

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Branislava D. Dobutović

**Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih  
enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze  
u jetri pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branislava D. Dobutović

**The effect of ghrelin on the regulation of  
antioxidant enzymes and inducible nitric  
oxide synthase in rat liver**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Branislave D. Dobutović, izabrana je u sastavu:

dr Esma R. Isenović, Naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd  
(mentor);

dr Jelena Đorđević, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
(mentor)

dr Edita Stokić, Redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu  
na \_\_\_\_\_ redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta  
u Beogradu, održanoj \_\_\_\_\_2013. godine. Svojom odlukom broj  
\_\_\_\_\_ od \_\_\_\_\_2013., Oblasno Veće Prirodnih Nauka Univerziteta u  
Beogradu je potvrdilo da kandidat Branislava D. Dobutović može da pristupi javnoj odbrani  
svoje doktorske disertacije pod naslovom: „Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih  
enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri pacova“

Datum i mesto javne odbrane: \_\_\_\_\_

*Doktorska disertacija „Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri pacova” je urađena u Laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu Genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, pod rukovodstvom dr Esme R. Isenović, NSV., u okviru projekta „Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot-monoksid-sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja”, br. 173033 finansiranog od strane MPN Republike Srbije.*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim Profesorki dr Jeleni Đorđević, mentoru sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu koja mi je pružila izuzetnu stručnu pomoć tokom pisanja i recenzije disertacije, svojim konstruktivnim sugestijama. Zahvaljujem joj se na izdvojenom vremenu i na velikom trudu pri pregledu i oceni ovog rada.*

*Dr Editi Stokić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu zahvaljujem se na stručnoj podršci, predusretljivosti i trudu pri oceni i pregledu doktorske disertacije.*

*Dr Esmi Isenović, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” i neposrednom mentoru se zahvaljujem na svesrdnoj podršci, bezgraničnoj motivaciji i pomoći od samog početka izrade teze.*

*Najtoplije se zahvaljujem kolegici dr Emmini Sudar na svim sugestijama i konstruktivnim savetima, kao i svim saradnicima na projektu: mr Sanji Soskić, Dragani Nikolić, Milanu Obradoviću, Sonji Zafirović, Aleksandri Jovanović, Kristini Savić, Julijani Stanimirović i Ivani Resanović koji su svojom kolegijalnošću i prijateljstvom učestvovali i doprineli izradi moje doktorske disertacije. Zahvaljujem se kolegici dr Snežani Tepavčević i saradnicima sa zajedničkog projekta na stručnoj pomoći u prvim fazama izrade disertacije. Takođe se zahvaljujem mr Jovanki Đurić, dr Ani Đorđević i Jeleni Đorđević na pomoći pri analizi enzima antioksidativne zaštite.*

*Zahvalnost dugujem i Ani Božović, dr Jeleni Velebit, dr Katarini Smiljanić i drugim saradnicima Laboratorije za Radiobiologiju i Molekularnu Genetiku, kao i kolegi dr Predragu Vujoviću sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Saši Sokoviću na neizmernoj i nesebičnoj pomoći, strpljenju i prijateljstvu.*

*Izrada ove teze ne bi bila moguća bez dragih prijatelja koji su svojom ljubavlju, entuzijazmom i savetima doprineli da istrajem.*

*Svima koji su uz mene bili i pomogli mi, još jednom, iskreno se zahvaljujem.*

*Ova teza je posvećena mojim roditeljima i mom bratu, koji su najviše zaslužni za sve što sam postigla.*

U Beogradu, 2013.godine

Branislava Dobutović

# SAŽETAK

## Naslov doktorske disertacije: „Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri pacova ”

U poslednjih nekoliko godina, objavljeni naučni podaci sve više ukazuju na antioksidantne i antiinflamatorne efekte grelina. U ovoj doktorskoj disertaciji su izučavani efekti grelina na ekspresiju enzima jetre: superoksid dismutaze (engl. *Superoxide Dismutase*, SOD), katalaze (engl. *Catalase*, CAT), glutation peroksidaze (engl. *Glutathione peroxidase*, GPx) i glutation reduktaze (engl. *Glutathione reductase*, GR), kao i ekspresiju njihovog uzvodnog regulatora, nuklearnog faktora-kB (engl. *Nuclear factor- kappa B*, NFκB). Takođe su izučavani efekti grelina na regulaciju enzima inducibilne azot-monoksid-sintaze (engl. *Inducible nitric oxide synthase*, iNOS; NOS2) u jetri pacova. Jedan od ciljeva istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bio i utvrđivanje uloge kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima (engl. *Extracellular regulated protein kinase*, ERK1/2) i protein kinaze B (engl. *Protein kinase B*, Akt) u grelinom regulisanoj aktivnosti i ekspresiji antioksidativnih enzima i iNOS u jetri pacova.

Kontrolni, normalno hranjeni mužjaci pacova, Wistar soja (mase 200-250g) kao i mužjaci pacova koji su bili na dijeti bogatoj mastima (engl. *High fat diet*, HF), tretirani su grelinom (0,3nmol/5μl) intracerebroventrikularnim (ICV) injeciranjem, u bočne cerebralne komore svaka 24 h, u trajanju od 5 dana. Dva sata nakon poslednjeg tretmana, životinje su žrtvovane i izolovane su jetre. Za utvrđivanje nivoa ekspresije proteina: iNOS, antioksidativnih enzima, fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup>, ERK 1/2 i NFκB, subjedinica p50 i p65, primenjena je Western blot metoda. Dobijeni rezultati pokazuju da dolazi do povećanja ekspresije proteina za enzime antioksidativne zaštite: Cu/Zn-SOD (p<0,05), Mn-SOD (p<0,05), CAT (p<0,01), GPx, (p<0,001), kao i GR (p<0,01) u grupi normalno hranjenih životinja tretiranih grelinom u poređenju sa kontrolnim životinjama. Grelina značajno smanjuje ekspresiju iNOS (p<0,001) kao i fosforilaciju NFκB subjedinica p65 (p<0,001) i p50 (p<0,05) u grupi normalno hranjenih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom

pacova. Nivo fosforilacije Akt na Ser<sup>473</sup> značajno je veći u grelinom tretiranoj grupi nego kod kontrolnih životinja ( $p < 0,01$ ).

Tretman gojaznih pacova grelinom doveo je do značajnog povećanje ekspresije enzima antioksidativne zaštite: Cu/Zn-SOD ( $p < 0,05$ ), Mn-SOD ( $p < 0,05$ ), CAT ( $p < 0,05$ ), GPx ( $p < 0,05$ ) kao i ekspresije transkripcionog faktora NF $\kappa$ B p65 ( $p < 0,001$ ), dok je značajno smanjio fosforilaciju ERK1/2 ( $p < 0,05$ ) i Akt ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa ne-tretiranim gojaznim pacovima.

Dobijeni rezultati pokazuju da grelin reguliše ekspresiju antioksidativnih enzima i iNOS kod kontrolnih, normalno hranjenih pacova preko Akt/ERK1/2 kinaza. Takođe, grelin smanjuje posledice indukovanog oksidativnog stresa kod gojaznih pacova povećanjem ekspresije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.

U zaključku, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u jetri normalno hranjenih pacova, aktivacija Akt i ERK1/2 je uključena u regulaciju ekspresije antioksidativnih enzima i iNOS posredovane grelinom.

**Ključne reči: grelin, Akt, ERK 1/2, iNOS, antioksidativni enzimi, NF $\kappa$ B, Jetra**

**Naučna oblast: Biologija**

**Uža naučna oblast: Molekularna endokrinologija**

**UDK broj: [ 577.175.2/.7: 577.218 ]: 611.36] : 636.028 (043.3)**

# ABSTRACT

In recent years, there have been prominent findings suggesting that ghrelin has antioxidant and anti-inflammatory effects. In this study we investigated the effects of ghrelin on protein expression of liver antioxidant enzymes superoxide dismutases (SODs), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR) as well as protein expression of their upstream regulator, nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B). We have also studied the effects of ghrelin on liver inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression. Furthermore, we aimed to investigate whether extracellular regulated protein kinase (ERK 1/2) and protein kinase B (Akt) are involved in ghrelin regulated liver antioxidant enzymes and iNOS protein expression. Male Wistar rats (200-250g) were treated with ghrelin (0,3nmol/5 $\mu$ l) injected into the lateral cerebral ventricle every 24 h for 5 day, 2 h after the last treatment the animals were sacrificed and liver excised. For protein expression of antioxidant enzymes, iNOS, phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup>, ERK1/2 and nuclear factor B (NF $\kappa$ B) subunits 50 and 65, Western blot method was used. Results show significantly higher protein expression of Cu/Zn SOD (p<0,05), Mn-SOD (p<0,05), CAT (p<0,01), GPx, (p<0,001), and GR (p<0,01) in the liver isolated from ghrelin treated animals compared with control animals. On the contrary, ghrelin significantly (p<0,001) reduced protein expression of iNOS. In addition, phosphorylation of NF $\kappa$ B subunits p65 and p50 were significantly (p<0,05) decreased by ghrelin when compared with controls. Phosphorylation of ERK1/2 and phosphorylation of Akt at Ser<sup>473</sup> were significantly higher in ghrelin treated than in control animals (p<0,05 for ERK1/2; p<0,01 for Akt). In conclusion, results from this study show that activation of Akt and ERK1/2 are involved in ghrelin-mediated regulation of protein expression of antioxidant enzymes and iNOS in the rat liver.

**Title of doctoral dissertation: “The effect of ghrelin on the regulation of antioxidant enzymes and inducible nitric oxide synthase in rat liver”**

**Key Words: ghrelin, Akt, ERK1/2, iNOS, antioxidative enzymes, NFκB, Liver.**

**Scientific Group: Biology**

**Specific Area Within A Group: Molecular Endocrinology**

**UDK number: [ 577.175.2/.7: 577.218 ]: 611.36] : 636.028 (043.3)**



# SPISAK SKRAĆENICA

<b>AC</b>	adenil ciklaza
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropni hormon - ( <i>engl. Adrenocorticotropic Hormone</i> )
<b>Akt</b>	protein kinaza B - ( <i>engl. Protein Kinase B</i> )
<b>AL</b>	arginosukcinat liaza - ( <i>engl. Argininosuccinate Lyase</i> )
<b>ALP</b>	alkalna fosfataza - ( <i>engl. Alkaline Phosphatase</i> )
<b>APS</b>	amonijumpersulfat
<b>Arg</b>	arginin - ( <i>engl. Arginine</i> )
<b>AS</b>	arginosukcinat sintaza - ( <i>engl. Argininosuccinate Synthase</i> )
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BCA</b>	bicinhoninična kiselina - ( <i>engl. Bicinchoninic Acid</i> )
<b>BCIP</b>	fosfatni reagens - ( <i>engl. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate</i> )
<b>BH<sub>4</sub></b>	tetrahidrobiopterin
<b>B<sub>n</sub></b>	bazna linija koja predstavlja prosečni šum - ( <i>engl. „Background”</i> )
<b>BSA</b>	goveđi serum albumini - ( <i>engl. Bovine Serum Albumine</i> )
<b>cAMP</b>	ciklični adenzin monofosfat
<b>CAT</b>	katalaza ( <i>engl. Catalase</i> )
<b>cDNK</b>	DNK komplementarna molekulu RNK - ( <i>engl. Complementary DNA</i> )
<b>cGMP</b>	ciklični guanozin monofosfat
<b>Co-A</b>	koenzim A
<b>C<sub>T</sub></b>	pražni ciklus - ( <i>engl. „Threshold Cycle”</i> )
<b>Cu/Zn-SOD</b>	bakar cink SOD
<b>DAG</b>	diacil-glicerol
<b>DAMO</b>	diacetil monoksim
<b>DDC</b>	dietilditiokarbamat - ( <i>engl. Diethyl-Dithiocarbamate</i> )
<b>DMT2</b>	dijabetes melitus tipa 2
<b>DNK</b>	dezoksiribonukleinska kiselina
<b>dNTP</b>	dezoksiribonukleotid trifosfat
<b>DPC-H<sub>2</sub>O</b>	voda tretirana dietilpirokarbonatom
<b>ECL</b>	pojačana hemiluminiscencija - ( <i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i> )

<b>EC-SOD</b>	ekstracelularna SOD
<b>EDTA</b>	etilendiamintetrasirćetna kiselina - ( <i>engl. Etylenediaminetetraacetic Acid</i> )
<b>eNOS</b>	endotelna NOS - ( <i>engl. Endothelial NOS</i> )
<b>ER</b>	endoplazmatski retikulum
<b>ERK1/2</b>	ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 - ( <i>engl. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2</i> )
<b>G</b>	grupa pacova tretiranih grelinom - ( <i>engl. Ghrelin</i> )
<b>GH</b>	hormon rasta - ( <i>engl. Growth Hormone</i> )
<b>GHRH</b>	GH-oslobađajući hormon - ( <i>engl. GH-Releasing Hormone</i> )
<b>GHRH-R</b>	GHRH receptor - ( <i>engl. GHRH Receptor</i> )
<b>GHS</b>	GH-sekretagozi - ( <i>engl. GH-Secretagogues</i> )
<b>GHS-R</b>	GHS-receptor - ( <i>engl. GHS-Receptor</i> )
<b>GHS-R1a</b>	GHS-R tipa 1a - ( <i>engl. GHS-R Type 1a</i> )
<b>GPCR</b>	receptor spregnut sa proteinom G - ( <i>engl. G Protein-Coupled Receptor</i> )
<b>GPx</b>	glutation peroksidaza - ( <i>engl. Glutathione peroxidase</i> )
<b>GR</b>	glutation reduktaza - ( <i>engl. Glutathione reductase</i> )
<b>GSH</b>	redukovani glutation
<b>GSSG</b>	oksidovani glutation
<b>GTP</b>	guanozin trifosfat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	vodonik peroksid
<b>HF</b>	grupa pacova koja je bila na režimu ishrane bogatoj mastima - ( <i>engl. High Fat</i> )
<b>HFG</b>	grupa gojaznih pacova tretiranih grelinom - ( <i>engl. HF-Ghrelin</i> )
<b>HOMA</b>	metod za procenu funkcije $\beta$ ćelija pankreasa i stepena rezistencije na insulin iz bazalnih (natašte) vrednosti glukoze i insulina, odnosno c peptida - ( <i>engl. Homeostasis Model Assessment Index</i> )
<b>HOMA-IR</b>	HOMA-indeks određivanje stepena rezistencije na insulin
<b>HOMA-<math>\beta</math></b>	HOMA-indeks je mera funkcionalnog kapaciteta $\beta$ -ćelija pankreasa
<b>HRP</b>	peroksidaza rena - ( <i>engl. Horse Radish Peroxidase</i> )
<b>[<sup>125</sup>I-His<sup>9</sup>]ghrelin</b>	radioaktivno obeležen grelin
<b>I.N.T</b>	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom
<b>ICV</b>	intracerebroventrikularno; način aplikacije
<b>IGF-1</b>	insulinu sličan faktor rasta-1 - ( <i>engl. Insulin-Like Growth Factor-1</i> )

<b>IGFR-1</b>	receptor za insulinu sličan faktor rasta-1 - ( <i>engl. IGF-1 Receptor</i> )
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IκB</b>	inhibitor NFκB - ( <i>engl. Inhibitor of NFκB</i> )
<b>IκK</b>	IκB kinaza - ( <i>engl. IκB Kinase</i> )
<b>iNOS</b>	inducibilna NOS - ( <i>engl. Inducible NOS</i> )
<b>IP</b>	intraperitonealno; način aplikacije
<b>IP<sub>3</sub></b>	inozitol 1,4,5-trifosfat
<b>IR</b>	rezistencija na insulin - ( <i>engl. Insulin Resistance</i> )
<b>iRNK</b>	informaciona RNK
<b>IRS-1</b>	supstrat receptora za insulin-1 - ( <i>engl. Insulin Receptor Substrate-1</i> )
<b>ISPF</b>	isonitrosopropiofenon
<b>IV</b>	intravenski; način aplikacije
<b>J<sup>125</sup>-insulin</b>	radioaktivno obeležen insulin
<b>JNK/SAPK</b>	c-Jun N-terminalna kinaza - ( <i>engl. c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase</i> )
<b>KONT</b>	kontrolna grupa pacova
<b>LPS</b>	lipopolisaiharidi
<b>MAPK</b>	mitogenima aktivirane protein kinaze - ( <i>engl. Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
<b>MAPKK</b>	kinaze MAPK - ( <i>engl. MAPK Kinases</i> )
<b>MAPKKK</b>	kinaze MAPKK - ( <i>engl. MAPKK Kinases</i> )
<b>Mn-SOD</b>	mangan SOD
<b>MnTBAP</b>	mitohondrijalni sintetski analog SOD - ( <i>engl. Manganese [III] tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin</i> )
<b>NADP</b>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
<b>NADPH</b>	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	natrijum bikarbonat
<b>NBT</b>	hloridni reagens - ( <i>engl. Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i> )
<b>NFκB</b>	nuklearni faktor-κB - ( <i>engl. Nuclear Factor-κB</i> )
<b>NFκB-p50</b>	subjedinica p50 NFκB
<b>NFκB-p65</b>	subjedinica p65 NFκB
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	amonijum jon
<b>nNOS</b>	neuronalna NOS - ( <i>engl. Neuronal NOS</i> )

<b>NO</b>	azot-monoksid
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitritni jon
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitratni jon
<b>NOS</b>	NO-sintaza - ( <i>engl. NO Synthase</i> )
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	superoksidni anjon
<b>OxS</b>	Oksidativni stres ( <i>engl. Oxidative Stress</i> )
<b>PBS</b>	fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom - ( <i>engl. Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PCR</b>	reakcija lančanog umnožavanja - ( <i>engl. Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	polietilenglikol
<b>PH</b>	plekstrinu homologi domeni, kratke oligopeptidne sekvence u proteinima - ( <i>engl. „Pleckstrin Homology”</i> )
<b>PI3-K</b>	fosfatidilinozitol-3 –kinaza - ( <i>engl. Phosphoinositide 3-Kinase</i> )
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinositol 4,5- bifosfat
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatidilinozitol 3,4,5- trifosfat
<b>PKB</b>	protein kinaza B - ( <i>engl. Protein Kinase B</i> )
<b>PMSF</b>	fenilmetansulfonilfluorid – ( <i>engl. Phenylmethanesulphonylfluoride</i> )
<b>PVDF</b>	vrsta transfer membrane - ( <i>engl. Polyvinylidene Difluoride</i> )
<b>qRT-PCR</b>	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu – ( <i>engl. Quantitativ Real Time-PCR</i> )
<b>RIA</b>	radioimunološka metoda - ( <i>engl. Radioimmunoassay</i> )
<b>RNK</b>	ribonukleinska kiselina
<b>ROS</b>	reaktivne vrste kiseonika - ( <i>engl. Reactive oxigen species</i> )
<b>SDS</b>	natrijum dodecil sulfat - ( <i>engl. Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS - ( <i>engl. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SEM</b>	standardna greška
<b>SMK</b>	slobodne masne kiseline
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza ( <i>engl. Superoxide Dismutase</i> )
<b>TBS</b>	fiziološki rastvor puferovan Tris-om - ( <i>engl. Tris-Buffered Saline</i> )
<b>TBS-T</b>	0,05% Tween 20 u TBS puferu
<b>TCA</b>	trihlor-sirćetna kiselina - ( <i>engl. Trichloroacetic Acid</i> )
<b>TEA</b>	trietanolaminski pufer

<b>Tris</b>	tris (hidroksimetil) aminometan
<b>XOD</b>	ksantin oksidaze - ( <i>engl. Xanthine Oxidase</i> )
<b><math>\Delta R_n</math></b>	relativna fluorescencija

# Sadržaj

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1. Opšte osobine grelina.....	3
1.1.1. Fiziološka uloga grelina.....	5
1.2. Oksidativni stres (OxS) .....	9
1.2.1. Enzimske komponente antioksidativne zaštite .....	11
1.2.1.1. Super oksid dismutaze .....	11
1.2.1.2. Katalaza.....	12
1.2.1.3. Glutation peroksidaze .....	13
1.2.1.4. Glutation reduktaza.....	14
1.2.2. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite.....	15
1.2.3. Oksidativni stres (OxS), rezistencija na insulin (IR) i gojaznost.....	16
1.3. Azot-monoksid-sintaze .....	19
1.3.1. Inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS).....	20
1.3.2. Uloga iNOS u patofiziologiji IR i gojaznosti.....	20
1.4. Protein kinaze B i Ekstracelularnim Signalima Regulisana Kinaza 1/2.....	21
<b>2. Ciljevi istraživanja.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Hipoteza.....</b>	<b>24</b>
<b>4. Materijal i metode .....</b>	<b>25</b>
4.5. Eksperimentalne životinje.....	25
4.6. Intracerebroventrikularno injeciranje grelina .....	26
4.7. Biohemijske analize.....	28

4.7.1. Određivanje koncentracije glukoze u serumu pacova.....	28
4.7.2. Određivanje koncentracije insulina u serumu pacova.....	28
4.7.3. Određivanje indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) i sekrecije insulina	29
4.7.4. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u serumu pacova.....	30
4.8. Izolovanje ćelijskog lizata iz jetre pacova .....	30
4.9. Određivanje koncentracije proteina .....	31
4.10. SDS-PAGE - elektroforeza .....	32
4.11. Imuno blot .....	34
4.12. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u uzorcima jetre pacova .....	37
4.12.1. Određivanje aktivnosti SOD .....	37
4.12.2. Određivanje aktivnosti CAT.....	38
4.13. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata u serumu pacova.....	39
4.14. Određivanje aktivnosti arginaze u homogenatu jetre pacova.....	40
4.15. Određivanje ekspresije gena za iNOS.....	41
4.15.1. Izolacija RNK iz jetre pacova.....	41
4.15.2. Prepis RNK u cDNK-reverzna transkripcija .....	41
4.15.3. Kvantifikacija ekspresije iNOS gena.....	42
4.16. Statistička obrada rezultata .....	46
<b>5. Rezultati .....</b>	<b>47</b>
5.17. Efekti grelina na masu tela i masu jetre kao i razvoj rezistencije na insulin kod normalno hranjenih pacova.....	47
5.17.1. Efekat grelina na masu tela i masu jetre normalno hranjenih pacova .....	47
5.17.2. Efekat grelina na koncentraciju glukoze i insulina u serumu normalno hranjenih pacova.....	48
5.17.3. Efekti grelina na HOMA-IR i HOMA- $\beta$ indekse kod normalno hranjenih pacova .....	50

5.17.4. Efekat grelina na koncentraciju SMK u serumu normalno hranjenih pacova .....	52
5.18. Efekat grelina na nivo proteina enzima antioksidativne zaštite u jetri normalno hranjenih pacova .....	53
5.19. Efekat grelina na regulaciju ekspresije i aktivnost iNOS u jetri normalno hranjenih pacova.....	57
5.19.1. Efekat grelina na aktivnost enzima arginaze u jetri normalno hranjenih pacova .....	57
5.19.2. Efekat grelina na aktivnost iNOS u jetri normalno hranjenih pacova .....	58
5.19.3. Efekat grelina na ekspresiju iNOS u jetri normalno hranjenih pacova .....	59
5.20. Efekti grelina na nivo transkripcionog faktora NF $\kappa$ B u jetri normalno hranjenih pacova.....	60
5.21. Efekat grelina na aktivaciju ERK1/2 i Akt u jetri normalno hranjenih pacova ....	62
5.22. Efekti grelina na masu tela i jetre kao i razvoj rezistencije na insulin kod gojaznih pacova.....	64
5.22.1. Efekti ishrane bogate mastima i grelina na masu tela i jetre pacova.....	64
5.22.2. Koncentracija glukoze i insulina u serumu ne-tretiranih gojaznih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom .....	65
5.22.3. Indeksi HOMA-IR i HOMA- $\beta$ kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom .....	66
5.22.4. Efekat grelina na koncentraciju SMK u serumu gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom.....	68
5.23. Nivo proteina enzima antioksidativne zaštite kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom.....	69
5.24. Regulacija aktivnosti i ekspresije iNOS u jetri gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom.....	75
5.24.1. Aktivnost enzima arginaze u jetri ne-tretiranih gojaznih pacova i tretiranih grelinom .....	75



5.24.2. Nivo ukupnog NO kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom.....	76
5.25. Nivo transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B u jetri pacova kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom .....	79
5.26. Nivo ERK1/2 i Akt kinaza u jetri pacova kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom.....	81
<b>6. Diskusija.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Zaključci.....</b>	<b>95</b>
<b>8. Literatura.....</b>	<b>97</b>
<b>9. Biografija.....</b>	<b>118</b>
<b>10. Prilozi.....</b>	<b>120</b>

# 1. Uvod

Oksidativni stres (engl. *Oxidative Stress*, OxS) podrazumeva poremećenu bioraspoloživost reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS), koja je rezultat narušene ravnoteže između stvaranja i uklanjanja ROS, odnosno poremećene antioksidativne odbrane organizma (Sies sa sar., 1985; Halliwell, 1987a). Enzimi antioksidativne zaštite kao što su: superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase*, SOD), katalaza (engl. *Catalase*, CAT), glutation peroksidaza (engl. *Glutathione peroxidase*, GPx) i glutation reduktaza (engl. *Glutathione reductase*, GR) predstavljaju sistem antioksidativne zaštite organizma od pojave mogućih oštećenja izazvanih OxS (Halliwell sa sar., 1990). Osnovna uloga SOD je da konvertuje  $O_2^{\cdot-}$  u  $H_2O_2$ . Peroksidi, uključujući i one koji su nastali aktivnošću SOD, se metabolišu aktivnošću GPx i CAT do vode, dok se uloga GR u antioksidativnoj odbrani ćelija sastoji u održavanju glutationa u redukovanom stanju, koje je neophodno za aktivnost GPx. Veoma bitan mehanizam u sprečavanju mogućih oštećenja organizma prouzrokovanih OxS, podrazumeva održavanje koncentracije ROS u okvirima fizioloških granica kao i adekvatan odgovor komponenti antioksidativne zaštite (Taniguchi sa sar., 2004; Cetin sa sar., 2011).

Jetra je organ koji ima centralnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Jedna od najznačajnijih metaboličkih uloga jetre je proces detoksifikacije kao i antioksidativna zaštita. Jetra poseduje jedan od najjačih antioksidativnih kapaciteta u organizmu. Takođe, u jetri se odvija niz intenzivnih metaboličkih procesa kao što su metabolizam masti, glukoze i

proteina (katabolizam i anabolizam), skladištenje supstanci, biotransformacija endogenih supstanci, kao i katabolizam hormona.

Inducibilna azot-monoksid-sintaza (engl. *Inducible nitric oxide synthase*, iNOS; NOS2) je enzim čijom aktivnošću se oslobađa velika količina reaktivnog azot monoksida (engl. *Nitric Oxide*, NO), koji lako reaguje sa drugim ROS. U reakciji NO i superoksidnog anjona ( $O_2^{\cdot-}$ ) nastaje peroksininitrit, koji dovodi do nitrozilacije proteina, oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i aktivacije poli (ADP-riboze) polimeraze (Beckman sa sar., 1990; Ponnuswamy sa sar., 2009). Nastali peroksininitrit reaguje sa drugim molekulima nakon čega se formiraju druge reaktivne vrste kiseonika i azota, kao što su azot dioksid, peroksininitritna kiselina i hidroksi-radikal (Hall sa sar., 2004; Ponnuswamy sa sar., 2009).

U kojoj meri, koliko dugo i na kom mestu će se aktivirati iNOS i generisati NO zavisi kako od vrste stimulusa, tako i od tipa ćelije u kojoj je iNOS aktiviran (Li sa sar., 1999). Tako npr. u stanjima inflamacije jetre, koja mogu biti prouzrokovana i gojaznošću, hepatociti su izloženi povećanoj koncentraciji NO, koga stvaraju, kako okolne ćelije jetre, tako i same hepatocite (Li sa sar., 1999; Rius sa sar., 2012). Za regulaciju transkripcije gena za iNOS, neophodna je aktivacija faktora transkripcije, Nuklearnog Faktora- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor- $\kappa$ B*, NF $\kappa$ B) (Li sa sar., 1999). Pokazano je da redoks-osetljivi transkripcioni faktor NF $\kappa$ B predstavlja važan detektor stresa i da ima ključnu ulogu u određivanju „sudbine“ ćelije izložene OxS (Martindale sa sar., 2002; Djordjevic sa sar., 2010). ROS mogu da aktiviraju NF $\kappa$ B, usled čega dolazi do pokretanja transkripcije brojnih gena, uključujući i gene za enzime antioksidativne zaštite i iNOS proteine (Kim sa sar., 1994; Wan sa sar., 1994; Xu sa sar., 1999; Zhou sa sar., 2001; Rojo sa sar., 2004; Djordjevic sa sar., 2010).

Stimulacija aktivnosti i ekspresije enzima antioksidativne zaštite i iNOS proteina može se indukovati različitim agensima i/ili hormonima kao što je grelin. Grelina je peptidni hormon i endogeni ligand za receptor sekretagoga hormona rasta (engl. *Growth hormone secretagogue receptor*, GHS-R) (Kojima sa sar., 1999; Cetin sa sar., 2011), koji se prevashodno sintetise i luči u želucu. Njegovi transkripti nađeni su u jetri, što ukazuje da pored endokrinih ima i druga svojstva (Kojima sa sar., 1999; Gnanapavan sa sar., 2002; Cetin sa sar., 2011). Podaci iz literature ukazuju da grelin ispoljava pozitivne efekte na kardiovaskularni, gastrointestinalni, reproduktivni i imunski sistem (Chang sa sar., 2004; Iseri sa sar., 2005; Yada sa sar., 2006; El Eter sa sar., 2007; Kheradmand sa sar., 2009; Arici sa sar., 2011; Cetin sa sar., 2011). Jedan od pozitivnih efekata grelina je i njegov uticaj na enzime antioksidativne zaštite (AOZ) (Suematsu sa sar., 2005; Zwirski-Korczała sa sar., 2007; Suzuki sa sar., 2011),

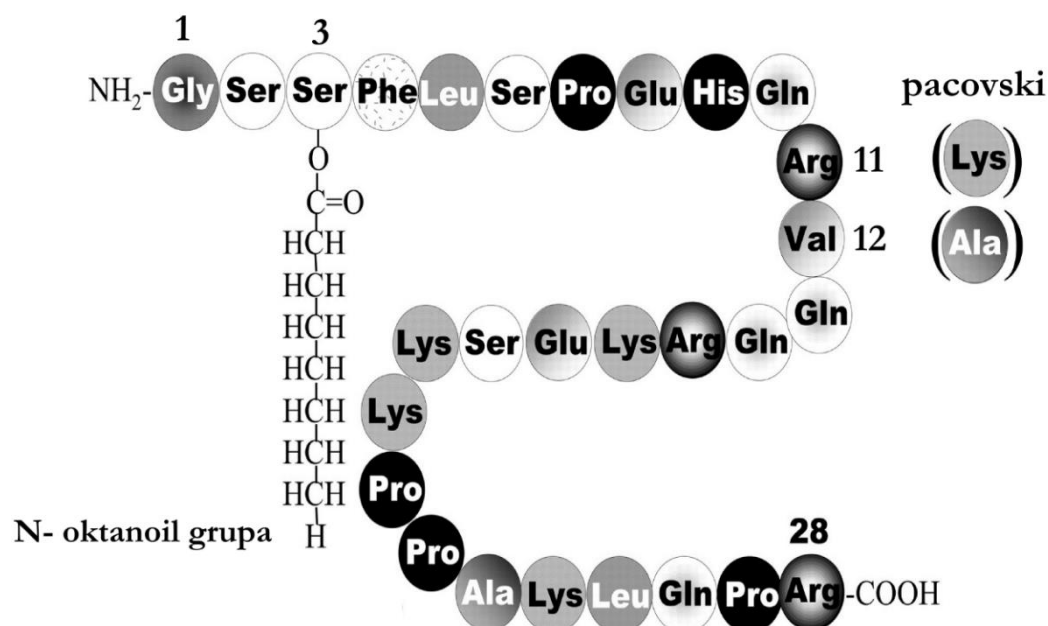
kao i njegovo anti-inflamatorno dejstvo na procese izazvane OxS u raznim organima, kao što su srce, jetra i pankreas (Dembinski sa sar., 2006; Xu sa sar., 2008; Hedayati sa sar., 2009; Hou sa sar., 2009b; Huang sa sar., 2009; Suzuki sa sar., 2011).

Efekti grelina se ostvaruju preko složene mreže međuzavisnih intracelularnih signalnih puteva, koji uključuju kinazu regulisanu ekstracelularnim signalima (engl. *Extracellular regulated protein kinase 1/2*, ERK1/2) i protein kinazu B (engl. *Protein kinase B*, Akt) (Iantorno sa sar., 2007; Sudar sa sar., 2011) (Iantorno sa sar., 2007; Sudar sa sar., 2011). Signalni put ERK1/2 je specifična serin-treonin (engl. *Serin- Threonin*, Ser/Thr) kinazna kaskada u koju su uključene mitogenima aktivirane protein kinaze (engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*, MAPK). Akt je Ser/Thr - protein kinaza, koja se takođe aktivira grelinom. Akt je važan nishodni ciljni molekul za fosfatidilinozitol 3-kinazu (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3-K) (Minden sa sar., 1994).

## 1.1. Opšte osobine grelina

Grelina je otkriven 1999. godine (Kojima sa sar., 1999) kao prvi prirodni endogeni ligand receptora hormona rasta (engl. *Growth hormon*, GH). Grelina je peptid koji se, kod ljudi i pacova, sastoji od 28 aminokiselina. Kod čoveka na poziciji 11 humanog grelina je arginin (*Arg<sup>11</sup>*), a na poziciji 12 valin (*Val<sup>12</sup>*), dok su kod pacova na istim pozicijama lizin (*Lis<sup>11</sup>*) i alanin (*Ala<sup>12</sup>*) (Kojima sa sar., 1999; Hosoda sa sar., 2000a; Kojima sa sar., 2002) (**Slika 1-1**). Grelina je modifikovan na aminokiselini serinu na trećoj poziciji (*Ser<sup>3</sup>*), n-oktanoinskom kiselinom. Ova modifikacija povećava njegovu lipofilnost, a ujedno predstavlja i preduslov za njegovu interakciju sa receptorom spregnutim sa proteinom G (GPCR; engl. *G Protein-Coupled Receptor*), odnosno receptorom sekretagoga hormona rasta 1a (GHS-R1a; engl. *Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a*) (Kojima sa sar., 1999; Stengel sa sar., 2012), kako kod ljudi tako i kod pacova (Kojima sa sar., 1999). Grelina je prvi prirodni peptid za koji je pokazano da ima ovu acil grupu kao rezultat post-translacione modifikacije (Kojima sa sar., 1999). Dve najčešće forme grelina koje se pojavljuju u cirkulaciji su: acilovani ili n-oktanoil grelina (engl. *Acylated n-Octanoylated Ghrelin*, AG) i des-acilovani ili neacilovani grelina (engl. *Unacylated Des-Octanoylated* ili *Unacylated Des-Acylated Ghrelin*, UAG) (Kojima sa sar., 1999).

## Humani grelin -28



Slika 1-1. Struktura humanog i pacovskog grelina.

**Sekvenca aminokiselina humanog grelina:** Gly-Ser-Ser(*n*-octanoyl)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg;

**Sekvenca aminokiselina pacovskog grelina:** Gly-Ser-Ser(*n*-octanoyl)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg

Iako je glavni produkt gena za grelin peptid od 28 aminokiselina sa modifikacijom na Ser<sup>3</sup>, gen za grelin takođe kodira nekoliko različitih molekula, uključujući des-Gln<sup>14</sup>-grelin (građen od 27 aminokiselina; sa delecijom glutamina (Gln) na poziciji 14) kao i druge molekule koji nastaju različitim alternativnim iskrajanjem (Hosoda sa sar., 2000b; Hosoda sa sar., 2003; Pemberton sa sar., 2003; Jeffery sa sar., 2005; Kineman sa sar., 2007) i/ili postranslacionom modifikacijom (Nishi sa sar., 2005; Kirchner sa sar., 2009).

Od svih formi grelina prisutnih u cirkulaciji, oslobađanje hormona rasta regulisano je sa dva peptida želuca: grelinom i des-Gln -grelinom, ali je des-Gln<sup>14</sup>-grelin prisutan u mnogo manjoj količini, što ukazuje da je acilovani grelin dominantna aktivna forma (Hosoda sa sar., 2000b; Kojima sa sar., 2005).

### 1.1.1. Fiziološka uloga grelina

Glavni izvor grelina u cirkulaciji su X/A ćelije želuca pacova (Ariyasu sa sar., 2001) i P/D1 ćelije želuca čoveka (Rindi sa sar., 2004; Stengel sa sar., 2012). Acilovani grelin je snažan GH-sekretagog (engl. *GH-Secretagogues*, GHS). Ulogu GH sekretagoga, kao i ostale biološke uloge ostvaruje vezivanjem za GHS-R1a (Kojima sa sar., 1999). Transkripti acilovanog grelina i njegovog receptora su detektovani i u drugim tkivima uključujući hipotalamus, hipofizu, jetru, bubrege, pluća, pankreas, srce, što ukazuje da pored endokrine grelin ostvaruje učestvuje u čitavom nizu procesa (Kojima sa sar., 1999; Date sa sar., 2000; Barreiro sa sar., 2002; Date sa sar., 2002; Gnanapavan sa sar., 2002; Cetin sa sar., 2011). Grelina stimuliše sekreciju GH, ACTH i prolaktina, povećava apetit i inicira uzimanje hrane, pražnjenje želuca i sekreciju hlorovodonične kiseline, kontroliše energetske homeostazu, ima uticaj na egzokrinu i endokrinu funkciju pankreasa, kao i na metabolizam glukoze, pojavu gojaznosti itd. (van der Lely sa sar., 2004; Wei sa sar., 2005).

Grelina svoje oreksigene efekte ostvaruje preko GHS-R1a. GHS-R1a se najviše ekspresira u nucleus arcuatus, hipotalamusnom regionu odgovornom za regulaciju ishrane i energetske homeostazu i to u neuronima koji koekspresiraju oreksigene peptide: neuropeptid Y i protein koji zavisi od aguti gena, NPY/AGRP (Willesen sa sar., 1999; Greenman sa sar., 2004).

Pokazano je da se nivo grelina u plazmi povećava neposredno pre obroka i tokom gladovanja, da opada odmah nakon uzimanja hrane, i da je koncentracija grelina u negativnoj korelaciji sa indeksom telesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI), količinom masnog tkiva, nivoom leptina, insulina i glukoze u plazmi (Ariyasu sa sar., 2001; Cummings sa sar., 2001; Tschöp sa sar., 2001), što sve zajedno ukazuju na ulogu grelina u regulaciji energetske homeostaze. Gojaznost uglavnom dovede do smanjenja koncentracije grelina u sistemske cirkulaciji, mada ima i podataka i da povećava (Wadden sa sar., 2012). Dugotrajna administracija grelina povećava gojaznost kod eksperimentalnih životinja.

Mehanizmi regulacije grelina još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoje podaci da estrogen i IGF-1 uzrokuju povećanje grelina u sistemske cirkulaciji (Grinspoon sa sar., 2004), a oralno uzeta ili intravenski injicirana glukoza, insulin, glukagon, GH i somatostatin inhibiraju nivo grelina (Mohlig sa sar., 2002; Grinspoon sa sar., 2004; Arafat sa sar., 2005). Postoje podaci da je sastav makronutritijena faktor regulacije u sekreciji grelina. Ugljeni hidrati, proteini i lipidi smanjuju njegovu ekspresiju (Greenman sa sar., 2004; Beck, 2002

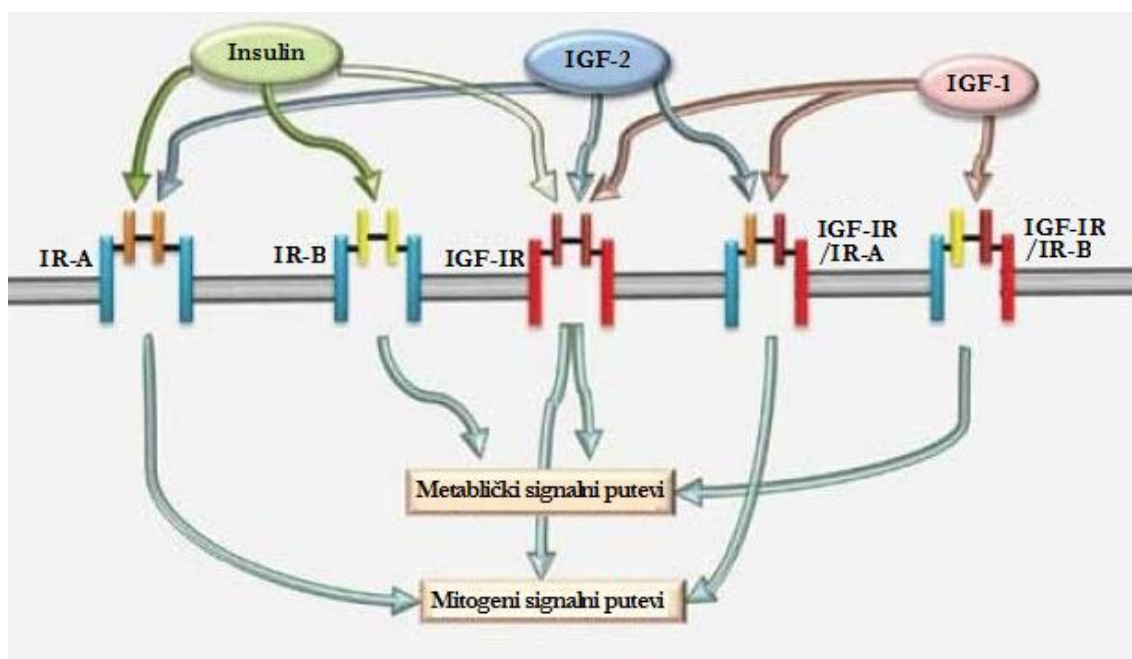
#7409; Bowen sa sar., 2006). Do sada je potvrđeno da sekrecija grelina opada tek kad nutritijenti dospeju u cirkulaciju, nakon prolaska kroz želudac (Williams sa sar., 2003).

Grelin povećava gojaznost i u stanjima gojaznosti zabeležen je čitav spektar vrednosti nivoa grelina, insulina, GH, glukoze i indeksa IR, ali tačno utvrđeni relacije i mehanizmi regulacije svih ovih parametara još nisu potvrđeni.

Grelin, kao i neki sintetički GHS imaju uticaj na sekreciju insulina i homeostazu glukoze. Nakon administracije grelina, promene u koncentraciji glukoze i insulina traju više od dva časa, dok povećanje hormona rasta ima prolazni karakter, što ukazuje da grelin ima direktne, od hormona rasta nezavisne metaboličke aktivnosti na metabolizam glukoze u jetri (glikogenezu) i sekreciju insulina (van der Lely, 2009). Murata je sa saradnicima (2002) pokazao da grelin sprečava inhibitorni efekat insulina na glukoneogenezu u ćelijama jetre, potvrđujući hipotezu da grelin ima direktne efekte na održavanje nivoa glukoze (Murata sa sar., 2002). U zavisnosti od eksperimentalnih uslova, utvrđeno je da grelin može da inhibira sekreciju insulina (Broglia sa sar., 2001) ili da je stimuliše (Adeghate sa sar., 2002; Date sa sar., 2002; Lee sa sar., 2002; Cui sa sar., 2008). Poremećaj u koncentraciji grelina su povezani sa pojavom IR i kod normalno hranjenih i kod gojaznih individua (Poykko sa sar., 2003; St-Pierre sa sar., 2007; Yada sa sar., 2008; Pacifico sa sar., 2009). Takođe je pokazano da grelin stimuliše skladištenje lipida jer favorizuje ekspresiju enzima koji katalizuju njihovo skladištenje u jetri i masnom tkivu (Sangiao-Alvarellos sa sar., 2011). Međutim, ekspresija GHS-R1a u jetri nije definitivno potvrđena, stoga je još uvek nepoznato da li grelin svoje efekte ostvaruje preko GHS-R1a ili putem aktivacije nekog drugog receptora (Thielemans sa sar., 2007; van der Lely, 2009)?

Ulogu sekretagoga HR, acilovani grelin ostvaruje isključivo preko GHS-R1a receptora. GHS-R1a aktivira fosfolipazu C, hidrolizuje membranski fosfatidil-inositol 4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>), do inozitol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i diacil-glicerola (DAG). DAG aktivira protein kinazu C (PKC), koja se premešta u plazma membranu usled povećane koncentracije Ca<sup>2+</sup> u ćeliji. Aktivirana PKC fosforilacijom inhibira kanale za jone kalijuma (K<sup>+</sup>), što dovodi do depolarizacije membrane usled koje se otvaraju voltažno zavisni Ca<sup>2+</sup> kanali tipa L što, takođe, dovodi do povećanja koncentracije Ca<sup>2+</sup> u ćeliji i do sekrecije GH (van der Lely sa sar., 2004). Jedna od uloga endogenog grelina je da utiče na već uspostavljeni obrazac sekrecije GH, postignut delovanjem hipotalamusnih hormona: GH oslobađajućeg hormona, (GHRH; engl. GH-releasing hormone) i somatostatina (Castañeda sa sar., 2010).

GH je pluripotentan hormon koji sem što stimulira rast ima ulogu i u regulaciji metabolizma (Vijayakumar sa sar., 2010). Vezivanjem za svoj receptor GHR (engl. *growth hormone receptor*) aktivira se Jak2 kinaza (engl. *Janus kinase*) koja fosforiliše STAT proteine (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*). Fosforilacija STAT, dovodi do njihove disocijacije sa receptora i translokacije do nukleusa gde utiču na transkripciju gena kao što su IGF-1, ALS itd (Smit sa sar., 1996). Glavni medijator GH aktivnosti je IGF-1. GH i IGF-1 funkcionišu po sistemu negativne povratne sprege. Aktivacijom receptora za GH u jetri, aktivira se sinteza IGF-1. Jetra je organ u kojem se sintetizira oko 70% u cirkulaciji prisutnog IGF-1 (Green sa sar., 1985). Ekspresija IGF-1 je zabeležena u gotovo svim tkivima gde svoje efekte može da ostvari autokrino i/ili parakrino. IGF-1 i proinsulin, kao i njihovi receptori pokazuju visok stepen homologije u aminokiselinskom sastavu, što im omogućuje da pored svog odgovarajućeg liganda vezuju homologne ligande: IGF-1 receptor vezuje insulin, a receptor za insulin, IGF-1, iako sa manjim afinitetom. Takođe, receptor za IGF-1 i za insulin mogu da formiraju heterotetramere hibridne receptore. Hibridni receptor ima po jedan  $\alpha$  i jedan  $\beta$  lanac od svakog od ova dva receptora, **Slika 1-2**.

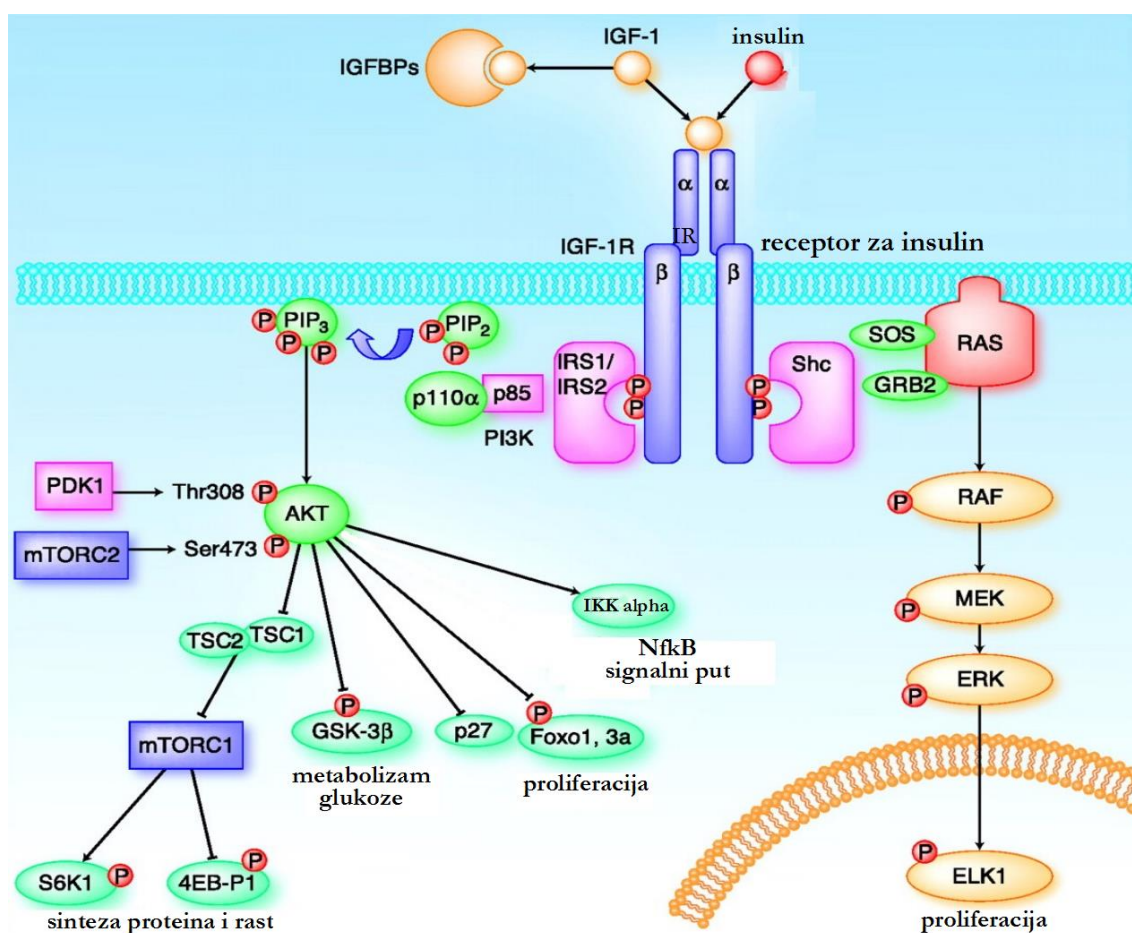


**Slika 1-2.** Receptor za insulin (IR-A i IR-B), IGF-1R i hibridni receptor (IGF-1R/IR-A i IGF-1R/IR-B). Insulin se primarno vezuje za svoje receptore, IR-A i IR-B, sa manjim afinitetom za IGF-1R. IGF-1 se prvenstveno vezuje za IGF-1R, IGF-1R/IR-A i IGF-1R/IR-B hibride. IGF-2 se vezuje IR-A, IGF-1, i IGF-1R/IR-A hibridni receptor. Insulin i IGF-2 pokreću signalnu mrežu koja vodi mitogenim



promenama kada se vežu za IR-A. Aktivacija IR-B receptora inicira metaboličke promene. IGF-1 i IGF-2 vezivanjem za IGF-1R aktiviraju uglavnom mitogene signalne puteve, kao i vezivanjem za IGF-1R/IR-A hibrid. Aktivacija IGF-1R/IR-B hibrida inicira metaboličke efekte. Preuzeto i modifikovano (Gallagher sa sar., 2010)

Eksprimiranje oba receptora je stimulisana uzimanjem hrane i inhibirana gladovanjem. IGF-1R receptor, IGF-1 i receptor za insulin su tirozin kinaze koje nakon aktivacije, pokreću signalni put preko IRS i Src homolognog i kolagen protein (engl. *Src Homology and Collagen Protein*, Shc). Na taj način se pokreću PI3K/Akt i MAPK kaskade, preko kojih insulin i IGF-1 aktiviraju mitogene i metaboličke procese (Saltiel sa sar., 2002), **Slika 1-3.**



Slika 1-3. IGF-1/IR signalni put.. Nakon vezivanja IGF-1 i insulina za svoje receptore, IGF-R i insulinski receptor podležu autofosforilaciji što omogućuje vezivanje IRS-1, IRS-2 i Shc. Vezivanje IRS-1 i IRS-2 vodi aktivaciji PI3K, čijom katalitičkom aktivnošću dolazi do konverzije PIP2 u PIP3. Ovaj događaj dovodi do pregrupisanja kinaza Akt do membrane, gde mogu biti fosforilisani od strane PDK1. Aktivirana Akt dalje pokreće čitavu signalnu mrežu vezanu za rast, razvoj,

**metabolizam, ćelijsku smrt itd. Sa druge strane vezivanjem Shc za receptore pokreće RAS/MAP kinazni signalni put, koji vodi proliferaciji ćelije. Preuzeto i modifikovano iz rada (Zha sa sar., 2010)**

U istraživanja u kojima su davane male doze IGF-1, pokazano je da IGF-1 ima hepatoprotektivne (Castilla-Cortazar sa sar., 1997; Mirpuri sa sar., 2002; Garcia-Fernandez sa sar., 2005) i antifibrinogene efekte (Muguerza sa sar., 2001; Garcia-Fernandez sa sar., 2005), iako je moguće da su ovi efekti IGF-1 indirektno posredovani grelinom.

Grelina ima značajnu ulogu u antiinflamatornim, antiapoptskim i antioksidativnim procesima u organima kao što su srce, pankreas i jetra (Baldanzi sa sar., 2002; Granado sa sar., 2009; Suzuki sa sar., 2011). Barazoni sa saradnicima (2011) je pokazao da grelina ima antiinflamatorno dejstvo kod pacova na ishrani bogatoj mastima. Takođe, ukazano je na jasnu vezu između ekspresije antioksidativnih enzima i sekrecije grelina (Suematsu sa sar., 2005; Zwirski-Korczala sa sar., 2007; Suzuki sa sar., 2011). U jetri, grelina stimuliše ekspresiju antioksidativnih enzima i štiti jetru od oštećenja oksidativnim stresom (Cetin sa sar., 2011). Naši objavljeni radovi pokazuju da grelina ostvaruje svoje fiziološke efekte preko Akt i ERK1/2 uključene u ostvarivanje fizioloških efekata grelina (Sudar sa sar., 2011).

## 1.2. Oksidativni stres (OxS)

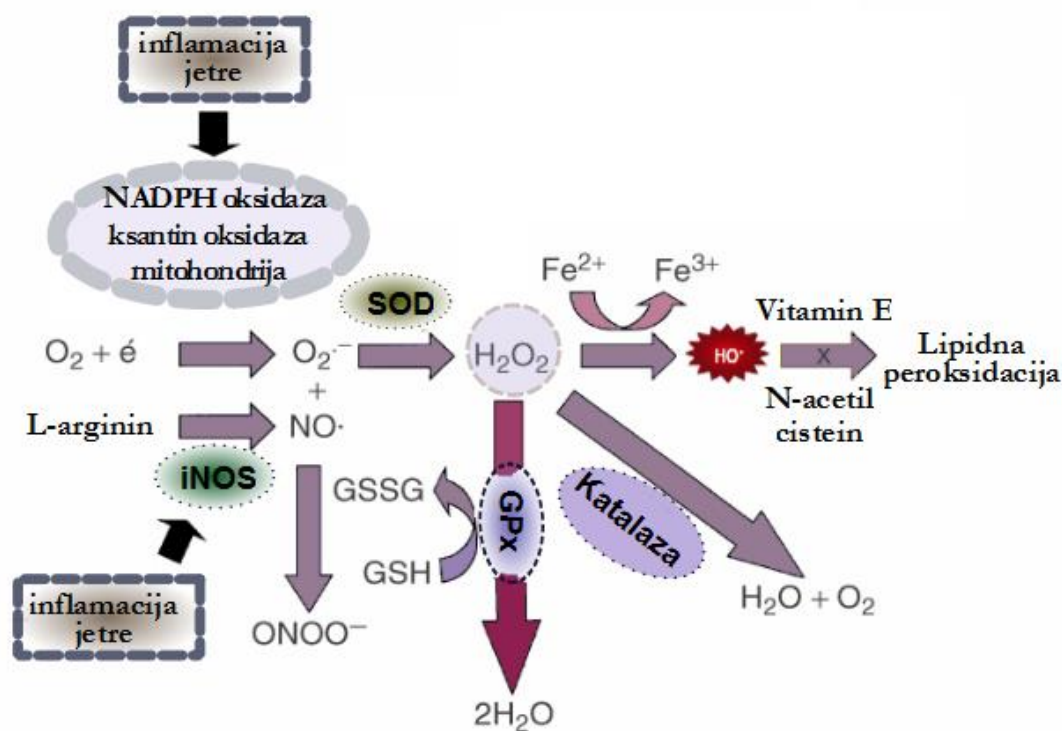
Mnogobrojni fiziološki procesi u ćeliji podrazumevaju stvaranje slobodnih radikala kao što su ROS, zatim reaktivnih vrsta azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS), reaktivnih vrsta ugljenika (engl. *Reactive Carbon Species*, RCS), reaktivnih vrsta hlorida (engl. *Reactive Chlorine Species*, RChS) kao i reaktivnih vrsta sumpora (engl. *Reactive Sulphur Species* (RSS)). Proces koji su neophodni za normalno funkcionisanje ćelije kao i regulisanje unutarćelijske komunikacije su pre svega mitohondrijalni transport elektrona kao i aktivnost NADPH oksidaze, koji su izvor superoksidnog anjona,  $O_2^-$ , značajnog medijatora u nizu oksidativnih reakcija kao i izvora drugih reaktivnih vrsta. Enzim NOS je izvor NO, dok su lipoksigenaze izvor hidroperoksida masnih kiselina. Takođe, makrofazi doprinose razvoju lokalnog OxS kao odgovor na inflamaciju.

Uloga antioksidativnog zaštitnog sistema je da spreči nastajanje, neutrališe ili prebaci u manje reaktivne forme novonastale reaktivne vrste kiseonika kao i da popravi, radikalima izazvana oštećenja biomolekula. Odbrambeni sistem je dosta složen jer deluje na nekoliko

nivoa, a koje će se komponente uključiti, zavisi od izvora, mesta, vrste i količine stvorenih ROS kao i drugih reaktivnih vrsta, i mnogo drugih faktora, **Slika 1-4**.

Prema prirodi i načinu delovanja, antioksidanti se mogu podeliti na:

- **enzimske**, koji čine prvu liniju antioksidativne odbrane i
- **ne-enzimske**, koji predstavljaju drugu liniju antioksidativne odbrane (niskomolekulski fiziološki konstituenti ćelije (glutation u redukovanom i oksidovanom obliku, bilirubin, mokraćna kiselina u serumu, ksantin, melatonin i dr.; vitamini (A, C, E); relevantni mikroelementi (Zn, Cu, Se, Mn i dr). (Halliwell, 1987b)



Slika 1-4. Shematski prikaz antioksidativne mreže enzima;  $O_2^{\cdot -}$  superoksidni anjon; SOD- superoksid dizmutaza; NO- azot-monoksid; ONOO- peroksininitrit. OH• - hidroksil radikal; GPx – glutation peroksidaza; iNOS - inducibilna azot monoksid sintaza; preuzeta i modifikovana shema (Jaber sa sar., 2005)

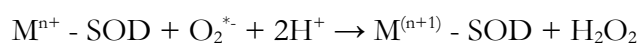
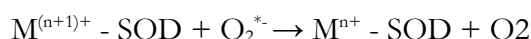
## 1.2.1. Enzimske komponente antioksidativne zaštite

### 1.2.1.1. Super oksid dismutaze

Super oksid dismutaza (SOD) smanjuje nivo superoksidnog anjona u ćeliji; ovi enzimi katalizuju konverziju superoksidnog anjona u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (McCord sa sar., 1969).

Na osnovu odeljka u ćeliji i metala koji sadrže u svom aktivnom centru, kod sisara razlikujemo tri izoforme SOD: bakar cink SOD (Cu/Zn-SOD), mangan SOD (Mn-SOD, SOD 2) i ekstracelularnu Cu/Zn-SOD (EC-SOD) (McCord sa sar., 1969; Marklund, 1982). Cu/Zn-SOD je homodimerni protein od 32 kDa, koji sadrži Cu i Zn. Široko je prisutna u različitim tipovima ćelija (Crapo sa sar., 1992) i to u citoplazmi, nukleusu, peroksisomima i mitohondrijalnoj membrani. (Miller, 2012). Smanjenje unutarćelijske koncentracije superoksida predstavlja primarnu funkciju Cu/Zn-SOD (Landis sa sar., 2005). Ranije se gen za Cu/Zn-SOD označavao kao „*housekeeping gene*“ a osim toga često se koristio kao interna kontrola za varijacije u ekspresiji Mn-SOD, zbog svoje stabilne i konstitutivne ekspresije. Danas se zna da je ekspresija i aktivnost Cu/Zn-SOD regulisana nizom kompleksnih unutarćelijskih reakcija, koje uključuju niz pozitivnih i negativnih regulatornih mehanizama (Minc sa sar., 1999; Milani sa sar., 2011). Mn-SOD je ključna u procesu uklanjanja  $O_2^{\cdot-}$  iz mitohondrijalnog matriksa, gde je dominantno prisutna. Ključna je za funkcionisanje ćelije, jer je utvrđen visok procenat postnatalne smrtnosti kod *knockout* miševa (MnSOD<sup>-/-</sup>) (Van Remmen sa sar., 1999). EC-SOD je dominantno zastupljena u vanćelijskom prostoru, ali je prisutna i u krvnim sudovima, srcu, plućima, bubrezima i placenti. Takođe je najznačajniji enzim antioksidativne zaštite u zidu krvnih sudova (Fukai sa sar., 2002).. Pored uloge u uklanjanju  $O_2^{\cdot-}$  iz vanćelijskog prostora, EC-SOD održava bioaktivnost NO i potpomaže ekspresiju, hipoksijom aktiviranih gena

Mehanizam reakcije koju katalizuju SOD bazira se na redukciji i reoksidaciji metala u aktivnom centru od strane  $O_2^{\cdot-}$  anjona.



gde M može biti = bakar (Cu; n = 1); mangan (Mn; n = 2); gvožđe (Fe; n = 2); i nikal (Ni; n = 2) (McCord sa sar., 1969).

Sva tri oblika SOD imaju u promotorskom i intronskom regionu redoks senzitivni transkripcioni faktor, NFκB (Xu sa sar., 1999; Fattman sa sar., 2003; Hoffmann sa sar., 2006). Iako se smatra da se Cu/Zn-SOD konstitutivno sintetiše, postojanje permeabilnog superoksid puta u endozomalnoj membrani ukazuje da Cu/Zn-SOD katalizuje O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> dismutaciju na površini endozoma i lokalno povećava koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što je dovoljno za redoks aktivaciju NFκB (Mumbengegwi sa sar., 2008).

### 1.2.1.2. Katalaza

Krajnji produkt aktivnosti SOD je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Za uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz ćelije, odgovoran je enzim katalaza (CAT), koji je kodiran jednim genom i zastupljen u svim tkivima kod sisara. Za svoju aktivnost koristi Fe ili Mn kofaktore (Chelikani sa sar., 2004). Ekspresija i aktivnost CAT je najveća u peroksisomima ćelija jetre i pluća, zatim u citoplazmi eritrocita, a najmanja je u vezivnim tkivima (Deisseroth sa sar., 1970; Schisler sa sar., 1987; Chen sa sar., 2004; Nishikawa sa sar., 2009). Nije zastupljena u mitohondrijama sisara, sem u mitohondrijama ćelija srca pacova (Zamocky sa sar., 1999). Jedini enzimski sistem odbrane u mitohondrijama koji eliminiše H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je redoks ciklus glutaciona.



Po strukturi CAT je homotetramerni enzim, molekulske težine 240kDa, čije četiri porfirinske hem grupe, omogućuju reakciju sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fita sa sar., 1985).

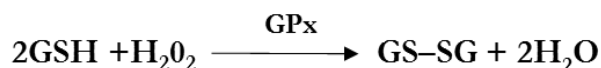
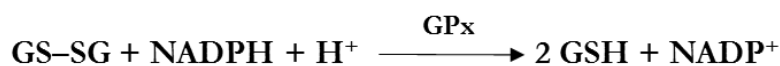
Kontrola koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pod delovanjem CAT bitan je faktor u terapiji mnogih bolesti, koje u svojoj etiologiji imaju povećan nivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je poznat i kao aktivator transkripcionih faktora, koji su pokretači mnogih gena aktivnih u patofiziološkim stanjima, među kojima i NFκB (Nishikawa sa sar., 2009).

**1.2.1.3. Glutation peroksidaze**

Glutation peroksidaza (GPx) je opšti naziv za familiju izoenzima, čija je osnovna biološka uloga da redukuju  $H_2O_2$  ili organske hidroperokside do molekula vode ili odgovarajućeg alkohola, uz pomoć redukovanog glutathiona koji ima ulogu donora elektrona (Halliwell sa sar., 1999). GPx je selenoprotein jedinstven po sposobnosti da vrši „popravku“ već nastalih oksidativnih lezija lipoproteina i nukleinskih kiselina (Flohe, 1988). Prisutan je i u mitohondrijama i u citosolu.

Do sada je u ćelijama sisara detektovano osam različitih izoformi GPx (Topo sa sar., 2008), od čega četiri izoforme imaju dominantnu ulogu. To su homotetramerni GPx1, GPx2, i GPx3 i monomer GPx4.

Mehanizam reakcije koju katalizuje GPx uključuje dva nezavisna događaja. Prvi je oksidacija katalitičkog domena gde GSH predstavlja redukovani monomerni glutathion, a GS-SG glutathion disulfid. GPx u sledećoj reakciji redukuje oksidovani glutathion, pri čemu se naelektrisanje selena menja između oksidacionog broja -2 i 0, a ROS intermedijeri se ne stvaraju u reakciji (Maiorino sa sar., 1995). U reakciji sa hidroperoksidima, GPx je jedinstven u preventivnom delovanju protiv inicijacije ili propagacije lanca ROS.



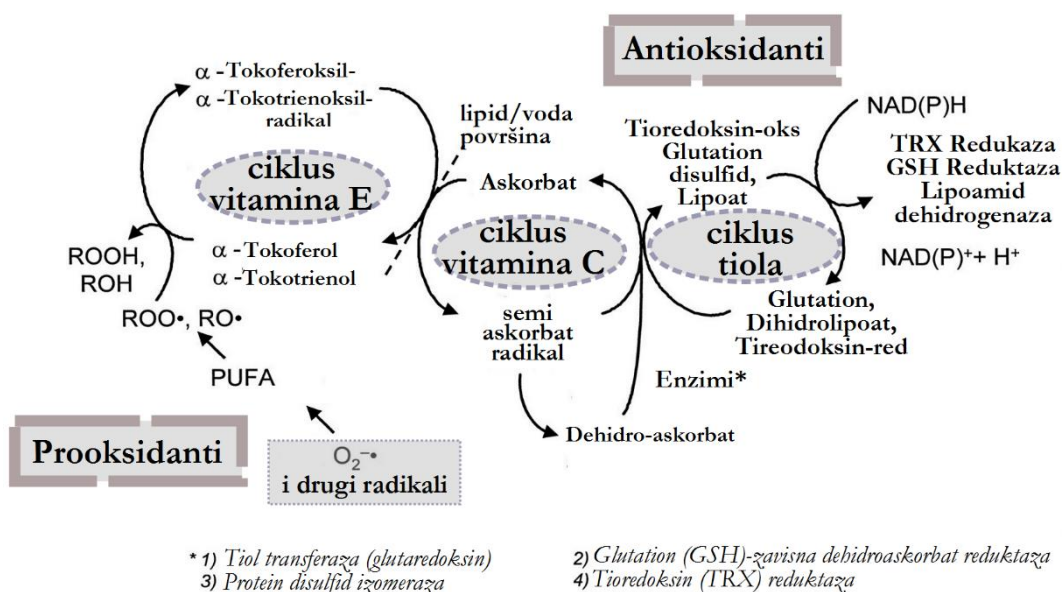
#### 1.2.1.4. Glutation reduktaza

Enzim Glutation reduktaza (GR) je uključen u sistem antioksidativne zaštite i odgovoran je za sprečavanje štetnih efekata koje stvaraju endogeni i egzogeni hidroperoksidi (Ulus sa sar., 2000).

GR je enzim neophodan za konverziju oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovanu formu (GSH) pri čemu se oksiduje i redukovani nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). GSH je veoma važan antioksidant za ćeliju. Ova reakcija je neophodna za održanje funkcionalnosti aerobnih ćelija, naročito eritrocita, i stabilizaciju drugih tiola u membranama i oko hemoglobina (Jozanov-Stankov, 2006). GR je homodimer, pripada porodici flavoprotein-disulfid oksidoreduktaza (sadrži flavin-adenin-dinukleotid, FAD) i ima disulfidni most u svom aktivnom centru (Worthington sa sar., 1975). GR poseduje veliku specifičnost za svoj supstrat GSSG, i u nedostatku tiola GR ima tendenciju da formira tetramere. Iako i u formi tetramera GR poseduje katalitičku aktivnost, prisustvo produkta GR aktivnosti, odnosno redukovanog glutationa, favorizuje dimernu formu (Worthington sa sar., 1975). Takođe ćelije koje su izložene visokom nivou OxS, kao što su eritrociti, zahtevaju da čak 10% konzumirane glukoze bude preusmereno na put pentozofosfata za stvaranje NADP neophodnog za konverziju (Krauth-Siegel sa sar., 2008).

### 1.2.2. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite

U fiziološkim uslovima, komponente odbrambenog antioksidativnog sistema zaštite u jetri, pored enzimske uključuje i ne-enzimsku zaštitu, koju čine proteini koji se ponašaju kao antioksidanti: tireodoksin, SS-peptid i proteini kao što je albumin (Roche sa sar., 2008), transferin, haptoglobin i ceruloplazmin. Ne-enzimsku zaštitu čine i vitamini i sekundarni metaboliti biljaka i životinja kao što su: glutation, koenzim Q10, vitamin A, C i vitamin E (tokoferoli i tokotrienoli), fenolna jedinjenja (fenoli, fenilpropanoidi, naftohinoni, ksantoni, stilbeni, flavonoidi, fitoaleksini, tanini), karotenoidi itd. (Slika 1-5.). Prisustvo vitamina i drugih nutritijenata sa antioksidativnom aktivnošću, uslovljava sinergističko dejstvo sa enzimima antioksidativne zaštite i zato imaju izuzetno pozitivne efekte u „borbi“ sa SR koji se stvaraju bilo u fiziološkim ili patofiziološkim uslovima (Frei, 1999).



Slika 1-5 Shematski prikaz antioksidativne mreže – interakcija između vitamina E, vitamina C i redoks ciklusa tiola. NADP (*engl. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) polizasićene masne kiseline (*engl. Polyunsaturated fatty acids* - PUFAs); TRX reduktaza – Tireodoksin reduktaza; GSH Reduktaza – Glutation Reduktaza; ROOH –hidroperoksid; ROO• - peroksi radikal; ROH - alkohol ; RO• - alkoksil radikal (Packer sa sar., 2001)

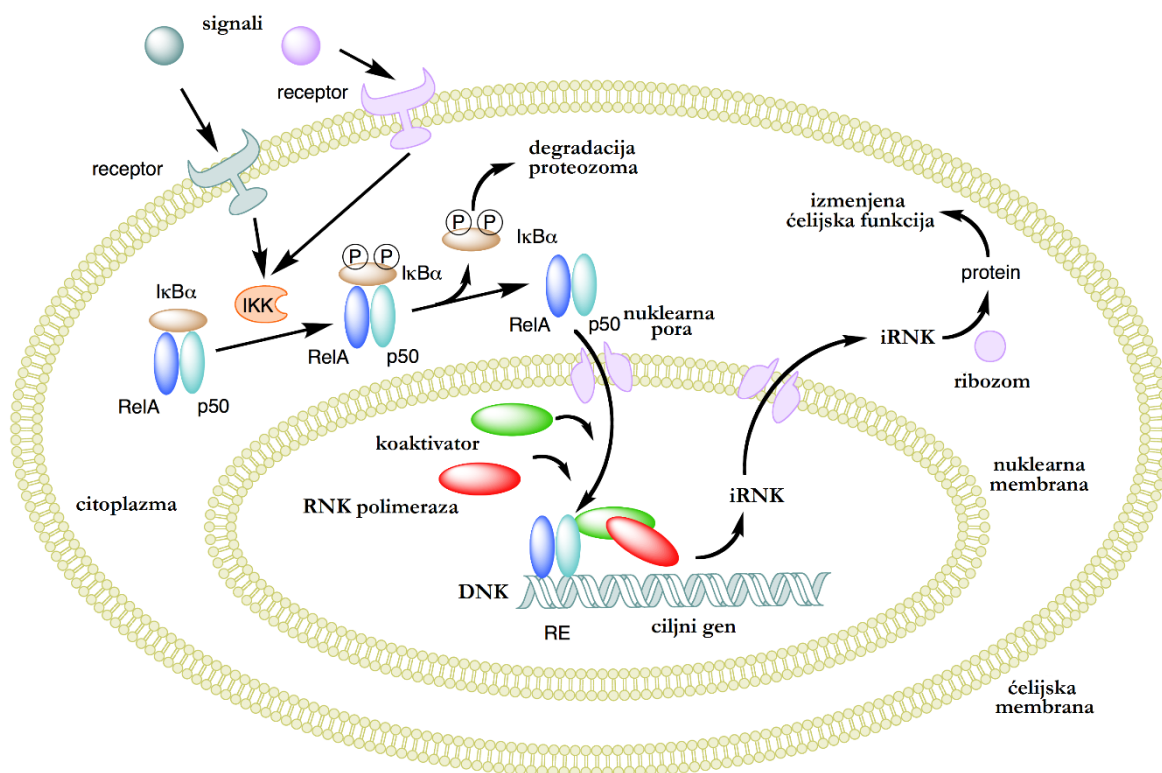


### 1.2.3. Oksidativni stres (OxS), rezistencija na insulin (IR) i gojaznost

Literaturni podaci pokazuju da dijeta bogata mastima kao i akumulacija masnog tkiva pozitivno korelišu sa pojavom OxS (Styskal sa sar., 2012), a sam OxS značajno doprinosi patogenezi i progresiji IR i dijabetesa (Dandona sa sar., 1996; Houstis sa sar., 2006; Anderson sa sar., 2009; Hoehn sa sar., 2009; Goodarzi sa sar., 2010)

IR je smanjene senzitivnosti na insulin i jedan je od ranih prediktora DTM2, kako kod životinja tako i kod ljudi. Smanjena osetljivost na insulin može nastati i kao poremećaj sinteze insulina (količina, struktura) ili usled različitih abnormalnosti u njegovom signalnom putu (DeFronzo sa sar., 1992; Maechler sa sar., 1999; Gardner sa sar., 2003; Dokken sa sar., 2008).

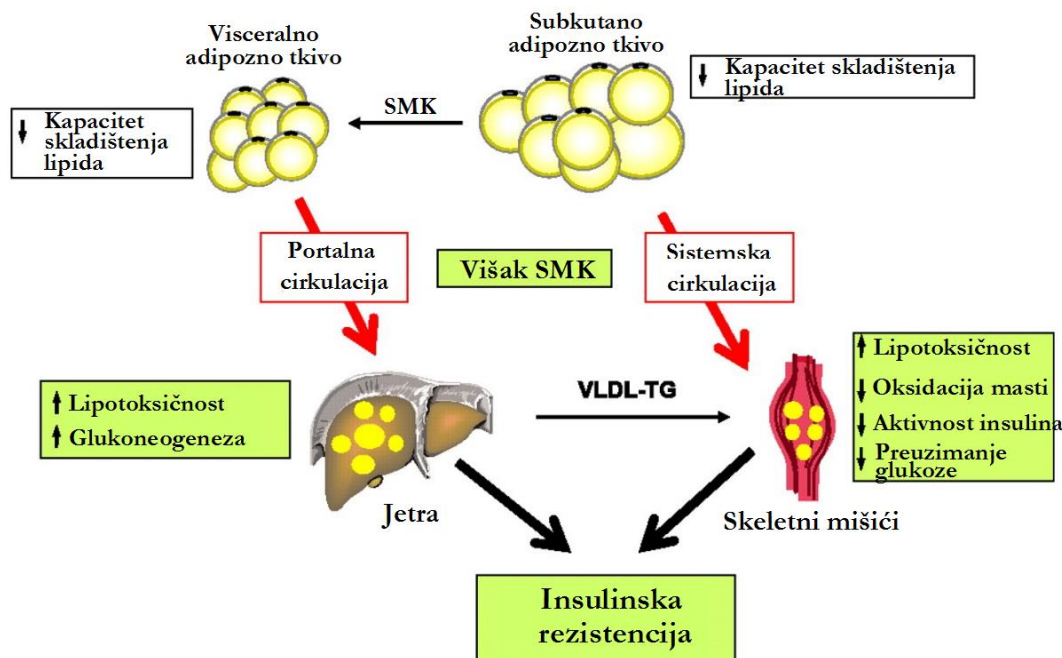
OxS ima značajan efekat na narušavanje signalnog puta insulina (Maechler sa sar., 1999; Gardner sa sar., 2003; Dokken sa sar., 2008). Nastale ROS mogu da deluju i kao signalni molekuli koji mogu da pokrenu brojne signalne puteve u koje su uključene i Ser/Thr kinaze (Kyriakis sa sar., 1996). U signalnom putu insulina, nalaze se mnogobrojni potencijalni supstrati serin kinaza, uključujući receptor za insulin kao i IRS (Evans sa sar., 2003). Povećanom fosforilacijom serinskih ostataka na IRS 1 i 2, smanjuje se mogućnost fosforilacije tirozinskih ostataka, čime se narušava aktivacija signalnog puta insulina (Paz sa sar., 1997; Birnbaum, 2001). Takođe, aktivacijom I $\kappa$ B-serin kinaze (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*, IKK) (**Slika 1-6.**), aktivatora signalnog puta NF $\kappa$ B, inhibira se aktivnost insulina (Yuan sa sar., 2001). Prekomerna ekspresija I $\kappa$ B-kinaza- $\beta$  u hepatocitama smanjuje njihovu osetljivost na insulin (Cai sa sar., 2005), dok smanjena ekspresija sprečava pojavu IR izazvanu ishranom bogatom mastima (Arkan sa sar., 2005). I $\kappa$ B-kinaza fosforiliše IRS-1 na serinskim ostacima, sprečavajući asocijaciju IRS-1 i receptora za insulin, vezivanje PI3-K i aktivaciju glavnog metaboličkog puta, kao i signalnog puta Akt (Gual sa sar., 2005).



Slika 1-6. Shematski prikaz aktivacije NF $\kappa$ B i njegov uticaj na ćelijsku funkciju. p50 - subjedinica p50 NF $\kappa$ B; Rel A - subjedinica p65 NF $\kappa$ B; I $\kappa$ B $\alpha$  - inhibitor transkripcionog faktora NF $\kappa$ B - (*engl. Inhibitor of NF $\kappa$ B*); I $\kappa$ K - I $\kappa$ B kinaza - (*od engl. I $\kappa$ B Kinase*); p – fosfo grupa; DNK - dezoksiribonukleinska kiselina; iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina; Preuzeto i modifikovano sa: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:NFKB\\_mechanism\\_of\\_action.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:NFKB_mechanism_of_action.png)

Gojaznošću indukovana IR se razvija kao dugotrajno i progresivno patološko stanje koje može dovesti do razvoja DTM2 (Guilherme sa sar., 2008). Akumulacija masnog tkiva, naročito visceralnog, dovodi do metaboličkih i hormonskih promena, koje vremenom dovode do značajnih poremećaja u transdukciji signala insulina, što potom u različitoj meri utiče na pojavu IR u masnom tkivu, jetri i mišićnom tkivu (DeFronzo, 2004; Kahn sa sar., 2006; Guilherme sa sar., 2008). Visceralna gojaznost je udružena sa povećanim nivoom slobodnih masnih kiselina (*engl. Free Fatty Acids*, FFA, SMK) u portnoj cirkulaciji (Nielsen sa sar., 2004; Lara-Castro sa sar., 2008). Oksidacijom SMK indukuje se potencijalni lipotoksični efekat, odnosno dolazi do smanjenja oksidacije glukoze prvenstveno u jetri i skeletnim mišićima, izazivajući hiperglikemiju (Taha sa sar., 1999; Trayhurn, 2010) (**Slika 1-7**).

Kompenzatorna hiperinsulinemija dalje pogoršava IR indukujući desenzitaciju perifernih tkiva na receptorskom i postreceptorskom nivou (DeFronzo sa sar., 2009).



Slika 1-7. Model gojaznošću izazvane IR. SMK – slobodne masne kiseline; VLDL- TG – lipoproteini veoma male gustine - trigliceridi (*engl. Very-Low-Density-Lipoprotein-triglyceride*); Preuzeto i modifikovano (Galgani sa sar., 2008)

Pokazano je da delovanje antioksidanata dovodi do smanjenja OxS a samim tim i komplikacija povezanih sa gojaznošću, kao što je netolerancija na glukozu i IR (Raffaella sa sar., 2008). Kod miševa na ishrani bogatoj mastima primenom antioksidanta MnTBAP (*engl. Manganese [III] tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin*), mitohondrijskog sintetskog analoga SOD, umanjuje se mogućnost pojave IR (Hoehn sa sar., 2009).

Tokom IR izražena je pojava hiperinsulinemije, kao kompenzacije za održavanje normalne koncentracija glukoze (Evans sa sar., 2003). Dugotrajna izloženost visokim koncentracijama insulina, SMK i/ili glukoze toksična je za organizam, jer povećava produkciju ROS i OxS. Takođe, aktiviraju se signalni putevi, čiji aktivator je stres, kao što su NF $\kappa$ B, JNK/SAPK, p38 MAPK (Evans sa sar., 2003).

### 1.3. Azot-monoksid-sintaze

U ćelijama sisara postoje tri različite izoforme azot-monoksid-sintaze (engl. *Nitric Oxide Synthases*, NOS) (Pautz sa sar., 2010). Neuronalna (engl. *Neuronal NOS*, nNOS) i endotelna (engl. *Endothelial NOS*, eNOS) azot-monoksid-sintaze su dve izoforme ovog enzima koje se konstitutivno eksprimiraju, za razliku od inducibilne azot-monoksid-sintaze (engl. *Inducible NOS*, iNOS; NOS2) koja može biti indukovana proinflamatornim citokinima, gojaznošću, SMK, hiperglikemijom, endotoksinima i OxS (Zamora sa sar., 2000). Svi ovi agensi koji su „okidač“ za sintezu iNOS, ujedno su uzročnici za pojavu IR (Fujimoto sa sar., 2005).

NOS enzimi su produkti različitih gena, različito su regulisani i imaju različita katalitička svojstva. Reakcija koju katalizuju sva tri enzima je konverzija L-arginina u L-citrulin i NO. Sekundarni metabolički put L-arginina se realizuje aktivnošću enzima arginaze, hidrolitičkog enzima koji konvertuje L arginin u ureu i L-ornitin (Mori, 2007).

Sve tri izoforme NOS enzima zahtevaju prisustvo nekoliko kofaktora za normalno funkcionisanje, uključujući tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinukleotid i flavin mononukleotid, kao i molekularni kiseonik.

Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin sistem kontrole je uključen u regulaciju aktivnosti sve tri izoforme NOS. eNOS i nNOS su katalitički neaktivne sve dok je koncentracija Ca<sup>2+</sup> na bazalnom nivou i dok ne vežu kalmodulin. Međutim, sa povećanjem unutarćelijske koncentracije Ca<sup>2+</sup> povećava se i aktivnost eNOS i nNOS. Sa druge strane, kalmodulin je čvrsto vezan za iNOS čak i pri bazalnim koncentracijama unutarćelijskog Ca<sup>2+</sup>, pa je aktivnost iNOS zapravo Ca<sup>2+</sup>-nezavisna (Weissman sa sar., 2002).

Aktivnošću eNOS i nNOS, količine stvorenog NO su optimalne i neophodne za mnogobrojne fiziološke procese. U situaciji kada se NO generiše aktivnošću iNOS, količina NO dostižu i do hiljadu puta veće koncentracije što stvara uslove za razvoj mnogih patoloških procesa i stanja, kao što su IR, DTM2 i gojaznost (Cha sa sar., 2010).

### 1.3.1. Inducibilna azot-monoksid-sintaza (iNOS)

Aktivnost iNOS je indukovana prisustvom citokina i drugih agenasa (mikroorganizama, lipopolisaharida, endotoksina itd.), a njena ekspresija regulisana je na nivou transkripcije i post-transkripcione obrade. U fiziološkim uslovima u većini ćelija, iNOS nije eksprimirana, a stepen njene aktivnosti zavisi od dostupnosti supstrata i prisutnosti kofaktora (Hibbs sa sar., 1990; Forstermann sa sar., 1994; Morris sa sar., 1994; Moncada sa sar., 2006). Aktivacijom iNOS povećava se koncentracija NO sve do razgradnje samog enzima (MacMicking sa sar., 1997; Pautz sa sar., 2010). Aktivacija iNOS se dovodi u vezu sa inflamatornim procesima, kao i pojavom različitih oboljenja, dok hronična inflamacija ima značajnu ulogu u patogenezi IR (LaPointe, 1999; Fujimoto sa sar., 2005). Utvrđeno je da nedostatak iNOS ima preventivnu ulogu u pojavi IR izazvane ishranom bogatom mastima u skeletnim mišićima (Fujimoto sa sar., 2005). Naši i rezultati drugih autora ukazuju da su Akt i ERK1/2 uključeni u regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS. iNOS aktiviraju različiti stimulusi u skoro svim ćelijama (Knowles sa sar., 1990; Radomski sa sar., 1990; Isenovic sa sar., 2002; Moncada sa sar., 2006; Sudar sa sar., 2011). U nedostatku supstrata, L-arginina, normalna aktivnost iNOS može biti narušena i u tom slučaju iNOS stvara ROS, pre svega  $O_2^*$  (Heusch sa sar., 2010). NO lako reaguje sa drugim reaktivnim vrstama ili metalnim centrima, zahvaljujući prisustvu ne-sparenog elektrona (Worthington sa sar., 1975). Veoma reaktivni NO lako stupa u reakcije sa ROS, kao što je  $O_2^*$ , a posledica te interakcije su mnogo reaktivniji intermedijerni produkti, kao što je peroksinitrit (Urban sa sar., 1991; Brown sa sar., 2009). Peroksinitrit direktno oksiduje aminokiseline (cistein, triptofan, metionin), dok se modifikacija lizina i arginina odvija verovatno tokom sekundarne reakcije sa lipidnim hidroksiperoksid radikalima (Brown sa sar., 2009; Pham sa sar., 2012).

### 1.3.2. Uloga iNOS u patofiziologiji IR i gojznosti

iNOS je zastupljena u mnogim tkivima, kao što su insulin senzitivna tkiva: jetra, mišići i masno tkivo (Fujimoto sa sar., 2005). Ekspresija iNOS je indukovana različitim faktorima koji se vezuju za pojavu IR, kao što su citokini, gojznost (Elizalde sa sar., 2000), SMK (Shimabukuro sa sar., 1998), hiperglikemija, endotoksini i OxS (Fujimoto sa sar., 2005). Perreault i Marette su utvrdili da delecija iNOS gena inhibira IR kod gojznih pacova

(Perreault sa sar., 2001). Fujimoto sa saradnicima je ustanovio da lipopolisaharidi (LPS) povećavaju ekspresiju iNOS u jetri i da se inače povećano oslobađanje glukoze iz jetre, izazvano LPS kod ob/ob (gojazni, dijabetični) miševa, blokira inhibicijom iNOS. Povećana ekspresija iNOS može narušiti insulinski signalni put u hepatocitima, odnosno smanjiti ekspresiju IRS-2, dominantnog u jetri, dok je ekspresija IRS-1 očuvana (Shinozaki sa sar., 2011). Nasuprot, blokada ekspresije iNOS u jetri pozitivno utiče na funkcionisanje IRS-2 (Fujimoto sa sar., 2005).

Podaci iz literature (Nathan sa sar., 1994) kao i naši objavljeni rezultati (Sudar sa sar., 2011) pokazuju da grelin pored drugih hormona, takođe reguliše aktivnost i ekspresiju iNOS.

## 1.4. Protein kinaze B i Ekstracelularnim Signalima Regulisana Kinaza 1/2

Protein kinaza B (PKB ili Akt) je serin /treonin kinaza koja pripada porodici protein kinaza zavisnih od cikličnih nukleotida. Ova grupa kinaza pokazuje veliki stepen sličnosti u mehanizmu aktivacije kao i aminokiselinskom sastavu katalitičkog domena (približno 80% poklapanja), iako su produkt tri različita gena locirana na različitim hromozomima (Scheid sa sar., 2003). Akt je jedan od glavnih ciljnih molekula signalne mreže pokrenute aktivnošću PI3-K i uključena je u regulaciju ćelijskog rasta, proliferacije, apoptoze, metabolizma glukoze, angiogeneze i migracije (Franke sa sar., 1995; Brazil sa sar., 2001; Zhuravleva sa sar., 2010). Kod sisara postoje tri izoforme PKB:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Akt ima tri različita domena: N- terminalni plekstrinski (engl. *Pleckstrin Homology*, PH) (Haslam sa sar., 1993), katalitički i C-terminalni regulatorni domen sa hidrofobnim motifom (HM) (Brazil sa sar., 2001). Sva tri regiona čine protein molekulske mase od 56kDa. Potpuno aktivirana Akt, koja ostvaruje svoju punu biološku aktivnost mora biti fosforilisana na dva mesta, jedno locirano unutar aktivacione petlje kinaznog domena (aminokiselina Thr<sup>308</sup>) i drugi u HM domenu (Ser<sup>473</sup>) (Frödin sa sar., 2002; Yang sa sar., 2002). **Slika 1-5.**

Akt se eksprimira u hepatocitima, Kupferovim i stelatnim ćelijama jetre, kao i endotelnim ćelijama sinusoidnih kapilara gde učestvuje u fiziološkim i patološkim procesima. U Kupferovim ćelijama stimulisanim lipoteihoinskom kiselinom i LPS, smanjuje se inflamatorna reakcija preko PI3-K/Akt puta (Dahle sa sar., 2004). Takođe, Akt ima značajnu ulogu u regeneraciji jetre i indukciji sekrecije citokina (Ping sa sar., 2006).

Akt može biti aktiviran  $H_2O_2$ , putem EGFR/PI3-K (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) zavisnog signalnog puta i povećana aktivnost Akt je potvrda da je aktivirana antioksidativna zaštita od apoptoze izazvane oksidativnim stresom (Wang sa sar., 2000).

ERK1/2 svojom strukturom i funkcijom pripada porodici serin/treonin kinaza odnosno, Mitogenima Aktivirane Protein Kinaze, (engl. *Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPK). MAPK su uključene u regulaciju različitih procesa u ćeliji kao što su proliferacija, diferencijacija, odgovor na stres i apoptoza (Schattenberg sa sar., 2005). Aktivacija MAPK kinaza se odvija preko kaskadne fosforilacije ushodnih kinaza. Kinaza MAPK kinaza (MAP3K; MEKK tj. MEK kinaza) fosforiliše i aktivira MAPK kinazu (MAP2K; MEK; MKK), koja zatim aktivira MAPK (Martindale sa sar., 2002; Subramaniam sa sar., 2006). Skoro svi faktori rasta i citokini, koji svoju aktivnost ostvaruju preko receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću, receptora aktiviranih citokinima ili receptora spregnutih sa proteinom G mogu da aktiviraju MAP-kinazni signalni put. Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija dva aminokiselinska ostatka to: Thr<sup>202</sup> i Tyr<sup>204</sup> u ERK1 i Thr<sup>183</sup> i Tyr<sup>185</sup> u ERK2. Aktivirana ERK1/2 zatim može da fosforiliše različite Ser/Thr ostatke više od 50 različitih citosolnih i nuklearnih proteina i transkripcionih faktora čime utiče na ekspresiju gena koji vode povećanju proliferacije, diferencijacije i preživljavanja ćelije (Taniguchi sa sar., 2006; Yap sa sar., 2011). Postoje potvrde da aktivaciju MAPK signalnih puteva mogu izazvati i ROS (Torres sa sar., 2003), ali mehanizmi aktivacije nisu još dovoljno razjašnjeni. Takođe, literaturni podaci uključujući i naše objavljene radove, pokazuju da grelin, kako u srcu (Sudar sa sar., 2011) tako i u jetri, svoje efekte ostvaruje aktiviranjem ERK1/2 kinaze.

## 2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu naših istraživanja i podataka iz literature ciljevi predložene doktorske disertacije bili su da se *in vivo* ispita:

1. Antioksidativna svojstva grelina, odnosno njegovi efekti na regulaciju nivoa enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GPx i GR) u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova;
2. Efekat grelina na regulaciju ekspresije i aktivnosti iNOS u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova;
3. Uloga transkripcionog faktora, NF $\kappa$ B u grelinom regulisanoj promeni ekspresije enzima antioksidativne zaštite i iNOS u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova;
4. Učešća ERK1/2/Akt u grelinom regulisanoj aktivnosti antioksidativnih enzima i iNOS u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova.



# 3. Hipoteza

Hipoteza predloženih istraživanja u okvirima ove doktorske disertacije se zasniva na pretpostavci da grelin u jetri pacova, *in vivo* reguliše ekspresiju i aktivnost enzima antioksidativne zaštite i iNOS, i to preko ERK1/2 i Akt signalnih puteva. Takođe, dobijeni eksperimentalni rezultati iz ovako dizajniranog eksperimenta su doprineli odgovoru na pitanje: da li se očekivane promene u antioksidativnim enzimima i iNOS mogu dovesti u vezu sa promenama u transkripcionom faktoru, NF $\kappa$ B kao i promenama u aktivaciji ERK1/2 i Akt u jetri pacova? Imajući u vidu složenost fiziološkog uticaja grelina i GH, kao i ograničenih literaturnih podataka, u okviru ove predložene doktorske disertacije dizajnirani su eksperimenti koji bi obuhvatili tretmane normalno hranjenih i gojaznih pacova grelinom. Tretman pacova ishranom bogatom mastima doveo je do razvoja patofiziološkog modela gojaznosti u kojem su ispitivani molekularni mehanizmi izmenjeni.

# 4. Materijal i metode

## 4.5. Eksperimentalne životinje

U eksperimentalnom postupku opisanom u ovom radu korišćeni su mužjaci pacova (*Rattus norvegicus*), soja *Wistar*. Životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja „Galenika A. D.“, Beograd. Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu.

U četvrtoj nedelji života pacovi su podeljeni u dve grupe, sa po 14 životinja u svakoj grupi.

Prva grupa životinja je označena kao „normalno uhranjene životinje“ i u skladu sa tim životinje su tokom celokupnog eksperimentalnog postupka imale slobodan (*ad libitum*) pristup vodi i standardnoj briketnoj hrani u sastavu: 20% proteina, 8% celuloze, 13% vlage, 1% kalcijuma, 0,90% lizina, 0,75% metionin+cistin, 0,5% fosfora, 0,15-0,25% natrijuma, mešavina vitamina (A- 10000 IU /kg, D3- 1600 IU /kg, E -25 mg/kg, B12 – 0,02 mg/kg), mešavina minerala (u mg/kg: cink 100, gvožđe 100, magnezijum 30, bakar 20, jod 0,5, selen 0,1), antioksidanata 100 mg/kg; digestibilna energija 11 MJ/kg (D.D. „Veterinarski zavod Subotica“, Subotica, Srbija).

Druga grupa životinja je označena kao „gojazne životinje“ i u cilju postizanja gojaznosti i razvijanja IR životinje su tokom četiri nedelje imale slobodan (*ad libitum*) pristup vodi i standardnoj briketnoj hrani koja je obogaćena sa 30% masti (engl. *High Fat Diet*, HF dijeta).

U periodu od četvrte do osme nedelje starosti, sve životinje su pojedinačno gajane u standardnim laboratorijskim uslovima, u kavezima od pleksiglasa sa poklopcem od nerđajuće čelične žice, pri konstantnoj temperaturi prostorija od  $22 \pm 2$  °C; relativne vlažnosti vazduha do 60-70% i režimu osvetljenja od 12 sati svetla i 12 sati mraka.

Nakon isteka osme nedelje, životinje su tri dana aklimovane na nov tip metaboličkih kaveza, a potom su pripremane za intracerebroventrikularno (*ICV*) injeciranje grelina. Standardna laboratorijska hrana za pacove i voda bile su dostupne *ad libitum* životinjama obe grupe pre i tokom izvođenja eksperimentalne procedure.

## 4.6. Intracerebroventrikularno injeciranje grelina

Za potrebe *ICV* injeciranja grelinom, sve životinja su podvrgavane implantaciji *ICV* kanile u uslovima opšte anestezije. Anestetik Tiopental-Na (Thiopental-Sodium, Rotexmedica, Trittau, Nemačka) apliciran je intraperitonealno (*IP*) u dozi od 45-50 mg/kg.

Nakon utvrđivanja tačne pozicije za ugradnju kanile, stereotaksičnim aparatom za glodare (Baltimore Instrument Co. Inc., SAD) pristupano je bušenju zubnom bušilicom do dure mater i to na poziciji: 1,5 mm lateralno, 1 mm posteriorno i 3 mm ispod kortikalne površine u odnosu na bregmu<sup>1</sup>. Za fiksiranje kanile, u okcipitalnom regionu lobanje pacova, postavljan je šraf od nerđajućeg čelika. Kanila i šraf su međusobno pričvršćeni i fiksirani za lobanju zubnim cementom (Simgal, Galenika A. D. Beograd, Srbija) (Stevanovic sa sar., 2008; Sudar sa sar., 2011).

Oporavak životinja posle implantacije *ICV* kanile trajao je 5 dana. U daljim eksperimentima korišćene su samo životinje koje su uspele u potpunosti da se oporave i nisu pokazivale znake bolesti (gubitak telesne mase, neurološki deficit, piloerekciju, hemoragiju itd.). Životinje su injecirane u toku pet kontinuiranih dana u periodu od 9:00 - 9:30h.

Za dalje potrebe eksperimenta, životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe sa po šest životinja u svakoj od navedenih grupa:

<sup>1</sup> **Bregma** je anatomski tačka koja se nalazi na stecištu koronalnog i parijetalnog šava lobanje.

1. Kontrolne životinje (**KONT**) normalno uhranjeni pacovi, kojima je *ICV* davan fosfatni pufer (engl. *Polyphosphate Buffer Saline*, PBS) (5µl PBS/po životinji) tokom pet uzastopnih dana;
2. Grupa normalno hranjenih pacova *ICV* tretiranih grelinom (**G**) (1µg pacovskog grelina ; Rat Ghrelin, Global Peptide, Fort Collins, CO, SAD) u 5µl PBS/ po životinji) tokom pet uzastopnih dana;
3. Gojazni pacovi (**HF**) na režimu ishrane bogate mastima i *ICV* tretirani sa PBS (5µl PBS/ po životinji);
4. Gojazni pacovi tretirani grelinom (**HFG**) na režimu ishrane bogate mastima, i *ICV* tretirani grelinom u trajanju od pet dana (1µg pacovskog grelina u 5µl PBS-a/ po životinji).

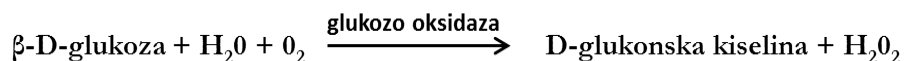
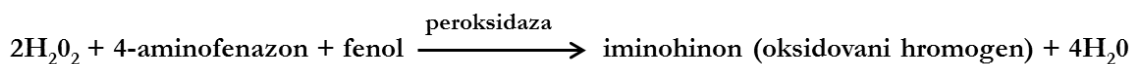
Svim životinjama je u toku trajanja tretmana, merena telesna masa neposredno pre davanja grelina ili PBS. Nakon pet dana od početka *ICV* aplikacije, životinje su žrtvovane dekapitacijom sat vremena nakon poslednjeg tretmana, upotrebom giljotine u dubokoj anesteziji, izazvanoj IP injeciranjem anestetika Tiopental-Na (Thiopental-Sodium, Rotexmedica, Trittau, Nemačka), u dozi od 50 mg/kg.

Nakon dekapitacije, krv je sakupljena i centrifugirana na 3000 rpm, 15 minuta, a dobijeni serumi zamrznuti su na temperaturi od -80 °C. Jetre su izolovane, merene i zamrznute do upotrebe u sledećim koracima eksperimenta.

## 4.7. Biohemijske analize

### 4.7.1. Određivanje koncentracije glukoze u serumu pacova

Koncentracija glukoze u serumu pacova određivana je standardizovanom GLUC-PAP metodom (Randox, Crumlin, Velika Britanija) u Rx Daytona automatskom biohemijском analizatoru (Randox, Velika Britanija). Princip metode se zasniva na oksidaciji glukoze u glukonsku kiselinu u prisustvu glukozo oksidaze, pri čemu se oslobađa  $H_2O_2$ . Glukozo oksidaza ima visok afinitet za reakciju sa  $\beta$ -D glukozom.  $H_2O_2$  iz reakcije, u prisustvu peroksidaze reaguje sa 4-aminofenazonom i 2,4-dihlorfenolom, gradeći iminohinon i vodu, odnosno oksidujući hromatsku komponentu.



Promena boje reakcione smeše je posledica stvaranja iminohinona. Merenjem apsorbanace svetlosti na talasnoj dužini od  $\lambda=505$  nm utvrđen je intenzitet nastale iminohinonske boje koji je direktno proporcionalan koncentraciji glukoze u uzorku i izražavana je u mmol/l (Pileggi sa sar., 1962).

### 4.7.2. Određivanje koncentracije insulina u serumu pacova

Koncentracija insulina u serumu pacova određivana je radioimunološkom metodom (RIA; engl. *Radioimmunoassay*) primenom RIA insulin komercijalnog kompleta (INEP, Zemun, Srbija). Princip testa zasniva se na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka ili standarda i radioaktivno obeleženog insulina ( $^{125}\text{J}$ -insulina, aktivnosti oko 85 kBq po bočici, liofilizovan) za određeni broj vezujućih mesta na specifičnim anti-insulinskim antitelima, pri čemu nastaju radioaktivno obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Ako je veća količina insulina u uzorku, u reakcionoj smeši će se detektovati manje formiranog obeleženog kompleksa. U serum zapremine 50  $\mu\text{l}$  dodavano je po 50  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{J}$ -insulina i 50  $\mu\text{l}$  anti-insulin-antiseruma. Nakon vorteksovanja reakcija se odvijala 20 h na sobnoj temperaturi. Po završenoj reakciji,

svi formirani kompleksi su taloženi imunoadsorbantom (dodavano je po 250 $\mu$ l) nakon čega je sadržaj centrifugiran 25 minuta na 3000g. Staloženi kompleksi predstavljaju kombinaciju sekundarnih antitela, polietilenglikola (PEG) i vezanog insulina, dok u tečnoj fazi ostaju slobodni insulin (obeleženi i neobeleženi) i slobodna antitela. Supernatant je uklanjana, a radioaktivnost sadržaja koji je ostao na dnu epruvete, merena je na gama-scintilacionom brojaču 1219 Rack beta Liquid Scintillation Counter (LKB, Belgija) .

Za izradu standardne krive korišćeni su standardi sa definisanim, poznatim koncentracijama insulina. Upoređivanjem sa standardnom krivom određivana je koncentracija insulina u uzorcima seruma. Koncentracija insulina izražavana je u mIU/l seruma.

### 4.7.3. Određivanje indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) i sekrecije insulina

HOMA indeks (engl. *Homeostasis Model Assessment Index*) opisan 1985. godine, je jednostavan matematički model kojim se utvrđuje odnos stepena funkcionalnosti  $\beta$  ćelija pankreasa, odnosno odgovor  $\beta$ -ćelija pankreasa na koncentraciju glukoze (HOMA1- $\beta$ ) i rezistencije na insulin (HOMA1-IR) u kojoj je smanjen inhibitorni efekat insulina na sintezu glukoze u jetri. Negativna povratna sprega između jetre i  $\beta$ -ćelija reguliše sekreciju insulina i oslobađanje glukoze iz jetre i omogućuje da se matematički izraze stabilne koncentracije insulina i glukoze.

Podaci koji se koriste u jednačini su izmerene bazalne (natašte) koncentracije glukoze i radioimunološkom metodom dobijene vrednosti insulina ili C-peptida. Na osnovu dobijenih vrednosti, ispitanici se dele na 3 grupe prema visini rezistencije na insulin, pri čemu oni u najvišoj trećini dobijanih vrednosti, imaju 27% veći rizik da dobiju neki od kardiovaskularnih događaja od onih koji su u nižoj trećini insulinske rezistencije (Matthews sa sar., 1985; Wallace sa sar., 2004). Koncentracija glukoze se izražava mmol/l, a koncentracija insulina u  $\mu$ U/ml. Brojne kliničke studije su pokazale odličnu korelaciju između HOMA indeksa i euglikemijskog clampa, koji se smatrao „zlatnim standardom“ u dijagnostici.

HOMA IR indeks izračunavan je prema formuli:

$$\text{HOMA IR indeks} = \text{glukoza našte [mmol/l]} \times \text{bazalni insulin [\mu U/ml]} / 22,5$$

HOMA- $\beta$  indeks izračunavan je prema formuli:

$$\text{HOMA-}\beta \text{ indeks} = 20 \times \text{bazalni insulin } [\mu\text{U/ml}] / (\text{glukoza našte } [\text{mmol/l}] - 3,5)$$

#### 4.7.4. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u serumu pacova

Koncentracija SMK u serumu pacova određivana je pomoću modifikovane kolorimetrijske metode po Dunkombeu (Duncombe, 1964). U osnovi metode je proces ekstrakcije lipida organskim rastvorom, npr. hloroformom, pri čemu se eliminišu interferirajuća jedinjenja, kao što su fosfolipidi. Hloroformski rastvor SMK u prisustvu reagensa koji sadrži bakar, reaguje i formira soli bakra, koje zatim u prisustvu dietilditiokarbamata (DDC; engl. *Dietlyl-Ditlliocarbamate*), stvaraju kompleks žute boje (kompleks SMK-Cu) sa maksimumom apsorpcije svetlosti na talasnoj dužini od 436 nm.

Postupak određivanje koncentracije SMK u serumu je rađen tako što je u 45  $\mu\text{l}$  seruma dodavano 225  $\mu\text{l}$  reagensa (trietanolaminskog pufera (TEA), pH 7,8, +  $(\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O} \text{ u } \text{H}_2\text{O})$ ) i nakon kratkog vorteksovanja dodato je 1125  $\mu\text{l}$  hloroforma i nakon snažnog mućkanja 20 minuta na sobnoj temperaturi, inkubaciona smeša je centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm u kliničkoj centrifugi. Gornji, vodeni plavo-zeleni sloj sa proteinima u potpunosti je uklanjan vakum pumpom, a iz donjeg hloroformskog sloja, prenošeno je po 450  $\mu\text{l}$  uzorka u posebne epruvete i dodavano 45  $\mu\text{l}$  0,2% DDC. Nakon snažnog vorteksovanja uzorci su inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije merene su apsorbance uzoraka i standarda prema slepoj probi u aparatu Biochrom ultraspec II (LKB, Belgija) na talasnoj dužini  $\lambda=436\text{nm}$ . Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji ukupnih SMK i izražavan je u mmol/l.

Koncentracija SMK je određivana korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbaneci očitanih za seriju rastvora palmitinske kiseline rastvorene u hloroformu, poznate koncentracije (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 mM) .

### 4.8. Izolovanje ćelijskog lizata iz jetre pacova

Za izolaciju ćelijskog lizata, uzimano je po 1g tkiva jetre. Tkivo je seckano i homogenizovano u 4 ml TES pufera sa proteaznim inhibitorima, u Ultra-Turrax

homogenizeru T8 (IKA-Werke, Nemačka) 3 x 30 s, na ledu. TES pufer za izolovanje proteina sadržao je: 10 mM Tris (pH 7,2), 250 mM saharoze, 1,5 mM EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*), kao i proteazne inhibitore 100mM PMSF (engl. *Phenylmethanesulphonylfluoride*), 10 mg/ml aprotinin, 10mg/ml leupeptin i fosfatazni inhibitor, 2 mM natrijum ortovanadat. Homogenati su dalje centrifugirani 20 minuta na 10000 x g (9500 rpm u Beckman, J21). Supernatanti su sakupljeni, prebacivani u prethodno ohlađene tube i centrifugirani 60 minuta na 48000 x g (23000 rpm u ultracentrifugi Beckman L3-50, Ti-50 rotor). Supernatant i talog su razdvajani. U dobijenom supernatantu, koji predstavlja lizat ćelija jetre, koncentracija proteina određivana je BCA metodom (engl. *Bicinchoninic Acid Assay*, BCA) (Smith sa sar., 1985).

## 4.9. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnog proteina u uzorku je određivana korišćenjem komercijalnog BCA testa (engl. *Bicinchoninic Acid Assay*-BCA, Pierce, Rockford, IL, SAD) koji se zasniva na protokolu za kolorimetrijsku detekciju i kvantifikaciju, Smitha i saradnika (1985). BCA test se zasniva na kolorimetrijskoj detekciji redukovano bakra  $\text{Cu}^+$ , nastalog tokom biuretske reakcije, u prisustvu bihinonske kiseline u alkalnoj sredini. Reakcija uključuje dva koraka:

1. biuretska reakcija u kojoj dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  jona do  $\text{Cu}^+$  jona. U jako alkalnom rastvoru dolazi do deprotonovanja NH grupe iz peptidne veze, što se detektuje plavom bojom.

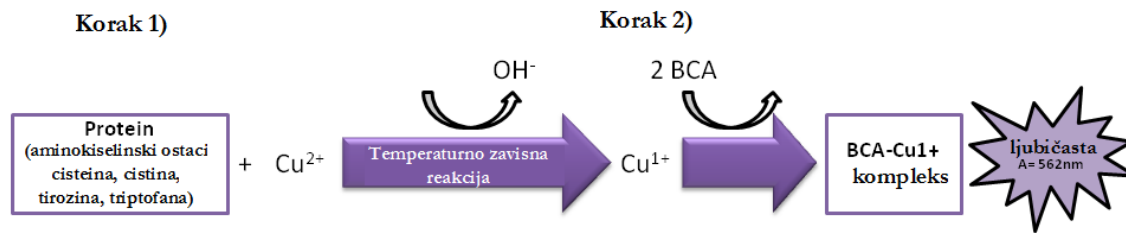
2. helacija dva molekula BCA sa jonom bakra  $\text{Cu}^+$  (

**Slika 4-1).**

Stvaranje BCA-bakar kompleksa je praćeno razvijanjem boje sa maksimumom apsorpcije na 562nm. Redukciji  $\text{Cu}^{2+}$ , što se detektuje promenom inteziteta boje, najviše doprinose amino kiseline cistein ili cistin, tirozin i triptofan Takođe, intezitetu boje doprinosi i celokupan proteinsku sadržaj. Vezivanjem BCA za jon Cu u biuretskoj reakciji, efikasno se uklanjaju slabo helirani peptidi. Oslobođeni peptidi su dalje slobodni da se vezuju za druge jone bakra.

Koncentracija ukupnih proteina je preračunavana sa standardne krive, konstruisane na osnovu izmerenih vrednosti apsorbaneci poznatih rastućih koncentracija BSA (0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2 mg/ml).





Slika 4-1. Shematski prikaz biuretske reakcije.  $\text{Cu}^{2+}$  - jon bakra;  $\text{Cu}^{1+}$  - jon bakra;  $\text{OH}^-$  – hidroksil radikal; BCA - bicinhoninična kiselina (engl. Bicinchoninic Acid Assay); Preuzeto i modifikovano: <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>

## 4.10. SDS-PAGE - elektroforeza

Elektroforeza je postupak kojim se iz smeše proteina razdvajaju makromolekuli u električnom polju i ona predstavlja prvi korak u određivanju stepena ekspresije proteina, njegove lokalizacije i fosforilacije u analiziranom uzorku. Princip metode korišćen u ovom radu preuzet je od Laemmli (Laemmli, 1970) i označen je kao diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). U poliakrilamidnoj elektroforezi, električno polje pokreće proteine kroz matriks poliakrilamidnog gela razdvajajući proteine isključivo na osnovu njihove molekulske mase izražene u kDa (engl. *Daltons*, Da).

SDS je anjonski deterdžent, čije negativno naelektrisanje narušava kompleksnu strukturu proteina prevodeći ih u linearne forme. Polipeptidni lanac vezuje za sebe SDS proporcionalno njegovoj molekulskoj masi, i proteini pri SDS elektroforezi se razdvajaju samo na osnovu same mase molekula.

Da bi se postigla visoka rezolucija u razdvajanju proteinskih frakcija primenjivan je sistem gradijentnog gela: 4% gel za koncentrovanje (0,5M Tris-HCl (pH 6,8), akrilamid, bisakrilamid, SDS, amonijumpersulfat (APS), TEMED i  $\text{H}_2\text{O}$ ) i 8% ili 10% gel za razdvajanje (1,5M Tris-HCl pH 8,8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i  $\text{H}_2\text{O}$ ) kao i dva različita puferska sistema: pufer za uzorkovanje (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerola, 0,5% 2-p-mercaptoetanol, 0,1% bromofenol plavo) i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i  $\text{H}_2\text{O}$ ). Elektroforetska separacija proteinskih frakcija

izvedena je u VWR® Mini Vertical PAGE, sistemu za vertikalnu elektroforezu (VWR Corporate, Radnor, PA, SAD).

Ćelijski lizati (početne koncentracije ukupnih proteina 5 µg/l) su razblaživani sa 5 puta koncentrovanim redukujućim puferom za uzorkavanje, odnosno Laemmli puferom (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 200 mM 2-β-merkaptioetanol, 4% SDS, 0,2% brom fenol plavo i 20% glicerol), do finalne koncentracije 4 µg/l. Ovako pripremljeni lizati zatim su kuvani 5 minuta na 100 °C kako bi se proteini potpuno denaturisali. Svi uzorci su zatim hlađeni na sobnoj temperaturi, korišćeni u planiranim analizama i/ili skladišteni na -20 °C.

Pripremljeni uzorci su nanošeni u bunariće gela u volumenu od 12,5 µl (60 µg ukupnih proteina) i razdvajani SDS- PAGE elektroforezom, 15 minuta pri naponu od 100V, a zatim 60 minuta pri naponu od 120V.

Na svaki gel su nanošeni i proteini poznatih molekulskih masa, odnosno marker PageRegular™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Vilnius, Litvanija) radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze, prema molekulskoj masi.

## 4.11. Imuno blot

Neposredno nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom, rađen je Imuno blot tj. postupak kojim se detektuju specifični proteini u proteinskim lizatima. Detekcija ispitivanih proteina u uzorcima vršena je na osnovu reakcije sa specifičnim antitelima. S obzirom da se u gelu poliakrilamida ne može izvesti reakcija antigen-antitelo, proteini iz gela prebacivani su na membranu.

Elektrotransfer razdvojenih proteinskih frakcija sa gelova vršen je na polivinilidendi fluorid (engl. *Polyvinylidene Difluoride*, PVDF) membranu (Immobilon-P Transfer Membrane - veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore, Bilerica, MA, SAD), tokom sat vremena pri struji intenziteta 250 mA na +4  $^{\circ}\text{C}$ , u aparatu za transfer, VWR<sup>®</sup> Mini PAGE Electroblothing System (VWR Corporate, Radnor, PA, SAD). Pufer za transfer proteina sadržao je 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol i  $\text{H}_2\text{O}$ , a efikasnost transfera proteina proveravana je bojenjem membrana sa 0,5% rastvorom Ponceau S tokom jedne minute. Po vizuelizaciji crveno obojenih proteinskih traka, membrane su ispirane destilovanom vodom i TBS-T puferom (0,05% Tween 20 u TBS puferu (engl. *Tris-Buffered Saline*, TBS), a zatim inkubirane tokom sat vremena na sobnoj temperaturi, u puferu za blokiranje (5% nemasno mleko u TBS-T puferu ili 5% BSA/TBS-T) kako bi se umanjilo ne-specifično vezivanje antitela za PVDF membranu.

Nakon blokiranja, membrane su ispirane TBS-T puferom, a zatim inkubirane preko noći na 4  $^{\circ}\text{C}$  sa primarnim antitelima određene specifičnosti, razblaživanim do odgovarajućih koncentracija u 5% nemasnom mleku u TBS-T ili u 5% BSA/TBS-T. Za potrebe ovih istraživanja membrane su inkubirane sa sledećim specifičnim primarnim antitelima: zečjim anti-fosfo-Akt Ser<sup>473</sup> i zečjim anti-Akt poliklonskim antitelom, razblaženje 1:1000; zečjim anti-fosfo-ERK1/2 (p44/ 42) i zečjim anti-ERK1/2 (p44/ 42) poliklonskim antitelom, oba u razblaženju 1:1000 (Cell Signaling, Beverly, MA, SAD); zečjim anti-iNOS/NOS tip II poliklonskim antitelom, razblaženje 1:2000, (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD); mišjim anti-NFKB-p50 (E-10) monoklonskim antitelom, razblaženje 1:1000 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD); zečjim anti-NFKB-p65 (C-20) poliklonskim antitelom, razblaženje 1:500 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD);  $\beta$ -aktin, mišji anti-aktin monoklonsko antitelo (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD); zečjim poliklonskim anti- $\beta$ -aktin antitelom (ab8227, Abcam), razblaženje 1:3000; Anti-Mn-SOD razblaženje 1:4000 (Stressgen), anti-CuZnSOD (1:10000) (Stressgen), anti-Catalase (1:10000)

(Calbiochem), anti-GPx (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) i anti-glutathione reductase (1:3000) (Santa Cruz Biotechnology) antitelom.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane tri puta po 5 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom, a zatim inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) ili sa alkalnom fosfatazom (engl. *Alkaline Phosphatase*, ALP): kozjim anti-zečjim IgG-HRP, ovčijim anti-mišjim IgG-HRP ili kozjim anti-zečjim IgG-ALP antitelima, u razblaženju 1:5000 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD i Amersham). Sekundarna antitela razblaživana su do odgovarajućih koncentracija u 5% nemasnom mleku rastvorenom u TBS-T puferu. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima, membrane su, takođe, ispirane tri puta po 5 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom.

Da bi utvrdili da li je na gelove nanošena jednaka količina proteina u svim uzorcima plazma membrana ili ćelijskih lizata, korišćena su antitela na  $\beta$ -aktin, mišji anti-aktin monoklonsko antitelo (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD) i zečji poliklonsko anti- $\beta$ -aktin antitelo (ab8227, Abcam) kao kontrola unosa uzoraka na gel tj. kao „loading“ kontrola.  $\beta$ -aktin je izabran kao marker ćelijskih frakcija na čiju količinu primenjeni tretmani nemaju efekta.

U slučaju kada su sekundarna antitela bila konjugovana sa HRP, analizirani proteini u uzorku su vizualizovani na autoradiografskom filmu pomoću ECL (engl. *Enhanced Chemiluminescence*, ECL) reagensa (Amersham Biotech, Pitt sburgh, PA, SAD). Metoda ECL se zasniva na brznoj i osetljivoj reakciji luminiscencije, u kojoj uz prisustvu  $H_2O_2$ , peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola. Nastali intermedijarni produkt prelazi u stabilnu formu uz emisiju svetlosti koja osvetljava film. Detekcija se vrši u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Membrana je postavljena između dve providne folije u kaseti za detekciju (Hypercassette, Amersham Life Science, SAD), a preko membrane je stavljan film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija). Ekspozicija filma je trajala od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (zavisno od intenziteta dobijenog signala). Otisci dobijani na filmu, odgovaraju proteinima koji se nalaze na membrani i za koje su vezana odgovarajuća primarna i sekundarna antitela sa peroksidazom.

U slučaju kada su sekundarna antitela bila konjugovana sa ALP analizirani proteini u uzorku su vizualizovani bojenom reakcijom na samoj membrani uz pomoć fosfatnog reagensa (engl. *5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate*, BCIP) i hlornog reagensa (NBT; engl. *Nitro Blue Tetrazolium Chloride*; Fluka, Sigma-Aldrich, Steinhdm, Nemačka). BCIP je supstrat

za ALP koji nakon defosforilacije reaguje sa NBT i kao produkt oksidacije nastaje jedinjenje plavo-ljubičaste boje. NBT služi kao oksidant i takođe daje jedinjenje plavo-ljubičaste boje i time intenzivira već nastalu boju.

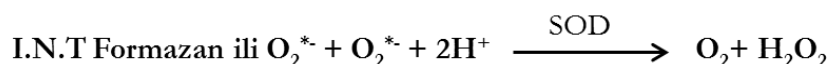
Postupak detekcije proteina na membrani uz pomoć BCIP/NBT, izvođen je tako što je membrana inkubirana na sobnoj temperaturi, u mraku, u rastvoru koji je sadržao 200  $\mu$ l reagensa BCIP/NBT i 10 ml pufera: 0,1M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl. Dužina inkubacije zavisila je od tipa proteina i antitela, a trajala je od nekoliko minuta do sat vremena. Plavo-ljubičasti otisci dobijani na membranama odgovaraju proteinima koji su na membrani i za koje su vezivana odgovarajuća primarna i sekundarna antitela sa ALP.

Intenziteti signala, odnosno koncentracije ispitivanih proteina, određivane su denzitometrijski. Filmovi su skenirani, a optička gustina detektovanih proteinskih traka kvantifikovana je pomoću programa *ImageJ* (engl. *Image Processing and Analysis in Java*). Prosečan broj piksela po otisku kontrolnih životinja definisan je kao jedna arbitrarna jedinica (AJ) po pg proteina, a vrednosti dobijene kod tretiranih životinja su poređene sa kontrolom i takođe izražavane u AJ/pg proteina. U slučaju kada je na istoj membrani, pored ispitivanog, trebalo detektovati i konstitutivno eksprimiran protein ( $\beta$ -aktin) ili totalnu količinu Akt, ERK, primenjivano je čišćenje membrane, tj. otklanjanje vezanih primarnih i sekundarnih antitela (engl. *Stripping*) određene specifičnosti. U tu svrhu, membrane su inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi u 0,2M NaOH. Nakon toga su membrane ispirane pet puta po 10 minuta u puferu TBS-T, te je ponavljanjem Western blot postupka od faze blokiranja, uz upotrebu odgovarajućih specifičnih antitela određivano prisustvo drugog proteina.

## 4.12. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u uzorcima jetre pacova

### 4.12.1. Određivanje aktivnosti SOD

Ukupna aktivnost SOD određivana je korišćenjem komercijalnog RANSOD kit (Randox Labs, Crumlin, UK), koji ne meri aktivnosti pojedinačnih izoformi Cu/Zn ili MnSOD. Princip reakcije zasniva se na originalnoj metodi McCord i Fridovich (McCord sa sar., 1969). U reakciji prevođenja ksantina u mokraćnu kiselinu pod dejstvom ksantin oksidaze (engl. *Xanthine Oxidase*, XOD), nastaje radikal superoksid anjon ( $O_2^*$ ), koji reaguje sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (I.N.T), formirajući crveno obojenu boju, formazan. SOD inhibira reakciju, prevodeći  $O_2^*$  u kiseonik. U eseju za određivanje ukupne aktivnosti SOD su korišćeni lizati tkiva jetre i standardni rastvori. Apsorbancija je merena spektrofotometrijski na 505nm u automatskom biohemijskom analizatoru RX-Daytona (Randox, Crumlin, UK). Jedinica aktivnosti superoksid dizmutaze definisana je kao količina SOD enzima koja uzrokuje inhibiciju formiranja formazana za 50% u odgovarajućim uslovima. Aktivnost SOD izražena je u jedinicama U/mg proteina.



### 4.12.2. Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT je određivana po metodu Claiborne (Clairborne, 1985). Princip metode se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju raspada  $H_2O_2$  pod dejstvom CAT, na talasnoj dužini od 240 nm, na kojoj apsorbuje  $H_2O_2$ .

Aktivnost je određivana u uzorcima ćelijskog lizata jetre (50 $\mu$ l) u koje je dodavano 25 $\mu$ l apsolutnog etanola i 1ml  $H_2O$ . Etanol se dodaje da bi se uklonio endogeno vezani  $H_2O_2$ , i tako obezbedilo merenje stvarne aktivnosti katalaze.

Postupak je izvođen pripremom reakcione smeše, neposredno pre merenja (0,05 M fosfatni pufer pH=7,0,  $KH_2PO_4$  (0,68g)/ $K_2HPO_4$  (0,87g) u 100ml  $H_2O$ ) u koju je dodavan  $H_2O_2$ . Pufer je podešavan tako da vrednosti apsorbance slepe probe na 240 nm budu u opsegu između 0,525-0,550. U reakcionu smešu dodavano je 40  $\mu$ l homogenata jetre pacova (koncentracije ukupnih proteina 10  $\mu$ g/ $\mu$ l). Reakcija je započinjana dodavanjem uzorka.

Aktivnost CAT se određuje praćenjem razlaganja  $H_2O_2$ , pri čemu je pad apsorbance proporcionalan aktivnosti CAT i preračunava se na osnovu sledeće formule:

$$\text{Specifična aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times \text{razblaženje} / 43,6 \times \text{koncentracija proteina} \\ \mu\text{mol/min mg}$$

Gde je  $\Delta A_{uz}$  – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti;  $\Delta A_{sp}$  - srednja promena apsorbance uzorka u minuti; 43,6 – molarni ekstincioni koeficijent za  $H_2O_2$  na 240nm ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Jedna jedinica aktivnosti CAT se definiše kao količina enzima koji razgrađuje 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$  u minuti po mg proteina. Izražava se u U/mg proteina.

### 4.13. Određivanje koncentracije nitrita i nitrata u serumu pacova

Određivanje koncentracije nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) kao stabilnih metabolita NO, korišćena je za indirektno merenje produkcije NO u biološkim sistemima, i podrazumeva dvostepenu reakciju. Prva reakcija uključuje aktivnost nitrat reduktaze, i nakon nje sledi Grisova reakcija (Hevel sa sar., 1994).

Odnos nitrita i nitrata je varijabilan i teško predvidljiv, te je njihova suma najbolji pokazatelj totalne produkcije NO.

Da bi se detektovali kolorimetrijski, nitrati se moraju prevesti u nitrite. Pomoću koenzima NADP ili NADPH zavisne nitrat reduktaze, nitrati se konvertuju u nitrite. Konvertovani nitriti se mogu kvantifikovati uz pomoc Grisovog reagensa, koji prevodi nitrite u purpurno (ljubičasto) azo-jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 570 nm.

NADPH je neophodan kofaktor za nitrat reduktazu, ali u višku interferira sa Grisovim reagensom i utiče na senzitivnost metode. Da bi se odstranio višak NADPH, neophodan je dodatni korak nakon redukcije nitrata, koji podrazumeva reakciju NADPH sa L-glutamat dehidrogenazom i  $\alpha$ -ketoglutaratom radi oksidacije NADPH u NADP.

Esej je rađen u mikrotitarskim polistirinskim pločama sa 96 bunarića. Uzorci seruma u volumenu od 100  $\mu\text{l}$  inkubirani su 3h na 37 °C sa 15  $\mu\text{l}$  (30mU) nitrat reduktaze (iz *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD), u prisustvu 1  $\mu\text{l}$  2,5 mM  $\beta$ -NADPH. Nitrati su redukovani do nitrita, a višak  $\beta$ -NADPH je zatim oksidovan sa 2  $\mu\text{l}$  (100 mU) L-glutaminske dehidrogenaze (SigmaAldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD), 1  $\mu\text{l}$  u 0,4 mM  $\alpha$ -ketoglutarata i 12,5  $\mu\text{l}$  2M amonium sulfata, 30 minuta na 37 °C. Nakon redukcije, koncentracija nitrita je određivana mešanjem istih volumena uzoraka i Grisovog reagensa (mešavina 1:1, 0,1 % rastvor naftil etilen diaminodihidroklorida u  $\text{H}_2\text{O}$  i 1% rastvor sulfanilamida u 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i 95%  $\text{H}_2\text{O}$ ) i inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim je merena apsorbanca na 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Sunrise basic, Tecan, Austrija).

Koncentracija je nitrata je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanca očitanih za seriju rastvora  $\text{KNO}_3$  poznate koncentracije i izražavana u  $\mu\text{mol/l}$ .



#### **4.14. Određivanje aktivnosti arginaze u homogenatu jetre pacova**

Određivanje aktivnosti arginaze u homogenatu jetre pacova vršen je spektrofotometrijskom metodom po Koralizi (Corraliza sa sar., 1994). Arginaza je enzim koji katalizuje prevođenje L-Arginina u L-ornitin i ureu, te se princip ove metode zasniva na merenju količine nastale uree u uzorku, koja je direktno proporcionalna aktivnosti enzima.

Postupak je izvođen tako što je u 100  $\mu$ l homogenata jetre pacova (koncentracije ukupnih proteina 10  $\mu$ g/ $\mu$ l) dodavano 100  $\mu$ l Reagens 1 (10mM MnCl<sub>2</sub> u 50mM Tris-HCl, pH 7,5). Smeša je kratko vorteksovana, a potom je enzim iz uzorka aktiviran kuvanjem u vodenom kupatilu na temperaturi od 55 °C u trajanju od 10 minuta. Hidroliza L-Arg započinje dodavanjem 50  $\mu$ l Reagens 2 (0,5 M L-Arginina i 0,5M arginin monohidrohlorida dodato u smešu 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 0,05% NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,7; L-arginin monohydrochloride, Kemika, Zagreb, R. Hrvatska) u 50  $\mu$ l, prethodno aktiviranog uzorka, i njihovim inkubiranjem na 37 °C u trajanju od 60 minuta. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 800  $\mu$ l Reagens 3 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96-98%) : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) : H<sub>2</sub>O = 1:3:7) i 50  $\mu$ l Reagens 4 (9% isonitrozopropiofenon (ISPF) u 100% etanolu) i kuvanjem na 100 °C u trajanju od 45 minuta. Posle 10 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi, u mraku (da bi se razvila boja), određivana je apsorbancia na 550 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (1420 Victor, Wallac, Perkin Elmer, SAD).

Aktivnosti arginaze je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitavanih za seriju rastvora uree (Urea, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD) poznate koncentracije i izražavana u nmol uree/min/mg proteina.

## 4.15. Određivanje ekspresije gena za iNOS

### 4.15.1. Izolacija RNK iz jetre pacova

Izolacija ukupne RNK iz ćelija jetre pacova urađena je upotrebom trizol reagensa. Trizol je jednofazni rastvor fenola i guanidin izotiocianata kojim se solubilizuje biološki materijal i denaturišu proteini.

Tkivo jetre pacova je seckano makazicama i potpuno homogenizovano klipnim špricom u mililitru Trizola (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Velika Britanija). Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 10 minuta, na 12000 g i na 4 °C. Faza separacije započinjana je dodavanjem hloroforma u supernatant (1/5 volumena Trizola, odnosno 200 µl, -20 °C) nakon mešanja i inkubacije 15 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12,000 g i na 4 °C. Iz tuba je sakupljan gornji trizolski sloj i dodavanjem na -20 °C rashlađenog 500 µl izopropil alkohola izvršena je precipitacija RNK. Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirani 8 minuta na 12,000 g i 4 °C. Talog iz tuba je ispiran dva puta sa po mililitar 75% etanola, potom sušen 5 minuta na sobnoj temperaturi. Rastvaranje taloga vršeno je u DEPC (engl. *Diethylpyrocarbonate*) vodi. Koncentracija i prečišćenost RNK određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm/280 nm, na aparatu Gene Qvant II (Pharmacia Biotech, Ltd., Velika Britanija). Analiza degradiranosti izolovane RNK vršena je 1,2% agaroznom nedenaturišućom elektroforezom.

### 4.15.2. Prepis RNK u cDNK-reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT reakcija) predstavlja proces u kom se jednolančana RNK prepisuje u komplementarnu DNK (engl. *Complementary DNA*, cDNA). Prepis je vršen uz pomoć kita za sintezu cDNK, prema uputstvu proizvođača: *The RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Vilnius, Litvanija).

Prepis je rađen po sledećoj proceduri: 12,5 µl uzorka koji je sadržao 1200 ng RNK izolovane iz jetre pacova, inkubirano je sa 1 µl (0,2 µg/µl) heksamera (Random Hexamer Primer) i 0,5 µl (100 mM) dNTP Mix 5 minuta na 70 °C. Nakon toga, dodavano je 4 µl pufera (5 X Reaction Buffer for M- MuLV Reverse Transcriptase), 1 µl (200 U/µl) reverzne

transkriptaze (Revert Aid™ H Minus M- MuLV Reverse Transcriptase) i 1 µl (20 U/µl) inhibitora RNKaze (RiboLock-Ribonuclease inhibitor) po uzorku i inkubirano 15 minuta na 25 °C, a zatim sat vremena na 42 °C. Reakcija je zaustavljena grejanjem na 70 °C, 10 minuta i dodatna 3 minuta na 95 °C. Dobijena cDNK korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena za iNOS.

### 4.15.3. Kvantifikacija ekspresije iNOS gena

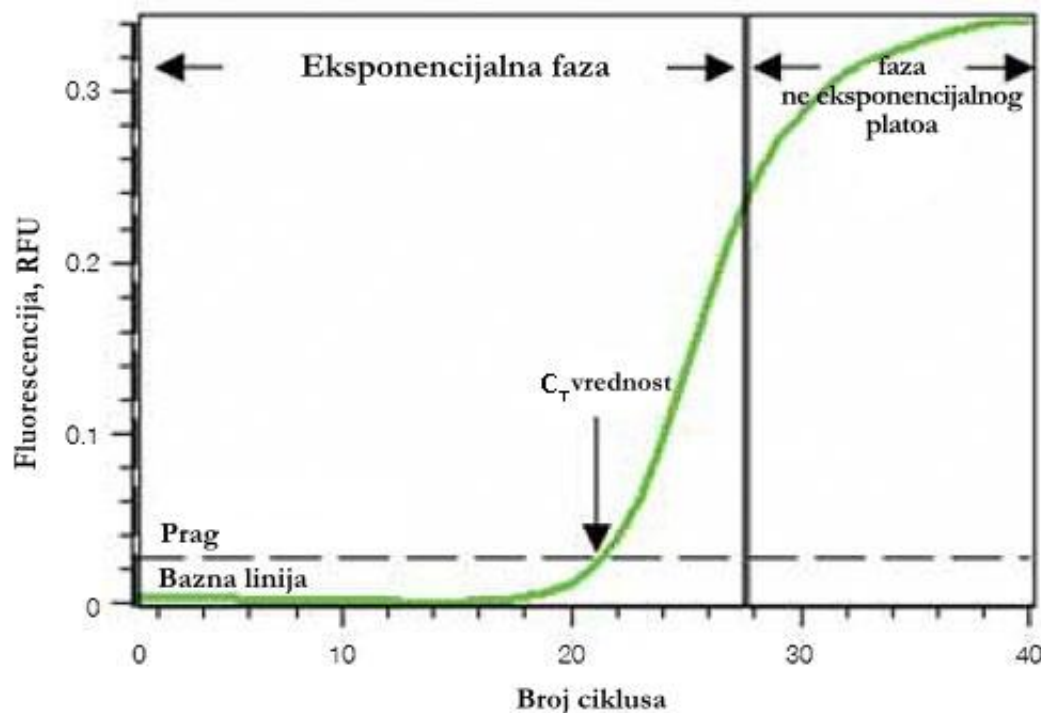
Metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymemse Chain Reaction*, PCR) u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) kvantifikovana je ekspresija gena za iNOS.

qRT-PCR postala je standardna metoda koja se koristi za identifikaciju, amplifikaciju i kvantifikaciju ciljnih nukleinskih kiselina (Gibson sa sar., 1996). Ova metoda omogućila je dobijanje velikog broja kopija određenog fragmenta DNK, pri čemu se selektivno umnožavanje ciljanog segmenta molekula DNK prati u realnom vremenu (engl. *Real Time*), što je i jedna od osnovnih razlika u odnosu na klasičan PCR. U osnovi metode je ciklična replikacija molekula DNK. Takođe, qRT-PCR reakcija podrazumeva i ciklične promene temperature, odnosno naizmenično zagrevanje i hlađenje inkubacione smeše kao i prisustvo fluorofora koje omogućuju kvantifikaciju svake pojedinačne amplifikacije. Amplifikacija fragmenata se vrši uz pomoć para prajmera (sintetski jednolančani oligonukleotidi dužine 18-20 nukleotida, koji prepoznaju granične regione sekvence od interesa u dvolančanoj DNK). Pored prajmera za proces PCR neophodan je i enzim DNK polimeraza. DNK polimeraza je odgovorna za sintezu komplementarnih lanaca nukleotida, koji se nastavljaju na prajmere. Nakon završenog ciklusa amplifikacije, isti prajmeri se mogu iskoristiti u novom ciklusu amplifikacije. S obzirom da je visoka temperatura uslov za razdvajanje dvolančane DNK, i sam enzim DNK polimeraza mora biti termostabilan i zato se u PCR metodi koristi DNK polimeraza (engl. *Taq polymerase*) koja je izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*. Ova polimeraza je aktivna i na temperaturi od 95 °C i zato nije potrebno da se dodaje u svakom ciklusu amplifikacije. qRT-PCR reakcija započinje denaturacijom DNK, zatim sledi hibridizacija prajmera. U trećoj fazi Taq DNK polimeraza, uz prisustvo slobodnih dezoksinukleozid-trifosfata (dNTP) i jona Mg<sup>2+</sup> pravi kopije željene sekvence. Svaka faza procesa se odvija na različitoj temperaturi.

Ponavljanjem ciklusa zagrejanja i hlađenja uz aktivnost DNK polimeraze umnožava se ciljni fragment DNK, tako da se broj kopija eksponencijalno povećava i iznosi  $2^n$ , gde je  $n$  = broj ciklusa.

Detekcija amplifikovanog produkta tokom qRT-PCR je moguća jer se u toku reakcije koriste fluorescentni molekuli koji daju informaciju o količini amplifikovane DNK. Količina amplifikovane DNK proporcionalna je povećanju intenziteta fluorescentnog signala koji detektuje sam PCR aparat tokom svakog ciklusa. Fluorescentni molekuli mogu biti DNK-vezujuće boje kao i prajmeri ili probe specifične sekvence koje su obeležene bojom. I oni su označeni kao *reporteri*.

Tokom amplifikacija razlikujemo dve faze, eksponencijalnu fazu i ne-eksponencijalnu plato fazu. Tokom eksponencijalne faze, količina PCR produkta se eksponencijalno povećava u svakom ciklusu (Error! Reference source not found.).



Slika 4-2. Amplifikaciona kriva PCR u realnom vremenu. Preuzeto i modifikovano sa sajta: [Real-Time PCR - Applications Guide](#)

Tokom PCR reakcije nivo detektovane fluorescencije korespondira količini ciljnog produkta. Međutim, promena u reakcionoj smeši može izazvati fluktuaciju nivoa fluorescencije, što se detektuje kao šum (engl. *background* ili *noise*). Šum je prisutan tokom

početnih ciklusa PCR reakcije, obično tokom 3-15 ciklusa, i ima funkciju da se odredi nivo *bazne linije* fluorescencije. Bazna linija se određuje empirijski za svaku reakciju pojedinačno.

Prag (engl. *Threshold*) je vrednost signala koja reflektuje statistički značajno povećanje koje je iznad pretpostavljene bazne linije signala. Uobičajeno je da prag određuje sam softver PCR instrumenta i njegove vrednosti su takve da je za tu vrednost moguće razlikovati signal amplifikacije od šuma. Vrednost praga je desetostruka standardna devijacija za fluorescenciju bazne linije.

$C_T$  (engl. *Threshold Cycle*) je broj ciklusa nakon kojeg vrednosti fluorescentnog signala reakcije pređu prag.  $C_T$  se koristi za izračunavanje inicijalnog broja kopija DNK, zato što su  $C_T$  vrednosti inverzno proporcionalne polaznoj količini kopija sekvenci od interesa.

Kako se ciklusi odvijaju reakcija se usporava, zbog trošenja komponenti reakcione smeše i proces ulazi u plato fazu (28-40 ciklusa).

Nagib krive tokom log-linearne faze ukazuje na efikasnost amplifikacije (engl. *Amplification Efficiency*, Eff). Eff se računa po formuli:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{nagib})} - 1$$

Efikasnost PCR bi trebala da bude 90-100% ( $-3,6 > \text{nagib} > -3,1$ ).

Za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije vrednosti se normalizuju na nivo ekspresije endogenih kontrola kao što je  $\beta$ -aktin. Interne/endogene kontrole pripadaju *housekeeping* genima i u odnosu na ukupnu RNK su konstantne i procentualno najzastupljenije.

Reakcija qRT-PCR je izvođena u Mastercycler ep realplex2 real-time PCR sistemu (Eppendorf, Nemačka) u 96-komornim pločama (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, SAD). Po komori, volumen od 20  $\mu\text{l}$  reakcione smeše sadržao je, 10  $\mu\text{l}$  uzorka razblaženog u odnosu 1:10, u dejonizovanoj vodi i 10  $\mu\text{l}$  reakcione mešavine (miksa): 8  $\mu\text{l}$  2,5 x RealMasterMix (Hot Start PCR Buffer, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM dNTP miksa; Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 0,16  $\mu\text{l}$  Taq DNA Polymerase (Maxima<sup>®</sup> Hot Start Taq DNA Polymerase; Fermentas, Vilnius, Litvanija), 1  $\mu\text{l}$  Eva Green (Biotium, Inc., Hayward, CA, SAD), i 1  $\mu\text{l}$  parova prajmera („forward“ i „reverse“) za iNOS (Metabion, Martinsried, Nemačka) ili za  $\beta$ -aktin (Sigma Aldrich Corporation, SAD). Finalne koncentracije prajmera „forward“ ( $5' \rightarrow 3'$ ) i „reverse“ ( $3' \rightarrow 5'$ ) bile su respektivno: za iNOS 900 nM i 100 nM i za  $\beta$ -aktin 100 nM oba. Ploča je prelepljivana optičkim adhezivnim filmom (MicroAmp Optical, Applied Biosystems,

Carlsbad, SAD) i centrifugirana minut na 3000 g, a zatim smeštana u qRT-PCR aparat. Temperaturni profil reakcije u qRT-PCR aparatu bio je: 4 minuta na 95 °C, zatim 40 ciklusa u trajanju od po 15 sekundi na 95 °C i po minut na 62 °C. Zatim su podešavani uslovi za izvođenje krive topljenja PCR produkta, koja se radi u cilju određivanja specifičnosti i identiteta PCR produkta: 15 sekundi na 95 °C, 15 sekundi na 60°C, 20 minuta temperaturnog rasta ( $\delta$ ), te 15 sekundi na 95 °C. Esej je rađen u duplikatu.

Prajmeri za amplifikaciju sekvence gena za iNOS i  $\beta$ -aktin prikazani su u **Tabela 4-1** (Sudar sa sar., 2011).

Gen pacova	„PRAJMERI“		Gen Bank accession number	Dužina PCR produkata (u bp)
	Forward	Reverse		
iNOS	Forward	5'-AGAAGTCCA GCC GCA CCA C-3'	NM_012611	103
	Reverse	5'-TGG TTG CCT GGG AAA ATC C-3'		
$\beta$ -aktin	Forward	5'-CCCTGGCTCCTAGCA CCA-3	NM_031144	76
	Reverse	5'-GAG CCA CCA ATC CACACA GA-3		

**Tabela 4-1. Prajmeri za amplifikaciju sekvence gena za iNOS i  $\beta$ -aktin**

Na kraju svake reakcije amplifikacije beležena fluorescencija je korišćena za izračunavanje relativne ekspresije gena pomoću softvera koji koristi sam aparat. Rn je nivo fluorescencije koji proizilazi iz odnosa nivoa fluoroscencije koju emituje reporter i fluorescencije koju emituje pasivna boja.  $\Delta Rn$  je vrednost Rn umanjena za vrednost bazne linije. Odnos između  $\Delta Rn$  i broja ciklusa daju krivu amplifikacije i vrednosti za  $C_T$ . Relativnom kvantifikacijom izabrani kontrolni uzorak se koristi kao kalibrator. Odnos normalizovane vrednosti ciljne sekvence i vrednosti normalizovanog kalibratora daju vrednosti za relativnu ekspresiju gena (Pfaffl, 2001).

Komparativnom  $C_T$  metodom ( $\Delta\Delta C_T$ ) određuje se relativna kvantifikacija ekspresije ciljnog gena u odnosu na ekspresiju referentne kontrole. Kao kalibrator izabran je jedan uzorak iz kontrolne grupe koji je bio najpribližniji srednjoj vrednosti svih uzoraka kontrolne grupe. Nivo ekspresije analiziranih gena normalizovan je u odnosu na nivo ekspresije gena za  $\beta$ -aktin kao referentnog gena, detektovanog u identičnom uzorku.

Konačan rezultat, relativna ekspresija ciljnih iRNK za iNOS, izražavan je u relativnim jedinicama kao N-puta razlika u odnosu na kalibrator (a normalizovan prema referentnom genu) po jednačini:

$$N_{\text{uzorka}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

gde je:  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ uzorka} - \Delta C_T \text{ kalibratora}$

$\Delta C_T \text{ uzorka} = C_T \text{ ciljanog transkripta} - C_T \beta\text{-aktina}$

$\Delta C_T \text{ kalibratora} = C_T \text{ ciljanog transkripta} - C_T \beta\text{-aktina}$

## 4.16. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su izražavani kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (SEM). Značajnost nađenih razlika ispitivanih parametara između eksperimentalnih i kontrolnih grupa određivana je pomoću Student-ovog *t*-testa primenom Excel PC programa ili primenom jednodimenzionalne analize varijanse (engl. "one way ANOVA"). Verovatnoća *p* manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom razlikom.

# 5. Rezultati

## 5.17. Efekti grelina na masu tela i masu jetre kao i razvoj rezistencije na insulin kod normalno hranjenih pacova

### 5.17.1. Efekat grelina na masu tela i masu jetre normalno hranjenih pacova

U svrhu ispitivanja uticaja grelina na promenu telesne mase životinja sve životinje su merene pre početka tretmana grelinom i pred žrtvovanje. Jetre su merene nakon žrtvovanja i podaci dobijeni ovim merenjima, prikazani su u **Tabela 5-1**. Vrednosti su pokazale da primena grelina ne dovodi do statistički značajne promene telesne mase kao i mase izolovane jetre, u grupi koja je tretirana grelinom (G), u poređenju sa kontrolnim, ne-tretiranim životinjama (KONT).



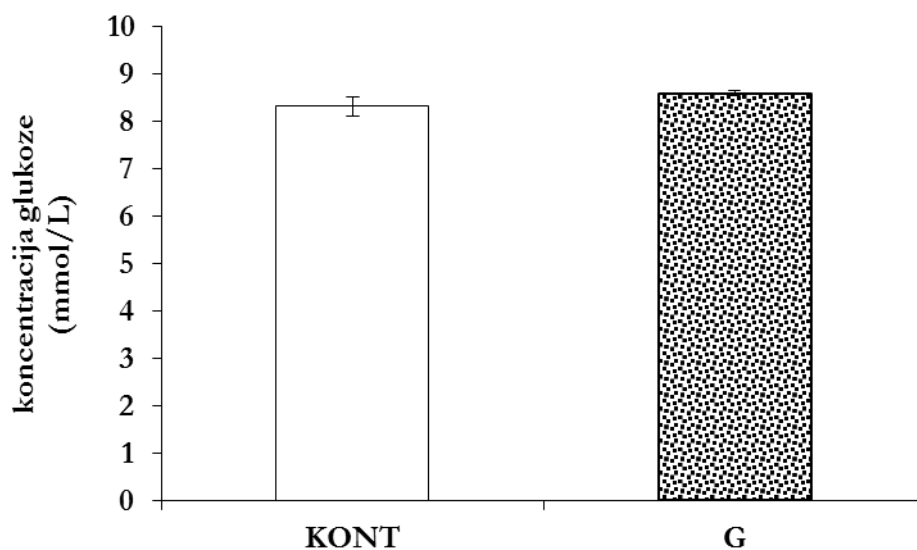
Eksperimentalne grupe	Inicijalna masa tela $\pm$ SEM [g]	Finalna masa tela $\pm$ SEM [g]	Masa jetre $\pm$ SEM [g]
KONTROLA	234 $\pm$ 8	235 $\pm$ 11	9,49 $\pm$ 0,72
GRELIN	215 $\pm$ 8	226 $\pm$ 8	8,85 $\pm$ 0,47

Tabela 5-1. Telesne mase i mase izolovanih jetri kontrolnih, normalno hranjenih (KONT) i grelinom tretiranih (G) životinja; Inicijalna masa - masa tela na početku tretmana i finalna masa - masa tela neposredno pre žrtvovanja. Mase tela i mase izolovanih jetri izražene su u g i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM; (n=6).

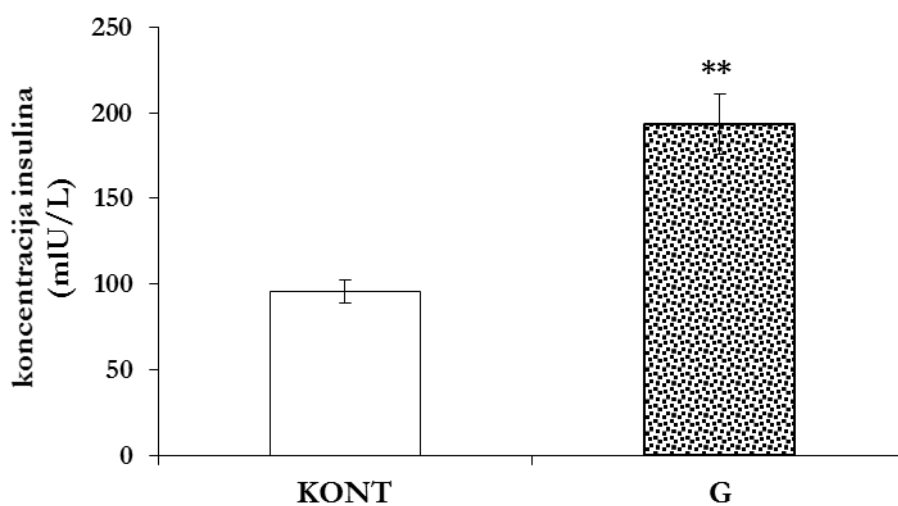
#### 5.17.2. Efekat grelina na koncentraciju glukoze i insulina u serumu normalno hranjenih pacova

Vrednosti dobijene merenjem koncentracija glukoze i insulina u serumu normalno hranjenih kontrolnih (KONT) i životinja tretiranih grelinom (G) prikazane su na **Slici 5-1**. Izmerene koncentracije glukoze( **Slika 5-1.A**), pokazuju da nije došlo da statistički značajne promene kada se uporede dobijene vrednosti između KONT i G grupe (KONT =8,32 $\pm$ 0,20 mmol/l; G=8,56 $\pm$ 0,06 mmol/l). U poređenju sa kontrolnom grupom, koncentracija insulina u cirkulaciji je povećana kod pacova tretiranih grelinom. Koncentracije izmerenog insulina u serumu grelinom tretiranih životinja, veće su za 101% (KONT=95,9 $\pm$ 6,6 mIU/l; G=193,3 $\pm$ 17,7 mIU/l; p<0,01 ), **Slika 5-1.B**.

A)



B)

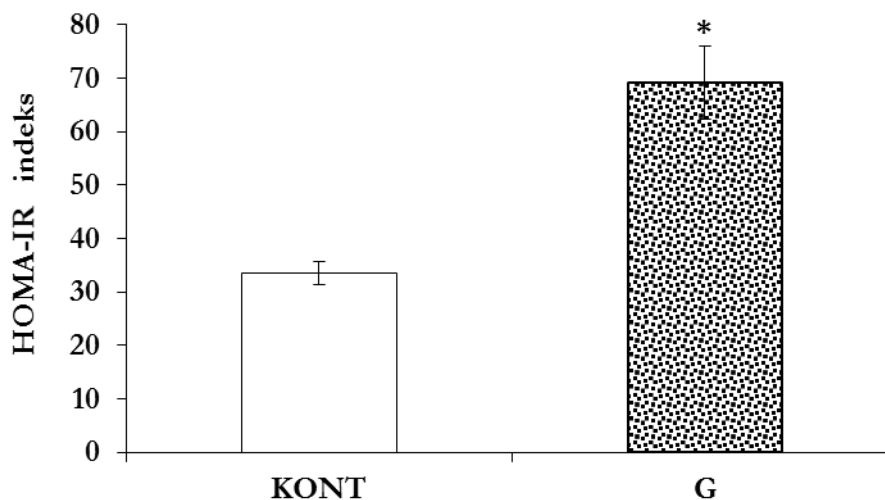


Slika 5-1. Efekti grelina na koncentraciju glukoze (A) i insulina (B). Vrednosti dobijene za koncentraciju glukoze izraženi su u mmol/l, a koncentraciju insulina u mIU/l. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=4-5); \*\*p<0,01.

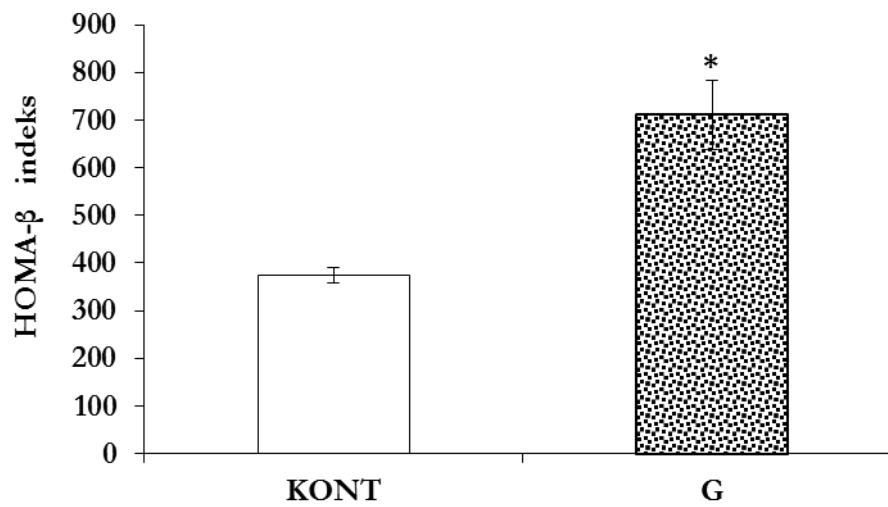
### 5.17.3. Efekti grelina na HOMA-IR i HOMA- $\beta$ indekse kod normalno hranjenih pacova

Kako bi se ispitaio efekat grelina na pojavu IR i njegov uticaj na stepen funkcionalnosti  $\beta$  ćelija pankreasa, za svaku grupu životinja računate su vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA- $\beta$ . Vrednosti prikazane na **Slici 5-2.** izračunavane su prema utvrđenim formulama za ove parametre date u poglavlju Materijal i metode. Na **Slici 5-2. A** prikazane su vrednosti HOMA-IR indeksa i može se uočiti statistički značajno povećanje u iznosu od 107% kod grelinom tretiranih pacova (HOMA-IR: KONT=33,42 $\pm$ 2,20; G=69,15 $\pm$ 6,85;  $p<0,05$ ). Isti trend statistički značajnog povećanja je zapažen i kada se analiziraju dobijene vrednosti za HOMA- $\beta$  indeksa (HOMA- $\beta$ : KONT=375 $\pm$ 16; G=711 $\pm$ 71;  $p<0,05$ ). Povećanje vrednosti HOMA- $\beta$  indeksa od 89% kod životinja tretiranih grelinom u poređenju sa kontrolnim, normalno hranjenim životinjama prikazano je na **Slici 5-2. B.**

A)



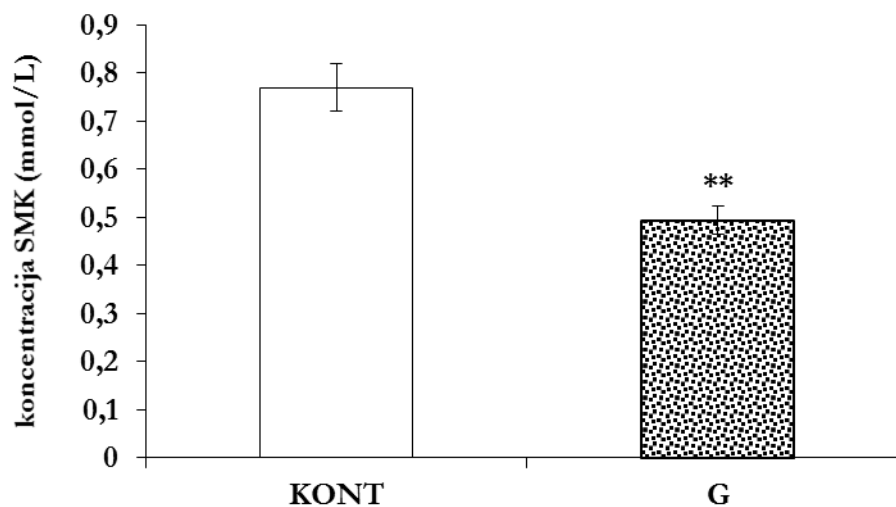
B)



Slika 5-2. Efekti grelina na indeks rezistencije na insulin - HOMA-IR (A) i indeks sekrecije insulina - HOMA-β (B). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=4); \*p<0,05.

#### 5.17.4. Efekat grelina na koncentraciju SMK u serumu normalno hranjenih pacova

Koncentracija SMK merena je u serumu kontrolnih normalno hranjenih i grelinom tretiranih životinja. Grelina dovodi do značajnog smanjenja ( $p < 0,01$ ) koncentracije SMK u cirkulaciji u iznosu od 36% u poređenju sa vrednostima dobijenim za nivo SMK u serumu kontrolnih životinja (KONT= $0,77 \pm 0,05$  mmol/l; G= $0,49 \pm 0,01$  mmol/l) **Slika 5-3.**



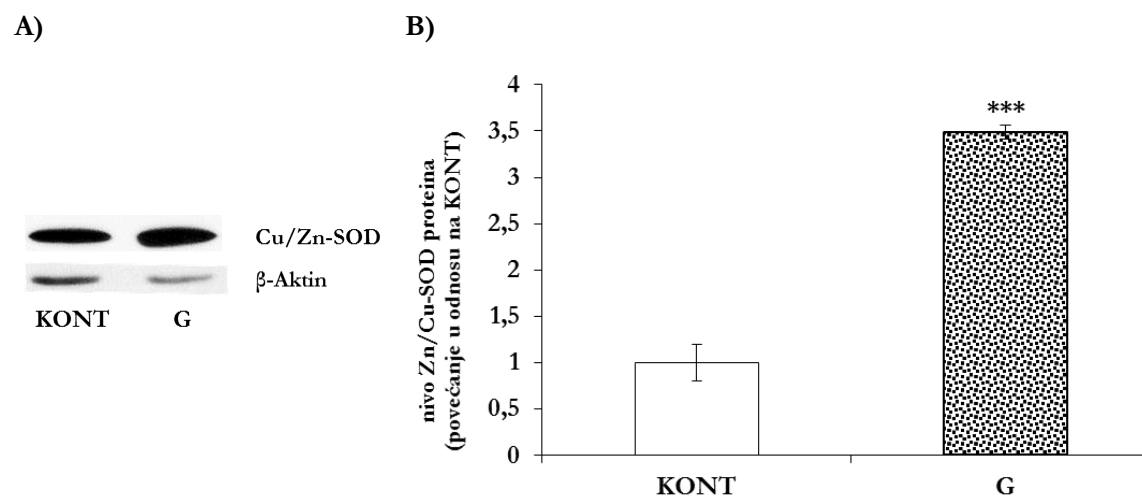
Slika 5-3. Koncentracija SMK u serumu kontrolnih, normalno hranjenih pacova (KONT) i pacova tretiranih grelinom (G). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*p<0,01.

## 5.18. Efekat grelina na nivo proteina enzima antioksidativne zaštite u jetri normalno hranjenih pacova

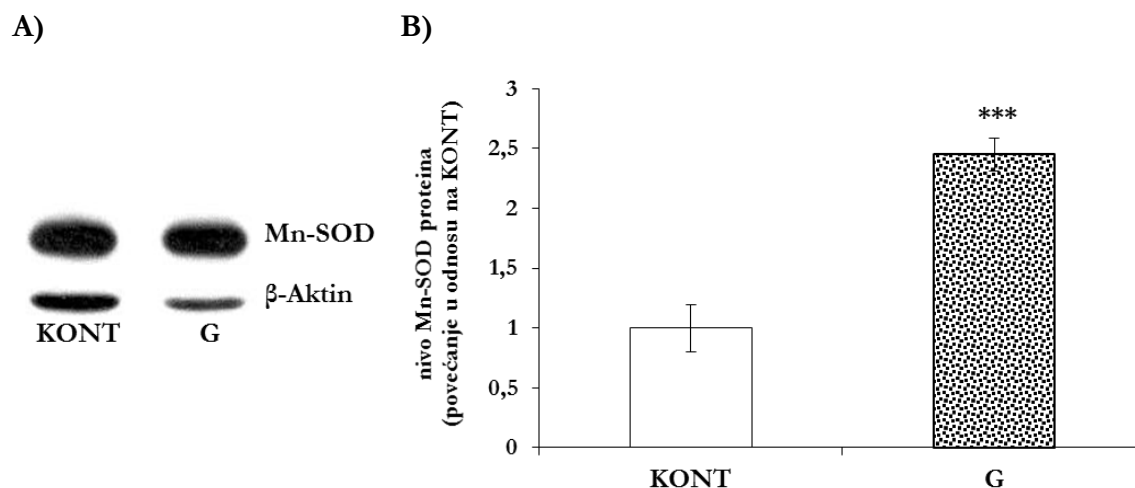
U cilju ispitivanja antioksidativnih svojstava grelina, Western blot metodom u jetri analiziran je uticaj grelina na nivo ekspresije najbitnijih enzima antioksidativne zaštite kao što su: SOD, katalaza, GPx i GR u lizatu jetre, kao i aktivnost SOD i CAT.

Tretman grelina u trajanju od pet dana u jetri je doveo do signifikatnog povećanja nivoa svih ispitivanih enzima antioksidativne zaštite:

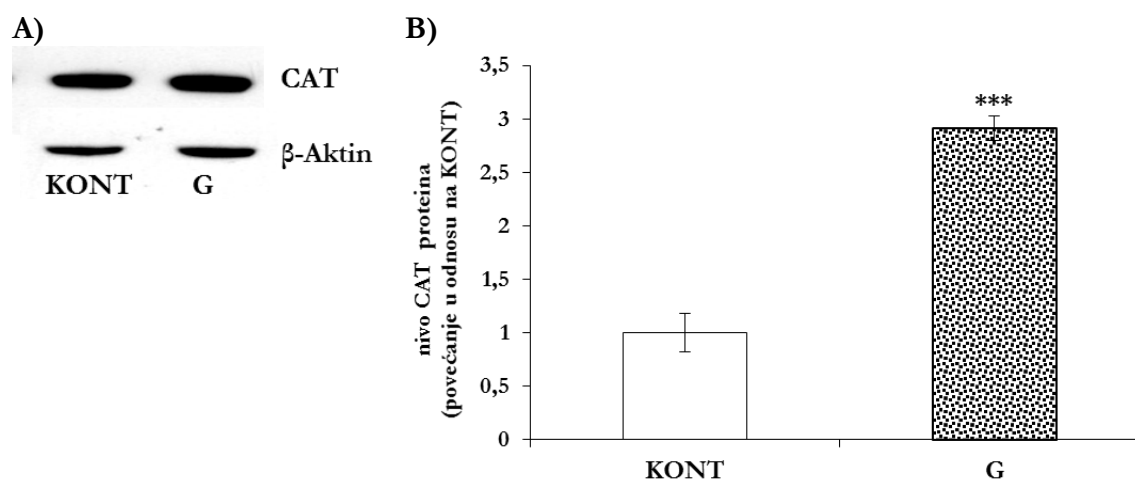
- Cu/Zn-SOD proteina za 249% (KONT=1±0; G=3,49± 0,08), **Slika 5-4**.
- Mn-SOD proteina za 145% (KONT=1±0; G=2,45±0,14), **Slika 5-5**.
- CAT proteina za 190% (KONT=1±0; G=2,9±0,11), **Slika 5-6**.
- GPx proteina za 165% (KONT=1± 0; G=2,65± 0,15), **Slika 5-7**.
- GR proteina za 168% (KONT=1±0; G=2,68± 0,34), **Slika 5-8**.



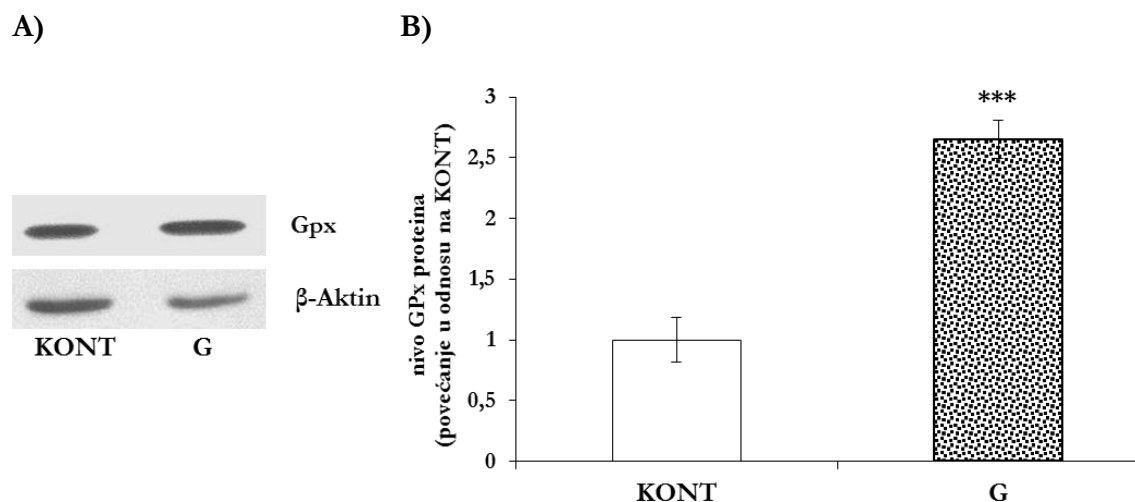
Slika 5-4. Uticaj grelina na nivo Cu/Zn-SOD proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo Cu/Zn-SOD proteina (B). predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=3); \*\*\*p<0,001.



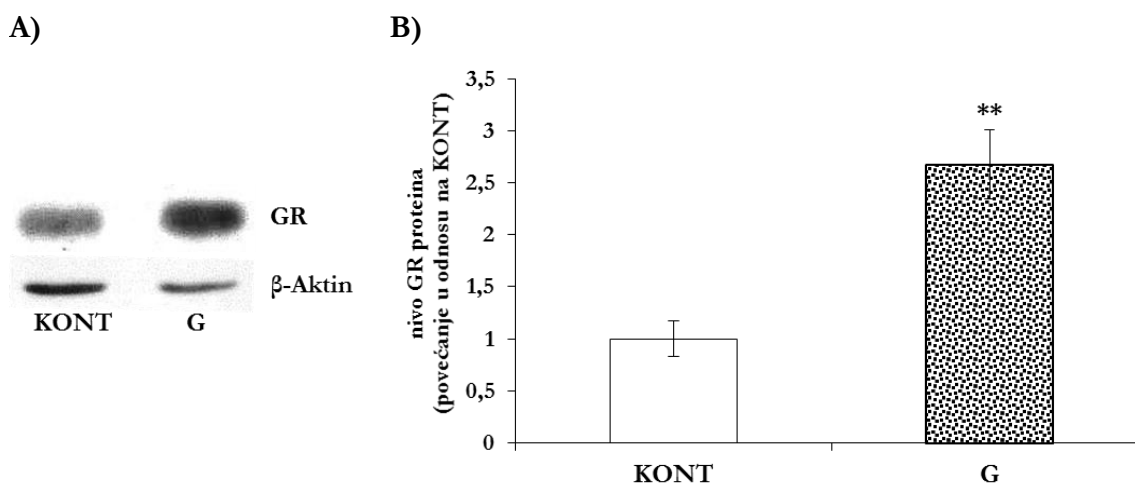
Slika 5-5 Uticaj grelina na nivo Mn-SOD proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo Mn-SOD proteina (B). predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*\*p<0,001.



Slika 5-6. Uticaj grelina na nivo CAT proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo CAT proteina (B). predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=4); \*\*\*p<0,001.



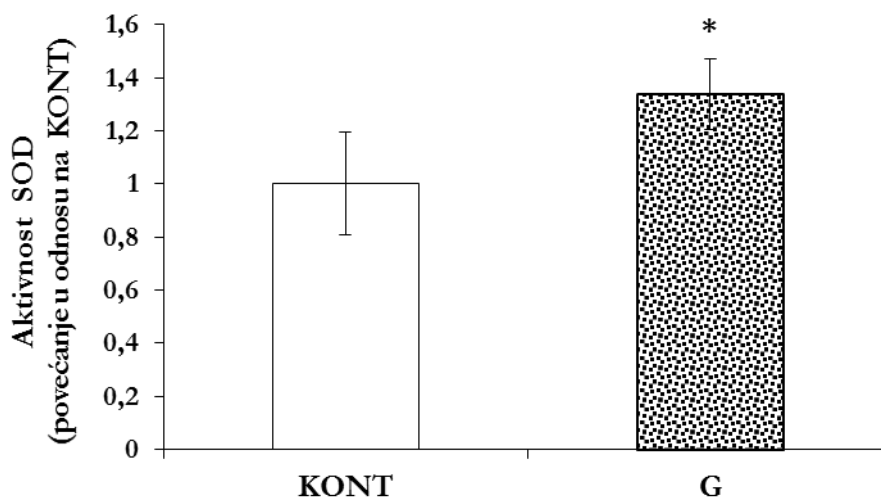
Slika 5-7. Uticaj grelina na nivo GPx proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo GPx proteina (B), predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*\*p<0,001.



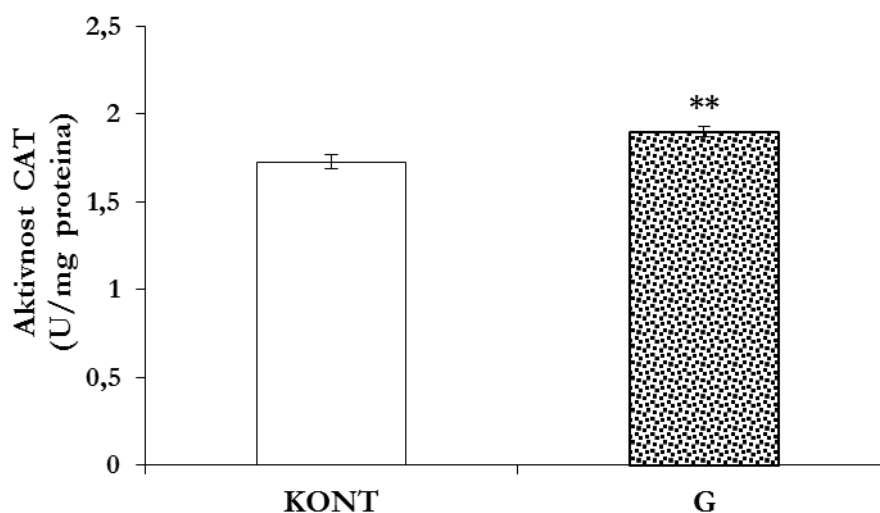
Slika 5-8. Uticaj grelina na nivo GR proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za stepen sinteze GR (B); predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*p<0,01.



Na osnovu izmerenih vrednosti aktivnosti enzima SOD, pokazano je da grelin signifikantno povećava aktivnost SOD enzima za 34% (KONT=1±0; G=1,34±0,13;  $p<0,05$ ), **Slika 5-9**. Takođe, grelin dovodi do malog ali statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT za 10% (KONT=1,73±0,04 U/mg protein; G=1,9±0,03 U/mg protein;  $p<0,01$ ) u poređenju sa izmerenim vrednostima aktivnosti enzima u grupi kontrolnih životinja. **Slika 5-10**.



**Slika 5-9.** Uticaj grelina na aktivnost enzima SOD. Rezultati dobijeni za aktivnost SOD predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=6); \* $p<0,05$ .

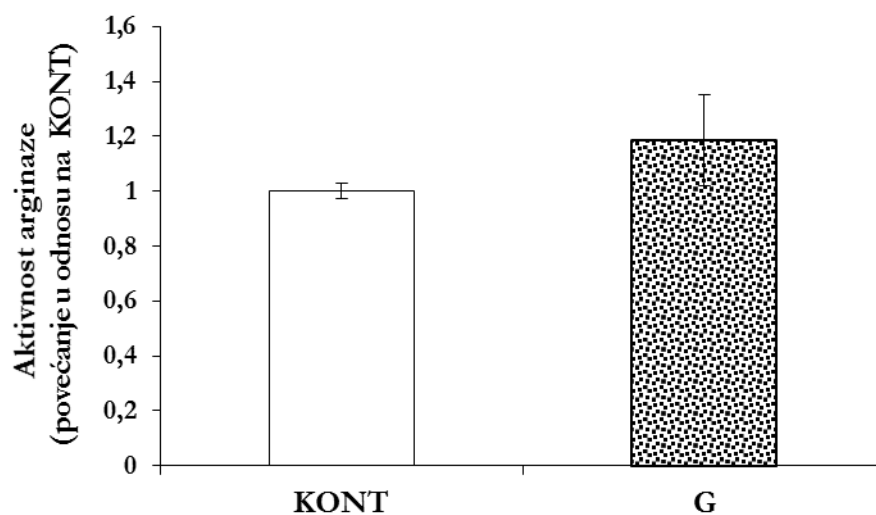


**Slika 5-10.** Uticaj grelina na aktivnost enzima CAT. Rezultati dobijeni za aktivnost CAT izraženi su u U/mg proteina i predstavljeni su kao aritmetičku srednju vrednost ± SEM (n=4-6), \*\* $p<0,01$ .

## 5.19. Efekat grelina na regulaciju ekspresije i aktivnost iNOS u jetri normalno hranjenih pacova

### 5.19.1. Efekat grelina na aktivnost enzima arginaze u jetri normalno hranjenih pacova

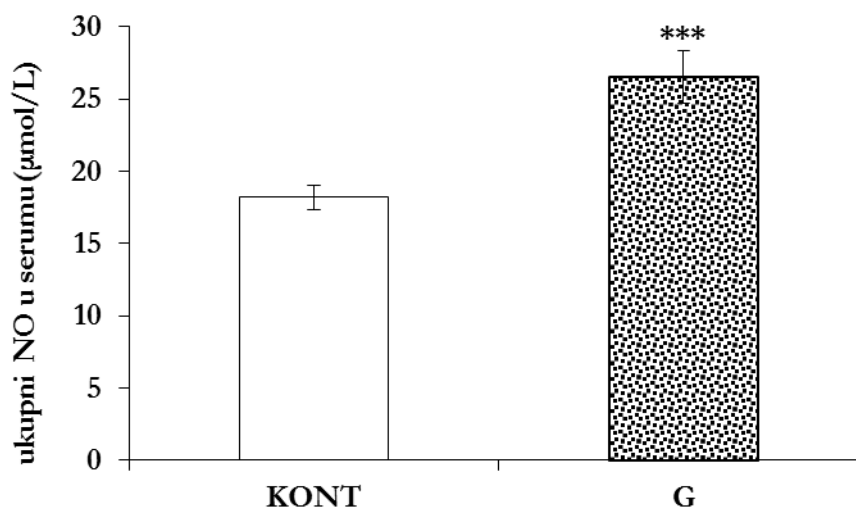
Imajući u vidu da je enzim arginaza u kompeticiji sa enzimom iNOS za isti supstrat, odnosno L-arginin, izučavali smo efekat grelina na aktivnost enzima arginaze. Sa **Slika 5-11**, može se uočiti da ne dolazi do statistički značajnih promena u nivou aktivnosti arginaze pod delovanjem grelina u poređenju sa aktivnošću enzima arginaze izmerene u jetri kontrolnih, normalno hranjenih životinja (KONT=1±0; G=1,19±0,17).



Slika 5-11. Uticaj tretmana grelinom na aktivnost enzima arginaze u lizatu jetre normalno hranjenih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=5).

### 5.19.2. Efekat grelina na aktivnost iNOS u jetri normalno hranjenih pacova

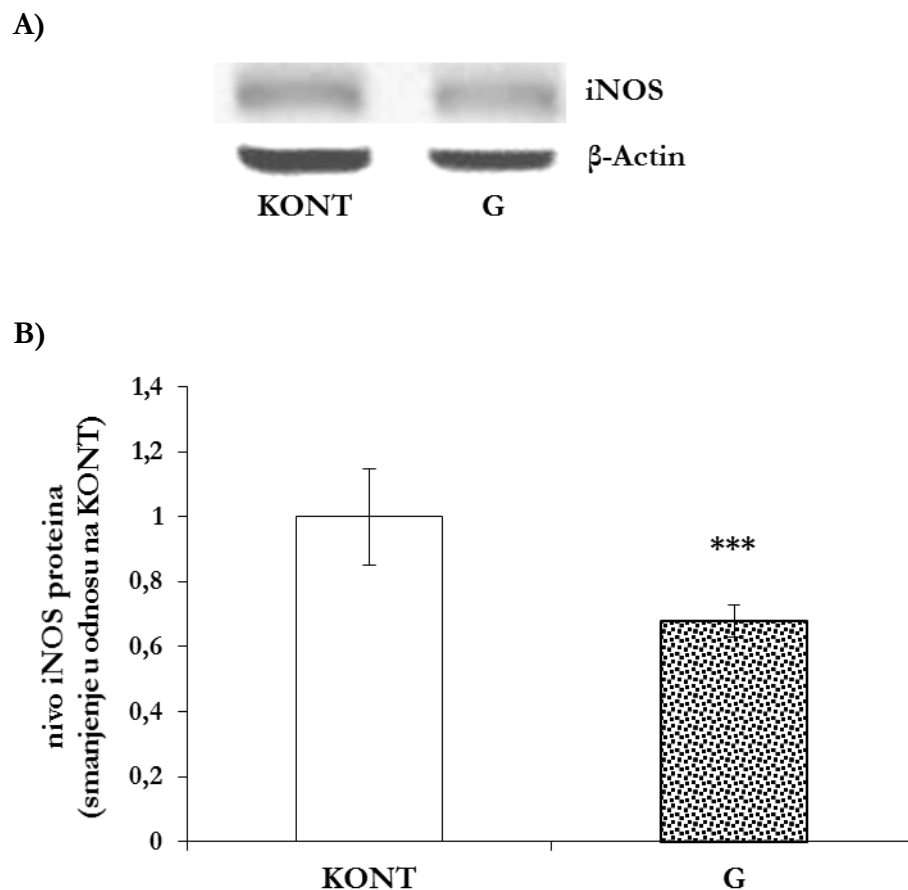
Na **Slici 5-12.** su prikazane vrednosti izmerene koncentracije NO u serumu obe ispitivane grupe životinja. U poređenju sa koncentracijom NO u serumu kontrolnih životinja, kod životinja tretiranih grelinom uočena je za 45% veća koncentraciji NO (KONT=18,2±0,8  $\mu\text{mol/l}$ ; G=26,5±1,8  $\mu\text{mol/l}$ ;  $p<0,001$ ).



**Slika 5-12.** Uticaj grelina na koncentraciju NO u serumu normalno hranjenih pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=9-10) i izraženi su u  $\mu\text{mol/l}$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

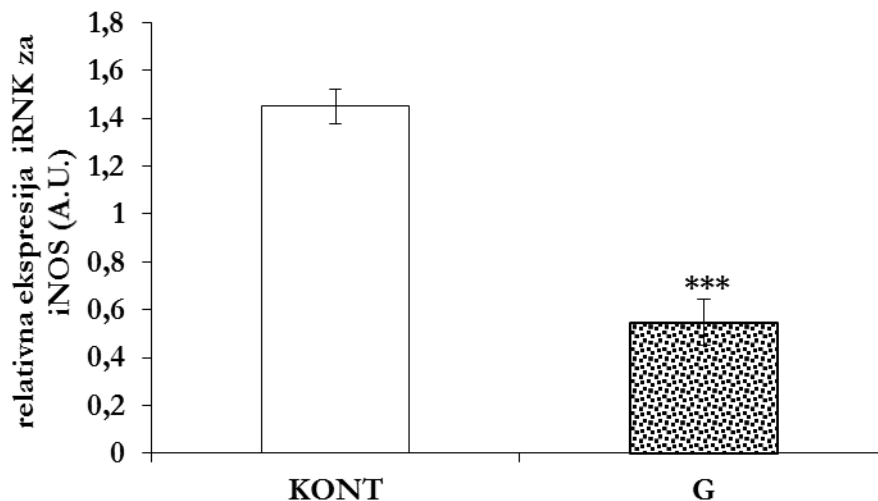
### 5.19.3. Efekat grelina na ekspresiju iNOS u jetri normalno hranjenih pacova

Na **Slici 5-13.** prikazani su rezultati efekta grelina na nivo iNOS proteina u lizatu jetre normalno hranjenih pacova. Dobijeni rezultati pokazuju da injecirani grelin dovodi do povećanja za nivoa iNOS proteina za 32% (KONT=1±0; G=0,68± 0,05, p<0,001).



Slika 5-13. Uticaj grelina na nivo iNOS proteina u lizatu jetre normalno hranjenih pacova; Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo proteina iNOS (B) izraženi su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=4-6); \*\*\* p<0,001.

Rezultati dobijeni merenjem količine iRNK za iNOS, primenom qRT-PCR metode, pokazuju da je u grupi životinja tretiranih grelinom, došlo do statistički značajnog smanjenja ( $p < 0,001$ ) ekspresije gena za iNOS za 64% u poređenju sa kontrolnom grupom (KONT=1,45± 0,072 A.U.; G=0,55± 0,097 A.U.), **Slika 5-14**.

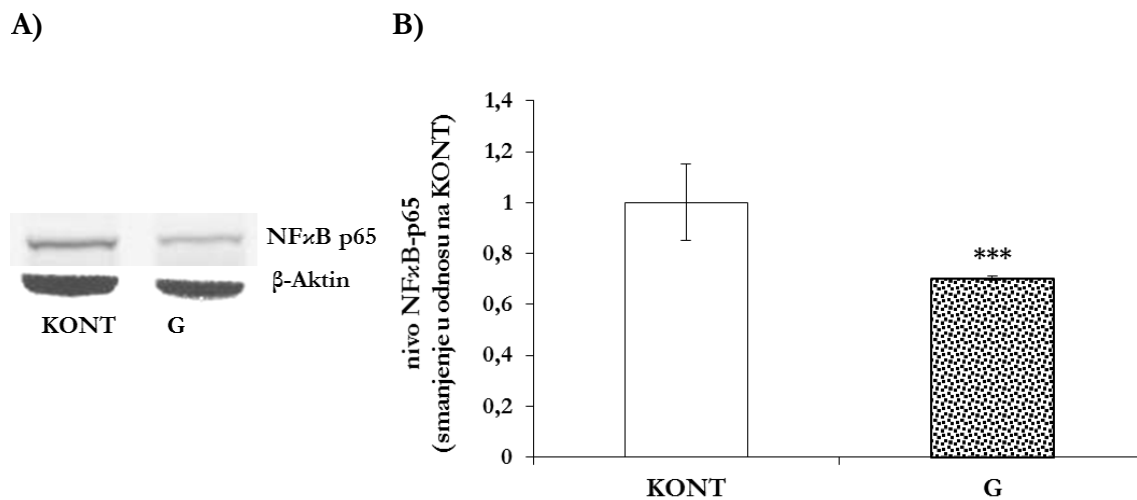


**Slika 5-14.** Uticaj grelina na relativnu ekspresiju gena za iNOS u lizatu jetre normalno hranjenih pacova; Rezultati za relativnu ekspresiju gena za iNOS, su dobijeni primenom qRT-PCR metode, izraženi preko relativne količine iRNK izražene u arbitrarnim jedinicama - A.U. (engl. *arbitrary unit*, A.U.) i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM (n=3-5); \*\*\*  $p < 0,001$ .

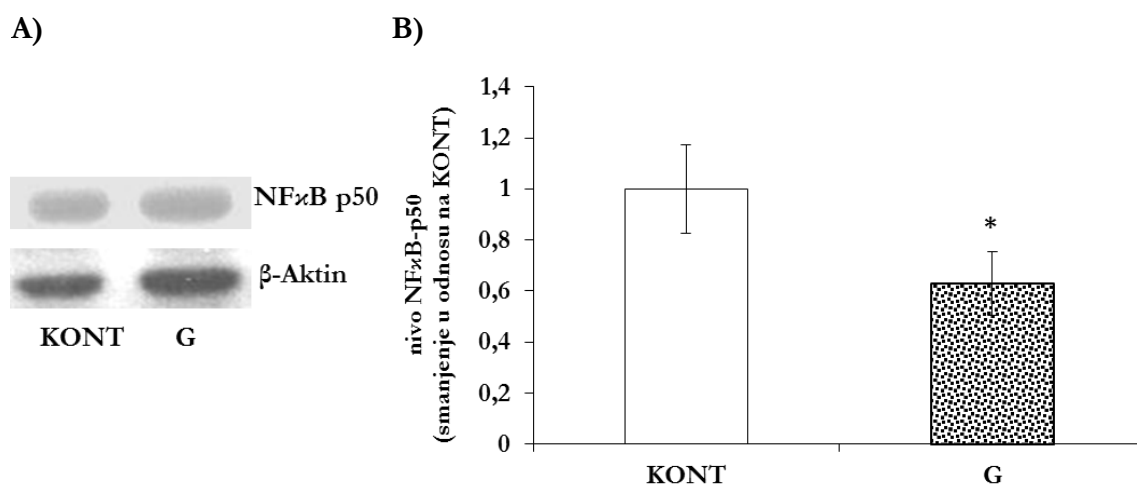
## 5.20. Efekti grelina na nivo transkripcionog faktora NFκB u jetri normalno hranjenih pacova

Poznato je da je u ekspresiji iNOS uključena i aktivacija transkripcionog faktora NFκB (Xu sa sar., 1999; Fattman sa sar., 2003; Hoffmann sa sar., 2006). Stoga je u daljem radu Western blot metodom analiziran nivo proteina za p65 i p50, kao najzastupljenijih subjedinica heterodimernog kompleksa NFκB, u jetri kontrolnih i grelinom tretiranih pacova.

Na **Slici 5-15**, prikazan je efekat injeciranog grelina na nivo subjedinica p65 i p50. Kako se na slici može videti dolazi do smanjenja nivoa p65 subjedinice NFκB, za 30% u poređenju sa kontrolnom grupom (KONT=1±0; G=0,7± 0,009;  $p < 0,001$ ). Takođe je uočeno i smanjenje nivoa p50 subjedinice NF-κB za 40% u odnosu na kontrolu (KONT=1±0; G=0,6± 0,13;  $p < 0,05$ ) što je prikazano na **Slici 5-16**.



Slika 5-15. Uticaj grelina na nivo p65 subjedinice transkripcionog faktora NFκB u lizatu jetre normalno hranjenih pacova; Reprerentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo p65 subjedinice NFκB (B), predstavljani su kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*\*p<0,001.

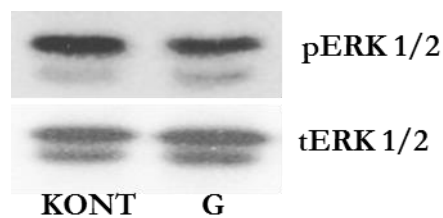


Slika 5-16. Uticaj grelina na nivo p50 subjedinice transkripcionog faktora NFκB u lizatu jetre normalno hranjenih pacova. Reprerentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati nivoa p50 subjedinice NFκB (B), i predstavljani su kao aritmetička srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=4); \*p<0,05.

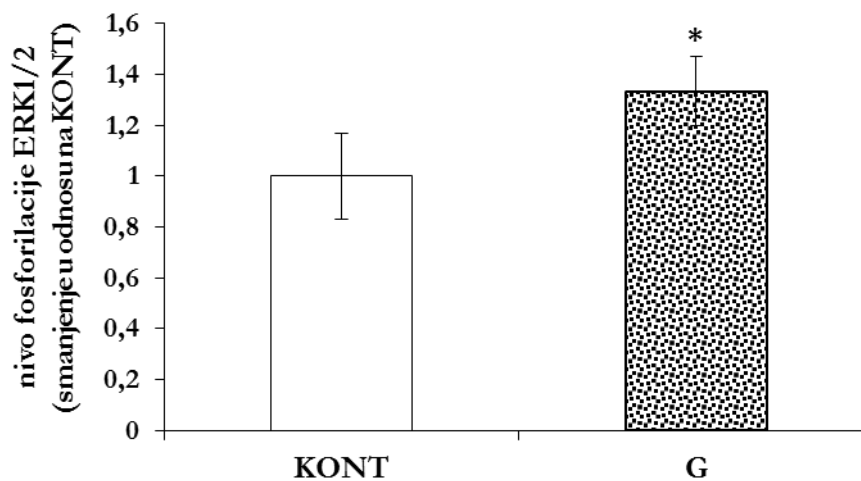
## 5.21. Efekat grelina na aktivaciju ERK1/2 i Akt u jetri normalno hranjenih pacova

Na **Slici 5-17.** prikazan je efekat grelina na nivo fosforilacije ERK1 (p44) i ERK2 (p42) kinaze na aminokiselinama Thr202/Tyr204, koja je neophodna za potpunu aktivaciju enzima. Dobijeni rezultati pokazuju da tretman grelinom je doveo do statistički značajne promene u fosforilaciji ERK1/2 (KONT=1±0; G=1,3± 0,18) u poređenju sa kontrolnom grupom.

A)



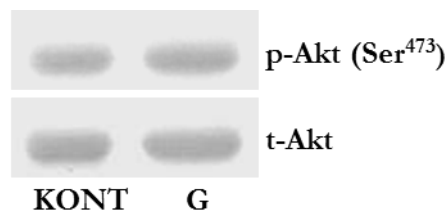
B)



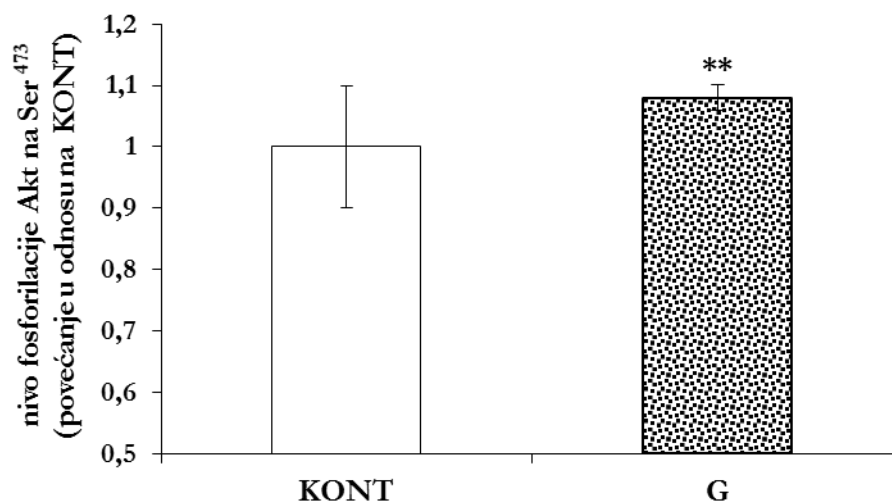
Slika 5-17. Uticaj grelina na fosforilaciju ERK1/2 enzima. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za fosforilaciju ERK1/2 proteina (B), predstavljeni su kao aritmetička srednju vrednost ± SEM (n=3).

Rezultati izučavanja efekata grelina na fosforilaciju Akt kinaze prikazani su na **Slici 5-18**. Dobijeni rezultati pokazuju da je tretman grelinom doveo do malog ali statistički značajnog povećanja u fosforilaciji Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup>, u poređenju sa kontrolnim životinjama (KONT=1±0; G=1,08± 0,02; p<0,01).

A)



B)



Slika 5-18. Uticaj grelina na aktivaciju Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup>. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za fosforilaciju Akt na Ser<sup>473</sup> (B), izraženi kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM (n=6); \*\*p<0,01.



## 5.22. Efekti grelina na masu tela i jetre kao i razvoj rezistencije na insulin kod gojaznih pacova

Prethodno prikazani rezultati ukazali su da grelin svojim delovanjem dovodi do značajnih promena u ekspresiji i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i iNOS u jetri normalno hranjenih pacova. Obzirom da je pokazano da je stanje gojaznosti praćeno povišenim OxS, sledeći korak u našim istraživanjima je imao za cilj da se ispituju efekti grelina kod pacova hranjenih hranom bogatom mastima.

### 5.22.1. Efekti ishrane bogate mastima i grelina na masu tela i jetre pacova

U cilju utvrđivanja uticaja grelina i ishrane bogate mastima na promenu telesne mase, životinje su merene pre početka tretmana grelinom (inicijalna), kao i pred samo žrtvovanje (finalna). Dobijeni podaci su sumirani u **Tabela 5-2**. Povećanje telesne mase za 36% (\*\*p<0,01) zabeleženo je kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj mastima u odnosu na kontrolne životinje. Vrednosti dobijene merenjem telesne mase, pokazale su da grelin injeciran gojaznim životinjama, ne dovodi do povećanja u telesnoj masi u odnosu na ne-tretirane gojazne životinje. Tretman grelinom takođe nije doveo do povećanja mase ispitivanog organa ni u jednoj od tretiranih grupa.

Eksperimentalne Grupe	Inicijalna masa tela $\pm$ SEM [g]	Finalna masa tela $\pm$ SEM [g]	Masa jetre $\pm$ SEM [g]
KONT	234 $\pm$ 8	235 $\pm$ 11	9,49 $\pm$ 0,72
HF	319 $\pm$ 7**	318 $\pm$ 8	10,9 $\pm$ 0,66
HFG	341 $\pm$ 5	340 $\pm$ 3	12,55 $\pm$ 0,42

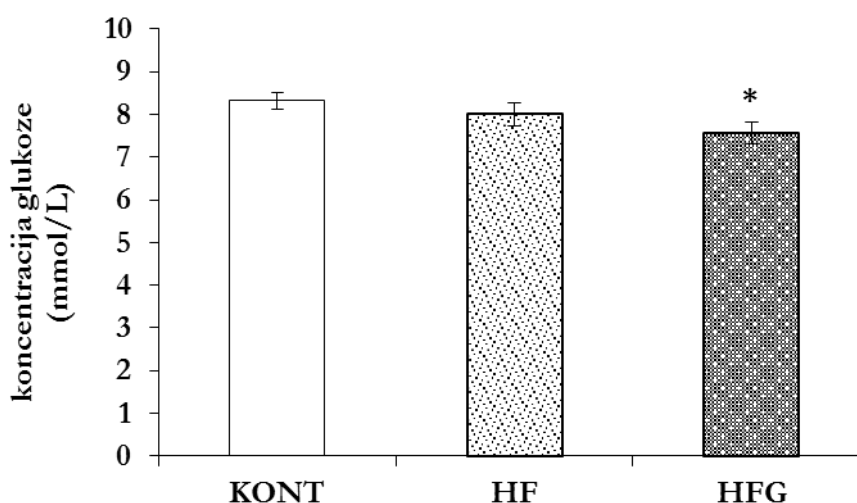
Tabela 5-2. Telesne mase kontrolnih (KONT), gojaznih (HF) i grelinom tretiranih gojaznih životinja i mase izolovanih jetri. Inicijalna masa- masa na početku tretmana; finalna masa- masa neposredno pre žrtvovanja; Rezultati za masu tela i

jetre izraženi su u g i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM. **\*\*p<0,01 HF vs HFG.**

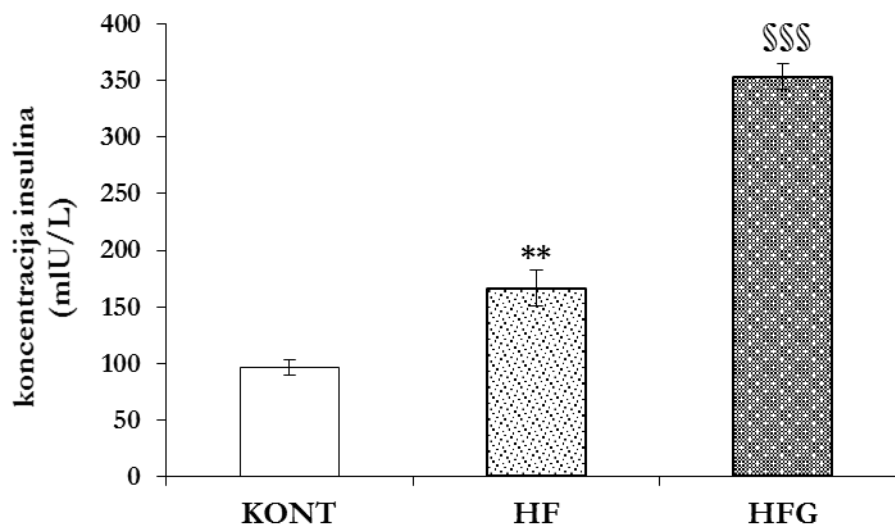
### 5.22.2. Koncentracija glukoze i insulina u serumu ne-tretiranih gojaznih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

Na osnovu dobijenih podataka o koncentraciji glukoze u serumu pacova na ishrani bogatij mastima, zapaženo je da grelin dovodi do signifikantnog smanjenja koncentracije glukoze u poređenju sa izmerenim vrednostima kod kontrolnih životinja (KONT=8,32 $\pm$ 0,20 mmol/l; HFG=7,556  $\pm$ 0,25 mmol/l; p<0,05), dok kod gojaznih ne-tretiranih životinja promene u koncentraciji glukoze nisu statistički značajne (KONT=8,32 $\pm$ 0,20 mlU/l; HF=8,00 $\pm$ 0,26 mlU/l) **Slika 5-19.A.** Izmerene vrednosti koncentracija insulina u serumu pacova ukazuju da primena hrane obogaćene mastima i tretman grelinom dovodi do statistički značajnih promena ovog parametra. Kod HF životinja zabeleženo je povećanje koncentracije insulina za 73% u odnosu na kontrolnu grupu (KONT=96 $\pm$ 7 mlU/l; HF=167 $\pm$ 15 mlU/l; p<0,01). Grelin kod gojaznih životinja, dovodi do signifikantnog povećanja koncentracije insulina za 269% u poređenju sa kontrolnm grupom (KONT=96 $\pm$ 7 mlU/l; HFG=354 $\pm$ 11 mlU/l; p<0,001) i za 117% u poređenju sa HF grupom ne-tretiranih životinja (HF=167 $\pm$ 15 mlU/l; HFG=354 $\pm$ 11 mlU/l; p<0,001) **Slika 5-19.B.**

A)



B)



Slika 5-19. Koncentracija glukoze (A) i nivo insulina (B) kod gojaznih pacova tretiranih grelinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=4-5) i izraženi su u mIU/l. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  - KONT vs HF ; \$\$\$ $p < 0,001$  - HF vs HFG.

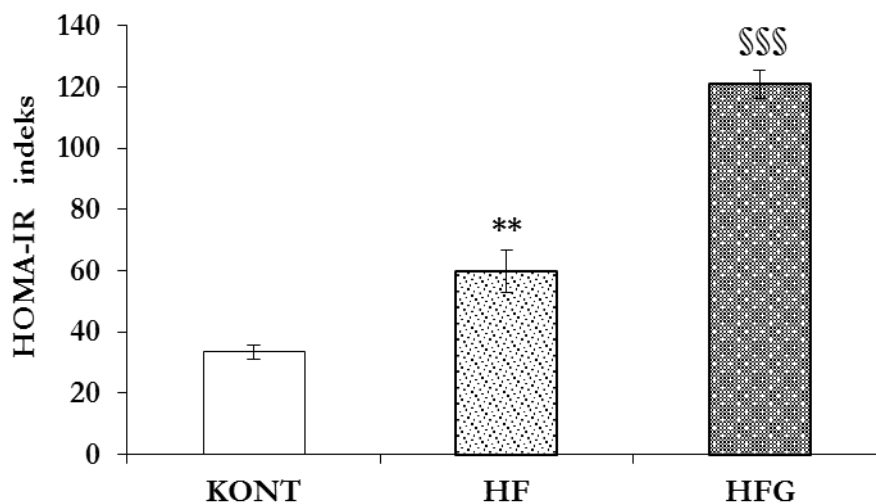
### 5.22.3. Indeksi HOMA-IR i HOMA- $\beta$ kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

Kako bi se potvrdio uticaj grelina na pojavu IR i uticaj na stepen funkcionalnosti  $\beta$  ćelija pankreasa, za svaku eksperimentalnu grupu životinja računane su vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA- $\beta$ . Ishrana bogata mastima i tretman grelinom, i pojedinačno i u kombinaciji, uticali su na pojavu IR i disfunkciju  $\beta$  ćelija pankreasa. Na **Slici 5-20**. prikazane su vrednosti za oba parametra i značajnosti tih promena nakon njihovog poređenja među grupama. Tako su kod HF životinja vrednosti HOMA-IR signifikatno uvećane u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja za 81% (KONT=33 $\pm$ 2; HF=59,67 $\pm$ 6,85;  $p < 0,05$ ), a kod HFG životinja vrednosti HOMA-IR su signifikantno veće za 266% u odnosu na kontrolne, normalno uhranjene životinja (KONT=33 $\pm$ 2; HFG=120,82 $\pm$ 4,8;  $p < 0,001$ ) i za 102% u poređenju sa HF životinjama (HF=59,67 $\pm$ 6,85; HFG=120,82 $\pm$ 4,8;  $p < 0,001$ ).

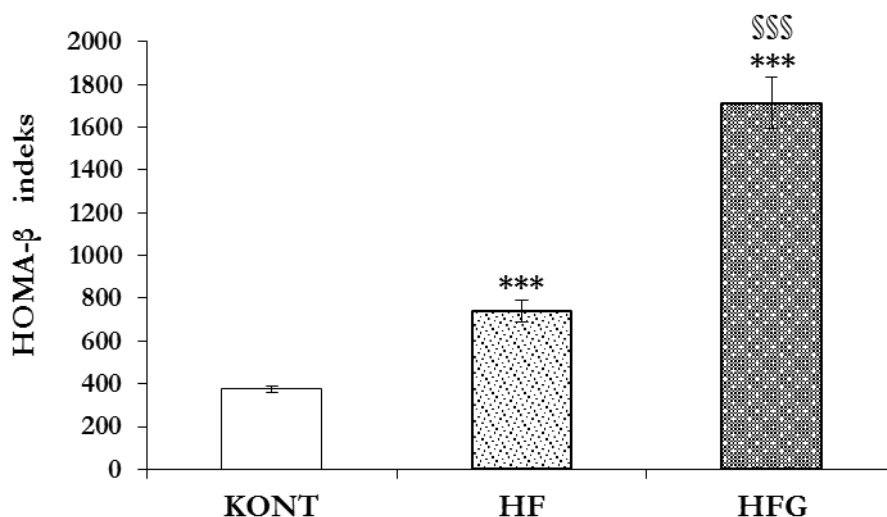
Isti trend promena je prisutan i kada su analizirane izračunate vrednosti za indeks HOMA- $\beta$ . Signifikantno povećanje u iznosu od 97% dobijeno je poređenjem vrednosti HOMA- $\beta$  indeksa između gojaznih i kontrolnih životinja (KONT=375 $\pm$ 16; HF=738  $\pm$ 50;

$p < 0,001$ ). Kod gojaznih, grelinom tretiranih životinja povećanje vrednosti HOMA- $\beta$  indeksa je bilo za 357% u odnosu na vrednosti istog parametra kod normalno hranjenih kontrola (KONT=375 $\pm$ 16; HFG=1712 $\pm$ 120;  $p < 0,001$ ) i za 132% u poređenju sa HF životinjama (HF=738 $\pm$ 50; HFG=1712 $\pm$ 120;  $p < 0,001$ ).

A)



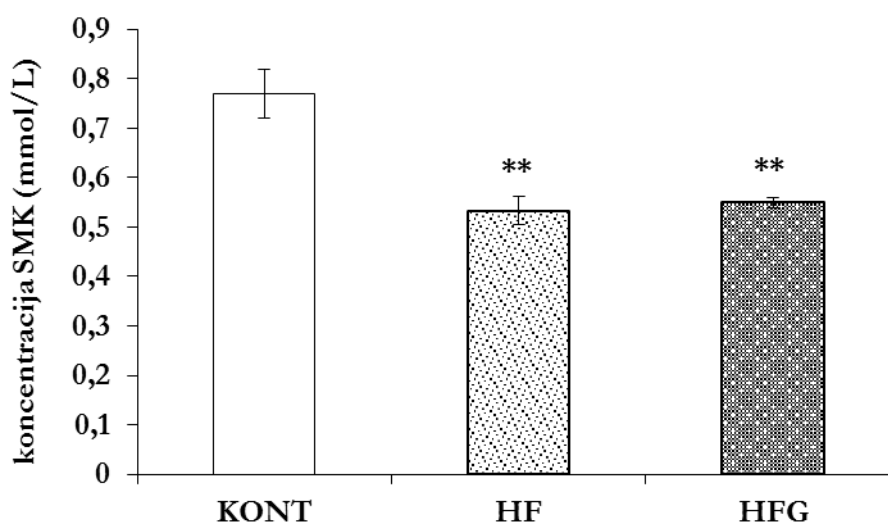
B)



Slika 5-20. Uticaj gojaznosti kao i injeciranog grelina gojaznim životinjama na indekse rezistencije na insulin - HOMA-IR (A) i sekrecije insulina - HOMA- $\beta$  (B). Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  SEM (n=4-5). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  - KONT vs HF, KONT vs HFG; \$\$\$ $p < 0,001$  - HF vs HFG.

#### 5.22.4. Efekat grelina na koncentraciju SMK u serumu gojaznih nretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

Poređenjem vrednosti dobijenih merenjem koncentracije SMK, pokazano je značajno smanjenje koncentracije SMK, za 31% kod HF životinja u odnosu na kontrolu grupu (KONT=0,77±0,05 mmol/l; HF=0,53±0,01 mmol/l; p<0,001). Smanjenje u iznosu od 29% kod HFG životinja u poređenju sa kontrolnim životinjama (KONT=0,77±0,05 mmol/l; HFG=0,55±0,02 mmol/l; p<0,001). Koncentracije SMK kod gojaznih i grelinom tretiranih gojaznih životinja ne pokazuju statistički značajne promene (HF=0,53±0,01 mmol/l; HFG=0,55±0,02 mmol/l) **Slika 5-21**.



Slika 5-21. Koncentracija SMK u serumu gojaznih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=4) i izraženi su u mmol/l. \*\*p<0,01 - KONT vs HF, KONT vs HFG.

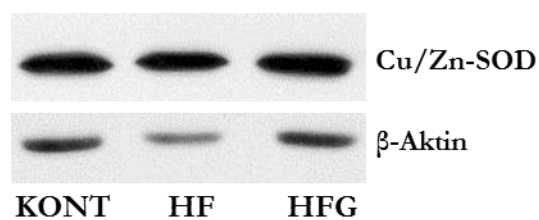
## 5.23. Nivo proteina enzima antioksidativne zaštite kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

U cilju ispitivanja uticaja ishrane bogate mastima i antioksidativnih svojstava grelina u stanjima gojaznosti, Western blot metodom analiziran je nivo proteina enzima antioksidativne zaštite: SOD, CAT, GPx i GR u lizatu jetre, gojaznih životinja ne-tretiranih i tretiranih grelinom.

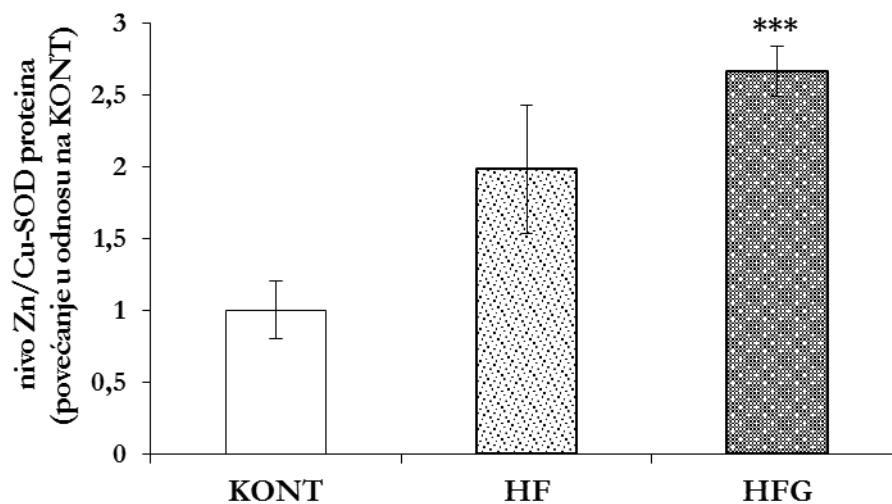
Tretman gojaznih životinja grelinom, u trajanju od pet dana, doveo je do signifikantnih promena nivoa svih ispitivanih enzima.

- Cu/Zn-SOD proteina za 166% (KONT=1±0; HFG=2,66±0,17; p<0,001), **Slika 5-22.**
- Mn-SOD proteina za 13% (KONT=1±0; HF=0,87±0,03; p<0,01), za 47% (KONT=1±0; HFG=1,47± 0,15; p<0,05), za 69% (HF=0,87±0,03; HFG=1,47± 0,15; p<0,01). **Slika 5-23.**
- CAT proteina za 170% (KONT=1±0; HFG=2,7±0,35; p<0,05), za 100% (HF=1,35±0,24; HFG=2,7± 0,35; p<0,05) **Slika 24.**
- GPx proteina za 48% (KONT=1±0; HFG=1,48± 0,15; p<0,05), za 78% (HF=0,83± 0,009; HFG=1,48± 0,15; p<0,05), za 27% (KONT=1±0; HF=0,83±0,009; p<0,001) **Slika 5-25.**
- Grelina i ishrana bogata mastima nisu dovele do signifikantnih promena kada je analiziran nivo GR proteina (KONT=1±0; HF=1,03±0,21), (KONT=1±0; HFG=1,17±0,2); (HF=1,03± 0,21; HFG=1,17± 0,2), **Slika 5-26.**

A)

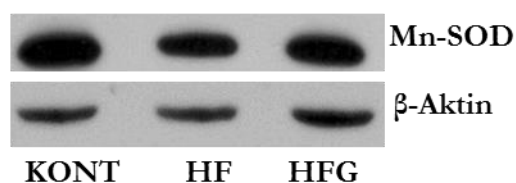


B)

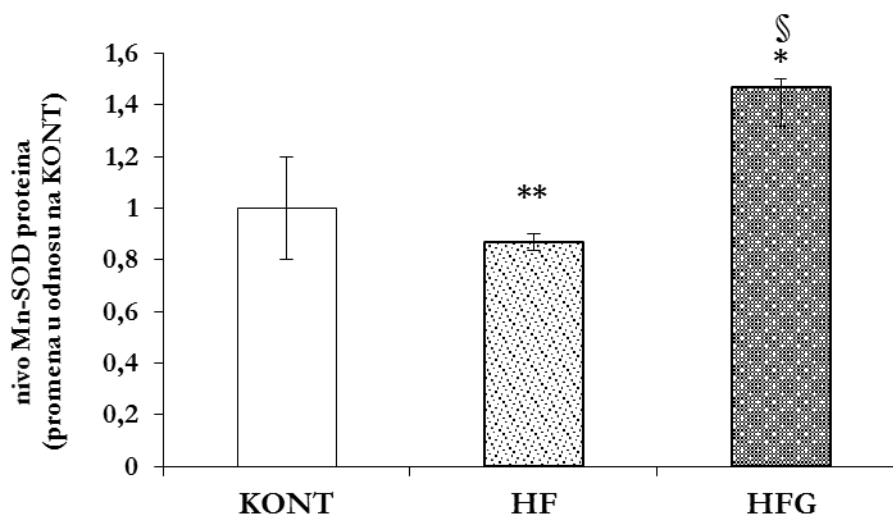


Slika 5-22. Uticaj grelina i ishrane bogate mastima na nivo Cu/Zn-SOD proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo Cu/Zn-SOD enzima (B) izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*\*p<0,001 - KONT vs HFG

A)

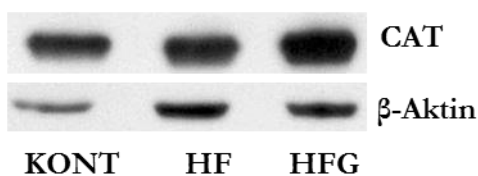


B)

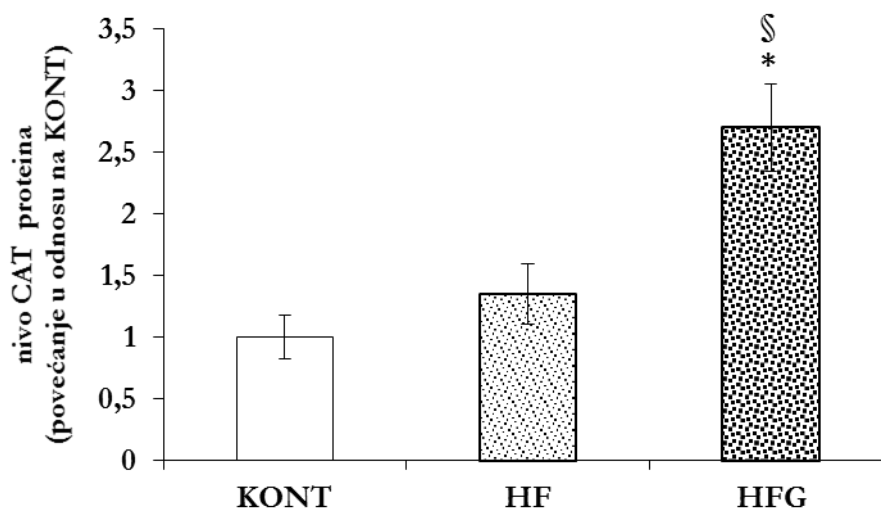


Slika 5-23. Uticaj grelina i ishrane bogate mastima na nivo Mn-SOD proteina. Reprerentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za stepen sinteze Mn-SOD (B) izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*p<0,05 - KONT vs HFG, \*\*p<0,01- KONT vs HF; §p<0,05 - HF vs HFG.

A)



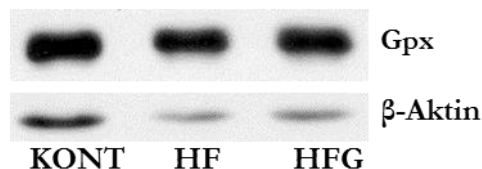
B)



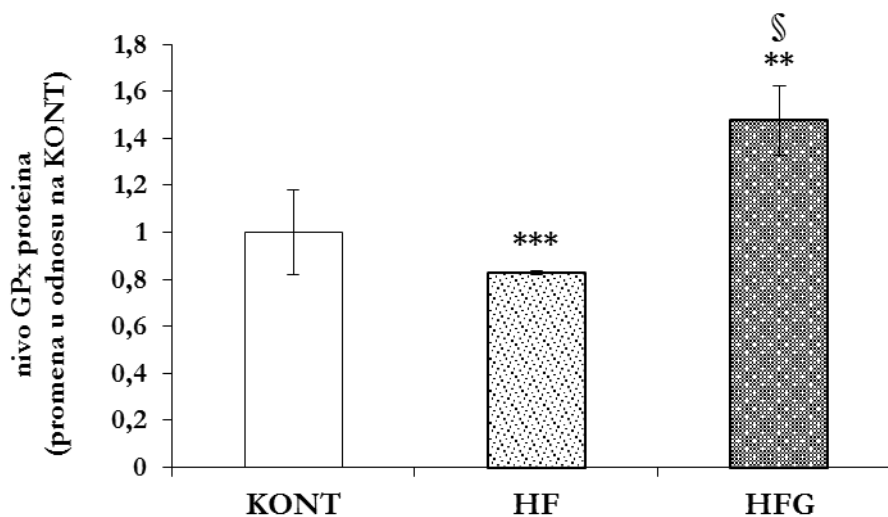


Slika 5-24. Uticaj grelina i HF dijeta na nivo CAT proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo CAT proteina (B) izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3-4); \*p<0,05- KONT vs HFG; §p<0,05 - HF vs HFG.

A)

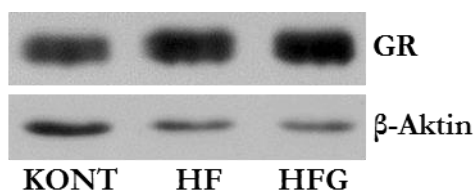


B)

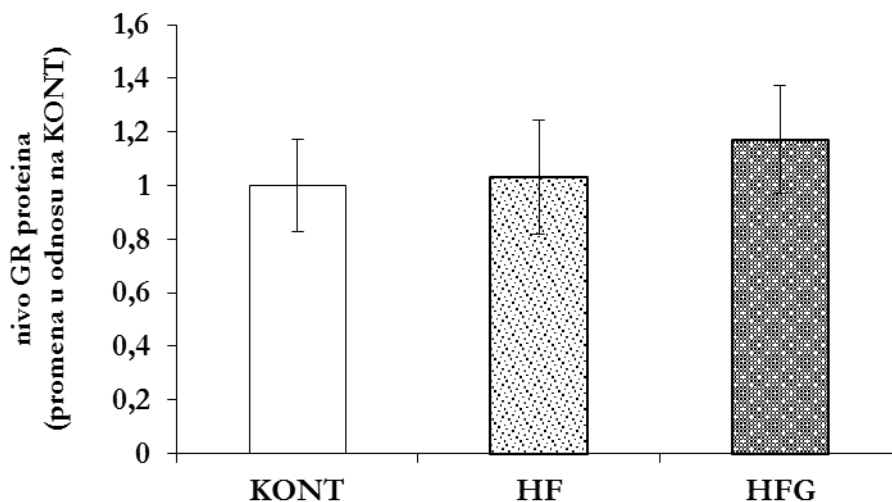


Slika 5-25. Uticaj grelina i HF dijeta na nivo GPx proteina. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za stepen sinteze GPx (B) izraženi su kao promena u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3); \*\*p<0,01 - KONT vs HFG; \*\*\*p<0,001 - KONT vs HF; §p<0,05 - HF vs HFG.

A)

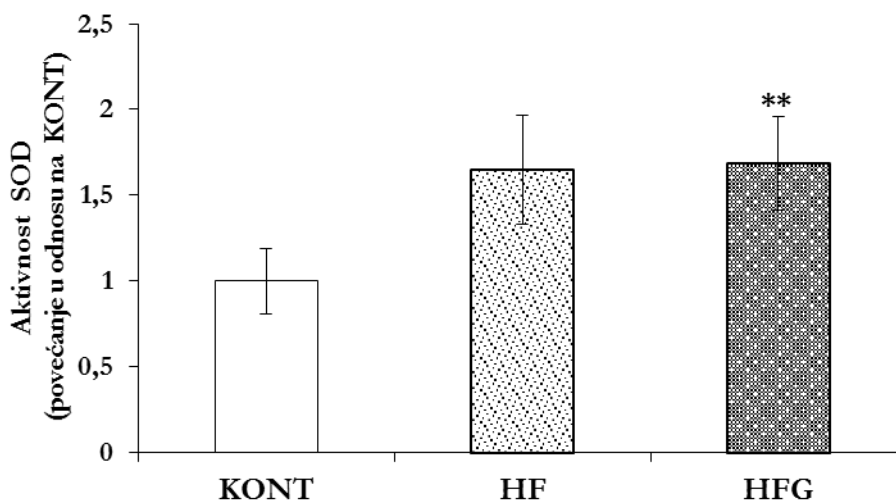


B)



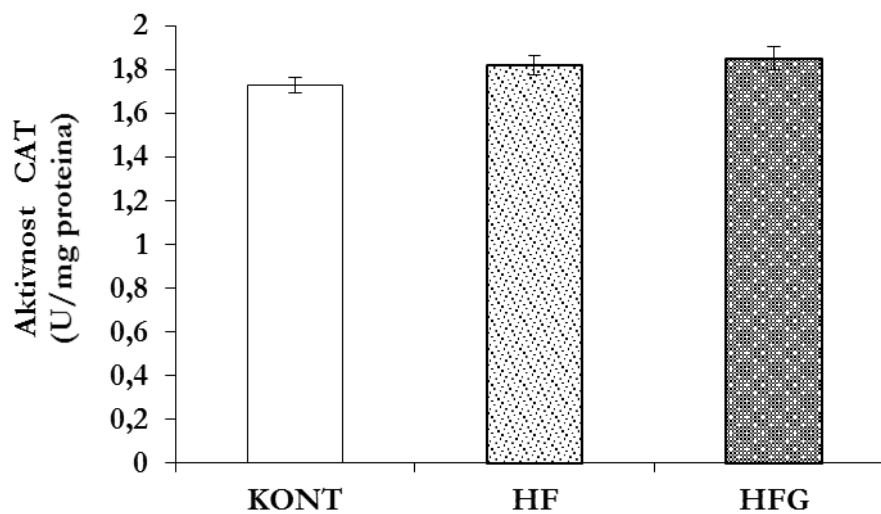
Slika 5-26. Uticaj grelina i HF dijeta na nivo proteina GR. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo proteina GR (B) izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3-4).

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 5-27 uočava se signifikantno povećanje ukupne aktivnosti SOD za 69% u grupi gojaznih životinja tretiranih grelinom (KONT=1 $\pm$ 0; HFG=1,69 $\pm$  0,27; p<0,01) u odnosu na kontrolne životinje. Kod životinja na ishrani bogatoj mastima nije zabeležena značajna promena u aktivnosti SOD (KONT=1 $\pm$ 0; HF=1,65 $\pm$  0,32); (HF=1,65 $\pm$  0,32; HFG=1,69 $\pm$  0,27). Slika 5-27.



**Slika 5-27. Uticaj grelina i HF dijeta na aktivnost enzima SOD. Rezultati dobijeni za aktivnost SOD izraženi su u U/mg proteina i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=6); \*\*p<0,01 - KONT vs HFG.**

Vrednosti izmerene za aktivnost CAT u jetri ne pokazuju značajne promene ni u jednoj od grupa životinja (KONT=1,73 $\pm$ 0,04 U/mg proteina; HF=1,82 $\pm$ 0,04 U/mg proteina), (KONT=1,73 $\pm$ 0,04 U/mg proteina; HFG=1,85 $\pm$ 0,05 U/mg proteina); (HF=1,82 $\pm$  0,04; HFG=1,85 $\pm$ 0,05 U/mg proteina). **Slika 5-28.**

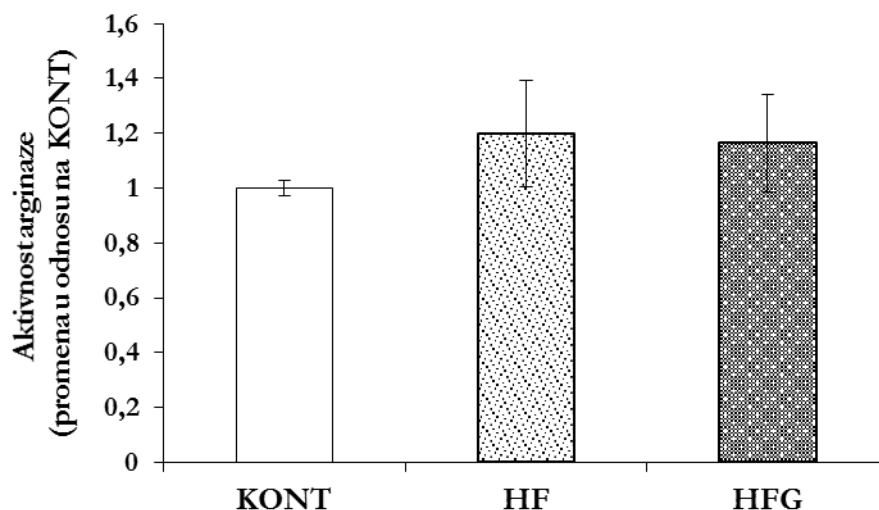


**Slika 5-28. Uticaj grelina i HF dijeta na aktivnost enzima CAT. Rezultati dobijeni za aktivnost CAT izraženi su u U/mg proteina i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=4-6).**

## 5.24. Regulacija aktivnosti i ekspresije iNOS u jetri gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

### 5.24.1. Aktivnost enzima arginaze u jetri ne-tretiranih gojaznih pacova i tretiranih grelinom

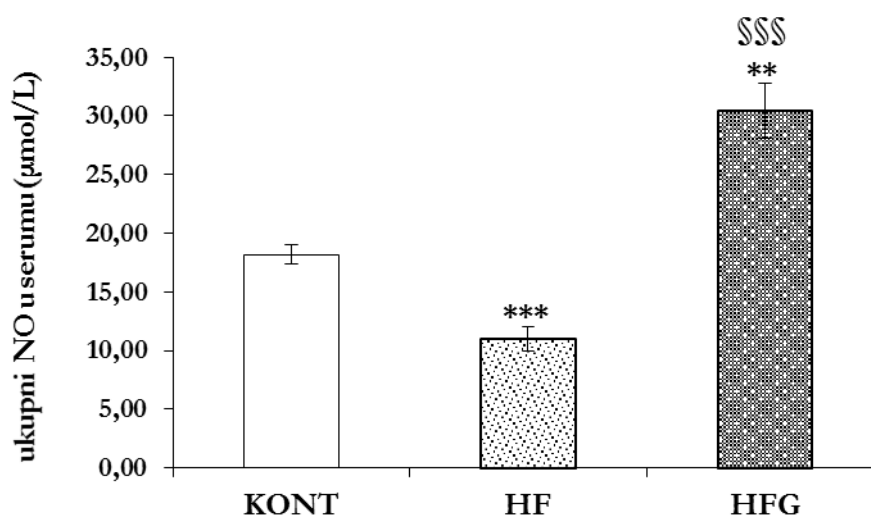
Rezultati prikazani na **Slika 5-29**, jasno ukazuju da nisu zapažene značajne promene u nivou aktivnosti enzima arginaze životinja na HF dijeti u poređenju sa kontrolnim životinjama (KONT=1±0; HF=1,2±0,19). Takođe, u poređenju sa kontrolnom grupom, nije zapažena statistički značajna promena u aktivnosti arginaze kod gojaznih životinja tretiranih grelinom (KONT=1±0; HFG=1,16±0,17).



Slika 5-29. Uticaj tretmana grelinom i ishrane bogate mastima na aktivnost enzima arginaze u homogenatu jetre pacova. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednja  $\pm$  SEM (n=5).

### 5.24.2. Nivo ukupnog NO kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

Na **Slici 5-30.** su prikazane vrednosti izmerene koncentracije NO u serumu ne-tretiranih gojaznih pacova kao i gojaznih pacova tretiranih grelinom. Kod gojaznih životinja uočava se statistički značajno smanjenje koncentracije NO u iznosu od 39% (KONT=18,2±0,8 μmol/l; HF=11,02±1,02 μmol/l; p<0,001) u poređenju sa vrednostima koncentracije NO u kontrolnoj grupi. Grelin injeciran gojaznim životinjama dovodi do statistički značajnog povećanja koncentracije NO u iznosu od 176% (HF=11,02±1,02 μmol//l; HFG=30,45±2,36 μmol//l; p<0,001) u poređenju sa HF životinjama i povećanja u iznosu od 67% u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KONT=18,2±0,8 μmol//l; HFG=30,45±2,36 μmol//l; p<0,001).

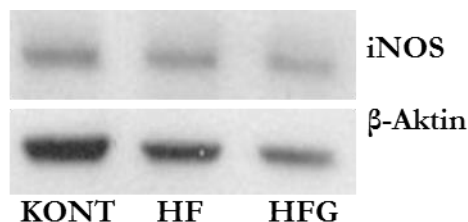


**Slika 5-30.** Uticaj grelina ishrane bogate mastima na koncentracije NO u serumu pacova. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=5-9) i izraženi su u μmol/l. \*\*\*p<0,001 - KONT vs HF, \*\*p<0,01 - KONT vs HFG; \$\$\$p<0,001 - HF vs HFG.

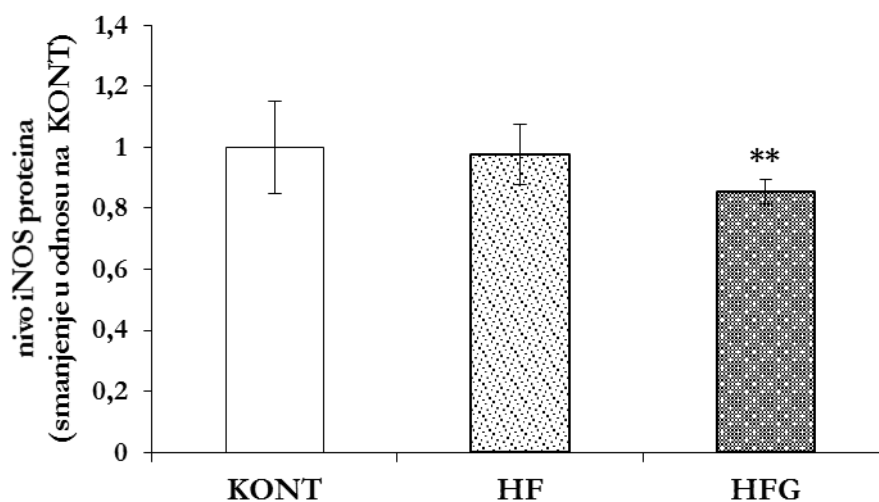
Na **Slici 5-31.** prikazani su rezultati efekta grelina kao i HF dijeta na nivo proteina iNOS u odnosu na nivo iNOS proteina u jetri pacova. Dobijeni rezultati ukazuju da injeciranje grelina gojaznim životinjama dovodi do smanjenja nivoa iNOS proteina u iznosu od 15% u poređenju sa kontrolnom grupom (KONT=1±0; HFG=0,85± 0,04; p<0,01). Značajne promene u nivou iNOS proteina nisu zabeležene kod HF životinja u poređenju sa

kontrolnom grupom (KONT=1±0; HF=0,98± 0,11) kao ni u poređenju HF sa HFG grupom životinja (HF=0,98± 0,1; HFG=0,85± 0,041).

A)



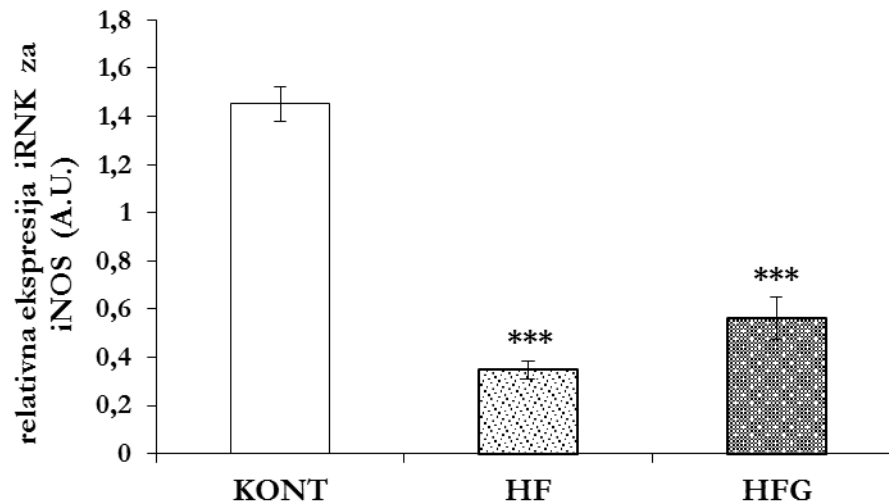
B)



Slika 5-31. Uticaj grelina i ishrane bogate mastima na nivo inducibilne azot-monoksid-sintaze (iNOS). Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo proteina iNOS (B), izraženi su kao smanjenje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3-4); \*\*\*p<0,001 - KONT vs HF.

Merenjem relativne količine iRNK u prikazanih na Slici 5-32. ukazuju da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena za iNOS za 77% u poređenju sa nivoom ekspresije iNOS u kontrolnoj grupi (KONT=1,45± 0,072 A.U.; HF=0,34± 0,036 A.U.; p<0,001). Injeciranje grelina gojaznim životinjama dovodi do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena za iNOS u iznosu od 61% u poređenju sa kontrolnom grupom (KONT=1,45± 0,072 A.U.; HFG=0,56± 0,08 A.U.; p<0,001).

Promene u ekspresiji gena za iNOS u grupi gojaznih životinja tretiranih grelinom nisu statistički značajna u poređenju sa grupom gojaznih životinja (HF= $0,34 \pm 0,036$  A.U.; HFG= $0,56 \pm 0,08$  A.U.).



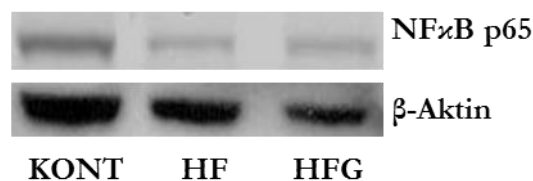
Slika 5-32. Uticaj grelina i Ishrane bogate mastima na relativnu ekspresiju gena za iNOS u lizatu jetre pacova. Rezultati za relativnu ekspresiju gena za iNOS, dobijeni primenom qRT-PCR metode izraženi su preko relativne količine iRNK, i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost A.U  $\pm$  SEM (n=3-4); \*\*\*p<0,001 - KONT vs HF, KONT vs HFG.

## 5.25. Nivo transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B u jetri pacova kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

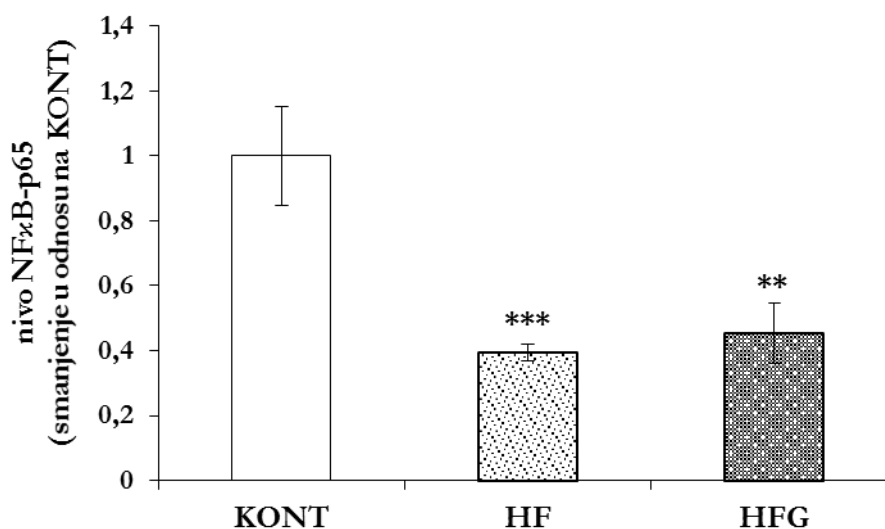
Na **Slici 5-33.** prikazan je nivo proteina p65 subjedinice transkripcionog faktora NF $\kappa$ B. Dobijeni rezultati pokazuju da ishrana bogata mastima dovodi do statistički značajnog smanjenja nivoa p65 subjedinice NF $\kappa$ B za 61% u poređenju sa kontrolnom grupom (KONT=1 $\pm$ 0; HF=0,39 $\pm$  0,02; p<0,001). Tretman grelinom kod gojaznih pacova takođe smanjuje ekspresiju subjedinice p65 za 61% u odnosu na kontrolnu grupu (KONT=1 $\pm$ 0; HFG=0,45 $\pm$ 0,09; p<0,01).

Merenjem nivoa proteina p50 subjedinice transkripcionog faktora NF $\kappa$ B, utvrđene statistički značajne promene kod HF i HFG pacova, u nivou subjedinice p50, kod obe grupe životinja nisu (KONT=1 $\pm$ 0; HF=1,24  $\pm$  0,66); (KONT=1 $\pm$ 0; HFG=1,57  $\pm$  0,85) **Slika 5-34.**

A)



B)

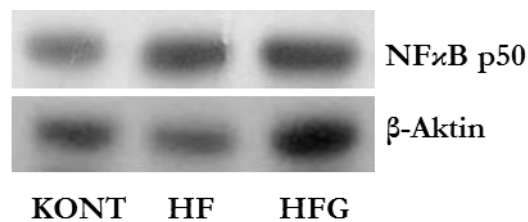


**Slika 5-33.** Uticaj grelina i ishrane bogate mastima na nivo proteina subjedinice p65 transkripcionog faktora NF $\kappa$ B, u lizatu jetre pacova. Reprezentativni

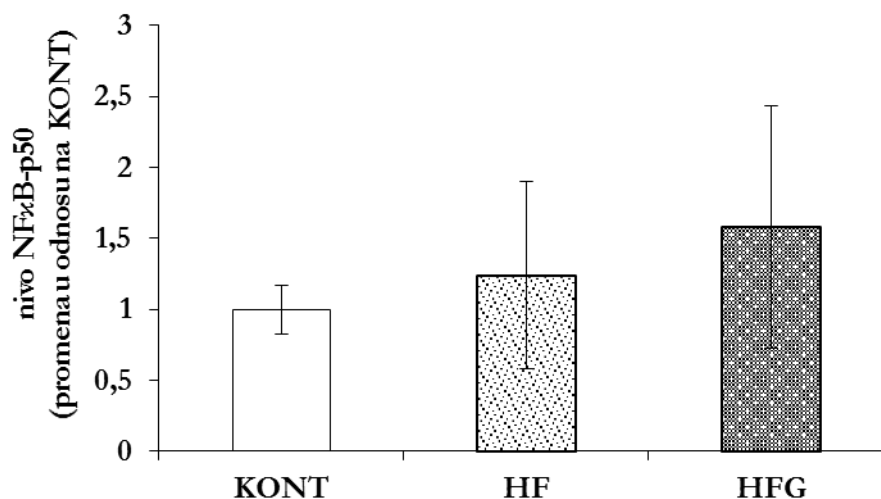


Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo ekspresije proteina subjedinice p65 NF $\kappa$ B (B) i izraženi su kao smanjenje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3-4); \*\*\*p<0,001 – KONT vs HF; \*\*p<0,01 - KONT vs HFG.

A)



B)

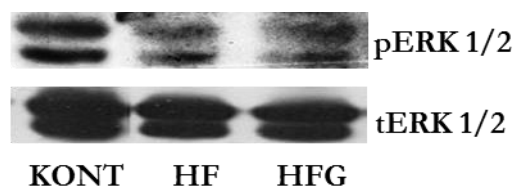


Slika 5-34. Uticaj grelina i ishrane bogate mastima na nivo proteina subjedinice p50 transkripcionog faktora NF $\kappa$ B, u lizatu jetre pacova. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo proteina subjedinice p50 NF $\kappa$ B (B) izraženi su kao smanjenje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost  $\pm$  SEM (n=3-4).

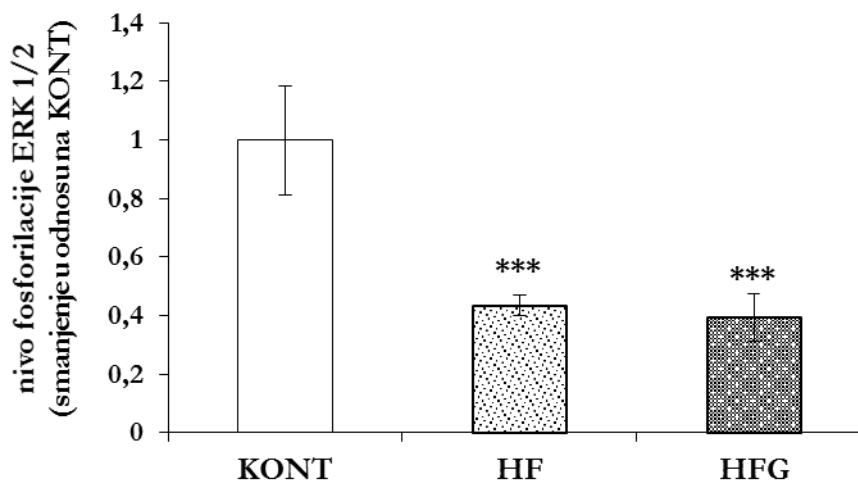
## 5.26. Nivo ERK1/2 i Akt kinaza u jetri pacova kod gojaznih ne-tretiranih pacova i gojaznih pacova tretiranih grelinom

Na **Slici 5-35**, prikazani su rezultati dobijeni merenjem nivoa fosforilacije ERK1 (p44) i ERK2 (p42) kinaze na aminokiselinama Thr202/Tyr204, neophodne za punu aktivaciju ove kinaze. Dobijeni rezultati pokazuju da ishrana bogata mastima i tretman grelinom dovode do statistički značajne promene u fosforilaciji ERK1/2. Kod HF životinja fosforilacija Tyr je iznosila 50 % u odnosu na kontrolnu grupu (KONT=1±0; HF=0,5±0,67; p<0,001), dok je kod gojaznih životinja tretman grelinom smanjio fosforilaciju za 33% u odnosu na kontrolnu grupu (KONT=1±0; HFG=0,67±0,03; p<0,001). Nivoa fosforilacije ERK1/2 kod HF i HFG pacova nije se menjao.

A)



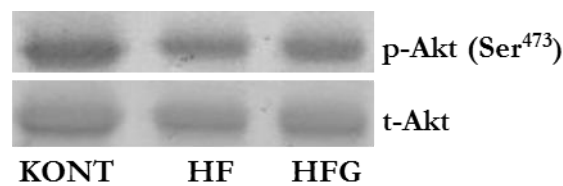
B)



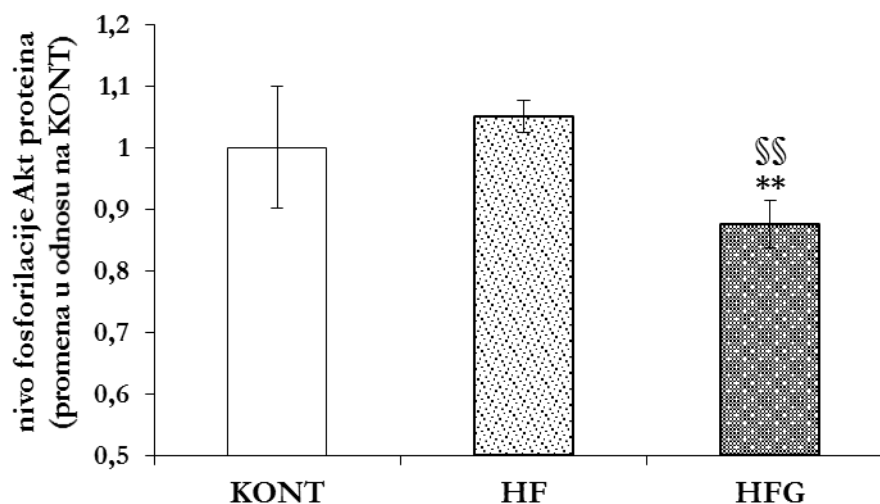
**Slika 5-35**. Uticaj grelina i Ishrane bogate mastima na nivo fosforilacije ERK 1/2 u lizatu jetre pacova. Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo fosforilacije ERK 1/2 (B) izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM (n=3); \*\*\*p<0,001 – KONT vs HF; KONT vs HFG.

Vrednosti dobijene analizom nivoa fosforilacije Akt, Ser/Thr protein kinaze, prikazani su na **Slici 5-36**. Dobijeni rezultati pokazuju da kod životinja na režimu ishrane bogate mastima nije zabeležena statistički značajna promena u fosforilaciji Akt na Ser<sup>473</sup> u poređenju sa kontrolnim životinjama (KONT=1±0; HF=1,05±0,02). Tretman grelinom gojaznih pacova grelinom dovodi do signifikantnog smanjenja u fosforilaciji Akt na Ser<sup>473</sup> kako u odnosu na kontrolu za 12% (KONT=1±0; HFG=0,88± 0,04; p<0,01), tako i u odnosu na HF grupu za 17% (HF=1,05± 0,02; HFG=0,88± 0,04; p<0,01).

A)



B)



**Slika 5-36.** Uticaj grelina i Ishrane bogate mastima na nivo fosforilacije Akt u lizatu jetre pacova; Reprezentativni Western blot (A) i kvantifikovani rezultati za nivo fosforilacije Akt (B), izraženi su kao povećanje u odnosu na KONT i predstavljaju aritmetičku srednju vrednost ± SEM (n=3-4); \*\*p<0,01 – KONT vs HFG; §§p<0,01 - HF vs HFG.

## 6. Diskusija

Ova doktorska disertacija zasnovana je na hipotezi da *ICV* injeciran grelin u jetri kako normalno hranjenih tako i gojaznih pacova, reguliše aktivnost i ekspresiju enzima antioksidativne zaštite i iNOS. Takođe, postavljena je i dodatna hipoteza, da su transkripcioni faktor NF $\kappa$ B kao i kinaze ERK 1/2 i Akt uključeni u regulaciju enzima antioksidativne zaštite i iNOS, u jetri normalno hranjenih pacova kao i u obe grupe gojaznih pacova, ne tretiranih i tretiranih grelinom.

Jetra je izabrana kao ciljni organ izučavanja efekata *ICV* injeciranog grelina na ekspresiju i aktivnost enzima antioksidativne zaštite i iNOS jer ona ima centralnu ulogu u metabolizmu i ujedno je glavni organ za detoksikaciju i eliminaciju štetnih supstanci iz organizma sa najvećim antioksidativnim kapacitetom u telu (Postic sa sar., 2004; Dufour sa sar., 2010). Efikasno funkcionisanje antioksidativnog sistema odbrane u jetri je od ključne važnosti za održavanje celokupnog sistema zaštite organizma. Takođe je važno istaći da je jetra organ koji je uključen u metabolizam ugljenih hidrata, te se stoga pretpostavlja da grelin može imati direktne efekte na metabolizam glukoze, regulišući njeno usvajanje, sintezu i razgradnju (Murata sa sar., 2002; Sangiao-Alvarellos sa sar., 2010).

U eksperimentima su korišćeni pacovi na *ad libitum* ishrani bogatoj mastima, kod kojih je postignuta gojaznost, jer je utvrđeno da ishrana bogata mastima izaziva viscelarnu gojaznost i povećanje telesne mase u animalnim modelima (engl. *diet-induced obesity*, DIO)

(Bray sa sar., 2004). *Ad libitum* ishrana bogata mastima povezana je sa promenama u biohemiji i strukturi kako jetre, tako i celog organizma (Hatori sa sar., 2012). Hatori sa saradnicima je utvrdio da *ad libitum* ishrana bogata mastima kod miševa dovodi do povećanja gojaznosti, intolerancije na glukozu, rezistencije na leptin, inflamacije i patoloških procesa u jetri u odnosu na miševе kojima je hrana obogaćena mastima bila ponuđena u trajanju od 8 sati i kod kojih ne izaziva pomenute poremećaje (Hatori sa sar., 2012). Povećani sadržaj masnoća u ishrani je značajan faktor u razvoju IR (Flanagan sa sar., 2008; Ikehara sa sar., 2008). Takođe je povezan sa povećanom  $\beta$  oksidacijom u mitohondrijama i peroksisomima, „curenjem“ elektrona iz mitohondrijalnog transportnog lanca elektrona, povećanom aktivnošću NADPH oksidaze, ksantin oksidaze i aktivacijom inflamatornih ćelija što je preduslov za pojavu OxS i moguća oštećenja jetre OxS (Lieber sa sar., 2004; Boden sa sar., 2005; Carmiel-Haggai sa sar., 2005; Oben sa sar., 2007; Kim sa sar., 2010; Tuzcu sa sar., 2011; Styskal sa sar., 2012). Gojaznošću izazvana IR može da dovede do razvoja nealkoholne bolesti masne jetre (NAFLD - engl. *nonalcoholic fatty liver disease*) odnosno neka od tri stadijuma ove hronične bolesti: steatoze jetre, nealkoholnog steatohepatitisa i fibroze/ciroze jetre (Carmiel-Haggai sa sar., 2005; Narasimhan sa sar., 2010).

Uticao grelina na apetit otkriven je kao propratni efekat tokom ispitivanja uticaja grelina na oslobađanje GH (Arvat sa sar., 2000). Grelina je hormon koji deluje u pravcu održavanja pozitivnog energetskeg balansa i pojave gojaznosti. On je jedini poznati, periferno cirkulišući hormon, koji stimuliše povećano uzimanje hrane i deponovanje energije delovanjem na hipotalamusne NPY/AgRP koeksprimirajuće neurone (Tschop sa sar., 2000; Nakazato sa sar., 2001b; Wren sa sar., 2001; Theander-Carrillo sa sar., 2006; Stevanovic sa sar., 2012). Sličan efekat se postiže i ishranom bogatom mastima, koja takođe povećava unos i deponovanje kalorija (Perez-Tilve sa sar., 2011). Grelina injeciran *ICV* putem kod pacova intenzivnije stimuliše uzimanje hrane i povećanje telesne mase u odnosu na periferno injeciran grelina (Tschop sa sar., 2000; Wren sa sar., 2001). Takođe je utvrđeno da centralno ili periferno injeciran grelina aktivira gene odgovorne za lipogenezu i povećava količinu lipida u jetri (Barazzoni sa sar., 2005; Sangiao-Alvarellos sa sar., 2009).

Rezultati prikazani u **Tabela 5-1.** i **Tabela 5-2** pokazuju da tretman grelinom, pojedinačno i u kombinaciji sa ishranom bogatom mastima, nije doveo do očekivanog povećanja telesne mase životinja, što je u skladu sa rezultatima pojedinih autora (Stevanovic sa sar., 2006; Sudar, 2011; Dobutović sa sar., 2013). Međutim, pojedini literaturini podaci pokazuju da tretman grelinom dovodi do povećanja telesne mase (Asakawa sa sar., 2001;

Nakazato sa sar., 2001a; Nesic sa sar., 2008; Stevanovic sa sar., 2008). Na osnovu podataka iz **Tabela 5-2** se može uočiti da je ishrana bogata mastima dovela do statistički značajnog povećanja u telesnoj masi. Podaci o koncentraciji cirkulišućeg grelina u stanjima pozitivnog energetske priliva pokazuju da dužina tretmana, kao i makro-nutritivni sastav hrane značajno određuju da li će i do kakve promene doći. Pokazano je da koncentracija cirkulišućeg grelina mogu biti nepromenjene (Votruba sa sar., 2009) ili povećane nakon ishrane bogate mastima (Wadden sa sar., 2012). Međutim u mnogim studijama je utvrđena negativna korelacija između koncentracije grelina i gojaznosti, bilo da je ona postignuta ishranom bogatom mastima (Erdmann sa sar., 2003; Greenman sa sar., 2004) ili egzogeno apliciranim grelinom (Tschop sa sar., 2001; Rosicka sa sar., 2003; Wadden sa sar., 2012). Različiti eksperimentalni pristupi koji uključuju različite metode davanja i doze injeciranog grelina, zatim broj dana na ishrani bogatoj mastima, kao i sastav same hrane i niz drugih parametara mogu biti uzrok neusaglašenosti u dobijenim rezultatima.

Pored potvrđene uloge grelina u povećanju apetita, sve je više dokaza da je uloga grelina u regulaciji metabolizma glukoze bitan aspekt metaboličke uloge grelina. U našim eksperimentima, injeciranje grelina normalno hranjenim životinjama dovodi do povećanja koncentracije insulina u serumu, dok koncentracija glukoze ostaje nepromenjena (**Slika 5-1.**) (Dobutović sa sar., 2013). Rezultati dobijeni merenjem nivoa insulina u serumu gojaznih životinja tretiranih grelinom, prate isti trend povećanja, utvrđen kod normalno hranjenih životinja, pri čemu nije zapažen efekat grelina na nivo glukoze u serumu gojaznih životinja u poređenju sa koncentracijom glukoze kod ne-tretiranih gojaznih životinja (**Slika 5-19.**)

Još uvek ne postoji usaglašeno mišljenje o efektima grelina na sekreciju insulina (Broglia sa sar., 2001; Adeghate sa sar., 2002; Date sa sar., 2002). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima nekih autora (Nesic sa sar., 2008; Stevanovic sa sar., 2008), dok podaci objavljeni od strane Lee i saradnika (Lee sa sar., 2002) pokazuju da nakon *ICV* tretmana grelinom, grelin dovodi do značajnog povećavanja koncentracije insulina, Kamegai i saradnici (Kamegai et al., 2001) u svom radu nisu zapazili značajno povećanje koncentracije insulina. Takođe, pokazano je da intravensko davanje grelina dovodi do inhibicije sekrecije insulina čak i kada je koncentracija glukoze povećana (Broglia sa sar., 2001; Tassone sa sar., 2003).

Mehanizmi kojima grelin utiče na metabolizam glukoze nisu u potpunosti razjašnjeni. Još je nejasno da li grelin svoje efekte ostvaruje direktno ili možda indirektno, preko insulina. S obzirom da su grelin i receptor za grelin detektovani u  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i/ili  $\epsilon$ -ćelijama pankreasa,

pretpostavlja se da se efekat grelina na stimulaciju sekrecije insulina ostvaruje ili parakrino ili endokrino (Date sa sar., 2002; Meyer, 2010). Takođe, zbog na izgled sličnog efekta grelina i GH na metabolizam glukoze (GH ima suprotne efekte od insulina na metabolizam glukoze i lipida) postoje pretpostavke da se efekti grelina ostvaruju GH zavisnim mehanizmima (Nass sa sar., 2010; Delhanty sa sar., 2011). Međutim, postoje i podaci koji ukazuju da grelin, možda deluje i na GH nezavisan način (Meyer, 2010; Delhanty sa sar., 2011).

Vrednosti HOMA indeksa prvenstveno ukazuju na IR u jetri. Rezultati koji se odnose na vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA- $\beta$  (**Slika 5-2. i Slika 5-20.**) pokazuju da su vrednosti oba indeksa statistički značajno povećane u odnosu na kontrolne pacove, što ukazuje da grelin i ishrana bogata mastima utiču na razvoj IR i poremećaj u sekreciji insulina. Kod pacova na ishrani bogatoj mastima povećana sekrecija insulina kompenzuje nastalu IR u jetri i utiče na dalji razvoj periferne IR, mitohondrijalne disfunkcije i gojaznosti kao odgovor na povećani unos kalorija ili povećani energetske priliv (Kraegen sa sar., 1991; Kim sa sar., 2003; Brons sa sar., 2009). Moguće objašnjenje za izostanak karakteristične hiperglikemije kod pacova na ishrani bogatoj mastima, je da se u početnom stadijumu IR, da bi se dostigle fiziološke vrednosti nivoa glukoze,  $\beta$  ćelije pankreasa pojačano luče insulin, a jetra smanjuje uklanjanje insulina iz cirkulacije i na taj način se kompenzuje prisustvo IR (Kim sa sar., 2007). Međutim, nakon perioda kompenzovane IR, iako je koncentracija insulina povećana, transport glukoze je poremećen što je posledica disfunkcije  $\beta$  ćelija pankreasa i njihove nemogućnosti da luče dovoljno insulina (Petersen sa sar., 2002). Iako hiperinsulinemija može da kompenzuje IR u nekim slučajevima biološkog delovanja insulina, ona može dovesti i do prekomernog delovanja insulina u tkivima kao što su jetra, mišići i masno tkivo, koja zadržavaju relativno normalnu senzitivnost na insulin (McFarlane sa sar., 2001). Sve je veći broj podataka koji govore u prilog činjenici da je grelin povezan sa pojavom IR (Wadden sa sar., 2012). Pojedine humane studije ukazuju na negativnu korelaciju između nivoa grelina i pojave IR, ali još nije jasno definisano da li je nizak nivo grelina faktor rizika ili kompenzatorni odgovor (Ikezaki sa sar., 2002; Broglio sa sar., 2003; Katsuki sa sar., 2004; Delhanty sa sar., 2011). Vestergaard i sar. su pokazali da grelin stimuliše razvoj periferne IR kod zdravih muškaraca, a kao razlog navode povišen nivo GH i SMK (Vestergaard sa sar., 2008). U uslovima hiperinsulinemije kod miševa, AG i UAG smanjuju senzitivnost jetre na insulin, dok koadministracija AG i UAG, vraća senzitivnost jetre na insulin u normalu (Heijboer sa sar., 2006). Usled kontraverznih rezultata efekata grelina na IR, smatra se da su dalje istraživanja neophodna kako bi se detaljno izučila uloga grelina u IR. Kod gojaznih

životinja posle tretmana grelinom, vrednosti indeksa HOMA-IR i HOMA- $\beta$  su takođe povećane u poređenju sa vrednostima indeksa kod gojaznih, grelinom ne tretiranih životinja.

S obzirom da grelin nije doveo do očekivanog povećanja telesne mase gojaznih životinja, pretpostavljamo da grelin povećava IR, povećavajući lipolizu i to u odsustvu GH i kortizola (Vestergaard sa sar., 2008). Literaturni podaci jasno pokazuju da su sinteza i sekrecija GH kod gojaznih životinja smanjene (Reil sa sar., 1999; Rahman sa sar., 2006), što dovodi do dodatnog nagomilavanja masti i povećavanja telesne mase (Furuhata sa sar., 2000). Iwakura i sar su pokazali, koristeći nekoliko različitih modela gojaznosti, da tretman gojaznih životinja grelinom dovodi do povećanja odgovora GH što može dovesti do povećanja IR i daljeg pogoršavanja DMT2 združenog sa gojaznošću (Cutfield sa sar., 2000; Iwakura sa sar., 2007; Shrader sa sar., 2011).

Koncentracija SMK u plazmi ima značajnu ulogu u akutnoj regulaciji metabolizma lipida celokupnog organizma, i poznato je da su SMK potentni stimulatori sekrecije insulina (Boden, 2003). Naši rezultati (**Slika 5-21**) pokazuju da grelin injeciran gojaznim pacovima nije doveo do značajnih promena u koncentraciji SMK u poređenju sa vrednostima SMK izmerenim kod kontrolnih gojaznih pacova, dok je kod normalno hranjenih i gojaznih životinja doveo do smanjenja ovih vrednosti (**Slika 5-3, Slika 5-21**) (Dobutović sa sar., 2013). Pojedini literaturni podaci ukazuju da je došlo do smanjenja SMK nakon ishrane bogate mastima, kao rezultat inhibiranja lipolize u masnom tkivu u stanjima „gladovanja“ izazvanih hiperinsulinemijom (Cornier sa sar., 2006). Takođe uzrok smanjenja može biti i povećano preuzimanje SMK u mišićima, koje se verovatno skladište kao intramiocelularni lipidi (Bachmann sa sar., 2001; Schrauwen-Hinderling sa sar., 2005; Kiens, 2006; Bickerton sa sar., 2007; Jain sa sar., 2009). Preliminarni rezultati dobijeni iz eksperimenata u kojima smo masenom spektrometrijom određivali količinu lipida u uzorcima jetre kontrolnih i pacova tretiranih grelinom, ukazuju na viši nivo palmitinske kiseline u jetri životinja tretiranih grelinom, i ovi rezultati se mogu dovesti u vezu sa efektima povećane koncentracije insulina koji dovodi do povećanog transport palmitinske kiseline. Poznato je da visok nivo palmitinske kiseline dovodi do pojave IR usled smanjenog nivoa fosforilacije insulinskog receptora i IRS-1 (Reynoso sa sar., 2003).

Ishrana bogata mastima je povezana sa promenama u strukturi i biohemiji jetre, kao i povećanjem rizika od nastanka hroničnih bolesti jetre (Tuzcu sa sar., 2011). Mnoge od ovih promena uslovljene su povišenim nivoom ROS, koje između ostalog dovodi do lipidne peroksidacije, povećanja aktivnosti NADPH oksidaze kao i posledičnog oštećenja



biomolekula (Beltowski sa sar., 2000; Feillet-Coudray sa sar., 2009; Amirkhizi sa sar., 2010). Prethodna *in vitro* istraživanja su pokazala da grelin ima antinflatatorne i antioksidativne efekte (Suematsu sa sar., 2005; Dembinski sa sar., 2006; Zwirska-Korczala sa sar., 2007; Iseri sa sar., 2008; Obay sa sar., 2008; Xu sa sar., 2008; Hedayati sa sar., 2009; Hou sa sar., 2009b; Huang sa sar., 2009; Liu sa sar., 2010; Cetin sa sar., 2011; Suzuki sa sar., 2011). Barazzoni i saradnici su pokazali da grelin injeciran pacovima na ishrani bogatoj mastima, izaziva antiinflatatorne efekte u mišićima (Barazzoni sa sar., 2011). *In vivo* efekti grelina na stimulaciju ekspresije antioksidativnih enzima u jetri, nisu ispitivani do sada i molekularni mehanizmi kojim grelin ostvaruje svoje efekte na enzime antioksidativnog odbrane još uvek nisu razjašnjeni. Naši rezultati pokazuju da grelin ostvaruje svoje antioksidativne efekte, jer povećava nivo proteina antioksidativnih enzima u jetri.

Injeciranje grelina intarevnski ili *ICV* kod pacova, dovodi do oslobađanja GH (Kojima sa sar., 1999; Date sa sar., 2000; Wren sa sar., 2000). Jedna od uloga endogenog grelina je da utiče na već uspostavljeni obrazac sekrecije GH, postignut delovanjem hipotalamusnih hormona: GH oslobađajućeg hormona, (GHRH; engl. GH-releasing hormone) i somatostatina (Castañeda sa sar., 2010). Efekat grelina na sekreciju GH, u *in vitro* ili *in vivo* uslovima zavisi od primenjene doze grelina (Kojima sa sar., 2005). Čak i niske doze *ICV* injeciranog sekretagoga GH, kao što je grelin, dovode do promena u aktivnosti hipofize (Tolle sa sar., 2002; Stevanovic sa sar., 2006) što za posledicu ima povećanje hiperglikemije i hiperinulinemije, a ovi efekti se pripisuju povećanoj sekreciji GH (Chapman sa sar., 1996a; Chapman sa sar., 1996b; Clark sa sar., 1997; Muller sa sar., 2001; Takano sa sar., 2001). GH ispoljava akutne i hronične efekte na metabolizam ugljenih hidrata i lipida (Davidson, 1987). Akutni efekti pokazuju insulinu slične efekte, smanjuju nivo glukoze i povećavaju njen transport, stimulišu preuzimanje glukoze od strane mišića i lipogenezu u adipocitima. Ovi efekti su prolazni, nakon nekoliko časova dominiraju anti-insulinski efekti: povećanje nivoa glukoze, IR i lipolize i inhibicije transporta glukoze (Davidson, 1987; Sangiao-Alvarellos sa sar., 2010).

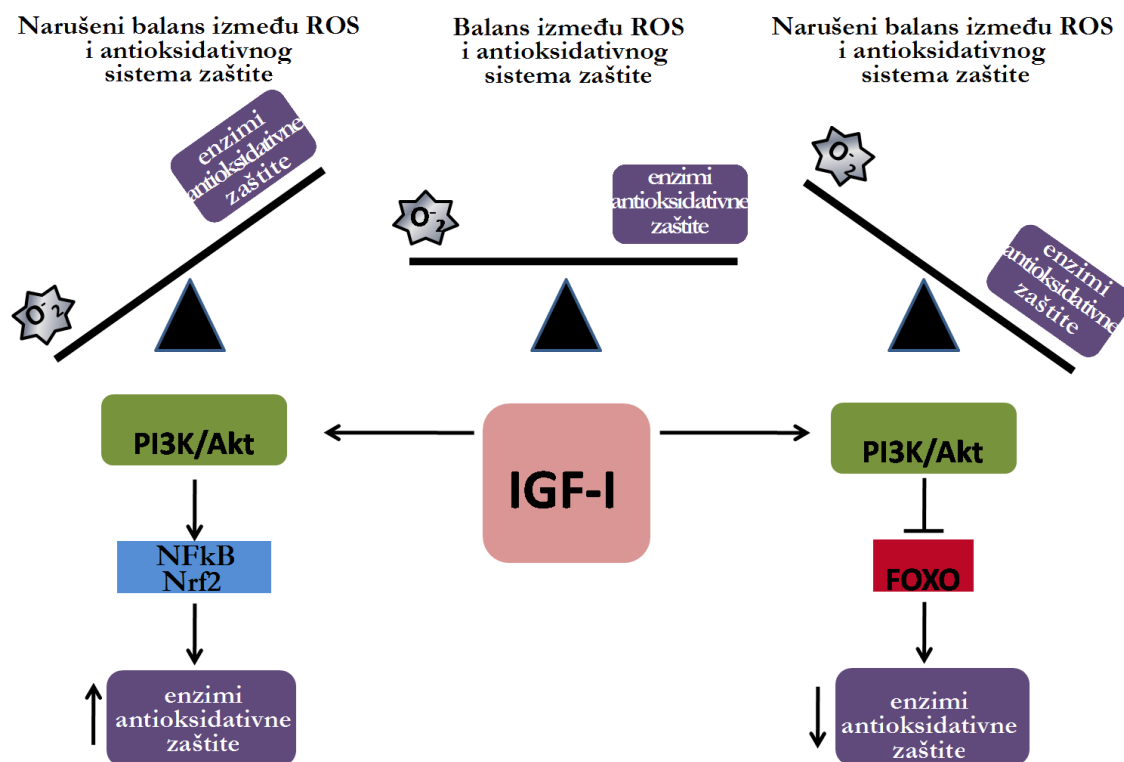
Važno je istaći da su podeljena mišljenja o prisustvu specifičnih receptora za grelin u jetri (Murata sa sar., 2002; Thielemans sa sar., 2007). S obzirom da ne postoje jasne potvrde o prisustvu receptora za grelin na jetri i da su injecirane količine grelina bile dovoljne za stimulaciju sekrecije GH, koji ciljano deluje na stimulaciju sekrecije insulinu sličnog faktora rasta-1 (engl. *Insulin-like growth factor*, IGF-1) u jetri, a da je u literaturi potvrđena njegova stimulaturna uloga na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite pretpostavili smo da bi grelin

preko GH mogao da ima ulogu u prevenciji oštećenja jetre kod normalno uhranjenih i pacova na ishrani bogatoj mastima.

Jedna od ključnih aktivnosti GH je stimulacija sinteze IGF-1 u jetri. Dembinski sa saradnicima je pokazao da grelin svojim delovanjem povećava nivo IGF-1 u plazmi (Dembinski sa sar., 2005). IGF-1 pored svoje uloge u rastu i razvoju, ostvaruje efekte slične insulinu (Simpson sa sar., 2004; Pennisi sa sar., 2006). Takođe, postoje podaci da IGF-1 ima anti-apoptotski efekat, kao i antioksidativne efekte koje ostvaruje u jetri (Brown-Borg sa sar., 2002; Conchillo sa sar., 2005; Garcia-Fernandez sa sar., 2005; Conchillo sa sar., 2007; Perez sa sar., 2008; Castilla-Cortazar sa sar., 2011).

Utvrđeno je da IGF-1 u velikoj meri utiče na smanjenje stvaranja superoksida u mitohondrijama (Muguerza sa sar., 2001; Csiszar sa sar., 2008; García-Fernández sa sar., 2008) i da je nizak nivo IGF-1 u ćeliji snažno povezan sa pojavom OxS (Castilla-Cortazar sa sar., 1997; García-Fernández sa sar., 2008; Perez sa sar., 2008; Puche sa sar., 2008). Regulacija enzima antioksidativne zaštite se odvija preko niza transkripcionih faktora kao što su: NF $\kappa$ B, Nrf2 (engl. *erythroid-derived 2)-like 2*) i FOXO (engl. *Forkhead box protein O*), koji su regulisani preko IGF-1 signalnog puta i signalnih puteva koje uključuju receptore sa tirozin kinaznom aktivnošću, **Slika 6-1**. Pokazano je da p65-NF $\kappa$ B ima značajnu hepatoprotektivnu ulogu. NF $\kappa$ B ima primarnu ulogu u prvim fazama regeneracije jetre, tako što podstiče proliferaciju hepatocita i inhibira apoptozu ćelija jetre (Plumpe sa sar., 2000; DeAngelis sa sar., 2005).

OxS, ishrana bogata mastima i različiti citokini mogu brzo aktivirati NF $\kappa$ B, koja je za razliku od ostalih transkripcionih faktora, u ćelijama prisutan u svom neaktivnom obliku (Gilmore, 2006). Neaktivan NF $\kappa$ B nalazi se u citoplazmi u formi heterodimera, vezan sa inhibitornim proteinom (I-kappa B) (Jacobs sa sar., 1998). Aktivaciji NF $\kappa$ B prethodi fosforilacija I-kappa B, praćena njegovom proteolitičkom razgradnjom što omogućava translokaciju p50 i p65 dimera u jedro gde se vezuju za DNK i iniciraju transkripciju. Subjedinica p65 u jedru ima regulatornu funkciju i aktivira mnoge gene enzima antioksidativne zaštite i pro-inflamatorne gene (citokine, hemokine i adhezione molekule) (Rahman sa sar., 2006).



Slika 6-1. Shematski prikaz uloge IGF-1 u antioksidativnoj zaštiti. Preuzeto i modificirano (Muñoz Morón sa sar., 2012)

Rezultati dobijeni merenjem nivoa proteina za p50 i p65 subjedinice NF $\kappa$ B (Slika 5-15, Slika 5-16) pokazuju da grelin smanjuje nivo proteina obe subjedinice, u citoplazmi jetre normalno hranjenih pacova (Dobutović sa sar., 2013). OxS značajno utiče na aktivaciju NF $\kappa$ B i veza između povećanog nivoa ROS-a i aktivacije NF $\kappa$ B je eksperimentalno potvrđena (Schmidt sa sar., 1995; Bonizzi sa sar., 2000; van den Berg sa sar., 2001; Azevedo-Martins sa sar., 2003), mada mehanizam, kojim enzimi antioksidativne zaštite sprečavaju aktivaciju NF $\kappa$ B i NF $\kappa$ B-zavisnih gena, još uvek nije poznat (Azevedo-Martins sa sar., 2003). Kao što je poznato, aktivnošću iNOS-a stvaraju se velike količine NO, koji lako stupa u reakciju sa drugim reaktivnim vrstama. NO reaguje sa O $_2^*$  i stvara azot-peroksid, što za posledicu vodi nitraciji proteina, oštećenju DNK i aktivaciji polimeraza (ADP-riboze) (Beckman sa sar., 1990; Ponnuswamy sa sar., 2009). Naši rezultati (

Slika 5-13) pokazuju da grelin smanjuje nivo iNOS proteina u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova, pri čemu ishrana bogata mastima umanjuje efekat grelina (Dobutović sa sar., 2013). Rezultati dobijeni izučavanjem efekata grelina na količinu iRNK za iNOS i relativnu stopu transkripcije gena *Nos2* (Slika 5-13.) ukazuju da su promene u

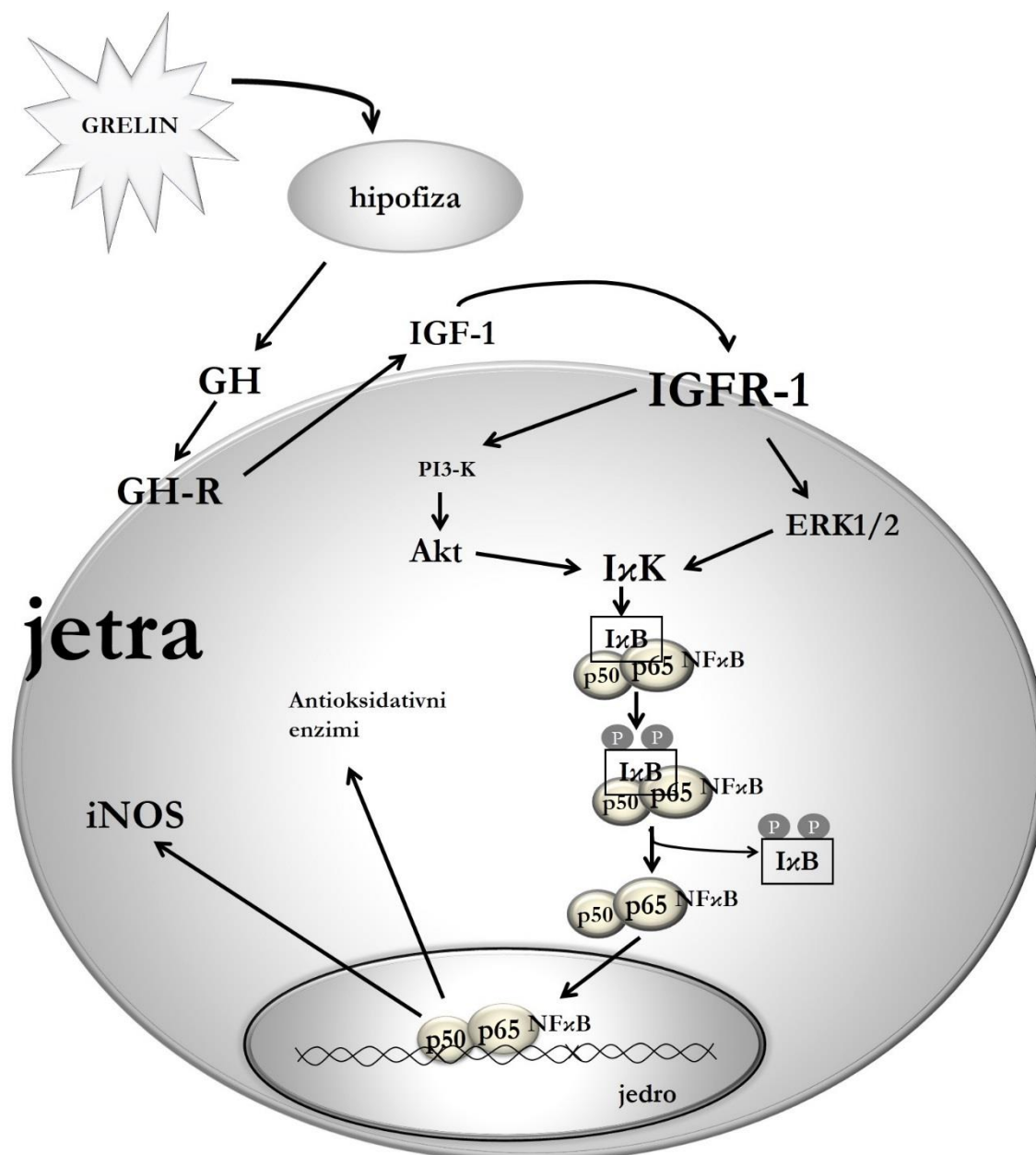
nivou iRNK za iNOS uslovljene promenama na nivou transkripcije. Uočena smanjena ekspresija gena za iNOS posredstvom grelina, (**Slika 5-14**), u saglasnosti je sa literaturnim podacima, u kojima je povišena nishodna regulacija ekspresije iNOS grelinom (Nathan sa sar., 1994). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima efekta grelina na iNOS u srcu (Sudar sa sar., 2011). Još uvek u literaturi nema dovoljno podataka o *in vivo* efektima grelina na regulaciju iNOS u jetri, naročito u jetri gojaznih pacova.

S obzirom da je promotor gena za iNOS mesto vezivanja mnogih transkripcionih faktora uključujući i NF $\kappa$ B koji se vezuje za 5' kraju gena za iNOS (Nathan sa sar., 1994; Hou sa sar., 2009a), moguće objašnjenje za ovako dobijene rezultate, je da grelin *in vivo* delovanjem sprečava fosforilaciju, deaktivaciju I $\kappa$ B- $\alpha$  i inhibira translokaciju NF $\kappa$ B u jedro sprečavajući indukciju iNOS gena (Slomiany sa sar., 2011a). Ovi rezultati mogu ukazivati na veoma bitnu ulogu NF $\kappa$ B kao regulatornog faktora grelinom indukovane ekspresije iNOS u jetri pacova. Takođe, pokazano je da povećani kapacitet inaktivacije ROS u  $\beta$  ćelijama može dovesti do inhibiranja citokinima-indukovane aktivacije NF $\kappa$ B i smanjiti posledičnu aktivaciju promotera za iNOS (Azevedo-Martins sa sar., 2003).

Naši prethodno objavljeni rezultati zajedno sa radovima drugih autora pokazuju da ERK1/2 ima aktivnu ulogu u fosforilaciji i defosforilaciji mnogih signalnih enzima koji regulišu ekspresiju i aktivnost iNOS (Isenovic sa sar., 2000; Rao, 2000; Yu sa sar., 2003; Wu sa sar., 2009; Sudar sa sar., 2011). ERK1/2 kaskada uključuje molekule koji fosforilacijom aktiviraju jedni druge, što na kraju dovodi do aktivacije NF $\kappa$ B i regulacije transkripcije gena. Fosforilacija Tyr ostataka na *Thr*<sup>202</sup>/*Tyr*<sup>204</sup> i *Thr*<sup>185</sup>/*Tyr*<sup>187</sup> je neophodna za punu aktivaciju ERK1/2. Aktiviran ERK1/2, može dalje fosforilisati mnoge ciljne proteine, uključujući faktore transkripcije i protein kinaze (Whitmarsh sa sar., 1998). Uloga ERK1/2 u aktivaciji iNOS pokazana je u nekoliko sistema (Kim sa sar., 2005; Ellerhorst sa sar., 2006; Hou sa sar., 2009a; Xiao sa sar., 2011). Vezivanje NF $\kappa$ B heterodimera za promoterski region iNOS, posredovano je aktivacijom ERK1/2 (Kim sa sar., 2005; Hou sa sar., 2009a). Pored toga, pokazano je da grelin aktivira signalni put IRS/MAPK (Murata sa sar., 2002).

U ovoj doktorskoj disertaciji, merenjem fosforilacije ERK 1/2, indukovane grelinom, analizirana je uloga ERK1/2 u aktivaciji NF $\kappa$ B i ekspresiji iNOS. Dobijeni rezultati (**Slika 5-17**) pokazuju da injeciran grelin dovodi do povećanja fosforilacije ERK1/2 u jetri normalno hranjenih pacova (Dobutović sa sar., 2013), dok ovaj efekat grelina kod gojaznih životinja u poređenju sa ne tretiranim gojaznim životinjama je statistički značajan.

Literaturni podaci, jasno ukazuju na važnu ulogu Akt u regulaciji NF $\kappa$ B i aktivaciji iNOS i enzima antioksidativne zaštite. Slomiany sa sar. (2011a) su pokazali da delovanje grelina na LPS indukovanu regulaciju IKK- $\beta$  i iNOS u želudačnoj mukozii, uključuje i aktivaciju Akt, dok su Rojo i saradnici utvrdili da je PI3K/Akt signalni put uključen u antioksidativnu zaštitu, povećanjem ekspresije Cu/Zn-SOD i MnSOD, aktivacijom NF $\kappa$ B (Rojo sa sar., 2004). Naš sledeći korak u istraživanju bio je usmeren na utvrđivanje efekata grelina na fosforilaciju Akt na aminokiselini Ser<sup>473</sup>. Dobijeni rezultati (**Slika 5-18**) pokazuju da grelin svojim delovanjem stimuliše fosforilaciju Akt u jetri normalno hranjenih životinja (Dobutović sa sar., 2013), što se može objasniti literaturnim podacima koji jasno ukazuju da su i iNOS i NF $\kappa$ B regulisani aktivnošću Akt (Rojo sa sar., 2004; Slomiany sa sar., 2011a). Prenos signala kroz Src/Akt signalni put zauzima centralno mesto u odgovoru na stimulaciju grelinom, posredovanu GHSR receptorom (Lodeiro sa sar., 2009; Slomiany sa sar., 2011a; Slomiany sa sar., 2011b). Pojedini autori su ispitivali i mogućnost da je IKK kompleks mesto inhibicije, izazvane procesom S-nitrozilacije specifičnih ostataka cisteina, endogenim donorima NO, u aktivacionoj petlji IKK- $\beta$  (Marshall sa sar., 2004; Reynaert sa sar., 2004; Perkins, 2007; Slomiany sa sar., 2011a). Jedan od mehanizama interakcije između PI3K/Akt i NF $\kappa$ B puteva uključuje direktnu fosforilaciju I $\kappa$ B kinaze  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) Akt, što vodi do aktivacije ove kinaze ushodno od NF $\kappa$ B. Akt može direktno fosforilisati c-Raf inhibirajući efekta Akt na ERK 1/2 signalni put (Manning sa sar., 2007). Neki od nishodnih enzima koje reguliše Akt, u fosforilisanom stanju mogu omogućiti komunikaciju između signalnih puteva.



Shema 6 - 1. Prikaz signalnih puteva uključenih u aktivaciju antioksidativnih enzima i iNOS; I $\kappa$ K - kinaza koja učestvuje u fosforilaciji inhibitora I $\kappa$ B $\alpha$  (od *engl. I $\kappa$ B Kinase*); I $\kappa$ B $\alpha$  - inhibitor NF $\kappa$ B - (*engl. Inhibitor of nuclear factor kappa B*); p - fosfo grupa; p50 - subjedinica p50 NF $\kappa$ B; p65 - subjedinica p65 NF $\kappa$ B; Akt - protein kinaza B; IGF-1 - insulinu sličan faktor rasta-1 (*engl. Insulin-Like Growth Factor-1*); IGFR-1 - receptor za IGF -1; iNOS - inducibilna NOS; PI3-K - fosfatidilinozitol-3 - kinaza; GH - hormon rasta (*engl. Growth Hormone*); GH-R - receptor za HR.

Na osnovu svih prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da se efekti grelina na regulaciju enzima antioksidativne zaštite kao i iNOS,

najverovatnije ostvaruju indirektnim putem. S obzirom da je PI3-K/Akt/ERK 1/2 signalna kaskada uključene u mehanizam delovanja IGF-1 (Isenovic sa sar., 2003; Isenovic sa sar., 2004; Dimova sa sar., 2005), može se pretpostaviti da *ICV* injeciran grelin stimuliše stvaranje IGF-1 koji deluje kroz mehanizam koji uključuje PI3-K zavisnu aktivaciju Akt i ERK1/2 kaskade i dalje povećava ekspresiju antioksidativnih enzima i reguliše ekspresiju/aktivnost iNOS kroz aktivaciju NF $\kappa$ B udruženog sa IR. Grelinom balansirani i paralelni prenos signala između Akt i ERK 1/2 puteva održava normalnim metabolizam i funkcionisanje jetre kod normalno uhranjenih (**Shema 6-1**).

## 7. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci o *in vivo* efektima grelina u jetri normalno hranjenih i gojaznih pacova:

**1. Grelina, kod normalno hranjenih pacova dovodi s jedne strane do razvoja insulinske rezistencije** (dijabetogeni efekti se ogledaju u povećanim HOMA-IR i HOMA- $\beta$  indeksima, povišenom koncentracijom insulina kao kompenzatornim efektom rane IR, prividne euglikemije), **a s druge strane ispoljava protektivne, antioksidativne efekte obzirom na smanjene vrednosti serumskih slobodnih masnih kiselina, smanjenje ekspresije iNOS i nivoa p65 i p50 subjediniča transkripcionog faktora NF $\kappa$ B i povećane vrednosti ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima.**

**2. Svoje bipolarne efekte na jetru normalno hranjenih pacova, grelina verovatno ostvaruje preko IGF-1 signalnog puta, koji uključuje aktivaciju nishodnih aktera poput ERK1/2 i Akt kinaze.** Povećanom fosforilacijom Akt i ERK1/2 kinaze kod normalno hranjenih pacova evidentan je uticaj grelina na višestruku ulogu Akt i ERK1/2 u signalnoj transdukciji, bilo u pravcu regulacije metabolizma glukoze ili aktivacijom drugih nishodnih ciljnih molekula preko kojih se ostvaruje antioksidativna uloga grelina.

**3. Većina ovih efekata grelina je ublažena ili suprimirana u modelu gojaznih pacova** (pacovi na 4 nedeljnoj dijeti bogatom mastima, kod kojih se takođe razvila početna



insulinska rezistencija). Možemo zaključiti da je efekat *ICV* injeciranog grelina umanjen razvojem IR i OxS, izazvanih gojaznošću. Vrednosti gore pomenutih parametara su značajno umanjene kod gojaznih pacova, što ukazuje da je OxS značajan činilac u narušavanju signalne transdukcije.

**4. Posmatrajući efekte egzogeno-intracerebovaskularno primenjenog grelina kod gojaznih pacova, može se zaključiti da je on potencirao dijabetogena dejstva, pojačavajući IR i kreirajući blagu hipoglikemiju sa još izraženijom kompenzatornom hiperinsulinemijom. S druge strane, grelin, delimično ublažava inflamatorno stanje smanjenjem SMK i znatno sniženim nivoom iNOS u odnosu na kontrolu a bez značajne promene u odnosu na ove parametre kod HF grupe, što govori u prilog da grelin nije uspeo da ostvari svoje antiinflamatorno delovanje. Nasuprot tome njegova antioksidativna protektivna uloga u HF grupi, ogleda se u znatnom povećanju ekspresije antioksidativnih enzima, do nivoa bliskog delovanju grelina kod kontrolnih životinja.**

Pozitivno delovanje grelina na primenjeni patofiziološki model, u okviru ove doktorske disertacije, omogućava polaznu osnovu za dalja istraživanje molekularnih mehanizama uključenih u delovanje grelina na OxS u patofiziološkim uslovima kao što je gojaznost udružena sa insulinskom rezistencijom.

## 8. Literatura

1. Adeghate E and Ponery AS. (2002.) Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol.* 14: 555-560.
2. Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, et al. (2010). Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women?
3. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, et al. (2009.) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation.* 119: 573-581.
4. Arafat MA, Otto B, Rochlitz H, Tschop M, et al. (2005.) Glucagon inhibits ghrelin secretion in humans. *Eur J Endocrinol.* 153: 397-402.
5. Arici OF and Cetin N. (2011.) Protective role of ghrelin against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced coagulation disturbances in rats. *Regul Pept.* 166: 139-142.
6. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, et al. (2001.) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 4753-4758.
7. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, et al. (2005.) IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine.* 11: 191-198.
8. Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, et al. (2000.) Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest.* 23: 493-495.
9. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, et al. (2001.) Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology.* 120: 337-345.

10. Azevedo-Martins AK, Lortz S, Lenzen S, Curi R, et al. (2003.) Improvement of the Mitochondrial Antioxidant Defense Status Prevents Cytokine-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Insulin-Producing Cells. *Diabetes*. 52: 93-101.
11. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, et al. (2001.) Effects of Intravenous and Dietary Lipid Challenge on Intramyocellular Lipid Content and the Relation With Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes*. 50: 2579-2584.
12. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, et al. (2002.) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*. 159: 1029-1037.
13. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, et al. (2005.) Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288: E228-235.
14. Barazzoni R, Zanetti M, Semolic A, Cattin MR, et al. (2011.) High-fat diet with acyl-ghrelin treatment leads to weight gain with low inflammation, high oxidative capacity and normal triglycerides in rat muscle. *PLoS One*. 6: e26224.
15. Barreiro ML, Gaytán F, Caminos JE, Pinilla L, et al. (2002.) Cellular Location and Hormonal Regulation of Ghrelin Expression in Rat Testis. *Biology of Reproduction*. 67: 1768-1776.
16. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, et al. (1990.) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 1620-1624.
17. Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D and Marciniak A. (2000.) The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol*. 51: 883-896.
18. Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, et al. (2007.) Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes*. 56: 168-176.
19. Birnbaum MJ. (2001.) Turning down insulin signaling. *J Clin Invest*. 108: 655-659.
20. Boden G. (2003.) Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 111: 121-124.
21. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, et al. (2005.) Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance and Activate the Proinflammatory Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway in Rat Liver. *Diabetes*. 54: 3458-3465.
22. Bonizzi G, Piette J, Merville M-P and Bours V. (2000.) Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor- $\kappa$ B activation by Interleukin-1. *Biochemical Pharmacology*. 59: 7-11.
23. Bowen J, Noakes M, Trenerry C and Clifton PM. (2006.) Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *J Clin Endocrinol Metab*. 91: 1477-1483.
24. Bray GA, Paeratakul S and Popkin BM. (2004.) Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav*. 83: 549-555.

25. Brazil DP and Hemmings BA. (2001.) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 26: 657-664.
26. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, et al. (2001.) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 5083-5086.
27. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, et al. (2003.) Ghrelin and the Endocrine Pancreas. *Endocrine.* 22: 19-24.
28. Brons C, Jensen CB, Storgaard H, Hiscock NJ, et al. (2009.) Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol.* 587: 2387-2397.
29. Brown-Borg HM, Rakoczy SG, Romanick MA and Kennedy MA. (2002.) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes. *Exp Biol Med (Maywood).* 227: 94-104.
30. Brown MD and Sacks DB. (2009.) Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling.* 21: 462-469.
31. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, et al. (2005.) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature Medicine.* 11: 183-190.
32. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI and Nieto N. (2005.) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *The FASEB Journal.* 19: 136-138.
33. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, et al. (2010.) Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 31: 44-60.
34. Castilla-Cortazar I, Garcia-Fernandez M, Delgado G, Puche JE, et al. (2011.) Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *J Transl Med.* 9: 103.
35. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Quiroga J, et al. (1997.) Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology.* 113: 1682-1691.
36. Cetin E, Kanbur M, Cetin N, Eraslan G, et al. (2011.) Hepatoprotective effect of ghrelin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Regul Pept.* 171: 1-5.
37. Cha H-N, Kim Y-W, Kim J-Y, Kim Y-D, et al. (2010.) Lack of inducible nitric oxide synthase does not prevent aging-associated insulin resistance. *Experimental Gerontology.* 45: 711-718.
38. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, et al. (2004.) Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 43: 165-170.
39. Chapman IM, Bach MA, Van Cauter E, Farmer M, et al. (1996a.) Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 81: 4249-4257.

40. Chapman IM, Hartman ML, Pezzoli SS and Thorner MO. (1996b.) Enhancement of pulsatile growth hormone secretion by continuous infusion of a growth hormone-releasing peptide mimetic, L-692,429, in older adults--a clinical research center study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81: 2874-2880.
41. Chelikani P, Fita I and Loewen PC. (2004.) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 61: 192-208.
42. Chen X, Liang H, Van Remmen H, Vijg J, et al. (2004.) Catalase transgenic mice: Characterization and sensitivity to oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 422: 197-210.
43. Clairborne A (1985). Catalase Activity. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. R. A. Greenwald. Boca Raton, FL, USA, CRC Press: 283-284.
44. Clark RG, Thomas GB, Mortensen DL, Won WB, et al. (1997.) Growth Hormone Secretagogues Stimulate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Are Diabetogenic in the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Endocrinology*. 138: 4316-4323.
45. Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, et al. (2005.) Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol*. 43: 630-636.
46. Conchillo M, Prieto J and Quiroga J. (2007.) [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis]. *Rev Esp Enferm Dig*. 99: 156-164.
47. Cornier M-A, Bergman BC and Bessesen DH. (2006.) The effects of short-term overfeeding on insulin action in lean and reduced-obese individuals. *Metabolism*. 55: 1207-1214.
48. Corraliza IM, Campo ML, Soler G and Modolell M. (1994.) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 174: 231-235.
49. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, et al. (1992.) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 10405-10409.
50. Csiszar A, Labinskyy N, Perez V, Recchia FA, et al. (2008.) Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295: H1882-1894.
51. Cui C, Ohnuma H, Daimon M, Susa S, et al. (2008.) Ghrelin infused into the portal vein inhibits glucose-stimulated insulin secretion in Wistar rats. *Peptides*. 29: 1241-1246.
52. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, et al. (2001.) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 50: 1714-1719.
53. Cutfield WS, Wilton P, Bennmarker H, Albertsson-Wikland K, et al. (2000.) Incidence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in children and adolescents receiving growth-hormone treatment. *Lancet*. 355: 610-613.
54. Dahle MK, Overland G, Myhre AE, Stuestol JF, et al. (2004.) The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun*. 72: 5704-5711.

55. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, et al. (1996.) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*. 347: 444-445.
56. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, et al. (2000.) Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 275: 477-480.
57. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, et al. (2002.) Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 51: 124-129.
58. Davidson MB. (1987.) Effect of Growth Hormone on Carbohydrate and Lipid Metabolism. *Endocrine Reviews*. 8: 115-131.
59. DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R and Lambris JD. (2005.) A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology*. 42: 1148-1157.
60. DeFronzo RA. (2004.) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 88: 787-835, ix.
61. DeFronzo RA, Bonadonna RC and Ferrannini E. (1992.) Pathogenesis of NIDDM: A balanced overview. *Diabetes Care*. 15: 318-368.
62. DeFronzo RA and Tripathy D. (2009.) Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 32 Suppl 2: S157-163.
63. Deisseroth A and Dounce AL. (1970.) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*. 50: 319-375.
64. Delhanty PJD and van der Lely AJ. (2011.) Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides*. 32: 2309-2318.
65. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Bielanski W, et al. (2005.) Variable effect of ghrelin administration on pancreatic development in young rats. Role of insulin-like growth factor-1. *J Physiol Pharmacol*. 56: 555-570.
66. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Cieszkowski J, et al. (2006.) Role of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the protective effect of ghrelin in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *Growth Horm IGF Res*. 16: 348-356.
67. Dimova EY, Moller U, Herzig S, Fink T, et al. (2005.) Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by insulin-like growth factor-1 via MAP kinases and hypoxia-inducible factor-1 in HepG2 cells. *Thromb Haemost*. 93: 1176-1184.
68. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A, et al. (2010.) Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiol Res*. 59: 729-736.
69. Dobutović B, Sudar E, Tepavčević S, Đorđević J, et al. (2013.) Effects of ghrelin on protein expression of antioxidative enzymes and iNOS in the rat liver. *Archives of Medical Science*.
70. Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, et al. (2008.) Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: Role of glycogen synthase kinase-3. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 294: E615-E621.

71. Dufour JF and Clavien PA (2010). Signaling Pathways in Liver Diseases, Springer Berlin Heidelberg.
72. Duncombe WG. (1964.) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clin Chim Acta.* 9: 122-125.
73. El Eter E, Al Tuwajiri A, Hagar H and Arafa M. (2007.) In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* 22: 1791-1799.
74. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, et al. (2000.) Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res.* 41: 1244-1251.
75. Ellerhorst JA, Ekmekcioglu S, Johnson MK, Cooke CP, et al. (2006.) Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Oncogene.* 25: 3956-3962.
76. Erdmann J, Lippl F and Schusdziarra V. (2003.) Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept.* 116: 101-107.
77. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM. (2003.) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* 52: 1-8.
78. Fattman CL, Schaefer LM and Oury TD. (2003.) Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 35: 236-256.
79. Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, et al. (2009.) Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med.* 46: 624-632.
80. Fita I and Rossmann MG. (1985.) The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology.* 185: 21-37.
81. Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, et al. (2008.) High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem.* 19: 505-513.
82. Flohe L. (1988.) Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 49: 663-668.
83. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, et al. (1994.) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23: 1121-1131.
84. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, et al. (1995.) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* 81: 727-736.
85. Frei B. (1999.) Molecular and biological mechanism of antioxidant action. *Fed Am Soc Exp Biol J.* 13: 963 - 964.
86. Frödin M, Antal TL, Dümmler BA, Jensen CJ, et al. (2002.) A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO Journal.* 21: 5396-5407.

87. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, et al. (2005.) A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*. 54: 1340-1348.
88. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U and Harrison DG. (2002.) Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 55: 239-249.
89. Furuhata Y, Kagaya R, Hirabayashi K, Ikeda A, et al. (2000.) Development of obesity in transgenic rats with low circulating growth hormone levels: involvement of leptin resistance. *Eur J Endocrinol*. 143: 535-541.
90. Galgani JE, Moro C and Ravussin E. (2008.) Metabolic flexibility and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. 295: E1009-E1017.
91. Gallagher EJ, Fierz Y, Ferguson RD and LeRoith D. (2010.) The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. *Endocr Pract*. 16: 864-873.
92. Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, et al. (2005.) Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterology*. 5: 7.
93. García-Fernández M, Delgado G, Puche JE, González-Barón S, et al. (2008.) Low Doses of Insulin-Like Growth Factor I Improve Insulin Resistance, Lipid Metabolism, and Oxidative Damage in Aging Rats. *Endocrinology*. 149: 2433-2442.
94. Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, et al. (2003.) Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Experimental Biology and Medicine*. 228: 836-842.
95. Gibson UE, Heid CA and Williams PM. (1996.) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 6: 995-1001.
96. Gilmore TD. (2006.) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25: 6680-6684.
97. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, et al. (2002.) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 87: 2988.
98. Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M and Babahmadi-Rezaei H. (2010.) Oxidative damage to DNA and lipids: Correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 24: 72-76.
99. Granada M, Chowen JA, Garcia-Caceres C, Delgado-Rubin A, et al. (2009.) Ghrelin treatment protects lactotrophs from apoptosis in the pituitary of diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol*. 309: 67-75.
100. Green H, Morikawa M and Nixon T. (1985.) A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*. 29: 195-198.
101. Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, et al. (2004.) Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 60: 382-388.



102. Grinspoon S, Miller KK, Herzog DB, Grieco KA, et al. (2004.) Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 3988-3993.
103. Gual P, Le Marchand-Brustel Y and Tanti JF. (2005.) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87: 99-109.
104. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V and Czech MP. (2008.) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 367-377.
105. Hall ED, Detloff MR, Johnson K and Kupina NC. (2004.) Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 21: 9-20.
106. Halliwell B. (1987a.) Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 46: 13-26.
107. Halliwell B. (1987b.) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364.
108. Halliwell B and Gutteridge JM. (1990.) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
109. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York, Oxford University Press.
110. Haslam RJ, Koide HB and Hemmings BA. (1993.) Pleckstrin domain homology. *Nature.* 363: 309-310.
111. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, et al. (2012.) Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell metabolism.* 15: 848-860.
112. Hedayati N, Annambhotla S, Jiang J, Wang X, et al. (2009.) Growth hormone-releasing peptide ghrelin inhibits homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human endothelial cells. *J Vasc Surg.* 49: 199-207.
113. Heijboer AC, Van Den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, et al. (2006.) Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia.* 49: 732-738.
114. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, et al. (2010.) Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299: H446-453.
115. Hevel JM and Marletta MA. (1994.) Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* 233: 250-258.
116. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Granger DL, et al. (1990). *Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidine nitrogen atom of l-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron.* New York, Elsevier Science Publishers B.V.
117. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, et al. (2009.) Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106: 17787-17792.

118. Hoffmann A, Natoli G and Ghosh G. (2006.) Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 25: 6706-6716.
119. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H and Kangawa K. (2000a.) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 279: 909-913.
120. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H and Kangawa K. (2000b.) Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*. 275: 21995-22000.
121. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, et al. (2003.) Structural divergence of human ghrelin: Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 64-70.
122. Hou CH, Lin J, Huang SC, Hou SM, et al. (2009a.) Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts. *J Cell Physiol*. 220: 196-203.
123. Hou Y, An J, Hu XR, Sun BB, et al. (2009b.) Ghrelin inhibits interleukin-8 production induced by hydrogen peroxide in A549 cells via NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol*. 9: 120-126.
124. Houstis N, Rosen ED and Lander ES. (2006.) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 440: 944-948.
125. Huang CX, Yuan MJ, Huang H, Wu G, et al. (2009.) Ghrelin inhibits post-infarct myocardial remodeling and improves cardiac function through anti-inflammation effect. *Peptides*. 30: 2286-2291.
126. Iantorno M, Chen H, Kim JA, Tesouro M, et al. (2007.) Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292: E756-764.
127. Ikehara O, Kawasaki N, Maezono K, Komatsu M, et al. (2008.) Acute and chronic treatment of L-isoleucine ameliorates glucose metabolism in glucose-intolerant and diabetic mice. *Biol Pharm Bull*. 31: 469-472.
128. Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, et al. (2002.) Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*. 51: 3408-3411.
129. Isenovic E and LaPointe MC. (2000.) Role of Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in the regulation of inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*. 35: 249-254.
130. Isenovic ER, Divald A, Milivojevic N, Grgurevic T, et al. (2003.) Interactive effects of insulin-like growth factor-1 and beta-estradiol on endothelial nitric oxide synthase activity in rat aortic endothelial cells. *Metabolism*. 52: 482-487.
131. Isenovic ER, Meng Y, Divald A, Milivojevic N, et al. (2002.) Role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in angiotensin II and insulin-like growth factor-1 modulation of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Endocrine*. 19: 287-292.

132. Isenovic ER, Meng Y, Jamali N, Milivojevic N, et al. (2004.) Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* 13: 915-922.
133. Iseri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, et al. (2008.) Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept.* 146: 73-79.
134. Iseri SO, Sener G, Yuksel M, Contuk G, et al. (2005.) Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *J Endocrinol.* 187: 399-406.
135. Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, et al. (2007.) Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293: E819-825.
136. Jaber BL, Pereira BJG, Bonventre JV and Balakrishnan VS. (2005.) Polymorphism of host response genes: Implications in the pathogenesis and treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 67: 14-33.
137. Jacobs MD and Harrison SC. (1998.) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell.* 95: 749-758.
138. Jain SS, Chabowski A, Snook LA, Schwenk RW, et al. (2009.) Additive effects of insulin and muscle contraction on fatty acid transport and fatty acid transporters, FAT/CD36, FABPpm, FATP1, 4 and 6. *FEBS Lett.* 583: 2294-2300.
139. Jeffery PL, Duncan RP, Yeh AH, Jaskolski RA, et al. (2005.) Expression of the ghrelin axis in the mouse: An exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology.* 146: 432-440.
140. Jozanov-Stankov O (2006). In vivo model radijacionog i hemijskog stresa - uloga selena u sistemu antioksidativne odbrane. Univerzitet u Beogradu.
141. Kahn SE, Hull RL and Utzschneider KM. (2006.) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 444: 840-846.
142. Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, et al. (2004.) Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology.* 151: 573-577.
143. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei Alavi E, et al. (2009.) Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia.* 41: 335-340.
144. Kiens B. (2006.) Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev.* 86: 205-243.
145. Kim HT, Kim YH, Nam JW, Lee HJ, et al. (1994.) Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 201: 1526-1533.
146. Kim JW and Kim C. (2005.) Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol.* 70: 1352-1360.
147. Kim SJ, Choi Y, Jun HS, Kim BM, et al. (2010.) High-fat diet stimulates IL-1 type I receptor-mediated inflammatory signaling in the skeletal muscle of mice. *Mol Nutr Food Res.* 54: 1014-1020.

148. Kim SP, Ellmerer M, Kirkman EL and Bergman RN. (2007.) Beta-cell "rest" accompanies reduced first-pass hepatic insulin extraction in the insulin-resistant, fat-fed canine model. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E1581-1589.
149. Kim SP, Ellmerer M, Van Citters GW and Bergman RN. (2003.) Primacy of Hepatic Insulin Resistance in the Development of the Metabolic Syndrome Induced by an Isocaloric Moderate-Fat Diet in the Dog. *Diabetes.* 52: 2453-2460.
150. Kineman RD, Gahete MD and Luque RM. (2007.) Identification of a mouse ghrelin gene transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in response to metabolic stress. *Journal of Molecular Endocrinology.* 38: 511-521.
151. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, et al. (2009.) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nature Medicine.* 15: 741-745.
152. Knowles RG, Salter M, Brooks SL and Moncada S. (1990.) Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 172: 1042-1048.
153. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, et al. (1999.) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402: 656-660.
154. Kojima M and Kangawa K. (2002.) Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Pharmacology.* 2: 665-668.
155. Kojima M and Kangawa K. (2005.) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 85: 495-522.
156. Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, et al. (1991.) Development of Muscle Insulin Resistance After Liver Insulin Resistance in High-Fat-Fed Rats. *Diabetes.* 40: 1397-1403.
157. Krauth-Siegel RL and Comini MA. (2008.) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1780: 1236-1248.
158. Kyriakis JM and Avruch J. (1996.) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem.* 271: 24313-24316.
159. Laemmli UK. (1970.) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
160. Landis GN and Tower J. (2005.) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev.* 126: 365-379.
161. LaPointe MC, Isenovic, E. . (1999.) Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension.* 33: 276-282.
162. Lara-Castro C and Garvey WT. (2008.) Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37: 841-856.
163. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, et al. (2002.) Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric

- distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 143: 185-190.
164. Li J and Billiar TR. (1999.) Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol*. 276: G1069-1073.
  165. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, et al. (2004.) Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*. 79: 502-509.
  166. Liu L, Xu H, Jiang H, Wang J, et al. (2010.) Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidation and NF-kappaB modulation in MES23.5 cells. *Exp Neurol*. 222: 25-29.
  167. Lodeiro M, Theodoropoulou M, Pardo M, Casanueva FF, et al. (2009.) c-Src Regulates Akt Signaling in Response to Ghrelin via  $\beta$ -Arrestin Signaling-Independent and -Dependent Mechanisms. *PLoS ONE*. 4: e4686.
  168. MacMicking J, Xie QW and Nathan C. (1997.) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 15: 323-350.
  169. Maechler P, Jornot L and Wollheim CB. (1999.) Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 27905-27913.
  170. Maiorino FM, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, et al. (1995). [5] Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*. P. Lester, Academic Press. Volume 252: 38-53.
  171. Manning BD and Cantley LC. (2007.) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129: 1261-1274.
  172. Marklund SL. (1982.) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79: 7634-7638.
  173. Marshall HE, Hess DT and Stamler JS. (2004.) S-nitrosylation: Physiological regulation of NF- $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 8841-8842.
  174. Martindale JL and Holbrook NJ. (2002.) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 192: 1-15.
  175. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, et al. (1985.) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28: 412-419.
  176. McCord JM and Fridovich I. (1969.) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 244: 6049-6055.
  177. McFarlane SI, Banerji M and Sowers JR. (2001.) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 86: 713-718.
  178. Meyer C. (2010.) Final answer: ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? *Diabetes*. 59: 2726-2728.
  179. Milani P, Gagliardi S, Cova E and Cereda C. (2011.) SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Research International*. 2011.

180. Miller AF. (2012.) Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 586: 585-595.
181. Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, et al. (1999.) The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem.* 274: 503-509.
182. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, et al. (1994.) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science.* 266: 1719-1723.
183. Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, et al. (2002.) Altered liver gene expression in CCl4-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 242-252.
184. Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, et al. (2002.) Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest.* 25: RC36-38.
185. Moncada S and Higgs EA. (2006.) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 213-254.
186. Mori M. (2007.) Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr.* 137: 1616S-1620S.
187. Morris SM, Jr. and Billiar TR. (1994.) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 266: E829-839.
188. Muguerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, et al. (2001.) Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1536: 185-195.
189. Muller AF, Janssen JA, Hofland LJ, Lamberts SW, et al. (2001.) Blockade of the Growth Hormone (GH) Receptor Unmasks Rapid GH-Releasing Peptide-6-Mediated Tissue-Specific Insulin Resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 86: 590-593.
190. Mumbengegwi DR, Li Q, Li C, Bear CE, et al. (2008.) Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. *Mol Cell Biol.* 28: 3700-3712.
191. Muñoz Morón U and Castilla-Cortázar I (2012). Protection Against Oxidative Stress and "IGF-I Deficiency Conditions. Antioxidant Enzyme. M. Amr El-Missiry.
192. Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, et al. (2002.) Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 277: 5667-5674.
193. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, et al. (2001a.) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 409: 194-198.
194. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, et al. (2001b.) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 409: 194-198.
195. Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, et al. (2010.) Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clinical Biochemistry.* 43: 815-821.

196. Nass RM, Gaylann BD, Rogol AD and Thorner MO. (2010.) Ghrelin and growth hormone: story in reverse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 8501-8502.
197. Nathan C and Xie QW. (1994.) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 78: 915-918.
198. Nesic DM, Stevanovic DM, Ille T, Petricevic S, et al. (2008.) Centrally applied ghrelin affects feeding dynamics in male rats. *J Physiol Pharmacol.* 59: 489-500.
199. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, et al. (2004.) Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest.* 113: 1582-1588.
200. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, et al. (2005.) Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology.* 146: 2255-2264.
201. Nishikawa M, Hashida M and Takakura Y. (2009.) Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 61: 319-326.
202. Obay BD, Tasdemir E, Tumer C, Bilgin HM, et al. (2008.) Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 29: 448-455.
203. Oben JE, Enyegue DM, Fomekong GI, Soukontoua YB, et al. (2007.) The effect of *Cissus quadrangularis* (CQR-300) and a *Cissus* formulation (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative stress. *Lipids Health Dis.* 6: 4.
204. Pacifico L, Poggiogalle E, Costantino F, Anania C, et al. (2009.) Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 161: 861-870.
205. Packer L, Weber SU and Rimbach G. (2001.) Molecular Aspects of  $\alpha$ -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. *The Journal of Nutrition.* 131: 369S-373S.
206. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, et al. (2010.) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 23: 75-93.
207. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, et al. (1997.) A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272: 29911-29918.
208. Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, et al. (2003.) C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 310: 567-573.
209. Pennisi P, Gavrilova O, Setser-Portas J, Jou W, et al. (2006.) Recombinant human insulin-like growth factor-I treatment inhibits gluconeogenesis in a transgenic mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology.* 147: 2619-2630.
210. Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, et al. (2011.) Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *The FASEB Journal.* 25: 2814-2822.
211. Perez R, Garcia-Fernandez M, Diaz-Sanchez M, Puche JE, et al. (2008.) Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor- I in experimental cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 14: 2731-2739.

212. Perkins ND. (2007.) Integrating cell-signalling pathways with NF-[kappa]B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 49-62.
213. Perreault M and Marette A. (2001.) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 7: 1138-1143.
214. Petersen KF and Shulman GI. (2002.) Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 90: 11G-18G.
215. Pfaffl MW. (2001.) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29.
216. Pham A, Bortolazzo A and White JB. (2012.) Rapid dimerization of quercetin through an oxidative mechanism in the presence of serum albumin decreases its ability to induce cytotoxicity in MDA-MB-231 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*
217. Pileggi R and Khin BW. (1962.) Enzymatic colorimetric method. *J Bio Chem.* 40: 585-589.
218. Ping C, Xiaoling D, Jin Z, Jiahong D, et al. (2006.) Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats. *Arch Med Res.* 37: 576-583.
219. Plumpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, et al. (2000.) NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278: G173-183.
220. Ponnuswamy P, Ostermeier E, Schrottle A, Chen J, et al. (2009.) Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase. *Am J Pathol.* 174: 2400-2410.
221. Postic C, Dentin R and Girard J. (2004.) Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 30: 398-408.
222. Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, et al. (2003.) Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes.* 52: 2546-2553.
223. Puche JE, Garcia-Fernandez M, Muntane J, Rioja J, et al. (2008.) Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology.* 149: 2620-2627.
224. Radomski MW, Palmer RM and Moncada S. (1990.) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 10043-10047.
225. Raffaella C, Francesca B, Italia F, Marina P, et al. (2008.) Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity.* 16: 958-964.
226. Rahman I and Adcock IM. (2006.) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 28: 219-242.
227. Rao KM. (2000.) Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 3: 27-58.



228. Reil TD, Barnard RJ, Kashyap VS, Roberts CK, et al. (1999.) Diet-induced changes in endothelial-dependent relaxation of the rat aorta. *J Surg Res.* 85: 96-100.
229. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, et al. (2004.) Nitric oxide represses inhibitory  $\alpha$ B kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101: 8945-8950.
230. Reynoso R, Salgado LM and Calderon V. (2003.) High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Biochem.* 246: 155-162.
231. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, et al. (2004.) The "Normal" Endocrine Cell of the Gut: Changing Concepts and New Evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1014: 1-12.
232. Rius B, López-Vicario C, González-Pérez A, Morán-Salvador E, et al. (2012.) Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease. *Frontiers in Immunology.* 3.
233. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, et al. (2008.) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582: 1783-1787.
234. Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, et al. (2004.) Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci.* 24: 7324-7334.
235. Rosicka M, Krsek M, Matoulek M, Jarkovska Z, et al. (2003.) Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res.* 52: 61-66.
236. Saltiel AR and Pessin JE. (2002.) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 12: 65-71.
237. Sangiao-Alvarellos S and Cordido F. (2010.) Effect of ghrelin on glucose-insulin homeostasis: therapeutic implications. *Int J Pept.* 2010.
238. Sangiao-Alvarellos S, Helmling S, Vázquez MJ, Klusmann S, et al. (2011.) Ghrelin neutralization during fasting-refeeding cycle impairs the recuperation of body weight and alters hepatic energy metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 335: 177-188.
239. Sangiao-Alvarellos S, Vazquez MJ, Varela L, Nogueiras R, et al. (2009.) Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology.* 150: 4562-4574.
240. Schattenberg J and Czaja M (2005). Nature and Function of Hepatic Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling  
Signaling Pathways in Liver Diseases. J.-F. Dufour, P.-A. Clavien, C. Trautwein and R. Graf, Springer Berlin Heidelberg: 115-128.
241. Scheid MP and Woodgett JR. (2003.) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.* 546: 108-112.
242. Schisler NJ and Singh SM. (1987.) Inheritance and expression of tissue-specific catalase activity during development and aging in mice. *Genome.* 29: 748-760.

243. Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P and Baeuerle PA. (1995.) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Chemistry & Biology*. 2: 13-22.
244. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, et al. (2005.) Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet. *Obes Res*. 13: 2088-2094.
245. Shimabukuro M, Higa M, Zhou Y-T, Wang M-Y, et al. (1998.) Lipoapoptosis in Beta-cells of Obese Prediabeticfa/fa Rats. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 32487-32490.
246. Shinozaki S, Choi CS, Shimizu N, Yamada M, et al. (2011.) Liver-specific Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Is Sufficient to Cause Hepatic Insulin Resistance and Mild Hyperglycemia in Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 34959-34975.
247. Shrader WD, Amagata A, Barnes A, Enns GM, et al. (2011.) alpha-Tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. *Bioorg Med Chem Lett*. 21: 3693-3698.
248. Sies H and Cadenas E. (1985.) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 311: 617-631.
249. Simpson HL, Jackson NC, Shojaee-Moradie F, Jones RH, et al. (2004.) Insulin-Like Growth Factor I Has a Direct Effect on Glucose and Protein Metabolism, but No Effect on Lipid Metabolism in Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89: 425-432.
250. Slomiany B and Slomiany A. (2011a.) Ghrelin Suppression of Helicobacter pylori-Induced Gastric Mucosal Expression of iNOS is Mediated through the Inhibition of IKK- $\beta$  Activation by cNOS-Dependent S-Nitrosylation. *Open Journal of Cell Biology*. 1: 1-10.
251. Slomiany BL and Slomiany A. (2011b.) Role of ghrelin-induced cSrc activation in modulation of gastric mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylori. *Inflammopharmacology*. 19: 197-204.
252. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, et al. (1996.) The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol Endocrinol*. 10: 519-533.
253. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, et al. (1985.) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150: 76-85.
254. St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, et al. (2007.) Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 264-269.
255. Stengel A and Tache Y. (2012.) Ghrelin - a pleiotropic hormone secreted from endocrine  $\alpha/a$ -like cells of the stomach. *Front Neurosci*. 6: 24.
256. Stevanovic D, Milosevic V, Nestic D, Ajdzanovic V, et al. (2006.) Central effects of ghrelin on serum growth hormone and morphology of pituitary somatotropes in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231: 1610-1615.
257. Stevanovic D, Nestic D, Milosevic V, Starcevic V, et al. (2008.) Consummatory behavior and metabolic indicators after central ghrelin injections in rats. *Regul Pept*. 147: 52-59.

258. Stevanovic D, Starcevic V, Vilimanovich U, Nestic D, et al. (2012.) Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance. *Brain Behav Immun.* 26: 150-158.
259. Styskal J, Van Remmen H, Richardson A and Salmon AB. (2012.) Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radical Biology and Medicine.* 52: 46-58.
260. Subramaniam S and Unsicker K. (2006.) Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience.* 138: 1055-1065.
261. Sudar E (2011). Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom. Univerzitet u Beogradu.
262. Sudar E, Dobutovic B, Soskic S, Mandusic V, et al. (2011.) Regulation of inducible nitric oxide synthase activity/expression in rat hearts from ghrelin-treated rats. *J Physiol Biochem.* 67: 195-204.
263. Suematsu M, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, et al. (2005.) Decreased circulating levels of active ghrelin are associated with increased oxidative stress in obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 153: 403-407.
264. Suzuki H, Matsuzaki J and Hibi T. (2011.) Ghrelin and oxidative stress in gastrointestinal tract. *J Clin Biochem Nutr.* 48: 122-125.
265. Taha C and Klip A. (1999.) The insulin signaling pathway. *J Membr Biol.* 169: 1-12.
266. Takano A, Haruta T, Iwata M, Usui I, et al. (2001.) Growth Hormone Induces Cellular Insulin Resistance by Uncoupling Phosphatidylinositol 3-Kinase and Its Downstream Signals in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes.* 50: 1891-1900.
267. Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. (2006.) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 85-96.
268. Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, et al. (2004.) Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci.* 75: 1539-1549.
269. Tassone F, Broglio F, Destefanis S, Rovere S, et al. (2003.) Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5478-5483.
270. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, et al. (2006.) Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *The Journal of Clinical Investigation.* 116: 1983-1993.
271. Thielemans L, Peeters PJ, Jonckheere H, Luyten W, et al. (2007.) The hepatocarcinoma cell line HepG2 does not express a GHS-R1a-type ghrelin receptor. *J Recept Signal Transduct Res.* 27: 309-322.
272. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, et al. (2002.) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology.* 143: 1353-1361.
273. Toppo S, Vanin S, Bosello V and Tosatto SC. (2008.) Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 10: 1501-1514.

274. Torres M and Forman HJ. (2003.) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *BioFactors*. 17: 287-296.
275. Trayhurn P (2010). *Adipocyte Biology. Clinical Obesity in Adults and Children*, Wiley-Blackwell: 103-114.
276. Tschop M, Smiley DL and Heiman ML. (2000.) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 407: 908-913.
277. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, et al. (2001.) Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 24: RC19-21.
278. Tuzcu M, Sahin N, Orhan C, Agca C, et al. (2011.) Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutrition & Metabolism*. 8: 28.
279. Ulusu NN, Acan NL, Turan B and Tezcan EF. (2000.) The effect of selenium on glutathione redox cycle enzymes of some rabbit tissues. *Trace Elements and Electrolytes*. 17: 25-29.
280. Urban RJ, Padmanabhan V, Beitins I and Veldhuis JD. (1991.) Metabolic clearance of human follicle-stimulating hormone assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay, and in vitro Sertoli cell bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*. 73: 818-823.
281. van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H and Bast A. (2001.) Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr*. 86 Suppl 1: S121-127.
282. van der Lely AJ. (2009.) Ghrelin and new metabolic frontiers. *Horm Res*. 71 Suppl 1: 129-133.
283. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML and Ghigo E. (2004.) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 25: 426-457.
284. Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, et al. (1999.) Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys*. 363: 91-97.
285. Vestergaard ET, Gormsen LC, Jessen N, Lund S, et al. (2008.) Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes*. 57: 3205-3210.
286. Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S, et al. (2010.) Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Horm IGF Res*. 20: 1-7.
287. Votruba SB, Kirchner H, Tschop M, Salbe AD, et al. (2009.) Morning ghrelin concentrations are not affected by short-term overfeeding and do not predict ad libitum food intake in humans. *Am J Clin Nutr*. 89: 801-806.
288. Wadden D, Cahill F, Amini P, Randell E, et al. (2012.) Serum acylated ghrelin concentrations in response to short-term overfeeding in normal weight, overweight, and obese men. *PLoS One*. 7: e45748.
289. Wallace TM, Levy JC and Matthews DR. (2004.) Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*. 27: 1487-1495.

290. Wan XS, Devalaraja MN and St Clair DK. (1994.) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13: 1127-1136.
291. Wang X, McCullough KD, Franke TF and Holbrook NJ. (2000.) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 275: 14624-14631.
292. Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, et al. (2005.) Characterization and Regulation of the Rat and Human Ghrelin Promoters. *Endocrinology.* 146: 1611-1625.
293. Weissman BA, Jones CL, Liu Q and Gross SS. (2002.) Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent [125I]Calmodulin binding. *European Journal of Pharmacology.* 435: 9-18.
294. Whitmarsh AJ and Davis RJ. (1998.) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* 23: 481-485.
295. Willesen MG, Kristensen P and Romer J. (1999.) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 70: 306-316.
296. Williams DL, Cummings DE, Grill HJ and Kaplan JM. (2003.) Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology.* 144: 2765-2767.
297. Worthington DJ and Rosemeyer MA. (1975.) Glutathione reductase from human erythrocytes. Molecular weight, subunit composition and aggregation properties. *Eur J Biochem.* 60: 459-466.
298. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, et al. (2001.) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes.* 50: 2540-2547.
299. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, et al. (2000.) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 141: 4325-4328.
300. Wu H, Jin Y, Arias J, Bassuk J, et al. (2009.) In vivo upregulation of nitric oxide synthases in healthy rats. *Nitric Oxide.* 21: 63-68.
301. Xiao Z, Wang T, Qin H, Huang C, et al. (2011.) Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release modulates endothelial nitric-oxide synthase via extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2-mediated serine 635 phosphorylation. *J Biol Chem.* 286: 20100-20108.
302. Xu Y, Kinningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, et al. (1999.) An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol.* 18: 709-722.
303. Xu Z, Lin S, Wu W, Tan H, et al. (2008.) Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF-kappaB pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology.* 247: 133-138.
304. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, et al. (2008.) Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev.* 4: 18-23.
305. Yada T, Kaiya H, Mutoh K, Azuma T, et al. (2006.) Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J Endocrinol.* 189: 57-65.

306. Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, et al. (2002.) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular Cell*. 9: 1227-1240.
307. Yap JL, Worlikar S, MacKerell AD, Jr., Shapiro P, et al. (2011.) Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. *ChemMedChem*. 6: 38-48.
308. Yu X, Kennedy RH and Liu SJ. (2003.) JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 278: 16304-16309.
309. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, et al. (2001.) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 293: 1673-1677.
310. Zamocky M and Koller F. (1999.) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 72: 19-66.
311. Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR. (2000.) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*. 6: 347-373.
312. Zha J and Lackner MR. (2010.) Targeting the Insulin-like Growth Factor Receptor-1R Pathway for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 16: 2512-2517.
313. Zhou LZ, Johnson AP and Rando TA. (2001.) NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 31: 1405-1416.
314. Zhuravleva E, Tschopp O and Hemmings B (2010). Role of PKB/Akt in Liver Diseases. *Signaling Pathways in Liver Diseases*. J.-F. Dufour and P.-A. Clavien, Springer Berlin Heidelberg: 243-259.
315. Zwirska-Korczala K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pilc K, et al. (2007.) Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol*. 58 53-64.

## 9. Biografija

Branislava D. Dobutović, rođena 4.marta 1977. godine u Sremskoj Mitrovici, završila je Biološki fakultet, smer Biologija, Univerziteta u Beogradu, 2006. godine, odbranivši diplomski rad 13.12.2006. godine, sa ocenom 10.

Od 2007. godine upisala je poslediplomske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom programu „Animalna i humana fiziologija“, modul Eksperimentalna endokrinologija. Iste godine zaposlena je i u Institutu “Vinča” u laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku, department „Molekularna endokrinologija i bolesti metabolizma“, gde je kao istraživač saradnik, u potpunosti uradila eksperimentalni deo teze. Doktorska disertacija pod naslovom „Efekat grelina na regulaciju antioksidativnih enzima i inducibilne azot-monoksid-sintaze u jetri pacova ” prihvaćena je na Univerzitetu u Beogradu 27.09.2012. godine. Iz disertacije je do sada proistekao rad u vrhunskom međunarodnom časopisu *Archive of medical science*.

Takođe je bila i saradnik na projektima internacionalne saradnje COST ACTION BM 0602 i CM 0602. Učestvovala na nekoliko treninga i edukacija u organizaciji Evropske Komisije i Nemačkog centra za dijabetes. Svoj rad je prezentovala na kongresu „10th Annual Meeting of young endocrinologists“, u Kelnu; Nemačka, 2009. godine, a potom i 2012. godine na DAAD Summer School in Physiology and Molecular Biology, Beograd, oralnom prezentacijom.

U svom dosadašnjem radu bila je saradnik na 20 publikacija objavljenih u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na 6 radova saopštenih na skupu međunarodnog i domaćeg značaja.

Glavna oblast naučno-istraživačkog rada joj je: molekularna endokrinologija, diabetes, kardiovaskularna oboljenja i oksidativni stres.



# 10. Prilozi

Прилог 1.

**Изјава о ауторству**Потписани-а Бранислава Д. Добутовићброј индекса AA070003**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**„Ефекат грелина на регулацију антиоксидативних ензима и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у јетри пацова”**

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

**Потпис докторанта**У Београду, 27.05.2013.Добутовић Бранислава

## Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**Име и презиме аутора Бранислава Д. ДобутовићБрој индекса AA070003Студијски програм Биологија: Молекуларна ендокринологијаНаслов рада: „Ефекат грелина на регулацију антиоксидативних ензима и индуцибилне азот-моноксид-синтазе у јетри пацова”**Ментор:**

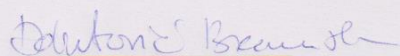
1. др Есма Исеновић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке "Винча", Београд
2. др Јелена Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Потписани/а Бранислава Д. Добутовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигитално репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанта**У Београду, 27.05.2013.

## Прилог 3.

**Изјава о коришћењу**

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

**“Ефекат грелина на регулацију антиоксидативних ензима и индуцибилне азот-монооксид-синтазе у јетри пацова”**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 27.05.2013

Потпис докторанта

