,05], FAS [F (1,24)=35,55; P<0,00001] i PEPCK [F (1,29)=7,93; P<0,01]. Stres je ostvario efekat na gen za HSL [F (1,20)=8,89; P<0,01], glavni regulatorni enzim u procesu razgradnje lipida. Dalje, nivo iRNK za sve ispitivane enzime uključene u proces lipogeneze bio je povećan u visceralnom masnom tkivu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu (P<0,001 za ACC i FAS, P<0,05 za LPL i PEPCK). Nasuprot tome, nivo iRNK za HSL je bio povećan (P<0,05) u obe grupe životinja izlaganih stresu nezavisno od rezima ishrane, u poređenju sa netretiranim životinjama. Ženke na ishrani bogatoj fruktozom koje su izlagane stresu su imale niži nivo iRNK za ACC (P<0,05) i FAS (P<0,001) u poređenju sa ženkama na istoj ishrani koje nisu izlagane stresu ([Slika 4.6.](#)).

4.2.6. Nivo transkripcionih regulatora uključenih u metabolizam lipida

Ispitivanje nivoa jedarnih proteina SREBP1c i PPAR γ , važnih transkripcionih regulatora u adipocitima, pokazala su značajan efekat fruktoze [F (1,12)=9,30; P<0,01] i interakcije fruktoze i stresa [F (1,12)=9,14; P<0,01] na nivo proteina PPAR γ , te je pokazano značajno povećanje nivoa ovog proteina kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu u odnosu na kontrolnu grupu (P<0,01). Dodatno, pokazano je smanjenje nivoa PPAR γ proteina kod ženki kombinovanog tretmana u odnosu na F grupu ženki (P<0,05). Nivo SREBP1c proteina nije bio promenjen pod uticajem ni jednog od ispitivanih tretmana ([Slika 4.7.](#)).



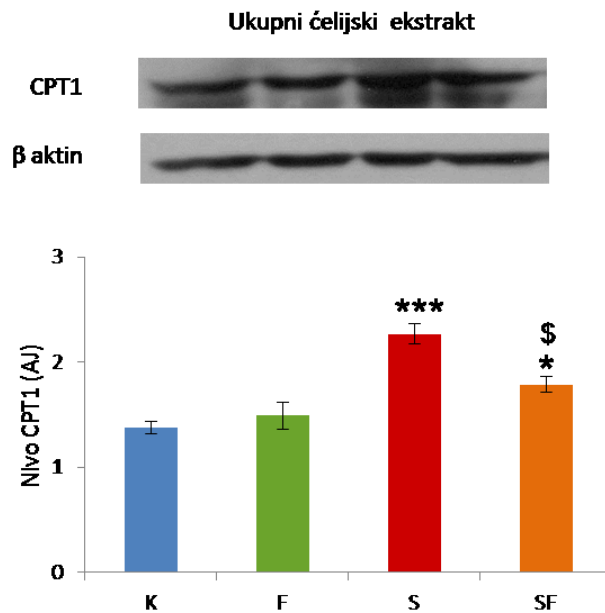
Slika 4.6. Relativna koncentracija iRNK za enzime lipidnog metabolizma regulisane GR-om u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNK za ACC, FAS, LPL, PEPCK i HSL ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima visceralnog masnog tkiva adultnih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplicatu. Prikazane su srednje vrednosti ± SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05, F, S ili SF u odnosu na K; ***P<0,001, F u odnosu na K; #P<0,05 i ###P<0,001, SF u odnosu na F.



Slika 4.7. Nivo transkripcionih regulatora metabolizma lipida u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo SREBP1c i PPAR γ proteina određen je Western blot metodom u nukleosolima visceralnog masnog tkiva ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju ispitivanim proteinima i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta SREBP1c, PPAR γ i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo SREBP1c i PPAR γ izražen je u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): ** $P < 0,01$, F u odnosu na K; # $P < 0,05$, SF u odnosu na F.

4.2.7. Nivo enzima CPT1

Nivo proteina CPT1, ključnog enzima za transport slobodnih masnih kiselina u mitohondrije i regulaciju β -oksidacije, određen je Western blot metodom u visceralnom masnom tkivu ženki sve četiri eksperimentalne grupe. Dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat samostalno primenjenog stresa [$F(1,12)=41,30$; $P < 0,0001$] i interakcije stresa i fruktoze [$F(1,12)=10,48$; $P < 0,01$] na nivo CPT1 proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima. Naime, post-hoc testom detektovano je povećanje nivoa CPT1 proteina kod stresiranih ženki na standardnoj ishrani ($P < 0,001$) i ishrani obogaćenoj fruktozom ($P < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i smanjenje kod stresiranih ženki koje su pile fruktozu u odnosu na stresirane ženke na standardnoj ishrani ($P < 0,05$) (Slika 4.8.).



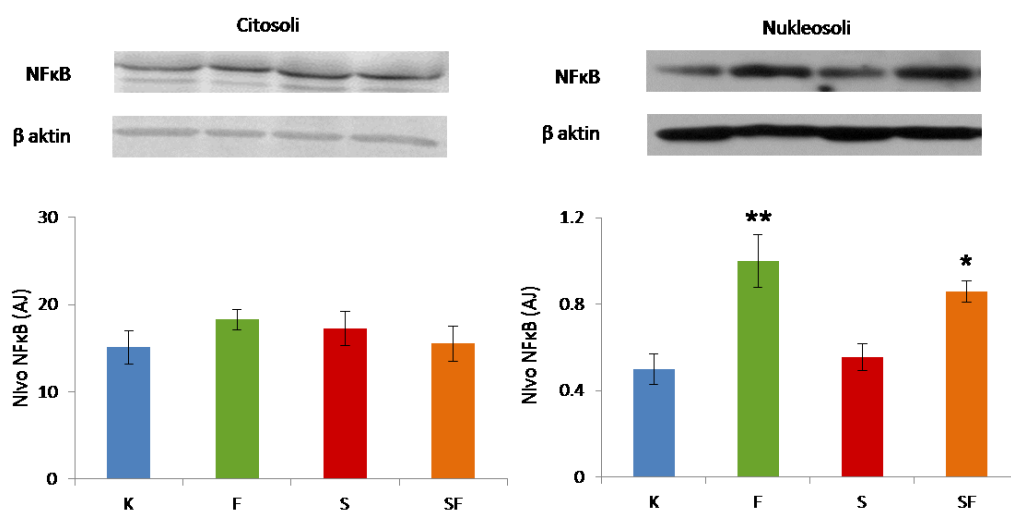
Slika 4.8. Nivo CPT1 proteina u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo CPT1 određen je Western blot metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu visceralnog masnog tkiva ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju CPT1 i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta CPT1 i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo CPT1 je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P < 0,05$, SF u odnosu na K; *** $P < 0,001$, S u odnosu na K; § $P < 0,05$, SF u odnosu na S.

4.2.8. Inflamatorni status visceralnog masnog tkiva

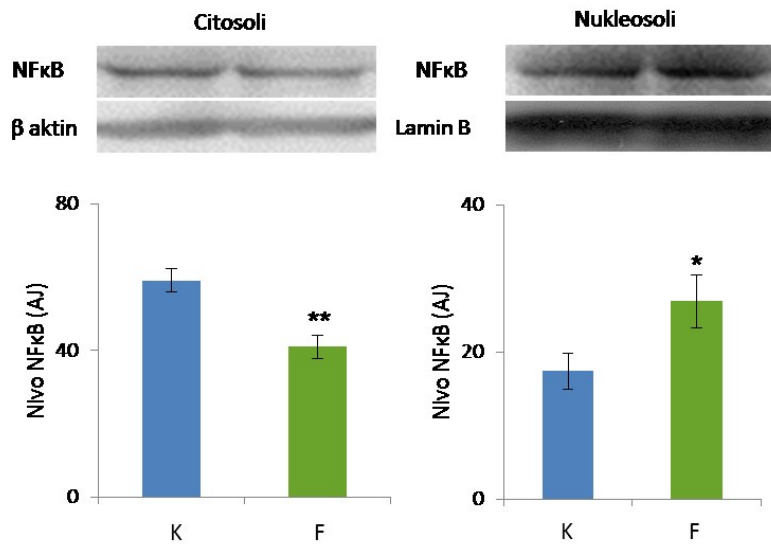
Važan aspekt ispitivanja uticaja fruktoze i stresa na visceralno masno tkivo jeste analiza inflamatornog statusa ovog tkiva, s obzirom da je poznato da je gojaznost praćena hroničnom inflamacijom niskog intenziteta i da se fruktoza dovodi u vezu sa promenama endokrine funkcije visceralnog masnog tkiva uključujući povećanu produkciju proinflamatornih markera.

Imajući predhodno u vidu, Western blot metodom ispitan je proteinski nivo i unutarćelijska distribucija NF κ B, inducibilnog transkripcionog regulatora koji ima esencijalnu ulogu u transkripcionoj aktivaciji proinflamatornih gena. Iako nije detektovana statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa adultnih ženki u proteinskom nivou NF κ B u citoplazmi, dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat

fruktoze [$F(1,10)=27,52$; $P<0,001$] na nivo ovog transkripcionog regulatora u jedru. Naime, fruktoza je značajno povećala nivo NF κ B kod nestresiranih životinja koje su pile fruktozu ($P<0,01$) kao i kod životinja izlaganih kombinacijom fruktoze i stresa ($P<0,05$) u odnosu na netretirane životinje (Slika 4.9.). Jedarna akumulacija NF κ B proteina detektovana je i kod mladih ženki koje su pile fruktozu, kod kojih je zabeležen smanjen nivo NF κ B u citoplazmi (za 30%, $P<0,01$) a povećan u jedru (za 60%, $P<0,05$) u odnosu na netretirane mlade ženke (Slika 4.10.).

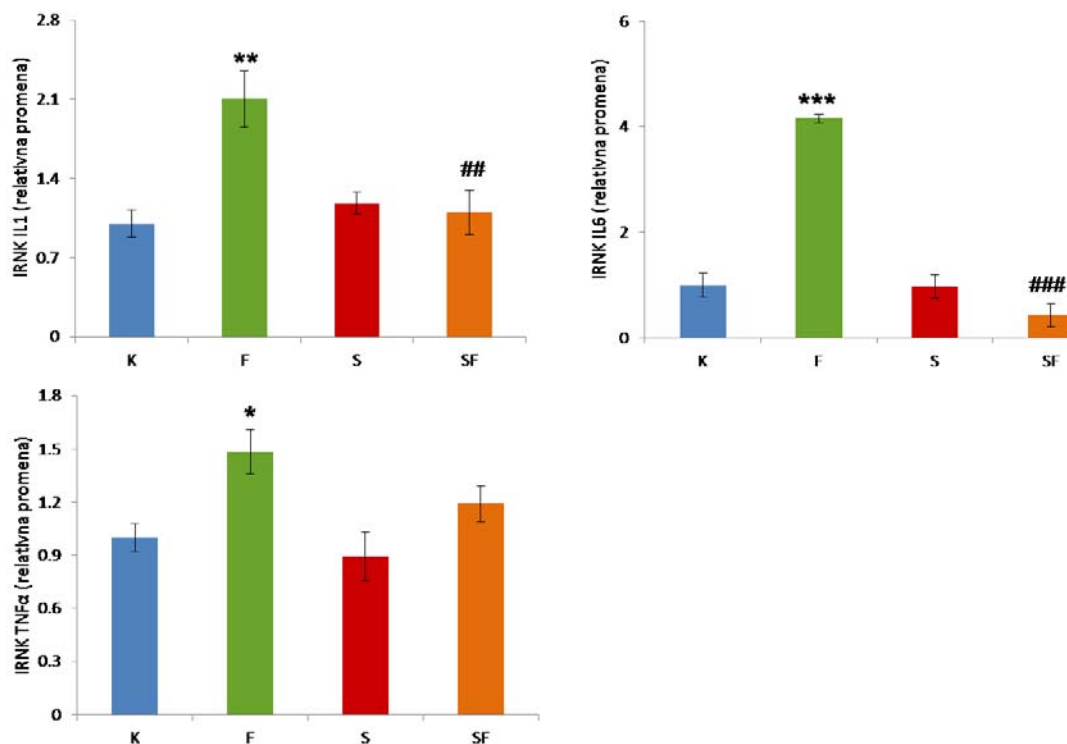


Slika 4.9. Nivo NF κ B proteina i njegova unutarćelijska distribucija u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo NF κ B određen je Western blot metodom u citosolima i nukleosolima visceralnog masnog tkiva ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju NF κ B-u i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta NF κ B i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo NF κ B je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P<0,05$, SF u odnosu na K; ** $P<0,01$, F u odnosu na K.

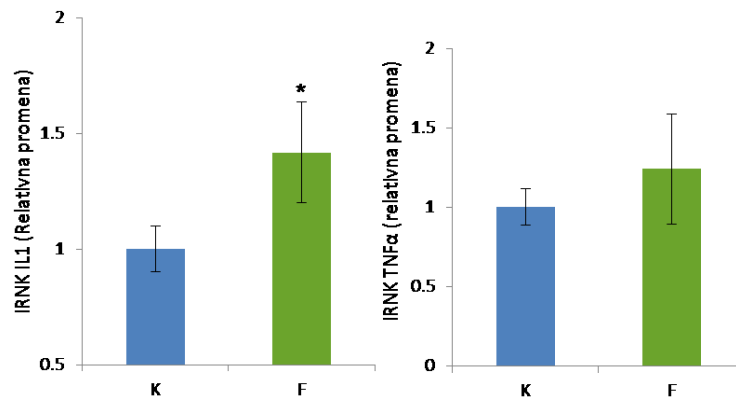


Slika 4.10. Nivo NFκB proteina i njegova unutarćelijska distribucija u visceralnom masnom tkivu mladih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*. Nivo NFκB određen je Western blot metodom u citosolima i nukleosolima visceralnog masnog tkiva mladih ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju NFκB i laminu B merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta NFκB-a i lamina B traka za svaki uzorak. Relativni nivo NFκB-a je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Statistička značajnost (Studentov t-test): ** $P < 0,01$, F u odnosu na K (citosoli); * $P < 0,05$, F u odnosu na K (nukleosoli).

Ispitivanje inflamatornog statusa visceralnog masnog tkiva nastavljeno je analizom nivoa iRNK za proinflamatorne citokine RT-PCR metodom. Dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat fruktoze, IL1 [F (1,30)=7,97; $P < 0,01$], IL6 [F (1,27)=20,97; $P < 0,0001$], TNFα [F (1,29)=12,18; $P < 0,01$], efekat stresa, IL1 [F (1,30)=5,11; $P < 0,05$], IL6 [F (1,27)=43,13; $P < 0,0001$], kao i njihove interakcije, IL1 [F (1,30)=10,69; $P < 0,01$], IL6 [F (1,27)=41,86; $P < 0,000001$]. Primenjeni tretmani su uticali na značajno povećanje nivoa iRNK za sva tri proinflamatorna citokina kod nestresiranih adultnih ženki koje su pile fruktozu i to IL1 ($P < 0,01$) i IL6 ($P < 0,001$) u odnosu na sve ostale adultne grupe životinja, kao i povećanje TNFα ($P < 0,05$) u odnosu na netretirane adultne ženke. Kod adultnih ženki koje su bile izlagane kombinacijom tretmana detektovano je smanjenje nivoa iRNK koje nose informacije za IL1 ($P < 0,01$) i IL6 ($P < 0,001$) u odnosu na F grupu adultnih ženki (Slika 4.11.). Povećan nivo iRNK za IL1 ($P < 0,05$) detektovan je i kod mladih ženki koje su pile fruktozu dok nivo ekspresije TNFα kod mladih ženki nije bio promenjen (Slika 4.12.).



Slika 4.11. Relativna koncentracija iRNK za IL1, IL6 i TNF α u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNK za IL1, IL6 i TNF α ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima visceralnog masnog tkiva adultnih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05, **P<0,01 i ***P<0,001, F u odnosu na K; ##P<0,01 i ###P<0,001, SF u odnosu na F.



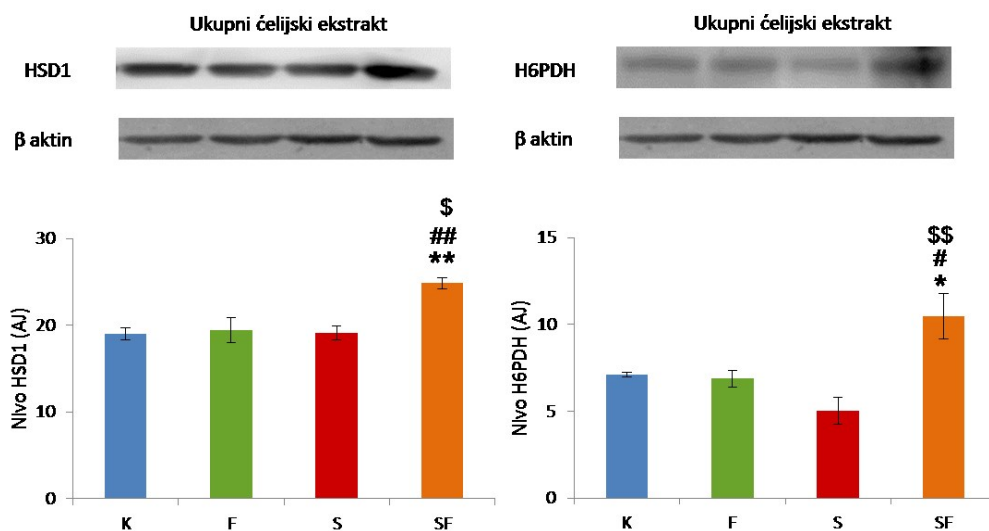
Slika 4.12. Relativna koncentracija iRNA za IL1 i TNF α u visceralnom masnom tkivu mladih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*. Relativna koncentracija iRNA za IL1 i TNF α ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima visceralnog masnog tkiva mladih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (Studentov t-test): *P<0,05, F u odnosu na K.

4.3. Hipotalamus

Hipotalamus predstavlja jedan od glavnih centara regulacije unosa hrane u organizam kao i kontrole odgovora i adaptacije organizma na stres. Između različitih jedara hipotalamusa nalazi se razvijena neuronska mreža oreksigenih i anoreksigenih puteva koji regulišu energetske status organizma kroz kontrolu apetita i potrošnju energije. Glukokortikoidi kao hormoni stresa i regulatori energetske metabolizma ostvaruju svoje efekte i u hipotalamusu, gde utiču na centre za modulaciju odgovora organizma na stres i ekspresiju neuropeptida koji regulišu unos energije. Stoga je u hipotalamusu ženki pacova izlaganih ishrani bogatoj fruktozom, hroničnom stresu i njihovoj kombinaciji ispitan signalni put glukokortikoida, signalni put anoreksigenog hormona leptina, kao i nivoi oreksigenih neuropeptida. Inflamacija se sve češće dovodi u vezu sa razvojem gojaznosti i metaboličkog sindroma, a glukokortikoidi kao poznati modulatori inflamatornih procesa mogli bi ostvariti ulogu u zaštiti hipotalamusa od razvoja inflamacije. U ovoj studiji ispitan je i inflamatorni status hipotalamusa određivanjem nivoa NF κ B i I κ B proteina, i ekspresije proinflamatornih citokina: IL1, IL6 i TNF α .

4.3.1. Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

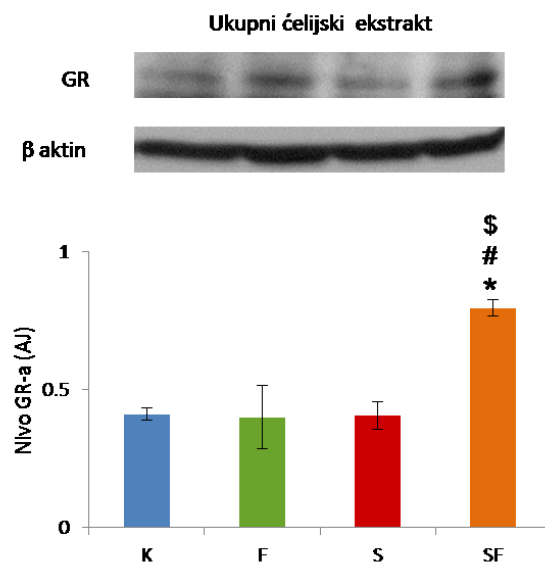
Prereceptorski metabolizam glukokortikoida u hipotalamusu ispitan je analizom proteinskog nivoa HSD1 i H6PDH, enzima zaduženih za tkivnu regeneraciju glukokortikoidnih hormona. Dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat stresa [F (1,11)=7,64; P<0,05], fruktoze [F (1,11)=9,44; P<0,05] i njihove interakcije [F (1,11)=7,19; P<0,05] na nivo HSD1 proteina. Post-hoc testom detektovano je povećanje nivoa HSD1 kod ženki izlaganih kombinaciji stresa i ishrane bogate fruktozom u odnosu na netretirane i nestrisirane ženke koje su pile frukozu (P<0,01) kao i u odnosu na stresirane životinje na standardnoj ishrani (P<0,05) (Slika 4.13.). Takođe, kod stresiranih ženki koje su pile fruktozu detektovan je i povećan nivo H6PDH proteina u odnosu na K (P<0,05), F (P<0,05) i S (P<0,01) grupu kao posledica efekata fruktoze [F (1,12)=10,65; P<0,01] i njene interakcije sa stresom [F (1,12)=12,74; P<0,01] (Slika 4.13.).



Slika 4.13. Nivo proteina HSD1 i H6PDH u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Ukupni ćelijski ekstrakt hipotalamusa adultnih ženki analiziran je Western blot metodom. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju HSD1, H6PDH i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta HSD1 odnosno H6PDH i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo HSD1 i H6PDH je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05 i **P<0,01, SF u odnosu na K; #P<0,05 i ##P<0,01, SF u odnosu na F; \$P<0,05 i \$\$P<0,01, SF u odnosu na S.

4.3.2. Nivo GR proteina

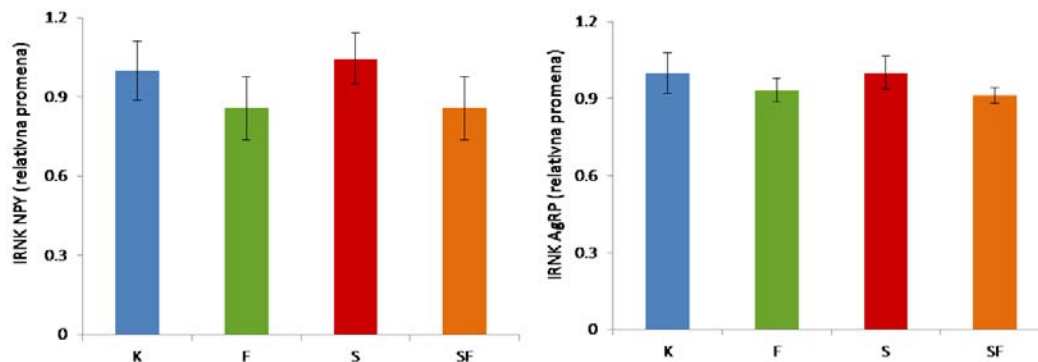
Western blot metodom određen je nivo proteina GR u ukupnim ćelijskim ekstraktima hipotalamusa. Dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat stresa [F (1,4)=9,07; P<0,05], fruktoze [F (1,4)=8,50; P<0,05] i njihove interakcije [F (1,4)=9,41; P<0,05]. Post-hoc testom utvrđeno je povećanje nivoa proteina GR kod stresiranih ženki na ishrani bogatoj fruktozom u odnosu na sve ostale grupe (P<0,05) (Slika 4.14.).



Slika 4.14. Nivo GR proteina u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo GR-a određen je Western blot metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa adultnih ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju GR-u i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta GR-a i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo GR-a je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti ± SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05, SF u odnosu na K; #P<0,05, SF u odnosu na F; ^SP<0,05, SF u odnosu na S.

4.3.3. Ekspresija gena za oreksigene neuropeptide

Ispitivanje nivoa iRNK za oreksigene neuropeptide, NPY i AgRp, RT-PCR metodom, nije pokazalo značajan efekat ni jednog od primenjenih tretmana (Slika 4.15.).



Slika 4.15. Relativna koncentracija iRNA za NPY i AgRP u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNA za NPY i AgRP merena je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima hipotalamusa adultnih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Nije bilo statistički značajnih promena između grupa (dvostruka ANOVA).

4.3.4. Nivo leptina, ObRb-a i inhibitora leptinskog puta

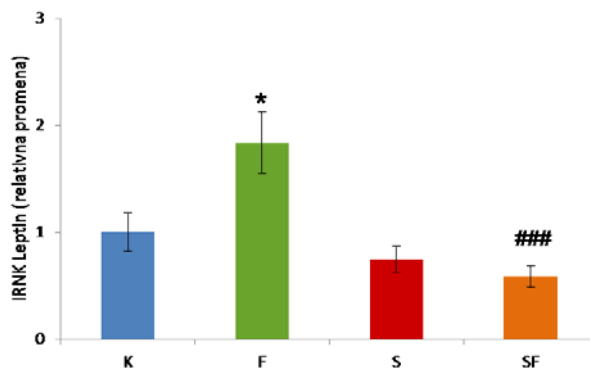
Leptin je hormon koji se sintetiše i oslobađa iz ćelija masnog tkiva u cirkulaciju odakle preko krvno-moždane barijere dospeva do ciljnih delova mozga u kojima preko receptora ostvaruje svoje funkcije. Leptinska signalizacija ispitana je analizom nivoa iRNA za leptin u adipocitima visceralnog masnog tkiva i proteinskog nivoa leptina sekretovanog u cirkulaciju. Takođe, u hipotalamusu je ispitan proteinski nivo i nivo iRNA za ObRb kao i nivo transkripcije gena za SOCS3, inhibitora signalnog puta leptina u hipotalamusu.

Dvostruka ANOVA pokazala je značajan efekat stresa [$F(1,29)=17,06$; $P<0,001$] i interakcije stresa i fruktoze [$F(1,29)=7,45$; $P<0,05$] na nivo iRNA za leptin u adipocitima. Post-hoc testom zabeleženo je povećanje iRNA za leptin kod nestresiranih životinja koje su pile fruktozu u odnosu na netretirane životinje ($P<0,05$) kao i značajno smanjenje njegovog nivoa kod stresiranih životinja koje su pile fruktozu u poređenju sa nestresiranim životinjama na istom režimu ishrane ($P<0,001$) (Slika 4.16).

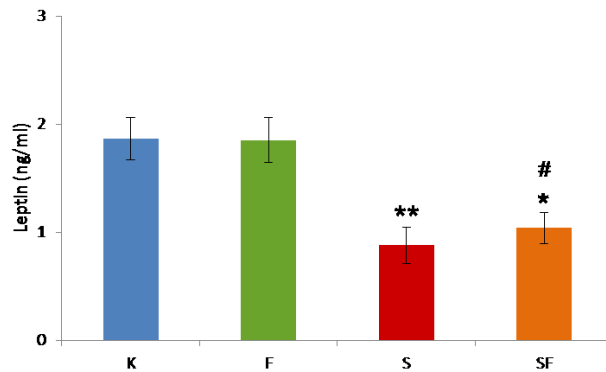
Stres je ostvario značajan efekat [$F(1,33)=25,81$; $P<0,0001$] na nivo leptina u plazmi, što se ogleda u njegovom smanjenju kod grupa izlaganih stresu na standardnoj ($P<0,01$) i ishrani bogatoj fruktozom ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu kao i smanjenju kod stresiranih ženki koje su pile fruktozu u odnosu na nestresirane ženke na ishrani bogatoj fruktozom ($P<0,05$) (Slika 4.17.).

Ishrana obogaćena fruktozom i izlaganje stresu nisu uticali na nivo ObRb proteina kao ni na nivo iRNK za ObRb u hipotalamusu bilo da su primenjeni samostalno ili u kombinaciji (Slika 4.18.).

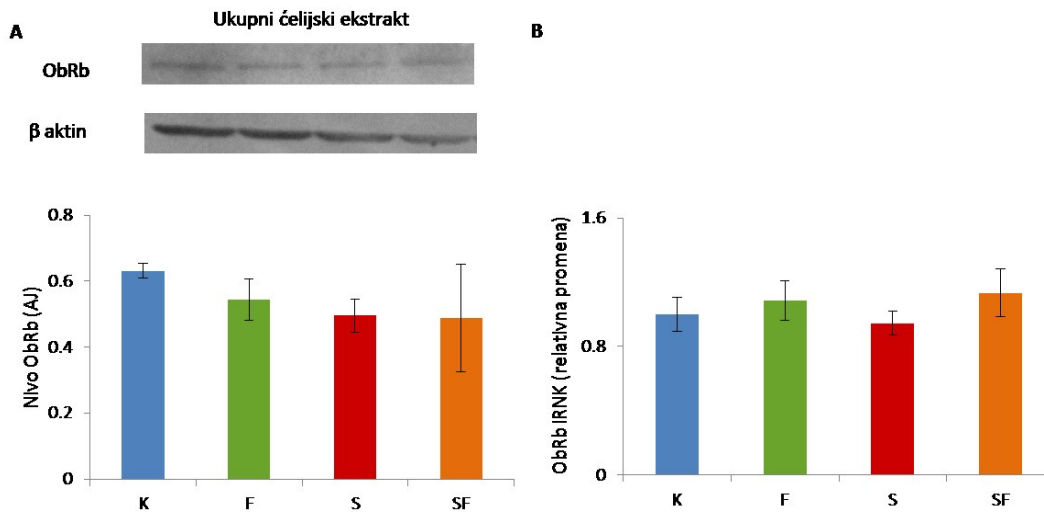
Sa druge strane, značajan efekat stresa [$F(1,20)=223,42$; $P<0,0001$] i fruktoze [$F(1,20)=15,51$; $P<0,001$] na nivo iRNK za SOCS3 doveo je do njegovog smanjenja kod obe stresirane grupe nezavisno od režima ishrane u poređenju sa kontrolnom grupom ($P<0,001$). Smanjenje je detektovano i kod stresiranih ženki na ishrani bogatoj fruktozom u odnosu na životinje izlagane samo stresu ($P<0,05$) i životinje samo na ishrani obogaćenoj fruktozom ($P<0,001$) (Slika 4.19.).



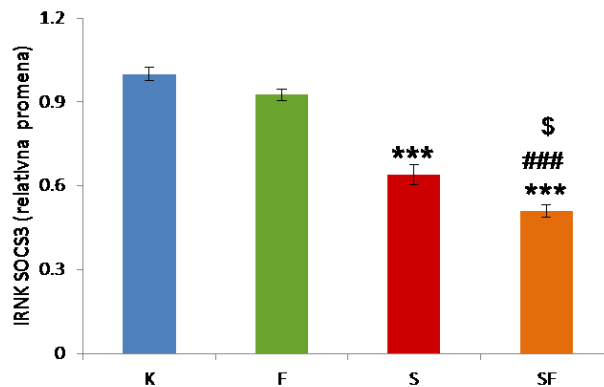
Slika 4.16. Relativna koncentracija iRNK za leptin u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNK za leptin ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima hipotalamusa adultnih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu ($n=9$ životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P<0,05$, F u odnosu na K; ### $P<0,001$, SF u odnosu na F.



Slika 4.17. Koncentracija leptina u plazmi adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Koncentracija leptina merena je ELISA metodom u plazmi ženki. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): * $P < 0,05$, SF u odnosu na K; ** $P < 0,01$, S u odnosu na K; # $P < 0,05$, SF u odnosu na F.



Slika 4.18. Ekspresija ObRb-a u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. **A)** Nivo proteina ObRb određen je Western blot metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju ObRb-u i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta ObRb-a i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo ObRb-a je izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM. **B)** Relativna koncentracija iRNK za ObRb ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplicatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu ($n=9$ životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Nije bilo statistički značajnih promena između grupa (dvostruka ANOVA).

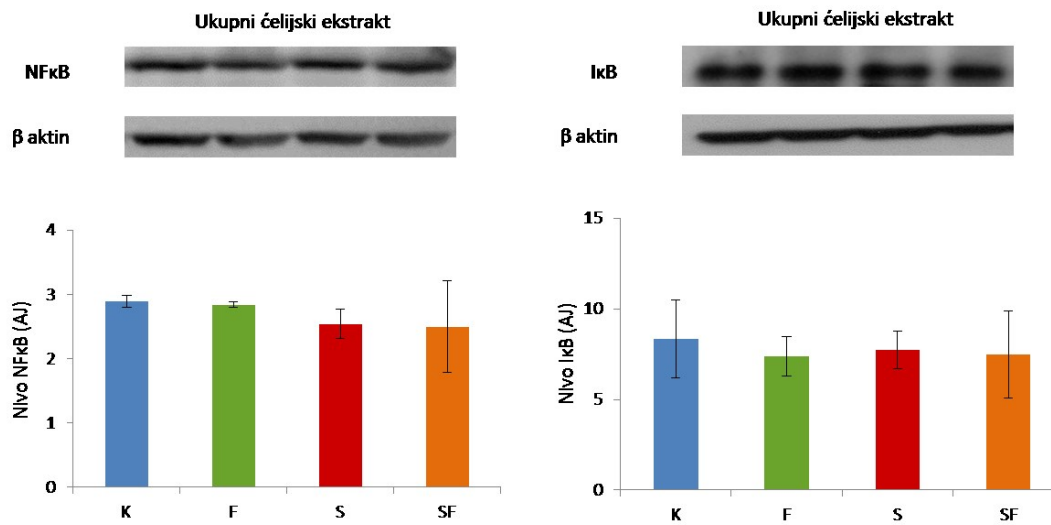


Slika 4.19. Relativna koncentracija iRNA za SOCS3 u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNA za SOCS3 ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima hipotalamusa adultnih ženki. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): ***P<0,001, S ili SF u odnosu na K; ###P<0,001, SF u odnosu na F; [§]P<0,05, SF u odnosu na S.

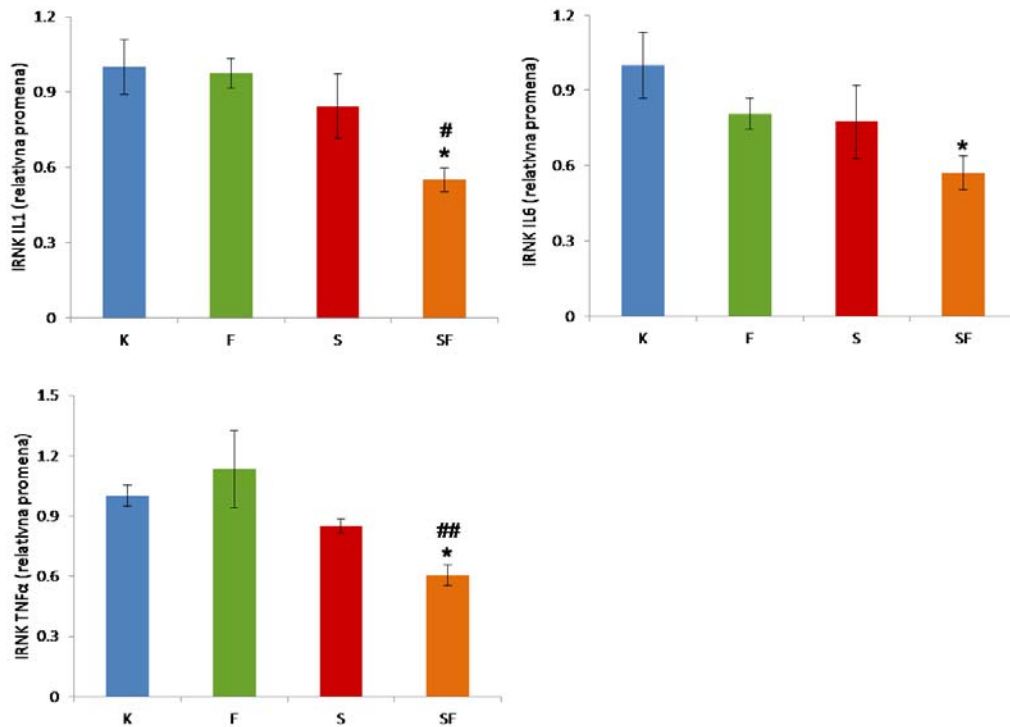
4.3.5. Inflamatorni status hipotalamusa

S obzirom da su metabolički poremećaji često praćeni lokalnom, tkivnom inflamacijom i da je jedna od veoma važnih uloga glukokortikoida sprečavanje inflamatornih procesa, od posebnog značaja za ovu studiju bilo je ispitivanje parametara inflamaciju u hipotalamusu.

Ispitivanje nivoa proteina NF κ B i njegovog inhibitora I κ B, pokazalo je da nijedan od primenjenih tretmana samostalno ili u kombinaciji nije doveo do promena u njihovom nivou (Slika 4.20.). S druge strane, analize nivoa iRNA za proinflamatorne citokine pokazale su značajan efekat stresa na IL1[F (1,19)=9,18; P<0,01], IL6 [F (1,20)=4,54; P<0,05] i TNF α [F (1,16)=14,95; P<0,01] kao i efekat interakcije stresa i fruktoze na TNF α [F (1,16)=4,67; P<0,05]. Post-hoc testom detektovan je smanjen nivo iRNA za IL1, IL6 i TNF α (P<0,05) kod stresiranih ženki koje su pile fruktozu u odnosu na netretirane ženke, kao i smanjen nivo IL1 (P<0,05) i TNF α (P<0,01) kod iste grupe ženki u odnosu na ženke koje su pile samo fruktozu (Slika 4.21.).



Slika 4.20. Nivo NFκB i IκB proteina u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Nivo NFκB i IκB određen je Western blot metodom u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa ženki. Relativna integrisana optička gustina imunoreaktivnih traka koje odgovaraju ispitivanim proteinima i β aktinu merena je pomoću softvera ImageQuant. Korekcija nejednakog nanošenja uzoraka na gel izvršena je izračunavanjem odnosa intenziteta NFκB, IκB i β aktinskih traka za svaki uzorak. Relativni nivo ispitivanih proteina izražen je u arbitrarnim jedinicama (AJ). Prikazane su srednje vrednosti ± SEM. Nije bilo statistički značajnih promena između grupa ni za jedan od ispitivanih proteina (dvostruka ANOVA).



Slika 4.21. Relativna koncentracija iRNA za IL1, IL6 i TNF α u hipotalamusu adultnih ženki pacova. Grupe: K – kontrola; F – životinje hranjene 10% rastvorom fruktoze *ad libitum*; S – životinje na standardnoj ishrani izlagane hroničnom nepredvidivom stresu; SF – životinje koje su konzumirale fruktozu i izlagane hroničnom nepredvidivom stresu. Relativna koncentracija iRNA za IL1, IL6 i TNF α ispitana je metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu pomoću Taqman proba i prajmera, u uzorcima hipotalamusa adultnih. Rezultati su analizirani komparativnom Ct metodom. Za normalizaciju je korišćen HPRT1. Svi uzorci rađeni su u triplikatu. Prikazane su srednje vrednosti \pm SEM izračunate za svaku grupu (n=9 životinja po grupi) i izražene kao promena u odnosu na srednju vrednost odgovarajućih kontrola. Statistička značajnost (dvostruka ANOVA): *P<0,05, SF u odnosu na K; [#]P<0,05 i ^{##}P<0,01, SF u odnosu na F.

5. Diskusija

Glukokortikoidni hormoni predstavljaju veoma važne regulatore energetskog metabolizma i odgovora organizma na stres. Narušen signalni put glukokortikoida nalazi se u osnovi mnogih poremećaja i bolesti. U novije vreme glukokortikoidi su dovedeni u vezu sa nastankom i razvojem metaboličkog sindroma koga čini skup biohemijskih i kliničkih karakteristika poput visceralne gojaznosti, insulinske rezistencije, hipertenzije, hiperglikemije i hipertrigliceridemije. Metabolički sindrom je okarakterisan kao bolest modernog doba i zadobija sve veću pažnju naučne zajednice i svetske zdravstvene organizacije budući da predstavlja faktor rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Naime, moderan način života karakterišu povećan unos prerađene, visokokalorične hrane bogate fruktozom i svakodnevna izloženost stresu. Savremen čovek ne unosi više fruktozu samo putem voća i povrća, već i kroz „brzu“, konzerviranu hranu i pića, u koje se fruktoza obilato dodaje radi poboljšanja ukusa. Tokom proteklih nekoliko decenija zabeleženo je izrazito povećanje unosa fruktoze koje koincidira sa dramatičnim porastom broja osoba koje pate od metaboličkog sindroma. Dodatno, savremeni čovek je opterećen raznim oblicima odgovornosti na poslu, u porodici i u društvu te je hronični stres prepoznat kao sveprisutni deo života čoveka. Sve je više studija koje ukazuju na povezanost hroničnog stresa sa metaboličkim sindromom i poremećajima koji ulaze u njegov sastav.

Istraživanja sprovedena ovim doktorskim radom predstavljaju doprinos boljem razumevanju molekularnih mehanizama kojima fruktoza uneta ishranom i izlaganje hroničnom nepredvidivom stresu odvojeno ili u kombinaciji utiču na signalni put glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu, doprinoseći razvoju karakteristika metaboličkog sindroma kod ženki pacova. U tu svrhu ispitani su efekti fruktoze, hroničnog stresa i njihove kombinacije na nivo enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, nivo i unutarćelijsku distribuciju GR-a kao i ekspresiju gena regulisanih GR-om a koji su uključeni u lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i koji regulišu apetit u hipotalamusu. Posebna pažnja je posvećena ispitivanju signalnog puta leptina u hipotalamusu kao i inflamatornog statusa oba pomenuta tkiva.

5.1. Efekat fruktoze i/ili hroničnog nepredvidivog stresa na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu

Brojna ispitivanja beleže da ishrana bogata fruktozom povećava telesnu masu i pospešuje razvoj gojaznosti. Naime, još devedesetih godina prošlog veka, Tordoff i Alleva (1990) su ukazali da konzumiranje pića zaslađenih fruktozom doprinosi povećanju telesne mase kod muškaraca i žena (Tordoff i Alleva, 1990). Slično je zabeleženo i praćenjem uticaja fruktoze na metabolizam životinja. Pa tako, unos 10% rastvora fruktoze u periodu od tri nedelje je uzrokovao povećanje mase abdominalnog masnog tkiva kod mužjaka pacova (Alzamendi i sar., 2009), a isti efekat zabeležen je kod miševa pri primeni 15% rastvora fruktoze (Jürgens i sar., 2005). Uvećanje telesne mase nakon dvonedeljne ishrane koja sadrži 60% fruktoze pokazano je čak i na modelu hrčka soja *Golden Sirian Hamster*, koji se smatra rezistentnim na metaboličke efekte povećanog unosa ugljenih hidrata (Kasim-Karakas i sar., 1996). Rezultati ove doktorske disertacije na mladim ženkaama su pokazali da je ishrana bogata fruktozom dovela do povećanja mase visceralnog masnog tkiva i njegovog udela u ukupnoj telesnoj masi (**Tabela 4.2.**). Slično, rezultati Alzamendi i sar., (2010) su pokazali povećanje apsolutne i relativne vrednosti mase masnog tkiva nakon povećanog unosa fruktoze putem ishrane kod ženki pacova (Alzamendi i sar., 2010). Međutim, u velikom broju studija primećeno je da metaboličke promene koje nastaju kao posledica povećanog unosa fruktoze ne uključuju nužno i povećanje telesne mase. Devetonedeljna ishrana obogaćena fruktozom u našoj studiji nije dovela do povećanja telesne mase kao ni mase visceralnog masnog tkiva adultnih nestresiranih ženki pacova (**Tabela 4.1.**). U skladu sa ovim, telesna masa, masa visceralnog masnog tkiva, kao i udeo visceralnog masnog tkiva u telesnoj masi nisu bili promenjeni ni kod mužjaka pacova nakon osmonedeljne (Zubira i sar., 2016) odnosno devetonedeljne (Bursać i sar., 2013) ishrane bogate fruktozom. U nekim studijama ni ishrana koja sadrži 60% fruktozu nije dovela do povećanja telesne mase mužjaka miševa (Tillman i sar., 2014) i pacova (Bursać i sar., 2014). Dodatno, Le i sar., (2010) su pokazali da nakon 4 nedelje primene ishrane bogate fruktozom nema promene telesne mase kao ni procenta masnog tkiva kod zdravih ljudi (Lê i sar., 2006), dok su Suga i sar., (2000) pokazali da ženke pacova sa predispozicijom

za gojaznost usled lezija ventromedijalnog dela hipotalamusa, nisu razvile gojaznost ni uvećanje masnog tkiva nakon dvonedeljne ishrane bogate fruktozom (Suga i sar., 2000). Iako ishrana bogata fruktozom nije uticala na masu visceralnog masnog tkiva nestresiranih ženki u ovde predstavljenoj studiji, histološka analiza ovog tkiva pokazala je prisustvo ostrvaca malih adipocita (**Slika 4.1.**). Ovo je vrlo značajno zapažanje zato što ukazuje na prisustvo adipogeneze i pripremu tkiva za proširivanje kapaciteta za dodatnu akumulaciju energije u vidu masti. Adipogeni uticaj fruktoze primećen u našem istraživanju u skladu je sa rezultatima nekoliko studija koje ukazuju da fruktoza ostvaruje uticaj na proces adipogeneze. Pa tako, obogaćenje standardnog medijuma fruktozom stimuliše adipogenezu u ćelijskoj kulturi na dozno-zavistan način (Du i Heaney, 2012). Da dobijeni efekat nije posledica samo povećanog izvora energije u medijumu, ukazuju rezultati po kojima je fruktoza efikasnija od glukoze u pokretanju diferencijacije adipocita (Legeza i sar., 2014; Zubira i sar., 2016). Stoga, adipociti u kulturi mogu efikasno da koriste fruktozu kao jedini izvor ugljenih hidrata i ona je dovoljna za uspešnu diferencijaciju adipocita (Legeza i sar., 2014). Slično je pokazano i u *in vivo* uslovima, te se ostrvca malih adipocita uočavaju na histološkim presecima visceralnog masnog tkiva mužjaka nakon ishrane sa visokim sadržajem fruktoze (Bursać i sar., 2014). Dodatno, kada se preadipociti iz masnog tkiva životinja hranjenih fruktozom gaje u kulturi, oni daju veći broj potpuno diferenciranih adipocita u odnosu na preadipocite iz masnog tkiva kontrolnih pacova (Zubira i sar., 2016). Dakle, fruktoza može da poveća sposobnost ćelija masnog tkiva da se diferenciraju i da odgovore na proadipogene stimuluse. Ishrana bogata fruktozom primenjena u našoj studiji predstavlja vid energetske opterećenja za adultne nestresirane ženke što je signal za inicijaciju adipogeneze i formiranje ostrvaca malih adipocita u visceralnom masnom tkivu ovih ženki.

Veliki broj studija ukazuje da fruktoza izaziva energetske disbalans i opterećenje. Hrana bogata fruktozom je veoma prijatnog ukusa, te se u studijama efekata fruktoze najčešće prijavljuje povećan energetske unos zasnovan na povećanom unosu hrane koja sadrži fruktozu u odnosu na unos standardne hrane (Bursać i sar., 2013, 2014; Zubira i sar., 2016). Zato se postavlja pitanje da li se promene koje se zapažaju nakon povećanog unosa fruktoze mogu pripisati samom šećeru ili povećanom energetske unosu. U našoj studiji adultne nestresirane ženke koje su pile fruktozu nisu

imale promenjen unos energije u odnosu na životinje na standardnoj ishrani. Pretpostavljajući da se životinje nisu razlikovale ni u pogledu energetske potrošnje, moglo bi se zaključiti da adipogeni efekti fruktoze u masnom tkivu nestresiranih ženki nisu posledica povećanog energetskeg unosa, već efekti same fruktoze.

Nasuprot nestresiranim ženkama koje su pile fruktozu, životinje izlagane stresu su imale smanjenu apsolutnu i relativnu masu visceralnog masnog tkiva nezavisno od tipa ishrane (**Tabela 4.1.**). Histološka analiza je pokazala da je masno tkivo ovih životinja sačinjeno od znatno manjih adipocita u poređenju sa kontrolnim jedinkama (**Slika 4.1.**). Literaturni podaci o ulozi stresa u razvoju gojaznosti i efektima na masno tkivo su kontradiktorni. Konstatovano je, na primer, da se izlaganje svakodnevnom stresu nalazi u korelaciji sa povećanjem telesne mase i za 10 kg kod sredovečnih muškaraca (Korkeila i sar., 1998). U trinaestogodišnjoj studiji Fower-Brown i sar., (2009) su pokazali da se sa povećanjem stepena izloženosti stresu povećava i BMI kod polno zrelih žena (Fowler-Brown i sar., 2009). Slično, pacovi izlagani hroničnom nepredvidivom stresu u periodu od 35 dana imali su značajno veći procenat masnog tkiva u organizmu i povećanje intraabdominalnog masnog tkiva u odnosu na nestresirane životinje (Karagiannides i sar., 2014). Međutim, nasuprot prethodnim podacima, mnogo je onih koji govore da svakodnevno izlaganje stresu može dovesti i do gubitka telesne mase. Hronična izolacija miševa uzrokuje smanjenje mase perigonadalnog masnog tkiva i smanjeni prirast telesne mase (Bartolomucci i sar., 2009). Slično, adipociti manjeg dijametra u odnosu na kontrolne životinje primećeni su i kod miševa hronično izlaganih psihosocijalnim stresovima (Bartolomucci i sar., 2009). Hronični stres imobilizacije ima za posledicu gubitak telesne mase kod pacova (Martí i sar., 1994). Pacovi koji su svakodnevno izlagani imobilizacionom stresu u trajanju od dva sata naglo su gubili telesnu masu tokom svih 15 dana primene stresa (Jeong i sar., 2013). Čak i akutno izlaganje stresu u periodu od 3 sata dovodi do smanjenja telesne mase kod pacova, koja ne dostiže nivo kontrolnih životinja ni nakon 10 dana (Rybkin i sar., 1997). Takođe, mnogi ljudi na stres reaguju smanjenjem telesne mase (Dallman i sar., 2003). Studije koje obuhvataju studentsku populaciju ukazuju da mnogi studenti gube na telesnoj masi usled hroničnog stresa učenja i polaganja ispita (Serlachius i sar., 2007).

Još uvek nije u potpunosti jasno koji faktori determinišu da li će izlaganje stresu za posledicu imati povećanje ili smanjenje telesne mase. Jedna od pretpostavki je da je energetski status na početku delovanja stresa bitan činičnik koji može da modifikuje krajnje efekte stresa na telesnu masu ljudi i životinja. Tako, pokazano je da muškarci sa visokim vrednostima BMI, kao posledicu hroničnog stresa povećavaju telesnu masu, dok hronično stresirani muškarci sa niskim vrednostima BMI, s protokom vremena gube na masi (Kivimäki i sar., 2006). Praćenjem 1355 muškaraca i žena kroz period od 9 godina pokazano je da je kod gojaznih muškaraca i žena hronično izlaganje stresu na poslu, u privatnom životu, zbog finansijskih problema i životnih neprilika povezano sa povećanim prirastom telesne mase (Block i sar., 2009). Međutim, kod osoba sa normalnim BMI vrednostima, hroničan stres se nalazi u korelaciji sa smanjenim prirastom telesne mase. U prilog tome idu i rezultati dobijeni u našoj studiji u kojoj su pacovi na početku eksperimenta imali optimalnu telesnu masu koja je odgovarala kontrolnim jedinkama, a nakon devetonedeljnog izlaganja hroničnom stresu imali su smanjenu masu visceralnog masnog tkiva, pa čak i značajno smanjenje telesne mase ukoliko su uz stres bili podvrgnuti i ishrani bogatoj fruktozom.

Dodatno, različiti protokoli stresa pokazuju različite efekte na telesnu masu, te je prednost modela hroničnog nepredvidivog stresa primenjenog u našoj studiji u tome što kombinuje fizičke i psihičke stresore podražavajući tako situacije iz realnog života (Flegal i sar., 2002). Značajno je što i studije koje ispituju efekte kombinacije stresa i hrane bogate ugljenim hidratima, takođe prijavljuju oprečne rezultate. Kuo i sar., (2007) su pokazali povećanu zapreminu visceralnog masnog tkiva kod pacova izlaganih hladnoći u kombinaciji sa ishranom bogatom šećerima i mastima, dok su Michel i sar., (2005) primetili da hroničan stres smanjuje udeo masnog tkiva u telu miševa na hrani sa visokim sadržajem šećera, i to kako kod sojeva podložnih razvoju gojaznosti tako i kod sojeva rezistentnih na gojaznost. Međutim, za sada nema studija koje ispituju efekte hroničnog nepredvidivog stresa u kombinaciji sa ishranom bogatom fruktozom.

Autori koji su pokazali smanjenje mase masnog tkiva kao posledicu stresa često ukazuju i na smanjen apetit navodeći da je nedovoljan unos hranljivih materija bar delimično odgovoran za gubitak mase masnog tkiva. Nasuprot tome, u studiji Jeonga i sar., (2013) primena stresa inicijalno smanjuje apetit i telesnu masu miševa, i to smanjenje mase ostaje značajno do kraja eksperimentalnog perioda iako unos hrane

stresiranih životinja dostiže 90% unosa kontrolnih. Slično, kod pacova hronično izlaganih imobilizacionom stresu smanjenje telesne mase zadržava se čak 40 dana nakon prestanka stresnog tretmana dok je hipogafija trajala samo 4 dana duže od stresa (Harris i sar., 1998). Na sličnu situaciju ukazuju i Uchida i sar., (2012) koji su detektovali smanjenje prinosa telesne mase i mase masnog tkiva kod stresiranih miševa bez promena u količini unete hrane u poređenju sa kontrolnim životinjama. U skladu sa prethodnim, u našoj studiji nije bilo značajnih razlika u energetske unosu između stresiranih i nestresiranih ženki te se smanjena masa visceralnog masnog tkiva stresiranih životinja ne može pripisati smanjenju apetita.

Ideja o učešću glukokortikoidnih hormona i njihovih receptora u patofiziologiji gojaznosti i metaboličkog sindroma, zasnovana je na velikoj fenotipskoj sličnosti između pacijenata sa metaboličkim sindromom i obolelih od Kušingovog sindroma koja se manifestuje kroz hipertenziju, dislipidemiju, visceralnu gojaznost i smanjenu toleranciju na glukozu. Kao posebno značajan efekat glukokortikoida na masno tkivo izdvojio se uticaj ovih hormona na procese lipolize i lipogeneze što ih čini važnim regulatorima energetske fluksa u adipocitima (revidirano u (Wang i sar., 2012)).

Rezultati ovog doktorata su pokazali da nivo kortikosterona u plazmi nije bio promenjen devetonedeljnim tretmanom fruktozom i/ili hroničnim, nepredvidivim stresom. Iako su glukokortikoidi poznati kao hormoni stresa i njihova sinteza i sekrecija su inicirane stresom, uticaj hroničnog, nepredvidivog stresa na nivo glukokortikoida nije uvek praćen povećanjem koncentracije ovih hormona u cirkulaciji. Nedavno su Lu i sar., (2015) pokazali da hronični, nepredvidivi stres ne utiče na nivo kortikosterona u plazmi ženki pacova u diestrusu. Azpiroz i sar., (1999) su takođe prijavili nepromenjen nivo kortikosterona u serumu miševa izlaganih stresu tokom 4 i 7 nedelja, slično kao i Kort i Weijma (1982) koji su ženke *Brown Norway* pacova izlagali dvomesečnom stresu u vidu promene svetlog i tamnog dnevnog ciklusa.

Nepromenjen nivo kortikosterona u plazmi nestresiranih ženki koje su pile fruktozu je u skladu sa našim prethodnim rezultatima koji su pokazali da metaboličke promene izazvane ishranom bogatom fruktozom nisu nužno praćene sistemskim promenama u nivou glukokortikoida (Kovačević i sar., 2014). Pored toga, pokazano je da dvadesetčetvoročasovni i jednonedeljni tretmani 16% rastvorom fruktoze nisu uticali na promene nivoa kortikosterona u cirkulaciji pacova (London i Castonguay, 2011).

Slično, ni mužjaci pacova koji su tokom devet nedelja konzumirali 10% odnosno 60% rastvor fruktoze nisu imali izmenjen nivo kortikosterona (Bursać i sar., 2013, 2014), što je potvrđeno i na modelu hrčka nakon 6 nedelja ishrane koja sadrži 60% fruktoze (Campbell i sar., 2009). Slično tome, zapaženo je da gojaznost nije povezana sa promenama koncentracije glukokortikoida izvan fiziološkog opsega (Salehi i sar., 2005). Studije na životinjama i ljudima ukazuju da je gojaznost praćena povećanom regeneracijom aktivnih formi glukokortikoida unutar samih tkiva (Livingstone i sar., 2000; Rask i sar., 2001). Proces unutarćelijske aktivacije glukokortikoidnog hormona katalizovan je HSD1 enzimom i povećana ekspresija ovog enzima je primećena u masnom tkivu gojaznih osoba. Naime, istraživanja metaboličkih poremećaja pokazuju da gojazne osobe imaju povećan nivo HSD1 u masnom tkivu (Desbriere i sar., 2006), kao i da se aktivnost enzima u ovom tkivu nalazi u pozitivnoj korelaciji sa vrednosti BMI kod žena (Rask i sar., 2002). Nasuprot tome, miševi koji ne poseduju HSD1 pokazuju smanjenu akumulaciju visceralnog masnog tkiva nakon ishrane bogate mastima i ne razvijaju gojaznost ni dijabetes, bez obzira na povećan kalorijski unos u odnosu na genetički neizmenjene miševe na istoj ishrani (Morton i sar., 2004). Rezultati predstavljeni u ovoj tezi pokazali su da fruktoza i stres povećavaju nivo proteina HSD1 i posledično koncentraciju kortikosterona u visceralnom masnom tkivu samo kada se primene u kombinaciji, dok nivo H6PDH, enzima koji je funkcionalno spregnut sa HSD1 nije bio promenjen ni u jednoj od eksperimentalnih grupa ([Slika 4.2.](#) i [Slika 4.3.](#)). Nakon pojedinačnih tretmana nije zabeležena promena nivoa HSD1, što je bilo posebno iznenađujuće za nestresirane ženke koje su pile fruktozu, s obzirom da postoje podaci da fruktoza povećava ekspresiju gena za HSD1 u masnom tkivu pacova (London i Castonguay, 2011) kao i njegovu ekspresiju i aktivnost u 3T3-L1 ćelijskoj kulturi (Legeza i sar., 2014). Takođe, raniji rezultati dobijeni u našoj laboratoriji na mladim ženkama ukazuju da je ishrana obogaćena fruktozom povezana sa povećanjem nivoa proteina HSD1 u visceralnom masnom tkivu (Kovačević i sar., 2014). Moguće je da koncentracija fruktoze i/ili trajanje primenjenog režima ishrane nisu bili dovoljni da ostvare uticaj na prereceptorski metabolizam glukokortikoida u masnom tkivu adultnih ženki, te da izlaganje stresu predstavlja dodatno opterećenje.

U daljem toku istraživanja ispitali smo uticaj fruktoze i/ili stresa na funkciju i ekspresiju GR-a. Naši rezultati pokazuju povećan nivo GR proteina u nukleusima

visceralnog masnog tkiva svih tretiranih grupa životinja u odnosu na netretirane ženke. Istovremeno, detektovano je smanjenje njegovog nivoa u citosolima što ukazuje na hormon-zavisnu aktivaciju receptora kao posledicu delovanja fruktoze, stresa kao i njihove kombinacije ([Slika 4.4.](#)).

Neke studije pokazuju da stres može povećati ekspresiju GR-a na iRNK i proteinskom nivou. Tako, uočeno je da hronični stres izazvan hladnoćom povećava nivo transkripcije gena za GR kao i nivo GR proteina u visceralnom masnom tkivu gojaznih pacova (Nagasawa i sar., 2016), dok je mikročip analizom pokazano da hronični stres povećava ekspresiju GR-a u masnom tkivu pacova kao i mrežu gena koji se nalaze pod regulacijom receptora ukazujući da je receptor funkcionalan (Karagiannides i sar., 2014). Iako u našoj studiji nije zapaženo povećanje proteinskog nivoa GR-a u visceralnom masnom tkivu, izražena akumulacija receptora u jedru ukazuje na to da hronični stres aktivira glukokortikoidnu signalizaciju u ovom tkivu nezavisno od režima ishrane.

Uticaj ishrane bogate fruktozom na glukokortikoidni receptor manje je jasan. Naime, jedarna akumulacija GR-a u visceralnom masnom tkivu pokazana je na modelu mužjaka pacova hranjenih 10% fruktozom (Bursać i sar., 2013), a povećan proteinski nivo GR-a detektovan je i u perirenalnom masnom tkivu fizički aktivnih hrčaka nakon 6 nedelja ishrane obogaćene fruktozom (Campbell i sar., 2009). U skladu sa prethodnim su i naši rezultati koji su pokazali smanjenje proteinskog niva GR-a u citoplazmi uz istovremeno povećanje u jedru ukazujući na aktivaciju receptora. Treba istaći da su prethodni rezultati iz naše laboratorije na mladim pacovima pokazali suprotne efekte fruktoze na ekspresiju i ćelijsku distribuciju GR-a. Mladi mužjaci pacova koji su konzumirali 60% fruktozu kao i mlade ženke na ishrani koja sadrži 10% fruktozu pokazuju smanjen nivo GR proteina kako u citosolima tako i u jedrima visceralnog masnog tkiva (Bursać i sar., 2014; Kovačević i sar., 2014). Ostaje da se ispita koji činioci usmeravaju uticaj fruktoze ka aktivaciji ili inhibiciji signalnog puta glukokortikoida.

Važna karakteristika GR-a koja određuje njegovu funkcionalnost je sposobnost receptora da veže hormon. Stoga su ispitani efekti ishrane obogaćene fruktozom i izlaganja hroničnom stresu na parametre vezivanja GR-a za glukokortikoidni hormon. Afinitet GR-a prema hormonu i maksimalni broj receptora koji su sposobni da vežu

hormon, nisu bili promenjeni pod dejstvom ni jednog od ispitivanih tretmana bilo da su primenjeni samostalno ili u kombinaciji (Slika 4.5.). Imajući ovo u vidu kao i činjenicu da je proteinski nivo HSD1 bio povećan kod stresiranih ženki hranjenih fruktozom, pretpostavka je da je akumulacija GR-a u jedru ove grupe životinja posledica stimulisane unutarćelijske regeneracije kortikosterona. Takođe, na osnovu naših rezultata, malo je verovatno da prereceptorski metabolizam glukokortikoida igra ulogu u aktivaciji receptora kod životinja koje su izlagane pojedinačnim tretmanima pa treba uzeti u razmatranje i druge faktore poput stimulisano ulaska i inhibiranog izlaska receptora iz jedra (Grad i Picard, 2007). Da li je neki od ovih aspekata promenjen pod uticajem ishrane bogate fruktozom ili izlaganja stresom ostaje da se ispita.

Glukokortikoidi ostvaruju kompleksnu funkciju u masnom tkivu koja se ogleda u njihovoj sposobnosti da regulišu suprotne procese u metabolizmu lipida. Oni stimulišu ekspresiju gena koji kodiraju kako enzime uključene u sintezu masnih kiselina i gliceroneogenezu, tako i enzime uključene u razgradnju triglicerida u masnom tkivu (Campbell i sar., 2011; Vegiopoulos i Herzig, 2007). Dodatno, glukokortikoidi su neophodni za potpunu diferencijaciju adipocita (Asada i sar., 2011). Zbog toga je sledeći korak u analizi karakteristika signalnog puta glukokortikoida u masnom tkivu nakon ishrane bogate fruktozom i/ili hroničnog stresa bio da se ispita transkripciona aktivnost GR-a određivanjem nivoa iRNK njegovih ciljnih gena koji su uključeni u lipidni metabolizam. Rezultati su pokazali da su fruktoza i stres doveli do aktivacije potpuno različite grupe gena lipidnog metabolizma koji su regulisani GR-om. Naime, samostalno primenjena fruktoza je uticala na gene uključene u lipogene procese, povećanjem nivoa iRNK koje kodiraju ACC, FAS, LPL i PEPCK. Nasuprot tome, hronični nepredvidivi stres, nezavisno od primenjene ishrane, povećao je nivo iRNK koje nose informaciju za HSL, enzim lipolitičkog puta (Slika 4.6.).

Ispitivanja uticaja sve veće zastupljenosti fruktoze u ishrani na lipidni metabolizam ukazala su da fruktoza može da stimuliše *de novo* sintezu lipida. Nivo postprandijalne sinteze masnih kiselina u jetri značajno je povećan kod muškaraca i žena nakon deset nedelja konzumiranja pića zaslađenih fruktozom (Stanhope i sar., 2009). Ekspresija gena koji kodiraju ACC i FAS značajno je veća u hepatocitima miševa koji su konzumirali fruktozu u odnosu na miševe koji su unosili standardnu hranu (Miyazaki i sar., 2004). Dodatno, istraživanja ukazuju da fruktoza stimuliše

sintezu masnih kiselina i u masnom tkivu. Pa tako, mužjaci pacova koji su tokom devet nedelja konzumirali 60% rastvor fruktoze pokazuju povećanu transkripciju gena koji kodira FAS u visceralnom masnom tkivu (Bursać i sar., 2014). Nivo iRNK za FAS i formiranje masnih kapi se odvijaju znatno brže u adipocitima koji rastu na medijumu obogaćenom fruktozom u odnosu na standardni medijum (Robubi i sar., 2014). Slično, rezultati naše studije su pokazali povećanu transkripciju gena koji kodiraju ACC i FAS u visceralnom masnom tkivu ženki koje su konzumirale samo fruktozu. Aktivacija gena koji kodiraju ove enzime uključene u put sinteze masnih kiselina kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu je u skladu sa uočenim ostrvcima malih adipocita u visceralnom masnom tkivu koji ukazuju na prisustvo adipogeneze. Ovo je i u skladu sa Gathercole i sar., (2011) koji su pokazali da nivo ACC proteina raste tokom diferencijacije ćelijske linije humanih adipocita.

Jedan od glavnih transkripcionih regulatora odgovornih za regulaciju sinteze masnih kiselina i holesterola je SREBP1c (Eberlé i sar., 2004). Naime, mesta na genomu za vezivanje SREBP1c-a nalaze se u okviru većine gena uključenih u sintezu lipida, a među njima i ACC i FAS gena (Bennett i sar., 1995). Iako postoje studije koje pokazuju da ishrana bogata fruktozom može da poveća nivo SREBP1c-a u jetri (Miyazaki i sar., 2004) i visceralnom masnom tkivu (Bursać i sar., 2014), jedarni nivo SREBP1c nije bio promenjen u našoj studiji ([Slika 4.7.](#)). Stoga, mehanizam putem koga je fruktoza u našoj studiji povećala ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u proces sinteze masnih kiselina u masnom tkivu ne uključuje povećanu stimulaciju SREBP1c-a. Jedan od alternativnih mehanizama primećenih efekata fruktoze bi mogao uključiti glukokortikoide, s obzirom da je poznato da oni pozitivno regulišu proces lipogeneze. Naime, *in vivo* i *in vitro* studijama je potvrđeno da se ekspresija ACC nalazi pod pozitivnom regulacijom glukokortikoida (Gathercole i sar., 2011; Slavin i sar., 1994). U promotoru *Fas* gena nalazi se GRE sekvenca putem koje glukokortikoidi pozitivno regulišu ekspresiju ovog gena (Lu i sar., 2001; Wang i sar., 2012). U prilog tome govori i studija u kojoj tretman deksametazonom povećava ekspresiju reporterskog gena pod promotorom *Fas* gena (Soncini i sar., 1995). Uticaj glukokortikoida na regulaciju FAS-a pokazan je u mnogim tkivima poput masnog tkiva, jetre i pluća (Sul i Wang, 1998). Na osnovu nepromenjenog nivoa SREBP1c-a i jedarne akumulacije GR-a u visceralnom masnom tkivu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu

može se pretpostaviti da je povećan nivo iRNK za FAS i ACC posledica aktivacije transkripcije ovih gena glukokortikoidima. Stoga, naši rezultati ukazuju da u uslovima prekomernog konzumiranja fruktoze, GR pospešuje sintezu masnih kiselina aktivacijom ekspresije lipogenog seta gena, a novoformirani adipociti se mogu smatrati pripremom organizma za njihovo deponovanje.

Ishrana obogaćena fruktozom se dovodi u vezu sa povećanjem triglicerida u plazmi. Naime, pored toga što stimuliše *de novo* lipogenezu, fruktoza se smatra veoma lipogenim šećerom i zbog specifičnog načina njene razgradnje u jetri. Ključni aspekt metabolizma fruktoze u jetri jeste što ona ulazi u glikolizu nizvodno od heksokinaze i fosfofruktokinaze. Na taj način fruktoza zaobilazi regulaciju ovih enzima ATP-om i citratom i izbegava reverzibilne reakcije. Usled toga, prilikom povećanog unosa, najveći deo fruktoze se brzo konvertuje u gliceraldehid i dihidroksiaceton fosfat u ćelijama jetre čime se obezbeđuju supstrati za sintezu masnih kiselina i triglicerida nezavisno od energetskeg statusa. Ishrana bogata fruktozom je uzrokovala značajno povećanje triglicerida u cirkulaciji mužjaka pacova (Bursać i sar., 2013; Zubira i sar., 2016), a Herman i saradnici su još 70-tih godina prošlog veka pokazali da povećan nivo triglicerida u serumu pacova postoji tokom svih 100 dana ishrane bogate fruktozom i da njihov nivo opada sa prelaskom na standardnu hranu (Herman i sar., 1970). Konzumiranje fruktoze u trajanju od 4 nedelje povećava nivo triglicerida u cirkulaciji i doprinosi steatozi jetre kod muškaraca (Lê i sar., 2006). Međutim, postoje i studije koje ukazuju na neizmenjenu koncentraciju triglicerida nakon ishrane bogate fruktozom. Naime, šestonedeljna ishrana koja sadrži 17% fruktoze nije dovela do promena postprandijalnog nivoa triglicerida kod mlađih muškaraca i starijih žena (Bantle i sar., 2000). Nakon dve godine praćenja efekata hroničnog konzumiranja saharoze, ksilitola i fruktoze kod zdravih ljudi, pokazano je da fruktoza ne dovodi do promena u nivou holesterola i triglicerida u cirkulaciji (Huttunen i sar., 1976). Neizmenjena koncentracija triglicerida i slobodnih masnih kiselina pokazana je i kod miševa nakon 14 nedelja ishrane koja sadrži 60% fruktoze (Tillman i sar., 2014). U skladu sa ovim studijama su i rezultati našeg istraživanja koji su pokazali da kod adultnih ženki koje su pile samo fruktozu nije bilo promena u nivou triglicerida ni slobodnih masnih kiselina (**Tabela 4.1.**). To ukazuje da devetonedeljna ishrana bogata fruktozom kod adultnih ženki nije bila dovoljna da dovede do poremećaja u lipidnom metabolizmu koje bi se

odrazile na sistemske promene u nivoima triglicerida i slobodnih masnih kiselina. Iako je ishrana bogata fruktozom u ovoj eksperimentalnoj grupi stimulisala ekspresiju gena lipogenog puta i inicirala pojavu adipogeneze detektovanu u vidu ostrvaca malih adipocita na histološkim presecima, najverovatnije da je kapacitet masnog tkiva dovoljan da izdrži lipogene efekte koje fruktoza ostvaruje te masa visceralnog masnog tkiva i dalje ostaje nepromenjena. Ispitujući uticaj ishrane bogate ugljenim hidratima na pojavu hipertrigliceridemije, Parks i Hellerstein (2000) ukazuju da pored povećane sinteze triglicerida u jetri veoma važan doprinos hipertrigliceridemiji ima i smanjeno uklanjanje triglicerida iz cirkulacije. Ključni enzim koji omogućava preuzimanje triglicerida iz cirkulacije u ćelije je LPL. Naime ovaj enzim vrši hidrolizu triglicerida iz hilomikrona i VLDL do slobodnih masnih kiselina koje onda ulaze u masno tkivo gde bivaju re-esterifikovane u trigliceride i deponovane u adipocitima (Cryer, 1981). Iako nema mnogo podataka o direktnom uticaju samostalno primenjene fruktoze na LPL, Kazumi i sar., (1997) sugerišu da ishrana bogata fruktozom kod gojaznih pacova narušava proces uklanjanja triglicerida iz cirkulacije ostavljajući nivo triglicerida daleko višim nego što bi se očekivalo iz nivoa stimulacije sinteze triglicerida (Kazumi i sar., 1997). Dodatno, pokazano je da se kod osoba sa hipertrigliceridemijom aktivnost LPL-a nalazi u inverznoj korelaciji sa koncentracijom VLDL-a i ukupnih triglicerida (Parks i Hellerstein, 2000). Stoga, povećan nivo ekspresije gena koji kodira LPL kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu ukazuje na povećano preuzimanje triglicerida iz cirkulacije u adipocite, što može biti razlog nepromenjenog nivoa triglicerida u plazmi ovih životinja a novoformirani adipociti obezbeđuju povećan kapacitet visceralnog masnog tkiva za preuzimanje triglicerida.

Adipogeneza, odnosno formiranje ostrvaca sastavljenih iz malih adipocita koje smo uočili histološkom analizom u visceralnom masnom tkivu nestresiranih životinja koje su hranjene fruktozom, najverovatnije je asocirana sa povećanjem nivoa proteina PPAR γ u jedru ([Slika 4.7.](#)). Naime, PPAR γ predstavlja ključni regulator i neophodnu komponentu diferencijacije adipocita (Rosen i sar., 1999) koja određuje kompetentnost prekursorskih ćelija adipocita odnosno sposobnost ćelija da se diferenciraju u adipocite u odgovoru na adipogeni signal (Cristancho i Lazar, 2011). Sve je više studija koje govore o pozitivnom uticaju koji fruktoza ima na regulaciju PPAR γ . Tako, povećana transkripcija gena za PPAR γ pokazana je u masnom tkivu mužjaka i ženki nakon 24

nedelje ishrane obogaćene fruktozom (Pektas i sar., 2016). Isti efekat pokazan je i u adipocitima izolovanim iz masnog tkiva životinja nakon 8 nedelja ishrane bogate fruktozom (Zubira i sar., 2016). Tretman 3T3-L1 preadipocita različitim dozama fruktoze povećava diferencijaciju masnih ćelija, proteinski nivo PPAR γ i transkripciju gena koji ga kodira (Du i Heaney, 2012). Legeza i sar., (2014) ukazuju da fruktoza stimuliše ekspresiju PPAR γ u adipocitima kao i da je povećanje dvostruko veće u odnosu na tretman glukozom. Dodatno, tretman preadipocita fruktozom može uzrokovati povećanje nivoa C/EBP α proteina, člana familije CCAAT transkripcionih regulatora koji su neophodni za diferencijaciju adipocita i smatraju se markerima adipogeneze (Du i Heaney, 2012; Legeza i sar., 2014). Povećana ekspresija C/EBP α pokazana je i *in vivo*, u masnom tkivu mužjaka pacova hranjenih fruktozom (Zubira i sar., 2016). Naime, PPAR γ i C/EBP α se smatraju glavnim pokretačima kaskade događaja koji čine adipogenezu. Istraživanja pokazuju da se mesta za vezivanje PPAR γ i C/EBP α nalaze u okolini najvećeg broja gena koji su aktivirani tokom adipogeneze kao i da svaki od ova dva transkripciona regulatora ima sposobnost međusobne regulacije i autoregulacije (Lefterova i sar., 2008; Wu i sar., 1999). Povećana jedarna akumulacija PPAR γ proteina kao i pojava ostrvaca malih adipocita u visceralnom masnom tkivu nakon ishrane obogaćene fruktozom pokazana u našem i sličnim istraživanjima zajedno sa povećanjem ekspresije C/EBP α detekovanim u mnogim studijama koje ispituju efekte fruktoze doprinose pretpostavci da fruktoza ima izraziti potencijal da stimuliše adipogenezu.

Iznenadujuće, adipogeneza primećena u visceralnom masnom tkivu nije dovela do povećanja mase ovog tkiva. Ipak, ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima Okuna i sar., (Okuno i sar., 1998) koji su ispitivali efekte troglitazona, agonista za PPAR γ , na masno tkivo gojaznih *Zucker* pacova i pokazali povećan broj malih adipocita bez efekta na ukupnu masu masnog tkiva. Interesantno je istaći da je za razliku od ovde predstavljenih rezultata koji pokazuju hiperplaziju visceralnog masnog tkiva nakon devetonedeljnog konzumiranja 10% fruktoze, u našoj laboratoriji pokazano prisustvo kako hiperplazije tako i hipertrofije kod životinja koje su pile 60% rastvor fruktoze (Bursać i sar., 2014). Na osnovu toga može se pretpostaviti da hiperplazija masnog tkiva prethodi hipertrofiji koja se najverovatnije javlja tek kada je metaboličko opterećenje dovoljno veliko.

Doprinos glukokortikoidnih hormona i njihovog receptora procesu adipogeneze je široko proučavan i dobro dokumentovan. Pokazano je da i kortizol i deksametazon stimulišu diferencijaciju adipocita po dozno-zavisnom obrascu (Hauner i sar., 1989), a kulture tretirane deksametazonom imaju veći broj ostrvaca malih adipocita (Ayala-Sumuano i sar., 2013). Upotrebom siRNK, Stegar i sar., (2010) su pokazali da ćelije 3T3-L1, u kojima je inhibiran GR nisu sposobne da efikasno deponuju lipide i eksprimiraju gene specifične za adipocite. Jedan od pretpostavljenih molekularnih mehanizama je da GR u kooperaciji sa C/EBP β , epigenetičkim mehanizmima aktivira transkripciju gena za PPAR γ , prevashodno regrutovanjem koaktivatora koji indukuju acetilaciju histona H3 u okviru pojačivača gena za PPAR γ (Steger i sar., 2010). Dalje, podaci ukazuju da deksametazon stimuliše fosforilaciju C/EBP β na treoninu na 188. poziciji, što je ključna post-translaciona modifikacija ovog molekula za odvijanje adipogeneze (Ayala-Sumuano i sar., 2011; Park i sar., 2004). Iako nema podataka da su transkripcioni regulatori prvog talasa adipogeneze poput C/EBP α , C/EBP β , SREBP1a i SREBP1c, direktno regulisani glukokortikoidima, njihov nivo u potpuno diferenciranim adipocitima je viši u kulturama koje su tokom ranih faza diferencijacije tretirane deksametazonom nego u onima koje nisu (Ayala-Sumuano i sar., 2013). Glukokortikoidi mogu da stimulišu adipogenezu i posredstvom gena koji se nalaze pod regulacijom GR-a, s obzirom na to da je aktivnost gena za lipogene enzime ACC (Levert i sar., 2002) i FAS (Schmid i sar., 2005) koji su regulisani GR-om, neophodna za ekspresiju PPAR γ tokom diferencijacije adipocita i da inhibitori ova dva enzima sprečavaju sazrevanje preadipocita. S tim u vezi, ekspresija ACC i FAS stimulirana GR-om kod nestresiranih ženki koje su konzumirale fruktozu bi mogla pospešiti adipogenezu kod ovih životinja. Jednom aktiviran, PPAR γ može učestvovati u pozitivnoj regulaciji sopstvenog gena i gena koji kodira C/EBP α sa kojim potom dalje propagira proces adipogeneze (Steger i sar., 2010).

Još jedna veoma važna uloga PPAR γ je da aktivira ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u proces preuzimanja masnih kiselina iz cirkulacije i koji promovišu njihovo recikliranje pre nego eksport iz ćelija masnog tkiva (Lehrke i Lazar, 2005). Među pomenutom grupom gena regulisanih sa PPAR γ , nalazi se i PEPCK. Pored toga što je ključni enzim gliceroneogeneze, PEPCK predstavlja važan korak u kontroli re-esterifikacije slobodnih masnih kiselina u masnom tkivu (Franckhauser i sar., 2002).

Na ovaj način PEPCK promoviše uklanjanje slobodnih masnih kiselina iz cirkulacije. Nepromenjen nivo ekspresije gena za HSL kod nestresiranih životinja koje su pile fruktozu ukazuje na odsustvo lipolize koja bi uslovlila oslobađanje slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva. Zajedno sa povećanom ekspresijom gena za PEPCK u istoj eksperimentalnoj grupi, ovi rezultati bi mogli da objasne zašto u našoj studiji ishrana obogaćena fruktozom, suprotno očekivanjima, nije povećala nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji. Kompleksna regulatorna mreža koja kontroliše transkripciju gena za PEPCK uključuje i PPAR γ i glukokortikoide. U masnom tkivu, PEPCK je negativno regulisan GR-om (Vegiopoulos i Herzig, 2007), te bi stoga njegovo povećanje u visceralnom masnom tkivu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu moglo biti pripisano transkripcionoj aktivnosti PPAR γ .

Nasuprot promenama opisanim kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu, obe grupe ženki izlaganih stresu su imale povećan nivo ekspresije gena koji kodira HSL, enzim uključen u proces hidrolize triglicerida i glavno mesto regulacije ovog procesa. Povećana ekspresija gena za HSL u visceralnom masnom tkivu, ukazuje na povećanu razgradnju triglicerida u adipocitima koja može rezultovati smanjenjem veličine adipocita i mase masnog tkiva što je i primećeno kod obe grupe stresiranih ženki.

Poznato je da tokom stresnih izazova postoje visoki zahtevi za energijom te se pored povećane koncentracije glukoze u krvi stimuliše i razlaganje triglicerida u cilju povećavanja nivoa dostupnih slobodnih masnih kiselina koje iz cirkulacije mogu preuzeti ćelije van masnog tkiva. Stoga glukokortikoidi, kao hormoni stresa ostvaruju pozitivnu regulaciju ekspresije HSL-a. Naime, tretman deksametazonom pozitivno reguliše HSL, kako na mRNA tako i na nivou proteina, utičući pri tome i na povećanje aktivnosti ove lipaze u adipocitima, što se inhibira upotrebom RU486, antagonista GR-a (Xu i sar., 2009). Ovi rezultati ukazuju na to da bi stres mogao da uzrokuje lipolizu posredstvom GR-a, koja za rezultat ima redukciju mase masnog tkiva nezavisno od režima ishrane. Iako bi mehanizmi odgovorni za jedarnu akumulaciju GR-a kod životinja izlaganih stresu na standardnoj i ishrani obogaćenoj fruktozom mogli biti različiti, transkripciona aktivnost receptora u obe stresirane grupe životinja bila je usmerena ka lipolitičkom putu, dok ekspresija analiziranih gena lipogenog puta nije bila promenjena kod ovih životinja (Slika 4.6.). Takođe, ekspresija PEPCK nije bila

promenjena ni u jednoj od grupa ženki izlaganih stresu, što podržava ideju da pod stresnim okolnostima kod adultnih ženki GR može doprineti gubitku mase visceralnog masnog tkiva usled povećane lipolize pre nego inhibicijom lipogeneze.

S ciljem da se objasni zašto nivo slobodnih masnih kiselina u plazmi životinja izlaganih stresu nije bio promenjen uprkos povećanoj ekspresiji gena za HSL u adipocitama, ispitan je nivo CPT1 proteina, ključnog regulatornog enzima koji omogućava transport slobodnih masnih kiselina u mitohondrije i njihovu posledičnu oksidaciju. Naši rezultati su pokazali povećan nivo CPT1 proteina u masnom tkivu obe grupe stresiranih ženki (**Slika 4.8.**), što ukazuje na povećanu potrošnju energije kod ovih životinja. Iako je primarna uloga ćelija belog masnog tkiva da skladišti lipide pre nego da vrši oksidaciju slobodnih masnih kiselina, prisustvo i aktivnost CPT1 u belom masnom tkivu su pokazani i kod pacova i kod ljudi (Brown i sar., 1997; Malandrino i sar., 2015). Povišen nivo CPT1 proteina bi za posledicu mogao da ima povećanu oksidaciju slobodnih masnih kiselina nastalih razlaganjem triglicerida, čime bi moglo da se objasni zašto nivo slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji ženki izlaganih stresu nije bio povećan i pored povišenog nivoa HSL.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je dugoročna ishrana obogaćena fruktozom i izlaganje hroničnom nepredvidivom stresu izazvalo suprotne efekte na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova. Dok je ishrana obogaćena fruktozom stimulisala adipogenezu, *de novo* lipogenezu i preuzimanje lipida od strane masnog tkiva, hronični stres je, nezavisno od načina ishrane, promovisao lipolizu i transport masnih kiselina u mitohondrije. Opisani efekti fruktoze, stresa i njihove kombinacije na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu najverovatnije se ostvaruju posredstvom aktivnosti glukokortikoidnih hormona, s obzirom da efekti koincidiraju sa povećanom jedarnom akumulacijom i transkripcionom aktivnošću GR-a.

5.2. Efekti ishrane bogate fruktozom, hroničnog stresa i njihove kombinacije na razvoj inflamacije u visceralnom masnom tkivu

Hronična inflamacija niskog intenziteta je prisutna kod pacijenata obolelih od različitih metaboličkih poremećaja uključujući i metabolički sindrom (Yudkin i sar., 1999). Sve veću pažnju istraživača privlači inflamacija koja se uočava u visceralnom masnom tkivu gojaznih osoba, s obzirom da je upravo visceralno masno tkivo prepoznato kao važan metabolički i endokrini centar koji utiče na regulaciju energetske homeostaze. Stoga je bilo od interesa da se ispita da li fruktoza i hroničan, nepredvidivi stres primenjeni samostalno ili u kombinaciji dovode do inflamacije u masnom tkivu. Gojaznost je postala veoma izražena i u mlađoj populaciji a studije upozoravaju da u ishrani dece sve češće prerađena hrana bogata fruktozom zamenjuje neophodne hranjive sastojke (Bray i Popkin, 2013). Posebno su alarmantni podaci da i preko 30% dece uzrasta od 1-5 godina konzumira veštački zaslađene napitke (Fulgoni i Quann, 2012). Procene su da bi unos fruktoze kod dece bio smanjen za 82% kada bi se eliminisali svi ostali izvori fruktoze izuzev voća i povrća (Vos i sar., 2008). Iako su povećani markeri inflamacije detektovani kod gojazne dece uzrasta od samo 6 godina (Zimmermann i Aeberli, 2008), uticaj fruktoze na inflamaciju kod mladih, naročito devojčica, nije dovoljno ispitan i razjašnjen. Naši prethodni rezultati su pokazali da mlade, preadultne ženke pacova hranjene fruktozom razvijaju adipoznost najverovatnije kao posledicu izostanka lipolitičkih efekata glukokortikoida čiji je signalni put inhibiran u visceralnom masnom tkivu (Kovačević i sar., 2014). Rezultati na adultnim ženkama prikazani u ovom doktoratu ukazuju da ishrana bogata fruktozom ne dovodi do povećanja mase masnog tkiva ni razvoja gojaznosti, ali inicira pojavu adipogeneze kao i jedarnu akumulaciju GR-a i njegovu transkripcionu aktivnost u masnom tkivu. Kako se efekti fruktoze na masu masnog tkiva i glukokortikoidnu signalizaciju u njemu značajno razlikuju između mladih i adultnih ženki, pretpostavka je da bi se i efekti fruktoze na markere inflamacije u visceralnom masnom tkivu mogli razlikovati kod mladih i adultnih ženki pacova. Zbog toga je ovom studijom analiziran inflamatorni status ne

samo adultnih već i preadultnih ženki pacova, koje su hranjene fruktozom odmah nakon odvajanja od majki.

Nakon analize markera inflamacije uočeno je da fruktoza ostvaruje značajan efekat na razvoj inflamacije u visceralnom masnom tkivu i kod mladih i kod adultnih ženki. Kod obe grupe adultnih ženki koje su konzumirale fruktozu uočena je jedarna akumulacija p65, transkripciono aktivne subjediniice NFκB, ukazujući na aktivaciju ovog proinflatornog transkripcionog regulatora (Slika 4.9.). Ovo je potvrđeno i ispitivanjem ekspresije gena za proinflatorne citokine IL1, IL6 i TNFα koji su regulisani NFκB-om, koje je pokazalo stimulisanu ekspresiju ovih gena kod nestresiranih adultnih ženki koje su pile fruktozu (Slika 4.11.). Aktivacija proinflatornog transkripcionog regulatora NFκB pokazana je i kod mladih ženki koje su konzumirale fruktozu u masnom tkivu gde je proteinski nivo NFκB bio značajno povećan u jedarnoj frakciji (Slika 4.10.). Međutim, izgleda da je glavni inflamatorni akter u masnom tkivu mladih ženki proinflatorni citokin IL1 čija je ekspresija bila povećana nakon devetonedelnog konzumiranja fruktoze što nije zapaženo u slučaju TNFα (Slika 4.12.).

Pojava inflamacije nakon ishrane bogate fruktozom nije iznenađujuća s obzirom da postoje literaturni podaci koji svedoče o tome da fruktoza može biti uzročnik hronične inflamacije niskog intenziteta u mnogim tkivima (Ruiz-Núñez i sar., 2013; Rutledge i Adeli, 2007). Tako je pokazano da unos hrane sa visokim sadržajem fruktoze olakšava migraciju leukocita povećanjem ekspresije adhezivnih proteina na površini endotelnih ćelija kao i da povećava infiltraciju makrofaga u bubrege stimulišući razvoj inflamacije i doprinoseći razvoju bolesti bubrega (Glushakova i sar., 2008). Slično, ishrana bogata fruktozom povezana je sa aktivacijom NFκB proteina u srcu mužjaka pacova (Padiya i sar., 2014), kao i povećanim nivoima proinflatornih citokina IL1 i TNFα u jetri (Castro i sar., 2012) i plazmi (Huang i sar., 2013; Madani i sar., 2012; Sivaraman i sar., 2013). Istaknuta je i veza između ishrane bogate fruktozom i izmenjene endokrine funkcije visceralnog masnog tkiva uključujući i povećanu produkciju markera inflamacije. Povećanje IL6 je u masnom tkivu mužjaka miševa uočeno na transkripcionom i proteinskom nivou nakon 8 nedelja ishrane sa visokim sadržajem fruktoze (Magliano i sar., 2015). Mužjaci pacova soja *Sprague–Dawley* imaju povećan nivo IL6 i TNFα u masnom tkivu nakon dugotrajne ishrane koja sadrži

65% fruktoze (Hsieh i sar., 2013), a isti efekat je zabeležen i u masnom tkivu mužjaka *Wistar* pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze (Mohammad Reza i sar., 2015). Iz priloženog se vidi da je najveći broj studija koje ispituju efekte fruktoze na inflamatorni status u različitim tkivima rađen na mužjacima. Jedno od retkih istraživanja sprovedenih na ženka je pokazalo da dodatak 10% rastvora fruktoze standardnoj ishrani povećava nivo IL1, IL6 i TNF α u masnom tkivu ženki pacova posle 24 nedelje (Pektas i sar., 2016). Naša studija pokazuje da se inflamacija u masnom tkivu ženki koje su konzumirale 10% fruktozu javlja i mnogo ranije, već nakon 9 nedelja.

Mehanizam nastanka inflamacije kao posledice unosa hrane bogate fruktozom nije u potpunosti razjašnjen. Jedan od puteva kojim bi fruktoza mogla da dovede do inflamacije uključuje stimulaciju adipogeneze i povećanje mase masnog tkiva. Naime, sve veći broj istraživanja ukazuje da fruktoza, kao šećer sa velikim lipogenim potencijalom, može uticati na razvoj gojaznosti kod ljudi i životinja (Bray i sar., 2004; Jürgens i sar., 2005). Pokazano je da je fruktoza dovoljna za uspešni završetak diferencijacije adipocita u kulturi i da je efikasnija od glukoze u indukovanju ekspresije gena koji su specifični za adipocite (Du i Heaney, 2012; Legeza i sar., 2014) što svedoči o stimulatornom efektu fruktoze na proces adipogeneze. Poznato je da su rast masnog tkiva i gojaznost praćeni razvojem hronične inflamacije niskog intenziteta u samom tkivu. Povećanje mase masnog tkiva i gojaznost povezani su sa aktivacijom transkripcionog regulatora NF κ B kao i povećanjem ekspresije gena za proinflamatorne citokine IL1, IL6 i TNF α , koji su najvećim delom pod transkripcionom kontrolom NF κ B-a (revidirano u (Wellen i Hotamisligil, 2005)). Rast masnog tkiva stvara uslove u kojima adipociti mogu sekretovati hemoatraktantne signale putem kojih se stimuliše regrutovanje makrofaga u masno tkivo (Wellen i Hotamisligil, 2005), te je infiltracija makrofaga u masno tkivo opisana u slučajevima gojaznosti i kod miševa i kod ljudi (Weisberg i sar., 2003; Xu i sar., 2003).

Razlog pojave inflamacije u masnom tkivu tokom gojaznosti nije u potpunosti jasan i još uvek predstavlja fokus mnogih istraživanja. Ipak, pojava hipoksije tokom gojaznosti se ističe kao najčešće pominjani uzrok promene inflamatornog stanja. Naime, poznato je da su tkiva povećane mase pod izazovom da snabdeju kiseonikom sve svoje delove, te je prisustvo hipoksije česta posledica. U gojaznosti, masno tkivo bi moglo biti upravo pred takvim izazovom, što je i potvrđeno upotrebom specifične hemijske probe

za hipoksiju i praćenjem ekspresije gena koji kodiraju markere hipoksije u masnom tkivu genetički gojaznih miševa i miševa kojima je gojaznost izazavana ishranom (Ye i sar., 2007). Studije ukazuju i da je hipoksija povezana sa oslobađanjem proinflamatornih citokina IL6 i TNF α iz masnog tkiva kod ljudi (O'Rourke i sar., 2011) kao i da su makrofagi osetljivi na prisustvo hipoksije, te kao odgovor pokreću produkciju plejade citokina i drugih proinflamatornih faktora (Murdoch i sar., 2005). Tesna veza između hipoksije u masnom tkivu povećane mase kao i u masnom tkivu u ekspanziji sa povećanjem proinflamatornih markera ukazuje da bi upravo sredinski uslovi bez kiseonika mogli biti signal za razvoj inflamacije u masnom tkivu (Trayhurn, 2013; Ye i sar., 2007). Takođe, pokazano je da hipoksija povećava ekspresiju GLUT5, specifičnog transportera za fruktozu, u humanim adipocitama (Wood i sar., 2007) što bi dodatno moglo doprineti stvaranju efekta začaranog kruga u kome ishrana bogata fruktozom stimuliše povećanje masnog tkiva i stvaranje hipoksičnih uslova koji potom olakšavaju transport fruktoze. Zaista, širenje visceralnog masnog tkiva kod mladih ženki koje su pile fruktozu može dovesti do uslova hipoksije. Takođe, prilikom formiranja novih adipocita u masnom tkivu odraslih nestresiranih ženki na ishrani obogaćenoj fruktozom, može postojati povećana potreba za kiseonikom i hranljivim sastojcima što oslikava uslove nedovoljne prokrvljenosti. Sveukupno, ovakvi uslovi bi mogli propagirati nastanak inflamacije, koja i jeste primećena u masnom tkivu ovih životinja.

Efekat fruktoze na razvoj inflamacije u masnom tkivu mogao bi se ostvariti i putem uticaja na oksidativni status i na mehanizme odbrane od oksidativnog stresa. Naime, studije ukazuju da je ishrana bogata fruktozom uključena u promovisanje oksidativnog stresa (Giriş i sar., 2014) i da se za period od samo nedelju dana primene fruktoze može povećati nivo reaktivnih vrsta kiseonika u aorti, srcu i cirkulaciji (Delbosc i sar., 2005). Tretman pacova na ishrani bogatoj fruktozom antioksidansima smanjuje produkciju markera oksidativnog stresa i predstavlja prevenciju od oštećenja i poremećaja koji nastaju kao posledica njihovog delovanja (Armutcu i sar., 2005). Podaci ukazuju da fruktoza narušava antioksidativnu odbranu, te ishrana obogaćena fruktozom smanjuje aktivnost i/ili ekspresiju antioksidativnih enzima u masnom tkivu i drugim organima poput jetre i mišića, kako kod ženki (Fields i Lewis, 1995; Mellouk i sar., 2012) tako i kod mužjaka (Cavarape i sar., 2001; Madani i sar., 2012) pacova. Kako je i u našoj laboratoriji pokazano da ishrana obogaćena fruktozom smanjuje

proteinski nivo antioksidativnih enzima u visceralnom masnom tkivu mladih ženki (Kovačević i sar., 2017), ostaje da se ispita da li i u kojoj meri ishrana bogata fruktozom menja oksidativni status masnog tkiva adultnih ženki pacova.

Glukokortikoidi predstavljaju značajne modulatore inflamatornog odgovora, a kako naši rezultati pokazuju da je kod pacova koji su konzumirali fruktozu glukokortikoidna signalizacija izmenjena u odnosu na životinje na standardnoj ishrani, jedan od pretpostavljenih mehanizama kojima fruktoza menja inflamatorni status masnog tkiva je glukokortikoidni signalni put. Našim prethodnim rezultatima pokazano je da ishrana bogata fruktozom dovodi do smanjenja transkripcije gena za GR, smanjenog nivoa GR proteina u citosolima i jedrima kao i smanjenja kapaciteta i afiniteta receptora za vezivanje hormona u masnom tkivu mladih ženki (Kovačević i sar., 2014). Rezultati ovog doktorata su pokazali da u visceralnom masnom tkivu mladih ženki koje su pile fruktozu postoji jedarna akumulacija NF κ B proteina i povećana ekspresija gena za proinflamatorni citokin IL1 čija je ekspresija pozitivno regulisana NF κ B-om. Stoga, moglo bi se pretpostaviti da inhibicija signalnog puta glukokortikoida bar jednim delom doprinosi aktivaciji proinflamatornog transkripcionog regulatora NF κ B i posledičnoj ekspresiji proinflamatornog citokina IL1 koji dovode do razvoja inflamacije kod mladih ženki. Međutim, mehanizam bi mogao biti potpuno drugačiji kod adultnih ženki koje su pile samo fruktozu s obzirom na to da se kod njih inflamacija razvija uprkos izraženoj jedarnoj akumulaciji GR-a. Interesantno je da za razliku od mladih ženki, glukokortikoidna signalizacija nema uticaj na inflamatorni status kod adultnih ženki, što ukazuje da fruktoza pokreće različite mehanizme u zavisnosti od starosti. Izgleda da bi faktori koji promovišu inflamaciju kao posledicu ishrane obogaćene fruktozom mogli da ostvare dominantan efekat u odnosu na anti-inflamatornu aktivnost glukokortikoida kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu. Jedan od kandidata koji bi mogao da moduliše anti-inflamatornu funkciju glukokortikoida je inhibicioni faktor migracije makrofaga, MIF (eng. *Macrophage migration inhibitory factor*). Naime, MIF je jedini do sada poznati proinflamatorni citokin čija je ekspresija indukovana glukokortikoidima, a koji istovremeno inhibira anti-inflamatornu funkciju glukokortikoida (Ji i sar., 2015). Pa je tako pokazano da egzogeni dodatak MIF-a smanjuje inhibicioni efekat glukokortikoida na ekspresiju proinflamatornih citokina, IL1, IL6 i TNF α , u ćelijskoj kulturi monocita kod kojih je

inflamacija izazvana lipopolisaharidima (Calandra i sar., 1995). Isti efekat je potvrđen i *in vivo*, na primeru endotoksemije kod koje se letalni efekat javlja kao posledica aktivacije citokina izazvanih endotoksinima. Iako je poznato da rani tretman glukokortikoidima efikasno suprimira produkciju citokina i povećava preživljavanje endotoksemije, dodatak MIF-a obolelim miševima blokira protektivno dejstvo glukokortikoida i povećava smrtnost (Calandra i sar., 1995). Još uvek se malo zna o uticaju visoko kalorične ishrane na regulaciju MIF-a i doprinosu različitih hranjivih materija na aktivaciju ovog proinflamatornog citokina. Retke studije koje ispituju ove efekte ukazuju na povećan nivo MIF proteina u masnom tkivu mladih mužjaka pacova na ishrani bogatoj fruktozom (Veličković i sar., 2013) kao i mužjaka miševa na ishrani bogatoj mastima (Finucane i sar., 2014). Imajući u vidu rezultate prikazane u ovom doktoratu koji ukazuju na aktivirani signalni put glukokortikoida koji ne ostvaruje anti-inflamatorne efekte u visceralnom masnom tkivu nestresiranih, odraslih ženki pacova koje su pile fruktozu, može se pretpostaviti da bi aktivacija MIF-a mogla doprineti modulaciji glukokortikoidnih efekata i doprineti razvoju inflamacije kod ove grupe životinja. Ipak, neophodne su dodatne analize za potvrdu ovih pretpostavki.

Interesantno je da je kod nestresiranih adultnih ženki koje su pile fruktozu detektovan povećan nivo mokraćne kiseline u cirkulaciji (**Tabela 4.1.**), koju sve veći broj studija navodi kao značajan uzrok inflamacije. Povećan nivo mokraćne kiseline u serumu najvećim delom vodi poreklo od metabolizma fruktoze u jetri, a pokazano je da i masno tkivo ima sposobnost sekrecije mokraćne kiseline, što se povećava sa gojaznošću i hipoksičnim uslovima koji često nastupaju tokom rasta masnog tkiva (Tsushima i sar., 2013). Naime, povećan unos fruktoze dovodi do drastičnog povećanja hidrolize ATP-a u jetri, tako da se, nakon samo 5 minuta intravenoznog unosa fruktoze, nivo ATP-a u jetri smanjuje za 50% (Mäenpää i sar., 1968). Prvi korak metabolizma fruktoze predstavlja njenu brzu fosforilaciju do fruktozo-1-fosfata koju katalizuje fruktokinaza. Tokom ovog procesa se troši ATP i povećava količina AMP-a, čijom dezaminacijom uz pomoć enzima AMP-dezaminaze nastaje inosinmonofosfat koji je prekursor za sintezu mokraćne kiseline (Kurtz i sar., 1986). Kurtz i sar., (1986) su pokazali da intravenozni unos fruktoze izaziva gotovo trenutno povećanje nivoa inozina, hipoksantina i ksantina, intermedijera puta sinteze mokraćne kiseline, u plazmi pacova i ljudi. Dodatno, brojne humane i animalne studije pokazale su da fruktoza može

da indukuje hiperurikemiju odnosno da dovede do povećanja nivoa mokraćne kiseline u krvi (Dornas i sar., 2015; Emmerson, 1974; Macdonald i sar., 1978). Upravo se povećan nivo mokraćne kiseline izazvan fruktozom dovodi u vezu sa mnogim metaboličkim posledicama ishrane bogate fruktozom, ali i poremećajima koji se javljaju u sklopu metaboličkog sindroma (Johnson i sar., 2007). Nakagawa i sar., (2006) su pokazali da pacovi na ishrani bogatoj fruktozom imaju povećanu koncentraciju mokraćne kiseline i da se njenim smanjenjem sprečava razvoj insulinske rezistencije. Nivo mokraćne kiseline se od skoro koristi i kao značajan prognostički parametar za gojaznost i promene u metabolizmu masnog tkiva kod ljudi (Cardoso i sar., 2013; Stirpe i sar., 1970). Smatra se da bi jedan od glavnih mehanizama putem kojih mokraćna kiselina narušava metaboličke procese u ćeliji bio indukovanje inflamacije. Paradoksalno, mokraćna kiselina ima anti-oksidativni efekat u serumu, međutim nakon transporta u ćelije ostvaruje proinflamatorne efekte pokrećući inflamatorni odgovor (Sautin i sar., 2007). Tako je pokazano da mokraćna kiselina povećava nivo MCP-1 u adipocitima u kulturi, dok je smanjenje njenog nivo uzrokovalo smanjenje ekspresije MPC-1 i TNF α *in vivo* (Baldwin i sar., 2011). Takođe, mokraćna kiselina može da aktivira NF κ B u različitim ćelijama poput tubularnih ćelija bubrega i ćelija glatke muskulature krvotoka (Kanellis i sar., 2003; Zhou i sar., 2012). Stoga bi povećana koncentracija mokraćne kiseline kod adultnih nestresiranih ženki koje su pile fruktozu mogla da bude pokretač inflamatornih procesa u masnom tkivu odnosno aktivacije NF κ B, proinflamatornog transkripcionog regulatora koji bi potom stimulisao ekspresiju proinflamatornih citokina IL1, IL6 i TNF α .

Hroničan stres primenjen samostalno ili u kombinaciji sa fruktozom nije doveo do promena u nivoima inflamatornih citokina, ni do razvoja inflamacije. Uprkos povećanoj jedarnog akumulaciji NF κ B proteina kod stresiranih ženki koje su konzumirale fruktozu (**Slika 4.9.**), transkripcija proinflamatornih gena regulisanih NF κ B-om nije bila promenjena (**Slika 4.11.**). Brojna literatura navodi oprečne rezultate po kojima izlaganje stresu može imati i pro- i anti-inflamatorne posledice. Tako, mušjaci pacova izlagani hroničnom stresu tokom 35 dana razvijaju inflamaciju u masnom tkivu okarakterisanu povećanim proteinskim nivoom proinflamatornih citokina IL1, IL6 i TNF α (Karagiannides i sar., 2014). Prinudno plivanje uzrokuje povećanje fagocitne sposobnosti makrofagi kod miševa (Barriga i sar., 2001), a isti efekat je

primećen i kod starih ženki i mužjaka miševa bilo da je primenjen akutni ili hronični stres (Ferrandez i Fuente, 1999). S druge strane, smanjenje telesne temperature zečevima za 3°C inhibira aktivnost neutrofila i smanjuje broj fagocitnih ćelija (Garbuliński i sar., 1991). Kod osoba koje neguju hronično teške bolesnike, ovaj vid stresa smanjuje proliferaciju limfocita i njihovu sekretornu sposobnost, redukujući tako ćelijski imunski odgovor (Bauer i sar., 2000).

Izostanak inflamacije kod obe grupe ženki izlaganih stresu može biti posledica aktiviranog signalnog puta glukokortikoida koji je pokazan jedarnom akumulacijom GR-a kod ovih grupa ženki. Naime, poznato je da glukokortikoidi ostvaruju anti-inflamatorno dejstvo a prirodni i sintetički glukokortikoidi su u širokoj upotrebi u lečenju kako akutnih tako i hroničnih inflamacija i nalaze se u prvom planu anti-inflamatornih i imunosupresivnih terapija. Svoje anti-inflamatorno dejstvo glukokortikoidi ostvaruju izazivanjem apoptoze neutrofila, bazofila, eozinofila i T limfocita, modulacijom funkcije B limfocita, monocita, makrofaga i granulocita kao i inhibicijom ekspresije gena koji kodiraju proinflamatorne citokine i hemokine, molekule za adheziju ćelija kao i ključne enzime uključene u inicijaciju i održavanje inflamacije. Glukokortikoidi modulišu imunski odgovor i delovanjem na signalni put NFκB tako što inhibiraju njegovu aktivnost u jedru (Cruz-Topete i Cidlowski, 2014). Interesantno je istaći da je jedarna akumulacija NFκB-a i GR-a u masnom tkivu primećena i kod stresiranih i kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu, ali da se inflamacija, u smislu povećane ekspresije proinflamatornih interleukina, razvila samo kod nestresiranih. Ovi rezultati ukazuju na to da fruktoza ima potencijal da razvije inflamaciju u masnom tkivu, pogotovo ako se uzme u obzir da samostalno primenjen stres nije doveo do jedarne akumulacije NFκB-a. Međutim, izgleda da izlaganje hroničnom stresu tokom prekomernog konzumiranja fruktoze predstavlja milje u kome glukokortikoidi ostvaruju svoje anti-inflamatorne efekte suprimirajući transkripcionu aktivnost NFκB, dok u slučaju samostalno primenjene fruktoze drugi činioci nadvladavaju ove efekte glukokortikoida o čemu je ranije bilo više reči.

Stimulisana lipoliza u masnom tkivu obe grupe adultnih ženki izlaganih stresu, koja je najverovatnije posledica aktiviranog signalnog puta glukokortikoida, dovela je do smanjenja mase masnog tkiva nezavisno od režima ishrane. Mnoge studije ukazuju na benefit smanjenja telesne mase i mase masnog tkiva na zdravlje ljudi. Smatra se da je

pozitivan efekat gubitka mase i smanjenja mase masnog tkiva na metaboličke poremećaje koji se razvijaju kao posledica gojaznosti u tesnoj vezi sa poboljšanjem inflamatornog statusa masnog tkiva (Clément i sar., 2004). Klinička ispitivanja su pokazala značajno smanjenje markera inflamacije u masnom tkivu, IL1, IL6, TNF α , nakon gubitka telesne mase (Moschen i sar., 2010; Ziccardi i sar., 2002). Poznato je da je veličina adipocita važna determinanta njegove sekretorne aktivnosti, te se sa povećanjem njihove veličine menja i balans sekretovanih pro- i anti-inflamatornih adipokina u smeru nastanka inflamacije (Skurk i sar., 2007). Smanjenje veličine adipocita i mase masnog tkiva kao posledica izlaganja hroničnom stresu, detektovano u obe stresirane grupe adultnih ženki, moglo bi stoga doprineti održavanju inflamatornog statusa u fiziološkim granicama.

Naši rezultati ukazuju da povećan unos fruktoze dovodi do inflamacije u masnom tkivu kako mladih tako i adultnih ženki pacova, dok izlaganje hroničnom stresu nije promenilo inflamatorni status masnog tkiva adultnih ženki bez obzira na režim ishrane. Inflamacija je kod mladih detektovana zajedno sa gojaznošću dok je kod adultnih jedinki prisustvo inflamacije pokazano i pre razvoja gojaznosti. To ukazuje, s jedne strane, na posebnu osetljivost mladih jedinki na efekte fruktoze, a s druge strane, da bi inflamacija u masnom tkivu mogla biti primarni događaj koji će doprineti nastanku novih metaboličkih poremećaja i da se ne javlja samo kao njihova posledica.

5.3. Efekat ishrane bogate fruktozom i/ili hroničnog nepredvidivog stresa na regulaciju unosa hrane u hipotalamusu

Hipotalamus predstavlja ključni region CNS-a za regulaciju energetske i metaboličke homeostaze u organizmu. Sposobnost hipotalamusa da primi, interpretira i intergrira širok spektar signala koji nose informacije o nutritivnom i energetskom statusu organizma i da na osnovu tih informacija moduliše unos hrane ali i potrošnju energije, čini ovaj deo mozga glavnim centrom regulacije energetskog balansa. U jedrima hipotalamusa odvija se i kontrola odgovora organizma na delovanje stresora i izlaganje stresnim uslovima. Kako se upravo u hipotalamusu ukrštaju centri regulacije

energetskog balansa (putem kvalitativne i kvantitativne kontrole unosa hrane) i regulacije odgovora organizma na stres, za dalji tok našeg istraživanja od posebne važnosti je bilo da se ispituju efekti ishrane obogaćene fruktozom i hroničnog nepredvidivog stresa samostalno ili u kombinaciji na signalne puteve u hipotalamusu.

Imajući u vidu široku upotrebu fruktoze u svakodnevnoj ishrani čoveka poslednjih decenija, sve su češća ispitivanja efekata koje fruktoza ostvaruje na različite centre za regulaciju apetita CNS-a. Postoje podaci da centralna i intraperitonealna aplikacija fruktoze može da aktivira neurone paraventricularnog nukleusa u hipotalamusu, rezultujući sekrecijom CRH i posledičnim povećanjem nivoa glukokortikoida (Kinote i sar., 2012). Kako su uloge glukokortikoida u mozgu višestruke i uključuju regulaciju energetskog balansa, odgovora organizma na stres i inflamatornog statusa, ispitivanje uticaja fruktoze na glukokortikoidnu signalizaciju u hipotalamusu moglo bi dati značajan doprinos u rasvetljavanju mehanizma kojim fruktoza izaziva metaboličke poremećaje. Veoma važno je pitanje doze, odnosno koju je količinu fruktoze neophodno uneti da bi u organizmu dostigla koncentraciju dovoljnu da ostvari uticaj na centre u hipotalamusu i signalne puteve u njima. Rezultati naše studije pokazuju da 10% rastvor fruktoze konzumiran tokom devet nedelja nije doveo do promena proteinskog nivoa enzima prereseptorskog metabolizma glukokortikoida, HSD1 i H6PDH (Slika 4.13.), kao ni nivoa GR proteina (Slika 4.14.) u hipotalamusu nestresiranih ženki. Slična situacija primećena je i kod mladih ženki i mužjaka pacova kod kojih ishrana obogaćena 10% fruktozom nije dovela do promena proteinskog nivoa GR-a, nivoa njegove iRNK, kao ni nivoa proteina HSD1 i H6PDH u hipotalamusu (Milutinović i sar., 2014). Takođe, pacovi na ishrani koja sadrži 40% fruktoze u kombinaciji sa mastima nisu imali promenjen nivo ekspresije gena za GR u hipotalamusu (Marissal-Arvy i sar., 2013). Tek je povećanje koncentracije konzumirane fruktoze na 60% dovelo do povećanja proteinskog nivoa GR-a u hipotalamusu mužjaka, bez promena prereseptorskog metabolizma (Bursać i sar., 2014). Očigledno je da je 10% fruktoza primenjena u našoj studiji nedovoljna količina fruktoze da bi se ostvario tako direktan uticaj na stimulaciju sekrecije glukokortikoida i pokretanje signalnog puta glukokortikoida u hipotalamusu.

Za razliku od delovanja fruktoze, efekti hroničnog stresa na hipotalamus i druge centre u mozgu daleko su više izučavani i poznati. Naime, izlaganje stresu aktivira

grupu neurona u paraventricularnom nukleusu hipotalamusa koji sekretuju CRH pokrećući HHA osu čiji je krajnji efekat sekrecija glukokortikoida. Međutim, nivo ovih hormona stresa se vrlo brzo vraća na bazalni usled negativne povratne regulacije HHA ose samim glukokortikoidima, koji delujući preko GR-a inhibiraju sekreciju CRH u hipotalamusu i ACTH u hipofizi (Sapolsky i sar., 2000). U prisustvu povećanih doza glukokortikoida, GR podleže takozvanoj homologoj negativnoj regulaciji (eng. *Homologous down regulation*) pod kojom se podrazumeva da receptor aktiviran glukokortikoidima smanjuje transkripciju sopstvenog gena (Burnstein i sar., 1990; Oakley i Cidlowski, 1993). Stoga su glukokortikoidni hormoni važni regulatori nivoa GR-a u hipotalamusu tokom stresa. Međutim, naši rezultati pokazuju da hronični nepredvidivi stres nije povećao nivo glukokortikoidnih hormona u cirkulaciji ženki na standardnoj ishrani. Pošto ni proteinski nivo enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida nije bio promenjen (**Slika 4.13.**), izostalo je i povećanje koncentracije aktivnih glukokortikoida u hipotalamusu. Pored toga, stres nije uzrokovao ni promenu proteinskog nivoa GR-a u hipotalamusu (**Slika 4.14.**). Iz svega navedenog može se zaključiti da ovde primenjen model hroničnog stresa nije uticao na signalni put glukokortikoida u hipotalamusu ženki na standardnoj ishrani. Slično ovim rezultatima, nepromenjen nivo transkripcije gena za GR pokazan je nakon akutnog i hroničnog stresa izazvanog boravkom u bučnim uslovima kod mužjaka (Eraslan i sar., 2015), kao i nakon dugotrajnog prinudnog plivanja primenjenog samostalno ili u kombinaciji sa dugotrajnim ograničenjem kretanja kod ženki pacova (Karandrea i sar., 2002). Takođe, akutno primenjeni stres ograničenja kretanja (Gądek-Michalska i sar., 2013) i hroničan stres imobilizacije nisu doveli do promena proteinskog nivoa GR-a u hipotalamusu mužjaka pacova (Mizoguchi i sar., 2003).

Nasuprot samostalno primenjenom stresu, kombinacija hroničnog stresa i ishrane bogate fruktozom je u našoj studiji dovela do povećanog proteinskog nivoa GR-a, kao i do povećane regeneracije glukokortikoida u hipotalamusu, o čemu svedoče povećani proteinski nivo HSD i H6PDH (**Slika 4.13. i Slika 4.14.**). Gotovo da nema literaturnih podataka o uticaju hroničnog stresa kombinovanog sa ishranom bogatom fruktozom na signalni put glukokortikoida u hipotalamusu. Kako je našim rezultatima pokazano da ni jedan od primenjenih tretmana samostalno nije doveo do značajnih promena u proteinskim nivoima enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida

kao ni samog receptora u hipotalamusu, ovom studijom je istaknuto da je za stimulaciju signalnog puta glukokortikoida u hipotalamusu vrlo značajno da se izlaganje stresu i konzumiranje fruktoze javi u kombinaciji.

O posledicama aktivacije signalnog puta glukokortikoida nakon konzumiranja fruktoze i izlaganja stresu, na regulaciju unosa hrane i razvoj inflamacije u hipotalamusu biće više reči u nastavku ove diskusije.

Leptin je hormon koji igra važnu ulogu u regulaciji unosa hrane i potrošnje energije. Otkriće leptina predstavljalo je veliki korak u otkrivanju i razumevanju komunikacije između mozga i masnog tkiva, kao primarnog depoa energije u organizmu. Efekat koji oralno uneta fruktoza ostvaruje na nivo leptina je kompleksan. Naime, akutno konzumiranje fruktoze dovodi do smanjenja nivoa leptina. Fruktoza uneta putem tečnosti u periodu od 24h, pokreće kod žena slabiji leptinski odgovor u vidu nižeg nivoa leptina u cirkulaciji od izokalorijski unete glukoze (Teff i sar., 2004). S druge strane, dugotrajna ishrana bogata fruktozom uzrokuje hiperleptinemiju kod ljudi i pacova (Lê i sar., 2006; Lindqvist i sar., 2008) dovodeći do razvoja leptinske rezistencije (Shapiro i sar., 2008, 2011). Naši rezultati pokazuju da je fruktoza povećala nivo iRNK za leptin u adipocitima nestresiranih ženki u odnosu na netretirane životinje (Slika 4.16.) što nije bilo praćeno promenama u nivou leptina sekretovanog u plazmu (Slika 4.17.). Iako je još mnogo toga ostalo da se otkrije o mehanizmima regulacije transkripcije gena za leptin, poznato je da on spada u grupu gena masnog tkiva koja biva aktivirana tokom diferencijacije adipocita. Pokazano je da C/EBP α , jedan od glavnih transkripcionih regulatora adipogeneze, može da aktivira promotor gena za leptin (Hollenberg i sar., 1997). Takođe, dodavanje agonista za PPAR γ tokom diferencijacije 3T3-L1 ćelija povećava ekspresiju leptina. Adipogeneza opisana prisustvom ostrvaca malih adipocita praćena povećanjem nivoa PPAR γ u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva u našoj studiji, mogli bi doprineti povećanju nivoa iRNK za leptin u masnom tkivu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu.

Povećana transkripcija gena za leptin kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu nije uzrokovala povećanje nivoa leptina u plazmi što ukazuje da su nedostajali dodatni stimulusi za sekreciju leptina. Jedan od njih bi mogao biti insulin. Naime, insulin je jedan od veoma važnih pozitivnih regulatora leptina koji stimuliše njegovu biosintezu i oslobađanje u cirkulaciju, smanjuje unutarćelijsku degradaciju i produžava

vreme polu-života novosintetisanog leptina (Lee i Fried, 2009). Međutim, merenja koncentracije insulina u našoj studiji, pokazala su da insulin u krvi nije bio značajno promenjen ni kod jedne eksperimentalne grupe (rezultati nisu prikazani). Na povećanje nivoa insulina u krvi utiče prevashodno povećanje glukoze, dok fruktoza ostvaruje veoma slab efekat na njegovu sekreciju. Po svojoj prilici, fruktoza ne stimuliše sekreciju insulina usled veoma niskog nivoa GLUT5 transportera za fruktozu na β ćelijama pankreasa (Curry, 1989). Rezus majmuni koji su primali intravenoznu infuziju fruktoze tokom 8 h, imali su blago snižen nivo insulina i nepromenjenju koncentraciju leptina u cirkulaciji za razliku od infuzije iste količine glukoze koja je dovela do povećanja nivoa leptina za oko 50% u odnosu na bazalni nivo (Havel, 1997). Slično, Teff i sar., (2004) su pokazali da je nivo leptina nakon obroka bogatog fruktozom znatno niži nego nakon unosa iste količine glukoze. Prethodno je potvrđeno i u humanim studijama u kojima unos pića sa srednjim i visokim sadržajem fruktoze nije doveo do promena nivoa leptina (Aeberli i sar., 2011). Stoga, odusutvo gojaznosti u kombinaciji sa nepromenjenim nivoom insulina kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu moglo bi da objasni zašto nije došlo do povećanja nivoa leptina u plazmi ove grupe životinja.

S druge strane, hroničan stres je uzrokovao smanjenje nivoa sekretovanog leptina u plazmi (**Slika 4.17.**), dok nivo iRNK koja nosi informaciju za sintezu leptina nije bio značajno promenjen ni kod jedne od stesiranih grupa ženki u odnosu na netretirane ženke (**Slika 4.16.**). Leptin se sintetiše i oslobađa iz adipocita, a koncentracija ovog hormona u plazmi direktno zavisi od mase masnog tkiva. Stoga se nivo leptina povećava u gojaznosti a smanjuje sa gubitkom telesne mase (Myers i sar., 2008). Upravo i naši rezultati pokazuju da ženke koje su imale smanjenu masu masnog tkiva, kao posledicu izlaganja stresu, imaju i smanjen nivo leptina u plazmi, dok ženke hranjene samo fruktozom, kod kojih je gojaznost izostala, imaju neizmenjen nivo leptina. Stoga, rezultat prikazan našom studijom oslikava opisanu korelaciju nivoa sekretovanog leptina i mase masnog tkiva.

Sve je više studija koje ukazuju da izlaganje stresu dovodi do promena u nivou leptina. Te je tako pokazano da pacovi hronično izlagani nepredvidivom stresu imaju smanjen nivo leptina u plazmi (Lu i sar., 2006). Stres koji podrazumeva fizičko ograničenje kretanja smanjuje nivo leptina kod miševa već nakon dva dana primene (Jeong i sar., 2013), a nizak nivo leptina zadržava se i po otklanjanju stresa (Harris i

sar., 2002). U skladu sa tim i naši rezultati ukazuju da izlaganje stresu dovodi do smanjenja nivoa leptina kod ženki nezavisno od režima ishrane. Iako se može pretpostaviti da je smanjena koncentracija leptina u plazmi primećena u našoj studiji posledica smanjene mase masnog tkiva, mehanizam putem koga stres zapravo ostvaruje efekte na nivo leptina nije u potpunosti poznat. Glukokortikoidi, kao hormoni stresa, predstavljaju kandidate za modulatore sinteze i sekrecije leptina tokom izlaganja stresnim situacijama. Analizirajući uticaj glukokortikoida na zrele adipocite Ayala-Sumano i sar., (2013) su primetili da u ćelijama u kojima glukokortikoidi stimulišu lipolizu ujedno, ostvaruju i negativnu regulaciju ekspresije leptina. Upotrebom antagonista GR-a, autori ističu da je ovaj receptor važan inhibitor transkripcije gena za leptin u zrelim adipocitima. Stoga, nije isključeno da u masnom tkivu stresiranih ženki u našoj studiji, glukokortikoidi usmereni na ispoljavanje lipolitičkih efekata mogu doprineti i smanjenom nivou leptina.

Mnoge studije ističu da glukokortikoidi mogu ostvariti i potpuno suprotni efekat na ekspresiju leptina. Zaista, postoje podaci da tretman glukokortikoidima može da poveća sintezu i sekreciju leptina u adipocitima (Sliker i sar., 1996; Won Jahng i sar., 2008; Zakrzewska i sar., 1999). Akutno povećan nivo glukokortikoida pozitivno reguliše ekspresiju leptina u masnom tkivu, posredstvom GRE sekvence, rezultujući prolaznim povećanjem nivoa leptina u plazmi (Kyrou i sar., 2006). Nije u potpunosti razjašnjeno šta sve determiniše koji će se efekat glukokortikoida ispoljiti ali bi to mogli biti isti signali koji usmeravaju glukokortikoidno dejstvo ka lipolitičkim odnosno lipogenim i adipogenim efektima u masnom tkivu. Stoga, glukokortikoidi imaju potencijal da dvojako regulišu ekspresiju leptina u masnom tkivu. Naši rezultati beleže da glukokortikoidi stimulišu procese lipogeneze i adipogeneze u masnom tkivu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu. Potpuno suprotno usmereni efekti glukokortikoida nego kod stresiranih ženki bi u ovom slučaju mogli učestvovati u procesima koji su rezultovali povećanjem nivoa iRNK za leptin. Svoje efekte, GR bi mogao ostvariti direktno, povećanjem transkripcije gena za leptin putem GRE sekvence ili indirektno, putem stimulacije adipogeneze i ekspresije PPAR γ i C/EBP α za koje je pokazano da aktiviraju transkripciju gena za leptin tokom adipogeneze.

Najveći deo svoje biološke uloge leptin ostvaruje vezivanjem za svoje receptore u mozgu, naročito u hipotalamusu kao ključnom centru integracije signala energetskog

balansa. Stoga, aktivnost signalnog puta leptina zavisi i od nivoa leptinskog receptora u hipotalamusu. Naši rezultati pokazuju da ni jedan od tretmana primenjen samostalno ili u kombinaciji nije promenio nivo transkripcije gena za leptinski receptor niti nivo receptorskog proteina u ovom regionu mozga (**Slika 4.18.**). To bi moglo da ukaže na neometanu funkciju receptora kod svih grupa ženki, odnosno da nijedan od tretmana nije doveo do leptinske rezistencije, zbog čega bi trebalo ispitati i funkcionalne karakteristike leptinskog receptora kao i regulatore njegove aktivnosti.

Upravo jedan od takvih, važnih regulatora je SOCS3 koji prepoznaje aktiviranu, fosforilisanu formu receptora i vezuje se za nju, tako ograničavajući aktivnost signalnog puta leptina. Ekspresija gena koji kodira SOCS3 pozitivno je regulisana samim leptinskim putem te je ovo primer negativne povratne sprege (Myers i sar., 2008). Rezultati naše studije pokazuju smanjen nivo iRNK za SOCS3 u hipotalamusu obe grupe stresiranih ženki (**Slika 4.19.**), što ne iznenađuje s obzirom da je nivo leptina u plazmi smanjen te verovatno nema ni aktivacije ObRb-a koja bi stimulisala ekspresiju SOCS3, a time i negativnu povratnu spregu. Iako postoje i alternativni vidovi regulacije ekspresije SOCS3, pozitivna regulacija leptinom se smatra jednim od glavnih regulatornih mehanizama, te bi upravo njegov izostanak kod stresiranih životinja mogao uzrokovati smanjenje nivoa iRNK za SOCS3. S obzirom na smanjen nivo leptina u plazmi ovih životinja uz smanjenu ekspresiju SOCS3 regulatora u hipotalamusu, nema znakova leptinske rezistencije kod stresiranih ženki. Nausprot tome, kod nestresiranih ženki koje su pile fruktozu nije primećena promena u nivou ekspresije ovog regulatora leptinskog puta. Nepromenjena ekspresija SOCS3 i ObRb-a u hipotalamusu zajedno sa nepromenjenim nivom leptina u plazmi ide u prilog našoj pretpostavci da je leptinska signalizacija u hipotalamusu nestresiranih ženki koje su pile fruktozu funkcionalna te da nije došlo do razvoja leptinske rezistencije. Dodatno, izmeren nivo triglicerida je kod ovih životinja u fiziološkim granicama i kao takav predstavlja još jedan faktor koji nagoveštava neizmenjenu leptinsku signalizaciju. Naime, leptinska rezistencija se može javiti i kao posledica narušenog transporta leptina kroz krvno-moždanu barijeru koji se obavlja posredstvom posebnog receptora. Povišen nivo triglicerida u krvi, što je čest slučaj kod gojaznih i osoba obolelih od metaboličkog sindroma, narušava sposobnost receptora da transportuje leptin i jedan je od glavnih razloga za razvoj leptinske rezistencije (Banks i sar., 2004). Stoga, iako se leptinski signalni put nalazio pod

očiglednim pritiskom fruktoze unete ishranom koja je inicirala povećanje transkripcije gena za leptin u adipocitima, naši rezultati sugerišu da nema značajnih izmena u signalnom putu leptina ni znakova leptinske rezistencije u ciljnom moždanom tkivu nestresiranih ženki koje su fruktozu.

Hrana bogata fruktozom je veoma prijatnog ukusa, te se u studijama koje ispituju efekte fruktoze najčešće prijavljuje povećan unos hrane koja sadrži fruktozu u odnosu na standardnu hranu (Bursać i sar., 2013, 2014; Zubira i sar., 2016). Kako je pokazano da izlaganje stresnim situacijama može da utiče na apetit, ovom studijom su ispitani i efekti fruktoze, stresa i njihove kombinacije na ekspresiju oreksigenih neuropeptida NPY i AgRP-a u hipotalamusu.

Devetonedeljna ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze nije dovela do promena u nivou iRNK za NPY i AgRP kod adultnih nestresiranih ženki pacova koje su pile fruktozu (**Slika 4.15.**). Iako postoje studije koje ističu da povećan unos hrane bogate fruktozom može dovesti do povećanja ekspresije oreksigenih neuropeptida, prevashodno NPY, u hipotalamusu (Beck, 2006; Li i sar., 2015), neke studije ukazuju i na smanjenje ekspresije ovog neuropeptida kao rezultat kompenzatornog mehanizma usled povećanog energetskeg unosa (Beck, 2006; Lindqvist i sar., 2008). U našoj studiji adultne nestresirane ženke koje su pile fruktozu nisu imale promenjen unos energije što je u skladu sa nepromenjenim nivoom ekspresije oreksigenih neuropeptida kod ove grupe pacova. Nakon intracerebroventrikularnog ubrizgavanja fruktoze nije primećen značajan efekat na nivo NPY i AgRP-a u hipotalamusu (Cha i sar., 2008). Dodatno, ispitivanjem aktivnosti hipotalamusa funkcionalnom magnetnom rezonancom nakon intravenoznog unosa fruktoze nisu detektovane značajne razlike u odnosu na bazalni nivo aktivnosti ili nivo nakon unosa fiziološkog rastvora (Purnell i sar., 2011). Takođe, prethodni rezultati naše laboratorije ukazuju da 10% rastvor fruktoze nije uzrokovao promene u nivou iRNK za NPY kod mladih mužjaka i ženki pacova (Milutinović i sar., 2014), kao i da je tek povećanje procenta konzumirane fruktoze na 60% dovelo do povećanja ekspresije ovog neuropeptida (Bursać i sar., 2014). S obzirom da gotovo nema studija koje direktno povezuju oralni unos fruktoze sa njenim efektima na regulaciju apetita u hipotalamusu, značajna je opservacija da bi procenat konzumirane fruktoze mogao imati važnu ulogu u ostvarivanju efekata fruktoze na nivo oreksigenih odnosno anoreksigenih neuropeptida u hipotalamusu.

Poznato je i da stres može da dovede do promena u regulaciji energetskog balansa i apetita, zbog čega neki ljudi dobijaju dok drugi gube na telesnoj masi kada su izloženi stresnim situacijama (Dallman i sar., 2003). Smatra se da bi se efekti stresora mogli javiti kao posledica promene ekspresije oreksigenih i anoreksigenih neuropeptida prevashodno u hipotalamusu. Posebna pažnja je usmerena na ispitivanje efekata stresa na NPY s obzirom da on ostvaruje ulogu i u adaptaciji organizma na stres (revidirano u (Reichmann i Holzer, 2016)).

Zaista, studije ukazuju da stres utiče na promenu ekspresije NPY u mozgu, međutim smer i intenzitet tih promena umnogome zavise od vrste i dužine trajanja primenjenog stresa kao i od ispitivanog regiona mozga. Najveći broj studija ukazuje da akutni stres povećava ekspresiju NPY u hipotalamusu (Chigr i sar., 2014; Conrad i McEwen, 2000), dok hronično izlaganje stresu dovodi do smanjenja nivoa ovog neuropeptida (Wang i sar., 2013). Ipak, neke studije ukazuju da stres ne dovodi do promena ekspresije oreksigenih neuropeptida u hipotalamusu. Ovo je bio slučaj i sa hroničnim stresom primenjenim u našoj studiji koji nije doveo do promena u nivou transkripcije gena kako za NPY tako ni za AgRP u hipotalamusu ženki bez obzira na režima ishrane. Throssell i sar., (1999) su pokazali da hroničan stres ograničenja kretanja nije uzrokovao promene nivoa peptida i iRNK za NPY u hipotalamusu pacova iako je priraštaj telesne mase bio smanjen. U studiji koja je pratila uticaj hroničnog stresa na metabolizam je istaknuto da je nakon 15 dana izlaganja stresu telesna masa miševa bila izrazito smanjena dok su nivoi iRNK za NPY i AgRP u hipotalamusu ostali nepromenjeni (Jeong i sar., 2013). U prvi mah nepromenjen nivo ekspresije oreksigenih neuropeptida u hipotalamusu stresiranih ženki koji smo zapazili deluje neočekivano. Naime, kod ovih životinja su masa masnog tkiva i telesna masa bile smanjenje, što bi se moglo objasniti kao posledica smanjenog apetita usled smanjene ekspresije oreksigenih neuropeptida u hipotalamusu. Međutim, energetski unos svih eksperimentalnih grupa u našoj studiji bio je isti, ukazujući da nije bilo promene u apetitu te je i neizmenjena ekspresija AgRP i NPY u skladu sa tim. Gore opisane promene telesne i mase masnog tkiva su najverovatnije uzrokovane lipolitičkim efektima glukokortikoida u masnom tkivu što je ranije detaljno opisano. Regulacija unosa hrane i energetskog balansa tokom izlaganja stresu je po svemu sudeći veoma kompleksna i uključuje modifikaciju aktivnosti mnogih kontrolnih mehanizma. Neizmenjen nivo NPY i AgRP-a kao i

izokalorijski unos energije nakon dugoročnog izlaganja stresu koji je doveo do smanjenja mase masnog tkiva kod obe grupe stresiranih ženki u našoj studiji govori o tome da mehanizmi koji bi stimulirali povećanje unosa hrane kojom bi se nadoknadile energetske rezerve nisu pokrenuti. Slično, Jeong i sar., (2013) ukazuju da hronični stres smanjuje telesnu masu miševa a da pri tome miševi ni u jednom trenutku tokom dve nedelje koliko je trajao stresni tretman nisu razvili kompenzatornu hiperfagiju. Dodatno, Harris i sar., (1998) ističu da nakon završetka stresnog tretmana koji je uzrokovao smanjenje telesne mase životinja, nema ni tendencije pojačavanja apetita u cilju nadoknade izgubljene telesne mase koja je ostala značajno niža u poređenju sa nestresiranim životinjama čak i 40 dana nakon prestanka delovanja stresa. Nasuprot tome, životinje kod kojih je uzrok smanjenja telesne mase restrikcija hrane, drastično povećavaju količinu unete hrane u trenutku kada hrana ponovo postane dostupna kako bi nadoknadile smanjene rezerve energije (Harris i sar., 1986).

Jedan od veoma bitnih negativnih regulatora ekspresije NPY i AgRP neuropeptida u hipotalamusu je leptin, čiji je nivo direktno zavistan od veličine masnog tkiva. Leptin učestvuje u ograničavanju unosa hrane u periodima energetskog izobilja i stimulaciji apetita kada postoji pad u rezervama energije. Iako je u našoj studiji, u skladu sa smanjenom masom visceralnog masnog tkiva, nivo leptina bio smanjen u plazmi svih stresiranih ženki to nije uzrokovalo povećanje nivoa oreksigenih neuropeptida u hipotalamusu. Slično našim rezultatima, Harris i sar., (2002) su detektovali smanjenje nivoa leptina tokom i nakon izlaganja pacova stresu, a da pri tome kao posledicu nisu uočili stimulaciju unosa hrane čak ni nakon završetka delovanja stresa. Takođe, Jeong i sar. (2013) su zapazili smanjenje nivoa leptina kod miševa hronično izlaganih imobilizacionom stresu. Čak i u studijama u kojima je uočeno povećanje nivoa leptina i leptinskog receptora u nukleusu arkuatusu nakon izlaganja stresu, nije nužno detektovana i promena u nivou NPY (Wang i sar., 2012). Iako je poznato da je leptin važan adipokin koji reguliše unos hrane i održavanje energetskog balansa, i iako se njegov nivo menja u stresnim situacijama, naši rezultati zajedno sa prethodno navedenim studijama sugerišu da tokom izlaganja stresu leptin nije odgovoran za regulaciju unosa hrane i promene u ekspresiji oreksigenih neuropeptoda koje se javljaju kao posledica stresa.

Glukokortikoidi kao hormoni stresa čine još jedan od veoma važnih činilaca zaduženih za regulaciju energetskeg balansa u stresnim situacijama. Naime, glukokortikoidi inicijalno utiču na inhibiciju apetita u trenucima početnog suočavanja sa stresnom situacijom i borbom za opstanak. Dugoročno, glukokortikoidi su zaslužni za povećanje unosa hrane u cilju što bržeg povratka izgubljenih resursa i energetske homeostaze. U skladu sa tim i istraživanja o uticaju glukokortikoida na ekspresiju NPY i AgRP daju oprečne rezultate. Pokazano je da je GR visoko eksprimiran u neuronima koji sekretuju NPY i AgRP u nukleusu arkuatusu, kao i da su GRE sekvence prisutne u neposrednoj blizini ili u samim promotorima gena koji kodiraju NPY i AgRP (Cintra i Bortolotti, 1992; Lee i sar., 2013; Misaki i sar., 1992). Shimizu i sar., (2008) ukazuju da glukokortikoidi povećavaju nivo iRNK za NPY i AgRP u nukleusu arkuatusu hipotalamusa pacova. Međutim, prijavljeno je i smanjenje ekspresije ovih oreksigenih neuropeptida kod gojaznih pacova nakon tretmana različitim dozama glukokortikoida, kao i kod pacova normalne telesne mase tretiranih višim dozama ovih hormona (Liu i sar., 2011). U našoj studiji povećanje nivoa GR-a i povećanje proteinskog nivoa enzima prereceptorskog metabolizma glukokortikoida u hipotalamusu stresiranih ženki koje su pile fruktozu nisu uticali na nivo iRNK za NPY i AgRP.

5.4. Efekti ishrane bogate fruktozom, hroničnog stresa i njihove kombinacije na razvoj inflamacije u hipotalamusu

Sve je više studija koje ukazuju na postojanje veze između razvoja inflamacije u mozgu i poremećaja koji se javljaju pod okriljem metaboličkog sindroma. Interdisciplinarna istraživanja neuroendokrinologije i neuroimunologije ukazuju da slaba kontrola inflamacije u mozgu a naročito u hipotalamusu može uzrokovati prekide neurotransmiterskih mreža što bi narušilo regulaciju metaboličke i energetske homeostaze u organizmu (Purkayastha i Cai, 2013). Ovom studijom analiziran je i uticaj fruktoze, hroničnog stresa i njihove kombinacije na inflamatorni status hipotalamusa.

Istraživanja efekata fruktoze ukazuju da ishrana bogata ovim šećerom može dovesti do razvoja inflamacije u mozgu. Pokazano je da povećan unos fruktoze može da aktivira signalni put NFκB i poveća ekspresiju njime regulisanih proinflamatornih

citokina IL1, IL6 i TNF α u hipotalamusu, uzrokujući inflamaciju (Li i sar., 2015; Xu i sar., 2016). Ipak, u većini *in vivo* studija koje ističu da fruktoza izaziva neuroinflamaciju detektovane su i povećana masa masnog tkiva i poremećaj lipidnog statusa u vidu povećanja nivoa triglicerida i slobodnih masnih kiselina u krvnoj plazmi. Međutim, i dalje nije postignut jasan konsezus o tome da li je neuroinflamacija uzrok ili posledica gojaznosti i metaboličkih poremećaja koji se dovode u vezu sa povećanim unosom fruktoze. Jedni autori pokazuju da povećan unos hranljivih materija, prevashodno masti i fruktoze, izaziva inflamaciju u hipotalamusu, kojom se narušava balans neuropeptida zaduženih za kontrolu unosa hrane i potrošnje energije, tako uzrokujući gojaznost (Li i sar., 2015; Xu i sar., 2016; Zhang i sar., 2008). Drugi autori sugerišu da bi ciklus mogao da započne efektima koje povećan unos hranljivih materija ostvaruje na masno tkivo izazivajući porast njegove mase, razvoj inflamacije i posledične promene endokrine funkcije putem koje masno tkivo ostvaruje vezu sa centrima u hipotalamusu, čime se narušava kontrola energetskeg balansa organizma (Arnoldussen i sar., 2014; Letra i sar., 2014; Parimisetty i sar., 2016). Na osnovu toga što nijedan od ispitivanih parametara inflamacije, poput proteinskog nivoa NF κ B, I κ B i ekspresije proinflamatornih citokina, nije bio promenjen u hipotalamusu nestresiranih ženki pacova koje su pile fruktozu (**Slika 4.20.** i **Slika 4.21.**), može se zaključiti da fruktoza nije uzrokovala pojavu inflamacije u ovom delu mozga. S obzirom na to da kod ove grupe životinja nije zapažena gojaznost, niti povišen nivo triglicerida i/ili slobodnih masnih kiselina u plazmi, naši rezultati idu u prilog studijama koje ukazuju da je gojaznost važan aspekt u razvoju inflamacije u hipotalamusu.

Dobro je poznato da masno tkivo ostvaruje komunikaciju sa centrima u mozgu putem sekretovanih adipokina. Sve češće, u žiži interesovanja nalaze se ispitivanja uloga adipokina leptina, rezistina i adiponektina u razvoju poremećaja funkcije mozga i nastanku bolesti poput demencije i Alchajmerove bolesti (Letra i sar., 2014; Misiak i sar., 2012). Masno tkivo predstavlja i izvor proinflamatornih citokina, što je posebno izraženo u gojaznosti (Kern i sar., 1995; Ziccardi i sar., 2002) i tokom energetskeg opterećenja kakvo predstavlja povećan unos fruktoze. Iako se smatra da neuroinflamaciju najvećim delom pokreću proinflamatorni citokini poreklom od ćelija mikroglije i astrocita, Misiak i sar., (2012) sugerišu da se ne može zanemariti značaj citokina koji dolaze sa periferije a čiji je izvor masno tkivo. Pretpostavke su da čak i

subklinička inflamacija masnog tkiva može da ima ulogu u razvoju centralne inflamacije i da pokreće mehanizme koji vode do promena u mozgu i razvoja neurodegeneracije (Misiak i sar., 2012). Dalje, inflamacija masnog tkiva i produkcija proinflammatoryh citokina i reaktivnih vrsta kiseonika dovodi se u vezu i sa narušavanjem selektivne propustljivosti krvno-moždane barijere (Parimisetty i sar., 2016). Kako se u našoj studiji pod uticajem ishrane bogate fruktozom primenjene bez izlaganja stresu inflamacija razvila samo u visceralnom masnom tkivu, može se pretpostaviti da bi fruktoza mogla izazivati metaboličke promene primarnim delovanjem na masno tkivo. Stoga, inflamatorne promene u visceralnom masnom tkivu mogu biti primarni događaj koji bi potom mogao doprineti razvoju inflamacije u hipotalamusu za šta bi verovatno bio neophodan unos veće količine fruktoze i/ili duži period njenog konzumiranja.

Studije ukazuju da izlaganje fizičkom, psihološkom i kombinovanom stresu stimuliše proinflammatory odgovor u mozgu, praćen sekrecijom proinflammatoryh citokina, prostanoida, azot-monoksida i aktivacijom njihovih transkripcionih regulatora (Gađek-Michalska i sar., 2013). Pacovi izlagani hroničnom stresu u periodu od 4 nedelje imali su povećan nivo transkripcije gena za proinflammatory citokine i smanjenu transkripciju gena za anti-inflamatorne citokine u hipokampusu, hipotalamusu i korteksu mozga (You i sar., 2011). Međutim, u našoj studiji, izlaganje ženki pacova hroničnom nepredvidivom stresu samostalno ili u kombinaciji sa ishranom bogatom fruktozom nije dovelo do razvoja inflamacije. Naprotiv, kombinacija stresa i fruktoze smanjila je nivo transkripcije gena za proinflammatory citokine IL1, IL6, TNF α u odnosu na netiretirane ženke ([Slika 4.21.](#)). Razlog za to mogao bi da leži u aktiviranom signalnom putu glukokortikoidnih hormona, koji kao važni modulatori imunskog odgovora organizma, ostvaruju svoje anti-inflamatorne efekte putem više različitih mehanizama, kako na periferiji tako i u CNS-u. Kliničke studije pokazuju da pacijenti sa bolestima koje karakteriše neuroinflamacija, poput multiple skleroze i encefalomijelitisa, ulaze u stadijum remisije simptoma bolesti pod uslovima hroničnog povećanja nivoa glukokortikoida (Elenkov i Chrousos, 1999). Transgeni soj miševa koje karakteriše pojačan signalni put glukokortikoida pokazuje rezistenciju i na pokušaj indukovanja encefalomijelitisa (van den Brandt i sar., 2007). Opšti imunosupresivni efekat koji glukokortikoidi ostvaruju i u CNS-u uključuje smanjenje nivoa

proinflammatory citokina, poput IL1, IL6 i TNF α , što se postiže direktno, inhibicijom transkripcije gena koji kodiraju ove citokine (Almawi i sar., 1996; Brattsiand i Linden, 1996) kao i indirektno, putem inhibicije transaktivacione sposobnosti njihovog transkripcionog regulatora NF κ B (De Bosscher i sar., 2000). S obzirom da su naši rezultati pokazali povećan nivo proteina HSD1 i H6PDH, enzima uključenih u prereseptorski metabolizam glukokortikoida, kao i povećan proteinski nivo GR-a u hipotalamusu stresiranih ženki koje su pile fruktozu, smanjen nivo iRNK za IL1, IL6 i TNF α je najverovatnije posledica delovanja glukokortikoida. Nivo NF κ B proteina i njegovog citoplazmatičnog inhibitora I κ B nije bio promenjen ni jednim od primenjenih tretmana (**Slika 4.20.**), što je u skladu sa činjenicom da glukokortikoidi inhibiraju ekspresiju proinflammatory citokina inhibicijom transkripcione aktivnosti NF κ B putem protein-protein interakcija u jedru.

Pored opisanog, postoje i drugi mehanizmi kojima glukokortikoidi kontrolišu neuroinflammatory, poput indukcije apoptoze T limfocita, inhibicije regrutovanja leukocita na krvno-moždanoj barijeri i kontrole njihove migracije, očuvanja integriteta i selektivne propustljivosti krvno-moždane barijere (revidirano u (Tischner i Reichardt, 2007)). Da li je i u kojoj meri neki od ovih mehanizama uključen u ostvarivanje anti-inflammatory dejstva glukokortikoida u našoj studiji, ostaje da se ispita.

6. Zaključci

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije zajedno pokazuju da fruktoza svojim lipogenim efektima uzrokuje metaboličke i fiziološke promene koje mogu predstavljati osnovu za razvoj metaboličkog sindroma, dok su posledice hroničnog stresa izraženije u odnosu na efekte fruktoze i uglavnom usmeravaju metabolizam ka potrošnji energije, pri čemu i u jednom i u drugom slučaju glukokortikoidi ostvaruju značajan doprinos. Na ovo ukazuju sledeći zaključci:

- ✓ Dugoročna ishrana obogaćena fruktozom i izlaganje hroničnom nepredvidivom stresu izazivaju suprotne efekte na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu adultnih ženki pacova:
 - Ishrana obogaćena fruktozom stimuliše adipogenezu, *de novo* lipogenezu i preuzimanje lipida.
 - Hronični stres smanjuje masu masnog tkiva, promoviše lipolizu i transport masnih kiselina u mitohondrije nezavisno od načina ishrane.
- ✓ Metabolički efekti fruktoze i stresa u visceralnom masnom tkivu najverovatnije se ostvaruju posredstvom aktivnosti glukokortikoidnih hormona, s obzirom da koincidiraju sa povećanom jedarnom akumulacijom i transkripcionom aktivnošću GR-a.
- ✓ Konzumiranje fruktoze kao ni izlaganje hroničnom nepredvidivom stresu ne dovode do promena u glukokortikoidnom i leptinskom signalnom putu koje bi narušile regulaciju unosa hrane kod ženki pacova o čemu svedoče neizmenjena ekspresija oreksigenih neuropeptida u hipotalamusu, kao i izokalorijski unos energije.
- ✓ Prekomerni unos fruktoze dovodi do razvoja inflamacije u visceralnom masnom tkivu kako kod mladih tako i kod adultnih nestresiranih ženki pacova. Međutim, za razliku od mladih, najverovatnije je da promene u glukokortikoidnom signalnom putu nisu uključene u pokretanje inflamacije u ovom tkivu adultnih ženki.
- ✓ U hipotalamusu glukokortikoidi ispoljavaju antinflamatorne efekte pri čemu je za stimulaciju signalnog puta glukokortikoida neophodno da se izlaganje stresu i konzumiranje fruktoze jave u kombinaciji.

- ✓ Inflamacija u visceralom masnom tkivu je jedna od prvih posledica konzumiranja fruktoze budući da se razvija u trenutku kada ni gojaznost ni inflamacija u hipotalamusu nisu uočljive.



7. Literatura

- Aeberli, I., Gerber, P. A., Hochuli, M., Kohler, S., Haile, S. R., Gouni-berthold, I., et al. (2011). Low to moderate sugar-sweetened beverage consumption impairs glucose and lipid metabolism and promotes inflammation in healthy young men: a randomized controlled trial 1 – 4. *American Society for Nutrition*, (1), 479–485.
- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S., i Elmquist, J. K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3), 263–307.
- Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A., i Rieder, M. J. (1996). Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *Journal of leukocyte biology*, 60(5), 563–72.
- Alzamendi, A., Castrogiovanni, D., Ortega, H. H., Gaillard, R. C., Giovambattista, A., i Spinedi, E. (2010). Parametrial adipose tissue and metabolic dysfunctions induced by fructose-rich diet in normal and neonatal-androgenized adult female rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(3), 441–8.
- Alzamendi, A., Giovambattista, A., Raschia, A., Madrid, V., Gaillard, R. C., Rebolledo, O., et al. (2009). Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine*, 35(2), 227–32.
- Andrew, R., Gale, C. R., Walker, B. R., Seckl, J. R., i Martyn, C. N. (2002). Glucocorticoid metabolism and the Metabolic Syndrome: associations in an elderly cohort. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 110(6), 284–290.
- Appel, B., i Fried, S. K. (1992). Effects of insulin and dexamethasone on lipoprotein lipase in human adipose tissue. *The American journal of physiology*, 262(5 Pt 1), E695-9.
- Armutcu, F., Coskun, O., Gürel, A., Kanter, M., Can, M., Ucar, F., i Unalacak, M. (2005). Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clinical biochemistry*, 38(6), 540–7.
- Arnoldussen, I. A. C., Kiliaan, A. J., i Gustafson, D. R. (2014). Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 24(12), 1982–99.
- Asada, M., Rauch, A., Shimizu, H., Maruyama, H., Miyaki, S., Shibamori, M., et al. (2011). DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Krüppel-like factor 15 gene expression. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 91(2), 203–15. Nature Publishing Group.
- Atkinson, H. C., i Waddell, B. J. (1997). Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle 1. *Endocrinology*, 138(9), 3842–3848.
- Ayala-Summano, J.-T., Velez-Delvalle, C., Beltrán-Langarica, A., Marsch-Moreno, M., Cerbón-Solorzano, J., i Kuri-Harcuch, W. (2011). Srebf1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. *Scientific reports*, 1, 178. Nature Publishing Group.
- Ayala-Summano, J.-T., Velez-delValle, C., Beltrán-Langarica, A., Marsch-Moreno, M., Hernandez-Mosqueira, C., i Kuri-Harcuch, W. (2013). Glucocorticoid paradoxically recruits adipose progenitors and impairs lipid homeostasis and glucose transport in mature adipocytes. *Scientific reports*, 3, 2573.
- Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., et al. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 30(1), 1–9. Elsevier Inc.
- Ayrolidi, E., i Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new

- important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal*, 23(11), 3649–3658.
- Azpiroz, A., Fano, E., Garmendia, L., Arregi, A., Cacho, R., Beitia, G., i Brain, P. F. (1999). Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 24(3), 345–361.
- Baldwin, W., McRae, S., Marek, G., Wymer, D., Pannu, V., Baylis, C., et al. (2011). Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 60(4), 1258–69.
- Banhegyi, G., Benedetti, A., Fulceri, R., i Senesi, S. (2004). Cooperativity between 11 - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Hexose-6-phosphate Dehydrogenase in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27017–27021.
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R., i Morley, J. E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*, 53(5), 1253–60.
- Bantle, J. P., Raatz, S. K., Thomas, W., i Georgopoulos, A. (2000). Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects 1 – 3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(5), 1128–1134.
- Barriga, C., Martín, M. I., Tabla, R., Ortega, E., i Rodríguez, A. B. (2001). Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress. *Journal of pineal research*, 30(3), 180–7.
- Bartolomucci, A., Cabassi, A., Govoni, P., Ceresini, G., Cero, C., Berra, D., et al. (2009). Metabolic Consequences and Vulnerability to Diet-Induced Obesity in Male Mice under Chronic Social Stress. (B. Baune, Ed.) *PLoS ONE*, 4(1), e4331.
- Bastard, J.-P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., et al. (2000). Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after Weight Loss 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(9), 3338–3342.
- Bastard, P. J., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, J. M., Caron, M., Vidal, H., et al. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, 17(March), 4–12.
- Bauer, M. E., Vedhara, K., Perks, P., Wilcock, G. K., Lightman, S. L., i Shanks, N. (2000). Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Journal of neuroimmunology*, 103(1), 84–92.
- Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1471), 1159–85. The Royal Society.
- Beigh, S. H., i Jain, S. (2012). Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformatics*, 8(13), 613–6. Biomedical Informatics Publishing Group.
- Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B., i Osborne, T. F. (1995). Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *The Journal of biological chemistry*, 270(43), 25578–83.
- Bhattacharyya, S., Brown, D. E., Brewer, J. A., Vogt, S. K., i Muglia, L. J. (2007).

- Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood*, 109(10), 4313–4319.
- Biddie, S. C., Conway-Campbell, B. L., i Lightman, S. L. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford, England)*, 51(3), 403–12. Oxford University Press.
- Block, J. P., He, Y., Zaslavsky, A. M., Ding, L., i Ayanian, J. Z. (2009). Psychosocial Stress and Change in Weight Among US Adults. *American Journal of Epidemiology*, 170(2), 181–192.
- Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F., i Krueger, J. M. (2004). Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1071–R1079.
- Bodwell, J. E., Hu, L. M., Hu, J. M., Ortí, E., i Munck, A. (1993). Glucocorticoid receptors: ATP-dependent cycling and hormone-dependent hyperphosphorylation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 47(1–6), 31–8.
- Bornstein, S. R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M., i Scherbaum, W. A. (1997). Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes*, 46(7), 1235–8.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., i Haegeman, G. (2000). Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3919–24.
- Boston, R. C., Moate, P. J., Allison, K. C., Lundgren, J. D., i Stunkard, A. J. (2008). Modeling circadian rhythms of food intake by means of parametric deconvolution: results from studies of the night eating syndrome. *The American journal of clinical nutrition*, 87(6), 1672–7.
- Boyko, E. J., Fujimoto, W. Y., Leonetti, D. L., i Newell-Morris, L. (2000). Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes care*, 23(4), 465–71.
- van den Brandt, J., Lühder, F., McPherson, K. G., de Graaf, K. L., Tischner, D., Wiehr, S., et al. (2007). Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *The American journal of pathology*, 170(3), 1041–53. American Society for Investigative Pathology.
- Brattsand, R., i Linden, M. (1996). Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 10 Suppl 2, 81-90–2.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., i Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 537–43.
- Bray, G. A., i Popkin, B. M. (2013). Calorie-sweetened beverages and fructose: What have we learned 10 years later. *Pediatric Obesity*, 8(4), 242–248.
- Broberger, C. (2005). Brain regulation of food intake and appetite: Molecules and networks. *Journal of Internal Medicine*, 258(4), 301–327.
- Brown, C. M., Dulloo, A. G., Yepuri, G., i Montani, J.-P. (2008). Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), R730–R737.

- Brown, N. F., Hill, J. K., Esser, V., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Foster, D. W., i Mcgarry, J. D. (1997). Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem. J*, 327, 225–231.
- Bujalska, I. J., Kumar, S., i Stewart, P. M. (1997). Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum”? *The Lancet*, 349(9060), 1210–1213.
- Burnstein, K. L., Jewell, C. M., i Cidlowski, J. A. (1990). Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry*, 265(13), 7284–91.
- Bursać, B. N., Djordjevic, A. D., Vasiljević, A. D., Milutinović, D. D. V., Veličković, N. A., Nestorović, N. M., i Matić, G. M. (2013). Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(6), 1166–1172.
- Bursać, B. N., Vasiljević, A. D., Nestorović, N. M., Veličković, N. A., Vojnović Milutinović, D. D., Matić, G. M., i Djordjevic, A. D. (2014). High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats - do glucocorticoids play a role? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 446–455.
- Burt, M. G., Gibney, J., i Ho, K. K. Y. (2007). Protein metabolism in glucocorticoid excess: study in Cushing’s syndrome and the effect of treatment. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 292(5), E1426–E1432.
- Cai, D. (2013a). Neuroinflammation and Neurodegeneration in Overnutrition- induced Diseases. *Trends Encocrinol Metab*, 24(1), 40–47.
- Cai, D. (2013b). Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(1), 40–47.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., et al. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377(6544), 68–71.
- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., et al. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British journal of nutrition*, 106 Suppl, S5-78.
- Cammisotto, P. G., i Bendayan, M. (2007). Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. *Histology and histopathology*, 22(2), 199–210.
- Campbell, J. E., Fediuc, S., Hawke, T. J., i Riddell, M. C. (2009). Endurance exercise training increases adipose tissue glucocorticoid exposure: adaptations that facilitate lipolysis. *Metabolism*, 58(5), 651–660.
- Campbell, J. E., Peckett, A. J., D’souza, A. M., Hawke, T. J., i Riddell, M. C. (2011). Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(1), C198-209.
- Cansell, C., Denis, R. G. P., Joly-Amado, A., Castel, J., i Luquet, S. (2012). Arcuate AgRP neurons and the regulation of energy balance. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 169.
- Caperuto, L. C., Anhê, G. F., Amanso, A. M., Ribeiro, L. M., Medina, M. C., Souza, L. C., et al. (2006). Distinct Regulation of IRS Proteins in Adipose Tissue from Obese Aged and Dexamethasone-Treated Rats. *Endocrine*, 29(3), 391–398.
- Cardellini, M., Andreozzi, F., Laratta, E., Marini, M. A., Lauro, R., Hribal, M. L., et al. (2007). Plasma interleukin-6 levels are increased in subjects with impaired glucose tolerance but not in those with impaired fasting glucose in a cohort of Italian

- Caucasians. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 23(2), 141–145.
- Cardoso, A. S., Gonzaga, N. C., Medeiros, C. C. M., i de Carvalho, D. F. (2013). Association of uric acid levels with components of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in overweight or obese children and adolescents. *Jornal de Pediatria*, 89(4), 412–418.
- Carrasco, G. A., i Van De Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 235–272.
- Castro, M. C., Francini, F., Schinella, G., Caldiz, C. I., Zubiría, M. G., Gagliardino, J. J., i Massa, M. L. (2012). Apocynin administration prevents the changes induced by a fructose-rich diet on rat liver metabolism and the antioxidant system. *Clinical science (London, England : 1979)*, 123(12), 681–92.
- Cavarape, A., Feletto, F., Mercuri, F., Quagliaro, L., Daman, G., i Ceriello, A. (2001). High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *Journal of endocrinological investigation*, 24(11), 838–45.
- Cha, S. H., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohan, S., i Lane, M. D. (2008). Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16871–5.
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D., i Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1409–1421.
- Chandler, V. L., Maler, B. A., i Yamamoto, K. R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell*, 33(2), 489–99.
- Chandola, T., Brunner, E., i Marmot, M. (2006). Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. *BMJ*, 332(7540), 521–525.
- Chapman, A. B., Knight, D. M., i Ringold, G. M. (1985). Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene. *The Journal of cell biology*, 101(4), 1227–35.
- Chigr, F., Rachidi, F., Tardivel, C., Najimi, M., i Moyse, E. (2014). Modulation of orexigenic and anorexigenic peptides gene expression in the rat DVC and hypothalamus by acute immobilization stress. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 198.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews. Endocrinology*, 5(7), 374–81. Nature Publishing Group.
- Cintra, A., i Bortolotti, F. (1992). Presence of strong glucocorticoid receptor immunoreactivity within hypothalamic and hypophyseal cells containing pro-opiomelanocortin peptides. *Brain research*, 577(1), 127–33.
- Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., et al. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), 1657–69.
- Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., et al. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & development*, 9(13), 1608–21.

- Coll, A. P., Farooqi, I. S., i O’Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell*, 129(2), 251–62. Elsevier.
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571–578.
- Conrad, C. D., i McEwen, B. S. (2000). Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyrus. *Brain research. Molecular brain research*, 79(1–2), 102–9.
- Coutinho, A. E., i Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 2–13. Elsevier Ireland Ltd.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., et al. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), 480–484.
- Cristancho, A. G., i Lazar, M. A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), 722–734. Nature Publishing Group.
- Cruz-Topete, D., i Cidlowski, J. A. (2014). One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *NeuroImmunoModulation*, 22, 20–32.
- Cryer, A. (1981). Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *International Journal of Biochemistry*, 13(5), 525–541.
- Currie, P. J. (2003). Integration of hypothalamic feeding and metabolic signals: focus on neuropeptide Y. *Appetite*, 41(3), 335–7.
- Curry, D. L. (1989). Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas*, 4(1), 2–9.
- Dallman, M. F., La Fleur, S. E., Pecoraro, N. C., Gomez, F., Houshyar, H., i Akana, S. F. (2004). Minireview: Glucocorticoids - Food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*, 145(6), 2633–2638.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., la Fleur, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., et al. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11696–11701.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., i Wadden, T. (1998). Tumor Necrosis Factor- α in Sera of Obese Patients: Fall with Weight Loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(8), 2907–2910.
- Dardeno, T. A., Chou, S. H., Moon, H.-S., Chamberland, J. P., Fiorenza, C. G., i Mantzoros, C. S. (2010). Leptin in human physiology and therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 377–393.
- Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C., i Adeli, K. (2010). Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 299(5), E685–E694.
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.-P., et al. (2005). Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis*, 179(1), 43–9.
- Desbriere, R., Vuaroqueaux, V., Achard, V., Boullu-Ciocca, S., Labuhn, M., Dutour, A., i Grino, M. (2006). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 mRNA is Increased in Both Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Patients*.

- Obesity*, 14(5), 794–798.
- Dhabhar, F. S. (2002). Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, behavior, and immunity*, 16(6), 785–98.
- Dieken, E. S., i Miesfeld, R. L. (1992). Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 12(2), 589–97.
- DiMeglio, D. P., i Mattes, R. D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(6), 794–800.
- Donahue, R. P., Abbott, R. D., Bloom, E., Reed, D. M., i Yano, K. (1987). Central obesity and coronary heart disease in men. *Lancet (London, England)*, 1(8537), 821–4.
- Dornas, W. C., de Lima, W. G., Pedrosa, M. L., i Silva, M. E. (2015). Health Implications of High-Fructose Intake and Current Research. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 6(6), 729–737. American Society for Nutrition.
- Douard, V., i Ferraris, R. P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E227–E237.
- Drake, A. J., Tang, J. I., i Nyirenda, M. J. (2007). Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clinical science*, 113(5), 219–32.
- Du, L., i Heaney, A. P. (2012). Regulation of adipose differentiation by fructose and GluT5. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(October 2012), 1773–82. The Endocrine Society.
- Dunn, J. F., Nisula, B. C., i Rodbard, D. (1981). Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Both Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 53(1), 58–68.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., i Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–848.
- Elenkov, i Chrousos. (1999). Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 10(9), 359–368.
- Emanuela, F., Grazia, M., Marco, D. R., Maria Paola, L., Giorgio, F., i Marco, B. (2012). Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 1–7.
- Emmerson, B. T. (1974). Effect of oral fructose on urate production. *Annals of the rheumatic diseases*, 33(3), 276–80.
- Eraslan, E., Akyazi, I., Ergül-Ekiz, E., i Matur, E. (2015). Noise stress-induced changes in mRNA levels of corticotropin-releasing hormone family molecules and glucocorticoid receptors in the rat brain. *Folia Biologica (Czech Republic)*, 61(2), 66–73.
- Esser, N., L'homme, L., De Roover, A., Kohnen, L., Scheen, A. J., Moutschen, M., et al. (2013). Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia*, 56(11), 2487–2497.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*

- (New York, N.Y.), 240(4854), 889–95.
- Exton, J. H., Friedmann, N., Wong, E. H., Brineaux, J. P., Corbin, J. D., i Park, C. R. (1972). Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*, 247(11), 3579–88.
- Fachin, A., Silva, R. K. S., Noschang, C. G., Pettenuzzo, L., Bertinetti, L., Billodre, M. N., et al. (2008). Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite*, 51(3), 592–598.
- Fain, J. N. (2006). Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. *Vitamins and hormones* (Vol. 74, pp. 443–477).
- Ferrandez, M. D., i Fuente, M. (1999). Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiologica Scandinavica*, 166(1), 47–53.
- Ferraù, F., i Korbonits, M. (2015). Metabolic comorbidities in Cushing’s syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 173(4), M133–M157.
- Festa, A., D’Agostino, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R. P., i Haffner, S. M. (2000). Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*, 102(1), 42–7.
- Fezeu, L., Balkau, B., Kengne, A.-P., Sobngwi, E., i Mbanya, J.-C. (2007). Metabolic syndrome in a sub-Saharan African setting: Central obesity may be the key determinant. *Atherosclerosis*, 193(1), 70–76.
- Fields, M., i Lewis, C. G. (1995). Antioxidant defense mechanisms in the female rat: interactions with alcohol, copper, and type of dietary carbohydrate. *Alcohol*, 12(3), 227–231.
- Filipovský, J., Ducimetière, P., Eschwège, E., Richard, J. L., Rosselin, G., i Claude, J. R. (1996). The relationship of blood pressure with glucose, insulin, heart rate, free fatty acids and plasma cortisol levels according to degree of obesity in middle-aged men. *Journal of hypertension*, 14(2), 229–35.
- Finucane, O. M., Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C., Harford, K. A., Morrison, M., Baugh, J., i Roche, H. M. (2014). Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis. *PLoS ONE*, 9(11), 1–14.
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., i Johnson, C. L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *JAMA*, 288(14), 1723–7.
- Fowler-Brown, A. G., Bennett, G. G., Goodman, M. S., Wee, C. C., Corbie-Smith, G. M., i James, S. A. (2009). Psychosocial Stress and 13-year BMI Change Among Blacks: The Pitt County Study. *Obesity*, 17(11), 2106–2109.
- Franckhauser, S., Muñ Oz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., et al. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 51, 624–30.
- Franks, P. W., Brage, S., Luan, J., Ekelund, U., Rahman, M., Farooqi, I. S., et al. (2005). Leptin predicts a worsening of the features of the metabolic syndrome independently of obesity. *Obesity research*, 13(8), 1476–1484.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., i Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311–1314. Nature Publishing

- Group.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., i Greenberg, A. S. (1998). Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3), 847–850.
- Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K., i Tarui, S. (1987). Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: clinical and experimental*, 36(1), 54–9.
- Fulgoni, V. L., i Quann, E. E. (2012). National trends in beverage consumption in children from birth to 5 years: analysis of NHANES across three decades. *Nutrition Journal*, 11(1), 92.
- Gądek-Michalska, A., Spyrka, J., Rachwalska, P., Tadeusz, J., i Bugajski, J. (2013). Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacological reports : PR*, 65, 1163–75.
- Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., i Bugajski, J. (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological reports : PR*, 65(6), 1655–62.
- Garbuliński, T., Obmińska-Domoradzka, B., Switała, M., i Debowy, J. (1991). Responses of neutrophils and lymphocytes in the cold stress: effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Polish journal of pharmacology and pharmacy*, 43(5), 353–9.
- Gathercole, L. L., Morgan, S. A., Bujalska, I. J., Hauton, D., Stewart, P. M., i Tomlinson, J. W. (2011). Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. *PLoS ONE*, 6(10), e26223.
- Geer, E. B., Lalazar, Y., Couto, L. M., Cohen, V., Lipton, L. R., Shi, W., et al. (2016). A prospective study of appetite and food craving in 30 patients with Cushing's disease. *Pituitary*, 19(2), 117–126.
- Gimeno, R. E., i Klaman, L. D. (2005). Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(2), 122–128.
- Giriş, M., Doğru-Abbasoğlu, S., Kumral, A., Olgaç, V., Koçak-Toker, N., i Uysal, M. (2014). Effect of carnosine alone or combined with α -tocopherol on hepatic steatosis and oxidative stress in fructose-induced insulin-resistant rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 70(2), 385–95.
- Glaser, R., Sheridan, J., Malarkey, W. B., MacCallum, R. C., i Kiecolt-Glaser, J. K. (2000). Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. *Psychosomatic medicine*, 62(6), 804–7.
- Glushakova, O., Kosugi, T., Roncal, C., Mu, W., Heinig, M., Cirillo, P., et al. (2008). Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(9), 1712–20. American Society of Nephrology.
- Goldberg, I. J., Eckel, R. H., i Abumrad, N. a. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S86-90.
- Gong, D. W., Bi, S., Pratley, R. E., i Weintraub, B. D. (1996). Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *The Journal of biological chemistry*, 271(8), 3971–4.
- Gonzales, A. M., i Orlando, R. A. (2007). Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutrition & metabolism*, 4, 22.

- Grad, I., i Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 2–12.
- Grenert, J. P., Johnson, B. D., i Toft, D. O. (1999). The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17525–33.
- Grimble, R. F. (2002). Inflammatory status and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 5(5), 551–9.
- Gross, K. L., i Cidlowski, J. A. (2008). Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(9), 331–339.
- Härd, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., et al. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4965), 157–60.
- Härle, P., i Straub, R. H. (2006). Leptin is a link between adipose tissue and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, 454–462.
- Harris, R. B., Kasser, T. R., i Martin, R. J. (1986). Dynamics of recovery of body composition after overfeeding, food restriction or starvation of mature female rats. *The Journal of nutrition*, 116(12), 2536–46.
- Harris, R. B. S. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(3), 414–23. Elsevier B.V.
- Harris, R. B. S., Mitchell, T. D., Simpson, J., Redmann, S. M., Youngblood, B. D., i Ryan, D. H. (2002). Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 282(1), R77–R88.
- Harris, R. B., Zhou, J., Youngblood, B. D., Rybkin, I. I., Smagin, G. N., i Ryan, D. H. (1998). Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *The American journal of physiology*, 275(6 Pt 2), R1928–38.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., i Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *The Journal of clinical investigation*, 84(5), 1663–70. American Society for Clinical Investigation.
- Havel, P. J. (1997). Glucose but not fructose infusion increases circulating leptin in proportion to adipose stores in Rhesus monkeys. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 105(SUPPL. 3), 37–38.
- Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Pich, E. M., Hauger, R. L., i Koob, G. F. (1993). Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuro peptide Y. *Brain research*, 611(1), 18–24.
- Heitzer, M. D., Wolf, I. M., Sanchez, E. R., Witchel, S. F., i DeFranco, D. B. (2007). Glucocorticoid receptor physiology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8(4), 321–330.
- Henry, J. P., Liu, Y. Y., Nadra, W. E., Qian, C. G., Mormede, P., Lemaire, V., et al. (1993). Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 21(5), 714–23.
- Herder, C., Schneitler, S., Rathmann, W., Haastert, B., Schneitler, H., Winkler, H., et al. (2007). Low-Grade Inflammation, Obesity, and Insulin Resistance in Adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(12), 4569–4574.
- Herman, R. H., Zakim, D., i Stifel, F. B. (1970). Effect of diet on lipid metabolism in

- experimental animals and man. *Federation proceedings*, 29(3), 1302–7.
- Hollenberg, A. N., Susulic, V. S., Madura, J. P., Zhang, B., Moller, D. E., Tontonoz, P., et al. (1997). Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ on the leptin promoter. *The Journal of biological chemistry*, 272(8), 5283–90.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867.
- Hotamisligil, G. S., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., et al. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 140(6), 900–917. Elsevier.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., i Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), 87–91.
- Hotamisligil, G. S., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., i Marino, M. W. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389(6651), 610–614.
- Hrnciar, J., Gábor, D., Hrnciarová, M., Okapcová, J., Szentiványi, M., i Kurray, P. (1999). [Relation between cytokines (TNF- α , IL-1 and 6) and homocysteine in android obesity and the phenomenon of insulin resistance syndromes]. *Vnitřní lékařství*, 45(1), 11–6.
- Hsieh, F.-C., Lee, C.-L., Chai, C.-Y., Chen, W.-T., Lu, Y.-C., i Wu, C.-S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & metabolism*, 10(1), 35.
- Hu, G.-X., Lin, H., Lian, Q.-Q., Zhou, S.-H., Guo, J., Zhou, H.-Y., et al. (2013). Curcumin as a Potent and Selective Inhibitor of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Improving Lipid Profiles in High-Fat-Diet-Treated Rats. (C. Verma, Ed.) *PLoS ONE*, 8(3), e49976.
- Hu, J. M., Bodwell, J. E., i Munck, A. (1994). Cell cycle-dependent glucocorticoid receptor phosphorylation and activity. *Molecular Endocrinology*, 8(12), 1709–1713.
- Huang, H.-Y., Korivi, M., Tsai, C.-H., Yang, J.-H., i Tsai, Y.-C. (2013). Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and Fruit-Vegetable Ferment along with High Fat-Fructose Diet Attenuates Metabolic Syndrome in Rats with Insulin Resistance. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 943020. Hindawi Publishing Corporation.
- Huang, K.-C., Lin, R. C. Y., Kormas, N., Lee, L.-T., Chen, C.-Y., Gill, T. P., i Caterson, I. D. (2004). Plasma leptin is associated with insulin resistance independent of age, body mass index, fat mass, lipids, and pubertal development in nondiabetic adolescents. *International Journal of Obesity*, 28(4), 470–475.
- Huang, Q., Timofeeva, E., i Richard, D. (2006). Regulation of corticotropin-releasing factor and its types 1 and 2 receptors by leptin in rats subjected to treadmill running-induced stress. *The Journal of endocrinology*, 191(1), 179–88. BioScientifica.
- Huttunen, J. K., Mäkinen, K. K., i Scheinin, A. (1976). Turku sugar studies XI: Effects of sucrose, fructose and xylitol diets on glucose, lipid and urate metabolism. *Acta Odontologica Scandinavica*, 34(6), 345–351. Taylor & Francis.
- Ishida-Takahashi, R., Uotani, S., Abe, T., Degawa-Yamauchi, M., Fukushima, T.,

- Fujita, N., et al. (2004). Rapid Inhibition of Leptin Signaling by Glucocorticoids in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19658–19664.
- Ishimoto, T., Lanasa, M. A., Le, M. T., Garcia, G. E., Diggle, C. P., Maclean, P. S., et al. (2012). Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4320–5.
- Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P. J., i Adcock, I. M. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med*, 203(1), 7–13.
- Jahan, F., Qureshi, R., Borhany, T., i Hamza, H. Bin. (2007). Metabolic syndrome: frequency and gender differences at an out - patient clinic. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, 17(1), 32–5.
- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R. E., Ahmadian, M., i Sul, H. S. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(1), G1–G4.
- Jeanrenaud, B., i Rohner-Jeanrenaud, F. (2000). CNS-periphery relationships and body weight homeostasis : influence of the glucocorticoid status. *Internal Journal of Obesity*, 24, 74–76.
- Jeong, J. Y., Lee, D. H., i Kang, S. S. (2013). Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 28(4), 288–96.
- Ji, N., Kovalovsky, A., Fingerle-Rowson, G., Guentzel, M. N., i Forsthuber, T. G. (2015). Macrophage migration inhibitory factor promotes resistance to glucocorticoid treatment in EAE. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 2(5), e139.
- Joëls, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V. M., Qin, Y., van Riel, E., et al. (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 7(4), 221–31.
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D.-H., et al. (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 86(4), 899–906.
- Jürgens, H., Haass, W., Castañeda, T. R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., et al. (2005). Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research*, 13(7), 1146–1156.
- Kanai, H., Tokunaga, K., Fujioka, S., Yamashita, S., Kameda-Takemura, K. K., i Matsuzawa, Y. (1996). Decrease in intra-abdominal visceral fat may reduce blood pressure in obese hypertensive women. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 27(1), 125–9.
- Kanellis, J., Watanabe, S., Li, J. H., Kang, D. H., Li, P., Nakagawa, T., et al. (2003). Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 41(6), 1287–93.
- Kannisto, K., Pietiläinen, K. H., Ehrenborg, E., Rissanen, A., Kaprio, J., Hamsten, A., i Yki-Järvinen, H. (2004). Overexpression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 in Adipose Tissue Is Associated with Acquired Obesity and Features of Insulin Resistance: Studies in Young Adult Monozygotic Twins. *The Journal of Clinical*

- Endocrinology & Metabolism*, 89(9), 4414–4421.
- Karagiannides, I., Golovatscka, V., Bakirtzi, K., Sideri, A., Salas, M., Stavrakis, D., et al. (2014). Chronic unpredictable stress regulates visceral adipocyte-mediated glucose metabolism and inflammatory circuits in male rats. *Physiological Reports*, 2(5), e00284.
- Karandrea, D., Kittas, C., i Kitraki, E. (2002). Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology*, 75(4), 217–226.
- Kasim-Karakas, S. E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L. C., i Goodman, M. N. (1996). Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 128(2), 208–13.
- Kaur, J., i Jaspinder. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, 2014, 943162. Hindawi Publishing Corporation.
- Kazumi, T., Odaka, H., Hozumi, T., Ishida, Y., Amano, N., i Yoshino, G. (1997). Effects of dietary fructose or glucose on triglyceride production and lipogenic enzyme activities in the liver of Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM. *Endocrine journal*, 44(2), 239–45.
- Kelishadi, R. (Ed.). (2012). *Dyslipidemia - From Prevention to Treatment*. InTech.
- Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R., i Simsolo, R. B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2111–2119.
- Kettner, N. M., Mayo, S. A., Hua, J., Lee, C., Moore, D. D., i Fu, L. (2015). Circadian Dysfunction Induces Leptin Resistance in Mice. *Cell Metabolism*, 22(3), 448–459.
- Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Kimura, N., i Taylor, H. L. (1972). Indices of relative weight and obesity. *Journal of chronic diseases*, 25(6), 329–43.
- Khan, S. H., Ling, J., i Kumar, R. (2011). TBP binding-induced folding of the Glucocorticoid receptor AF1 domain facilitates its interaction with Steroid Receptor Coactivator-1. *PLoS ONE*, 6(7).
- Kiecolt-Glaser, J. K., Glaser, R., Gravenstein, S., Malarkey, W. B., i Sheridan, J. (1996). Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 3043–7. National Academy of Sciences.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Marucha, P. T., Mercado, A. M., Malarkey, W. B., i Glaser, R. (1995). Slowing of wound healing by psychological stress. *The Lancet*, 346(8984), 1194–1196.
- Kim, J. K., Fillmore, J. J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I. K., Pypaert, M., et al. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7522–7527.
- Kinote, A., Faria, J. A., Roman, E. A., Solon, C., Razolli, D. S., Ignacio-Souza, L. M., et al. (2012). Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology*, 153(8), 3633–45.
- Kivimäki, M., Head, J., Ferrie, J. E., Shipley, M. J., Brunner, E., Vahtera, J., i Marmot, M. G. (2006). Work stress, weight gain and weight loss: evidence for bidirectional effects of job strain on body mass index in the Whitehall II study. *International Journal of Obesity*, 30(6), 982–987.
- Klein, S., Fontana, L., Young, V. L., Coggan, A. R., Kilo, C., Patterson, B. W., i

- Mohammed, B. S. (2004). Absence of an Effect of Liposuction on Insulin Action and Risk Factors for Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*, 350(25), 2549–2557.
- Kleinridders, A., Schenten, D., Könner, A. C., Belgardt, B. F., Mauer, J., Okamura, T., et al. (2009). MyD88 Signaling in the CNS Is Required for Development of Fatty Acid-Induced Leptin Resistance and Diet-Induced Obesity. *Cell Metabolism*, 10(4), 249–259.
- Konno, J., Yoshida, S., Ina, A., Ohmomo, H., Shutoh, F., Nogami, H., i Hisano, S. (2008). Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. *Neuroscience Research*, 60(3), 259–265.
- Korkeila, M., Kaprio, J., Rissanen, A., Koshenvuo, M., i Sörensen, T. I. (1998). Predictors of major weight gain in adult Finns: stress, life satisfaction and personality traits. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 22(10), 949–57.
- Kort, W. J. (1982). Effect of chronic light-dark shift stress on the immune response of the rat. *Physiology and Beh*, 29, 1083–1087.
- Kovačević, S., Nestorov, J., Matić, G., i Elaković, I. (2014). Dietary fructose-related adiposity and glucocorticoid receptor function in visceral adipose tissue of female rats. *European Journal of Nutrition*, 53(6), 1409–1420.
- Kovačević, S., Nestorov, J., Matić, G., i Elaković, I. (2017). Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 151–160.
- Krssak, M., Falk Petersen, K., Dresner, A., DiPietro, L., Vogel, S. M., Rothman, D. L., et al. (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*, 42(1), 113–116.
- Kuo, L. E., Kitlinska, J. B., Tilan, J. U., Li, L., Baker, S. B., Johnson, M. D., et al. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine*, 13(7), 803–811.
- Kurtz, T. W., Kabra, P. M., Booth, B. E., Al-Bander, H. A., Portale, A. A., Serena, B. G., et al. (1986). Liquid-Chromatographic Measurements of Inosine, Hypoxanthine, and Xanthine in Studies of Fructose-Induced Degradation of Adenine Nucleotides in Humans and Rats. *CLIN. CHEM*, 325(5), 782–786.
- Kylin. (1923). Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyca “mie- Hyperurika” miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin*, 105–127.
- Kyrou, I., Chrousos, G. P., i Tsigos, C. (2006). Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083, 77–110.
- Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.-P., Maachi, M., Quignard-Boulangé, A., Capeau, J., i Caron, M. (2006). Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*, 49(9), 2162–2173.
- Lakshmi, V., Sakai, R. R., McEwen, B. S., i Monder, C. (1991). Regional Distribution of 1 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Rat Brain*. *Endocrinology*, 128(4), 1741–1748.
- Lambillotte, C., Gilon, P., i Henquin, J. C. (1997). Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3), 414–423.

- Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., Rybo, E., i Sjöström, L. (1984). Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 289(6454), 1257–61.
- Lê, K.-A., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Vermathen, P., et al. (2006). A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *The American journal of clinical nutrition*, 84(6), 1374–9.
- Le, K.-A., 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. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1760–1765.
- Lee, B., Kim, S.-G., Kim, J., Choi, K. Y., Lee, S. S.-K., Lee, S. S.-K., i Lee, J. W. (2013). Brain-specific homeobox factor as a target selector for glucocorticoid receptor in energy balance. *Molecular and cellular biology*, 33(14), 2650–8.
- Lee, J.-E., i Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell & bioscience*, 4(1), 29.
- Lee, M.-J., i Fried, S. K. (2009). Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis i secretion. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296(6), E1230-8.
- Lee, M. J., Pramyothin, P., Karastergiou, K., i Fried, S. K. (2014). Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 473–481. Elsevier B.V.
- Lee, Y., Wang, M.-Y., Kakuma, T., Wang, Z.-W., Babcock, E., McCorkle, K., et al. (2001). Liporegulation in Diet-induced Obesity: THE ANTISTEATOTIC ROLE OF HYPERLEPTINEMIA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5629–5635.
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., et al. (2008). PPAR and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & Development*, 22(21), 2941–2952.
- Legeza, B., Balázs, Z., i Odermatt, A. (2014). Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Letters*, 588(3), 490–496.
- Lehrke, M., i Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPAR γ . *Cell*, 123(6), 993–999.
- Letra, L., Santana, I., i Seiça, R. (2014). Obesity as a risk factor for Alzheimer’s disease: the role of adipocytokines. *Metabolic brain disease*, 29(3), 563–8.
- Levert, K. L., Waldrop, G. L., i Stephens, J. M. (2002). A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(19), 16347–50.
- Li, G., Wang, S., i Gelehrter, T. D. (2003). Identification of glucocorticoid receptor domains involved in transrepression of transforming growth factor-beta action. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), 41779–88.
- Li, J., Li, F., i Zhao, A. (2006). Inflammation and leptin. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 3(3), 387–393.
- Li, J. M., Ge, C. X., Xu, M. X., Wang, W., Yu, R., Fan, C. Y., i Kong, L. D. (2015). Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(2),

189–202.

- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrão, a B., Cizza, G., Wong, M. L., Bongiorno, P. B., et al. (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature medicine*, 3, 575–579.
- Liden, J., Delaunay, F., Rafter, I., Gustafsson, J., i Okret, S. (1997). A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *The Journal of biological chemistry*, 272(34), 21467–72.
- Lindqvist, A., Baelemans, A., i Erlanson-Albertsson, C. (2008). Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory peptides*, 150(1–3), 26–32.
- Liu, X. Y., Shi, J. H., Du, W. H., Fan, Y. P., Hu, X. L., Zhang, C. C., et al. (2011). Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(5), 977–984.
- Livingstone, D. E. W., Jones, G. C., Smith, K., Jamieson, P. M., Andrew, R., Kenyon, C. J., i Walker, B. R. (2000). Understanding the Role of Glucocorticoids in Obesity: Tissue-Specific Alterations of Corticosterone Metabolism in Obese Zucker Rats 1. *Endocrinology*, 141(2), 560–563.
- London, E., i Castonguay, T. W. (2011). High Fructose Diets Increase 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Liver and Visceral Adipose in Rats Within 24-h Exposure. *Obesity*, 19(5), 925–932.
- Lönn, L., Kvist, H., Ernest, I., i Sjöström, L. (1994). Changes in body composition and adipose tissue distribution after treatment of women with Cushing's syndrome. *Metabolism: clinical and experimental*, 43(12), 1517–22.
- Lu, J., Wu, X. Y., Zhu, Q. Bin, Li, J., Shi, L. G., Wu, J. L., et al. (2015). Sex differences in the stress response in SD rats. *Behavioural Brain Research*, 284, 231–237. Elsevier B.V.
- Lu, X.-Y., Kim, C. S., Frazer, A., i Zhang, W. (2006). Leptin: a potential novel antidepressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1593–8.
- Lu, Z., Gu, Y., i Rooney, S. A. (2001). Transcriptional regulation of the lung fatty acid synthase gene by glucocorticoid, thyroid hormone and transforming growth factor- β 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1532(3), 213–222.
- Luecke, H. F., i Yamamoto, K. R. (2005). The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes & development*, 19(9), 1116–27. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., i Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352(6335), 497–505.
- Macdonald, I., Keyser, A., i Pacy, D. (1978). Some effects, in man, of varying the load of glucose, sucrose, fructose, or sorbitol on various metabolites in blood. *The American journal of clinical nutrition*, 31(8), 1305–11.
- Macfarlane, D. P., Forbes, S., i Walker, B. R. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: Fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *Journal of Endocrinology*, 197(2), 189–204.
- Madani, Z., Louchami, K., Sener, A., Malaisse, W. J., i Ait Yahia, D. (2012). Dietary sardine protein lowers insulin resistance, leptin and TNF- α and beneficially affects

- adipose tissue oxidative stress in rats with fructose-induced metabolic syndrome. *International journal of molecular medicine*, 29(2), 311–8.
- Madiehe, A. M., Lin, L., White, C., Braymer, H. D., Bray, G. A., i York, D. A. (2001). Constitutive activation of STAT-3 and downregulation of SOCS-3 expression induced by adrenalectomy. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(6).
- Mäenpää, P. H., Raivio, K. O., i Kekomäki, M. P. (1968). Liver adenine nucleotides: fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 161(3847), 1253–4.
- Magliano, D. C., Penna-de-Carvalho, A., Vazquez-Carrera, M., Mandarim-de-Lacerda, C. A., i Aguila, M. B. (2015). Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine*, 50(2), 355–367.
- Malandrino, M. I., Fucho, R., Weber, M., Calderon-Dominguez, M., Mir, J. F., Valcarcel, L., et al. (2015). Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 308(9), E756–E769.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., i Hill, R. A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*, 26(11), 1407–1433.
- Marissal-Arvy, N., Batandier, C., Dallennes, J., Canini, F., Poulet, L., Couturier, K., et al. (2013). Effect of a high-fat-high-fructose diet, stress and cinnamon on central expression of genes related to immune system, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function and cerebral plasticity in rats. *The British journal of nutrition*, 111(7), 1190–201.
- Marjani, A., i Moghasemi, S. (2012). The Metabolic Syndrome among Postmenopausal Women in Gorgan. *International Journal of Endocrinology*, 2012, 1–6. Hindawi Publishing Corporation.
- Marshall, G. D. J. (2011). The adverse effects of psychological stress on immunoregulatory balance: applications to human inflammatory diseases. *Immunology and allergy clinics of North America*, 31(1), 133–40.
- Martí, O., Martí, J., i Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior*, 55(4), 747–753.
- Martos, R., Valle, M., Morales, R. M., Cañete, R., Gascón, F., i Urbano, M. M. (2009). Changes in body mass index are associated with changes in inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers in obese prepubertal children after 9 months of body mass index SD score loss. *Metabolism*, 58(8), 1153–1160.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., i Flier, J. S. (2001). A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science*, 294(5549), 2166–2170.
- Matsuura, N., Nagasawa, K., Minagawa, Y., Ito, S., Sano, Y., Yamada, Y., et al. (2015). Restraint stress exacerbates cardiac and adipose tissue pathology via β -adrenergic signaling in rats with metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(10), H1275–H1286.
- Matsuzawa, Y. (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters*,

- 580(12), 2917–2921.
- McKay, L. I., i Cidlowski, J. A. (2000). CBP (CREB Binding Protein) Integrates NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) and Glucocorticoid Receptor Physical Interactions and Antagonism. *Molecular Endocrinology*, 14(8), 1222–1234.
- Meijer, K., de Vries, M., Al-Lahham, S., Bruinenberg, M., Weening, D., Dijkstra, M., et al. (2011). Human primary adipocytes exhibit immune cell function: Adipocytes prime inflammation independent of macrophages. *PLoS ONE*, 6(3), e17154.
- Mellouk, Z., Sener, A., Ait Yahia, D., i Malaisse, W. J. (2012). The metabolic syndrome of fructose-fed rats: effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids. VII. Oxidative stress. *Molecular medicine reports*, 6(6), 1409–12.
- Mendall, M. A., Patel, P., Asante, M., Ballam, L., Morris, J., Strachan, D. P., et al. (1997). Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart (British Cardiac Society)*, 78(3), 273–7. BMJ Publishing Group.
- Michel, C., Duclos, M., Cabanac, M., i Richard, D. (2005). Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Hormones and Behavior*, 48(2), 172–179.
- Milutinović, D. V., Nikolić, M., Dinić, J., Dordević, A., Veličković, N., Elaković, I., et al. (2014). Leptin and glucocorticoid signaling pathways in the hypothalamus of female and male fructose-fed rats. *Archives of Biological Sciences*, 66(2), 829–839.
- Misaki, N., Higuchi, H., Yamagata, K., i Miki, N. (1992). Identification of glucocorticoid responsive elements (GREs) at far upstream of rat NPY gene. *Neurochemistry international*, 21(2), 185–9.
- Misiak, B., Leszek, J., i Kiejna, A. (2012). Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. *Brain research bulletin*, 89(3–4), 144–9.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.-J., i Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), 25164–71.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., i Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119(3), 887–97.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., et al. (1997). Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- α , *in Vivo* 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(12), 4196–4200.
- Mohammad Reza, S., Hamideh, M., i Zahra, S. (2015). The Nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Artemisia dracuncululus* L. Aqueous Extract on Fructose Fed Male Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–5. Hindawi Publishing Corporation.
- Monteiro, R., i Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2010(Atp Iii).
- Moran, A., Steffen, L. M., Jacobs, D. R., Steinberger, J., Pankow, J. S., Hong, C.-P., et al. (2005). Relation of C-reactive protein to insulin resistance and cardiovascular risk factors in youth. *Diabetes care*, 28(7), 1763–8.
- Morton, N. M., Paterson, J. M., Masuzaki, H., Holmes, M. C., 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(4), 931–8.
- Moschen, A. R., Molnar, C., Geiger, S., Graziadei, I., Ebenbichler, C. F., Weiss, H., et al. (2010). Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut*, 59(9), 1259–64.
- Murdoch, C., Muthana, M., i Lewis, C. E. (2005). Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(10), 6257–63.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., i Münzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual review of physiology*, 70, 537–56.
- Nagasawa, K., Matsuura, N., Takeshita, Y., Ito, S., Sano, Y., Yamada, Y., et al. (2016). Attenuation of cold stress-induced exacerbation of cardiac and adipose tissue pathology and metabolic disorders in a rat model of metabolic syndrome by the glucocorticoid receptor antagonist RU486. *Nutrition & Diabetes*, 6(4), e207.
- Nair, S., Lee, Y. H., Lindsay, R. S., Walker, B. R., Tataranni, P. A., Bogardus, C., et al. (2004). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia*, 47(6), 1088–95.
- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., et al. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American journal of physiology. Renal physiology*, 290(3), F625-31.
- Nakamura, T., Tokunaga, K., Shimomura, I., Nishida, M., Yoshida, S., Kotani, K., et al. (1994). Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis*, 107(2), 239–46.
- Nakayama, S., Nishiyama, M., Iwasaki, Y., Shinahara, M., Okada, Y., Tsuda, M., et al. (2011). Corticotropin-releasing hormone (CRH) transgenic mice display hyperphagia with increased Agouti-related protein mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrine journal*, 58(4), 279–86.
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Denis, M., i Gustafsson, J. A. (1990). The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry*, 29(7), 1880–6.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., i Graetz, N. (2014). Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*, 384(9945), 766–781.
- Nieman, L. K., i Chanco Turner, M. L. (2006). Addison's disease. *Clinics in Dermatology*, 24(4), 276–280.
- Nieves, D. J., Cnop, M., Retzlaff, B., Walden, C. E., Brunzell, J. D., Knopp, R. H., i Kahn, S. E. (2003). The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes*, 52(1), 172–9.
- Nyberg, S. T., Heikkilä, K., Fransson, E. I., Alfredsson, L., De Bacquer, D., Bjorner, J. B., et al. (2012). Job strain in relation to body mass index: pooled analysis of 160 000 adults from 13 cohort studies. *Journal of Internal Medicine*, 272(1), 65–73.
- O'Malley, B. (1990). MINIREVIEW: The Steroid Receptor Superfamily: More Excitement Predicted for the Future. *Molecular Endocrinology*, 4(3), 363–369.
- O'Rourke, R. W., White, A. E., Metcalf, M. D., Olivas, A. S., Mitra, P., Larison, W. G.,

- et al. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, 54(6), 1480–1490. Springer Berlin Heidelberg.
- Oakley, R. H., i Cidlowski, J. A. (1993). Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 3(2), 63–88.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., et al. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1354–1361.
- Oliver, G., Wardle, J., i Gibson, E. L. (2000). Stress and food choice: a laboratory study. *Psychosomatic medicine*, 62(6), 853–65.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, N.Y.)*, 164(3880), 719–21.
- Ottosson, M., Mårin, P., Karason, K., Elander, A., i Björntorp, P. (1995). Blockade of the glucocorticoid receptor with RU 486: effects in vitro and in vivo on human adipose tissue lipoprotein lipase activity. *Obesity research*, 3(3), 233–40.
- Ottosson, M., Vikman-Adolfsson, K., Enerbäck, S., Olivecrona, G., i Björntorp, P. (1994). The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79(3), 820–825.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., i Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85–97.
- Padiya, R., Chowdhury, D., Borkar, R., Srinivas, R., Pal Bhadra, M., i Banerjee, S. K. (2014). Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *PLoS one*, 9(5), e94228.
- Parimisetty, A., Dorsemans, A.-C., Awada, R., Ravanan, P., Diotel, N., i Lefebvre d’Hellencourt, C. (2016). Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 67.
- Park, B.-H., Qiang, L., i Farmer, S. R. (2004). Phosphorylation of C/EBP at a Consensus Extracellular Signal-Regulated Kinase/Glycogen Synthase Kinase 3 Site Is Required for the Induction of Adiponectin Gene Expression during the Differentiation of Mouse Fibroblasts into Adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8671–8680.
- Park, H. S., Lee, S. Y., Kim, S. M., Han, J. H., i Kim, D. J. (2006). Prevalence of the metabolic syndrome among Korean adults according to the criteria of the International Diabetes Federation. *Diabetes care*, 29(4), 933–4.
- Parks, E. J., i Hellerstein, M. K. (2000). Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*, 71(2), 412–33.
- Patel, R., Williams-Dautovich, J., i Cummins, C. L. (2014). Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(7), 999–1011.
- Patel, S. B., Reams, G. P., Spear, R. M., Freeman, R. H., i Villarreal, D. (2008). Leptin: linking obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Curr.Hypertens Rep.*, 10(1534–3111 (Electronic)), 131–137.
- Peckett, A. J., Wright, D. C., i Riddell, M. C. (2011). The effects of glucocorticoids on

- adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(11), 1500–1510.
- Pektas, M. B., Koca, H. B., Sadi, G., i Akar, F. (2016). Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. *BioMed Research International*, 2016. Hindawi Publishing Corporation.
- Perez-Pozo, S. E., Schold, J., Nakagawa, T., Sánchez-Lozada, L. G., Johnson, R. J., i Lillo, J. L. (2010). Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *International journal of obesity (2005)*, 34(3), 454–461.
- Picard, D., i Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO journal*, 6(11), 3333–40. European Molecular Biology Organization.
- Plomgaard, P., Fischer, C. P., Ibfelt, T., Pedersen, B. K., i Van Hall, G. (2008). Tumor necrosis factor- α modulates human in vivo lipolysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(2), 543–549.
- Pollock, N. K., Bundy, V., Kanto, W., Davis, C. L., Bernard, P. J., Zhu, H., et al. (2012). Greater fructose consumption is associated with cardiometabolic risk markers and visceral adiposity in adolescents. *The Journal of nutrition*, 142(2), 251–7.
- Ponholzer, A., Temml, C., Rauchenwald, M., Marszalek, M., i Madersbacher, S. (2008). Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? *International Journal of Impotence Research*, 20(1), 100–104.
- Popkin, B. M., Armstrong, L. E., Bray, G. M., Caballero, B., Frei, B., i Willett, W. C. (2006). A new proposed guidance system for beverage consumption in the United States. *The American journal of clinical nutrition*, 83(3), 529–42.
- Pouliot, M. C., Després, J. P., 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. *The American journal of cardiology*, 73(7), 460–8.
- Pratt, W. B., i Toft, D. O. (1997). Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones 1. *Endocrine Reviews*, 18(3), 306–360.
- Purkayastha, S., i Cai, D. (2013). Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Molecular metabolism*, 2(4), 356–63. Elsevier.
- Purkayastha, S., Zhang, G., i Cai, D. (2011). Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine*, 17(7), 883–887.
- Purnell, J. Q., Klopfenstein, B. A., Stevens, A. A., Havel, P. J., Adams, S. H., Dunn, T. N., et al. (2011). Brain functional magnetic resonance imaging response to glucose and fructose infusions in humans. *Diabetes, obesity & metabolism*, 13(3), 229–34.
- Rankinen, T., Pérusse, L., Weisnagel, S. J., Snyder, E. E., Chagnon, Y. C., i Bouchard, C. (2002). The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. *Obesity Research*, 10(3), 196–243.
- Rask, E., Olsson, T., Soderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D. E. W., Johnson, O., i Walker, B. R. (2001). Tissue-Specific Dysregulation of Cortisol Metabolism in Human Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 1418–1421.

- Rask, E., Walker, B. R., Söderberg, S., Livingstone, D. E. W., Eliasson, M., Johnson, O., et al. (2002). Tissue-Specific Changes in Peripheral Cortisol Metabolism in Obese Women: Increased Adipose 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), 3330–3336.
- Reaven, G. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1595–607.
- Reichmann, F., i Holzer, P. (2016). Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides*, 55(1), 99–109.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., et al. (2003). Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30413–30416.
- Rezaee, F. (2013). Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 1(S13).
- Ribiere, C., i Plut, C. (2005). Nutritional regulation of leptin signaling. *Curr.Hypertens.Rep.*, 7(1522–6417 (Print)), 11–16.
- Ricketts, M. L., Verhaeg, J. M., Bujalska, I., Howie, A. J., Rainey, W. E., i Stewart, P. M. (1998). Immunohistochemical Localization of Type 1 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Tissues 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(4), 1325–1335.
- Robubi, A., Huber, K. R., i Krugluger, W. (2014). Extra fructose in the growth medium fuels lipogenesis of adipocytes. *Journal of Obesity*, 2014.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., et al. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*, 4(4), 611–7.
- Rosmond, R. (2005). Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*, 30(1), 1–10.
- Ruiz-Núñez, B., Pruijboom, L., Dijck-Brouwer, D. A. J. A. J., i Muskiet, F. A. J. J. (2013). Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: Causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(7), 1183–1201. Elsevier Inc.
- Rutledge, A. C., i Adeli, K. (2007). Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms INVOLVEMENT OF FRUCTOSE , A LIPOGENIC NUTRIENT , IN INITIATION OF THE. *Nutrition*, 65(6), 13–23.
- Rybkin, I. I., Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G. N., Ryan, D. H., i Harris, R. B. (1997). Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *The American journal of physiology*, 273(5 Pt 2), R1612-22.
- Salehi, M., Ferenczi, A., i Zumoff, B. (2005). Obesity and Cortisol Status. *Hormone and Metabolic Research*, 37(4), 193–197.
- Samuel, V. T. (2011). Fructose induced lipogenesis: From sugar to fat to insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(2), 60–65. Elsevier Ltd.
- Sanchez, E. R., Meshinchi, S., Tienrungrroj, W., Schlesinger, M. J., Toft, D. O., i Pratt, W. B. (1987). Relationship of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *The Journal of biological chemistry*, 262(15), 6986–91.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., i Munck, a. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocrine Reviews*, 21(April), 55–89.
- Sarraf, P., Frederich, R. C., Turner, E. M., Ma, G., Jaskowiak, N. T., Rivet, D. J., et al.

- (1997). Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *The Journal of experimental medicine*, 185(1), 171–5.
- Sautin, Y. Y., Nakagawa, T., Zharikov, S., i Johnson, R. J. (2007). Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(2), C584-96.
- Savontaus, E., Conwell, I. M., i Wardlaw, S. L. (2002). Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Research*, 958(1), 130–138.
- Scarpace, P. J., i Zhang, Y. (2008). Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R493–R500.
- Schäffler, A., Schölmerich, J., i Salzberger, B. (2007). Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in Immunology*, 28(9), 393–399.
- Schenk, S., Saberi, M., i Olefsky, J. M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 2992–3002.
- Schiffman, S. S., Graham, B. G., Sattely-Miller, E. A., i Peterson-Dancy, M. (2000). Elevated and sustained desire for sweet taste in african-americans: a potential factor in the development of obesity. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 16(10), 886–93.
- Schmid, B., Rippmann, J. F., Tadayyon, M., i Hamilton, B. S. (2005). Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(4), 1073–1082.
- Schowalter, D. B., Sullivan, W. P., Maihle, N. J., Dobson, A. D., Conneely, O. M., O'Malley, B. W., i Toft, D. O. (1991). Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry*, 266(31), 21165–73.
- Seckl, J. R., Morton, N. M., Chapman, K. E., i Walker, B. R. (2004). Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent progress in hormone research*, 59, 359–93.
- Seckl, J. R., i Walker, B. R. (2001). Minireview: 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1— A Tissue-Specific Amplifier of Glucocorticoid Action 1. *Endocrinology*, 142(4), 1371–1376.
- Selye, H. (1998). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 10(2), 230a–231.
- Serlachius, A., Hamer, M., i Wardle, J. (2007). Stress and weight change in university students in the United Kingdom. *Physiology & Behavior*, 92(4), 548–553.
- Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K.-Y., Johnson, R. J., i Scarpace, P. J. (2008). Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(5), R1370-5.
- Shapiro, A., Tümer, N., Gao, Y., Cheng, K.-Y., i Scarpace, P. J. (2011). Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *The British journal of nutrition*, 106(3), 390–7.
- Shapiro, A., Tumer, N., Gao, Y., Cheng, K. Y., i Scarpace, P. J. (2011). Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat

- content. *British Journal of Nutrition*, 106(3), 390–397.
- 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(9), 4544–4553.
- Shimojo, M., Whorwood, C. B., i Stewart, P. M. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat adrenal. *Journal of molecular endocrinology*, 17(2), 121–30.
- Shively, C. A., Register, T. C., i Clarkson, T. B. (2009). Social stress, visceral obesity, and coronary artery atherosclerosis: product of a primate adaptation. *American Journal of Primatology*, 71(9), 742–751.
- Shoelson, S. E., i Goldfine, A. B. (2009). Getting away from glucose: fanning the flames of obesity-induced inflammation. *Nature Medicine*, 15(4), 373–374.
- Sidorenkov, O., Nilssen, O., Brenn, T., Martiushov, S., Arkhipovsky, V. L., i Grjibovski, A. M. (2010). Prevalence of the metabolic syndrome and its components in Northwest Russia: the Arkhangelsk study. *BMC Public Health*, 10(1), 23.
- Siegrist, J., Matschinger, H., Cremer, P., i Seidel, D. (1988). Atherogenic risk in men suffering from occupational stress. *Atherosclerosis*, 69(2–3), 211–8.
- Siegrist, J., Peter, R., Cremer, P., i Seidel, D. (1997). Chronic work stress is associated with atherogenic lipids and elevated fibrinogen in middle-aged men. *Journal of internal medicine*, 242(2), 149–56.
- Sivaraman, K., Senthilkumar, G. P., Sankar, P., i Bobby, Z. (2013). Attenuation of oxidative stress, inflammation and insulin resistance by allium sativum in fructose-fed male rats. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 7(9), 1860–2.
- Sjögren, J., Weck, M., Nilsson, A., Ottosson, M., i Björntorp, P. (1994). Glucocorticoid hormone binding to rat adipocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1224(1), 17–21.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., i Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3), 1023–33.
- Slavin, B. G., Ong, J. M., i Kern, P. A. (1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *Journal of lipid research*, 35(9), 1535–41.
- Slieker, L. J., Sloop, K. W., Surface, P. L., Kriauciunas, A., LaQuier, F., Manetta, J., et al. (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *The Journal of biological chemistry*, 271(10), 5301–4. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Soncini, M., Yet, S. F., Moon, Y., Chun, J. Y., i Sul, H. S. (1995). Hormonal and nutritional control of the fatty acid synthase promoter in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 270(51), 30339–43. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Sorrells, S. F., i Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity*, 21(3), 259–72.
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., et al. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192–4199.
- Spruill, T. M. (2010). Chronic psychosocial stress and hypertension. *Current*

- hypertension reports*, 12(1), 10–6. NIH Public Access.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. a, Graham, J. L., et al. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese men. *Journal of Clinical Investigation*, 1334(5), 1322–1334.
- Steger, D. J., Grant, G. R., Schupp, M., Tomaru, T., Lefterova, M. I., Schug, J., et al. (2010). Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes and Development*, 24(10), 1035–1044.
- Stellar, E. (1994). The physiology of motivation. 1954. *Psychological review*, 101(2), 301–11.
- Stirpe, F., Della Corte, E., Bonetti, E., Abbondanza, A., Abbati, A., i De Stefano, F. (1970). Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet (London, England)*, 2(7686), 1310–1.
- Strähle, U., Schmid, W., i Schütz, G. (1988). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *The EMBO journal*, 7(11), 3389–95.
- Suga, A., Hirano, T., Kageyama, H., Osaka, T., Namba, Y., Tsuji, M., et al. (2000). Effects of fructose and glucose on plasma leptin, insulin, and insulin resistance in lean and VMH-lesioned obese rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 278(4), E677-83.
- Sul, H. S., i Wang, D. (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: Studies of Fatty Acid Synthase and Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Transcription. *Annual Review of Nutrition*, 18(1), 331–351.
- Sun, Z., i Andersson, R. (2002). NF-[kappa] B activation and inhibition: a review. *Shock*, 18(2), 99–106.
- Tangvarasittichai, S., Pongthaisong, S., i Tangvarasittichai, O. (2016). Tumor Necrosis Factor-A, Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in Abdominal Obesity Women. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 31(1), 68–74. Springer India.
- Tannin, G. M., Agarwal, A. K., Monder, C., New, M. I., i White, P. C. (1991). The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *The Journal of biological chemistry*, 266(25), 16653–8.
- Tchernof, A., i Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*, 93(1), 359–404.
- Teff, K. L., Elliott, S. S., Tschöp, M., Kieffer, T. J., Rader, D., Heiman, M., et al. (2004). Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2963–2972.
- Thaler, J. P., i Schwartz, M. W. (2010). Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: The hypothalamus heats up. *Endocrinology*, 151(9), 4109–4115.
- Thorsell, A., Carlsson, K., Ekman, R., i Heilig, M. (1999). Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. *Neuroreport*, 10(14), 3003–7.
- Tillman, E. J., Morgan, D. A., Rahmouni, K., Swoap, S. J., Bray, G., Nielsen, S., et al. (2014). Three Months of High-Fructose Feeding Fails to Induce Excessive Weight Gain or Leptin Resistance in Mice. (J. A. Chowen, Ed.) *PLoS ONE*, 9(9), e107206. Public Library of Science.
- Tischner, D., i Reichardt, H. M. (2007). Glucocorticoids in the control of

- neuroinflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 62–70.
- Tordoff, M. G., i Alleva, A. M. (1990). Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. *The American journal of clinical nutrition*, 51(6), 963–9.
- Torres, S. J., i Nowson, C. A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*, 23(11–12), 887–894.
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological reviews*, 93(1), 1–21.
- Tsushima, Y., Nishizawa, H., Tochino, Y., Nakatsuji, H., Sekimoto, R., Nagao, H., et al. (2013). Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. *The Journal of biological chemistry*, 288(38), 27138–49.
- Uchida, Y., Takeshita, K., Yamamoto, K., Kikuchi, R., Nakayama, T., Nomura, M., et al. (2012). Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: Role of visceral adipose-derived monocyte chemoattractant protein-1. *Diabetes*, 61(6), 1552–1561.
- Uchoa, E. T., Silva, L. E. C. M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., i Elias, L. L. K. (2012). Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides*, 46(3), 119–124. Elsevier Ltd.
- Uchoa, E. T., da Silva, L. E. C. M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., i Elias, L. L. K. (2010). Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Hormones and Behavior*, 58(5), 714–719. Elsevier Inc.
- Uddén, J., Björntorp, P., Arner, P., Barkeling, B., Meurling, L., i Rössner, S. (2003). Effects of glucocorticoids on leptin levels and eating behaviour in women. *Journal of Internal Medicine*, 253(2), 225–231.
- Uhlenhaut, N. H., Barish, G. D., Yu, R. T., Downes, M., Karunasiri, M., Liddle, C., et al. (2013). Insights into Negative Regulation by the Glucocorticoid Receptor from Genome-wide Profiling of Inflammatory Cistromes. *Molecular Cell*, 49(1), 158–171.
- Ulrich-Lai, Y. M., i Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409.
- Unger, R. H. (2002). Lipotoxic Diseases. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 319–336.
- Unger, R. H., i Roth, M. G. (2015). A new biology of diabetes revealed by leptin. *Cell Metabolism*, 21(1), 15–20. Elsevier Inc.
- Vaccarino, V., i Bremner, J. (2005). Stress response and the metabolic syndrome. *Cardiology*.
- Vague, J. (1947). Sexual differentiation. A factor affecting the forms of obesity. *Presse Medicale*, S39–S40.
- Vasselli, J. R., Scarpace, P. J., Harris, R. B. S., i Banks, W. A. (2013). Dietary components in the development of leptin resistance. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(2), 164–75. American Society for Nutrition.
- Vegiopoulos, A., i Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 43–61.
- Veličković, N., Djordjevic, A., Vasiljević, A., Bursać, B., Milutinović, D. V., i Matic, G. (2013). Tissue-specific regulation of inflammation by macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoids in fructose-fed Wistar rats. *The British journal of nutrition*, 110(May), 456–65.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H., i Hei, S. S. (2004). Desnutrin, an

- adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: Ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47066–47075.
- Voet, D., i Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*. John Wiley & Sons.
- Vos, M. B., Kimmons, J. E., Gillespie, C., Welsh, J., i Blanck, H. M. (2008). Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape journal of medicine*, 10(7), 160. WebMD/Medscape Health Network.
- De Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J., i Staels, B. (1995). Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *The Journal of biological chemistry*, 270(27), 15958–61.
- Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., Da Silva, M. E. R., i Santos, R. F. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, 34(11–12), 616–621.
- Walker, B. R., Phillips, D. I., Noon, J. P., Panarelli, M., Andrew, R., Edwards, H. V, et al. (1998). Increased glucocorticoid activity in men with cardiovascular risk factors. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 31(4), 891–5.
- Walker, E. A., i Stewart, P. M. (2003). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 14(7), 334–9. Elsevier.
- Wang, J.-C., Gray, N. E., Kuo, T., i Harris, C. A. (2012). Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. *Cell & bioscience*, 2(1), 19.
- Wang, M. (2005). The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutrition & metabolism*, 2(1), 3. BioMed Central.
- Wang, S.-X., Chen, J.-X., Yue, G.-X., Bai, M.-H., Kou, M.-J., Jin, Z.-Y., et al. (2012). Xiaoyaosan decoction regulates changes in neuropeptide y and leptin receptor in the rat arcuate nucleus after chronic immobilization stress. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, 381278. Hindawi Publishing Corporation.
- Wang, S., Chen, J., Yue, G., Bai, M., Kou, M., i Jin, Z. (2013). Neuropeptide Y and leptin receptor expression in the hypothalamus of rats with chronic immobilization stress. *Neural regeneration research*, 8(18), 1721–6. Medknow Publications.
- Wardle, J., Chida, Y., Gibson, E. L., Whitaker, K. L., i Steptoe, A. (2011). Stress and Adiposity: A Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *Obesity*, 19(4), 771–778.
- Weikum, E. R., Knuesel, M. T., Ortlund, E. A., i Yamamoto, K. R. (2017). Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allosteric. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(3), 159–174. Nature Publishing Group.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., i Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1796–808.
- Wellen, K. E., i Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1111–9.
- WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic. (2015). *WHO*. World Health Organization.
- WHO | Obesity and overweight. (2016). *WHO*. World Health Organization.
- Wisse, B. E. (2004). The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in

- metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(11), 2792–800.
- Won Jahng, J., Kim, N. Y., Ryu, V., Yoo, S. B., Kim, B.-T., Kang, D.-W., i Lee, J.-H. (2008). Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *European Journal of Pharmacology*, 581(1–2), 64–70.
- Wood, I. S., Wang, B., Lorente-Cebrián, S., i Trayhurn, P. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(2), 468–73.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., i Cota, D. (2008). Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annual Review of Nutrition*, 28(1), 295–311.
- Wu, T., Dorn, J. P., Donahue, R. P., Sempos, C. T., i Trevisan, M. (2002). Associations of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *American journal of epidemiology*, 155(1), 65–71.
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., et al. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular cell*, 3(2), 151–8.
- Xu, C., He, J., Jiang, H., Zu, L., Zhai, W., Pu, S., i Xu, G. (2009). Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(8), 1161–1170.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1821–30.
- Xu, M.-X., Yu, R., Shao, L.-F., Zhang, Y.-X., Ge, C.-X., Liu, X.-M., et al. (2016). Up-regulated fractalkine (FKN) and its receptor CX3CR1 are involved in fructose-induced neuroinflammation: Suppression by curcumin. *Brain, behavior, and immunity*.
- Yang, E. V., i Glaser, R. (2002). Stress-associated immunomodulation and its implications for responses to vaccination. *Expert Review of Vaccines*, 1(4), 453–459.
- Yarandi, S. S., Hebbbar, G., Sauer, C. G., Cole, C. R., i Ziegler, T. R. (2011). Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 27(3), 269–75. NIH Public Access.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., i He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(4), E1118-28.
- Yoo, H., i Franke, W. D. (2011). Stress and cardiovascular disease risk in female law enforcement officers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 84(3), 279–286.
- You, Z., Luo, C., Zhang, W., Chen, Y., He, J., Zhao, Q., et al. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. *Behavioural brain research*, 225(1), 135–41.

- Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., et al. (2002). Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50230–50236.
- Yu, C. Y., Mayba, O., Lee, J. V., Tran, J., Harris, C., Speed, T. P., i Wang, J. C. (2010). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PLoS ONE*, 5(12).
- Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J., i Coppack, S. W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(4), 972–8.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*, 364(9438), 937–952.
- Zakrzewska, K. E., Cusin, I., Sainbury, A., Rohner-Jeanrenaud, F., i Jeanrenaud, B. (1997). Toward an Understanding of Leptin Resistance, 46(April), 717–719.
- Zakrzewska, K. E., Cusin, I., Stricker-Krongrad, A., Boss, O., Ricquier, D., Jeanrenaud, B., i Rohner-Jeanrenaud, F. (1999). Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes*, 48(2), 365–70.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., i Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, 135(1), 61–73.
- Zhou, J., i Cidlowski, J. A. (2005). The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 70(5–7 SPEC. ISS.), 407–417.
- Zhou, Y., Fang, L., Jiang, L., Wen, P., Cao, H., He, W., et al. (2012). Uric Acid Induces Renal Inflammation via Activating Tubular NF-κB Signaling Pathway. (R. A. Linker, Ed.) *PLoS ONE*, 7(6), e39738.
- Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., et al. (2002). Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*, 105(7), 804–9.
- Zimmermann, M. B., i Aeberli, I. (2008). Dietary determinants of subclinical inflammation, dyslipidemia and components of the metabolic syndrome in overweight children: a review. *International journal of obesity (2005)*, 32 Suppl 6, S11-8.
- Zubira, M. G., Alzamendi, A., Moreno, G., Rey, M. A., Spinedi, E., i Giovambattista, A. (2016). Long-term fructose intake increases adipogenic potential: Evidence of direct effects of fructose on adipocyte precursor cells. *Nutrients*, 8(4).

Biografija

Sanja Kovačević je rođena 23.06.1988. god. u Beogradu. Osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu kao nosilac Vukove diplome. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2007. god. kao pobednik Republičkog takmičenja Ministarstva prosvete. Osvojila je prvu nagradu na Internacionalnoj BIOS-Olimijadi mladih 2009. god u Sankt Peterburgu, Rusija. Osnovne studije je završila 2010. god. sa prosečnom ocenom 9,41 i iste godine upisala master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija. Master rad, urađen na Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, pod rukovodstvom dr Gordane Matić i dr Ivane Elaković, pod naslovom „Uticaj ishrane obogaćene fruktozom na ekspresiju i funkciju glukokortikoidnog receptora u visceralnom masnom tkivu ženki pacova”, odbranila je 2012. god. sa ocenom 10, čime je završila master studije sa prosečnom ocenom 9,81. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija eukariota. Od 2013. god. je zaposlena i stekla zvanje istraživač saradnik na 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“ (br. 41009) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Član je Danske akademije za dijabetes i dobitnik njihove stipendije za učešće na kursu doktorskih studija, 2014. god. Niborg, Danska.

Do danas je objavila 6 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 3 saopštenja na međunarodnim skupovima.