

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Maja M. Bundalo

**UTICAJ ISHRANE BOGATE FRUKTOZOM
NA EKSPRESIJU KOMPONENTI RENIN-
ANGIOTENZIN SISTEMA I INFLAMACIJE
U TKIVU SRCA PACOVA: POLNO
SPECIFIČNE RAZLIKE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Maja M. Bundalo

**THE EFFECT OF FRUCTOSE RICH DIET
ON THE EXPRESSION OF RENIN-
ANGIOTENSIN SYSTEM COMPONENTS
AND INFLAMMATORY MOLECULES IN
THE RAT HEART: SEX SPECIFIC
DIFFERENCES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori

dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za nuklearne nauke "Vinča"

dr Gordana Matić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Član komisije

dr Goran Korićanac, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za nuklearne nauke "Vinča"

Datum odbrane:

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku i u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu u okviru projekta "Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti", (br. ON175085) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

ZAHVALNICA

Posebno se zahvaljujem članovima komisije:

Dr Aleksandri Stanković, koja je osmislila ovu doktorsku disertaciju i nesebično mi pomagala pri realizaciji iste. Hvala na svim savetima, strpljenju, trudu i energiji uloženoj u izradu ove teze. Pre svega, veliko hvala što ste mi pružili mogućnost da se bavim naukom.

Prof. dr Gordani Matić na dragocenim savetima koji su doprineli da ova doktorska disertacija dobije konačni oblik.

Dr Goranu Korićancu na svim eksperimentima koji su urađeni u njegovoj laboratoriji, na savetima i sugestijama, kao i na velikoj pomoći pri pisanju radova.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Maji Živković** koja je uvek bila tu da me posavetuje i nauči. Hvala što ste mi pomogli da lakše prebrodim kritične trenutke.

Zahvaljujem se **dr Tamari Đurić** na svim savetima i na moralnoj podršci.

Zahvaljujem se **dr Ljiljani Stojković** na nesebičnoj pomoći i podršci u eksperimentalnom radu, na svemu što me je naučila i na vremenu koje je odvojila da bi odgovorila na sva moja pitanja.

Hvala **dr Ani Kolaković** na tome što me je uvek izveštavala o novostima u polju nauke.

Zahvaljujem se kolegama iz grupe **dr Gorana Korićanca** na pomoći koju su mi pružali tokom eksperimentalnog rada, kao i na svim sugestijama i savetima.

Zahvaljujem se **dr Ani Đorđević** na kritičkoj proceni radova čime je doprinela njihovoj publikaciji.

Veliko hvala **dr Snežani Jovanović-Ćupić** i **dr Nini Petrović** za to što su uvek bile spremne da mi priskoče u pomoć.

Veliko hvala svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku koji su doprineli stvaranju pozitivne radne atmosfere što mi je olakšalo izradu ove teze.

Goranu hvala na strpljenju i podršci tokom svih ovih godina.

Mojoj najvećoj ljubavi, mom **Ogiju**, hvala što postojiš.

Najveću zahvalnost dugujem mojim voljenim roditeljima – **Mariji i Milanu**. Hvala na veri u meni, na emotivnoj, fizičkoj i finansijskoj pomoći. Zbog svega što ste mi pružili ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama.

Uticao ishrane bogate fruktozom na ekspresiju komponenti renin-angiotenzin sistema i inflamacije u tkivu srca pacova: polno specifične razlike

REZIME

Ishrana bogata fruktozom predstavlja bitan faktor u razvoju metaboličkog sindroma koji je povezan sa povećanim rizikom za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da hronična inflamacija ima bitnu ulogu u njegovoj patogenezi. Ženke su zaštićene od ishranom izazvanih metaboličkih poremećaja i hipertenzije u reproduktivnom periodu. Estrogen, koji utiče na normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema, bi mogao doprinositi uočenim polno specifičnim razlikama u nastanku simptoma metaboličkog sindroma. Proteinske komponente renin-angiotenzin sistema (RAS) imaju bitnu ulogu u nastanku inflamacije, hipertenzije i insulinske rezistencije i na njihovu ekspresiju utiče estradiol. Ova doktorska disertacija je za cilj imala da ispita da li pol i estradiol doprinose promenama u ekspresiji komponenti RAS-a [angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE), angiotenzin konvertujućeg enzima 2 (ACE2), angiotenzinskog receptora tipa 1 (AT1R), angiotenzinskog receptora tipa 2 (AT2R) i kolektina] i medijatora inflamacije i remodelovanja tkiva srca [nuklearnog faktora κ B (NF κ B), matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i liganda 16 iz familije hemokina CXC (CXCL16)] kod animalnog modela metaboličkog sindroma.

Mužjaci i ženke pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze umesto vode u trajanju od 9 nedelja predstavljali su animalni model metaboličkog sindroma korišćen u ovoj studiji. Radi ispitivanja efekata estradiola jedan deo ženki pacova je ovarijektomisan i podeljen u tri grupe pri čemu je jedna grupa pored standardne laboratorijske hrane pila vodu, druga grupa je pila 10% rastvor fruktoze, a treća grupa je pored rastvora fruktoze primala i supstitucionu terapiju estradiolom. Ishrana bogata fruktozom je uzrokovala povećanje krvnog pritiska samo kod mužjaka pacova. Ovaj tip ishrane nije doveo do promena u masi srca niti u odnosu masa srca/masa tela ni kod jednog pola, kao ni kod ovarijektomisanih životinja što ukazuje da se hipertrofija srca nije razvila. Rezultati

biohemijskih analiza su pokazali da ishrana bogata fruktozom dovodi do hipertrigliceridemije kod oba pola, kao i kod ovarijektomisanih pacova. Kod ovarijektomisanih pacova ovaj tip ishrane dovodi i do hiperinsulinemije i insulinske rezistencije za koje se pokazalo da su revertibilne supstytucionom terapijom estradiolom. *Western blot* analiza je pokazala da ishrana bogata fruktozom uzrokuje povećanje nivoa ACE, istovremeno sa smanjenjem nivoa ACE2 i AT2R u srcu mužjaka pacova i ovarijektomisanih ženki. Metodom *Real-time PCR* je ustanovljeno da ishrana bogata fruktozom u srcu mužjaka pacova inhibira transkripciju gena koji kodira AT2R. Kod ženki ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze ne dovodi do promena u nivou ACE, ACE2 i AT2R. Iako ni kod jednog pola nije došlo do promene u nivou AT1R i MMP-9 nakon ishrane bogate fruktozom, ipak je detektovan veći nivo ovih molekula u srcu mužjaka pacova hranjenih fruktozom u odnosu na ženke. S druge strane, kod ovarijektomisanih ženki je ovaj tip ishrane doveo do povećanja nivoa i AT1R i MMP-9. U srcu pacova nakon ishrane obogaćene fruktozom nisu detektovane promene u nivou iRNK za CXCL16 i kolektrin. Kao posledica ishrane bogate fruktozom u srcu ovarijektomisanih pacova došlo je do povećanja nivoa iRNK za CXCL16 i do povećanja fosforilacije p65 subjedinice NFκB. Supstuciona terapija estradiolom kod ovarijektomisanih životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze je dovela do vraćanja nivoa ACE2 i AT2R na nivo detektovan kod kontrole, dok je nivo ACE, AT1R i MMP-9 bio čak manji od nivoa izmerenog kod kontrola. Uporedo sa ovim, estradiol je delovao antiinflamatorno smanjujući nivo fosforilacije NFκB i nivo iRNK za CXCL16.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji može se zaključiti da detektovane polno specifične promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a u srcu i razvoj hipertenzije, zajedno sa povećanjem nivoa medijatora inflamacije i remodelovanja, doprinose tome da mužjaci pacova budu podložniji za nastanak eventualnih budućih patoloških promena u strukturi i funkciji srca indukovanih ishranom bogatom fruktozom. Estrogen pokazuje zaštitni efekat na srce ovarijektomisanih ženki pacova ukidajući metaboličke promene na biohemijskom i molekularnom nivou nastale kao posledica ishrane bogate fruktozom, smanjujući inflamaciju i remodelovanje srca. Ova

doktorska distertacija je omogućila bolje razumevanje polno specifičnih razlika u patogenezi metaboličkog sindroma, kao i bolje razumevanje uloge RAS u ovom procesu.

Ključne reči: ishrana bogata fruktozom, polno specifične razlike, estradiol, srce, pacovi, inflamacija, renin-angiotenzin sistem, MMP-9, NFκB, CXCL16

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj: [577.114.3:591.53.063]:616.12]:57.017.5

The effect of fructose rich diet on the expression of renin-angiotensin system components and inflammatory molecules in the rat heart: sex specific differences

ABSTRACT

Fructose rich diet (FRD) represents an important factor in the development of metabolic syndrome. Metabolic syndrome is associated with increased risk for cardiovascular diseases occurrence and chronic inflammation has a major role in its pathogenesis. Females are protected from diet-induced metabolic disturbances and hypertension in their reproductive period. Estrogen, which influences the cardiovascular system, could contribute to the observed gender-specific differences in the onset of metabolic syndrome. Components of the renin-angiotensin system (RAS), the synthesis of which is mediated by estrogen, have an important role in the inflammatory processes, hypertension and insulin resistance. Almost all of the components of metabolic syndrome increase the activity of RAS, which finally results in increased oxidative stress and inflammation. The aim of this doctoral dissertation was to investigate sex specific changes and role of estradiol in the expression of RAS components [angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin receptor type 1 (AT1R), angiotensin receptor type 2 (AT2R) and collectrin], as well as mediators of inflammation and remodeling of heart tissue [nuclear faktor κ B (NF κ B), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and CXCL16 chemokine] in the animal model of metabolic syndrome.

Male and female rats, which consumed 10% fructose solution instead of water for 9 weeks, represent an animal model of metabolic syndrome that was used in this study. In order to examine the effects of estradiol in the context of FRD, female rats were ovariectomized and divided in three groups: fed normal diet, fed FRD, and fed FRD and subjected to estradiol replacement therapy. FRD increased blood pressure only in male rats. This diet regime didn't cause heart hypertrophy neither in intact males and females, nor in ovariectomized females. Biochemical analyses showed that FRD resulted in

hypertriglyceridemia in both sexes, as well as in ovariectomized females. Further, in ovariectomized females FRD caused hyperinsulinemia and insulin resistance, which were reverted with estradiol replacement therapy. Western blot analyses revealed that fructose fed males and fructose fed ovariectomised females had increased level of ACE, and decreased levels of ACE2 and AT2R in the heart compared to adequate controls. Real-time PCR method showed that FRD abolished gene transcription of AT2R in male rats. In females, there were no changes in RAS molecules expression as a consequence of FRD. Although FRD didn't cause changes in levels of AT1R and MMP-9 neither in males nor in females, their levels were higher in fructose fed males compared to fructose fed females. On the other side, we detected increased mRNA levels of AT1R and MMP-9 in ovariectomized fructose fed females. FRD didn't affect mRNA level of CXCL16 and collectrin in the heart of intact animals. In the heart of ovariectomized females this diet led to the increased mRNA level of CXCL16 and increased phosphorylation of p65 subunit of NFκB. Estradiol reverts changes in the level of MMP-9 and RAS components in the heart of fructose fed ovariectomised female rats. Further, estradiol showed antiinflammatory effect since it decreased phosphorylation of p65 subunit and mRNA level of CXCL16 in heart of fructose fed ovariectomized animals. Based on the results obtained in this study we can conclude that detected sex specific changes in the development of hypertension and cardiac RAS proteins expression, together with elevated inflammation and remodeling contributed to greater susceptibility of male rats for the occurrence of possible further pathological changes in the function and structure of the heart. Estrogen, demonstrating the ability to revert the biochemical and molecular changes, protects female rats from metabolic disorders and additionally reduces inflammation and heart remodeling that followed the FRD. This doctoral dissertation contributes to better understanding of gender specific differences in the pathogenesis of metabolic syndrome, as well as to better understanding of the role of RAS in this process.

Keywords: fructose rich diet, sex specific differences, estradiol, heart, rats, inflammation, renin-angiotensin system, MMP-9, NFκB, CXCL16

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular biology

UDC number: [577.114.3:591.53.063]:616.12]:57.017.5

SKRAĆENICE

ACE – angiotenzin konvertujući enzim

Ace-/- – organizmi sa isključenim genom koji kodira angiotenzin konvertujući enzim

Ace2-/- – organizmi sa isključenim genom koji kodira angiotenzin konvertujući enzim 2

ACE2 – angiotenzin konvertujući enzim 2

AGT – angiotenzinogen

Agtr2-/- – organizmi sa isključenim genom koji kodira angiotenzin II receptor tipa 2

ANG I – angiotenzin I

ANG II – angiotenzin II

Ang-(1-7) – angiotenzin (1-7)

Ang-(1-9) – angiotenzin (1-9)

ARB – blokatori receptora za angiotenzin (engl. *Angiotensin Receptor Blockers*)

AT1R – angiotenzin II receptor tipa 1

AT2R – angiotenzin II receptor tipa 2

ATP – adenzin tri fosfat

B2R – bradikininski receptor tipa 2

BCA – bicinhoninična kiselina

C domen – karboksi domen

cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

CRP – C reaktivni protein

CXCL16 – CXC ligand 16

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

E2 – estradiol

ECM – ekstracelularni matriks

EDTA – etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

eNOS – endotelna azot oksid sintaza (engl. *endothelial nitric oxid synthase*)

ERE – estrogenski responsivni element

ERK – kinaza regulisana ekstracelularnim signalima (engl. *Extracellular signal-regulated kinases*)

ER α – estrogenski receptor tipa α

ER β – estrogenski receptor tipa β

F – životinje koje su pile 10% rastvor fruktoze

FA – masne kiseline (engl. *fatty acid*)

FAA – slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acid*)

GLUT – glukozni transporter (engl. *Glucose transporter*)

GPRK – G protein receptorska kinaza (engl. *G-protein receptor kinase*)

GRE – glukokortikoidni responsivni element

HFCS – kukuruzni sirup sa visokim sadržajem fruktoze (engl. *high fructose corn syrup*)

HNF-1a – nuklearni faktor hepatocita-1a (engl. *hepatocyte nuclear factor-1a*)

HNF-1b – nuklearni faktor hepatocita-1b (engl. *hepatocyte nuclear factor-1b*)

HRP – peroksidaza rena (engl. *horseradish peroxidase*)

ECL – pojačana hemiluminiscenciju (engl. *enchanced chemiluminescence*)

ICAM-1 – adhezioni protein leukocita-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*)

IKK – I κ B kinazni kompleks

IL-1 – interleukin-1

IL-6 – interleukin-6

IR – insulinski receptor

iRNK – informaciona ribonukleinska kiseina

IRS-1 – supstrat za insulinski receptor 1 (engl. *insulin receptor supstrat-1*)

JAK – janus kinaza

JNK – c-jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinases*)

K – kontrolna grupa životinja

LDL – lipoproteini male gustine (engl. *low density lipoproteins*)

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinaze*)

MCP-1 – monocitni hemoatraktantni protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MI – infarkt miokarda (engl. *miocardial infarction*)

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

MODY – adultni tip dijabetesa kod mladih osoba (engl. *mature-onset diabetes of the young*)

MSK-1 – mitogenom i stresom aktivirana protein kinaza-1 (engl. *mitogen- and stress-activated protein kinase-1*)

N domen – amino domen

NADPH – nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NFκB – nuklearni faktor kappa B

NLS – signal za jedarnu lokalizaciju (engl. *nuclear localization signal*)

NO – azot oksid (engl. *nitric oxide*)

OVX – ovarijektomija

ox-LDL – oksidovani lipoproteini male gustine

PDGF – faktor rasta trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza

PLD – fosfolipaza D (engl. *phospholipase D*)

PPARγ – receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (engl. *peroxisome proliferator activated receptor*)

PVDF – polivinildifluoridne membrane

Pyk2 – Ca²⁺-zavisna prolinom bogata tirozin kinaza 2

RAS – renin-angiotenzin sistem

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – slobodni radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SDS-PAGE – elektroforeza na natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (engl. *Sodium Dodecil Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

SNARE – (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*)

SNS – simpatički nervni sistem

STAT – transduktor signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal transducer and Activator of Transcription*)

TG – trigliceridi

TIMP-1 – tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza-1 (engl. *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1*)

TLR – receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor- α*)

VCAM 1 – vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1 (engl. *vascular cell adhesion protein 1*)

VLDL – lipoproteini jako male gustine (engl. *very low desity lipoproteins*)

VSMC – glatke mišićne ćelije krvnih sudova (engl. *vascular smooth muscle cell*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metabolički sindrom i bolesti srca	1
1.2. Inflamacija u metaboličkom sindromu	2
1.3. Polne razlike u metaboličkom sindromu	3
1.4. Estrogeni	4
1.4.1. Estrogeni i regulacija genske ekspresije	4
1.4.2. Estrogeni i metabolizam	4
1.4.3. Estrogeni i srce	5
1.5. Ishrana obogaćena fruktozom	5
1.5.1. Metabolizam fruktoze	6
1.5.2. Fruktoza i inflamacija	8
1.5.3. Fruktoza i poremećaji koji leže u osnovi metaboličkog sindroma	8
1.6. Životinjski model metaboličkog sindroma	10
1.6.1. Ishrana bogata fruktozom i promene na srcu	10
1.7. Sistemski i tkivni RAS	11
1.7.1. Lokalni RAS u srcu	11
1.7.2. RAS i metabolički sindrom	14
1.7.3. Estrogeni i RAS	16
1.7.4. Angiotenzin konvertujući enzim tipa I (ACE)	17
1.7.4.1. ACE u regulaciji krvnog pritiska i metabolizma	17
1.7.5. Angiotenzin konvertujući enzim tipa II (ACE2)	18
1.7.6. Kolektrin	19
1.7.7. Angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1R)	20
1.7.7.1. Regulacija ekspresije AT1R	21
1.7.7.2. Signalni putevi AT1R.....	21
1.7.8. Angiotenzin II receptor tipa 2 (AT2R)	22
1.7.8.1. Signalni putevi AT2R	23
1.8. Nuklearni faktor κB	24

1.9. Metaloproteinaza matriksa-9 (MMP-9)	26
1.9.1. Regulacija ekspresije MMP-9	27
1.9.2. MMP-9 i srce	28
1.10. Hemokin CXCL16	29
1.10.1. CXCL16 i inflamacija	30
2. HIPOTEZA I CILJEVI	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Tretman životinja u studiji	32
3.2. Merenje krvnog pritiska i srčanog ritma	34
3.3. Izolacija srca, sakupljanje krvi i priprema krvne plazme za biohemijske analize	34
3.4. Određivanje koncentracije insulina i računanje HOMA indeksa	34
3.5. Izolacija proteina	35
3.6. Određivanje koncentracije proteina	35
3.7. Elektroforeza na natrijum dodecil sulfat poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	36
3.8. <i>Western blot</i> analiza	36
3.9. Izolacija ukupne ćelijske RNK iz tkiva srca i određivanje njene koncentracije	38
3.10. Obrada uzoraka RNK dezoksiribonukleazom	38
3.11. Reverzna transkripcija	38
3.12. Analiza relativnog nivoa iRNK reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu	39
3.13. Statistička obrada podataka	40
4. REZULTATI	41
4.1. Energetski unos	41
4.2. Masa tela i masa srca	42
4.3. Uticaj ishrane bogate fruktom na biohemijske parametre	44

4.4. Uticaj ishrane bogate fruktom na krvni pritisak i srčani ritam	45
4.5. Uticaj ishrane bogate fruktom na ekspresiju molekula RAS-a u srcu pacova	46
4.5.1. Nivo ACE	46
4.5.2. Nivo ACE2	47
4.5.3. Koncentracija iRNK za kolektrin	48
4.5.4. Nivo iRNK i proteina AT1R	49
4.5.5. Nivo iRNK i proteina AT2R	51
4.6. Nivo iRNK i proteina MMP-9	53
4.7. Aktivacija NFκB	55
4.8. Nivo iRNK za CXCL16	56
5. DISKUSIJA	57
5.1. Uticaj ishrane bogate fruktozom na morfološke i biohemijske karakteristike mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova	57
5.2. Uticaj ishrane bogate fruktozom na krvni pritisak mužjaka i ženki <i>Wistar</i> pacova	59
5.3. Promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a u srcu mužjaka i ženki pacova nakon ishrane bogate fruktozom	60
5.4. Efekat estadiola na promene u nivou proteina RAS-a u srcu ovarijektomisanih ženki pacova nakon ishrane bogate fruktozom	65
5.5. Polno specifične razlike u efektu ishrane bogate fruktozom na ekspresiju MMP-9	70
5.6. Uticaj ishrane bogate fruktozom i estradiola na aktivaciju NFκB	72
5.7. Uticaj ishrane bogate fruktozom i estradiola na nivo iRNK za CXCL16	74
6. ZAKLJUČCI	77
7. LITERATURA	79

1. UVOD

1.1. Metabolički sindrom i bolesti srca

Poremećaji koji leže u osnovi metaboličkog sindroma su: insulinska rezistencija, abdominalna gojaznost, hiperglikemija, povišen krvni pritisak i dislipidemija (Eckel i sar., 2005).

Metabolički sindrom je povezan sa povećanom stopom obolevanja od bolesti srca i krvnih sudova (Lakka i sar., 2002; Wilson i sar., 1999; Sattar i sar., 2003; Isomaa i sar., 2001). Iako svaka pojedinačna komponenta metaboličkog sindroma remeti strukturu i funkciju srca, kombinacija ovih komponenti donosi još veći rizik za nastanak srčanih oboljenja (Voulgari i sar., 2010; Chinali i sar., 2008). Insulinska rezistencija, gojaznost i dislipidemija dovode do slabosti srca kod ljudi (Ingelsson i sar., 2005; Kenchaiah i sar., 2002). Kod gojaznih pacijenata i osoba sa dijabetesom detektovan je povećan nivo triglicerida (TG) u srcu, a poznato je da akumulacija lipida u srcu ima bitnu ulogu u nastanku srčane disfunkcije (Kusminski i sar., 2009).

Poremećaji koji leže u osnovi metaboličkog sindroma dovode do narušavanja energetske bilansa u srcu. U fiziološkim uslovima srce prvenstveno koristi masne kiseline (FA, engl. *fatty acid*) kao glavni izvor energije, dok glukozu koristi u mnogo manjoj meri. Glukoza, laktat i ketoni postaju dominantan izvor energije u srcu u određenim patološkim stanjima kao što su gojaznost, dijabetes i insulinska rezistencija (Kodde i sar., 2007; Buchanan i sar., 2005; Peterson i sar., 2008; Belke i sar., 2002).

Kod pacijenata sa metaboličkim sindromom zabeležen je povećan oksidativni stres i smanjena aktivnost superoksid dismutaze (Palmieri i sar., 2006; Armutcu i sar., 2008; Ford i sar., 2003). Slobodni radikali (ROS, engl. *reactive oxygen species*) smanjuju perfuziju srca narušavajući funkciju endotela (Widlansky i sar., 2003; Scognamiglio i sar., 2005). ROS mogu imati i direktan uticaj na kardiomiocite izazivajući poremećaje u proizvodnji energije

od strane mitohondrija (Diamant i sar., 2003; Metzler i sar., 2002). ROS utiču na signalni put insulina uzrokujući insulinsku rezistenciju (Houstis i sar., 2006), smanjenu bioraspoloživnost azot oksida (NO, *nitric oxide*) (Wold i sar., 2005), promene u metabolizmu kalcijuma (Barouch i sar., 2002) i oštećenje mitohondrija što na kraju rezultuje poremećenim remodelovanjem srca i disfunkcijom komora (Wilkinson i sar., 2004).

1.2. Inflamacija u metaboličkom sindromu

Hronična inflamacija ima ulogu u patogenezi metaboličkog sindroma (Ridker i sar., 2003; Festa i sar., 2000). Inflamacija koja prati metabolički sindrom se ne uklapa u klasičnu definiciju akutne ili hronične inflamacije i naziva se hroničnom inflamacijom niskog intenziteta. Pošto je aktivirana metabolizmom naziva se još i metainflamacija ili parainflamacija (Hotamisligil, 2006; Medzhitov, 2008). Nastaje prekomernim unosom hranjivih materija. To dovodi do metaboličkog suficita. Tada specijalizovane metaboličke ćelije (adipociti, hepatociti ili miociti) mogu da, kao odgovor na opasnost, pokrenu ćelijski odbrambeni mehanizam i inflamatorni odgovor. Ovi inflamatorni putevi uključuju aktivaciju tool-like receptora (TLR, engl. *tool-like receptors*), c-jun N-terminalne kinaze (JNK, engl. *c-Jun N-terminal kinases*), nuklearnog faktora kappa B (NFκB, engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i receptora γ aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PPAR γ , engl. *peroxisome proliferator activated receptor*), što dovodi do proizvodnje proinflamatornih citokina (Gregor i Hotamisligil, 2011). Na sistemskom nivou dolazi do povećanja nivoa proteina akutne faze, CRP-a (Osborn i Olefsky, 2012; Lumeng i Saltiel, 2011). Povećano otpuštanje hemotaktičnih molekula dovodi do regrutacije imunskih ćelija kao što su makrofagi, mast ćelije, limfociti, eozinofili i dendritičke ćelije u tkiva zahvaćena inflamacijom (Chmelar, i sar., 2013). Inflamatorni markeri bi stoga mogli da se koriste u cilju predikcije kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa tipa 2 kako kod zdravih osoba, tako i kod pacijenata sa metaboličkim sindromom (Schmidt i sar., 1999; Rader, 2000).

1.3. Polne razlike u metaboličkom sindromu

Postoje polno specifične razlike u relativnom riziku za nastanak metaboličkih komplikacija (Seerat i Saroj, 2012). Eksperimenti na životinjama su pokazali da su ženke u reproduktivnom periodu zaštićene od razvoja metaboličkih poremećaja i hipertenzije izazvanih ishranom. Neke studije su pokazale da muškarci imaju veću stopu oboljevanja od metaboličkog sindroma u odnosu na žene (Njelekela i sar., 2009; Balkau i sar., 2002; Pannier i sar., 2006), dok druge studije pokazuju suprotno (Ahonen i sar., 2009; He i sar., 2007). Smatra se da su za to odgovorni polni hormoni (Galipeau i sar., 2002; Korićanac i sar., 2013). Polne razlike u razvoju metaboličkog sindroma bi mogle doprineti postojanju polno specifičnih razlika u nastanku kardiovaskularnih bolesti (Regitz-Zagrosek i sar., 2006; Njelekela i sar., 2009).

Stopa obolevanja od metaboličkog sindroma kod žena raste sa pojavom menopauze (Carr, 2003). U menopauzi obično dolazi do pojave gojaznosti i do redistribucije masnog tkiva od glutealne (Williams, 2004) ka abdominalnoj frakciji što podseća na distribuciju koja se sreće kod muškaraca i naziva se androidnim tipom gojaznosti (Tchernof i sar., 2000; Gambacciani i sar., 1999). Ovaj tip gojaznosti je povezan sa povećanom kardiovaskularnom smrtnošću i razvojem dijabetesa tipa 2 (Bjorntorp, 2000). S obzirom da visceralno masno tkivo predstavlja bitan izvor slobodnih masnih kiselina (FFA, engl. *free fatty acid*) i medijatora inflamacije koji se sekretuju u portalnu venu, nije neočekivano da preokret od periferne ka centralnoj gojaznosti dovodi do metaboličkih poremećaja (Wajchenberg, 2000; Krotkiewski i sar., 1983).

Žene pre menopauze imaju manju verovatnoću za nastanak hipertenzije u odnosu na muškarce istih godina. Porast stope hipertenzije je daleko veći kod žena nakon menopauze nego kod muškaraca iste životne dobi (Gasse i sar., 2001). To se objašnjava prekomernom aktivacijom renin-angiotenzin sistema (RAS) i gojaznošću kod žena nakon menopauze. Polni hormoni, prvenstveno estrogen, u bitnoj meri utiče na aktivnost RAS-a (Fischer i sar., 2002). S druge strane, i sam androgeni tip gojaznosti predstavlja nezavistan faktor rizika za nastanak hipertenzije (Pechere-Bertschi i Burnier, 2004).

1.4. Estrogeni

Brojna ispitivanja urađena kako na ljudima tako i na životinjama su pokazala da bi promene u nivou estrogena ili njihovih receptora mogle da dovedu do simptoma metaboličkog sindroma (Eshtiaghi i sar., 2010; Heine i sar., 2000; Bryzgalova i sar., 2006; Takeda i sar., 2003; Jones i sar., 2000; Bryzgalova i sar., 2008).

1.4.1. Estrogeni i regulacija genske ekspresije

Estrogeni se vezuju za estrogenske receptore tipa α i β (ER α i ER β) koji potom menjaju svoju konformaciju i dimerizuju. U zavisnosti od identiteta i koncentracije liganda formiraju se različiti dimeri: ER α -ER α homodimeri, ER β -ER β homodimeri i ER α -ER β heterodimeri (Powell i sar., 2008). Dimer se vezuje za estrogen-responsivni element (ERE) nakon čega interaguje sa kofaktorima i učestvuje u regulacije genske ekspresije (Nilsson i sar., 2001). Pored klasičnih jedarnih ER, čija aktivacija dovodi do promena u transkripciji gena u roku od nekoliko sati (Shang i sar., 2000), postoje i ekstranuklearni ER koji aktiviraju različite proteinske kinaze koje fosforilišu različite proteine (Fu i Simoncini, 2008). Preko ovih receptora estradiol može aktivirati brze signale koji deluju u roku od nekoliko sekundi ili minuta (Hammes i Levin, 2007).

1.4.2. Estrogeni i metabolizam

Estrogeni imaju bitan uticaj prvenstveno na metabolizam lipida ali i na druge komponente metaboličkog sindroma (Misso i sar., 2005). Nedostatak estrogena rezultuje povećanjem ukupnog udela masnog tkiva, gojaznošću (Danilovich i sar., 2000; Heine i sar., 2000) i hiperholesterolemijom (Hewitt i sar., 2003; Jones i sar., 2000). Estrogeni ublažavaju insulinsku rezistenciju i olakšavaju procesovanje lipoproteina niske gustine (LDL, engl. *low density lipoprotein*) od strane jetre (Riant i sar., 2009; Windler i sar., 1980). Ženke miševa i drugih glodara, kao i žene sa normalnim nivoom estradiola su zaštićene od insulinske rezistencije indukovane ishranom (Frias i sar., 2001; Hevener i sar., 2002; Hong i sar., 2009). Nakon menopauze kod žena ili nakon ovarijskeektomije kod eksperimentalnih životinja uočava se naglo smanjenje osetljivosti na insulin paralelno sa porastom mase masnog tkiva,

cirkulišućih inflamatornih markera, LDL-a, TG i FA (Pfeilschifter i sar., 2002; Sites i sar., 2002; Carr, 2003). Ovarijektomisani pacovi i miševi su rezistentni na insulin (Campbell i sar., 2002), dok supstituciona terapija estradiolom održava insulinsko delovanje i toleranciju na glukozu na fiziološkom nivou (Stubbins i sar., 2012). Estradiol povećava osetljivost na insulin kod glodara i ljudi oba pola sve dok je prisutan u uskim fiziološkim granicama. Ukoliko postigne koncentraciju veću od fiziološke dolazi do nastanka insulinske rezistencije usled hiperinsulinemije u jetri i usled smanjenja ekspresije glukoznog transportera tipa 4 (GLUT4) u mišićima (Nadal i sar., 2009; Barros i sar., 2008).

1.4.3. Estrogeni i srce

Estrogeni su odgovorni za normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema (Deroo i Korach, 2006). Većina dejstava estradiola se ostvaruje preko ER i uključuje i genomske i negenomske puteve (Baross i Gustafsson, 2011).

Brojni eksperimenti na životinjama su pružili dokaze o zaštitnom dejstvu estrogena na kardiovaskularni sistem (Mendelsohn i Karas, 1999; Pinto i sar., 1997; Hulley i sar., 1998; Shinmura i sar., 2008). 17 β -estradiol deluje protektivno na nastanak ateroskleroze (Hayashi i sar., 1992), inflamacije (Koh, 2002) i ima pozitivno dejstvo na funkciju endotela i vaskulature (Gorodeski i sar., 1995). Estradiol takođe utiče i na aktivnost endotelne azot oksid sintaze (eNOS, engl. *endothelial nitric oxid synthase*) što dodatno doprinosi njegovoj zaštitnoj funkciji u tkivu srca (Khalil, 2005).

1.5. Ishrana obogaćena fruktozom

Povećan unos fruktoze predstavlja bitan faktor u razvoju metaboličkog sindroma i komplikacija koje ga prate (Miller i Adeli, 2008). Unos fruktoze putem voća je nizak ~ 15 grama na dan, i ne dovodi do značajnih promena u metabolizmu. Međutim, šezdesetih godina prošlog veka je napredak tehnologije omogućio jeftinu proizvodnju sirupa sa visokim sadržajem fruktoze koji se dobija iz kukuruza (HFCS eng. *high fructose corn syrup*), i samim tim fruktoza je počela masovno da se korisiti kao zaslađivač (Hanover i White, 1993). Zbog izuzetne slatkoće i niske cene sredinom osamdesetih godina je HFCS postao

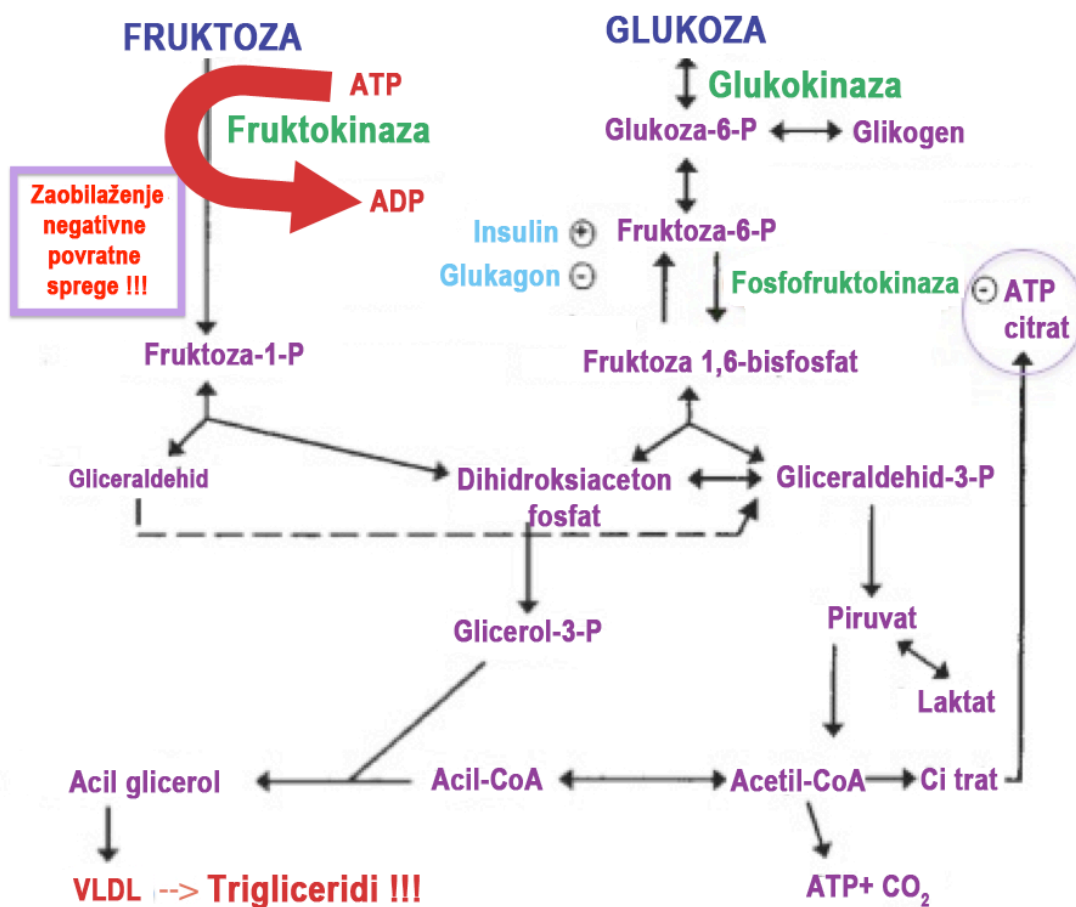
najzastupljeniji zaslađivač u industriji gaziranih pića. Procene su da poslednjih decenija više od 30% totalnog unosa energije čini fruktoza (Johnson i sar., 2009).

Porast konzumacije fruktoze tokom poslednjih 30 godina koincidira sa povećanom rasprostranjenošću gojaznosti i metaboličkog sindroma (Havel, 2005). Eksperimenti na raznim životinjskim modelima su pokazali da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do nastanka insulinske rezistencije, gojaznosti, hiperlipidemije i hipertenzije (Havel, 2005; Basciano i sar., 2005). Ispitivanja na ljudima su pokazala da je konzumacija hrane obogaćene fruktozom povezana sa razvojem insulinske rezistencije i dislipidemije (Le i Tappy, 2006).

1.5.1. Metabolizam fruktoze

I pored izrazite sličnosti u hemijskoj strukturi, fruktoza i glukoza se metabolišu potpuno različitim putevima (***Slika 1.1***) i koriste različite GLUT transportere (Zhao i Keating, 2007). Fruktoza se iz digestivnog trakta apsorbuje u portalnu venu preko GLUT5 (Havel, 2005), a iz portalnog krvotoka je preuzima jetra pomoću GLUT2 (Cheeseman, 1993). Fruktoza se prvo fosforiliše enzimom fruktokinazom i nastaje fruktoza-1-fosfat koja se posredstvom aldolaze B konvertuje u D-gliceraldehid i dihidroksiaceton fosfat. D-gliceraldehid se dalje fosforiliše i nastavlja proces glikolize do piruvata. Oba molekula mogu biti prevedena u gliceraldehid-3-fosfat. Neki od ovih molekula se mogu konvertovati u glukozu procesom glukoneogeneze ili mogu biti iskorišćeni za produkciju drugih molekula kao što su TG.

Postoji nekoliko koraka u metabolizmu glukoze koji inhibiraju formiranje TG. Ovi koraci obuhvataju pretvaranje glukoze u glikogen, ponovno stvaranje glukoze kroz proces glukoneogeneze i inhibiciju glikolize i daljeg preuzimanja glukoze usled negativne povratne inhibicije enzima fosfofruktokinaze. S druge strane, u metabolizmu fruktoze učestvuje enzim fruktokinaza koji omogućava zaobilazanje enzima fosfofruktokinaze. Time dolazi do neograničenog ulaska ugljenih hidrata u proces glikolize.



Slika 1.1. Razlike u metabolizmu fruktoze i glukoze (preuzeto i modifikovano sa truttmd.com)

Trioze nastale degradacijom fruktoze mogu eventualno biti iskorišćene za sintezu glicerola i FA, koji kroz esterifikaciju mogu formirati TG. Prema tome, visok unos fruktoze može dovesti do prevelike sinteze TG (Havel, 2005). U jetri se potom iz ovih TG mogu formirati lipoproteini veoma male gustine (VLDL, engl *very low density lipoprotein*). Kako VLDL partikule putuju krvotokom, TG mogu biti hidrolizovani lipoproteinskom lipazom do FFA i monoacilglicerola. Masno tkivo može preuzeti ove komponente i opet formirati TG. Prema tome, preterani unos fruktoze može rezultovati povišenim nivoom FFA i gojaznošću (Havel, 2005; Rutledge i Adeli 2007).

Druga posledica konverzije fruktoze u fruktozo-1-fosfat enzimom fruktokinazom je prekomerno iskorišćavanje adenozin tri fosfata (ATP) kao donora fosfata. S obzirom da fruktokinaza nije podložna negativnoj povratnoj inhibiciji dolazi do akumulacije fosforilisanih supstrata i do potpunog iskorišćavanja ATP-a u jetri što na kraju rezultuje povećanom degradacijom nukleotida do urične kiseline (Maenpaa i sar., 1968). Urična kiselina inhibira *in vivo* i *in vitro* sintezu endotelnog NO (Khosla i sar., 2005) i direktno uzrokuje disfunkciju adipocita (Sautin i sar., 2007).

1.5.2. Fruktoza i inflamacija

Mnoge studije urađene na eksperimentalnim životinjama su potvrdile da fruktoza indukuje inflamaciju. Fruktoza, za razliku od glukoze, brzo povećava ekspresiju adhezionog proteina leukocita ICAM-1 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) u endotelnim ćelijama poreklom iz ljudske aorte (Glushakova i sar., 2008). Povećana ekspresija ICAM-1, VCAM-1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Protein 1*), kao i povećana infiltracija makrofaga i aktivacija NFκB u aorti pacova nakon ishrane bogate fruktozom ukazuju na prisustvo inflamacije (Tan i sar., 2008). Kod pacova je nakon ishrane bogate fruktozom detektovan i povećan nivo interleukina (IL-1 i IL-6) u plazmi (Armutcu i sar., 2005).

Inflamacija i oksidativni stres imaju bitnu ulogu u razvoju simptoma metaboličkog sindroma kod pacova nakon ishrane bogate fruktozom (Delbosc i sar., 2005). Povećana zastupljenost fruktoze u ishrani vodi aktivaciji RAS-a čiji je glavni efektorni molekul povezan sa oksidativnim stresom (Iyer i sar., 1996; Hitomi i sar., 2007).

1.5.3. Fruktoza i poremećaji koji leže u osnovi metaboličkog sindroma

Fruktoza, za razliku od glukoze, ne stimuliše sekreciju insulina i leptina koji smanjuju skladištenje TG u masnom tkivu (Grant i sar., 1980; Curry, 1989). Insulinska rezistencija i gojaznost uzrokovane dugoročnom konzumacijom namirnica bogatih fruktozom dovode do pojave kompenzatorne hiperinsulinemije (Rohner-Jeanrenaud i Jeanrenaud, 1996). Fruktoza ne samo da dovodi do pojave insulinske rezistencije u metaboličkim tkivima kao što su jetra, mišići i masno tkivo, već takođe indukuje pojavu

insulinske rezistencije u srcu (Deng i sar., 2007). Insulinska rezistencija je kod pacova hranjenih fruktozom povezana sa povećanjem ekspresije angiotenzin II receptora tipa 1 (AT1R), kao i oksidaze nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) koja je odgovorna za povećan nivo superoksidnih anjona (Shinozaki i sar., 2004).

Ishrana obogaćena fruktozom dovodi do povećanja krvnog pritiska kod životinja (Erlich i Rosenthal., 1995; Suzuki i sar., 1997; Verma i sar., 1994). Smatra se da preterana produkcija urične kiseline, hiperinsulinemija, formiranje aldehida, i poremećaji u reaktivnosti krvnih sudova dovode do ovog efekta fruktoze (Reiser, 1985; Daly i sar., 1997; Vasdev i sar., 1998; Verma i sar., 1996). Insulinska rezistencija i hiperinsulinemija mogu dovesti do hipertenzije povećanjem aktivacije simpatičkog nervnog sistema (SNS), povećanjem koncentracije kateholamina u plazmi ili povećanjem reapsorpcije tečnosti u proksimalnim tubulama (Reaven i sar., 1988). S druge strane, urična kiselina smanjivanjem nivoa vazodilatatornog NO može biti uzrok nastanka hipertenzije (Nakagawa i sar., 2005). Postoji i veza između inflamacije uzrokovane ishranom obogaćenom fruktozom i hipertenzije. Povećani nivoi insulina, vodonik peroksida i angiotenzina I (ANG I) su izmereni u srcu i aorti hipertenzivnih životinja hranjenih fruktozom. Sve ove promene se mogu revertovati kaptoprilom, inhibitorom angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE, engl. *Angiotensin Converting Enzyme*), što ukazuje na veoma bitnu ulogu RAS-a u nastanku poremećaja izazvanih ishranom obogaćenom fruktozom (Nyby i sar., 2007). Hipertenzija uzrokovana preteranom konzumacijom fruktoze je povezana sa povećanom ekspresijom AT1R u masnom tkivu (Giacchetti i sar., 2000). Konzumacija velike količine fruktoze kod miševa dovodi do pojave noćne hipertenzije i disbalansa autonomnog nervnog sistema što je povezano sa aktivacijom SNS-a i RAS-a (Farah i sar., 2006).

Brojne studije su pokazale da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do pojave hiperlipidemije kod glodara (Storlien i sar., 1993; Herman i sar., 1970; Okazaki i sar., 1994). Naime, kod izbalansirane ishrane postoji malo *de novo* lipogeneze iz glukoze (Hellerstein, 1996). S druge strane, zabeležen je porast *de novo* lipogeneze za 3-15 puta u slučaju fruktoze kao supstarata (Schwarz i sar., 1993; Bhosale i sar., 1996). Istraživanja na ljudima su

pokazala da ishrana obogaćena fruktozom dovodi do porasta nivoa TG i holesterola (Hallfrisch i sar., 1983; Reiser i sar., 1989; Teff i sar., 2002).

1.6. Životinjski model metaboličkog sindroma

Istraživanje na pacovima je pokazalo da ishrana obogaćena fruktozom i saharozom, ali ne i glukozom, dovodi do povećanja telesne mase i smanjenja tolerancije na glukozu. Pacovi hranjeni fruktozom unose više kalorija od životinja na standardnoj ishrani (Kanarek i Orthen-Gambil, 1982). Ishrana obogaćena fruktozom kod glodara dovodi do nastanka simptoma metaboličkog sindroma kao što su visok nivo TG, adipoznost, insulinska rezistencija, hiperinsulinemija, hipertenzija i netolerancija na glukozu (Tran i sar., 2009; Kamide i sar., 2002; Brito i sar., 2008; Machi i sar., 2012; Mostarda i sar., 2012; Sanches i sar., 2012; Abdulla^a i sar., 2011; Thorburn i sar., 1989; Hallfrisch i sar., 1979; Higashiura, 2000).

Metabolički sindrom se može eksperimentalno izazvati hranjenjem pacova 60% fruktozom (Hwang i sar., 1987; Nakagawa i sar., 2006) ili upotrebom 10-20% rastvora fruktoze umesto vode (Dai i McNeill, 1995). Ovi različiti načini administracije fruktoze mogu dovesti do manifestacije različitih komponenti metaboličkog sindroma (Sanchez-Lozada i sar., 2007).

1.6.1. Ishrana bogata fruktozom i promene na srcu

Ovaj životinjski model omogućava praćenje promena u kardiovaskularnom tkivu koje prate metabolički sindrom. Ishrana obogaćena 60% fruktozom kod pacova dovodi do ventrikularne dilatacije, smanjenja ventrikularne kontraktilne funkcije, hipertrofije srca, infiltracije inflamatornih ćelija u srce, povećanja oksidativnog stresa, kao i do povećane aktivacije NFκB u srcu (Bagul i sar., 2005; Padiya i sar., 2014; Patel i sar., 2009; Chang i sar., 2007). Ishrana obogaćena fruktozom povećava nivo angiotenzina II (ANG II) koji aktivirajući AT1R dovodi do proliferacije fibroblasta. To uzrokuje povećanje sinteze kolagena tipa II i njegovu akumulaciju u srcu što rezultuje remodelovanjem tkiva (Paul i sar., 2006; Kamide i sar., 2002; Giani i sar., 2010). Studije u kojima je pacovima davan 10%

rastvor fruktoze su pokazala da ovaj tretman dovodi do hipertrofije srca, povećanja prečnika miocita i do fibroze leve komore sa perivaskularnim taloženjem kolagena tipa III u srcu (Miatello i sar., 2005; Giani i sar., 2010; Xohg i sar., 2010).

Povećana simpatička stimulacija srca i krvnih sudova prethodi nastanku metaboličkih poremećaja kod pacova hranjenih fruktozom. To ukazuje da bi promene u autonomnoj stimulaciji mogle da predstavljaju okidač za nastanak čitavnog skupa simptoma povezanih sa kardiometaboličkim bolestima (Machi i sar., 2012; Mostarda i sar., 2012; Sanches i sar., 2012).

1.7. Sistemski i tkivni RAS

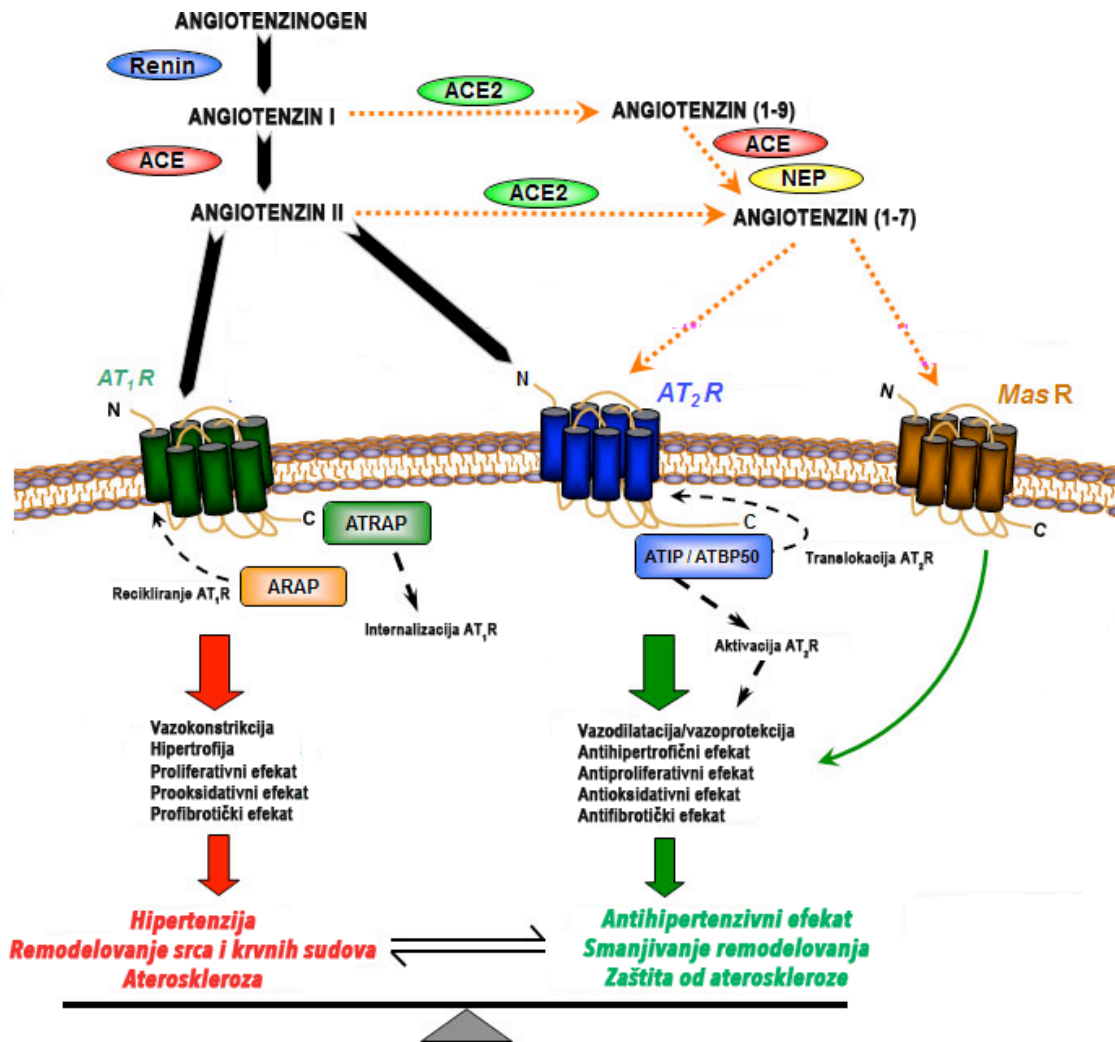
Po svojoj osnovnoj definiciji RAS predstavlja peptidergički sistem sa endokrinim karakteristikama. RAS se karakteriše prisustvom peptidnih hormona koji imaju bitnu ulogu u održavanju ravnoteže telesnih tečnosti i krvnog pritiska ali su uključeni i u patogenezu kardiovaskularnih bolesti. Komponente RAS-a čine: renin koji se sintetiše u bubrezima i seče angiotenzinogen (AGT) do ANG I; delovanjem ACE koji se uglavnom nalazi na endotelnim ćelijama, ANG I se dalje konveruje u aktivni peptid ANG II koji svoje dejstvo ostvaruje posredstvom dva tipa receptora: AT1R i angiotenzin II receptora tipa 2 (AT2R). Enzim homolog ACE zove se angiotenzin konvertujući enzim 2 (ACE2, engl. *Angiotensin Converting Enzyme 2*). ACE2 prevodi ANG II u angiotenzin (1-7) (Ang-(1-7)) (Tipnis i sar., 2000; Donoghue i sar., 2000; Vickers i sar., 2002) koji se vezuje za Mas receptor (Santos i sar., 2003).

1.7.1. Lokalni RAS u srcu

Klonirani su geni svih komponenti RAS-a i njihova ekspresija je detektovana u mnogim tkivima što je poslužilo kao dokaz za mogućnost sinteze ANG II na lokalnom nivou. Najvažnija fiziološka uloga RAS-a u srcu je održavanja odgovarajućeg ćelijskog okruženja uspostavljanjem ravnoteže među stimulusima koji indukuju i inhibiraju ćelijski rast i proliferaciju, kao i posredovanjem u adaptivnom odgovoru na miokardijalni stres (Paul i sar., 2006). Više od 90% ANG I detektovanog u srcu se sintetiše lokalno, kao i više

od 75% ANG II (Van Kats i sar., 1998). iRNK koja kodira ACE je detektovana u srcu pacova i čoveka (Hirsch i sar., 1991; Kreutz i sar., 1995; Schunkert i sar., 1990). ACE sintetišu fibroblasti i koronarne endotelne ćelije (Katwa i sar., 1995; Zhou i sar., 1994). Detektovana je i ekspresija ACE2 u srcu pacova (Crackower i sar., 2002; Tipnis i sar., 2000) i čoveka (Burrell i sar., 2005; Goulter i sar., 2004). Srčane miocite i fibroblasti ekspimiraju AT1R (Allen i sar., 2000; Saito i sar., 1987; Crabos i sar., 1994; Koch-Weser, 1964) čijom aktivacijom ANG II ostvaruje pozitivno jonotropno dejstvo (Koch-Weser, 1964).

Lokalno produkovan ANG II indukuje fibrozu i hipertrofiju srca aktivacijom AT1R i signalnih puteva faktora rasta (Pinto i sar., 2000.; Sun i sar., 1997; Dostal, 2000), dok aktivacija AT2R dovodi do suprotnih efekata (Steckelings i sar., 2005; Yan i sar., 2008). Fibroza rezultuje povećanjem krutosti komora i finalno dovodi do dijastolne disfunkcije i slabosti srca (Bader, 2010). Hipertrofija kardiomiocita predstavlja kompenzatorni mehanizam za održavanje funkcije srca u fiziološkim uslovima, ali može predstavljati i veliki rizik za nastanak kongestivne slabosti srca i iznenadne srčane smrti (Dzau i sar., 2001). ACE inhibitori i antagonisti AT1R sprečavaju ili smanjuju stepen hipertrofije srca. Ovi lekovi smanjuju i remodelovanje srca nakon infarkta i, poboljšavajući njegov funkcionalni status, smanjuju smrtnost (Pfeffer i sar., 1988; Pfeffer i Braunwald, 1990). Naime, AT1R u tkivu srca ima ulogu u apoptozi (Cigola i sar., 1997) koja je odgovorna za remodelovanje srca nakon infarkta miokarda (MI, engl. *miocardial infarction*) (Anversa i sar., 1998) i kod hipertenzivne i dijabetičke kardiomiopatije (Diez i sar., 1997; Fiordaliso i sar., 2000). U eksperimentima je pokazano da su miševi kod kojih nema lokalne proizvodnje AGT u srcu barem delimično zaštićeni od hipertrofije i fibroze srca izazvane hipertenzijom (Kang i sar., 2002). S druge strane, miševi koji uopšte nemaju ANG II ili AT1R razvijaju hipertrofiju srca (Hamawaki i sar., 1998). Prekomerna aktivacija RAS-a u srcu može uzrokovati smanjenu dijastolnu relaksaciju (Schunkert i sar., 1993; Rothermund i sar., 2000; Rothermund i sar., 2001), a pored strukturnih abnormalnosti dovodi i do promena u sprovođenju električnog nadražaja uzrokujući aritmije (Delpon i sar., 2005; Healey i sar., 2005).



Slika 1.2. RAS u srcu (preuzeto i modifikovano iz Jones i sar., 2008; NEP- Neutralna endopeptidaza; ARAP1 i ATRAP- proteini asocirani sa AT₁R koji promovišu recikliranje ili internalizaciju AT₁R receptora; ATIP1- AT₂R interagujući protein-1)

Brojne studije su nedavno sprovedene u cilju razjašnjavanja uloge ACE2-Ang-(1-7)-Mas ose u srcu. Miševi koji nemaju ACE2 ili Mas imaju smanjenju ventrikularnu kontraktilnu funkciju (Oudit i sar., 2006; Yamamoto i sar., 2006; Santos i sar., 2006). Ang-(1-7) štiti miševe i pacove od hipertrofije srca (Santos i sar., 2004; Mercure i sar., 2008). Naime, Ang-(1-7) nakon vezivanja za Mas receptor povećava produkciju NO i fosforilaciju

protein kinaze B (Akt) u kardiomiocitima (Dias-Peixoto i sar., 2008), istovremeno smanjujući ekspresiju kolagena i faktora rasta fibroblasta (Iwata i sar., 2005) (*Slika 1.2.*).

1.7.2. RAS i metabolički sindrom

S obzirom da ANG II ima značajnu ulogu u nastanku hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i insulinske rezistencije (Henriksen, 2007; Folli i sar., 1997), RAS bi mogao predstavljati ključnu vezu između gojaznosti, dijabetesa i hipertenzije u metaboličkom sindromu (Boustany i sar., 2004; Schmieder i sar., 2007). Upotreba lekova koji inhibiraju delovanje ANG II ne samo da snižava krvni pritisak već povećava i insulinsku senzitivnost, a takođe može odložiti i pojavu dijabetesa (Yusuf i sar., 2000; Fogari i sar., 1998; Sowers i sar., 2001; Abuissa i sar., 2005). Klinička ispitivanja su pokazala da su ACE inhibitori i blokatori receptora za angiotenzin (ARB, engl. *Angiotensin Receptor Blockers*) uspešni u tretmanu pacijenta sa poremećenom tolerancijom glukoze (Abuissa i sar., 2005; Niklason i sar., 2004; Scheen^a, 2004; Scheen^b, 2004). Farmakološka blokada ANG II u kardiomiocitima, glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (VSMC, engl. *vascular smooth muscle cell*) i endotelnim ćelijama poboljšava insulinsku senzitivnost (Cooper i sar., 2007).

Insulinska rezistencija i povećan nivo ANG II koegzistiraju u ranom stadijumu kardiomiopatija. ANG II inhibira signalni put insulina aktivacijom protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, engl. *Mitogen-activated Protein Kinase*) (Alfarano i sar., 2008). Intravenska infuzija ANG II inhibira insulinom posredovanu aktivaciju fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i Akt-a u srcu (Carvalho i sar., 2003). Kod gojaznih miševa rezistentnih na insulin kaptopril (ACE inhibitor) popravljja osetljivost na insulin, energetski status miokardijuma i normalizuje aktivnost protein kinaze α aktivirane AMP-om (AMPK, engl. *AMP-activated Protein Kinase α*) (Tabbi-Annani i sar., 2008).

Esencijalna hipertenzija, koja predstavlja glavnu karakteristiku prekomerne aktivnosti RAS-a, je često povezana sa insulinskom rezistencijom. ANG II je snažan vazokonstriktor, a varijacije u protoku krvi su značajan faktor u kontroli insulinom

posredovanog preuzimanja glukoze u tkiva (Barrett i sar., 2009; Vincent i sar., 2005). Na ovaj način bi ACE inhibitori i ARB mogli rezultirati povećanim preuzimanjem glukoze. Međutim, inhibicija RAS-a poboljšava insulinsku senzitivnost čak i nezavisno od promena u krvnom pritisku (Niklason i sar., 2004; Mori i sar., 2007; Munoz i sar., 2006). Drugi predloženi mehanizmi kojima bi ANG II mogao da utiče na insulinsku senzitivnost su smanjenje sekrecije adiponektina (Ran i sar., 2006), smanjenje adipogeneze (Sharma i sar., 2002), inhibicija translokacije GLUT4 (Shiuchi i sar., 2004; Wei i sar., 2008), povećanje sinteze ROS-a i inflamacija (Wei i sar., 2008).

Kod pacijenata sa metaboličkim sindromom zabeležen je povećan oksidativni stres i smanjena aktivnost superoksid dismutaze u srcu (Palmieri i sar., 2006; Armutcu i sar., 2008; Ford i sar., 2003). Još uvek nije ustanovljen tačan mehanizam kojim povećan oksidativni stres dovodi do poremećaja strukture i funkcije srca, ali je moguće da u osnovi ovoga stoji sposobnost ROS-a da uzrokuju oštećenja na proteinima, DNK ili RNK molekulima (Ilkun i Boudina, 2013). Skoro sve komponente metaboličkog sindroma povećavaju aktivnost RAS-a (Putnam i sar., 2012) koji stimuliše aktivnost NADPH oksidaze i stvaranje ROS-a od strane mitohondrija (Zhang^a i sar., 2007). Oksidativni stres je uključen u proces apoptoze i igra centralnu ulogu u dejstvu ANG II na signalni put insulina u srcu (Matsuzawa i Ichijo, 2005; Erickson i sar., 2008). Oksidativni stres koji nastaje kao rezultat AT1R-posredovane aktivacije NADPH oksidaze povećava remodelovanje tkiva srca i doprinosi razvoju insulinske rezistencije u srcu kod animalnog modela sa hronično povišenim nivoom ANG II (Ren2 pacovi) (Whaley-Connell i sar., 2007). Kod pacova koji su bili na ishrani bogatoj fruktozom insulinska rezistencija je povezana sa povećanom ekspresijom AT1Ra u aorti i sa povećanom aktivnošću NADPH oksidaze (Shinozaki i sar., 2004).

Mnoge studije urađene na glodarima sugerišu da RAS ima istaknutu ulogu u etiologiji gojaznosti. Periferna administracija ACE inhibitora i ARB, kao i genetičke manipulacije na kritičnim komponentama RAS-a, sprečavaju prekomernu gojaznost kod glodara (de Kloet i sar., 2009; Mori i sar., 2007; Santos i sar., 2008; Shiuchi i sar., 2004; Yvan-Charvet i sar., 2005).

Ang-(1-7) ima protektivnu ulogu u nastanku metaboličkog sindroma. Naime kod pacova hranjenih fruktozom tretman Ang-(1-7) dovodi do smanjenja telesne težine, insulinske rezistencije, nivoa TG i aldosterona, adipozitisa i hepatosteatoze (Marcus i sar., 2013; Giani i sar., 2009). Potvrdu ovom protektivnom dejstvu Ang-(1-7) pružaju i druge studije urađene na animalnim modelima deficijentim za Mas receptor kod kojih dolazi do dramatičnih promena u metabolizmu masti i glukoze (Santos i sar., 2008). Kod transgenih pacova koji imaju povećan nivo Ang-(1-7) u plazmi je zabeležena povećana tolerancija na glukozu i insulinska senzitivnost (Santos i sar., 2010). Ang-(1-7) takođe smanjuje i produkciju superoksidnih radikala i aktivaciju NF κ B i MAPK/ERK u masnom tkivu (Marcus i sar., 2013).

1.7.3. Estrogen i RAS

Polni hormoni utiču na ekspresiju komponenti RAS-a različitim mehanizmima. Godinama su postojale brojne nedoumice o uticaju estrogena na RAS. Pre 15 godina je postojao konsenzus u naučnoj zajednici da estrogen aktivira RAS (Laragh, 1967; Weinberger i sar., 1977; Sealey i sar., 1994; Brosnihan i sar., 1997; Oelkers, 1996). Danas međutim, zahvaljujući daleko preciznijim merenjima, možemo drugačije da procenimo situaciju. Kod životinja kod kojih je stimulisan RAS i koje su razvile hipertenziju, supstituciona terapija estrogenom dovodi do smanjenja sinteze ANG II i do smanjenja krvnog pritiska (Hoeg i sar., 1977; Okuniewski i sar., 1998; Roesch i sar., 2000; Brosnihan i sar., 1997). Kod ljudi i eksperimentalnih životinja je pokazano da estrogen smanjuje aktivnost i nivo ACE i AT1R (Brosnihan i sar., 1997; Gallagher i sar., 1999; Roesch i sar., 2000; Ferrario i sar., 1997; Dean i sar., 2005). U srcu ovarijektomisanih životinja je uočena smanjena ekspresija AT2R koja se vraća na inicijalni nivo nakon tretmana estradiolom (Xu i sar., 2003). Smatra se da ER β ima bitnu ulogu u inhibiciji signalnog puta ANG II pošto je pokazano da tretman estradiolom smanjuje hipertrofiju i fibrozu leve komore samo kod miševa sa isključenim genom za ER α , ali ne i kod onih sa isključenim genom za ER β (Pedram i sar., 2008).

1.7.4. Angiotenzin konvertujući enzim tipa I (ACE)

ACE, takođe poznat i pod nazivima peptidil-dipeptidaza A ili kininaza II je ključni element RAS-a. Ima molekulsku težinu 140 kDa i sastoji se od 1304 amiokiseline. Glikozilovana forma enzima ima molekulsku masu od 150-180 kDa (Coates, 2003). Somatski ACE se sastoji od unutarćelijskog domena, transmembranskog domena i dva slična ekstraćelijska domena – amino ili N domen i karboksi ili C domen. ACE iseca dipeptid His-Leu sa karboksilnog kraja dekaoptida ANG I pri čemu se formira ANG II (Skeggs i sar., 1956). ACE takođe seče i preposlednju Pro-Phe vezu u vazodilatatoru bradikininu inaktivirajući ga. Bradikinin pored svog vazodilatatornog delovanja deluje i kardioprotektivno pošto učestvuje u sintezi NO (Henriksen i Jacob, 2003).

Prisustvo ACE u srcu pacova je potvrđeno raznim metodama (Yamada i sar., 1991; Pinto i sar., 1991). Kod hipertrofije leve komore koja nastaje kao rezultat opterećenja pritiskom dolazi do indukcije aktivnosti ACE i povećane sinteze ACE iRNK (Hirsch i sar., 1991; Schunkert i sar., 1990; Schunkert i sar., 1993; Fabris i sar., 1990). Ova tkivno specifična aktivacija gena koji kodira ACE može doprineti štetnim efektima RAS-a kod bolesti srca. Smatra se da lokalno sintetisani ACE ima bitnu ulogu u procesu remodelovanja tkiva srca (Hirsch i sar., 1991).

1.7.4.1. ACE u regulaciji krvnog pritiska i metabolizma

Miševi kojima je isključen gen koji kodira ACE (*Ace*^{-/-}) imaju znatno niži krvni pritisak u odnosu na divlji soj (čak i do 30 mmHg) (Esther i sar., 1996; Esther i sar., 1997; Krege i sar., 1995). Do ovog dolazi usled nedostatka produkcije ANG II (Wang i sar., 2010). Miševi koji poseduju tri kopije gena koji kodira ACE razvijaju značajno ozbiljniji fenotip dijabetičke nefropatije nakon tretmana streptozotocinom u odnosu na dijabetičke miševe divljeg soja (Huang i sar., 2001). *Ace*^{-/-} miševi imaju manju telesnu masu i masu masnog tkiva, a odlikuje ih i brže otklanjanje glukoze iz krvotoka. Usled povećanog metabolizma FA u jetri ove miševe odlikuje i veća potrošnja energije (Jayasooriya i sar., 2008). To ukazuje da bi inhibicija ACE bila korisna u tretmanu dijabetesa i gojaznosti. Ipak farmakološka inhibicija ACE ne dovodi do smanjenja telesne mase (Weisinger i sar., 2009; Ades i sar.,

2008). ACE izgleda ima kompleksniju ulogu u regulaciji telesne težine i osetljivosti na insulin. Naime, miševi koji poseduju 3 kopije Ace gena nakon ishrane obogaćene mastima imaju manju telesnu masu, kao i niži nivo glukoze i insulina u odnosu na miševе sa 1 ili 2 kopije Ace gena (Heimann i sar., 2005). Dalja istraživanja bi mogla pomoći da se objasni kako promene u nivou ACE deluje na pojavu gojaznosti i dijabetesa.

1.7.5. Angiotenzin konvertujući enzim tipa 2

ACE2 je transmembranski protein i deli 61% homologije sa ACE (Donoghue i sar., 2000; Tipnis i sar., 2000). Nije osetljiv na delovanje ACE inhibitora (Rice i sar., 2004). Ima 805 aminokiselina i molekulsku težinu od 120 kDa. Deglikozilacija smanjuje molekulsku težinu na 85 kDa (Tipnis i sar., 2000; Eriksson i sar., 2002). ACE2 ima jedno aktivno mesto i funkcioniše kao karboksipeptidaza koja uklanja po jednu aminokiselinu sa C kraja odgovarajućih supstrata (Vickers i sar., 2002). Predominantno je lokalizovan na endotelnim ćelijama gde je njegovo katalitičko mesto izloženo cirkulišućim vazoaktivnim peptidima (Warner i sar., 2005). Aktivnost ACE2 je kontrolisana nivoom njegove ekspresije na površini ćelije i oslobođenjem njegovog katalitičkog domena delovanjem metaloproteinaze ADAM 17 (Lambert i sar., 2005).

ACE2 je prvenstveno pronađen u srcu (Tipnis i sar., 2000). ACE2 ima bitnu ulogu u regulaciji funkcije srca, uključujući kontraktilnost i konduktivnost. Smatra se da bi mogao imati koristan efekat kod srčane slabosti, prvenstveno usled produkcije Ang-(1-7) (Danilczyk i Penninger, 2006). U patološkim uslovima ACE2 deluje kardioprotektivno smanjujući remodelovanje srca (Alghamri i sar., 2013). Isključivanje gena koji kodira ACE2 (Ace2) smanjuje kontraktilnost srca, uzrokuje blagu dilataciju komora i povećava nivo ANG II, ali ne dovodi do promena u krvnom pritisku (Crackower i sar., 2002). S druge strane, Ace2^{-/-} miševi su podložniji razvoju hipertenzije indukovane ANG II, ali ne pokazuju promene u strukturi i funkciji srca (Gurley i sar., 2006). Ace2 transgeni miševi imaju nizak krvni pritisak i zaštićeni su od nastanka bolesti srca i krvnih sudova (Alenina i sar., 2008). Ang-(1-7) i ANG II imaju suprotne efekte na regulaciju transkripcije metaloproteinaza matriksa i njihovih tkivnih inhibitora u primarnoj kulturi srčanih

kardiomiocita (Pan i sar., 2008). Mužjaci miševa kojima je isključen Ace2 gen se odlikuju smanjenom sekrecijom insulina tokom prve faze odgovora na glukozu i pokazuju progresivno pogoršanje tolerancije na glukozu u poređenju sa miševima divljeg soja (Niu i sar., 2008). Ace2^{-/-} miševi brzo oboljevaju od dijabetičke nefropatije i karakteriše ih povećana ekskrecija albumina putem mokraće i zadebljanje glomerularne bazalne membrane (Wong i sar., 2007).

1.7.6. Kolektrin

Kolektrin spada u membranske proteine tipa I i izrazito je evolutivno očuvan (Zhang i sar., 2001). Kolektrin deli 47,8% homologije sa C-terminalnim krajem ACE2, ali ne poseduje aktivni dipeptidil karboksipeptidazni katalitički domen (Zhang i sar., 2001). Gen za humani kolektrin se nalazi samo 26 kb udaljen od gena koji kodira ACE2 što znači da su mogli nastati od zajedničkog pretka (Zhang i sar., 2007).

Kolektrin je prvobitno identifikovan u citoplazmi i apikalnoj membrani ćelija sabirnih kanalića ali je označen drugačijim imenom (TMEM 27) (Zhang i sar., 2001). Naknadno je ekstracelularna lokalizacija zabeležena u različitim tkivima i ćelijskim linijama, uključujući srce i ćelijske linije mišjeg insulinoma (Fukui i sar., 2005; Akpinar i sar., 2005). Kolektrin je identifikovan kao ciljani gen za nuklearni faktor hepatocita-1a (HNF-1a, engl. *Hepatocyte Nuclear Factor-1a*). HNF-1a igra značajnu ulogu u omogućavanju pravilne sekrecije insulina uključujući i glukozni transport, glikolizu i mitohondrijalnu oksidaciju (Dukes i sar., 1998; Yamagata i sar., 2002; Wang i sar., 1998; Yang i sar., 2002). Prekomerna ekspresija kolektrina u INS-1 ćelijama rezultuje značajnim povećanjem sekrecije insulina (Fukui i sar., 2005). Kolektrin se vezuje za c-aktin-miozin II-A, SNARE (engl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor*) i policistein-2 polaris komplekse, koji su uključeni u unutarćelijske pokrete vezikula pomoću cilijuma, kao i membranskih proteina (Zhang^b i sar., 2007; Yoder i sar., 2002; Moyer i sar., 1994). SNARE kompleks, preko interakcije sa SNAP-25 vezujućim proteinom, predstavlja vezu između kolektrina i sekrecije insulina (Fukui i sar., 2005). Kolektrin ima ulogu u proliferaciji β-ćelija pankreasa (Akpinar i sar., 2005). Kolektrin je takođe regulisan i HNF-1b genom.

Mutacija HNF-1b gena kod pacijenata sa adultnim tipom dijabetesa kod mladih osoba (MODY5, engl. *Mature-onset Diabetes of the Young 5*) dovodi do dijabetesa tipa II i do razvoja policističnih bubrega. Poremećaj kolektrina kod miševa dovodi do ozbiljne aminoacidourije (Danilczyk i sar., 2006; Malakauskas i sar., 2007). Miševi deficitarni za kolektrin se odlikuju značajno manjom ekspresijom transportera za aminokiseline (Danilczyk i sar., 2006).

1.7.7. Angiotenzin II receptor tipa 1 (AT1R)

AT1R ima molekulsku težinu 41 kDa i sastoji se od 359 aminokiselina. Ima sedam transmembranskih domena. Unutarćelijski karboksiterminalni region je bogat serinom, treoninom i tirozinom i sadrži tri mesta koja fosforiliše protein kinaza C (PKC). Vanćelijski N-kraj proteina sadrži tri mesta N-glikozilacije. U vanćelijskom domenu nalaze se i dva para disulfidnih mostova. Citoplazmatski rep AT1R je bogat serinskim i treoninskim ostacima koji predstavljaju potencijalna mesta za fosforilaciju kinazama, uključujući i kinaze G proteinskih receptora (GPRK, engl. *G-protein Receptor Kinase*) i PKC. AT1R pripada familiji G protein vezujućih receptora (Chang i sar., 1982; Jayadev i sar., 1999).

Kod glodara postoje dva tipa AT1R, AT1Ra i AT1Rb (Elton i sar., 1992). Kod pacova AT1Ra je lokalizovan na hromozomu 17, dok je AT1Rb lokalizovan na hromozomu 2 (Szpirer i sar., 1999; Lewis i sar., 1993). Aminokiselinske sekvence kodirane od strane gena za AT1Ra i AT1Rb dele 96% homologije u kodirajućem regionu, ali postoje značajne razlike u nekodirajućim regionima što ukazuje na moguće razlike u mehanizmima regulacije ovih receptora (Guo i sar., 2001). U promotorskim regionima gena za AT1Ra (Guo i sar., 1995) i AT1Rb (Bogdarina i sar., 2009) je prisutan glukokortikoidni responsivni element (GRE) ali je on kod AT1Ra pozitivan regulator dok je kod AT1Rb negativni regulator transkripcije.

AT1Ra je dominantan u srcu i krvnim sudovima (Kakar i sar., 1992; Du i sar., 1995; Shanmugam i sar., 1994; Gasc i sar., 1994). Eksperimenti su pokazali da je AT1Ra značajniji u kontroli krvnog pritiska od AT1Rb (Chen i sar., 1997; Ito i sar., 1995; Sugaya i sar., 1995). Jedna studija urađena na pacovima je pokazala da je u srcu pacova eksprimirana samo

AT1Ra forma (Della Bruna i sar., 1995), dok je druga studija detektovala i izuzetno malu ekspresiju AT1Rb (Gasc i sar., 1994).

Miševi sa isključenim genom za AT1Rb (Agtr1b^{-/-}) su zdravi. Miševi kojima je isključen gen za AT1Ra imaju zadebljanje zidova krvnih sudova u bubrezima kao i atrofiju unutrašnje bubrežne medule (Oliverio i sar., 1998). AT1Ra^{-/-} miševi su mršavi, otporni na gojaznost uzrokovanu ishranom i imaju poboljšanu potrošnju energije i osetljivost na insulin (Kouyama i sar., 2005). Ovo ukazuje da bi AT1Ra^{-/-} miševi mogli biti zaštićeni od nastanka metaboličkog sindroma (Wang i sar., 2010). Farmakološka blokada AT1R povećava toleranciju na glukozu i osetljivosti na insulin (Henriksen, 2007). U odsustvu AT1R ishrana obogaćena fruktozom dovodi do snižavanja krvnog pritiska (Farah i sar., 2006).

1.7.7.1. Regulacija ekspresije AT1R

AT1R predstavlja kontrolnu tačku na kojoj se reguliše delovanje ANG II na ciljna tkiva. Povećan nivo ANG II dovodi do povećanja aktivnosti AT1R ali je interesantno da hronično izlaganje ANG II smanjuje gustinu angiotenzinskih receptora (Griendling i sar., 1987; Lassegue i sar., 1995; Touyz i sar., 1999). Ekspresija AT1R ne samo da je pod kontrolom svog agonista, već na njenu ekspresiju utiču i mnogi faktori rasta i citokini, npr. insulin, estrogen, LDL, NO i drugi (Mehta i Griendling, 2007). LDL i insulin povećavaju ekspresiju AT1R tako što nakon transkripcije stabilizuju njegovu iRNK (Nickenig i sar., 1999; Nickenig^a i sar., 1997; Nickenig^b i sar., 1997).

1.7.7.2. Signalni putevi AT1R

Nakon vezivanja ANG II za AT1R dolazi do aktivacije brojnih signalnih puteva čime se ostvaruju različiti fiziološki efekti ANG II. AT1R se nakon aktivacije kupluje sa Gq/11 i stimuliše inozitol-3-fosfat/Ca²⁺ signalni put koji je odgovoran za razvoj hipertenzije i hipertrofije srca. AT1R se takođe kupluje i sa G_{11/12} što dovodi do aktivacije fosfolipaze C i D, Ca²⁺ kanala L-tipa i Rho kinaze, dok kuplovanje sa G_{i/o} inhibira adenilat ciklazu (Spät i Hunyady, 2004; de Gasparo i sar., 2000; Ushio-Fukai i sar., 1999; Rattan i sar., 2003).

AT1R ima ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije, migracije, apoptoze i ekspresije gena. Ovo svoje dejstvo ostvaruje aktivacijom tirozin kinaza (Pyk2, c-Src, Tyk2, FAK, Jak2) i receptora za faktore rasta koji imaju tirozin kinaznu aktivnost [receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*) i receptora za faktor rasta trombocita (PDGF-R, engl. *Platelet-derived Growth Factor Receptor*] (Saito i Berk, 2002 ; Yin i sar., 2003). AT1R aktivira i serin/treonin kinaze kao što su PKC i MAPK, uključujući i ERK 1/2, p38MAPK i c-Jun NH₂-terminalnu kinazu (JNK) koje su uključene u ćelijski rast i hipertrofiju (Puja i sar., 2007).

AT1R stimuliše i signalnu transdukciju nezavisnu od G proteina direktnim vezivanjem za signalne molekule, kao što su β -arrestin, Cdc42 i Src (Hunyady i Catt, 2006). β -arrestin može poslužiti kao kalup za formiranje signalnog kompleksa koji učestvuje u AT1R indukovanoj aktivaciji ERK, MAPK i JNK3 MAPK (Thomas i Qian, 2003). U fibroblastima srca AT1R stimuliše Jak/STAT signalni put koji ima ulogu u nastanku poremećaja u strukturi i funkciji srca (Booz i sar., 2002; Hunyady i Catt, 2006).

1.7.8. Angiotezin II receptor tipa 2 (AT2R)

AT2R pripada G protein vezujućim receptorima i deli 34% homologije sekvenci sa AT1R (Mukoyama i sar., 1993). Ima 7 transmembranskih domena (Kambayashi i sar., 1994), sastoji se od 363 aminokiseline i ima molekulsku težinu 41 kDa.

Gen koji kodira AT2R je mapiran na X hromozomu kod ljudi i pacova (Koike i sar., 1994). AT2R je visoko eksprimiran u fetalnim tkivima. Nakon rođenja njegova ekspresija dramatično opada, ali se i dalje detektuje u kardiovaskularnom sistemu (Levy, 2005). AT2R se eksprimira u kardiomiocitima (Booz i Baker, 1996), fibroblastima (Tsutsumi i sar., 1998) i krvnim sudovima (Baños i sar., 2011; Batenburg i sar., 2004; You i sar., 2005).

AT2R ima 5 potencijalnih mesta glikozilacije na N kraju proteina. Zbog mogućnosti posttranslacionih modifikacija ovih mesta molekulska masa AT2R proteina može varirati od 40-80 kDa (Kambayashi i sar., 1993). Druga unutarćelijska petlja AT2R sadrži potencijalna mesta fosforilacije PKC, dok citoplazmatični rep sadrži tri mesta fosforilacije PKC i jedno mesto fosforilacije cAMP-zavisnom protein kinazom (Griendling i sar., 1996).

Promotor gena za AT2R sadrži GRE koji predstavlja negativni regulator ekspresije, što objašnjava smanjivanje ekspresije AT2R glukokortikoidima (Que i sar, 2014).

Smatra se da AT2R ima suprotno dejstvo u odnosu na AT1R. Primer za to je fosforilacija insulinskog receptora (IR); naime dok stimulacija AT1R povećava fosforilaciju IR i supstrata za insulinski receptor (IRS-1, engl. *Insulin Receptor Substrate-1*), ista je smanjena nakon aktivacije AT2R (Elbaz i sar., 2000). AT2R kontroliše mnoge fiziološke procese uključujući remodelovanje tkiva (inhibicijom ćelijskog rasta i stimulacijom apoptoze) i krvni pritisak (vazodilatacijom) (Dasgupta i Zhang, 2011).

U normalnim fiziološkim stanjima AT2R je u srcu eksprimiran jako slabo, međutim u patološkim stanjima kao što su hipertenzija ili MI njegova ekspresija raste i postaje dominantna u odnosu na AT1R. Mnoge studije ukazuju da AT2R ima povoljno dejstvo na srce. U miokardu miševa kojima je isključen gen za AT2R (*Agtr2^{-/-}*) dolazi do povećane ekspresije AT1R što uzrokuje proliferaciju ćelija, hipertrofiju srca, smanjeno preživljavanje i povećanje dilatacije leve komore nakon MI (Johren i sar., 2004). Međutim još uvek postoje nesuglasice oko zaštitnog delovanja AT2R u srcu. Jedna studija je pokazala da su hipertrofija indukovana ishemijom i fibroza nezavisne od AT2R (Tschöpe i sar., 2005). Druga studija je pokazala da nedostatak AT2R ne dovodi do povećanja efekata aktivacije AT1R (van Esch i sar., 2010). AT2R ostvaruje svoj antiproliferativni i proapoptotički efekat u VSMC suprotstavljenjem efektima aktivacije AT1Ra (Horiuchi i sar, 2002).

1.7.8.1. Signalni putevi AT2R

AT2R ima tri glavna signalna puta: aktivacija serin/treonin fosfataza, aktivacija bradikinin/NO/cGMP puta i aktivacija fosfolipaze A2 (Lemarie i Schiffrin, 2010). AT2R učestvuje u aktivaciji MAP kinaza fosfataza (MKP-1), protein fosfataze 2 (PP2A) i tirozin fosfataze koja sadrži SH2 domen (SHP-1) (Johren i sar., 2004; Lemarie i Schiffrin, 2010). Aktivacija MKP-1 i PPA2 rezultuje inhibicijom ERK1/2 što indukuje apoptozu. SHP-1 inhibira ERK1/2 i NADPH čime doprinosi antioksidativnoj zaštiti (Mehta i Griendling, 2007). AT2R stimuliše bradikininiski receptor tipa 2 (B2R) koji povećava fosforilaciju eNOS

Na taj način se povećava sinteza NO i aktivira se guanilat ciklaza koja sintetizira cGMP što rezultuje vazodilatacijom (Yayama i sar., 2006).

AT2R stimuliše aktivnost fosfolipaze A2 (PLA₂) i formiranje arahidonske (AA) kiseline koja reguliše struju kalcijuma i može dovesti do hiperpolarizacije ćelije i smanjene nadražljivosti (Johren i sar., 2004; Zhu i sar., 1998).

AT2R smanjuje inflamaciju preko stimulacije serin/treonin fosfataza i sintezom AA, što produkuje metabolit 11,12-EET koji je deo inflamatornog puta. Ovi procesi zajedno smanjuju aktivnost NFκB koji potom smanjuje IL-6 (Rompe i sar., 2010).

1.8. Nuklearni faktor κB

Kod sisara, NFκB familija se sastoji od pet različitih subjedinica koje se vezuju za DNK: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) i p52/p100 (NFκB2) (Baldwin, 1996). U većini ćelija, NFκB subjedinica postoji u formi homo- ili heterodimera vezanog za inhibicioni protein IκB čija je uloga da zadrži ovaj kompleks u citoplazmi (Karin i Ben-Neriah, 2000). IκB proteini se odlikuju prisustvom 5-7 ankirinskih ponovaka koji učestvuju u vezivanju za dimerizacioni domen NFκB i maskiraju signal za jedarnu lokalizaciju (NLS, engl. *Nuclear Localization Signal*) čime onemogućavaju prelazak NFκB u jedro (Huxford i sar., 1998; Jacobs i Harrison, 1998). p65, RelB i c-Rel poseduju transaktivacioni domen na C-kraju preko koga se reguliše transkripcija target gena za NFκB. p65 subjedinica poseduje dva takva transaktivaciona domena (Schmitz i Baeuerle, 1991). NFκB se u jedru vezuje za DNK i reguliše transkripciju brojnih gena. Stoga NFκB učestvuje u brojnim biološkim procesima uključujući inflamaciju, imunski odgovor, proliferaciju, i apoptozu (Kim i sar., 2006; Perkins, 2007).

U klasičnom putu, prva faza aktivacije NFκB podrazumeva regulisanu degradaciju IκBα i ona je pokrenuta aktivatorima kao što su faktor nekroze tumora alfa (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor-α*), lipopolisaharidi, IL-1β i forbol 12-miristat 13-acetat (**Slika 1.3**). Ovi molekuli dovode do fosforilacije IκBα na Ser32 i Ser36 u N-terminalnom domenu IκB kinaznog kompleksa (IKK). Fosforilisan IκBα potom podleže poliubikvitinaciji kako bi predstavljao target za 26S proteazomski kompleks, što rezultuje oslobađanjem NFκB i

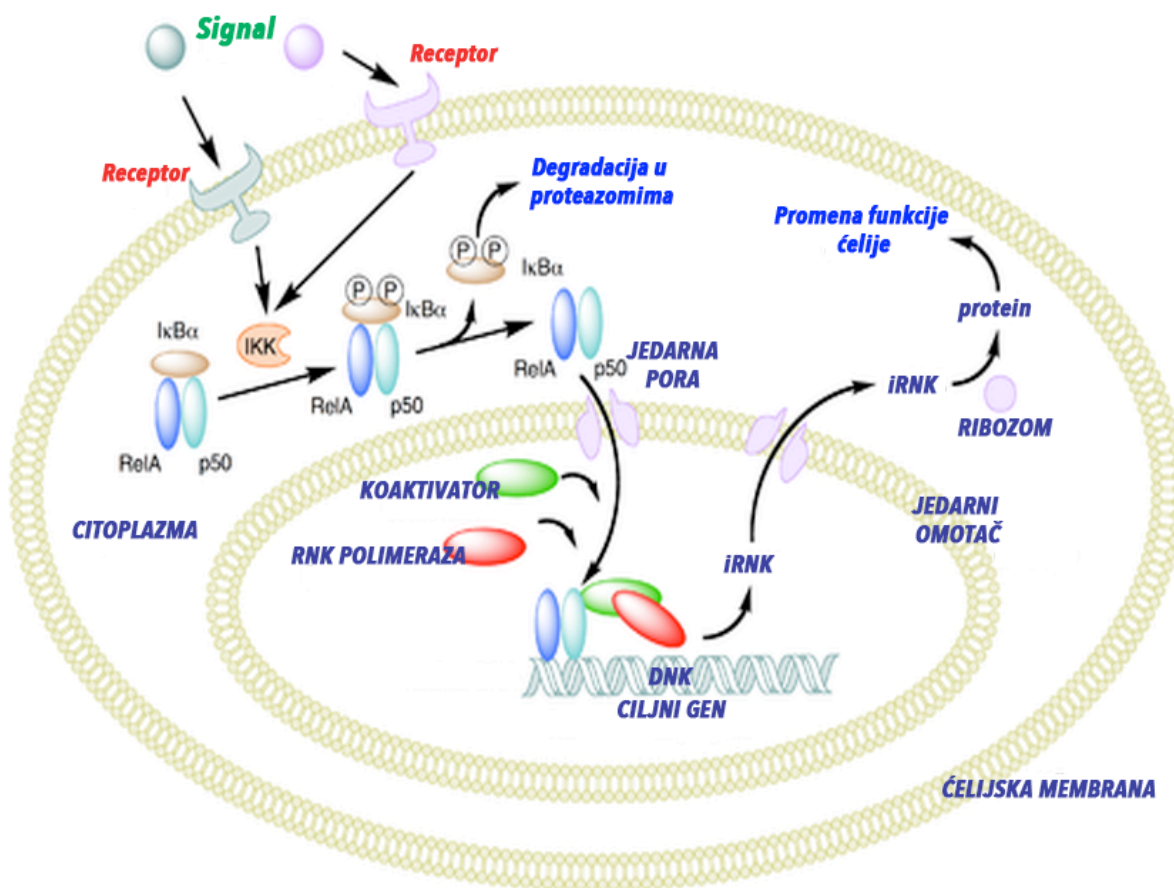
njegovom akumulacijom u jedru (Wolf i sar., 2002). Druga faza aktivacije NF κ B podrazumeva fosforilaciju p65 subjedinice, što određuje jačinu i vreme trajanja transkripcionog odgovora posredovanog sa NF κ B (Viatour i sar., 2005). Jedno od mesta fosforilacije predstavlja i Ser 276 (fosfo Ser276) koje mogu fosforilisati dve kinaze: PKA u citoplazmi i mitogenom i stresom aktivirana protein kinaza-1 (MSK-1, engl. *Mitogen- and Stress-activated Protein Kinase-1*) u jedru (Zhong i sar., 1998; Vermeulen i sar., 2003).

NF κ B posreduje u inflamatornom odgovoru u tkivu srca nastalom kao rezultat delovanja ANG II (Brasier i sar., 2000; Hall i sar., 2006; Takemoto i sar., 1997). ANG II stimuliše NADPH oksidazu koja produkuje ROS. ROS predstavljaju sekundarne glasnike u aktivaciji NF κ B (Saito i Berk, 2002). Takođe ANG II aktivira NF κ B stimulišući translokaciju p65 subjedinice u jedro, vezivanje za DNK, transkripciju reporter gena za NF κ B i degradaciju I κ B. S druge strane, NF κ B stimuliše ekspresiju gena koji kodira AGT i na taj način pojačava inflamatorni proces posredovan sa ANG II (Costanzo i sar., 2003).

Aktivacija IKK β /NF κ B proinflamatornog puta u metaboličkim tkivima predstavlja istaknutu odliku različitih metaboličkih poremećaja povezanih sa prekomernim unosom hranjivih materija (Petersen i Shulman, 2004; Berg i Scherer, 2005; Schenk i sar., 2008; Shoelson i sar., 2009; Gregor i Hotamisligil, 2011; Lumeng i Saltiel, 2011; Sabio i Davis, 2010). Biološki efekti metaboličke inflamacije posredovane sa NF κ B su štetni kako na nivou tkiva tako i na ćelijskom nivou i dovode do poremećaja u signalnim putevima i metabolizmu. Metabolička inflamacija posredovana sa IKK β /NF κ B je detektovana i u CNS-u, posebno u hipotalamusu, koji pretežno učestvuje u razvoju poremećaja asociраниh sa prekomernim unosom hranjivih materija kao što su metabolički sindrom, gojaznost, dijabetes, insulinska rezistencija i hipertenzija povezana sa gojaznošću (Gregor i Hotamisligil, 2011; Lumeng i Saltiel, 2011; Sabio i Davis, 2010; Purkayastha i sar., 2011; Ozcan i sar., 2009).

Estrogen može interferirati sa signalnim putem NF κ B. ER se može vezivati za c-Rei i ReiA što interferira sa formiranjem aktivnog NF κ B dimera (Galien i Garcia, 1997; Stein i Yang, 1995; Guzeloglu-Kayisli i sar., 2008). Indirektno estrogen inhibira vezivanje NF κ B za

DNK s obzirom da inhibira aktivaciju IKK, povećava ekspresiju I κ B i smanjuje njegovu fosforilaciju (Stice i sar., 2012; Xing i sar., 2012; Simoncini i sar., 2000; Wen i sar., 2004).



Slika 1.3. Aktivacija NF κ B (preuzeto i modificirano sa en.wikipedia.org)

1.9. Metaloproteinaza matriksa-9 (MMP-9)

MMP-9 je protein od 92 kDa koji pripada familiji cink- i kalcijum-zavisnih endopeptidaza. Sastoji se od 708 aminokiselina. Kod pacova gen koji kodira za MMP-9 je lociran na hromozomu 3q42. MMP-9 ima kompleksnu strukturu sa signalnim peptidom na N-kraju za kojim sledi propeptid, katalitički domen sa vezujućim mestom koje poseduje

jone cinka, tri ponovka sekvence slična fibronektinu, prolinom bogat i O-glikozilovan linker, i na C-kraju hemopeksinski domen (Stute i sar., 2003).

MMP-9 je prisutan u svim tkivima. On je vanćelijski protein mada su skorašnje studije potvrdile njegovo prisustvo u jedru mišićnih ćelija (Yeghiazaryan i sar., 2012), neurona (Yang i sar., 2010), i ljudskih glijalnih ćelija (Pirici i sar., 2012). Sekretuje se od strane velikog broja ćelija uključujući neutrofile, makrofage i fibroblaste.

MMP-9 je odgovoran za proteolizu različitih molekula ekstracelularnog matriksa (ECM) (kolagen, fibronektin i laminin), inflamatornih hemokina (CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL-7 i CXCL12) i citokina (Yabluchanskiy i sar., 2013). Zbog raznovrsnosti supstrata za čiju proteolizu je odgovoran, MMP-9 ima ulogu u različitim fiziološkim funkcijama kao što su remodelovanje tkiva, diferencijacija ćelija (Zimowska i sar., 2013), međućelijski kontakt i migracija (Kim^a i sar., 2012), otpuštanje citokina i regulacija aktivnosti faktora rasta (Schonbeck i sar., 1998), preživljavanje i apoptoza (Kowluru i sar., 2011), angiogeneza i inflamacija.

1.9.1. Regulacija ekspresije MMP-9

Ekspresija MMP-9 je regulisana na nivou transkripcije, lokalne translacije, posttranslaciono, na nivou sekvenciranja u ćelijsku membranu, internalizacije i odložene aktivacije. Aktivacija MMP-9 se ostvaruje sečenjem propeptida u čemu učestvuju ili druge metaloproteinaze ili sistem koji se sastoji od tkivnog aktivatora plazminogena i plazmina (Bruno i Cuello, 2006). Moguća je i aktivacija koja se dešava posttranslacionim modifikovanjem nezavisno od proteolize. NO može da reguliše stabilnost MMP-9 iRNK (Akool i sar., 2003).

NFκB je jedan od faktora koji regulišu ekspresiju MMP-9. Inhibicija NFκB smanjuje proizvodnju MMP-9 u VSMC i makrofagima (Bond i sar., 2001; Grimm i sar., 2006). Takođe i ROS mogu aktivirati MMP-9 putem zavisnim od NFκB (Okamoto i sar., 2001).

ANG II ima direktan i indirektan uticaj na ekspresiju MMP-9. ANG II aktivacijom EGFR i MAPK signalnog puta indukuje ekspresiju MMP-9 (Shah i Catt, 2003). U miocitima

srčanih komora, ANG II direktno stimuliše NFκB i indukuje ekspresiju MMP-9 (Rouet-Benzineb i sar., 2000).

1.9.2. MMP-9 i srce

MMP-9 se smatra glavnom komponentom odgovornom za remodelovanje srca kod različitih bolesti kao što su MI, hipertrofija srca i kardiomiopatija (Spinale, 2007). Miokardijum između ostalog čine i brojni proteini ekstracelularnog matriksa (ECM), uključujući kolagen, laminin, fibronektin kao i mali nivo matricelularnih proteina, od kojih svi imaju bitnu ulogu u ostvarivanju fizioloških performansi srca. Kolagen formira kompleksnu mrežu koja pruža trodimenzionalnu strukturu i otpornost na istežanje srčanim mišićnim vlaknima. U kardiovaskularnim bolestima dolazi do remodelovanja srčanog mišića radi očuvanja funkcije i integriteta srca, što dovodi do oštećenja kolagenske mreže. Brojne studije su pokazale da MMP-9 utiče na remodelovanje leve komore (Squire i sar., 2004; Sundström i sar., 2004; Yan i sar., 2006; Martos i sar., 2007).

Još 2003. godine je urađena obimna klinička studija koja je ukazala da bi MMP-9 mogao biti prognostički marker za povećan rizik od kardiovaskularne smrti (Blankenberg i sar., 2003). MMP-9 koreliše sa proteinima akutne faze kao što su IL-6, CRP i fibrinogen, što ukazuje da bi mogao imati izuzetan patofiziološki značaj u kardiovaskularnoj smrtnosti.

U slučaju hipertenzije, aktivnost MMP-9 se indukuje izuzetno rano što dovodi do razlaganja kolagena i do smanjene elastičnosti arterija. Povećanje fibrilarnog kolagena u stadijumu kompenzacije hipertenzije je asocirano sa povećanom aktivnošću MMP-9 (Weber i sar., 1989). Povećani arterijski pritisak i poremećeno remodelovanje krvnih sudova dovode do preopterećenja srca. U ovim uslovima tkivo srca biva podvrgnuto dodatnom kompenzatornom remodelovanju. Kompenzatorna hipertrofija koja se razvija kao posledica preopterećenja srca je asocirana sa povećanom aktivnošću MMP-9 (Li i sar., 2000).

MMP-9 ima bitnu ulogu tokom ranih stadijuma akutnog MI i progresije ka srčanoj slabosti (Jong i sar., 2006). Nivo MMP-9 počinje da raste već nekoliko minuta nakon MI i ostaje povećan tokom prve nedelje kod animalnih modela MI (Etoh i sar., 2001; Romanic i

sar., 2001). Ovaj rani porast nivoa MMP-9 nakon MI koreliše sa povećanjem broja neutrofila, a kasniji porast sa infiltracijom makrofaga što ukazuje na bitnu ulogu MMP-9 u različitim stadijumima inflamacije. Delecija MMP-9 smanjuje broj makrofaga nakon MI što dovodi do smanjenja uvećanja leve komore i smanjene akumulacije kolagena (Ducharme i sar., 2000).

Kod pacijenata sa metaboličkim sindromom detektovani su povećani nivoi i MMP-9 i tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza-1 (TIMP-1, engl. *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1*) (Mieczkowska i sar., 2011; Roberts i sar., 2006; Gonçalves i sar., 2009), kao i povećana aktivnost MMP-9 (Mieczkowska i sar., 2011). Aktivnost ovih enzima raste zajedno sa porastom broja faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti koji doprinose metaboličkom sindromu. Pijenje 10% rastvora fruktoze dovodi do povećanja ekspresije MMP-9 u aorti miševa koji su deficitarni za ApoE (Cannizzo i sar., 2012).

1.10. Hemokin CXCL16

Hemokin CXCL16 je otkriven 2000. godine. On kombinuje svojstva receptora čistača sa svojstvima inflamatornog hemokina. CXCL16 se klasifikuje zajedno sa CXC hemokinima (Wente i sar., 2008). CXCL16 je transmembranski protein koji sadrži vanćelijski hemokinski domen, mucinu sličan domen, transmembranski domen i citoplazmatski domen. Hemokinski domen deluje kao atraktant za ćelije koje ekspimiraju CXCR6 receptor (Matloubian i sar., 2000; Wilbanks i sar., 2001), ali i kao receptor čistač koji olakšava preuzimanje oksidovanih lipoproteina niske gustine (ox-LDL), fosfatidilserina i bakterija (Minami i sar., 2001). CXCL16 je povezan sa inflamatornim bolestima mada njegova uloga još uvek nije do kraja ispitana (Geissmann i sar., 2005; Fukumoto i sar., 2004; Sheikine i sar., 2006; Aslanian i sar., 2006). Ekspimiran je u makrofagima (Wilbanks i sar., 2001), glatkim mišićnim ćelijama (Hofnagel i sar., 2002; Wagsater i sar., 2004), dendritskim ćelijama (Shimaoka i sar., 2004; Tabata i sar., 2005) i B-limfocitima (Wilbanks i sar., 2001). CXCL16 pospešuje sintezu citokina, kao i proliferaciju ćelija krvnih sudova. CXCL16 indukuje proliferaciju endotelnih ćelija umbilikalne vene kod ljudi (Zhuge i sar., 2005).

1.10.1. CXCL16 i inflamacija

Interagujući sa svojim receptorom, solubilni CXCL16 deluje kao hemoatraktant za leukocite (Wilbanks i sar., 2001). CXCL16 je inducibilan u ćelijama krvnih sudova i na njegovu ekspresiju utiču sinergistički IFN γ i TNF α (Abel i sar., 2004; Wågsäter i sar., 2004). Povećana ekspresija CXCL16 dovodi do povećanog preuzimanja oxLDL od strane makrofaga i do formiranja penušavih ćelija (Wuttge i sar., 2004). CXCL16 aktivira NF κ B i indukuje transkripciju gena koji kodira TNF α u glatkim mišićnim ćelijama aorte. Takođe, CXCL16 podstiče proliferaciju glatkih mišićnih ćelija aorte i međusobno povezivanje ćelija (Chandrasekar i sar., 2004). S druge strane, pokazano je da genetička deficijencija CXCL16 ubrzava aterosklerozu, povećava regrutaciju makrofaga i ekspresiju iRNK koja kodira monocitni hemoatraktantni protein-1 (MCP-1, engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) i TNF α (Ghilardi i sar., 2004). Takođe, u *in vitro* ispitivanjima je pokazano da makrofagi miševa koji su deficijentni za CXCL16 imaju smanjeni kapacitet za vezivanje i uklanjanje oxLDL (Aslanian i sar., 2006). Sve ovo ukazuje da CXCL16 ima bitnu ulogu u nastanku i progresiji ateroskleroze.

Kod ljudi, nivoi solubilnog CXCL16 su pozitivno asocirani sa metaboličkom dislipidemijom i inflamacijom (Lehrke i sar., 2007). Kod gojaznih pacova je detektovana povećana ekspresija CXCL16 u masnom tkivu koja se smanjuje kalorijskom restrikcijom (Kurki i sar., 2012).

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Povećan unos fruktoze predstavlja bitan faktor u razvoju metaboličkog sindroma i nastanku hronične inflamacije, a estrogen doprinosi uočenim polnim razlikama. Komponente RAS-a (ACE, ACE2, AT1R, AT2R, kolektrin), NFκB, MMP-9 i CXCL16 imaju bitnu ulogu u nastanku inflamacije. Na osnovu toga postavljena je hipoteza da ishrana bogata fruktozom može da dovede do polno specifičnih promena u nivou gore pomenutih molekula u srcu i na taj način do razvoja simptoma metaboličkog sindroma i sa njim povezanih kardiovaskularnih poremećaja.

Cilj doktorske disertacije je da se doprinese boljem razumevanju polno specifičnih promena u ekspresiji komponenti RAS-a i inflamacije u srcu pacova nastalih nakon ishrane bogate fruktozom. Do cilja se došlo realizacijom sledećih zadataka:

1. Ispitivanjem promena u nivou proteinskih komponenti RAS-a (ACE, ACE2, AT1R i AT2R) u tkivu srca mužjaka i ženki pacova nastalih kao posledica ishrane bogate fruktozom
2. Određivanjem nivoa iRNK za AT1R, AT2R, kolektrin, MMP-9 i CXCL16 u tkivu srca mužjaka i ženki pacova na fruktoznoj dijeti i kontrolnih pacova (mužjaka i ženki na normalnoj laboratorijskoj ishrani)
3. Ispitivanjem da li estradiol dovodi do reverzije promena u nivou proteinskih komponenti RAS-a u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova nastalih kao posledica ishrane bogate fruktozom
4. Određivanjem nivoa iRNK za AT1R, AT2R, kolektrin, MMP-9 i CXCL16 u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova podvrgnutih ishrani bogatoj fruktozom i supstitucionoj terapiji estradiolom
5. Ispitivanjem da li ishrana bogata fruktozom i supstitucionna terapija estradiolom menjaju stepen fosforilacije p65 subjedinice NFκB transkripcionog regulatora u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova
6. Utvrđivanjem da li ishrana bogata fruktozom i supstitucionna terapija estradiolom dovode do promena u nivou MMP-9 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Tretman životinja u studiji

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta za rad sa životinjama u istraživanju Instituta za nuklearne nauke "Vinča" i od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Istraživanje je usklađeno sa etičkim načelima Evropske komisije za zaštitu životinja (86/609/EEC).

U eksperimentima su korišćeni mužjaci i intaktne ženke pacova soja Wistar, kao i ovarijektomisane ženke pacova. Ovarijektomija je urađena dve nedelje pre žrtvovanja. Životinje su tom prilikom anestetizirane ketaminom (40 mg/kg, intraperitonealno) u kombinaciji sa ksilazinom (5 mg/kg). Jedan deo ovarijektomisanih životinja je nakon ovarijektomije podvrgnut supstitucionoj terapiji estradiolom (40 µg/kg, potkožno, svaki drugi dan do pretposlednjeg dana pred žrtvovanje) u cilju postizanja fizioloških koncentracija estrogena (Sales i sar., 2010). Ovarijektomisane životinje koje nisu dobijale estradiol su injecirane lanenim uljem (s obzirom da je estradiol rastvaran u njemu).

Mušjaci i intaktne ženke su podeljeni u dve grupe: po 9 životinja svakog pola je činilo kontrolnu grupu (K) koja je bila na standardnom laboratorijskom načinu ishrane, dok je drugu grupu činilo po 9 životinja svakog pola koje su bile podvrgnute ishrani obogaćenoj fruktozom (F). Ovaj tip ishrane je podrazumevao standardnu laboratorijsku hranu s tim što je voda bila zamenjena 10% rasvorom fruktoze. Ovarijektomisane životinje su podeljene u tri grupe: 9 životinja je činilo kontrolnu grupu na standardnoj laboratorijskoj hrani (K-OVX), 9 životinja je činilo grupu koja je bila na ishrani bogatoj fruktozom (F-OVX) i 9 životinja je činilo grupu koja je pored ishrane bogate fruktozom bila podvrgnuta i supstitucionoj terapiji estradiolom (F-OVX+E2). Sve životinje su bile stare 21 dan kada su podvrgnute kontrolisanoj ishrani. Ovakav tip ishrane je trajao 9 nedelja nakon čega su životinje žrtvovane dekapitacijom.

Komercijalna hrana i voda (ili fruktozni rastvor) su pacovima bile dostupna *ad libitum*. Fruktoza je nabavljena od firme API-PEK iz Bečeja, Srbija. Sadržaj svih hranjivih materija prisutnih u korišćenoj komercijalnoj laboratorijskoj hrani je dat u **Tabeli 3.1.**

Tabela 3.1. Sastav hranljivih materija u komercijalnoj laboratorijskoj hrani

Proteini (%)	20
Vlažnost (%)	13
Pepeo (%)	10
Celuloza (%)	8
Kalcijum (%)	1
Natrijum (%)	0.15-0.25
Fosfor (%)	0.5
Lizin (%)	0.9
Metionin + Cistein (%)	0.75
Vitamin A (mg/kg)	3440
Vitamin D3 (mg/kg)	0.04
Vitamin E (mg/kg)	25
Vitamin B12 (mg/kg)	0.02
Cink (mg/kg)	100
Gvožđe (mg/kg)	100
Mangan (mg/kg)	30
Bakar (mg/kg)	20
Jod (mg/kg)	0.5
Selen (mg/kg)	0.1
Antioksidanti (mg/kg)	100

Životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 22°C, vlažnosti od 55% i standardnom svetlosnom režimu 12 časova svetlo/12 časova mrak počevši do 7:00 časova. Telesna masa životinja je merena na kraju eksperimenta.

3.2. Merenje krvnog pritiska i srčanog ritma

Krvni pritisak i srčani ritam su mereni *tail-cuff* metodom koja predstavlja uobičajenu neinvazivnu metodu za merenje ovih parametara kod svesnih životinja. Kod ove metode životinja se stavlja u komoru i zagreva se do 34°C. Senzor se postavlja na rep pacova. Manžetna se postavlja takođe oko repa i polako se naduvava do određene vrednosti iznad sistolnog pritiska koja se prepoznaje po tome što se na njoj zaustavlja pulsacija. Pritisak u manžetni na kome prestaje pulsacija se uzima kao sistolni pritisak u repu. Srčani ritam se određuje automatski brojanjem pulsa u jedinici vremena.

3.3. Izolacija srca, sakupljanje krvi i priprema krvne plazme za biohemijske analize

Životinje su žrtvovane dekapitacijom uz pomoć giljotine. Noć pre žrtvovanja životinjama nije bio omogućen pristup hrani. Nakon dekapitacije krv od svake životinje je skupljana u staklene epruvete koje su u sebi sadržavali antikoagulans etilen-diamin-tetra-sirćetnu kiselinu (EDTA). Krv je korišćena za merenje nivoa triglicerida i glukoze pomoću automatskih analizatora (MultiCare strips, Systems International, Italia i Accutrend glucometer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Krv prikupljena nakon dekapitacije je centrifugirana u kliničkoj centrifugi (Tehtnica LC-321) na 3000 rpm u trajanju od 15 minuta radi dobijanja krvne plazme koja je korišćena za određivanje koncentracije insulina.

Odmah nakon dekapitacije srca su izolovana, isprana u fiziološkom rastvoru, osušena filter papirom, prebačena na led i sečena na komadiće koji su korišćeni za izolaciju proteina i RNK.

3.4. Određivanje koncentracije insulina i računanje HOMA index-a

Nivo insulina u plazmi je meren RIA metodom korišćenjem pacovskog insulina kao standarda. Ova metoda se zasniva na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka (ili standarda) i radioaktivno obeleženog insulina pri čemu nastaju radioaktivno obeleženi kompleksi. Kad u plazmi ima više insulina formira se manje radioaktivno obeleženog kompleksa. Kad se reakcija završi svi nastali kompleksi se talože imunoadsorbentom na

sobnoj temepraturi (30 min), nakon čega se centrifugiraju 25 min na 3000g. Nastali talog predstavlja kombinaciju sekundarnih antitela i polietilenglikola i vezanog insulina, dok slobodni insulin (obeleženi i neobeleženi), kao i slobodna antitela zaostaju u tečnoj fazi. Radioaktivnost taloga je merena u toku 1 minuta brojačem 1219 LKB. Istovremeno sa uzorcima plazme, tretirani su i standardi različitih, precizno definisanih koncentracija insulina (0,3, 3, 10, 30, 100 i 300 mIU/l), pomoću kojih je formirana standardna kriva. Koncentracija insulina u uzorcima plazme je određena upoređivanjem sa standardnom krivom.

HOMA index (engl. *Homeostasis Model Assessment*) je korišćen za određivanje insulinske osetljivosti. On je izračunat iz izmerenih koncentracija insulina i glukoze u krvi prema formuli Mathewsa i saradnika: $\text{insulin (mIU/l)} \times [\text{glukoza (mmol/l)}/22.5]$ (Mathews i sar., 1985).

3.5. Izolacija proteina

Tkivo srca je homogenizovano Ultra-turrax homogenizerom u puferu za liziranje koji je sadržavao 10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM-EGTA, 1% Triton X-100, proteazne inhibitore (2mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin) i fosfatazne inhibitore (100 mMnatrijum fluorid, 10 mM natrijum pirofosfat i 2 mM natrijum ortovanadat) u odnosu 1:7 (m:V) (Dupont i sar., 1998). Homogenati su centrifugirani na 600g 20 minuta na 4°C u Sorvall centrifugi. Dobijeni supernatanti, koji su predstavljali ukupan ćelijski lizat, su centrifugirani na 100000g 60 minuta u ultracentrifugi Beckman L3-50, Ti-50 rotor.

3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određivana kolorimetrijskom BCA metodom korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog kompleta BCA (Smith i sar., 1985). Bicinoninična kiselina (BCA) je stabilna komponenta rastvorljiva u vodi. BCA u alkalnoj sredini interagujući sa jonima Cu^{+1} formira kompleks intenzivne ljubičaste boje. Cu^{+1} se formira redukcijom Cu^{+2} jona prilikom reakcije sa proteinima. Kompleks BCA i Cu^{+1} pokazuje snažnu apsorbanu na

562 nm koja linearno raste sa povećavanjem koncentracije proteina. Koncentracija ukupnih proteina je očitavana sa standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanaci rastvora poznatih rastućih koncentracija (0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2 mg/ml) albumina goveđeg seruma (BSA, Sigma-Aldrich).

3.7. Elektroforeza na natrijum dodecil sulfat-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Uzorci za elektroforezu su dobijeni kuvanjem u trajanju od 5 minuta u Laemlijevom puferu za pripremu uzoraka i čuvani su na -20°C u zamrzivaču. SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecil Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) tehnika omogućava razdvajanje proteinskih frakcija u uzorku na osnovu njihove molekulske mase (Laemmli, 1970). Jednake količine proteina (100 μg) su nanošene na 4% gel za sabijanje (3% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8). Gel za sabijanje je nanesen preko 10% gela za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8). 0,05% amonijum persulfat i 0,033% TEMED su korišćeni kao katalizatori polimerizacije. Za elektroforezu je korišćen mini sistem za elektroforezu (Mini Protein Electrophoresis Cell, Bio-Rad) čiji su rezervoari naliveni TANK puferom (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 0,1% SDS). Prilikom prolaženja uzoraka kroz gel za sabijanje napon je bio podešen na 150V (15 minuta), da bi potom bio spušten na 100V i elektroforeza je trajala 120 minuta na sobnoj temperaturi. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je nanesena smeša proteinskih markera za elektroforezu koja sadrži 6 proteina poznatih molekulskih masa (132 kDa, 90 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa i 23 kDa, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Gelovi su nakon elektroforeze korišćeni za *Western blot* analizu.

3.8. Western blot analiza

Nakon elektroforeze izvršen je transfer proteina sa gelova na polivinildifluoridne membrane (PVDF, Hybond-P, membrana, veličine pora 0,45 μm , Amersham) prethodno aktivirane metanolom. Transfer je tekao preko noći na 4°C pri konstantnoj struji od 80 mA u sistemu za mokri transfer (Trans Blott Cell, Bio-Rad). Za transfer je upotrebljavan pufer u

sastavu 0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glicin i 20% metanol. Po završenom transferu membrane su blokirane inkubacijom u TBST puferu (25 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween, pH 8,0) sa 5% BSA tokom 90 minuta uz mešanje na sobnoj temperaturi. Ovaj korak je neophodan da bi se blokirala nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Nakon procesa blokiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima u cilju identifikacije željenih proteina. Proces inkubacije se odvijao preko noći na 4°C uz blago mešanje. Korišćena su kozja poliklonska antitela za ACE (sc-12187, razblaženje 1:250) i ACE2 (sc-17720, razblaženje 1:250) nabavljena od *Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*; zečje poliklonsko antitelo za AT1R (sc-1173, razblaženje 1:200) nabavljeno od *Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*; zečje poliklonsko antitelo za AT1R (PA5-20812, razblaženje 1:500) proizvedeno od strane *Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*; zečja poliklonska antitela za AT2R (ab19134, razblaženje 1:2500), MMP-9 (ab7299, razblaženje 1:500) i NFκB p65 (phospho S276) (ab30632, razblaženje 1:1000) nabavljena od *Abcam-a, Cambridge, UK*. Nakon inkubacije sa primarnim antitelom membrane su ispirane 5 puta po 5 minuta TBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon ispiranja membrane su inkubirane na sobnoj temeperaturi sa odgovarajućim kozjim ili zečjim sekundarnim antitelom (*Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*) u trajanju od 120 minuta. Korišćena sekundarna antitela su bila konjugovana sa peroksidazom iz rena (HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*). Membrane su potom ponovo isprane u TBST-u i 5 minuta inkubirane sa supstratom za hemiluminiscenciju (ECL, engl. *Enhanced Chemiluminescence*) (*Amersham Biotech, Pittsburg, PA, SAD*). Nakon toga su sušene, pokrivane tankom plastičnom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filmova. Na pokrivene membrane je postavljan rendgen film (ORTO CP-G-PLUS, AGFA), pri čemu je dužina ekspozicije bila 3 minuta. Intenzitet signala na filmu odgovara količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Filmovi su skenirani i računarski program ImageJ je iskorišćen za određivanje optičke gustine detektovanih traka. Rezultati su izraženi kao promena u odnosu na jediničnu vrednost odgovarajuće kontrole.

Posle kvantifikacije AT1R i AT2R proteina, membrane su stripovane 30 min na 50°C u puferu za stripovanje koji je sadržavao 100 mM β-merkaptetoetanol, 2% SDS i 62,5

mM Tris pH 6,7. Prilikom stripovanja sa membrane se uklanja supstrat, primarno i sekundarno antitelo, i membrana se vraća u isto stanje u kome se nalazila nakon skidanja sa transfera. Nakon ispiranja i blokiranja nespecifičnog vezivanja, na membranama je detektovan β -aktin (*Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD*) koji je korišćen kao kontrola za jednako nanošenje proteina.

3.9. Izolacija ukupne ćelijske RNK iz tkiva srca i određivanje njene koncentracije

Ukupna ćelijska RNK je izolovana iz tkiva srca korišćenjem Tri Reagent Solution-a (*Ambion, Inc*) prema protokolu proizvođača. Koncentracija i čistoća izolovane RNK određene su spektrofotometrijski na aparatu NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*). Čistoća uzoraka RNK je procenjena kao zadovoljavajuća imajući u vidu da su odnosi apsorbancije na 260 i 280 nm bili u opegu 1,8-2,1. Uzorci RNK su čuvani na -70°C.

3.10. Obrada uzoraka RNK dezoksiribonukleazom

Pre reakcije reverzne transkripcije, uzorci RNK su obrađeni dezoksiribonukleazom I. Ovaj tretman služi za uklanjanje jednolančanih i dvolančanih molekula DNK. U ovoj reakciji je 2 μ g ukupne RNK kao polaznog materijala inkubirano 30 minuta na 37°C sa dezoksiribonukleazom I (DNase I (1U/ μ l), *Fermentas*). Za aktivnost DNase I su neophodni joni Mg^{2+} koji su prisutni u reakcionom puferu (10 X Reaction Buffer with $MgCl_2$ for DNase I, *Fermentas*). Nakon inkubacije, dezoksiribonukleaza I je inhibirana hemijskim i termičkim putem (25 mM EDTA i inkubiranjem smeše na 65°C u trajanju od 10 minuta).

3.11. Reverzna transkripcija

Reakcija reverzne transkripcije podrazumeva da se na osnovu informacije uskladištene u RNK molekulu sintetišu molekuli jednolančane komplementarne DNK (cDNK, engl. *complementary DNA*). Reverzna transkripcija je urađena po protokolu proizvođača (*RevertAid first Strand cDNA synthesis kit, Fermentas, Lithuania*). U reakciji reverzne transkripcije korišćeno je 2 μ g ukupne čiste RNK kao polaznog materijala. U

uzorak RNK, prethodno tretiran dezoksiribonukleazom I, dodata je reakciona smeša koja se sastojala od četiri dezoksiribonukleozidtrifosfata (10 mM dNTP Mix, *Amersham Biosciences*), oligo-dT prajmera (20 X oligo(dT)₁₈ Primer, *ThermoFischer Scientific*), reverzne transkriptaze (Revert Aid Reverse Transcriptase (200 U/μl), *ThermoFischer Scientific*), ribonukleaznog inhibitora (RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl), *ThermoFischer Scientific*) i reakcionog pufera (5 X Reaction Buffer, *ThermoFischer Scientific*). Prvi korak u reakciji je bio dodavanje prajmera oligo(dT)₁₈ smeši nastaloj nakon tretmana RNK enzimom dezoksiribonukleazom I. Ova smeša je inkubirana na 65°C 5 minuta nakon čega je stavljena na led. Potom su smeši dodate ostale komponente reakcije (reakcioni pufer, dNTP mix, ribonukleazni inhibitor i reverzna transkriptaza). Ukupna zapremina reakcije je bila 20 μl. Smeša je inkubirana na 42°C 60 minuta. Reakcija je zaustavljena inkubacijom na 70°C u trajanju od 10 minuta. Dobijena cDNK je razblažena vodom za PCR (Nuclease-Free Water, *ThermoFischer Scientific*) do finalne koncentracije od 0.01 μg/μl i čuvana na -70°C do upotrebe.

3.12. Analiza relativnog nivoa iRNK reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Rekacija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real-Time PCR, engl. *Real-time polymerase chain reaction*) omogućava merenje relativnog nivoa iRNK. U analizi su korišćeni komercijalno dostupni *TaqMan*[®] eseji za detekciju potencijalno eksprimiranih transkripata za AT1R, AT2R, kolektrin, MMP-9 i CXCL-16: Rn02758772_s1, Rn00560677_s1, Rn00571968, Rn00579162_m1 i Rn01496393_m1, redom. Kao endogena kontrola u ovoj studiji korišćena je 18S rRNK (*TaqMan*[®] esej Hs99999901_s1). Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 25 μl. Reakcionu smešu su sačinjavali: 1 X *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix (*ThermoFisher Scientific*), 1 X *TaqMan*[®] Gene Expression Assay i 50 ng cDNK. Uslovi PCR reakcije su bili sledeći: 2 minuta na 50°C radi aktivacije enzima uracil-N-glikozilaze, zatim 10 minuta na 95°C pri čemu dolazi do aktivacije *AmpliTaq Gold*[®] DNK polimeraze za čim sledi 40 ciklusa u trajanju od 15 sekundi na 95°C radi denaturacije dimera i 60 sekundi na 60°C potrebnih za hibridizaciju i umnožavanje. Svaki

uzorak je analiziran u duplikatu na aparaturi *ABI Real-time 7500 system* (ABI, Foster City, CA, USA).

Za relativnu kvantifikaciju ekspresije gena korišćena je $2^{-\Delta Ct}$ metoda gde se količina iRNK ispitivanog gena normalizuje prema količini iRNK endogene kontrole (Schmittgen i Livak, 2008).

3.13. Statistička obrada podataka

Za statističke analize je korišćen program GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software, Inc.*) Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Sva poređenja između grupa su urađena neparametrijskim Mann-Whitney U testom, a statistički značajnim su smatrane sve vrednosti $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Energetski unos

Unos hrane i tečnosti je praćen tokom celog eksperimenta. Kod pacova na ishrani bogatoj fruktozom kalorijski unos predstavlja sumu kalorija unesenih putem hrane i 10% rastvora fruktoze.

Ženke i mužjaci koji su pili rastvor fruktoze su u toku dana konzumirali značajno manje hrane u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0.001$). Sa druge strane unos tečnosti se značajno povećao i kod ženki ($p < 0.01$) i kod mužjaka ($p < 0.001$). Kalorijski unos je u slučaju oba pola bio značajno veći u grupama koje su pile fruktozu u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim grupama ($p < 0.05$) (*Tabela 4.1.*).

Tabela 4.1. Unos hrane, tečnosti i kalorija kod mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze

	K Ženke	F Ženke	K Mužjaci	F Mužjaci
Unos hrane (g/dan/životinja)	17.41±2.99	12.59±0.67***	20.57±2.63	14.20±2.01***
Unos tečnosti (g/dan/životinja)	33.02±6.58	56.19±20.41**	49.33±5.39	74.10±11.36***
Kalorijski unos (kJ/dan/životinja)	191.51±32.89	236.06±30.21*	226.23±28.9	283.65±24.51*

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD po životinji. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ u odnosu na K odgovarajućeg pola

Ovarijsktomisane ženke koje su pile 10% rasvor fruktoze su značajno smanjile unos hrane ($p < 0.05$) dok je unos tečnosti značajno povećan ($p < 0.001$). Kalorijski unos je značajno povećan kod ovarijsktomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze ($p < 0.05$). Supstitucionna terapija estradiolom je dovela do daljeg smanjivanja unosa hrane i u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) i u odnosu na grupu koja je pila rastvor fruktoze ($p < 0.05$). Što se tiče unosa tečnosti, supstitucionna terapija estradiolom je dovela do smanjivanja unosa tečnosti u odnosu na životinje koje su pile rasvor fruktoze ($p < 0.05$), ali je unos tečnosti i dalje bio

statistički značajno veći u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Tretman estradiolom je doveo do smanjenja kalorijskog unosa kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze ($p < 0.05$) (**Tabela 4.2.**).

Tabela 4.2. Unos hrane, tečnosti i kalorija kod ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze i estradiolom

	K-OVX	F-OVX	F-OVX+E2
Unos hrane (g/dan/životinja)	19.23±1.85	16.31±3.37*	14.46±1.62***#
Unos tečnosti (g/dan/životinja)	28.51±4.54	48.75±14.81***	37.93±11.49*#
Kalorijski unos (kJ/dan/životinja)	211.57±20.31	263.26±58.29*	224.31±32.62#

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD po životinji. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX- ovarijektomija, E2- supstituciona terapija. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ u odnosu na K-OVX; # $p < 0.05$ u odnosu na F-OVX

4.2. Masa tela i masa srca

Kao što je predstavljeno u **Tabeli 4.3.** ishrana bogata fruktozom je dovela do povećanja telesne mase kod intaktnih ženki pacova ($p < 0.05$). Ovo je bilo praćeno povećanjem mase visceralnog masnog tkiva, kao i povećanjem odnosa mase visceralnog masnog tkiva i mase tela ($p < 0.05$). Kod mužjaka nije došlo do promene telesne mase kao posledica ishrane obogaćene fruktozom. Mase tela između mužjaka i intaktnih ženki pacova se značajno razlikovala i kod životinja na normalnom režimu ishrane ($p < 0.001$) i kod životinja tretiranih ishranom bogatom fruktozom ($p < 0.05$).

Masa srca je bila statistički značajno različita između intaktnih ženki i mužjaka koji su bili na normalnom režimu ishrane ($p < 0.01$), dok se kod životinja koje su bile na ishrani bogatoj fruktozom ova razlika izgubila. Ishrana bogata fruktozom nije dovela do statistički značajnih promena u odnosu mase srca i ukupne mase tela ni kod mužjaka ni kod intaktnih ženki pacova (**Tabela 4.3.**).

Tabela 4.3. Telesna težina i masa srca mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze

	K Ženke	F Ženke	K Mužjaci	F Mužjaci
Masa tela (g)	263.2±30.26	279.5±20.52*	338.9±40.45#	311.3±37.58 ^s
Masa srca (g)	0.83±0.13	0.83±0.08	1.05±0.14**	0.94±0.16
Masa VAT (g)	3.2±1.32	5.06±2.48*	2.59±1.14	3.16±1.80
Odnos masa srca/masa tela (x10 ⁻³)	3.17±0.16	3.04±0.21	3.11±0.19	3.00±0.26
Odnos masa VAT/masa tela (x10 ⁻²)	12.43±5.23	18.29±7.52*	7.48±2.84	10.06±4.81 ^s

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, VAT-visceralno masno tkivo; *p<0.05, **p<0.01, #p<0.001 u odnosu na K Ženke; ^sp<0.05 u odnosu na F Ženke

Između različito tretiranih grupa ovarijektomisanih životinja nisu pronađene statistički značajne razlike ni u masi srca ni u masi tela, kao ni u njihovom međusobnom odnosu. Takođe, ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze nije uticala na masu masnog tkiva niti na odnos mase masnog tkiva i mase tela (**Tabela 4.4.**).

Tabela 4.4. Masa tela i masa srca kod ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze i estradiolom

	K-OVX	F-OVX	F-OVX+E2
Masa tela (g)	293.2±23.09	286.7±23.87	280.6±18.15
Masa srca (g)	0.85±0.08	0.84±0.1	0.84±0.07
Masa VAT (g)	3.41±0.63	4.71±2.09	3.65±1.11
Odnos masa srca/masa tela (*10 ⁻³)	2.92±0.13	3.00±0.14	2.98±0.15
Odnos masa VAT/masa tela (*10 ⁻²)	1.10±0.16	1.57±0.6	1.29±0.36

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX- ovarijektomija, E2-supstitutivna terapija estradiolom

4.3. Uticaj ishrane bogate fruktozom na biohemijske parametre

Kao što je predstavljeno u **Tabeli 4.5.** ishrana bogata fruktozom je kod ženki dovela do snižavanja nivoa glukoze u krvi ($p < 0.05$), dok kod mužjaka nije bilo značajnih promena. Ishrana bogata fruktozom je dovela do povećanja nivoa triglicerida u krvi i kod ženki ($p < 0.01$) i kod mužjaka ($p < 0.05$). Režim ishrane nije uticao na nivo insulina u plazmi ni kod jednog ni kod drugog pola. Nivo insulina u plazmi kod ženki na standardnom režimu ishrane je bio statistički značajno manji nego kod mužjaka na istom dijetalnom režimu. Ishrana bogata fruktozom nije dovela do promene HOMA indexa ni kod mužjaka ni kod ženki.

Tabela 4.5. Efekat ishrane bogate fruktozom na biohemijske karakteristike mužjaka i intaktnih ženki pacova

	K Ženke	F Ženke	K Mužjaci	F Mužjaci
Glukoza (mmol/l)	5.38±0.65	4.58±0.84*	5.20±0.42	4.84±0.62
Trigliceridi (mmol/l)	1.39±0.29	1.87±0.38**	1.49±0.36	1.9±0.35*
Insulin (mIU/l)	6.60±2.5#	8.87±3.97	12.68±6.33	7.51±4.94
HOMA index	1.62±0.69	1.86±0.92	2.94±1.49	1.72±1.29

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom; * $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću K, ** $p < 0.01$ u odnosu na K Ženke, # $p < 0.05$ u odnosu na K mužjaci

Kod ovarijektomisanih ženki ishrana bogata fruktozom nije dovela do promene nivoa glukoze u krvi, dok je tretman estradiolom kod F-OVX životinja smanjio nivo glukoze u krvi ($p < 0.05$) u odnosu na F-OVX grupu (**Tabela 4.6.**). Ishrana bogata fruktozom je povećala nivo triglicerida u krvi ovarijektomisanih životinja ($p < 0.05$). Nivo triglicerida je ostao povećan kod životinja hranjenih fruktozom u odnosu na kontrolne životinje i nakon supstitucione terapije estradiolom ($p < 0.05$). Kod životinja hranjenih fruktozom detektovan je i povećan nivo insulina u plazmi ($p < 0.01$), dok supstituciona terapija estradiolom smanjuje nivo insulina kod ove grupe pacova ($p < 0.05$) i vraća ga na nivo detektovan kod

kontrola. HOMA index je bio povećan kod životinja hranjenih fruktozom ($p < 0.05$). I u ovom slučaju tretman estradiolom je uspeo da revertuje ove promene.

4.6. Efekat ishrane bogate fruktozom na biohemijske karakteristike ovarijektomisanih ženki pacova sa ili bez tretmana estradiolom

	K-OVX	F-OVX	F-OVX+E2
Glukoza (mmol/l)	6.15±1.98	6.74±1.33	5.34±0.3#
Trigliceridi (mmol/l)	1.39±0.22	2.19±0.93*	1.73±0.28*
Insulin (mIU/l)	21.6±16.13	47.48±34.08**	13.08±5.07#
HOMA index	4.31±2.41	13.63±6.82*	3.17±1.37#

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX- ovarijektomija, E2- supstituciona terapija; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ u odnosu na K-OVX, # $p < 0.05$ u odnosu na F-OVX

4.4. Uticaj ishrane bogate fruktozom na krvni pritisak i srčani ritam

Kao što je predstavljeno u **Tabeli 4.7.** ishrana bogata fruktozom dovodi do povećanja krvnog pritiska samo kod mužjaka pacova ($p < 0.05$). Mužjaci pacova na standardnom režimu ishrane imaju veći krvni pritisak nego ženke na istom režimu ($p < 0.001$). Ishrana bogata fruktozom ne dovodi do promena srčanog ritma ni kod jednog pola.

Tabela 4.7. Krvni pritisak i srčani ritam kod mužjaka i inaktivnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze

	K Ženke	F Ženke	K Mužjaci	F Mužjaci
Krvni pritisak (mm Hg)	121.43±7.01	124.14±12.4	109±4.33#	120.6±7.93*
Srčani ritam (otkucaji/minut)	433.71±47.21	437.14±24.84	479.33±43.63	475.2±36.6

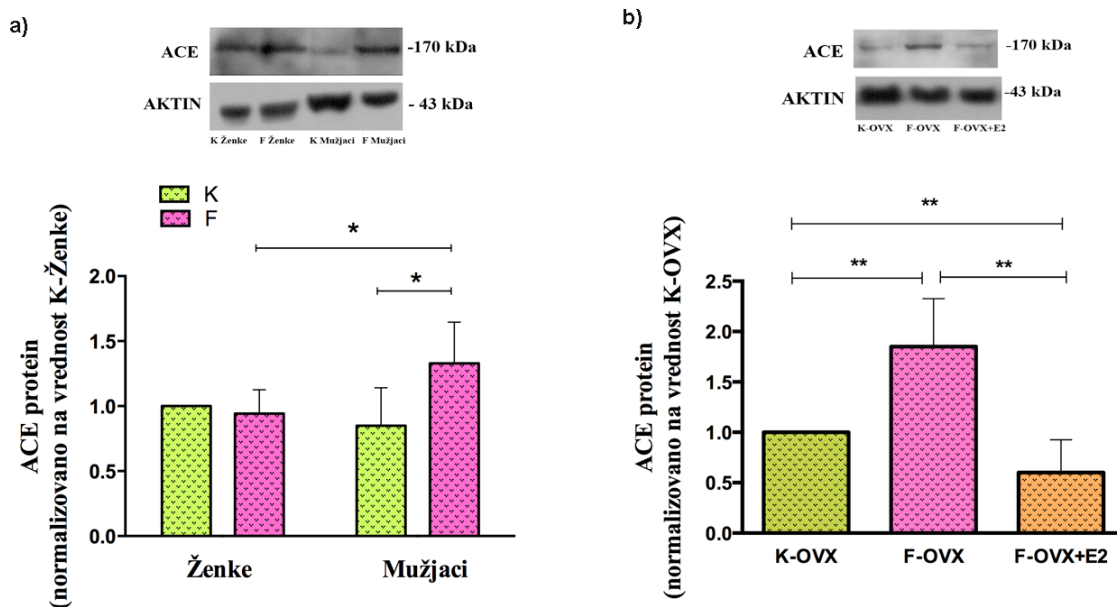
Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Svaka grupa se sastoji od 9 životinja. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom; * $p < 0.05$ u odnosu na K Mužjaci, # $p < 0.05$ u odnosu na K Ženke

4.5. Uticaj ishrane bogate fruktozom na ekspresiju molekula RAS-a u srcu pacova

4.5.1. Nivo ACE

Ishrana bogata fruktozom je dovela do povećanja nivoa ACE u srcu samo kod mužjaka pacova ($p < 0.05$). Takođe, izmeren je veći nivo ACE u srcu kod mužjaka koji su pili 10% fruktozni rasvor nego kod ženki na istom tretmanu ($p < 0.05$). Između mužjaka i ženki pacova na standardnom laboratorijskom režimu ishrane nije detektovana razlika u nivou ACE u srcu (*Slika 4.1.a*).

Kao što je prikazano na *slici 4.1.b* ishrana obogaćena fruktozom je dovela do povećanja nivoa ACE u tkivu srca ovarijektomisanih pacova ($p < 0.01$). Sa druge strane, tretman estradiolom je smanjio nivo ACE kod ovarijektomisanih životinja koje su pile 10% rasvor fruktoze ($p < 0.01$). Kod F-OVX+E2 životinja je nivo ACE čak bio statistički značajno smanjen u odnosu na K-OVX životinje ($p < 0.01$).



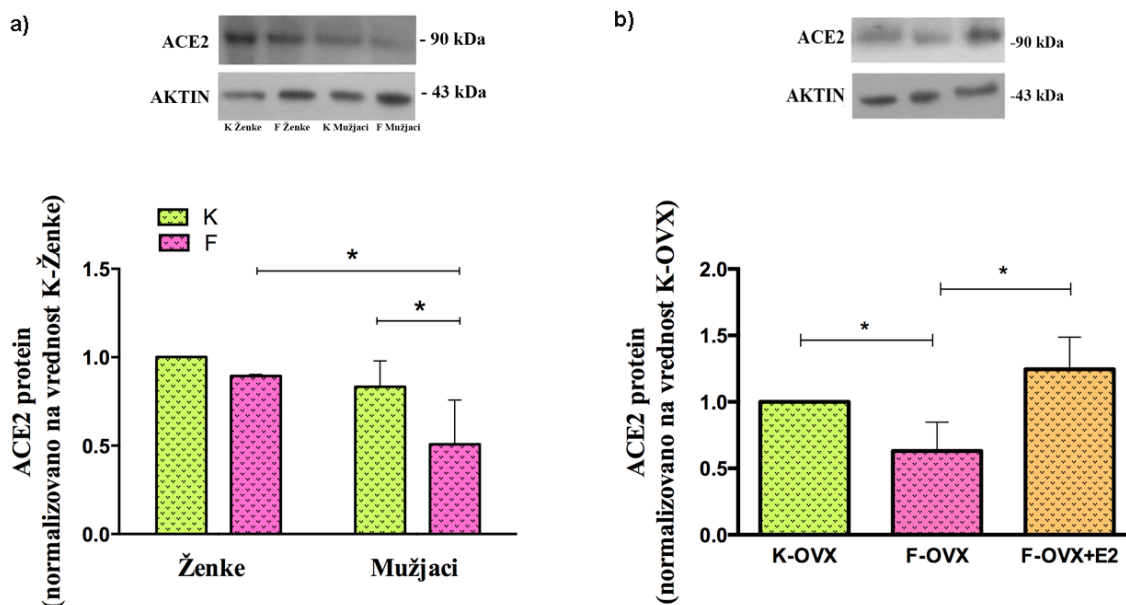
Slika 4.1. Nivo ACE u lizatu ćelija srca mužjaka i intaktnih ženki pacova (a) i ovarijektomisanih ženki pacova sa ili bez supstitucione terapije estradiolom (b) nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze. Na gornjem delu slike su predstavljene reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su

predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.5.2. Nivo ACE2

Kao što je predstavljeno na *slici 4.2.a* ishrana obogaćena fruktozom je smanjila nivo ACE2 u tkivu srca samo kod mužjaka ($p < 0.05$). Nivo ACE2 kod mužjaka tretiranih fruktozom je bio značajno manji nego kod ženki na istom tretmanu ($p < 0.05$). Između kontrolnih mužjaka i ženki nisu detektovane promene u nivou ACE2.

Ishrana bogata fruktozom je smanjila nivo ACE2 ($p < 0.05$) u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova, dok je tretman estradiolom doveo do povećanja nivoa ACE2 kod životinja koje su dobijale 10% rasvor fruktoze ($p < 0.05$). Supstituciona terapija estradiolom je dovela do reverzije promena nastalih delovanjem 10% fruktoznog rastvora (*Slika 4.2.b*).

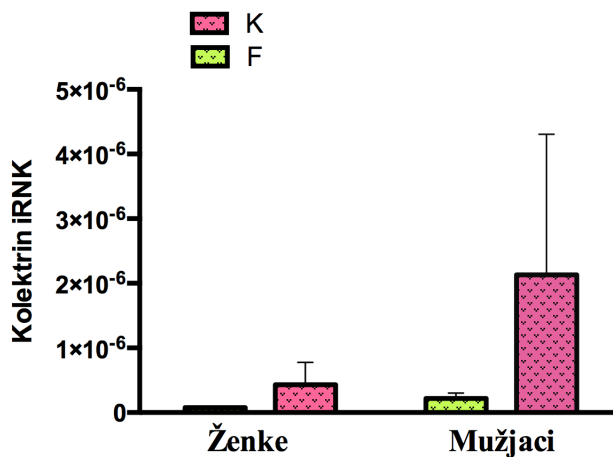


Slika 4.2. Nivo ACE2 u lizatu ćelija srca mužjaka i intaktnih ženki pacova (a) i ovarijektomisanih ženki pacova sa ili bez supstitucione terapije estradiolom (b) nakon tretmana 10% rastvorom

fruktoze. Na gornjem delu slike su predstavljeni reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol, * $p < 0.05$

4.5.3 Koncentracija iRNK za kolektrin

S obzirom da je transkripcija gena za kolektrin u tkivu srca detektovana samo kod malog broja intaktnih životinja nije postojala statistički značajna razlika u nivou iRNK za kolektrin između životinja na ishrani bogatoj fruktozom i odgovarajućih kontrolnih životinja (**Slika 4.3.**). Kod ovarijektomisanih životinja nije detektovana transkripcija gena koji kodira za kolektrin.

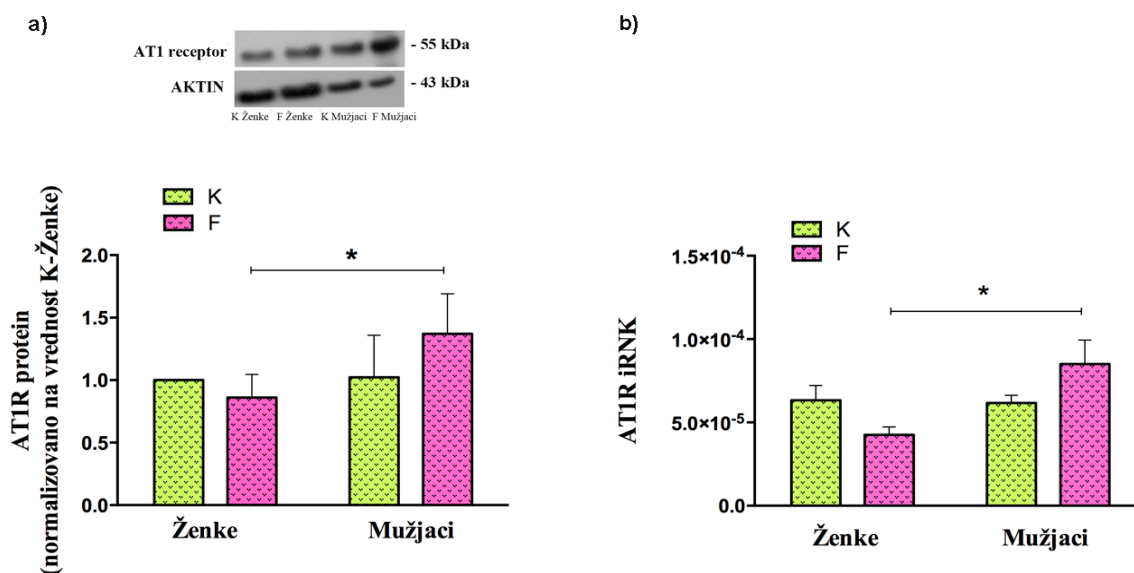


Slika 4.3. Relativna koncentracija iRNK za kolektrin u srcu mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom

4.5.4. Nivo iRNK i proteina AT1R

Western blot analizom je utvrđeno da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze ne dovodi do promena u nivou AT1R u srcu ni kod mužjaka ni kod ženki pacova. Takođe, ishrana bogata fruktozom nije dovela ni do promene nivoa iRNK za AT1R (*Slika 4.4.*) Međutim, nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze izmeren je značajno veći nivo iRNK i proteina AT1R u srcu kod mužjaka u odnosu na ženke pacova ($p < 0.05$).

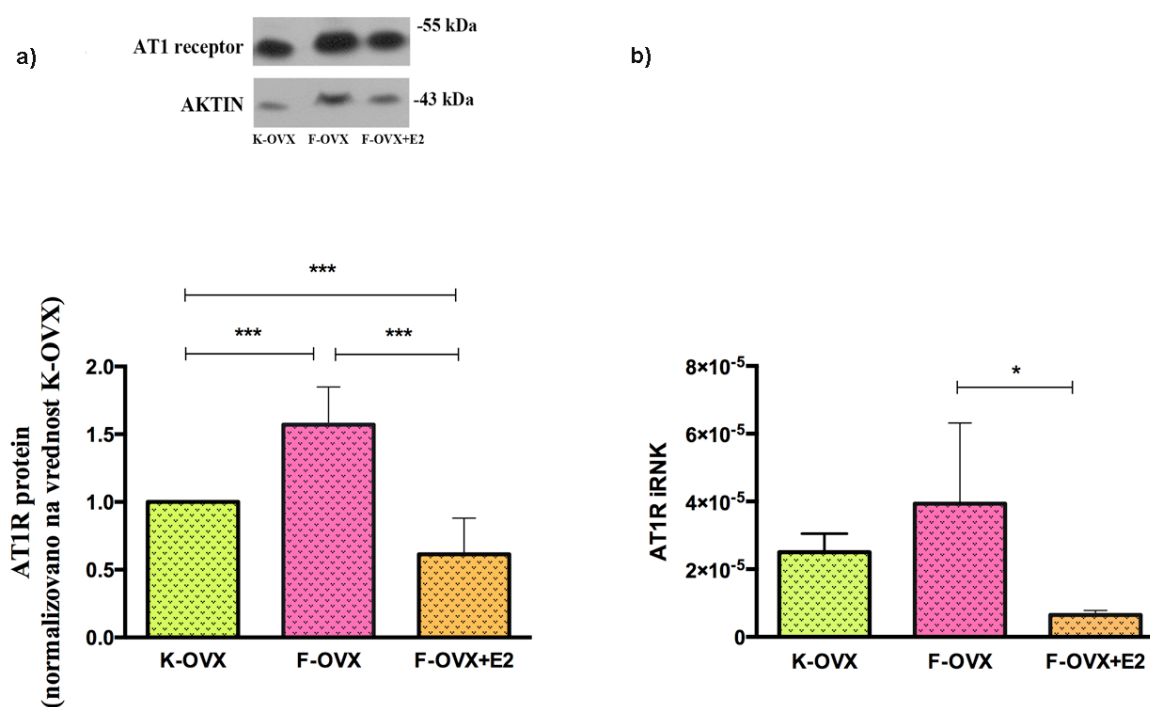
Nivo AT1R u srcu ovarijektomisanih ženki pacova je bio značajno povećan nakon ishrane bogata fruktozom ($p < 0.001$). Tretman estradiolom je smanjio nivo AT1R kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze ($p < 0.001$). Kod životinja tretiranih estradiolom koje su pile 10% rastvor fruktoze je čak detektovan manji nivo AT1R u srcu nego kod kontrolnih ženki ($p < 0.001$) (*Slika 4.5.a*).



Slika 4.4. (a) Nivo AT1R u lizatu ćelija srca kod mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze. Na gornjem delu slike su predstavljene reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. **(b) Relativna koncentracija iRNK koji kodira AT1R u srcu mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze.** Rezultati su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke

značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, # $p < 0.05$

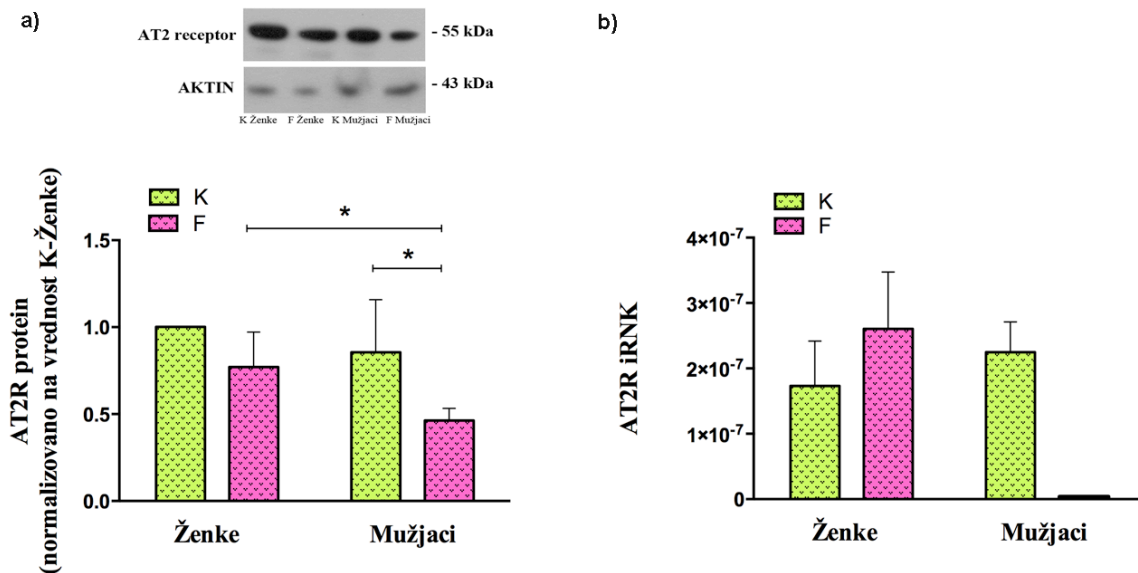
Na **slici 4.5.b** se vidi da ishrana bogata fruktozom nije dovela do statistički značajne promene u koncentraciji iRNK za AT1R u tkivu srca ovarijektomisanih životinja. S druge strane, kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze tretman estradiolom je doveo do značajnog smanjenja koncentracije iRNK za AT1R ($p < 0.05$).



Slika 4.7. (a) Nivo AT1R u lizatu ćelija srca kod ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom. Na gornjem delu slike su predstavljene reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. **(b) Koncentracija iRNK za AT1R u srcu ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom.** Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

4.5.5. Nivo iRNK i proteina AT2R

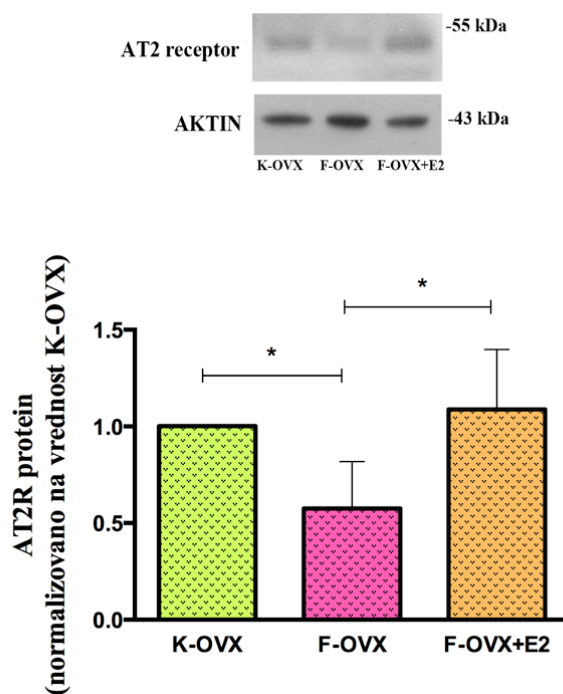
Ishrana bogata fruktozom je dovela do smanjenja nivoa AT2R u tkivu srca kod mužjaka pacova ($p < 0.05$). Kod intaktnih ženki ishrana bogata fruktozom nije uticala na nivo AT2R. Kod mužjaka pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze nivo AT2R u srcu je bio značajno manji u odnosu na ženke koje su bile na ishrani bogatoj fruktozom (*Slika 4.6.a*). Između mužjaka i ženki koji su bili na standardnoj laboratorijskoj ishrani nije detektovana razlika u nivou AT1R u tkivu srca.



Slika 4.6. (a) Nivo AT2R u lizatu ćelija srca kod mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze. Na gornjem delu slike su predstavljeni reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. **(b) Relativna koncentracija iRNK za AT2R u srcu mužjaka i intaktnih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, $*p < 0.05$.

Ishrana bogata fruktozom nije dovela do statistički značajne promene koncentracije iRNK za AT2R u srcu intaktnih ženki. Interesantno je da kod mužjaka koji su pili 10% rastvor fruktoze nismo detektovali transkripciju gena koji kodira AT2R (*Slika 4.6.b*).

Kod ovarijektomisanih ženki pacova ishrana bogata fruktozom smanjuje nivo AT2R u tkivu srcu ($p < 0.05$). Supstituciona terapija estradiolom kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze dovodi do povećanja nivoa AT2R ($p < 0.05$) i do njegovog vraćanja na nivo detektovan kod kontrolnih životinja (*Slika 4.7.*). Transkripcija gena koji kodira AT2R nije detektovana u tkivu srca ni kod jedne grupe ovarijektomisanih ženki.

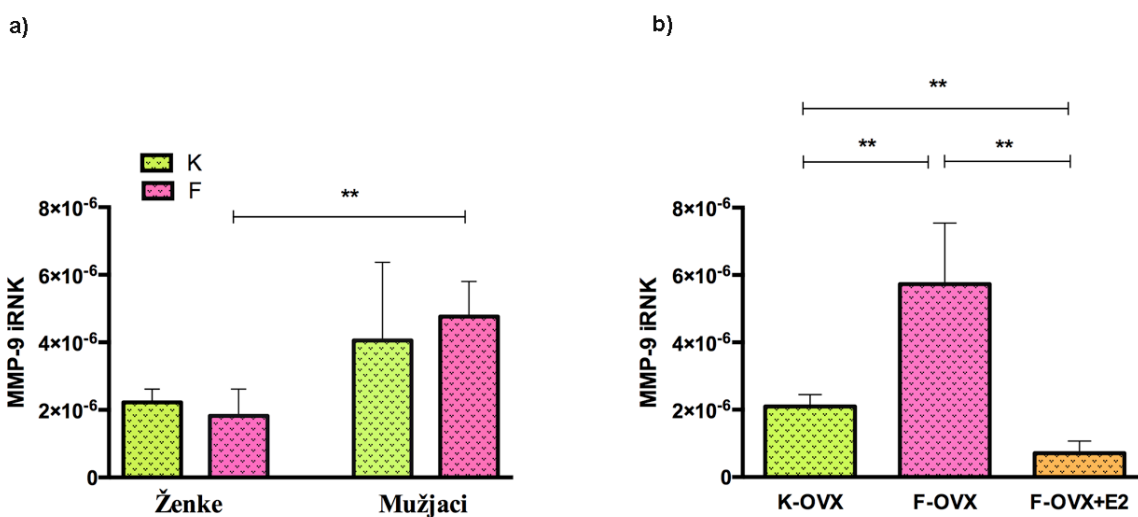


Slika 4.7. Nivo AT2R u lizatu ćelija srca kod ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom. Na gornjem delu slike su predstavljeni reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol, * $p < 0.05$.

4.6. Nivo iRNK i proteina MMP-9

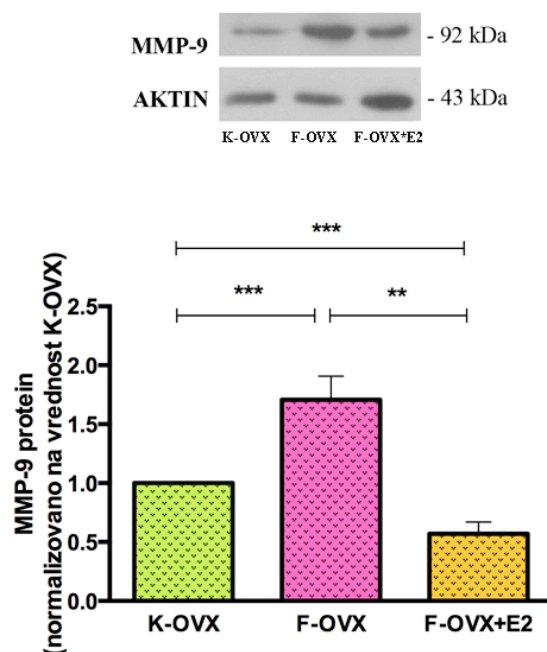
Kao što je prikazano na **slici 4.8.a** ishrana bogata fruktozom nije uticala na nivo iRNK za MMP-9 u tkivu srca ni kod mužjaka ni kod ženki pacova. Kod mužjaka pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze nivo iRNK za MMP-9 u srcu je bio značajno veći u odnosu na ženke koje su bile na ishrani bogatoj fruktozom ($p < 0.01$).

Kod ovarijektomisanih ženki pacova koje su pile 10% rastvor fruktoze je izmerena značajno veća koncentracija iRNK za MMP-9 u srcu u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$). Tretman estradiolom je doveo do smanjenja koncentracije iRNK za MMP-9 kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze. Kod ove grupe životinja je čak izmerena značajno manja koncentracija iRNK za MMP-9 nego kod kontrolne grupe ($p < 0.01$) (**Slika 4.8.b**).



Slika 4.8. (a) Relativna koncentracija iRNK za MMP-9 u srcu mužjaka i intaktnih ženki pacova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F- životinje na ishrani bogatoj fruktozom, $^{\#}p < 0.001$ u odnosu na F Ženke; (b) **Koncentracija iRNK za MMP-9 u srcu ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol; $^{**}p < 0.01$.

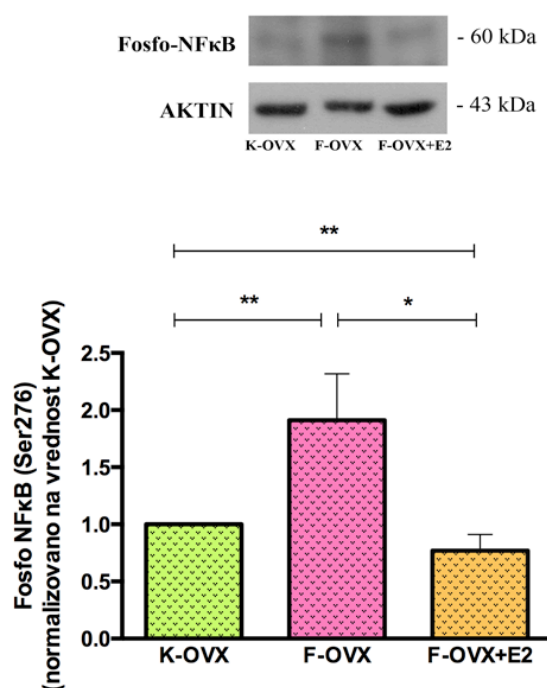
Kao što je predstavljeno na **slici 4.9.** kod ovarijektomisanih ženki je ishrana bogata fruktozom dovela do povećanja nivoa MMP-9 ($p < 0.001$), dok je tretman estradiolom smanjio nivo MMP-9 kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze ($p < 0.001$). Nivo MMP-9 je bio čak statistički značajno manji kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze i primale supstitucionu terapiju estradiolom u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).



Slika 4.9. Nivo MMP-9 u lizatu ćelija srca kod ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom. Na gornjem delu slike su predstavljeni reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$

4.7. Aktivacija NFκB

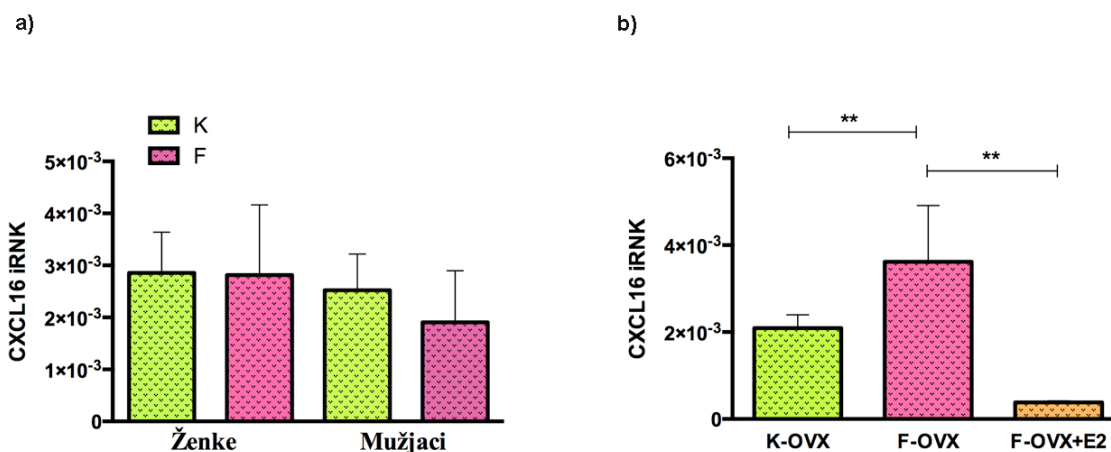
U srcu ovarijektomisanih ženki pacova je ishrana bogata fruktozom je dovela do povećane fosforilacije p65 subjedinice NFκB transkripcionog regulatora na serinskom ostatku koji se nalazi na poziciji 276 (Ser276) ($p < 0.01$). Ova fosforilacija je odgovorna za aktivaciju NFκB. Smanjen stepen fosforilacije p65 subjedinice je izmeren kod ovarijektomisanih ženki koje su pored ishrane bogate fruktozom bile podvrgnute i supstitucionoj terapiji estradiolom u odnosu na životinje koje nisu primale ovu terapiju ($p < 0.05$). Stepenn fosforilacije NFκB je bio čak značajno manji kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze i primale supstitucionu terapiju estradiolom nego kod kontrolnih životinja ($p < 0.01$) (Slika 4.10.).



Slika 4.10. Nivo fosforilisane forme NFκB u lizatu ćelija srca ovarijektomisanih ženki pacova nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze sa ili bez supstitucione terapije estradiolom. Na gornjem delu slike su predstavljeni reprezentativni Western blot-ovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Svaku grupu je činilo 9 životinja. Kao kontrola za jednako nanošenje proteina korišćen je β -aktin. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F-životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijektomija, E2-estradiol; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.8. Nivo iRNK za CXCL16

Kao što je predstavljeno na **slici 4.11.a** ishrana bogata fruktozom nije dovela do promene nivoa iRNK za CXCL16 u srcu ni kod mužjaka ni kod ženki. Za razliku od intaktnih životinja, u srcu ovarijsktomisanih ženki je ovaj režim ishrane doveo do povećanja nivoa iRNK za CXCL16 ($p < 0.01$). Treman estradiolom je smanjio nivo iRNK za CXCL16 ($p < 0.01$) i vratio ga na nivo detektovan kod kontrolnih ovarijsktomisanih ženki



Slika 4.13. Relativna koncentracija iRNK za CXCL16 u srcu mužjaka i intaktnih ženki pacova (a) i ovarijsktomisanih ženki pacova sa ili bez supstitucione terapije estradiolom (b) nakon tretmana 10% rastvorom fruktoze. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti. Kao endogena kontrola za relativnu kvantifikaciju korišćena je iRNK za 18s rRNK. K-životinje na standardnom režimu ishrane, F- životinje na ishrani bogatoj fruktozom, OVX-ovarijsktomija, E2-estradiol; ** $p < 0.01$

5. DISKUSIJA

Ishrana obogaćena fruktozom dovodi do razvoja simptoma metaboličkog sindroma (Havel, 2005; Basciano i sar., 2005; Le i Tappy, 2006). Ovaj tip ishrane dovodi do poremećaja u strukturi i funkciji srca što je povezano sa povećanom inflamacijom i oksidativnim stresom (Kobayashi i sar., 1993; Patel i sar., 2009; Kamide i sar., 2002, Conti i sar., 2014). Kod žena stopa obolevanja od metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih bolesti raste sa pojavom menopauze (Carr, 2003). Istraživanja urađena na životinjama su ukazala da bi polni hormoni, pre svega estrogen, mogli biti odgovorni za zaštitu ženki od nastanka metaboličkih poremećaja izazvanih ishranom tokom reproduktivnog perioda (Galipeau i sar., 2002; Korićanac i sar., 2013; Romić i sar., 2013; Frias i sar., 2001; Djouadi i sar., 1998; Hong i sar., 2009; Carr, 2003).

5.1. Uticaj ishrane bogate fruktozom na morfološke i biohemijske karakteristike mužjaka i ženki Wistar pacova

Rezultati ove studije pokazuju da su mužjaci, kao i intaktne i ovarijektomisane ženke pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze unosili više tečnosti u odnosu na životinje koje su pile samo vodu. Ovo se može objasniti izuzetno prijatnim ukusom fruktoznog rastvora. Istovremeno, životinje koje su pile 10% rastvor fruktoze su unosile manje hrane od kontrolnih životinja. Međutim, i pored smanjenog unosa hrane kod životinja na fruktoznoj ishrani ukupan energetske unos je povećan u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo verovatno nastaje kao rezultata povećanog unosa fruktoze. Tretman estradiolom je doveo do smanjenja unosa hrane i tečnosti, što je zajedno rezultovalo smanjenim kalorijskim unosom kod ovarijektomisanih životinja. Ovo je u skladu sa rezultatima prethodne studije u kojoj je pokazano da estradiol smanjuje ukupan kalorijski unos kod miševa za 25-35% (Dubuc, 1985).

Interesantno je da, i pored povećanog kalorijskog unosa, kod mužjaka pacova i kod ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze nije došlo do povećanja telesne mase. Ovo je u skladu sa rezultatima druge studije u kojoj takođe nije došlo do promene

telesne težine kod pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze (Roglans i sar., 2007; Sanchez-Lozada i sar., 2007). Rezultati koji se tiču uloge ishrane bogate fruktozom u povećanju telesne mase su i dalje kontradiktorni. Naime, iako je u brojnim studijama pokazano da ishrana obogaćena fruktozom ne dovodi do povećanja telesne mase kod pacova (Hwang i sar., 1987; Bezerra i sar., 2000; Lingelbach i McDonald, 2000; D'Angelo, i sar., 2005; Iyer i Katovich, 1994), u drugim studijama je pokazano obrnuto (Dai i McNeill, 1995; Abdulla^b i sar., 2011; Kanarek i Orthen Gambill, 1982). Ovo bi moglo biti posledica različite starosti životinja u trenutku kad se počelo sa tretmanom fruktozom, kao i uticaja ishrane bogate fruktozom na nivo leptina u plazmi (Abdulla^b i sar., 2011).

S druge strane, kod intaktnih ženki koje su konzumirale 10% rastvor fruktoze je došlo do porasta telesne mase verovatno usled povećanja mase visceralnog masnog tkiva što je u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljene studije (Bocarsly i sar., 2010). Ovo se objašnjava nalazom da ishrana obogaćena 10% fruktozom dovodi do razvoja leptinske rezistencije kod ženki pacova što rezultuje povećanom visceralnom adipoznošću (Vojnović-Milutinović i sar., 2014).

Ishrana bogata fruktozom ni kod jedne grupe životinja nije dovela do povećanja apsolutne i relativne mase srca. Prethodna istraživanja su pokazala da veći procenat fruktoze u ishrani (61% i 66%) dovodi do hipertrofije srca (Kobayashi i sar., 1993; Patel i sar., 2009). Kod pacova koji su bili na ishrani bogatoj mastima i pili 10% rastvor fruktoze je do značajnog povećanja mase srca došlo tek nakon 18 nedelja tretmana (Axelsen i sar., 2010). Na osnovu ovoga se može pretpostaviti da su i dužina trajanja tretmana i količina konzumirane fruktoze u ovoj studiji nedovoljne da bi izazvale promene u masi srca.

Konzumacija 10% rastvora fruktoze je dovela do hipoglikemije kod intaktnih ženki dok je nivo insulina ostao nepromenjen. Kod mužjaka nije došlo do promene nivoa glukoze i insulina u krvi. Nepromenjen nivo insulina verovatno nastaje usled toga što fruktoza ne stimuliše sekreciju insulina iz β -ćelija pankreasa (Curry, 1989). Ono što je odlikovalo intaktne životinje oba pola koje su pile 10% rastvor fruktoze je povećan nivo TG u plazmi u odnosu na kontrole. Ovo nije neočekivano s obzirom da fruktoza stimuliše *de novo*

lipogenezu u jetri, smanjuje klirens VLDL i povećava sekreciju VLDL iz jetre (Faeh i sar., 2005; Chong i sar., 2007; Taghibiglou i sar., 2000).

Kod ovarijektomisanih ženki pacova ishrana bogata fruktozom dovela je do povećanja nivoa insulina i TG u plazmi dok je nivo glukoze u plazmi ostao nepromenjen. HOMA index je bio povećan kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze što ukazuje na razvoj insulinske rezistencije. Biohemijske promene detektovane kod ovarijektomisanih ženki u ovoj studiji su u skladu sa rezultatima prethodno objavljene studije (Babacanoglu i sar., 2013). Tretman estradiolom kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze je doveo do snižavanja nivoa glukoze, insulina i HOMA indexa, pri čemu su se vrednosti insulina i HOMA indexa vratile na nivo detektovan kod životinja na standardnoj ishrani. Ranija istraživanja su pokazala da estradiol deluje povoljno na homeostazu glukoze kod ovarijektomisanih ženki (Alonso i sar., 2006). Takođe, kod intaktnih i gonadektomisanih mužjaka koji su bili na ishrani bogatoj fruktozom tretman estradiolom je doveo do poboljšanja osetljivosti na insulin (Vasudevan i sar., 2005). U ovoj studiji tretman estradiolom nije uticao na nivo TG kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze što je u skladu sa prethodnom studijom (Vasudevan i sar., 2005).

5.2. Uticaj ishrane bogate fruktozom na krvni pritisak mužjaka i ženki Wistar pacova

Prethodna istraživanja su pokazala da ishrana bogata fruktozom dovodi do povećanja krvnog pritiska kod mužjaka pacova (Suzuki i sar., 1997; Verma i sar., 1994; Nyby i sar., 2007; Senador i sar., 2010; Vasudevan i sar., 2005). To je u saglasnosti sa rezultatima ove studije u kojoj je takođe pokazano da ishrana bogata fruktozom dovodi do porasta krvnog pritiska kod mužjaka. Smatra se da bi povećana aktivnost RAS-a mogla imati ulogu u fruktozom-posredovanom porastu krvnog pritiska (Tran i sar., 2009; Kobayashi i sar., 1993).

Za razliku od rezultata dobijenih kod mužjaka, naša studija je pokazala da kod ženki pacova ne dolazi do promena u krvnom pritisku nakon 9-nedeljne konzumacije 10% rastvora fruktoze. Studija Galipeau-a i saradnika je takođe pokazala da 9-nedeljna ishrana ženki Wistar pacova 60% fruktozom ne dovodi do promena u krvnom pritisku (Galipeau i

sar., 2002). Druge studije su međutim pokazale da pijenje 10% rastvora fruktoze u trajanju od 8 i 18 nedelja dovodi do povećanja krvnog pritiska kod ženki Wistar pacova (Brito i sar., 2008; da Silva i sar., 2011). Ono što bi moglo da doprinese primećenoj razlici u efektu ishrane bogate fruktozom na povećanje krvnog pritiska kod ženki pacova je izbor metode za merenje krvnog pritiska. Naime u našoj i u studiji Galipeau i saradnika krvni pritisak je meren indirektnom metodom postavljanjem manžetne na rep pacova, dok je u druge dve studije korišćena direktna metoda merenja krvnog pritiska pri čemu je kateter implantiran u zid karotidne arterije i jugularne vene.

U našoj studiji smo takođe pokazali da mušjaci na standardnom režimu ishrane imaju manji krvni pritisak od ženki. Sličan podatak je dobijen u studiji sa Wistar-Kyoto pacovima gde je krvni pritisak praćen tokom 24 časa (Calhoun i sar., 1995). S druge strane, kod različitih sojeva hipertenzivnih pacova je pokazano da mušjaci imaju veći krvni pritisak u odnosu na ženke (Ganten i sar., 1989; Masubuchi i sar., 1982; Iams i sar., 1979; Chen i sar., 1991; Crofton i sar., 1993).

5.3. Promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a u srcu mužjaka i ženki pacova nakon ishrane bogate fruktozom

Poznato je da prekomerna aktivacija ACE/ANG II/AT1R ose dovodi do hipertenzije, hiperholesterolemije, dijabetesa, slabosti srca i drugih poremećaja u funkcionisanju kardiovaskularnog sistema. S druge strane, aktivacija ACE2/Ang-(1-7)/Mas ose ima protektivno dejstvo na nastanak kardiovaskularnih bolesti. Iako je poznato da postoje polno specifične razlike u podložnosti kardiovaskularnim bolestima, kao i u samom odgovoru na terapiju, u istraživanjima je još uvek prisutna neravnoteža među polovima što je naročito uočljivo kod animalnih modela. Naime, većina eksperimentalnih studija se izvodi na mužjacima (Zucker i Berry, 2010).

U ovoj studiji smo, po prvi put, pokazali da u srcu pacova nakon ishrane bogate fruktozom dolazi do polno specifičnih promena u nivou proteinskih komponenti RAS-a. Kod mužjaka pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze smo detektovali povećan nivo ACE u srcu, dok kod ženki isti tretman nije doveo do promena u nivou ovog enzima. Jedna od

prethodnih studija je pokazala da ishrana 60% fruktozom dovodi do povećane transkripcije gena za ACE u srcu i aorti mužjaka pacova (Nyby i sar., 2007). ACE je ključni enzim RAS-a koji katalizuje prevođenje ANG I u vazokonstriktorni ANG II, kao i inaktivaciju vazodilatatora bradikininina. Mužjaci miševa kojima je isključen gen za ACE imaju značajno manji krvni pritisak u poređenju sa miševima divljeg soja (Esther i sar., 1996; Krege i sar., 1995), što nije slučaj sa ženkama (Krege i sar., 1995). Pretpostavka je da do ovoga dolazi usled nemogućnosti sinteze ANG II (Wang i sar., 2010). Ljudi sa ACE D/D genotipom, koji imaju veći nivo ACE u plazmi, se karakterišu smanjenom osetljivošću na insulin, smanjenom tolerancijom na glukozu, gojaznošću i podložnošću dijabetesu (Strazzullo i sar., 2003; Riera-Fortuny i sar., 2005; Yang i sar., 2006). Ovaj genotip je asociran i sa dijabetičkom nefropatijom koja nastaje kao posledica smanjene sinteze bradikininina (Kunz i sar., 1998; Azar i sar., 2001; Ha i sar., 2003; Vleming i sar., 1999; Jeffers i sar., 1997). Sve ovo ukazuje da ACE ima bitnu ulogu u nastanku simptoma metaboličkog sindroma i zbog toga ne iznenađuje činjenica da ACE inhibitori deluju protektivno na progresiju patofizioloških procesa koji odlikuju ovaj sindrom (Khan i sar., 2004; Bitkin i sar., 2013).

S druge strane, ishrana bogata fruktozom je u našem istraživanju rezultovala smanjenim nivoom ACE2 u tkivu srcu mužjaka pacova. Kod ženki nisu detektovane razlike u nivou ACE2 u srcu nakon ishrane bogate fruktozom. Imajući u vidu da ACE ima ulogu u produkciji ANG II (Skeggs i sar., 1956) dok ga ACE2 razgrađuje (Tipnis i sar., 2000), možemo zaključiti da bi povećanje odnosa ACE/ACE2 moglo dovesti do povećanja nivoa ANG II. U prethodnoj studiji je kod mužjaka pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze zapravo i izmeren veći nivo ANG II u tkivu srca (Giani i sar., 2010) što je u skladu sa rezultatima naše studije.

Kao što je prethodno pomenuto, ACE2 seče ANG II do Ang-(1-7). Time ne samo da dovodi do smanjivanja koncentracije vazokonstriktornog ANG II, već povećava i nivo vazodilatatornog Ang-(1-7). Eksperimentalne i kliničke studije su pokazale da ACE2/Ang-(1-7)/Mas regulatorna osa ima bitnu ulogu u etiologiji hipertenzije i u regulaciji funkcije kardiovaskularnog sistema. Smanjivanje aktivnosti ove ose može predstavljati kritičan faktor u nastanku i u progresiji kardiovaskularnih bolesti (Santos i sar., 2008; Ferrario,

2011). U istraživanjima je pokazano da tretman Ang-(1-7) dovodi do smanjenja telesne težine, nivoa TG i aldosterona, kao i do povećanja insulinske senzitivnosti kod mužjaka pacova koji su bili na ishrani bogatoj fruktozom (Marcus i sar., 2013; Giani i sar., 2009). Transgeni pacovi koji imaju povećan nivo Ang-(1-7) u plazmi se odlikuju povećanom insulinskom senzitivnošću i tolerancijom na glukozu (Santos i sar., 2010). Ang-(1-7) deluje i antiinflamatorno smanjujući nivo produkcije superoksid radikala i aktivaciju NF κ B i ERK (Marcus i sar., 2013). Kod mužjaka pacova je pokazano da ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze povećava odnos masa srca/masa tela, prečnik miocita, kao i da dovodi do fibroze leve komore i taloženja kolagena tipa III pri čemu tretman Ang-(1-7) ublažava ove efekte ishrane bogate fruktozom (Giani i sar., 2010). Studije urađene na nivou Mas receptora su pokazale da deficijencija ovog receptora dovodi do drastičnih promena u metabolizmu masti i glukoze (Santos i sar., 2008).

Donedavno je pažnja bila uglavnom usmerena na Ang-(1-7) kao glavni efektorni molekul koji nastaje delovanjem ACE2. Međutim ACE2 učestvuje i u sintezi Ang-(1-9) čija funkcija još uvek nije dovoljno proučena (Erdös i sar., 2002; Johnson i sar., 1989; Drummer i sar., 1990). Pokazano je da Ang-(1-9) inhibira ACE i resenzitizuje desenzitizovane B2R povećavajući aktivnost bradikina (Chen i sar., 2005). Nedavno je pokazano da se Ang-(1-9) vezuje za AT2R i da na taj način sprečava hipertrofiju kardiomiocita (Flores-Muñoz i sar., 2011; Ocaranza i sar., 2010). Druge studije su potvrdile da ACE2/Ang-(1-9) osa ima bitnu ulogu i u snižavanju krvnog pritiska (Ocaranza i sar., 2006; Ocaranza i sar., 2011). Na osnovu svih ovih činjenica možemo zaključiti da ACE2 stvaranjem Ang-(1-7) i Ang-(1-9) deluje protektivno na tkivo srca i da bi smanjenje njegovog nivoa kod mužjaka pacova, koje nastaje kao posledica ishrane bogate fruktozom, moglo da ima štetne efekte na funkciju srca.

Iako još uvek nije utvrđeno u kolikoj meri lokalni RAS u srcu doprinosi razvoju hipertenzije, ova studija pokazuje da je povećanje krvnog pritiska praćeno povećanjem odnosa ACE/ACE2 u srcu mužjaka pacova koji su pili 10% rastvor fruktoze. U budućim istraživanjima bi bilo interesantno ispitati kako ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze deluje na nivo ovih enzima u krvnim sudovima i bubrezima.

ANG II se vezuje za dva tipa receptora (AT1R i AT2R) preko kojih ostvaruje svoje dejstvo. Vezivanjem za AT1R ANG II može direktno učestvovati u patogenezi kardiovaskularnih bolesti. U ovoj studiji je pokazano da ishrana bogata fruktozom ne utiče na nivo iRNK za AT1R niti na proteinski nivo ovog receptora u srcu pacova oba pola. Međutim, detektovan je veći nivo iRNK i proteina AT1R u srcu kod mužjaka koji su pili 10% rastvor fruktoze u odnosu na ženke. U studiji Nyby-ja i saradnika je uočeno da ishrana bogata fruktozom (60%) utiče na povećanje nivoa iRNK za AT1R u srcu pacova (Nyby i sar., 2007). Ono što razlikuje našu i studiju Nyby-ja i saradnika je procenat fruktoze zastupljen u ishrani, tako da je to moglo da dovede do različitih rezultata. Prethodno je detektovano i povećanje gustine AT1R u komorama srca i to već nakon 3 nedelje konzumacije hrane bogate fruktozom (Iyer i sar., 1996). Međutim, i u ovom slučaju su pacovi hranjeni 60% fruktozom. Ovi rezultati ukazuju da procenat fruktoze primenjen u ishrani pacova u našoj studiji nije dovoljan da izazove promene u nivou AT1R.

Ishrana bogata fruktozom je izazvala polno-specifične promene u nivou drugog receptora za ANG II – AT2R. Naime, u srcu mužjaka pacova je detektovano smanjenje nivoa AT2R nakon ishrane bogate fruktozom, dok kod ženki ovaj način ishrane nije doveo do promena u nivou AT2R. Štaviše, iRNK za AT2R nije uopšte detektovana u srcu mužjaka pacova koji su pili rastvor fruktoze. Nameće se zaključak da je smanjen nivo AT2R posledica smanjene transkripcije gena koji kodira AT2R. Na osnovu izvedenih eksperimenata i na osnovu postojeće naučne literature još uvek ne možemo da pružimo adekvatno objašnjenje na koji bi način ishrana bogata fruktozom mogla da dovede do smanjene transkripcije gena za AT2R. Prethodno je predloženo da bi kod ženki vazodepresorna osa RAS-a (ACE2/AT2R) mogla biti više eksprimirana nego kod mužjaka (Sampson i sar., 2008). Međutim u našem istraživanju nismo detektovali razlike u nivou ni ACE2 ni AT2R između kontrolnih mužjaka i ženki.

Danas je široko zastupljeno mišljenje da AT2R predstavlja protektivni sistem samog organizma (Rompe i sar., 2010). Iako su podaci o funkciji AT2R još uvek kontroverzni, većina njih podržava koncept da AT2R deluje antiproliferativno, antiinflamatorno, antifibrotički i antiapoptički (de Gasparo i sar., 2000; Steckelings i sar., 2005). Skorašnja

studija je pokazala da stimulacija AT2R deluje antiinflamatorno snižavajući nivo TNF- α , IL-6 i NF κ B (Rompe i sar., 2010). AT2R na različite načine interaguje sa AT1R interferirajući sa štetnom signalnom kaskadom povezanom sa njegovom aktivacijom koja dovodi do hipertenzije, inflamacije, fibroze i oštećivanja organa (Volpe i sar., 2003; de Gasparo i sar., 2000; Steckelings i sar., 2005). Naime, AT2R može formirati heterodimere sa AT1R čime se direktno inhibira funkcionisanje AT1R (AbdAlla i sar., 2001). Takođe, AT2R formira i dimere sa B2R čime se povećava produkcija NO (Abadir i sar., 2006). Zaštitna svojstva AT2R na nivou tkiva su potvrđena kod različitih tipova oboljenja kao što su šlog, MI, ateroskleroza ili oštećenja nervnog tkiva (Iwai i sar., 2004; Bove i sar., 2005; Iwai i sar., 2005; Lucius i sar., 1998). Smanjenje nivoa AT2R kod mužjaka pacova na ishrani bogatoj fruktozom zapaženo u ovoj studiji bi se moglo tumačiti kao nedostatak u funkcionisanju zaštitnog sistema u srcu, što posredno može značiti bržu progresiju oštećenja srca. S druge strane kod ženki pacova koje su pile 10% rastvor fruktoze nije došlo do promene nivoa AT2R pa se može reći da su zaštićene od delovanja fruktoze svojim hormonskim statusom.

Generalno se smatra da AT2R ima protektivno dejstvo na kardiovaskularni sistem. Zhang i saradnici su pokazali da u koronarnoj cirkulaciji stimulacija AT1R rezultuje vazokonstrikcijom dok stimulacija AT2R dovodi do vazodilatacije (Zhang i sar., 2003). Kod fruktozom hranjenih hipertenzivnih pacova aktivacija AT2R ima potpuno suprotan efekat na kontrolu krvnog pritiska i homeostazu glukoze u odnosu na aktivaciju AT1R (Hsieh i sar., 2005). Interakcija ANG II sa AT2R dovodi do vazodilatacije povećanjem sinteze i otpuštanja NO (Abadir i sar., 2006; Katada i Majima, 2002; Cosentino i sar., 2005). U krvnim sudovima pacova sa normalnim i povišenim krvnim pritiskom detektovan je nizak nivo iRNK i proteina AT2R. Nivo AT2R se povećava kod hipertenzivnih životinja nakon blokade AT1R što ukazuje da među ovim receptorima postoji unakrsni mehanizam regulacije koji uglavnom deluje u patološkim uslovima (Cosentino i sar., 2005; Savoia i sar., 2005). Stimulacija AT2R, koja se dešava nakon povećanja nivoa endogenog ANG II, doprinosi antifibrotičkim i antihipertenzivnim efektima hronične blokade AT1R (Jones i sar., 2012). Farmakološki agonizam AT2R poboljšava performanse kardiomiocita (Altarche-Xifro i sar., 2009). Trenutno se rade istraživanja koja se baziraju na upotrebi

AT2R agonista u cilju poboljšanja adaptivne ćelijske diferencijacije i regeneracije nakon povrede tkiva i tokom zarastanja rana (Savoia i Volpe, 2011).

Na osnovu dobijenih rezultata i imajući u vidu podatke dostupne iz literature možemo zaključiti da bi promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a koje su detektovane u srcu mužjaka pacova nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze, mogle predstavljati rane molekulske promene koje prethode patološkim procesima u srcu. S obzirom da ove promene koincidiraju sa povećanjem krvog pritiska, a poznato je da lokalni RAS u srcu doprinosi nastanku hipertenzivne bolesti srca tako što stimuliše rast i proliferaciju miocita (Varagic i Frohlich, 2002), možemo zaključiti da su mužjaci pacova podložniji razvoju bolesti srca nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze. U ovoj studiji su ispitivane dve glavne ose renin-angiotenzin sistema – ANG II/AT1R i ANG II/AT2R. Interesantno bi bilo ispitati i kako konzumacija 10% rastvora fruktoze utiče na aktivnost drugih osa kao što su Ang-(1-7)/Mas receptor i alamandin/Mas vezani receptor D. Iako su potrebna još dodatna istraživanja da bi se u potpunosti razumeo mehanizam kojim ishrana bogata fruktozom pospešuje nastanak kardiovaskularnih oboljenja, dobijeni rezultati bi mogli biti značajni ako bi se iskoristili u cilju prevencije i preporuke da se nutricionistički saveti prilagode polno-specifičim potrebama.

5.4. Efekat estradiola na promene u nivou proteina RAS-a u srcu ovarijskim ženki pacova nakon ishrane bogate fruktozom

Polno specifične razlike u nivou proteina RAS-a koje su detektovane nakon ishrane obogaćene fruktozom bi mogle da nastanu kao posledica delovanja ženskih polnih hormona. Olatunji i saradnici su pokazali da oralni kontraceptivi poništavaju štetni uticaj koji preterana zasupljenosti fruktoze u ishrani ima na metabolizam glukoze i lipida (Olatunji i sar., 2013).

Kao što je prethodno istaknuto, metabolički sindrom povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti. S druge strane, estrogen deluje protektivno na zdravlje kardiovaskularnog sistema, bilo direktnim uticajem na ćelije krvnih sudova i kardiomiocite ili indirektno preko sistemskih efekata (Murphy, 2011). Naime razlike koje su pronađene

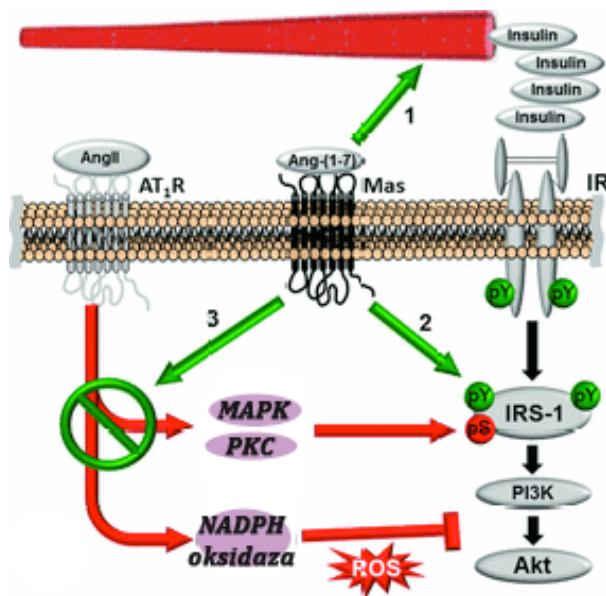
između mužjaka i ženki u ekspresiji i aktivnosti jonskih kanala u srcu se pripisuju ulozi estrogena (Saito i sar., 2009). Estrogen je takođe odgovoran i za značajno manju produkciju ROS-a od strane mitohondija srčanih ćelija kod ženki, a takođe ima i protektivno dejstvo na nastanak ateroskleroze i hipertrofije srca (Murphy, 2011). Smatra se da protektivno dejstvo estrogena proizilazi i iz njegovog delovanja na povećanje sinteze NO (Nuedling i sar., 1999; Sun i sar., 2006; Lin i sar., 2009; Chakrabarti i sar., 2010).

U ovoj studiji je po prvi put pokazano da pijenje 10% rastvora fruktoze menja nivo proteinskih komponenti RAS-a u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova. Nivo proteina sa potencijalno štetnim dejstvom, ACE i AT1R, je povećan u tkivu srca ovarijektomisanih životinja nakon ishrane bogate fruktozom dok je u isto vreme nivo proteina sa potencijalno zaštitinim dejstvom na kardiovaskularni sistem, ACE2 i AT2R, smanjen. Ove promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a koincidiraju sa povećanjem nivoa TG i insulina u plazmi, kao i HOMA indeksa. Tretman estradiolom je doveo do vraćanja nivoa ACE2 i AT2R u tkivu srca na nivo koji je detektovan kod kontrolnih životinja i do smanjenja nivoa ACE i AT1R čak ispod nivoa izmerenog kod kontrola (Bundalo^a i sar., 2015). Pored toga, supstituciona terapija estradiolom je vratila HOMA index na kontrolni nivo što još jednom ukazuje na vezu RAS-a i osetljivosti na insulin.

Inflamacija i insulinska rezistencija imaju bitnu ulogu u nastanku kardiovaskularnih bolesti (Willerson i Ridker, 2004; Roberts, 2004). ANG II deluje proinflamatorno indukujući ekspresiju proinflamatornih citokina, hemokina, faktora rasta i adhezionih molekula. Važnog posrednika u inflamatornom delovanju ANG II predstavljaju i ROS koji nastaju aktivnošću NADPH oksidaze (Rajagopalan i sar., 1996; Griendling i sar., 2000; Touyz, 2004; Tain i Baylis, 2006). ANG II preko AT1R aktivira NADPH oksidazu, dok aktivacija AT2R dovodi do inhibicije ovog enzima (Sohn i sar., 2000). Prekomerno formiranje ROS-a indukuje insulinsku rezistenciju (Stump i sar., 2006) (**Slika 5.1.**) i aktivira mnogobrojne signalne puteve uključujući i NFκB (Nathan, 2003) koji potom stimuliše transkripciju proinflamatornih gena koji kodiraju TNF-α, MCP-1, IL-6 i CRP, što dovodi do inflamacije (Brasier i sar., 2002; Han i sar., 1999; Muller i sar., 2000). ROS takođe smanjuju bioraspoloživost NO, dovode do oksidacije lipida i prouzrokuju oštećenja ćelija.

Studije urađene na različitim model-sistemima insulinske rezistencije, uključujući i pacove hranjene fruktozom, su pokazale da antagonisti AT1R smanjuju insulinsku rezistenciju (Henriksen i sar., 2001; Navarro-Cid i sar., 1995). Naime, ANG II inhibira signalne puteve insulina na nekoliko nivoa (Folli i sar., 1997; Izawa i sar., 2005). ANG II može smanjiti sposobnost insulina da aktivira IRS-1/PI3K/Akt signalni put što dovodi do smanjene translokacije GLUT4 u plazma membranu i smanjenog preuzimanja glukoze u VSMC (Izawa i sar., 2005). Fosforilacija serina u IRS-1 predstavlja najznačajniji mehanizam kojim ANG II delujući preko AT1R ometa signalni put insulina (Huisamen i sar., 2011). Aktivacija IRS-1/PI3K/Akt signalnog puta dovodi i do stimulacije eNOS i otpuštanja NO (Kuboki i sar., 2000; Zeng i sar., 2000). ANG II sprečava aktivaciju eNOS fosforilacijom IRS-1 na Ser612 i Ser307 što je posredovano sa ERK 1/2 i JNK 1/2 (Andreozzi i sar., 2004). Poznato je da lekovi koji interferiraju sa RAS-om, među kojima su i ARB, povećavaju fosforilaciju eNOS na Ser1177 i na taj način povećavaju bioraspoloživost NO (Imanishi^a i sar., 2008; Imanishi^b i sar., 2008; Matsumoto i sar., 2014). Dalje, ANG II inhibira insulinom posredovanu aktivaciju IRS-1 smanjenjem fosforilacije na Tyr608 i smanjuje fosforilaciju Akt na Ser473 dodatno smanjujući osetljivost na insulin (Folli i sar., 1997; Izawa i sar., 2005). ANG II indukuje i aktivaciju enzima p38 MAPK (Ushio-Fukai i sar., 1998; Eguchi i sar., 2001) koji bi indirektno mogao dovesti do fosforilacije serina u IRS-1 (Hemi i sar., 2011) (**Slika 5.1.**).

S druge strane, Ang-(1-7) ublažava insulinsku rezistenciju smanjivanjem fosforilacije serina u IRS-1 (Giani i sar., 2009; Tassone i sar., 2013) (**Slika 5.1.**) i direktnom stimulacijom fosforilacije IRS-1 na Tyr (Giani i sar., 2007). Ovaj molekul deluje suprotno od ANG II dovodeći do aktivacije ERK 1/2 i PKC u srcu pacova (Giani i sar., 2008). Takođe je pokazano da aktivacija Mas receptora sa Ang-(1-7) indukuje fosforilaciju Akt i na Thr308 i na Ser473 kako u srcu tako i drugim tkivima što ukazuje da bi Ang-(1-7) mogao pospešivati akciju insulina (Muñoz i sar., 2010; Giani i sar., 2007). Ovo pozitivno dejstvo Ang-(1-7) na signalni put insulina bi moglo biti posledica delovanja Ang-(1-7) na smanjenje oksidativnog stresa (Cao i sar., 2014).



Slika 5.1. Mehanizmi kojima Ang-(1-7) utiče na delovanje insulina (preuzeto od Dominici i sar., 2014) 1. Vazodilatatornim delovanjem povećava protok krvi olakšavajući dopremanje insulina do perifernih tkiva; 2. Direktno stimuliše fosforilaciju Tyr na IRS-1; 3. Inhibira negativno delovanje ANG II na signalni put insulina.

Na osnovu ovoga lako je zaključiti da bi ravnoteža između ACE i ACE2 koje smo određivali u našoj studiji, odnosno posredno, ravnoteža između ANG II i Ang-(1-7) koje nismo određivali, mogla biti izuzetno značajna za vezu između insulinske rezistencije, hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti.

U prethodnoj studiji, urađenoj na istom animalnom modelu, pokazano je da ishrana bogata fruktozom dovodi do insulinske rezistencije u srcu usled smanjenja fosforilacije Akt-a na Ser473 i Thr308 i eNOS-a na Ser1177 (Romić i sar., 2013). Na osnovu podataka o uticaju komponenti RAS-a na signalne puteve insulina možemo zaključiti da je detekovana insulinska rezistencija u srcu pacova nakon ishrane bogate fruktozom barem delimično nastala kao rezultat promena u ekspresiji molekula RAS-a. Dalje, supstituciona terapija estradiolom je uzrokovala reverziju promena u fosforilaciji Akt i eNOS kod ovarijektomisanih životinja (Romić i sar., 2013), što pokazuje da estradiol selektivno suprimira negativne efekte ishrane bogate fruktozom na signalne puteve insulina koji su

odgovorni za fosforilaciju/defosforilaciju Akt i eNOS. Imajući u vidu da je u našoj studiji pokazano da estradiol revertuje sve promene nastale u ekspresiji molekula RAS-a u srcu pacova nakon ishrane bogate fruktozom nameće se zaključak da to barem delimično doprinosi detektovanim promenama u fosforilaciji/defosforilaciji Akt i eNOS uzrokovanih estradiolom.

Kao što je pomenuto, prethodne studije urađene na modelu pacova hranjenih fruktozom u kojima je meren nivo komponenti RAS-a su uključivale samo mužjake. Poznato je da prekomerna aktivacija AT1R može dovesti do hipertrofije kardiomiocita što predstavlja veliki faktor rizika za nastanak slabosti srca, iznenadne srčane smrti i povećanja mortaliteta (Wassmann i Nickenig, 2006). Uloga AT1R u remodelovanju srca je prvi put sugerisana na osnovu rezultata kliničkog ispitivanja koje je pokazalo da su ARB mnogo učinkovitiji u odnosu na druge antihipertenzivne lekove u smanjenju mortaliteta uzrokovanog kardiovaskularnim bolestima (Dahlöf i sar., 2002). Druga istraživanja su pokazala da prekomerna ekspresija AT1aR kod transgenih miševa dovodi do hipertrofije i fibroze srca i do poremećaja u sprovođenju nadražaja i srčanog ritma što na kraju rezultuje slabošću srca (Hein i sar., 1997). S obzirom da su AT1aR prevashodno eksprimirani u srcu (Kakar i sar., 1992; Gasc i sar., 1994) mi smo pratili ekspresiju ovog tipa AT1R.

Hipertrofija srca nastaje kao posledica produženog delovanja ANG II na AT1R pri čemu, aktivacijom nekoliko signalnih puteva (protein kinaze C, EGFR, Jak-STAT puta, ROS-a i eikozanoida) finalno dolazi do aktivacije MAP kinaze (Mehta i Griendling, 2007). S druge strane, AT2R ima suprotno dejstvo na proliferaciju u odnosu na AT1R (Brede i sar., 2001). U našem prethodnom eksperimentu urađenom na ovarijektomisanim pacovima nije se razvila hipertrofija srca kao posledica ishrane bogate fruktozom (Romić i sar., 2013). Međutim značajno povećanje nivoa ACE i AT1R, kao i smanjenje nivoa ACE2 i AT2R koje je izmereno nakon ishrane bogate fruktozom može ukazivati da bi hipertrofija srca mogla da se razvije ako bi se ovakav režim ishrane nastavio.

Rezultati ove studije su pokazali da ishrana bogata fruktozom povećava nivo AT1R u srcu ovarijektomisanih životinja dok nije primećena značajna razlika u nivou transkripcije gena koji kodira AT1R. Ovo bi moglo ukazivati na moguću posttranslacionu

kontrolu ekspresije AT1R. Mogli bismo spekulirati da bi ishrana bogata fruktozom mogla zapravo dovesti do stabilizacije AT1R štiteći ga od degradacije, ali za sve ovo bi bila potrebna dodatna eksperimentalna potvrda. Sa druge strane, pokazali smo da tretman estradiolom kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze rezultuje kako smanjenjem nivoa AT1R tako i smanjenjem transkripcije gena koji kodira AT1R. Poznato je da estradiol može direktno uticati na transkripciju AT1R gena delujući na ERE koji se nalazi u 5' delu gena (Takeuchi i sar., 1993), ali i da može inhibirati translaciju AT1R iRNK (Wu i sar., 2003). Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da u našem eksperimentalnom modelu estradiol, barem delimično, smanjuje nivo AT1R smanjujući transkripciju gena za AT1R.

U ovoj studiji nismo detektovali iRNK za AT2R, ali smo detektovali protein. Objašnjene ove, naizgled nelogične pojave, bi mogao da pruži podatak da je poluživot iRNK za AT2R u nekim kulturama ćelija izuzetno kratak (maksimalno do 20 sati) (Csikos i sar., 1998), što samim tim otežava njenu detekciju. Takođe, činjenica je da je AT2R visoko eksprimiran samo u fetalnim tkivima i da nakon rođenja njegova ekspresija u normalnim fiziološkim uslovima dramatično opada (Levy, 2005).

Na kraju možemo da zaključimo da estradiol deluje protektivno na promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a koje nastaju kao posledica ishrane bogate fruktozom. Ove promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a u srcu predstavljaju zapravo promene na subkliničkom nivou i stoga su izuzetno bitne. Dobijeni rezultati bi mogli biti od velikog značaja u daljim ispitivanjima fenotipova kao što su insulinska rezistencija, metabolički sindrom i prateće kardiovaskularne bolesti kod žena.

5.5. Polno specifične razlike u efektu ishrane bogate fruktozom na ekspresiju MMP-9

MMP-9 pripada familiji metaloproteinaza matriksa i sposobna je da seče sve vrste denaturisanih kolagena, kolagen IV i V u njihovoj nativnoj formi, elastin, proteoglikane i ostale proteine matriksa (Birkedal-Hansen, 1995; Newby i sar., 2005). U kardiovaskularnim bolestima dolazi do oštećenja kolagenske mreže radi očuvanja funkcije i integriteta srca.

MMP-9 bi mogla predstavljati prognostički marker za povećan rizik od kardiovaskularne smrti (Blankenberg i sar., 2003).

U ovoj studiji smo po prvi put ispitivali efekat koji konzumacija 10% rastvora fruktoze ima na ekspresiju MMP-9 kod pacova oba pola. Rezultati naše studije su pokazali da ishrana bogata fruktozom ne dovodi do povećanja koncentracije iRNK za MMP-9 ni kod mužjaka ni kod ženki pacova (Bundalo^b i sar., 2015). U prethodno urađenoj studiji izmerena je veća aktivnost MMP-9 u VSMC kod mužjaka pacova koji su bili na ishrani obogaćenoj 60% fruktozom (Lu i sar., 2013). I druga studija u kojoj je ispitivan efekat konzumacije 10% rastvora fruktoze na nivo MMP-9 urađena je opet samo na mužjacima miševa sa isključenim genom za ApoE. Pokazano je da ishrana bogata fruktozom povećava nivo MMP-9 kod ovih miševa (Cannizzo i sar., 2012). S obzirom da je ovaj model sistem specifičan po odsustvu gena koji kodira Apo-E, poređenje sa našim model sistemom nije jednostavno.

U ovoj studiji je uočeno da mužjaci koji su pili 10% rastvor fruktoze imaju značajno veću koncentraciju iRNK za MMP-9 u tkivu srca nego ženke na istom režimu ishrane. Dalje, ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze kod ovarijektomisanih ženki je dovela do statistički značajnog povećanja koncentracije iRNK za MMP-9. Uporedo sa ovim je pokazano da ovaj tip ishrane povećava i proteinski nivo MMP-9 (Bundalo^b i sar., 2015). Prethodna studija je pokazala da estradiol može redukovati nivo MMP-9 (Vegeto i sar., 2001). To je u skladu sa rezultatima ove studije gde je pokazano da tretman estradiolom smanjuje nivo MMP-9 u tkivu srca ovarijektomisanih ženki pacova koje su pile 10% rastvor fruktoze (Bundalo^b i sar., 2015). Promene u nivou MMP-9 nakon ishrane obogaćene fruktozom i supstitucione terapije estradiolom su konzistentne sa onim koje su detektovane za ACE i AT1R. To i nije iznenađujuće imajući u vidu podatak da ANG II preko AT1R utiče na nivo MMP-9 (Okada i sar., 2010; Okada i sar., 2008).

Štetno remodelovanje miokardijuma finalno rezultuje povećanjem mortaliteta i morbiteta uzorokovanih različitim kardiovaskularnim bolestima uključujući hipertenziju, MI, kardiomiopatije i srčanu slabost (Cohn i sar., 2000). Poznato je da MMP-9 ima značajnu ulogu u remodelovanju srca koje je povezano sa hipertenzijom (Tayebjee i sar.,

2004; Chiao i sar., 2012). Aktivnost MMP-9 je povećana kod spontano hipertenzivnih pacova (Li i sar., 2000). MMP-9 direktno utiče na transformaciju miofibrila u miocitima (Jiang i sar., 2013) što je značajno prilikom nastanka fibroze srca i formiranja ožiljaka (Porter i Turner, 2009). Nekoliko studija je pokazalo da i veći sadržaj fruktoze u ishrani (60%), i duže vreme trajanja dijetalnog režima dovode do hipertrofije srca, prekomernog taloženja kolagena, i povećanja krutosti leve komore (Kobayashi i sar., 1993; Patel i sar., 2009; Kamide i sar., 2002). S obzirom da ishrana obogaćena 10% rastorom fruktoze kod ovarijektomisanih životinja dovodi do povećanja nivoa MMP-9 možemo očekivati da bi pri dužem tretmanu ovim rastvorom i kod našeg model sistema došlo do navedenih patofizioloških promena u srcu. U budućim studijama bi bilo interesantno ispitati efekte koje bi dugotrajna konzumacija 10% rastvora fruktoze imala na morfologiju i funkciju srca, ali takođe bi se moglo i manipulirati sa različitim procentima fruktoze zastupljenim u ishrani.

MMP-9 ima bitnu ulogu u inflamaciji. S obzirom da izvor MMP-9 predstavljaju prvenstveno inflamatorne ćelije (Mukherjee i sar., 2006) nije iznenađujuće da upotreba inhibitora MMP-9 smanjuje inflamaciju u miokardijumu kao i remodelovanje srca (Halade i sar., 2013). MMP-9 posredstvom citokina utiče na funkciju leukocita. Naime, MMP-9 aktivira IL-1 β i IL-8 koji dalje stimulišu degranulaciju MMP-9 iz neutrofila čime se povećava aktivnost neutrofila i hemotaksa (Opdenakker i sar., 2001). MMP-9 je i direktni posrednik u ulozi CRP u povećanju akumulacije makrofaga (Takahashi i sar., 2010).

S obzirom na iznesene činjenice možemo zaključiti da ishrana bogata fruktozom uzrokuje promene u ekspresiji MMP-9 u srcu ovarijektomisanih pacova čak i pre nego što su se desile strukturne promene, i da bi ove promene na molekularnom nivou zapravo mogle da budu uvod u promene koje se dešavaju na morfološkom nivou.

5.6. Uticaj ishrane bogate fruktozom i estradiola na aktivaciju NF κ B

NF κ B predstavlja transkripcioni regulator čija je aktivnost esencijalna za regulisanje brojnih bioloških procesa uključujući inflamaciju, imunski odgovor, proliferaciju, razviće i apoptozu (Kim i sar., 2006; Perkins, 2007). Između ostalog, NF κ B posreduje i u

inflamatornom odgovoru u tkivu srca nastalom kao rezultat delovanja ANG II (Brasier i sar., 2000; Hall i sar., 2006; Takemoto i sar., 1997).

U svojoj neaktivnoj formi NF κ B je vezan za inhibitorni protein I κ B α i ovaj kompleks je lokalizovan u citoplazmi (Karin i Ben-Neriah, 2000). Aktivacija NF κ B podrazumeva degradaciju I κ B α što rezultuje oslobađanjem NF κ B i njegovom akumulacijom u jedru (Han i sar., 1999; Wolf i sar., 2002). Potom dolazi do fosforilacije p65 subjedinice (Chen i Green, 2004; Viatour i sar., 2005), pri čemu jedno od mesta fosforilacije predstavlja i Ser276 (Zhong i sar., 1998; Vermeulen i sar., 2003). Kim i saradnici su predložili da bi ANG II delujući preko AT1R mogao povećavati fosforilaciju Ser276 i na taj način aktivirati NF κ B (Kim^b i sar., 2012).

Osim što smo kod ovarijektomisanih životinja detektovali promene u ekspresiji ACE i AT1R nakon ishrane bogate fruktozom, rezultati ove studije su po prvi put pokazali da ishrana bogata fruktozom povećava fosforilaciju p65 subjedinice na poziciji Ser276. Osim toga, ustanovljeno je i da je estradiol sposoban da revertuje ove promene u fosforilaciji p65 kod životinja koje su pile 10% rastvor fruktoze (Bundalo^b i sar., 2015), što je takođe u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za ACE i AT1R (Bundalo^a i sar., 2015).

U nekoliko studija je potvrđeno da je aktivacija NF κ B neophodna za produkciju MMP-9 (Bond i sar., 2001; Moon i sar., 2004). U različitim tipovima ćelija je pokazano da ANG II aktivira NF κ B (Kranzhofer i sar., 1999; Marui i sar., 1993) i da je ekspresija gena za MMP-9 regulisana ovim signalnim putem (Guo i sar., 2008). Imajući u vidu navedene podatke iz literature i rezultate dobijene u ovoj studiji koji pokazuju da promene ekspresije MMP-9 gena nakon ishrane bogate fruktozom i tretmana estradiolom u potpunosti prate promene u fosforilaciji p65 subjedinice na Ser276, možemo pretpostaviti da je signalni put ANG II/AT1R/p65 fosfoSer276 barem delimično odgovoran za detektovane promene u ekspresiji MMP-9. Naravno, potrebna su dodatna istraživanja da bi se nedvosmisleno potvrdila uloga ovog signalnog puta.

Prethodne studije su pokazale da estradiol inhibira aktivaciju NF κ B doprinoseći njegovoj stabilizaciji na dva načina: povećavanjem nivoa I κ B α kinaze i smanjenjem fosforilacije I κ B α (Xing i sar., 2012; Wen i sar., 2004). Naša studija zapravo po prvi put

demonstrira sposobnost estradiola da inaktivira NFκB smanjujući fosforilaciju p65 subjedinice na Ser 276.

NFκB pored uloge u kontroli ekspresije MMP-9 ima ulogu i u kontroli ekspresije mnogih drugih proinflamatornih gena, adhezivnih molekula i hemokina (Wei i sar., 2008; Cai i sar., 2005; Shoelson i sar., 2006). Pokazano je da inhibicija NFκB smanjuje insulinsku rezistenciju (Kim i sar., 2013), tako da možemo zaključiti da je smanjenje fosforilacije p65 na Ser276 uzrokovano estradiolom, barem delimično odgovorno za smanjenje insulinske rezistencije u srcu fruktoznih pacova izmereno nakon supstitucione terapije estradiolom (Romić i sar., 2013).

Naši rezultati ukazuju da estradiol, smanjujući aktivnost NFκB transkripcionog regulatora, ima zaštitno dejstvo na nastanak poremećaja u funkciji srca koji bi bili podstaknuti ishranom bogatom fruktozom.

5.7. Uticaj ishrane obogaćene fruktozom i estradiola na nivo iRNK za CXCL16

CXCL16 ima ulogu proinflamatornog hemokina. Naime, proinflamatorni citokini indukuju ekspresiju gena za CXCL16 (Wuttge i sar., 2004) koji dalje stimuliše produkciju proinflamatornih citokina (Gursel i sar., 2006). CXCL16 pokreće migraciju T-ćelija, stimuliše ćelijsku proliferaciju i dovodi do nastanka inflamatornog fenotipa u glatkim mišićnim ćelijama (Shimaoka i sar., 2004). U našoj studiji smo po prvi put ispitivali efekat 10% rastvora fruktoze na koncentraciju iRNK za CXCL16. Utvrdili smo da ishrana bogata fruktozom ne utiče na nivo transkripcije gena za CXCL16 kod mužjaka i ženki pacova. S druge strane, kod ovarijektomisanih ženki ishrana bogata fruktozom značajno povećava koncentraciju iRNK za CXCL16, dok tretman estradiolom revertuje ove promene.

CXCL16, pored uloge inflamatornog hemokina, deluje još i kao adhezioni molekul i receptor čistač. Kao adhezioni molekul on ima funkciju posrednika u prijanjanju T-limfocita za endotel krvnih sudova, dok kao receptor čistač posreduje u preuzimanju aterogeničnih lipoproteina od strane makrofaga i glatkih mišićnih ćelija (Shimaoka i sar., 2004). CXCL16 u sekretovanoj formi ima ulogu u pokretljivosti CD8⁺T ćelija, dok u transmembranskoj formi privlači T-ćelije na mesto zahvaćeno zapaljenskim procesom što

dovodi do formiranja penušavih ćelija i do ateroskleroze (Yamauchi i sar., 2004). Stoga nije iznenađujuće što je kod pacijenata sa metaboličkim sindromom koji su imali i karotidni plak detektovan povećan nivo solubilnog CXCL16 kao i povećan nivo iRNK za CXCL16 u odnosu na zdrave kontrole (Lv i sar., 2013). U aterosklerotskim plakovima je izmerena značajno veća koncentracija iRNK za CXCL16 u odnosu na onu izmerenu u grudnim arterijama i venama što ukazuje na moguću ulogu CXCL16 u nastanku ateroskleroze (Wuttge i sar., 2004). Ispitan je i uticaj haplotipova na nivo iRNK za CXCL16 u aterosklerotskim plakovima kod ljudi (Živković i sar., 2015). Međutim, uloga CXCL16 u nastanku ateroskleroze je još uvek predmet istraživanja (Jovanović i sar., 2015). Naime, studija urađena na CXCL16^{-/-}/LDLR^{-/-} miševima, čiji makrofagi imaju smanjenu sposobnost za vezivanje i internalizaciju oksidovanih lipoproteina, je pokazala da ishrana bogata mastima kod ovih miševa dovodi do formiranja većih lezija, do povećanog regrutovanja makrofaga i do povećane transkripcije gena za inflamatorne citokine u odnosu na kontrole. To sugeriše da bi akumulacija oksidovanih lipida od strane CXCL16 mogla biti ateroprotektivan mehanizam (Aslanian i Charo, 2006).

Ukoliko bi se CXCL16 posmatrao kao proinflamatorni hemokin onda na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da su ovarijektomisane ženke pacova podložnije inflamaciji uzrokovanoj ishranom bogatom fruktozom. Estradiol bi u tom slučaju imao protektivno dejstvo smanjujući transkripciju gena koji kodira ovaj proinflamatorni hemokin. S druge strane, prethodno urađena studija je pokazala da tretman estradiolom dovodi do povećanja nivoa TG u srcu ovarijektomisanih ženki koje su pile 10% rastvor fruktoze, što ukazuje da bi estradiol povećavajući taloženje lipida u srcu mogao potencirati štetne efekte ishrane bogate fruktozom (Korićanac i sar., 2012). Ukoliko bi se CXCL16 posmatrao na osnovu njegove uloge receptora čistača onda bi se rezultati mogli interpretirati na način da zapravo povećanje transkripcije gena koji kodira CXCL16 može predstavljati protektivni mehanizam kojim bi se sprečio eventualni nastanak ateroskleroze izazvan ishranom bogatom fruktozom. Za buduća istraživanja bi bilo interesantno ispitati da li ishrana bogata fruktozom i estradiol imaju uticaja na proteinski nivo CXCL16 (i vezanog za membranu i solubilnog). Na kraju možemo samo konstatovati da dok uloga

CXCL16 u metaboličkom sindromu i aterosklerozi ne bude detaljno ispitana ne možemo da donesemo tačan zaključak o posledicama koje promene u transkripciji njegovog gena imaju kod ovarijektomisanih ženki nakon ishrane bogate fruktozom i terapije estradiolom.

6. ZAKLJUČCI

1. Ishrana obogaćena 10% rastvorom fruktoze je dovela do povećanog kalorijskog unosa kod mužjaka i ženki pacova. Ovo je rezultovalo povećanjem telesne mase samo kod ženki pacova verovatno usled povećanja mase visceralnog masnog tkiva. Ishrana bogata fruktozom nije dovela do promene apsolutne i relativne mase srca ni kod jednog pola.
2. Ishrana bogata fruktozom dovodi do hipertrigliceridemije kod pacova oba pola, dok nema uticaja na insulinsku osetljivost.
3. Mužjaci pacova su podložniji za nastanak kardiovaskularnih bolesti nakon ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze u odnosu na ženke. Ovo štetno dejstvo ishrane bogate fruktozom se ogleda u:
 - povećanju krvnog pritiska kod mužjaka,
 - narušavanju ravnoteže u nivou proteinskih komponenti RAS-a koje bi moglo rezultovati patofiziološkim promenama u strukturi i funkciji srca kod mužjaka,
 - povećanoj transkripciju gena za MMP-9 i CXCL16 kod mužjaka u odnosu na ženke, što ukazuje na pokretanje inflamacije i štetno remodelovanje tkiva srca mužjaka
4. Estradiol poništava efekte ishrane bogate fruktozom na povećanje kalorijskog unosa kod ovarijektomisanih ženki.
5. Estradiol poništava štetno dejstvo ishrane obogaćene 10% rastvorom fruktoze na razvoj hiperinsulinemije i insulinske rezistencije kod ovarijektomisanih ženki pacova, ali ne sprečava nastanak hipertrigliceridemije.
6. Estradiol poništava sve štetne efekte ishrane bogate fruktozom na promene u nivou proteinskih komponenti RAS-a kod ovarijektomisanih ženki, što vodi smanjenju inflamacije i štetnog remodelovanja u tkivu srca.

7. Ishrana obogaćena fruktozom, posredstvom signalnog puta ANG II/AT1R/p65 fosfoSer276/MMP-9, može dovesti do inflamacije i šetnog remodelovanja tkiva srca kod ovarijektomisanih ženki pacova, dok estradiol svoje protektivno dejstvo ispoljava smanjujući nivo svih komponenti ovog puta, kao i aktivaciju NFκB transkripcionog regulatora.

7. LITERATURA

- Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension* 2006;48:316-22.
- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001;276:39721-39726.
- Abdulla^a MH, Sattar MA, Abdullah NA, Khan MAH, Anand Swarup KRL, Johns EJ. The contribution of $\alpha(1B)$ -adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose-fed Sprague-Dawley rats. *Eur J Nutr*, 2011;50: 251-260.
- Abdulla^b MH, Sattar MA, Johns EJ. The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *Int J Nephrol* 2011;2011:934659.
- Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 2004;172:6362-72.
- Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:821-6.
- Ades PA, Savage PD, Toth MJ, Schneider DJ, Audelin MC, Bunn JY, Ludlow M. The influence of obesity and consequent insulin resistance on coronary risk factors in medically treated patients with coronary disease. *Int J Obes* 2008;32:967-74.
- Ahonen T, Saltevo J, Laakso M, Kautiainen H, Kumpusalo E, Vanhala M. Gender differences relating to metabolic syndrome and proinflammation in Finnish subjects with elevated blood pressure. *Mediators Inflamm* 2009; 2009:959281.
- Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Förstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA

- by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 2003;23:4901-4916.
- Akpinar P, Kuwajima S, Krutzfeldt J, Stoffel M. Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab* 2005;2:385-397.
- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* 2008;93:528-37.
- Alfarano C, Sartiani L, Nediani C, Mannucci E, Mugelli A, Cerbai E, Raimondi L. Functional coupling of angiotensin II type 1 receptor with insulin resistance of energy substrate uptakes in immortalized cardiomyocytes (HL-1 cells). *Br J Pharmacol* 2008;153:907-914.
- Alghamri MS, Weir NM, Anstadt MP, Elased KM, Gurley SB, Morris M. Enhanced angiotensin II-induced cardiac and aortic remodeling in ACE2 knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013;18:138-51
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 2000;13:S31-38.
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Gonzalez-Pardo H, Conejo NM, Diaz F, Gonzalez C. Positive effects of 17 β -estradiol on insulin sensitivity in aged ovariectomised rats. *J Gerontol* 2006;61A:419-426
- Altarche-Xifró W, Curato C, Kaschina E, Grzesiak A, Slavic S, Dong J, Kappert K, Steckelings M, Imboden H, Unger T, Li J. Cardiac c-kit⁺AT21 cell population is increased in response to ischemic injury and supports cardiomyocyte performance. *Stem Cells* 2009;27:2488-2497.
- Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 2004;94:1211-1218.
- Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1998;3:8-12.

- Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:785-90.
- Armutcu F, Coskun O, Gurel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005;38:540-7.
- Aslanian AM, Charo IF. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis. *Circulation* 2006;114:583-590.
- Axelsen LN, Lademann JB, Petersen JS, Holstein-Rathlou NH, Ploug T, Prats C, Pedersen HD and Kjolbye AL. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:R1560-1570.
- Azar ST, Zalloua PA, Medlej R, Halabi G. The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with diabetic nephropathy in the type-1 diabetics. *Endocr Res* 2001;27:99-108.
- Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrupe-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2013;60:160-167.
- Bader M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:439-65.
- Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, Banerjee SK. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NF-kB-p65 and histone 3. *J Nutr Biochem* 2015 doi:10.1016/j.jnutbio.2015.06.006.
- Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
- Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, Morris R, Zavaroni I, van Dam R, Feskens E, Gabriel R, Diet M, Nilsson P, Hedblad B, European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR). Frequency of the

- WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 2002;28:364-376.
- Baños M, Arellano-Mendoza MG, Vargas-Robles H, Avila-Casado MC, Soto V, Romo E, Rios A, Hernandez-Zavala A, de la Peña-Diaz A, Escalante B. Relationship between angiotensin II receptor expression and cardiovascular risk factors in Mexican patients with coronary occlusive disease. *Exp Mol Pathol* 2011;91:478-83.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002;426:337-339.
- Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, Liu Z. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia* 2009;52:752-64.
- Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen Receptors and the Metabolic Network. *Cell Metab* 2011;14:289-299.
- Barros RP, Morani A, Moriscot A, Machado UF. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol Cell Endocrinol* 2008;295:24-31.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:5.
- Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 2004;109:2296-301.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR, Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 2002;109:629-39.
- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939-49.

- Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, CCarvalho CRO, Saad MJA. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr* 2000;130:531-1535.
- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 1996;60:280-300.
- Birkedal-Hansen. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-35.
- Bitkin EC, Boyraz M, Taşkın N, Akçay A, Ulucan K, Akyol MB, Akçay TJ. Effects of ACE inhibitors on insulin resistance and lipid profile in children with metabolic syndrome. *Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:164-9.
- Bjorntorp P. Metabolic difference between visceral fat and subcutaneous abdominal fat. *Diabetes Metab* 2000;26:10-12.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579-85.
- Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;97:101-106.
- Bogdarina IG, King PJ, Clark AJ. Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 2009;43:73-80.
- Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2001;50:556-565.
- Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1996;28:635-40.
- Booz GW, Day JN, Baker KM. Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1443-1453.

- Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin–angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R943-R949.
- Bove CM, Gilson WD, Scott CD, Epstein FH, Yang Z, Dimaria JM, Berr SS, French BA, Bishop SP, Kramer CM. The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. *J Cardiovasc Magn Reson* 2005;7:459-464.
- Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000;212:155-169.
- Brasier AR, Recinos A, III, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1257-1266.
- Brede M, Hadamek K, Meinel L, Wiesmann F, Peters J, Engelhardt S, Simm A, Haase A, Lohse MJ, Hein L. Vascular hypertrophy and increased P70S6 kinase in mice lacking the angiotensin II AT(2) receptor. *Circulation* 2001;104:2602-2607.
- Brito JO, Ponciano K, Figueroa D, Bernardes N, Sanches IC, Irigoyen MC, De Angelis K. Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:804-808.
- Brosnihan KB, Weddle D, Anthony MS, Heise C, Li P, Ferrario CM. Effects of chronic hormone replacement on the renin–angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertens* 1997;15:719-726.
- Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6735-6740.
- Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Gustafsson JA, Efendic S, Khan A. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 2006;49:588-597.
- Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of

- estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E904-912.
- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 2005;146:5341-9.
- Bundalo^a M, Živković M, Tepavčević S, Čulafić T, Korićanac G, Stanković A. Fructose-rich diet-induced changes in expression of the renin-angiotensin molecules in the heart of ovariectomised female rats could be reversed by estradiol. *Horm Metab Res* 2015;47:521-7.
- Bundalo^b M, Živković M, Čulafić T, Stojiljković M, Korićanac G, Stanković A. Oestradiol treatment counteracts the effect of fructose-rich diet on matrix metalloproteinase 9 expression and NFκB activation. *Folia Biologica (Praha)* 2015;61:233-240.
- Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005;26:369-375.
- Cai D, Yuan M, Frantz DF., Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183-90.
- Calhoun DA, Zhu S-T, Chen Y-F, Oparil S. Gender and dietary NaCl in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 1995;26:285-289.
- Campbell SE, Febbraio MA. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1139-E1146.
- Cannizzo B, Luján A, Estrella N, Lembo C, Cruzado M, Castro C. Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:941304.

- Cao X, Yang FY, Xin Z, Xie RR, Yang JK. The ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis can inhibit hepatic insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2014;393:30-8.
- Carr MC. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2404-2411.
- Carvalho JB, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz W, Guimaraes RB, Ribeiro EB, Franchini KG, Velloso LA, Saad MJ. The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implications for insulin resistance. *Endocrinology* 2003;144:5604-14.
- Chakrabarti S, Lekontseva O, Peters A, Davidge ST. 17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2010;85:796-805.
- Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;279:3188-3196.
- Chang KC, Liang JT, Tseng CD, Wu ET, Hsu KL, Wu MS, Lin YT, Tseng YZ. Aminoguanidine prevents fructose-induced deterioration in left ventriculararterial coupling in Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2007;151:341-346.
- Chang RSL, Lotti V, Keegan ME. Inactivation of angiotensin II receptors in bovine adrenal cortex by dithiothreitol. *Biochem Pharmacol* 1982;31:1903-6.
- Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 1993;105:1050-6.
- Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:392-401.
- Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 1997;272:F299-304.
- Chen YF, Meng Q-M. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 1991;48:85-96.

- Chen Z, Tan F, Erdös EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension* 2005;46:1368-1373.
- Chiao YA, Ramirez TA, Zamilpa R, Okoronkwo SM, Dai Q, Zhang J, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. *Cardiovasc Res* 2012;96:444-55.
- Chinali M, de Simone G, Roman MJ, Best LG, Lee ET, Russell M, Howard BV, Devereux RB. Cardiac markers of pre-clinical disease in adolescents with the metabolic syndrome: the strong heart study. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:932-8.
- Chmelar J, Chung KJ, Chavakis T. The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thromb Haemost* 2013;109:399-406.
- Chong MF, Fielding BA, Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1511-20
- Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997;231:363-371.
- Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:769-73.
- CohnJN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
- Conti FF, Brito Jde O, Bernardes N, Dias Dda S, Sanches IC, Malfitano C, Llesuy SF, Irigoyen MC, De Angelis K. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. *BMC Cardiovasc Disord* 2014;14:185.
- Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, Stas S, Sowers JR. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2009-H2023.

- Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, Venturelli V, Schiavoni M, Lembo G, Volpe M. Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Hypertens* 2005;18:493-9.
- Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL. Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* 2003;195:402-410.
- Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest* 1994;93:2372-78.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradski I, Scanga SE, Oliveira-Dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappel MC, Backx PH, Yagie Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-828.
- Crofton JT, Ota M, Share L. Role of vasopressin, the renin-angiotensin system, and sex in Dahl salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 1993;11:1031-1038.
- Csikos T, Balmforth AJ, Grojec M, Gohlke P, Culman J, Unger T. Angiotensin AT2 receptor degradation is prevented by ligand occupation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:142-7.
- Curry DL. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas* 1989;4:2-9.
- D'Angelo G, Elmarakby AA, Pollock DM, Stepp DW. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 2005;46:806-811.
- da Silva RJ, Bernardes N, Brito J, Sanches IC, Irigoyen C, De Angelis K. Simvastatin-induced cardiac autonomic control improvement in fructose-fed female rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:1793-1796.

- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995-1003.
- Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995;33:101-7.
- Daly ME, Vale C, Walker M, Alberti KG, Mathers JC. Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1072-85.
- Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-Converting Enzyme II in the Heart and the Kidney. *Circ Res* 2006;98:463-471.
- Danilczyk U, Sarao R, Remy C, Benabbas C, Stange G, Richter A, Arya S, Pospisilik JA, Singer D, Camargo SM, Makrides V, Ramadan T, Verrey F, Wagner CA, Penninger JM. Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* 2006;444:1088-91.
- Danilovich N, Babu PS, Xing W, Gerdes M, Krishnamurthy H, Sairam MR. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (forko) female mice. *Endocrinology* 200;141:4295-4308.
- Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today* 2011;16:22-34.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology: XXIII—the angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.
- de Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology* 2009;150:4114-23.

- Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FHH. 17β -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288: R759-R766.
- Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristo JP, Cros G, Azay Y. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 2005;179:43-9.
- Della Bruna R, Ries S, Himmelstoss C, Kurtz A. Expression of cardiac angiotensin II AT1 receptor genes in rat hearts is regulated by steroids but not by angiotensin II. *J Hypertens* 1995;13:763-769.
- Delpon E, Caballero R, Gomez R, Nunez L, Tamargo J. Angiotensin II, angiotensin II antagonists and spironolactone and their modulation of cardiac repolarization. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:155-161.
- Deng JY, Huang JP, Lu LS, Hung LM. Impairment of cardiac insulin signaling and myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H978-87.
- Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561-570.
- Diamant M, Lamb HJ, Groeneveld Y, Endert EL, Smit JW, Bax JJ, Romijn JA, de Roos A, Radder JK. Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:328-335.
- Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 2008;52:542-48.
- Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1029-1034.

- Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Clin Invest* 1998;102:1083-1091.
- Dominici FP, Burghi V, Muñoz MC, Giani JF. Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). *Clin Sci* 2014;126:613-630.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87:E1-E9.
- Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept* 2000;91:1-11.
- Drummer OH, Kourtis S, Johnson H. Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II. *Biocheml Pharmacol* 1990;39:513-518.
- Du Y, Yao A, Guo DF, Inagami T, Wang DH. Regulation of angiotensin II receptor in rat kidney by dietary sodium. *Hypertension* 1995;25:872-7;12.
- Dubuc. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985;180:468-73.
- Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000;106:55-62.
- Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou YP, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, Polonsky KS. Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1 α -deficient mice. *J Biol Chem* 1998;273:24457-24464.
- Dupont J, Derouet M, Simon J, Taouis M. Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken. *Am J Physiol* 1998;274:E309-16.

- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van GW, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, and Weber M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 2001;88:1L-20L.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
- Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 2001;276:7957-7962.
- Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C. Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinol* 2000;14:795-804.
- Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1067-1073.
- Erdös EG, Jackman HL, Brovkovich V, Tan F, Deddish PA. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1569-1576.
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 2008;133:462-74.
- Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol*. 2002;12:R745-R752.
- Erlich Y, Rosenthal T. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on fructose

- induced hypertension and hyperinsulinaemia in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22(suppl):S347-9.
- Eshtiaghi R, Esteghamati A, Nakhjavani M. Menopause is an independent predictor of metabolic syndrome in Iranian women. *Maturitas* 2010;65:262-266.
- Esther CR Jr, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 1996;74:953-65.
- Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi M, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 1997;99:2375-2385.
- Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, Baicu S, Mukherjee R, Manhaini M, Spinale FG. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H987-H994.
- Fabris B, Jackson B, Kohzuki M, Perich R, Johnston CI. Increased cardiac angiotensin converting enzyme in rats with chronic heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1990;17:309-314.
- Faeh D, Minehira K, Schwarz J, Periasami R, Seongus P, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipo-genesis and insulin sensitivity in healthy males. *Diabetes* 2005;54:1907-13
- Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, Morris M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci* 2006;130:41-50.
- Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1716-22.
- Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1997;30:535-541.
- Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20:1-6.

- Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102:42-47.
- Fezeu L, Balkau B, Kengne AP, Sobngwi E, Mbanya JC. Metabolic syndrome in a sub-Saharan African setting: central obesity may be the key determinant. *Atherosclerosis* 2007;193:70.
- Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, Kajstura J. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab Invest* 2000;80:513-527.
- Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002;53:672-677.
- Flores-Muñoz M, Smith NJ, Haggerty C, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin 1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol* 2011;589:939-951.
- Fogari R, Zoppi A, Lazzari P, Preti P, Mugellini A, Corradi L, Lusardi P. ACE inhibition but not angiotensin II antagonism reduces plasma fibrinogen and insulin resistance in overweight hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:616-620.
- Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 1997;100:2158-2169.
- Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003;52:2346-52.
- Frias JP, Macaraeg GB, Ofrecio J, Yu JG, Olefsky JM, Kruszynska YT. Decreased susceptibility to fatty acid-induced peripheral tissue insulin resistance in women. *Diabetes* 2001;50:1344-1350.

- Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life* 2008;60:502-10.
- Fukui K, Yang Q, Cao Y, Takahashi N, Hatakeyama H, Wang H, Wada J, Zhang Y, Marselli L, Nammo T, Yoneda K, Onishi M, Higashiyama S, Matsuzawa Y, Gonzalez FJ, Weir GC, Kasai H, Shimomura I, Miyagawa J, Wollheim CB, Yamagata K. The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab* 2005;2:373-384.
- Fukui T, Hirano T, Shiraishi Y, Nagashima M, Adachi M. Chronic insulin infusion normalizes blood pressure and the gene expressions of angiotensin II type 1 receptor in fructose-fed rats. *Hypertens Res* 2008;31:127-33.
- Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, Yonehara S. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;173:1620-7.
- Galien R, Garcia T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2424-2429.
- Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2478-H2484.
- Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 1999;33:323-328.
- Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, De Simone L, Genazzani AR. Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. *Climacteric* 1999;2:37-44.
- Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmerman F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens* 1989;7:721-726.

- Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 1994;24:531-537.
- Gasse C, Hense HW, Stieber J, Döring A, Liese AD, Keil U. Assessing hypertension management in the community: Trends of prevalence, detection, treatment, and control of hypertension in the MONICA Project, Augsburg 1984-1995. *J Hum Hypertens* 2001;15:27-36.
- Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, Littman DR. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 2005;3:e113.
- Ghilardi G, Biondi ML, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Internal carotid artery occlusive disease and polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1: a genetic risk factor. *Stroke* 2004;35:1276-1279.
- Giacchetti G, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Mantero F, Schambelan M. The tissue renin-angiotensin system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J Hypertens* 2000;18:695-702.
- Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1154-63.
- Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) has a dual role on growth-promoting signalling pathways in rat heart in vivo by stimulating STAT3 and STAT5a/b phosphorylation and inhibiting angiotensin II-stimulated ERK1/2 and Rho kinase activity. *Exp Physiol* 2008;93:570-578.
- Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA, Gironacci MM, Turyn D, Dominici FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E262-71.

- Giani JF, Muñoz MC, Mayer MA, Veiras LC, Arranz C, Taira CA, Turyn D, Toblli JE, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H1003-13.
- Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M, Coleman CI. The Impact of ACE Inhibitors or Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers on the Development of New-Onset Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2261-2266.
- Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, Mu W, Heinig M, Cirillo P, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Nakagawa T. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1712-1720.
- Gonçalves FM, Jacob-Ferreira AL, Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Marcaccini AM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2009;403:173-7.
- Gorodeski GI, Yang T, Levy MN, Goldfarb J, Utian WH. Effects of estrogen in vivo on coronary vascular resistance in perfused rabbit hearts. *Am J Physiol* 1995;269:R1333-R1338.
- Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med* 2004;2:19.
- Grant AM, Christie MR, Ashcroft SJ. Insulin release from human pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 1980;19:114-7.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-45.
- Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987;262:14555-14562.
- Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:281-306.

- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- Grimm T, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z, Hogger P. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm* 2006;3:1.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8.
- Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:399-404.
- Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res* 2001;11:165-180.
- Guo DF, Uno S, Ishihata A, Nakamura N, Inagami T. Identification of a cis-acting glucocorticoid responsive element in the rat angiotensin II type 1A promoter. *Circ Res* 1995;77:249-57.
- Guo R, Yang L, Wang H, Liu B, Wang L. Angiotensin II induces matrix metalloproteinase-9 expression via a nuclear factor-kappa-B-dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Regul Pept* 2008;147:37-44.
- Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest* 2006;116:2218-25.
- Gursel M, Gursel I, Mostowski HS, Klinman DM. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol* 2006;177:1575-1580.

- Guzeloglu-Kayisli O, Halis G, Taskiran S, Kayisli UA, Arici A. DNA-binding ability of NF- κ B is affected differently by ER α and ER β and its activation results in inhibition of estrogen responsiveness. *Reprod Sci* 2008;15:493-505.
- Ha SK, Park HC, Park HS, Kang BS, Lee TH, Hwang HJ, Kim SJ, Kim DH, Kang SW, Choi KH, Lee HY, Han DS. ACE gene polymorphism and progression of diabetic nephropathy in Korean type 2 diabetic patients: effect of ACE gene DD on the progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2003;41:943-9.
- Halade GV, Jina YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: A proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* 2013;139:32-40.
- Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:580-591.
- Hallfrisch J, Lazar F, Jorgensen C, Reiser S. Insulin and glucose responses in rats fed sucrose or starch. *Am J Clin Nutr* 1979;32:787-793.
- Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose. *Am J Clin Nutr* 1983;37:740-8.
- Hamawaki M1, Coffman TM, Lashus A, Koide M, Zile MR, Oliverio MI, DeFreyte G, Cooper G 4th, Carabello BA. Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;274:H868-73.
- Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007;28:726-741.
- Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999;84:695-703.
- Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition and applications of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993;58:724S-32S.
- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2005;63:133-157.

- Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11259-11263.
- He Y, Jiang B, Wang J, Feng K, Chang Q, Zhu S, Fan L, Li X, Hu FB. BMI versus the metabolic syndrome in relation to cardiovascular risk in elderly Chinese individuals. *Diabetes Care* 2007;30:2128-34.
- Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, Connolly SJ. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1832-1839.
- Heimann AS, Favarato MH, Gozzo FC, Rioli V, Carreño FR, Eberlin MN, Ferro ES, Krege JH, Krieger JE. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. *Physiol Genomics* 2005;20:173-82.
- Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6391-6396.
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12729-12734.
- Hellerstein MK. Synthesis of fat in response to alterations in diet: insights from new stable isotope methodologies. *Lipids* 1996;31(suppl):S117-25.
- Hemi R, Yochananov Y, Barhod E, Kasher-Meron M, Karasik A, Tirosh A, Kanety H. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent transactivation of ErbB receptor family: a novel common mechanism for stress-induced IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. *Diabetes* 2011;60:1134-1145.
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 2001;38 :884-890.

- Henriksen EJ, Jacob S. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol* 2003;196:171-179.
- Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 2007;293:974-80.
- Herman RH, Zakim D, Stifel FB. Effect of diet on lipid metabolism in experimental animals and man. *Fed Proc* 1970;29:1302-7.
- Hevener A, Reichart D, Janez A, Olefsky J. Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:1907-1912.
- Hewitt KN, Boon WC, Murata Y, Jones ME, Simpson ER. The aromatase knockout mouse presents with a sexually dimorphic disruption to cholesterol homeostasis. *Endocrinology* 2003;144:3895-3903.
- Higashiura K, Ura N, Takada T, Li Y, Torii T, Togashi N, Takada M, Takizawa H, Shimamoto K. The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2000;13:290-297.
- Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991;69:475-482.
- Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol* 2007; 22:311-5.
- Hoeg JM, Willis LR, Weinberger MH. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1977;233:H369-H373.
- Hofnagel O, Luechtenborg B, Plenz G, Robenek H. Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:710-1.
- Hong J, Stubbins RE, Smith RR, Harvey AE, Nunez NP. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr J* 2009;8:11.

- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-21.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-7.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-948.
- Hsieh PS, Tai YH, Loh CH, Shih KC, Cheng WT, Chu CH. Functional interaction of AT1 and AT2 receptors in fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Metabolism* 2005;54:157-64
- Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, Krege JH, Meneton P, Marre M, Smithies O, Alhenc-Gelas F. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13330-4.
- Huisamen B, Pêrel SJ, Friedrich SO, Salie R, Strijdom H, Lochner A. ANG II type I receptor antagonism improved nitric oxide production and enhanced eNOS and PKB/Akt expression in hearts from a rat model of insulin resistance. *Mol Cell Biochem* 2011;349:21-31.
- Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006;20:953-970.
- Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* 1998;95:759-770.
- Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987;10:512-516
- Iams SG, McMurtry JP, Wexler BC. Aldosterone, deoxycorticosterone, and prolactin changes during lifespan of chronically and spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 1979;104:1357-1363.
- Ilkun O, Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des* 2013;19:4806-17.

- Imanishi^a T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Kobayashi K, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Addition of eplerenone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor effectively improves nitric oxide bioavailability. *Hypertension* 2008;51:734-741.
- Imanishi^b T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension* 2008;52:563-572.
- Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. Insulin resistance and risk of congestive heart failure. *JAMA* 2005;294:334-41.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-689.
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3521-5.
- Iwai M, Chen R, Li Z, Shiuchi T, Suzuki J, Ide A, Tsuda M, Okumura M, Min L-J, Mogi M, Horiushi M. Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2005;112:1636-1643.
- Iwai M, Liu HW, Chen R, Ide A, Okamoto S, Hata R, Sakanaka M, Shiuchi T, Horiushi M. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004;110:843-848.
- Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2356-63.
- Iyer SN, Katovich MJ, Raizada MK. Changes in angiotensin AT1 receptor density during hypertension in fructose-fed rats. *Adv Exp Med Biol* 1996;396:49-58.

- Iyer SN, Katovich MJ. Effect of chronic losartan potassium treatment on fructose-induced hypertension. *Life Sci* 1994;55:PL139-PL144.
- Izawa Y, Yoshizumi M, Fujita Y, Ali N, Kanematsu Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Obata T, Ebina Y, Tomita S, Tamaki T. ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 2005;308:291-299.
- Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 1998;95:749-758.
- Jayadev S, Smith RD, Jagadeesh G, Baukal AJ, Hunyady L, Catt KJ. N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells *Endocrinology* 1999;140:2010-7.
- Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, Egan GF, McKinley MJ, Rodger PD, Sinclair AJ, Wark JD, Weisinger HS, Jois M, Weisinger RS. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6531-6.
- Jeffers BW, Estacio RO, Raynolds MV, Schrier RW. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus and its relationship with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;52:473-7.
- Jiang B, Li D, Deng Y, Teng F, Chen J, Xue S, Kong X, Luo C, Shen X, Jiang H, Xu F, Yang W, Yin J, Wang Y, Chen H, Wu W, Liu X, Guo DA. Salvianolic acid A, a novel matrix metalloproteinase-9 inhibitor, prevents cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 2013;8:e59621.
- Johnson H, Kourtis S, Waters J, Drummer OH. Radioimmunoassay for immunoreactive [des-Leu10]-angiotensin I. *Peptides* 1989;10:489-492.
- Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glasscock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes? *Endocr Rev* 2009;30:96-116.

- Johren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res* 2004;62:460-7.
- Jones ES, Black MJ, Widdop RE. Influence of Angiotensin II Subtype 2 Receptor (AT2R) Antagonist, PD123319, on Cardiovascular Remodelling of Aged Spontaneously Hypertensive Rats during Chronic Angiotensin II Subtype 1 Receptor (AT1R) Blockade. *Int J Hypertens* 2012;2012:543062.
- Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2008;120:292-316.
- Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. Aromatase-deficient (arko) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12735-12740.
- Jong GP, Ma T, Chou P, Chang MH, Wu CH, Lis PC, Lee SD, Liu JY, Kuo WW, Huang CY. Serum MMP-9 activity as a diagnosing marker for the developing heart failure of post MI patients. *Chinese J Physiol* 2006;49:104-109.
- Jonsson S, Lundberg A, Kalvegren H, Bergstrom I, Szymanowski A, Jonasson L. Increased levels of leukocyte-derived MMP-9 in patients with stable angina pectoris. *PLoS One* 2011;6:e19340.
- Jovanović I, Živković M, Đurić T, Popović M, Alavantić D, Stanković A. CXCL16 in vascular pathology research: from macro effects to microRNAs. *J Atheroscler Thromb* 2015;22:1012-24.
- Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neil JD. Angiotensin II type-a receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:1090-6.
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993;268:24543-6.
- Kambayashi Y, Takahashi K, Bardhan S, Inagami T. Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. *Kidney Int* 1994;46:1502-1504.

- Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Okamura A, Nagai M, Moriguchi K, Ohishi M, Satoh N, Tuck ML, Ogihara T. The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2002;15:66-71.
- Kanarek RB, Orthen-Gambill N. Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr* 1982;112:1546-54.
- Kang N, Walther T, Tian XL, Bohlender J, Fukamizu A, Ganten D, Bader M. Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *J Mol Med* 2002;80:359-66.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF[κ]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663.
- Katada J, Majima M. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol* 2002;136:484-91.
- Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res* 1995;29:57-64.
- Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:305-13.
- Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 2009;14:1484-95.
- Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* 2005;46:249-254.
- Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, Hooper WC, Menon RG, Lerakis S, Helmy T. Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2004;27:1712-5.
- Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005;67:1739-42.
- Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13:738-747.

- Kim JE, Lee MH, Nam DH, Song HK, Kang YS, Lee JE, Kim HW, Cha JJ, Hyun YY, Han SY, Han KH, Han JY, Cha DR. Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice. *PLoS One* 2013;8:e62068.
- Kim^a YH, Kwon HJ, Kim DS. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)-dependent processing of β ig-h3 protein regulates cell migration, invasion and adhesion. *J Biol Chem* 2012;287:38957-38969.
- Kim^b JM, Heo HS, Ha YM, Ye BH, Lee EK, Choi YJ, Yu BP, Chung HY. Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- κ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age* 2012;34:11-25.
- Kobayashi R, Nagano M, Nakamura F, Higaki J, Fujioka Y, Ikegami H, Mikami H, Kawaguchi N, Onishi S, Ogihara T. Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Hypertension* 1993;21:1051-5.
- Koch-Weser J. Myocardial actions of angiotensin. *Circ Res* 1964;14:337-44.
- Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146:26-39.
- Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc Res* 2002;55:714-726.
- Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1842-50.
- Korićanac G, Djordjević A, Žakula Z, Vojnović-Milutinović D, Tepavčević S, Veličković N, Milosavljević T, Stojiljković M, Romić S, Matic G. Gender modulates development of the metabolic syndrome phenotype in fructose-fed rats. *Arch Biol Sci* 2013;65:455-464.
- Korićanac G, Tepavčević S, Romić S, Živković M, Stojiljković M, Milosavljević T, Stanković A, Petković M, Kamčeva T, Žakula Z. Estradiol enhances effects of fructose rich diet on cardiac fatty acid transporter CD36 and triglycerides accumulation. *Eur J Pharmacol* 2012;694:127-34.

- Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* 2005;146:3481-9.
- Kowluru RA, Mohammad G, dos Santos JM, Zhong Q. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage. *Diabetes* 2011;60:3023-3033.
- Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1623-1629.
- Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995;375:146-8.
- Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS, Liu Y, Ganten D, Paul M. Induction of cardiac angiotensin I-converting enzyme with dietary NaCl-loading in genetically hypertensive and normotensive rats. *J Mol Med* 1995;73:243-248.
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *Clin Invest* 1983;72:1150-1162.
- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000;101:676-681.
- Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel J, Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1653-63.
- Kurki E, Shi J, Martonen E, Finckenberg P, Mervaala E. Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice *Nutr Metab* 2012;9:64.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-2716.
- Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) D. W. mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005;280:30113-30119.
- Laragh JH. Renin, angiotensin, aldosterone and hormonal regulation of arterial pressure and salt balance. Introductory remarks. *Fed Proc* 1967;26:39-41.
- Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 1995;48:601-609.
- Le KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:469-475.
- Lehrke M, Millington SC, Lefterova M, Cumarantunge RG, Szapary P, Wilensky R, Rader DJ, Lazar MA, Reilly MP, MB. CXCL16 Is a Marker of Inflammation, Atherosclerosis, and Acute Coronary Syndromes in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:442-449.
- Lemarie CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11:19-31.
- Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens* 2005;18:134S-141S.
- Lewis JL, Serikawa T, Warnock DG. Chromosomal localization of angiotensin II type 1 receptor isoforms in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:667-82.

- Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 2000;46:298-306.
- Lin J, Steenbergen C, Murphy E, Sun J. Estrogen receptor-beta activation results in S-nitrosylation of proteins involved in cardioprotection. *Circulation* 2009;120:245-254.
- Lingelbach LB, McDonald RB. Description of the long-term lipogenic effects of dietary carbohydrates in male Fischer 344 rats. *J Nutr* 2000;130:3077-3084.
- Lu J, Ji J, Meng H, Wang D, Jiang B, Liu L, Randell E, Adeli K, Meng QH. The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats. *Cardiovasc Diabet* 2013;12:58.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 1998;188:661-670.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111-7.
- Lv Y, Hou X, Ti Y, Bu P. Associations of CXCL16/CXCR6 with carotid atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2013;32:849-854.
- Machi JF, Bernardes N, Mostarda C, Moraes-Silva IC, Irigoyen MC, De Angelis K, Wichy RB. Walking promotes metabolic and baroreflex sensitivity improvement in fructose-fed male rats. *Eur J Appl Physiol* 2012;113:41-49.
- Maenpaa PH, Raivio KO, Kekomaki MP. Liver adenine nucleotides: fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis. *Science* 1968;161:1253-1254.
- Malakauskas SM, Quan H, Fields TA, McCall SJ, Yu MJ, Kourany WM, Frey CW, Le TH. Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F533-F544.
- Marcus Y, Shefer G, Sasson K, Kohen F, Limor R, Pappo O, Nevo N, Biton I, Bach M, Berkutzki T, Fridkin M, Benayahu D, Shechter Y, Stern N. Angiotensin 1-7 as

- means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. *Diabetes* 2013;62:1121-30.
- Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2009-2013.
- Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* 2007;115:888-95.
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1866-1874.
- Masubuchi Y, Kumai T, Uematsu A, Komoriyama K, Hirai M. Gonadectomy-induced reduction in blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982;101:154-160.
- Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000;1:298-304.
- Matsumoto S, Shimabukuro M1, Fukuda D, Soeki T, Yamakawa K, Masuzaki H, Sata M. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio Ser1177/Thr497 of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2014;13:30.
- Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:472-81.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428-35.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C82-C97.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-1811.

- Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RA, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL. Angiotensin 1-7 blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res* 2008;103:1319-26.
- Metzler B, Schocke MF, Steinboek P, Wolf C, Judmaier W, Lechleitner M, Lukas P, Pachinger O. Decreased high energy phosphate ratios in the myocardium of men with diabetes mellitus type 1. *J Cardiovasc Magn Reson* 2002;4:493-502.
- Miatello R, VazquezM, Renna N, Cruzado M, Zumino AP, Risler N. Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2005;18:864-70.
- Mieczkowska J, Mosiewicz J, Barud W, Kwaśniewski W. Changes in the activity of connective tissue matrix enzymes in the metabolic syndrome. *Arch Med Sci* 2011;4:634-641.
- Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrom. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:204-209.
- Minami M, Kume N, Shimaoka T, Kataoka H, Hayashida K, Akiyama Y, Nagata I, Ando K, Nobuyoshi M, Hanyuu M, Komeda M, Yonehara S, Kita T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1796-800.
- Misso ML, Jang C, Adams J, Tran J, Murata Y, Bell R, Boon WC, Simpson ER, Davis SR. Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition. *Maturitas* 2005;51:299-306.
- Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involment of the RAS dependent pathway. *J Cell Physiol* 2004;198:417-427.
- Mori Y, Itoh Y, Tajima N. Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity. *Am J Hypertens* 2007;20:431-436.

- Mostarda C, Moraes-Silva IC, Salemi VM, Machi JF, Rodrigues B, De Angelis K, Farah Vde M, Irigoyen MC. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics* 2012;67:815-820.
- Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, Schrick JJ, Avner ED, Sweeney WE, Godfrey VL, Cacheiro NL, Wilkinson JE, Woychik RP. Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 1994;264:1329-1333.
- Mukherjee R, Mingoia JT, Bruce JA, Austin JS, Stroud RE, Escobar GP, McClister DM, Allen CM, Alfonso-Jaume MA, Fini ME, Lovett DH, Spinale FG. Selective spatiotemporal induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 transcription after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2216-28.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993;268:24539-42.
- Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000;35:193-201.
- Munoz MC, Argentino DP, Dominici FP, Turyn D, Toblli JE. Irbesartan restores the in vivo insulin signaling pathway leading to Akt activation in obese Zucker rats. *J Hypertens* 2006;24:1607-17.
- Muñoz MC, Giani JF, Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. *Regul Pept* 2010;161:1-7.
- Murphy E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2011;109:687-696.
- Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB. The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:63-68.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in

- fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F625-F631.
- Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1:80-6.
- Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 2003;111:769-778.
- Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Vizcaino F, Cachofeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, Lahera V. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension* 1995;26:1074-1078.
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85:1-31.
- Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhovel F, Bohm M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation* 1999;100:2131-2134.
- Nickenig^a G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Scholkens BA, Bohm M. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;272: H2701-H2707.
- Nickenig^b G, Sachinidis A, Michaelsen F, Bohm M, Seewald S, Vetter H. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;95:473-478.
- Niklason A, Hedner T, Niskanen L, Lanke J. Development of diabetes is retarded by ACE inhibition in hypertensive patients--a subanalysis of the Captopril Prevention Project (CAPPP). *J Hypertens* 2004;22:645-52;
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.

- Niu MJ, Yang JK, Lin SS, Ji XJ, Guo LM. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 leads to impaired glucose homeostasis in mice. *Endocrine* 2008;34:56-61.
- Njelekela MA, Mpebeni R, Muhihi A, Mligiliche NL, Spiegelman D, Hertzmark E, Liu E, Finkelstein JL, Fawzi WW, Willett WC, Mtabaji J. Gender-related differences in the prevalence of cardiovascular disease risk factors and their correlates in urban Tanzania. *BMC Cardiovasc Disord* 2009;9:30.
- Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Doevendans PA, Meyer R, Vetter H, Grohé C. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res* 1999;43:666-674.
- Nyby M, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck M. Vascular Angiotensin Type 1 Receptor Expression Is Associated with Vascular Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation in Fructose-Fed Rats. *Hypertens Res* 2007;30:451-457.
- Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, Castro P, Lavandero S. Enalapril attenuates downregulation of angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension* 2006;48:572-578.
- Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, Apablaza F, Gonzalez L, Hernandez C, Varas M, Lopez R, Godoy I, Verdejo H, Chiong M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens* 2010;28:1054-1064.
- Ocaranza MP, Rivera P, Novoa U, Pinto M, González L, Chiong M, Lavandero S, Jalil JE. Rho kinase inhibition activates the homologous angiotensin-converting enzyme-angiotensin-(1-9) axis in experimental hypertension. *J Hypertens* 2011;29:706-715.
- Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996;61:166-171.
- Okada M, Kikuzuki R, Harada T, Hori Y, Yamawaki H, Hara Y. Captopril attenuates matrix metalloproteinase-2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Sci* 2008;108:487-94.
- Okada M, Yamawaki H, Hara Y. Angiotensin II enhances interleukin-1 beta-induced MMP-9 secretion in adult rat cardiac fibroblasts. *J Vet Med Sci* 2010;72:735-9.

- Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 2001;276:29596-29602.
- Okazaki M, Zhang H, Yoshida Y, Ichino K, Nakayama S, Oguchi K. Correlation between plasma fibrinogen and serum lipids in rats with hyperlipidemia induced by cholesterol free-high fructose or high cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1994;40:479-89.
- Okuniewski R, Davis EA, Jarrott B, Widdop RE. A comparison of the development of renal hypertension in male and female rats. *Clin Sci (Colch)* 1998;95:445-451.
- Olatunji LA, Oyeyipo IP, Usman TO. Effect of a high-fructose diet on glucose tolerance, plasma lipid and hemorheological parameters during oral contraceptive administration in female rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;54:23-32.
- Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Nat Acad Sci* 1998;95:15496-15501.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;69:851-859.
- Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012;18:363-74.
- Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2006;168:1808-20.
- Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr., Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35-51.

- Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, Srinivas R, Bhadra MP, Benerjee SK. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *Plos One* 2014;9:e94228.
- Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 2006;136:3022-6.
- Pan CH, Wen CH, Lin CS. Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. *Exp Physiol* 2008;93:599-612.
- Paoletti R, Bolego C, Poli A, Cignarella A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:145-52.
- Patel J, Iyer A, Brown L. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys* 2009;48:66-72.
- Paul M, Mehr AP, Kreutz AR. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.
- Pechere-Bertschi A, Burnier M. Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2004;17:994-1001.
- Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, Vannan M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology* 2008;149:3361-3369.
- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49-62.
- Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006;119:S10-S16.
- Peterson LR, Herrero P, McGill J, Schechtman KB, Kisrieva-Ware Z, Lesniak D, Gropler RJ. Fatty acids and insulin modulate myocardial substrate metabolism in humans with type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:32-40.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 1990;81:1161-72.

- Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DE, Parisi AF, Braunwald E. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;319:80-86.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002;23:90-119.
- Pinto J, Vignione P, Saavedra J. Autoradiographic localization and quantification of rat heart angiotensin converting enzyme. *Am J Hypertens* 1991;4:321-326.
- Pinto S, Viridis A, Ghiadoni L, Bernini G, Lombardo M, Petraglia F, Genazzani AR, Taddei S, Salvetti A. Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women. *Hypertension* 1997;29:268-273.
- Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, Engler S, Kossamehl P, Hocher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker HJ, Paul M. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat. *Hypertension* 2000;36:747-754.
- Pirici D, Pirici I, Mogoanta L, Margaritescu O, Tudorica V, Margaritescu C, Ion DA, Simionescu C, Coconu M. Matrix metalloproteinase-9 expression in the nuclear compartment of neurons and glial cells in aging and stroke. *Neuropathology* 2012;32:492-504.
- Porter KE, Turner NA. Cardiac fibrosis: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009;123:255-78.
- Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor α/β dimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19012-19017.
- Purkayastha S, Zhang G, Cai D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2011;17:883-7.
- Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H1219-30.

- Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000;343:1179-1182.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923.
- Rattan S, Puri RN, Fan YP. Involvement of rho and rho-associated kinase in sphincteric smooth muscle contraction by angiotensin II. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:972-981.
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 2009;156:885-898.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.
- Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol* 2006;95:136-47.
- Reiser S, Powell AS, Scholfield DJ, Panda P, Fields M, Canary JJ. Day-long glucose, insulin, and fructose responses of hyperinsulinemic and nonhyperinsulinemic men adapted to diets containing either fructose or high-amylose cornstarch. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1008-14.
- Reiser S. Effects of dietary sugars in metabolic risk factors associated with heart disease. *Nutr Health* 1985;3:203-16.
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 2009;150:2109-2117.
- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 2004;383:45-51.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-397.

- Riera-Fortuny C, Real JT, Chaves FJ, Morales-Suárez-Varela M, Martínez-Triguero ML, Morillas-Ariño C, Hernández-Mijares A. The relation between obesity, abdominal fat deposit and the angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and its association with coronary heart disease. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:78-84.
- Roberts CK, Won D, Pruthi S, Kurtovic S, Sindhu RK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. *J Appl Physiol* 2006;100:1657-65.
- Roberts WL. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: laboratory tests available to assess inflammation—performance and standardization: a background paper. *Circulation* 2004;110:e572-e576.
- Roesch DM, Tian Y, Zheng W, Shi M, Verbalis JG, Sandberg K. Estradiol attenuates angiotensin-induced aldosterone secretion in ovariectomized rats. *Endocrinology* 2000;141:4629-4636.
- Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007;45:778-788.
- Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Obesity, leptin, and the brain. *N Engl J Med* 1996;334:324-5.
- Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci* 2001;68:799-814.
- Romić S, Tepavčević S, Žakula Z, Milosavljević T, Stojiljković M, Popović M, Stanković A, Korićanac G. Does oestradiol attenuate the damaging effects of a fructose-rich diet on cardiac Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling? *Br J Nutr* 2013;109:1940-8.
- Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-

- Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010;55:924-31.
- Rothermund L, Pinto YM, Hocher B, Vetter R, Leggewie S, Kobetamehl P, Orzechowski HD, Kreutz R, Paul M. Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake. *Circulation* 2000;102:1582-1588.
- Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001;19:1465-1472.
- Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1767-1778.
- Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. *Nutr Rev* 2007;65:S13-S23.
- Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Barrett T, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Morel C, Mora A, Reilly J, Kim JK, Davis RJ. Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev* 2010;24:256-64.
- Saito K, Gutkind JS, Saavedra JM. Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1987;253:H1618-22.
- Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L, Stefani E, Eghbali M. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. *Circ Res* 2009;105:343-352.
- Saito Y, Berk BC. Angiotensin II-mediated signal transduction pathways. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:167-171.
- Sales S, Ureshino RP, Pereira RT, Luna MS, Pires de Oliveira M, Yamanouye N, Godinho RO, Smaili SS, Porto CS, Abdalla FM. Effects of 17beta-estradiol replacement on the apoptotic effects caused by ovariectomy in the rat hippocampus. *Life Sci* 2010;86:832-838.

- Sampson AK, Moritz KM, Jones ES, Flower RL, Widdop RE, Denton KM. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats. *Hypertension* 2008;52:666-71.
- Sanches IC, de Oliveira Brito J, Candido GO, da Silva Dias D, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Cardiometabolic benefits of exercise training in an experimental model of metabolic syndrome and menopause. *Menopause* 2012;19:562-568.
- Sanchez-Lozada L, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F423-9.
- Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension* 2006;47:996-1002.
- Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL, Bader M. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 2004;17:292-99.
- Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Expl Physiol* 2008;93:519-527.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8258-63.
- Santos SH, Braga JF, Mario EG, Pôrto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, Botion LM, Alenina N, Bader M, Santos RA Improved lipid and glucose metabolism in

- transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:953-61.
- Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, Isles C, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J. Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2003;108:414-419.
- Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol* 2007;293:C584-C596.
- Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of Rho/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23:1037-1045.
- Savoia C, Volpe M. Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12:381-4.
- Scheen AJ^a. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab* 2004;30:498-505.
- Scheen AJ^b. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A metaanalysis of randomised clinical trials. *Diabetes Metab* 2004;30:487-96.
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992-3002.
- Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999;353:1649-1652.
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BMW. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007;369:1208.

- Schmittgen TD, Livak KJ. Analysing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-1108.
- Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J* 1991;10:3805-3817.
- Schmitz U, Ishida T, Ishida M, Surapisitchat J, Hasham MI, Pelech S, Berk BC. Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ Res* 1998;82:1272-1278.
- Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. *J Immunol* 1998;161:3340-3346.
- Schunkert H, Dzau V, Tang S, Hirsch A, Apstein C, Lorell B. Increased rat angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1990;86:1913-1920.
- Schunkert H, Jackson B, Tang S, Schoen F, Smits J, Apstein C, Lorell B. Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation* 1993;87:1328-1339.
- Schwarz JM, Neese RA, Basinger A, Hellerstein MK. Effect of oral fructose on lipolysis, fat oxidation, fractional and absolute de novo lipogenesis (DNL) using mass isotopomer distribution analysis (MIDA). *FASEB J* (abstr) 1993;7:A867.
- Scognamiglio R, Negut C, de Kreutzenberg S, Tiengo A, Avogaro A. Postprandial myocardial perfusion in healthy subjects and in type 2 diabetic patients. *Circulation* 2005;112:179-184.
- Sealey JE, Itskovitz-Eldor J, Rubattu S, James GD, August P, Thaler I, Levrone J, Laragh JH. Estradiol- and progesterone-related increases in the renin-aldosterone system: studies during ovarian stimulation and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:258-264.
- Seerat HB, Saroj J. Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformation* 2012;8:613-616.

- Senador D, Key M, Brosnihan KB, Irigoyen MC, Elased KM, Morris M. Cardiovascular interactions between losartan and fructose in mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2010;15:68-77.
- Shah BH, Catt KJ. A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II -induced cardiac hypertrophy. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:239-244.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 2000;103:843-852.
- Shanmugam S, Monnot C, Corvol P, Gasc JM. Distribution of type 1 angiotensin receptor subtypes messenger RNAs in the rat fetus. *Hypertension* 1994;23:137-141.
- Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002;40:609-11.
- Sheikine Y, Bang CS, Nilsson L, Samnegård A, Hamsten A, Jonasson L, Eriksson P, Sirsjö A. Decreased plasma CXCL16/SR-PSOX concentration is associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2006;188:462-6.
- Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:267-274.
- Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Bolli R. Loss of ischaemic preconditioning in ovariectomized rat hearts: possible involvement of impaired protein kinase C phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2008;79:387-394.
- Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 2004;43:255-62.
- Shiuchi T, Iwai M, Li H-S, Wu L, Min L-J, Li J-M, Okumura M, Cui T-X, Horiuchi M. Angiotensin II Type-1 Receptor Blocker Valsartan Enhances Insulin Sensitivity in Skeletal Muscles of Diabetic Mice. *Hypertension* 2004;43:1003-1010.
- Shoelson SE, Goldfine AB. Getting away from glucose: fanning the flames of obesity-induced inflammation. *Nat Med* 2009;15:373-4.

- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-1801.
- Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao JK, De Caterina R. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 2000;87:19-25.
- Sites CK, Toth MJ, Cushman M, L'Hommedieu GD, Tchernof A, Tracy RP, Poehlman ET. Menopause-related differences in inflammation markers and their relationship to body fat distribution and insulin-stimulated glucose disposal. *Fertil Steril* 2002;77:128-135.
- Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. Preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med* 1956;103:295-299.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
- Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol* 2000;131:667-672.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001;37:1053-1059.
- Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 2004;84:489-539.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-1342.
- Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail* 2004;10:328-33.
- Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular

- dysfunction in diabetes. *Int J Mol Med* 2002;9:85-89.
- Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor: a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26:1401-409.
- Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol Cell Biol* 1995;15:4971-4979.
- Stice JP, Mbai FN, Chen L, Knowlton AA. Rapid activation of nuclear factor kb by 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators: pathways mediating cellular protection. *Shock* 2012;38:128-136.
- Storlien LH, Oakes ND, Pan DA, Kusunoki M, Jenkins AB. Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes* 1993;42:457-62.
- Strazzullo P1, Iacone R, Iacoviello L, Russo O, Barba G, Russo P, D'Orazio A, Barbato A, Cappuccio FP, Farinaro E, Siani A; Olivetti Prospective Heart Study. Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men. *Ann Intern Med* 2003;138:17-23.
- Stubbins RE, Holcomb VB, Hong J, Nunez NP. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur J Nutr* 2012;51:861-870.
- Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med* 2006;38:389-402.
- Stute J, Pourmotabbed T, Tschesche H. Kinetic analysis of the binding of hemopexin-like domain of gelatinase B cloned and expressed in *Pichia pastoris* to tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Protein Chem* 2003;22:509-514.
- Sugaya T, Nishimura S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukuta K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensin II type 1a receptor deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem* 1995;270:18719-22.

- Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2006;98:403-411.
- Sun Y, Ramires FJ, Zhou G, Ganjam VK, Weber KT. Fibrous tissue and angiotensin II. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2001-2012.
- Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Sutherland P, Wilson PW, Vasan RS. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109:2850-6.
- Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, Hamada M, Hiwada K, Horiuchi M. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 2002;106:847-53.
- Suzuki M, Nomura C, Odaka H, Ikeda H. Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;74:297-302.
- Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T. Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and SA gene. *J Hypertension* 1999;11:919-25.
- Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subset and CD4⁺T cells. *J Leukocit Biol* 2005;77:777-786.
- Tabbi-Anneni I, Buchanan J, Cooksey RC, Abel E. Captopril normalizes insulin signaling and insulin-regulated substrate metabolism in obese (ob/ob) mouse hearts. *Endocrinology* 2008;149:4043-4050.
- Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* 2000;275:8416-25.

- Tain YL, Baylis C. Dissecting the causes of oxidative stress in an in vivo model of hypertension. *Hypertension* 2006;48:828-829.
- Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Nagai T, Kohno T, Maekawa Y, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S. Increased C-reactive protein expression exacerbates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H1795-804.
- Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 1997;30:1621-1627.
- Takeuchi K, Alexander RW, Nakamura Y, Tsujino T, Murphy TJ. Molecular structure and transcriptional function of the rat vascular AT1a angiotensin receptor gene. *Circ Res* 1993;73:612-621.
- Tan HW, Xing SS, Bi XP, Li L, Gong HP, Zhong M, Zhang Y, Zhang W. Felodipine attenuates vascular inflammation in a fructose-induced rat model of metabolic syndrome via the inhibition of NF- κ B activation. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:1051-1059.
- Tassone EJ, Sciacqua A, Andreozzi F, Presta I, Perticone M, Carnevale D, Casaburo M, Hribal ML, Sesti G, Perticone F. Angiotensin (1-7) counteracts the negative effect of angiotensin II on insulin signalling in HUVECs. *Cardiovasc Res* 2013;99:129-136.
- Tayebjee MH, Nadar SK, MacFadyen RJ, Lip GY. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension Relationship to tissue Doppler indicates of diastolic relaxation. *Am J Hypertens* 2004;17:770-4.
- Tchernof A, Poehlman ET, Despres JP. Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab* 2000;26:12-20.
- Teff K, Elliott S, Tschoep M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ . Consuming high fructose meals reduces 24 hour plasma insulin and leptin concentrations, does not suppress circulating ghrelin, and

- increases postprandial and fasting triglycerides in women. *Diabetes* 2002;1(suppl):1672.
- Thomas WG, Qian H. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:130-136.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen E W. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* 1989;49:1155-1163.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme—cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000;275:33238-33243.
- Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 1999;99:392-399.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44:248-252.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 2009;332:145-159.
- Tschöpe C, Westermann D, Dhayat N, Dhayat S, Altmann C, Steendijk P, Schultheiss HP, Walther T. Angiotensin AT2 receptor deficiency after myocardial infarction: its effects on cardiac function and fibrosis depend on the stimulus. *Cell Biochem Biophys* 2005;43:45-52.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38MAPK is a critical component of the oxidant stress (H₂O₂)-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells hypertrophy. *J Biol Chem* 1998;273:15022-15029.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the $\beta\gamma$ subunits

- of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1999;55:142-149.
- van Esch JH, Gembardt F, Sterner-Kock A, Heringer-Walther S, Le TH, Lassner D, Stijnen T, Coffman TM, Schultheiss HP, Danser AH, Walther T. Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts. *Cardiovasc Res* 2010;86:401-9.
- Van Kats JP, Danser AH, van Meegen J, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* 1998;98:73-81.
- Varagic J, Frohlich ED. Local Cardiac Renin-Angiotensin System: Hypertension and Cardiac Failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1435-1442.
- Vasdev S, Ford CA, Longerich L, Gadag V, Wadhawan S. Role of aldehydes in fructose induced hypertension. *Mol Cell Biochem* 1998;181:1-9.
- Vasudevan H, Xiang H, McNeill JH. Differential regulation of insulin resistance and hypertension by sex hormones in fructose-fed male rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1335-42.
- Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 2001;21:1809-18
- Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Antihypertensive effects of metformin in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1334-7.
- Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism* 1996;45:1053-5.
- Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 2003;22:1313-1324.
- Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005;30:43-52.

- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:14838-14843.
- Vincent MA, Clerk LH, Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. Active role for the vasculature in the delivery of insulin to skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32(4):302-7.
- Vleming LJ, van der Pijl JW, Lemkes HH, Westendorp RG, Maassen JA, Daha MR, van Es LA, van Kooten C. The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy to end stage renal failure in IDDM. *Clin Nephrol* 1999;51:133-40.
- Vojnović-Milutinović D, Nikolić M, Dinić J, Đorđević A, Veličković N, Elaković I, Matić G, Nestorov J. Leptin and glucocorticoid signaling pathways in the hypothalamus of female and male fructose-fed rats. *Arch Biol Sci* 2014;66:829-839.
- Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* 2003;21:1429-1443.
- Voulgari C, Moyssakis I, Papazafiropoulou A, Perrea D, Kyriaki D, Katsilambros N, Tentolouris N. The impact of metabolic syndrome on left ventricular myocardial performance. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:121-7.
- Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. *Intl J Mol Med* 2011;28:247-253.
- Wågsäter D1, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjö A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1187-1193.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.

- Wang CH, Li F, Takahashi N. The Renin Angiotensin System and the Metabolic Syndrome. *Open Hypertens J* 2010;3:1-13.
- Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J* 1998;17:6701-6713.
- Warner FJ, Lew RA, Smith AI, Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem* 2005;280:39353-39362.
- Wassmann S, Nickenig G. Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens Suppl* 2006;24:S15-21.
- Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:121-131.
- Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E345-51.
- Weinberger MH, Kramer NJ, Grim CE, Petersen LP. The effect of posture and saline loading on plasma renin activity and aldosterone concentration in pregnant, non-pregnant and estrogen-treated women. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;44:69-77.
- Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav* 2009;98:192-7.
- Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD, Koulen P, Simpkins JW. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004;1008:147-154.
- Wente MN, Gaida MM, Mayer C, Michalski CW, Haag N, Giese T, Felix K, Bergmann F, Giese NA, Friess H. Expression and potential function of the CXC chemokine CXCL16 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2008;33:297-308.

- Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, Ma L, Qazi M, Link D, Karuparthi PR, Stump C, Ferrario C, Sowers JR. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E355-63.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-1160.
- Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 2001;166:5145-54.
- Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension* 2004;44:112-116.
- Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 2004;109:II2-II10.
- Williams CM. Lipid metabolism in women. *Proc Nutr Soc* 2004;63:153-160.
- Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1999;159:1104-1109.
- Windler EE, Kovanen PT, Chao YS, Brown MS, Havel RJ, Goldstein JL. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem* 1980;255:10464-10471.
- Wold LE, Dutta K, Mason MM, Ren J, Cala SE, Schwanke ML, Davidoff AJ. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:297-307.
- Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int* 2002;61:1986-1995.

- Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, Backx PH, Penninger JM, Herzenberg AM, Scholey JW. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol* 2007;171:438-51.
- Wu Z, Maric C, Roesch D, Zheng W, Verbalis AG, Sandberg K. Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor translation. *Endocrinology* 2003;144:3251-61.
- Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wågsäter D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjö A. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:750-5.
- Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen YF, Nozell S. Estrogen modulates NFκB signaling by enhancing IκBα levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor-β. *PLoS One* 2012;7:e36890.
- Xohg S, Bi X, Tan H, Zhang Y, Xing Q, Zhang W. Overexpression of interleukin-18 aggravates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in fructose-fed rats. *Mol med* 2010;16:465-470.
- Xu Yi, Ivan A Arenas, Stephen J Armstrong, Sandra T Davidge. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res* 2003;57:388-394.
- Xue Q, Patterson AJ, Xiao D, Zhang L. Glucocorticoid Modulates Angiotensin II Receptor Expression Patterns and Protects the Heart from Ischemia and Reperfusion Injury. *PLoS One* 2014;9:e106827.
- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* 2013;28:391-403.
- Yamada H, Fabris B, Allen A, Jackson B, Johnston C, Mendelsohn F. Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ Res* 1991;68:141-149.
- Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, Ihara A, Iizuka K, Yang Q, Satoh T, Li M, Uenaka R, Okita K, Iwahashi H, Zhu Q, Cao Y, Imagawa A, Tochino Y, Hanafusa T,

- Miyagawa J, Matsuzawa Y. Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* 2002;51:114-123.
- Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, Tatara Y, Shiota A, Sugano S, Takeda S, Rakugi H, Ogihara T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension* 2006;47:718-26.
- Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Takahashi S, Yamaguchi J, Nishina T, Kitaichi M, Komeda M, Manabe T, Yonehara S, Kita T. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8+ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:282-287.
- Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M, Demers C, McKelvie RS, Liu PP. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006;12:514-9.
- Yan X, Schuldt AJ, Price RL, Amende I, Liu FF, Okoshi K, Ho KK, Pope AJ, Borg TK, Lorell BH, Morgan JP. Pressure overload-induced hypertrophy in transgenic mice selectively overexpressing AT2 receptors in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1274-81.
- Yang M, Qiu CC, Xu Q, Xiang HD. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism with type 2 diabetes mellitus. *Biomed Environ Sci* 2006;19:323-7.
- Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010;112:134-149.

- Yayama K, Hiyoshi H, Imazu D, Okamoto H. Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. *Hypertension* 2006;48:958-64.
- Yeghiazaryan M, Żybura-Broda K, Cabaj A, Włodarczyk J, Sławińska U, Rylski M, Wilczyński GM. Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography. *Histochem Cell Biol* 2012;138:75-87.
- Yin G, Yan C, Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:780-783.
- Yoder BK, Tousson A, Millican L, Wu JH, Bugg CE Jr, Schafer JA, Balkovetz DF. Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F541-F552.
- You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2005;111:1006-11.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Eng J Med* 2000;342:145-153.
- Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulangé A. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2005;54:991-9.
- Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000;101:1539-1545.
- Zhang C, Hein TW, Wang W. Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ Res* 2003;92:322-9.

- Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, Wang H, Lin S, Kanwar YS, Makino H. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem* 2001;276:17132-17139.
- Zhang^a GX, Lu XM, Kimura S, Nishiyama A. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. *Cardiovasc Res* 2007;76:204-12.
- Zhang^b Y, Wada J, Yasuhara A, Iseda I, Eguchi J, Fukui K, Yang Q, Yamagata K, Hiesberger T, Igarashi P, Zhang H, Wang H, Akagi S, Kanwar YS, Makino H. The Role for HNF-1beta Targeted Collectrin in Maintenance of Primary Cilia and Cell Polarity in Collecting Duct Cells. *PLoS One* 2007;2:e414.
- Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genom* 2007;8:113-128.
- Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998;1:661-671.
- Zhou J, Allen AM, Yamada H, Sun Y, Mendelsohn FAO. Localization and properties of angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors in the heart. In *The Cardiac Renin-Angiotensin System*, ed. K Lindpaintner, D Ganten, Armonk, NY: Futura 1994;63-88.
- Zhu M, Gelband CH, Moore JM, Posner P, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 1998;18:679-86.
- Zhuge X, Murayama T, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, Kita T. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:1295-1300.
- Zimowska M, Swierczynska M, Ciemerych MA. Nuclear MMP-9 role in the regulation of rat skeletal myoblasts proliferation. *Biol Cell* 2013;105:334-344.
- Zucker I, Berry AK. Males still dominate animal studies. *Nature* 2010;465:690.

Živković M, Đurić T, Stojković Lj, Jovanović I, Končar I, Davidović L, Veljković N, Alavantić D, Stanković A. CXCL16 haplotypes in patients with human carotid atherosclerosis: a preliminary results. *J Atheroscler Thromb* 2015;22:10-20.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja Bundalo je rođena 14.03.1982. godine u Zagrebu, republika Hrvatska. Osnovno i srednje obrazovanje je stekla u Beogradu. Diplomirala je 16.10.2008. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) sa prosečnom ocenom 8,60 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad, pod nazivom: "Ispitivanje citotoksičnosti smeše hidroksiapatita sa srebrom" uradila je na Institutu za fiziologiju i biohemiju Biološkog fakulteta pod rukovodstvom dr. Biljane Božić.

Školske 2010/2011. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija.

Od 01.01.2011. godine je zaposlena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča. U zvanje istraživač saradnik je izabrana 2013. godine.

Do sada je publikovala 3 rada iz uže naučne oblasti u časopisima međunarodnog značaja i 3 kongresna saopštenja iz uže naučne oblasti na skupovima međunarodnog značaja. Trenutno je angažovana na projektu: "Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti", (ON 175085) finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бундало Маја

број уписа Б3014/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај исхране богате фруктозом на експресију компоненти ренин-ангиотензин система

и инфламације у ткиву срца пацова: полно специфичне разлике

- 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 докторанда

У Београду, 08.12.2015



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маја Бундало

Број уписа Б3014/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Утицај исхране богате фруктозом на експресију компоненти ренин-ангиотензин система и инфламације у ткиву срца пацова: полно специфичне разлике

Ментор др Александра Станковић, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду

др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани Маја Бундало

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног 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 докторанда

У Београду, 08.12.2015



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај исхране богате фруктозом на експресију компоненти ренин-ангиотензин система и инфламације у ткиву срца пацова: полно специфичне разлике

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).

Потпис докторанда

У Београду, 08.12.2015



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.