

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marina M. Nikolić

**METABOLIČKE KARAKTERISTIKE
SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA U
VISCERALNOM MASNOM TKIVU I
LEPTINSKA REZISTENCIJA U
HIPOTALAMUSU PACOVA
TRETIRANOG
5 α -DIHIDROTESTOSTERONOM:
ULOGA GLUKOKORTIKOIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marina M. Nikolić

**METABOLIC CHARACTERISTICS OF
POLYCYSTIC OVARY SYNDROME IN
THE VISCERAL ADIPOSE TISSUE AND
LEPTIN RESISTANCE IN THE
HYPOTHALAMUS OF THE RAT
TREATED WITH
5 α -DIHYDROTESTOSTERONE:
ROLE OF GLUCOCORTICOIDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade 2015.

MENTORI:

dr Danijela Vojnović Milutinović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “ Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

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

KOMISIJA:

dr Danijela Vojnović Milutinović, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “ Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

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

dr Đuro Macut, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

MENTORS:

Danijela Vojnović Milutinović, PhD, Research Associate, Institute for Biological Research “Siniša Stanković“, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Gordana Matić, PhD, Full Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

COMMITTEE MEMBERS:

Danijela Vojnović Milutinović, PhD, Research Associate, Institute for Biological Research “Siniša Stanković“, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Gordana Matić, PhD, Full Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Đuro Macut, MD, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Defense date:

Eksperimenti predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji urađeni su u Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta br. 41009 „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i ostvarenog pod rukovodstvom prof. dr Gordane Matić.

Veliko HVALA,

Mojoj Mentorki i Prijateljici dr Danijeli Vojnović Milutinović jer je od mene načinila istraživača, jer me je iskreno i saosećajno podržala u teškim trenucima i pri izazovima koji su se ukazivali u periodu izrade ove teze, ali i zbog toga što ne prestaje da postavlja standarde u predanosti poslu, radnoj etici i organizaciji, pouzdanosti i preciznosti. Nadam se da Si zadovoljna onim što smo zajedno uradile, da ću uspeti da Te u nabrojanom sustignem i da postajem saradnik vredan Tvog potpunog poverenja.

Prof. dr Gordani Matić jer mi je pružila šansu da se okušam u naučnom radu, za nesebične, britke i inteligentne savete i jer svojim jednostavnim i nenametljivim autoritetom i dobronamernim odnosom čini rad na Odeljenju za biohemiju lepim.

Dr Đuri Macutu za zainteresovanost, profesionalan pristup i ažurne i stručne sugestije tokom izrade radova i ove doktorske disertacije.

Dr Nataši Veličković za laboratorijske početke, otrežnjujuće razgovore i pravovremenu podršku, pozitivnu i nasmejanu radnu atmosferu, prijateljstvo i društvo za ljutu nam guju; za dobru saradnju u eksperimentalnom radu i odlične savete tokom pisanja radova. Jer je njena ljubav prema nauci i naučnom radu inspirativna.

Dr Ani Đorđević za neiscrpnu energiju, entuzijazam i zaraznu veru u uspeh. Za pomoć, podršku i konstruktivne savete tokom pisanja radova. Jer je njena stručnost i snaga ličnosti pokretačka.

Dr Ani Teofilović, dr Biljani Bursać i Sanji Kovačević za prijateljske sugestije, kolegijalnost, podršku i pomoć tokom vršenja eksperimenata.

Dr Jeleni Nestorov i dr Ivani Elaković na ljubaznosti i prijatnom zajedničkom radu.

Dr Jadranki Dunderski i novoj kolegini Ljupki Gligorovskoj na vedrom duhu i pozitivnoj energiji kojim obogaćuju naš kolektiv.

Grupi dr Gorana Korićanca na uspešnoj i dobroj saradnji, za antitela i pomoć u nekim od Western-a koji su me mučili.

Svima sa Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" koji su na bilo koji način doprineli realizaciji ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem dr Nataši Nestorović za veliku pomoć u histološkim analizama tkiva.

Ovaj rad posvećujem ljudima koje ću uvek čuvati u srcu i duši, jer su podižući me, rastući sa mnom, ili pružajući mi odanost, prijateljstvo i ljubav uticali, ili još uvek utiču da se oblikuje osoba koja danas jesam. Nadam se da ste ponosni jer ste najlepší i najvažniji deo priče koju ispisuje moj život.

Metaboličke karakteristike sindroma policističnih jajnika u visceralnom masnom tkivu i leptinska rezistencija u hipotalamusu pacova tretiranog 5α-dihidrotestosteronom: uloga glukokortikoida

REZIME

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) je najčešća endokrinopatija žena u reproduktivnom životnom dobu i predstavlja heterogeno oboljenje, koje u osnovi karakterišu hiperandrogenizam, hronična anovulacija i policistični jajnici, a sa njim su povezane i karakteristike metaboličkog sindroma, kao što su insulinska rezistencija, gojaznost, dislipidemija i hipertenzija.

Patofiziologija i etiologija PCOS-a, odnosno uzročno-posledična povezanost njegovih pojedinačnih simptoma, nisu do kraja razjašnjene. Generalno se smatra da reproduktivni, endokrini i metabolički poremećaji u PCOS-u formiraju začarani krug u čijem centru je hiperandrogenemija, koju stimulišu visceralna gojaznost, narušen lipidni metabolizam, inflamacija i insulinska rezistencija.

Glukokortikoidni hormoni utiču na pojavu visceralne gojaznosti i, delujući antagonistički sa insulinom, mogu da doprinesu patofiziologiji metaboličkog sindroma. Glukokortikoidni hormoni tkivno-specifičnim efektima podstiču nastanak insulinske rezistencije na nivou organizma. Imaju i generalno antiinflamatorna dejstva, ali u gojaznosti podstiču ekspresiju nekih proinflamatornih činilaca.

Leptin je hormon masnog tkiva, čija je najvažnija uloga centralno anoreksigeno dejstvo u hipotalamusu tokom kontrole unosa energije. Pri tome, leptin deluje sinergistički sa insulinom i antagonistički sa glukokortikoidnim hormonima. U gojaznosti dolazi do hiperleptinemije i nemogućnosti leptina da ostvari svoje efekte, to jest razvoja leptinske rezistencije. Glukokortikoidi kroz interakcije sa leptinskim signalnim putem mogu da podstaknu njen nastanak.

Izučavanje PCOS-a olakšano je uspostavljanjem životinjskih modela koji razvijaju glavne karakteristike ovog sindroma. Za ovu studiju odabran je pacovski model uspostavljen kontinuiranim tromesečnim tretmanom ženki potentnim androgenom 5 α -dihidrotestosteronom (DHT), počevši od puberteta. Cilj ove studije bila je detaljna morfološka, biohemijska, fiziološka i molekularno-biološka karakterizacija ovog modela PCOS-a, naročito sa aspekta uticaja glukokortikoidne signalizacije na metaboličke probleme povezane sa sindromom, kao što su visceralna gojaznost, dislipidemija i metabolička inflamacija, insulinska i leptinska osetljivost. Posebno je analiziran prereceptorski metabolizam i uticaj glukokortikoidnih hormona na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu i leptinsku signalizaciju u hipotalamusu.

Rezultati ove studije pokazuju da primenjeni tretman dovodi do razvoja reproduktivnih i metaboličkih promena koje se sreću kod žena sa PCOS-om. Među njima treba posebno istaći atreziju folikula jajnika i anovulaciju, dislipidemiju, visceralnu gojaznost sa hipertrofičnim rastom adipocita, sistemski smanjenu osetljivost na insulin, kao i hiperleptinemiju. Rezultati ukazuju da povećana lokalna koncentracija glukokortikoida utiče na pomeranje lipidnog metabolizma u pravcu lipogeneze u visceralnom masnom tkivu. Insulinska osetljivost tog tkiva nije se promenila, ali je uočena lokalna inflamacija. S druge strane, u hipotalamusu DHT-om tretiranih pacova nisu uočene promene komponenti leptinskog signalnog puta na koje utiču glukokortikoidni hormoni, kao ni parametri lokalne inflamacije.

Reproduktivne i metaboličke promene dobijene u ovoj studiji modela PCOS-a generisanog tretmanom ženki pacova DHT-om ukazuju na adekvatnost tog modela za ispitivanja raznih aspekata PCOS-a kod žena. Promene uočene na molekularnom nivou impliciraju uključenost glukokortikoida u promene metabolizma lipida u visceralnom masnom tkivu kod DHT-om tretiranih životinja. Na nivou hipotalamusa odabranog modela PCOS-a, interakcija između glukokortikoidne i leptinske signalizacije nije uočena.

Ključne reči: PCOS; DHT; visceralno masno tkivo; hipotalamus; glukokortikoidni hormoni; leptin; insulin; inflamacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

UDK broj:

[[612.616.31::618.11-006]:[61.453:[591.134:[591.476:591.133.12]]]:611.814]:599.323.45(043.3)

Metabolic characteristics of the polycystic ovary syndrome in the visceral adipose tissue and leptin resistance in the hypothalamus of the rat treated with 5 α -dihydrotestosterone: role of glucocorticoids

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy of women of reproductive age. It is a heterogenous disorder, with hyperandrogenism, chronic anovulation and polycystic ovaries as basic characteristics, and features of the metabolic syndrome, such as insulin resistance, obesity, dislipidemia and hypertension as associated metabolic characteristics.

Pathophysiology and aetiology of PCOS and interlinks between its symptoms are yet to be clarified. It is generally considered that the reproductive, endocrine and metabolic features of PCOS create a vicious circle in the centre of which lies hyperandrogenemia, stimulated by visceral obesity, disturbed lipid metabolism, inflammation and insulin resistance.

By functioning antagonistically with insulin, glucocorticoids influence the genesis of visceral obesity and contribute to the pathophysiology of the metabolic syndrome. Their tissue-specific effects stimulate systemic insulin resistance. In addition, glucocorticoids generally exhibit antiinflammatory actions. In obesity, however, they show an ability to stimulate proinflammatory factors.

Leptin is a hormone with anorexigenic effects in the hypothalamus. In the course of energy intake and consumption control it works synergistically with insulin, but antagonizes the actions of glucocorticoids. Increased secretion of leptin - hyperleptinemia and leptin resistance are common consequences of obesity. By modulating leptin signaling components in the

hypothalamus, glucocorticoids can contribute to the development of leptin resistance.

The studies of PCOS have been facilitated by the introduction of animal models exhibiting the principal features of this syndrome. In this study, a rat model of PCOS was established by continual, three-month long treatment of pubertal female rats with a potent androgen, 5 α -dihydrotestosterone (DHT). The aim of the study was a detailed morphological, biochemical, physiological and molecular characterization of this model, particularly focused on the influence of glucocorticoid signaling on the metabolic features of PCOS, such as visceral obesity, dislipidemia, metabolic inflammation, and insulin and leptin resistance. A particularly detailed analyses of lipid metabolism in the visceral adipose tissue and hypothalamic leptin signaling were performed.

The results of this study show that this treatment leads to the development of the reproductive and metabolic features seen in women with PCOS, of which follicular atresia and anovulation, dislipidemia, visceral obesity with hypertrophic adipocytes, systemically low insulin sensitivity and hyperleptinemia are particularly important. The increased local regeneration of glucocorticoids influences the molecular changes that shift the lipid metabolism toward lipogenesis in the visceral adipose tissue of the model. Insulin sensitivity of the visceral adipose tissue, was not changed. However, markers of local inflammation were increased. On the other hand, the changes of leptin signaling components influenced by glucocorticoids could not be seen in the hypothalamus of DHT treated rats, which was also the case with local inflammation parameters.

Reproductive and metabolic changes gained in this study of the DHT induced rat model of PCOS point to the adequacy of the use of this model in studies concerning the different aspects of PCOS in women. The observed molecular changes imply the involvement of glucocorticoids in the changes of lipid metabolism in the visceral adipose tissue of the DHT treated animals. In the hypothalamus of the chosen PCOS model, however, the interactions between glucocorticoid and leptin signaling were not observed.

Key words: PCOS; DHT; visceral adipose tissue; hypothalamus; glucocorticoids; leptin; insulin; inflammation

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Biochemistry and molecular biology

UDK number:

[[612.616.31::618.11-006]:[61.453:[591.134:[591.476:591.133.12]]]:611.814]:599.323.45(043.3)

Skraćenice:

ACC	karboksilaza acetil-koenzima A
ACTH	adrenokortikotropni hormon (od eng. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ADD-1	faktor determinacije i diferencijacije adipocita-1 (od eng. <i>adipocyte determination and differentiation factor-1</i>)
AgRP	peptid srodan <i>Agouti</i> proteinu (od eng. <i>Agouti-related peptide</i>)
AMH	antimilerijalni hormon (od eng. <i>anti-Müllerian hormone</i>)
ARC	arkuatno jedro hipotalamusa (od eng. <i>arcuate nucleus</i>)
ASRM	Američko društvo za reproduktivnu medicinu (od eng. <i>American Society for Reproductive Medicine</i>)
ATGL	lipaza triglicerida masnog tkiva (od eng. <i>adipose triglyceride lipase</i>)
AUC	površina ispod krive (od eng. <i>area under curve</i>)
BA	β -aktin
B2M	β_2 -mikroglobulin
BSA	albumin iz seruma govečeta (od eng. <i>bovine serum albumin</i>)
CBBG	<i>Coomassie</i> briljantno plava boja tipa G (od eng. <i>Coomassie Brilliant Blue G</i>)
CBG	globulin koji vezuje kortikosteroide (od eng. <i>corticosteroid binding globulin</i>)
CD36	klaster diferencijacije 36 (od eng. <i>cluster of differentiation 36</i>)
CE	ceramid
C/EBP	protein koji se vezuje za pojačivač CCAAT (od eng. <i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>)
DAG	diacilglicerol
DBD	domen proteina za vezivanje za DNK (od eng. <i>DNA-binding domain</i>)
DDC	dietilditiokarbamat (od eng. <i>diethyldithiocarbamate</i>)
DGAT	diacilglicerol aciltransferaza

DHEA	dehidroepiandosteron
DHEAS	dehidroepiandosteron sulfat
DHT	5 α -dihidrotestosteron
DEPC	dietilpirokarbonat
DTT	ditiotreitol
ECF	pojačana hemifluorescencija (od eng. <i>enhanced chemifluorescence</i>)
E2	estrogen
EDTA-Na₂	etilendiaminotetrasirćetna kiselina
EGTA-Na₂	etilenglikoltetrasirćetna kiselina
ELISA	enzimski esej imunoadsorpcije (od eng. <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i>)
ER	endoplazmatični retikulum
ESHRE	Evropsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (od eng. <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>)
EV	estradiol valerat
FAS	sintaza masnih kiselina (od eng. <i>fatty acid synthase</i>)
FFA	slobodne masne kiseline (od eng. <i>free fatty acids</i>)
FSH	folikulostimulirajući hormon
GLUT4	transporter glukoze tipa 4
GnRH	gonadotropin-oslobađajući hormon (od eng. <i>gonadotropin releasing hormone</i>)
G6P	glukozo-6-fosfat (od eng. <i>glucose-6-phosphate</i>)
G6PT	transporter glukozo-6-fosfata (od eng. <i>glucose-6-phosphate transporter</i>)
GPAT	aciltransferaza glicerol fosfata (od eng. <i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>)
GR	glukokortikoidni receptor
GRE	elementi sekvence DNK koji odgovaraju na glukokortikoide (od eng. <i>glucocorticoid response elements</i>)

GSK-3	kinaza sintaze glikogena tipa 3 (od eng. <i>glycogen synthase kinase-3</i>)
HDL	lipoproteini visoke gustine (od eng. <i>high-density lipoproteins</i>)
HEPES	hidroksietil-1-piperazinetansulfonska kiselina (od eng. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid</i>)
HHA	hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa
HHG	hipotalamo-hipofizno-gonadalna osa
HOMA	model za određivanje homeostaze (od eng. <i>homeostasis assessment model</i>)
H6PDH	heksozo-6-fosfat dehidrogenaza
HPRT	hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (od eng. <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase type 1</i>)
HRP	peroksidaza rena (od eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
11β-HSD	11β-hidroksisteroid dehidrogenaza
HSL	lipaza osetljiva na hormone (od eng. <i>hormone sensitive lipase</i>)
Hsp	proteini toplotnog šoka (od eng. <i>heat shock proteins</i>)
IL-1β	interleukin 1β
IL-6	interleukin 6
IP-GTT	intraperitonealni test tolerancije na glukozu (od eng. <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)
IR	receptor za insulin (od eng. <i>insulin receptor</i>)
IRS	supstrat insulinskog receptora (od eng. <i>insulin receptor substrate</i>)
ITM	indeks telesne mase
JAK 2	kinaza <i>Janus</i> tipa 2 (od eng. <i>Janus kinase 2</i>)
LBD	proteinski domen za vezivanje liganda (od eng. <i>ligand binding domain</i>)
LDL	lipoproteini niske gustine (od eng. <i>low density lipoproteins</i>)
LH	luteinizirajući hormon
LPA	lipofosfatidat (od eng. <i>lypophosphatidate</i>)

LPAAT	aciltransferaza lipofosfatidata (od eng. <i>lypophosphatidate acyltranspherase</i>)
LPL	lipaza lipoproteina (od eng. <i>lipoprotein lipase</i>)
MAG	monoacilglicerol
MAPK	protein kinaze aktivirane mitogenom (od eng. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MC3R	receptor melanokortina 3 (od eng. <i>melanocortin 3 receptor</i>)
MC4R	receptor melanokortina 4 (od eng. <i>melanocortin 4 receptor</i>)
MIF	faktor koji inhibira migraciju makrofaga (od eng. <i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
α-MSH	α -melanocit-stimulišući hormon (od eng. <i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>)
NADP⁺	oksidovana forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NADPH	redukovana forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NFκB	jedarni faktor κ B (od eng. <i>nuclear factor κB</i>)
NIH	Nacionalni institut za zdravlje SAD-a (od eng. <i>National Institute of Health</i>)
NLS	signal za lokalizaciju u jedro (od eng. <i>nuclear localization signal</i>)
NPY	neuropeptid Y (od eng. <i>neuropeptide Y</i>)
NTD	Transaktivacioni domen proteina smešten na N-kraju (od eng. <i>N-terminal transactivation domain</i>)
ObR	receptor za leptin (od eng. <i>obesity receptor</i>)
OD	optička gustina
PAP1	fosfatidat fosfataza 1 (od eng. <i>phosphatidate phosphatase 1</i>)
PCO	policistični jajnici (od eng. <i>polycystic ovaries</i>)
PCOS	sindrom policističnih jajnika (od eng. <i>polycystic ovary syndrome</i>)

PEPCK	fosfoenolpiruvat karboksikinaza (od eng. <i>phosphoenolpyruvate carboxikinase</i>)
PGC-1α	koaktivator 1 α receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma γ (od eng. <i>peroxisome proliferator - activated receptor γ co – activator - 1α</i>)
6-PGL	6-fosfoglukonat (od eng. <i>6-phosphogluconate</i>)
PI3K	fosfoinozitol-3-kinaza (od eng. <i>phosphoinositol-3-kinase</i>)
PKB	protein kinaza B
4PL kriva	standardna logistička kriva sa četiri parametra (od eng. <i>4-parameter logistic curve</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonil hlorid (od eng. <i>phenylmethysulfonyl chloride</i>)
POMC	proopiomelanokortin (od eng. <i>proopiomelanocortin</i>)
PPAR	receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (od eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PTP1B	fosfotirozin fosfataza 1B (od eng. <i>phosphotyrosine phosphatase 1B</i>)
PVDF	poliviniliden difluorid
PVN	paraventrikularno jedro hipotalamusa (od eng. <i>paraventricular nucleus</i>)
qPCR	kvantitativna reakcija lančane polimerizacije u stvarnom vremenu (od eng. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
SD	standardna devijacija
SDS	natrijum dodecil sulfat (od eng. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SEM	standardna greška srednje vrednosti (od eng. <i>standard error of the mean</i>)
SH2	homolog proteina Src 2 (od eng. <u>Src</u> <i>homology 2</i>)
SHBG	globulin plazme koji vezuje polne hormone (od eng. <i>sex hormone-binding globulin</i>)

SOCS-3	supresor signalnog puta citokina 3 (od eng. <i>supressor of cytokine signaling 3</i>)
SREBP-1	protein koji se vezuje za elemente regulisane sterolom tipa 1 (od eng. <i>sterol regulatory element binding protein 1</i>)
STAT	prenosnici signala i aktivatori transkripcije (od eng. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
TAG	triacilgliceroli
TBP	protein koji se vezuje za TATA blok (od eng. <i>TATA binding protein</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TG	trigliceridi
TLR4	receptor sličan <i>toll</i> proteinu (od eng. <i>toll-like receptor 4</i>)
TMB	tetrametilbenzidin
TNFα	faktor nekroze tumora α (od eng. <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
VLDL	lipoproteini izrazito niske gustine (od eng. <i>very low density lipoproteins</i>)
WHR	odnos obima struka i kukova (od eng. <i>waist-to-hip ratio</i>)

Sadržaj

1 UVOD	1
1.1 Sindrom policističnih jajnika	2
1.1.1 Kriterijumi za postavljanje dijagnoze PCOS-a.....	2
1.1.2 Patofiziologija PCOS-a	5
1.1.3 Metabolički poremećaji u PCOS-u.....	10
1.1.3.1 Gojaznost u PCOS-u	10
1.1.3.2 Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija u PCOS-u.....	14
1.1.3.3 Dislipidemija u PCOS-u	15
1.2 Glukokortikoidni hormoni	16
1.2.1 Fiziološki efekti glukokortikoidnih hormona	16
1.2.2 Sinteza glukokortikoidnih hormona.....	18
1.2.3 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida.....	18
1.2.4 Mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona	20
1.3 Metabolizam lipida u masnom tkivu: uloge glukokortikoida....	26
1.4 Glukokortikoidi i metabolička inflamacija u visceralnom masnom tkivu	34
1.5 Signalni putevi insulina i razvoj insulinske rezistencije: uloga glukokortikoida	35
1.6 Komunikacija visceralnog masnog tkiva i centralnog nervnog sistema u regulaciji energetskeg metabolizma	39
1.6.1 Leptin.....	40
1.6.1.1 Periferni efekti leptina	41
1.6.1.2 Centralni efekti leptina	41
1.6.1.3 Prenos leptinskog signala	43
1.6.1.4 Rezistencija na leptin	44
1.7 Životinjski modeli u izučavanju PCOS-a	47
2 CILJ RADA	50
3 MATERIJALI I METODE	52
3.1 Materijal	53

3.2 Metode	57
3.2.1 <i>Tretman životinja</i>	57
3.2.2 <i>Sakupljanje krvi, priprema krvne plazme i izolovanje jajnika, materice, visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa</i>	58
3.2.3 <i>Histološka analiza i imunohistohemija</i>	59
3.2.4 <i>Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara</i>	60
3.2.4.1 <u>Određivanje koncentracije glukoze i triglicerida u krvi</u>	60
3.2.4.2 <u>Određivanje koncentracije FFA u plazmi</u>	61
3.2.4.3 <u>Određivanje koncentracije hormona i MIF-a u krvnoj plazmi i u visceralnom masnom tkivu</u>	61
3.2.4.4 <u>Određivanje koncentracije insulina i parametara insulinske osetljivosti</u>	63
3.2.4.5 <u>Određivanje visine sistolnog krvnog pritiska i merenje pulsa</u>	64
3.2.5 <i>Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije</i>	65
3.2.5.1 <u>Izolacija RNK</u>	65
3.2.5.2 <u>Reakcija reverzne transkripcije</u>	66
3.2.5.3 <u>Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu</u>	66
3.2.6 <i>Izolovanje proteina i priprema odgovarajućih ćelijskih frakcija</i>	68
3.2.6.1 <u>Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije visceralnog masnog tkiva</u>	68
3.2.6.2 <u>Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta hipotalamusa</u>	70
3.2.6.3 <u>Određivanje koncentracije proteina u uzorcima</u>	70
3.2.6.4 <u>Western Blot analiza proteina</u>	71
3.2.6.4.1 Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS - poliakrilamidnom gelu	71
3.2.6.4.2 Western blot	72
3.3 Statistička obrada rezultata	74

4 REZULTATI	75
4.1 Ženke pacova tretirane DHT-om kao model PCOS-a	76
4.1.1 Reproktivni parametri	76
4.1.1.1 Morfometrijske karakteristike ovarijuma	76
4.1.1.2 Histološka i imunohistohemijska analiza jajnika	77
4.1.2 Morfološki i metabolički parametri	78
4.1.2.1 Kalorijski unos, visina krvnog pritiska i pulsa, masa tela i apsolutna i relativna masa visceralnog masnog tkiva	78
4.1.2.2 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva	79
4.1.2.3 Slobodne masne kiseline i trigliceridi u krvnoj plazmi	81
4.1.2.4 Parametri insulinske osetljivosti	82
4.1.2.5 Koncentracija leptina i kortikosterona u plazmi i kortikosterona u visceralnom masnom tkivu	83
4.2 Signalni put glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu	84
4.2.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida	84
4.2.2 Unutarćelijska distribucija GR-a	86
4.2.3 Ekspresija enzima lipidnog metabolizma regulisanih glukokortikoidima u visceralnom masnom tkivu DHT-om tretiranih pacova	87
4.2.3.1 Transkripcioni i proteinski nivoi proadipogenih i prolipogenih faktora	87
4.2.3.2 Transkripcioni nivoi prolipolitičkih faktora regulisanih GR-om	93
4.3 Metabolička inflamacija i insulinska rezistencija u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om	94
4.3.1 Metabolička inflamacija u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om	94

4.3.2	<i>Signalni put insulina u visceralnom masnom tkivu</i>	
	<i>DHT-om tretiranih pacova</i>	98
4.4	<i>Signalni putevi glukokortikoida i leptina i inflamacija</i>	
	<i>u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om</i>	100
4.4.1	<i>Prereceptorski metabolizam glukokortikoida i unutarćelijski nivoi</i>	
	<i>GR-a u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om</i>	100
4.4.2	<i>Komponente leptinskog signalnog puta čija je ekspresija pod</i>	
	<i>kontrolom glukokortikoidnih hormona</i>	102
4.4.3	<i>Lokalna inflamacija u hipotalamusu</i>	
	<i>pacova tretiranih DHT-om.....</i>	105
5	<i>DISKUSIJA</i>	107
5.1	<i>Reproduktivne i metaboličke karakteristike</i>	
	<i>životinjskog modela PCOS-a</i>	108
5.2	<i>Uloga glukokortikoida u metaboličkim promenama</i>	
	<i>u visceralnom masnom tkivu</i>	
	<i>ženki pacova tretiranih DHT-om</i>	110
5.3	<i>Metabolička inflamacija i insulinska osetljivost u</i>	
	<i>visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om ...</i>	115
5.4	<i>Glukokortikoidna i leptinska signalizacija</i>	
	<i>u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om</i>	119
6	<i>ZAKLJUČCI</i>	122
7	<i>LITERATURA</i>	124
8	<i>PRILOZI</i>	138



1 Uvod

1.1 Sindrom policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika (PCOS, od eng. *polycystic ovary syndrome*) predstavlja najčešću endokrinopatiju kod žena u reproduktivnom životnom dobu sa učestalošću od 6 do 20% žena u populaciji (Sirmans i Pate 2013; Conway i sar. 2014). Ovaj sindrom prvi su u modernoj medicinskoj literaturi prijavili Štajn i Levental još 1935. godine, opisujući sedam žena koje su patile od amenoreje, uvećanih jajnika sa brojnim cistama, hirzutizma i gojaznosti. Tada je ovaj sindrom bio označavan imenom sindrom Štajna i Leventala (eng. *Stein-Leventhal syndrome*). Danas se zna da je PCOS heterogeno endokrinološko oboljenje sa širokim spektrom reproduktivnih i metaboličkih poremećaja, koje u osnovi karakterišu hiperandrogenizam, hronična anovulacija i policistični jajnici, a sa njim su povezane i karakteristike metaboličkog sindroma - insulinska rezistencija i narušena tolerancija na glukozu, gojaznost, dislipidemija i hipertenzija (Diamanti-Kandarakis i sar. 2007; Sirmans i Pate 2013). Kod žena sa PCOS-om, uočena je i asocijacija sindroma sa psihološkim problemima, naročito anksioznošću i depresijom, ali i poremećajima sna i regulacije unosa hrane (Kanaya i sar. 2013; Conway i sar. 2014).

1.1.1 Kriterijumi za postavljanje dijagnoze PCOS-a

Zbog komplikovane simptomatologije i etiologije sindroma, pravilno postavljanje dijagnoze je otežano, pa je poslednjih decenija jedan od važnijih ciljeva bilo formulisanje adekvatne definicije PCOS-a i uspostavljanje jasnih dijagnostičkih kriterijuma.

Kriterijumi za dijagnozu PCOS-a do sada su definisani u tri navrata: 1990. godine od strane Nacionalnog instituta za zdravlje SAD-a (NIH, od eng. *National Institute of Health*) (Sirmans i Pate 2013; Conway i sar. 2014); u

Rotterdamu 2003. godine od strane Evropskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE, od eng. *European Society of Human Reproduction and Embryology*) i Američkog društva za reproduktivnu medicinu (ASRM, od eng. *American Society for Reproductive Medicine*) (Rotterdam 2004); i 2006. od strane radne grupe Društva za povećan nivo androgena i PCOS (Azziz i sar. 2006).

Sve grupe za pravilno postavljanje dijagnoze PCOS smatraju presudnim isključenje drugih bolesti sa sličnim simptomima, kao što su urođena hiperplazija nadbubrega, nekласična hiperplazija nadbubrega, Kušingov sindrom, androgen-sekretujući tumor, idiopatski hiperandrogenizam, idiopatski hirzutizam, hiperprolaktinemija i poremećaji rada tiroidne žlezde (Azziz i sar. 2006; Sirmans i Pate 2013). Pošto je kod 20%–30% inače zdravih žena pokazano prisustvo većeg broja cisti na jajnicima (Azziz i sar. 2006), samo prisustvo policističnih jajnika (PCO, od eng. *polycystic ovaries*) nijedna grupa ne smatra dovoljnim za postavljanje dijagnoze PCOS. NIH i Društvo za povećan nivo androgena zahtevaju da pacijenti imaju i simptome hiperandrogenizma, kakvi su hirzutizam ili povišeni slobodni testosteron, sniženi globulin plazme koji vezuje polne hormone (SHBG, od eng. *sex hormone-binding globulin*), ili povišeni dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) (Azziz i sar. 2006; Sirmans i Pate 2013). ESHRE/ASRM kriterijumi, međutim, ne podrazumevaju znake kliničkog ili biohemijskog hiperandrogenizma neophodnim za dijagnozu PCOS-a. Sa aspekta tih kriterijuma, žene sa disfunkcijom jajnika i policističnim jajnicima smatraju se obolelim. Dodatna ključna razlika između kriterijuma je način posmatranja oligomenoreje i amenoreje. Po ESHRE/ASRM kriterijumima nije neophodno postojanje nepravilnih menstruacija ili ovulatorne disfunkcije za dijagnozu PCOS-a pod uslovom da žene sa pravilnim menstrualnim ciklusima imaju PCO i hiperandrogenemiju/hiperandrogenizam (Rotterdam 2004). Subklinička ovulatorna disfunkcija može, naime, da bude prisutna kod žena sa pravilnim menstrualnim krvarenjem (Azziz i sar. 2006). Po NIH-u, međutim, ženama sa subkliničkom ovarijalnom disfunkcijom ne bi

trebalo dijagnostikovati PCOS (Sirmans i Pate 2013). Prema kriterijumima za dijagnostikovanje PCOS-a datim 2006. godine od strane Društva za povećan nivo androgena, sindrom treba posmatrati prevashodno kao poremećaj koji odlikuje hiperandrogenizam.

Suštinske razlike između do sada datih kriterijuma za dijagnozu PCOS predstavljene su u ***Tabeli 1.***

Tabela 1. Različiti kriterijumi za postavljanje dijagnoze PCOS-a. Prilagođeno iz Azziz i sar. (2006).

<i>Kriterijumi za postavljanje dijagnoze</i>	<i>NIH (1990. godine)</i>	<i>ESHRE/ASRM (2003. godine)</i>	<i>Društvo za povećan nivo androgena (2006. godine)</i>
Druga oboljenja koja dovode do poremećaja ciklusa i hiperandrogenizma	-	-	-
Klinički i/ili biohemijski hiperandrogenizam	+	+*	+ [#]
Menstrualna disfunkcija	+		
Ovarijalna disfunkcija (oligo- ili anovulacija)		+*	+ [#]
Policistični jajnici		+*	+ [#]

Legenda: *, za postavljanje dijagnoze zahteva se prisustvo dva od tri označena kriterijuma;
[#], za postavljanje dijagnoze zahteva se prisustvo svih označenih kriterijuma

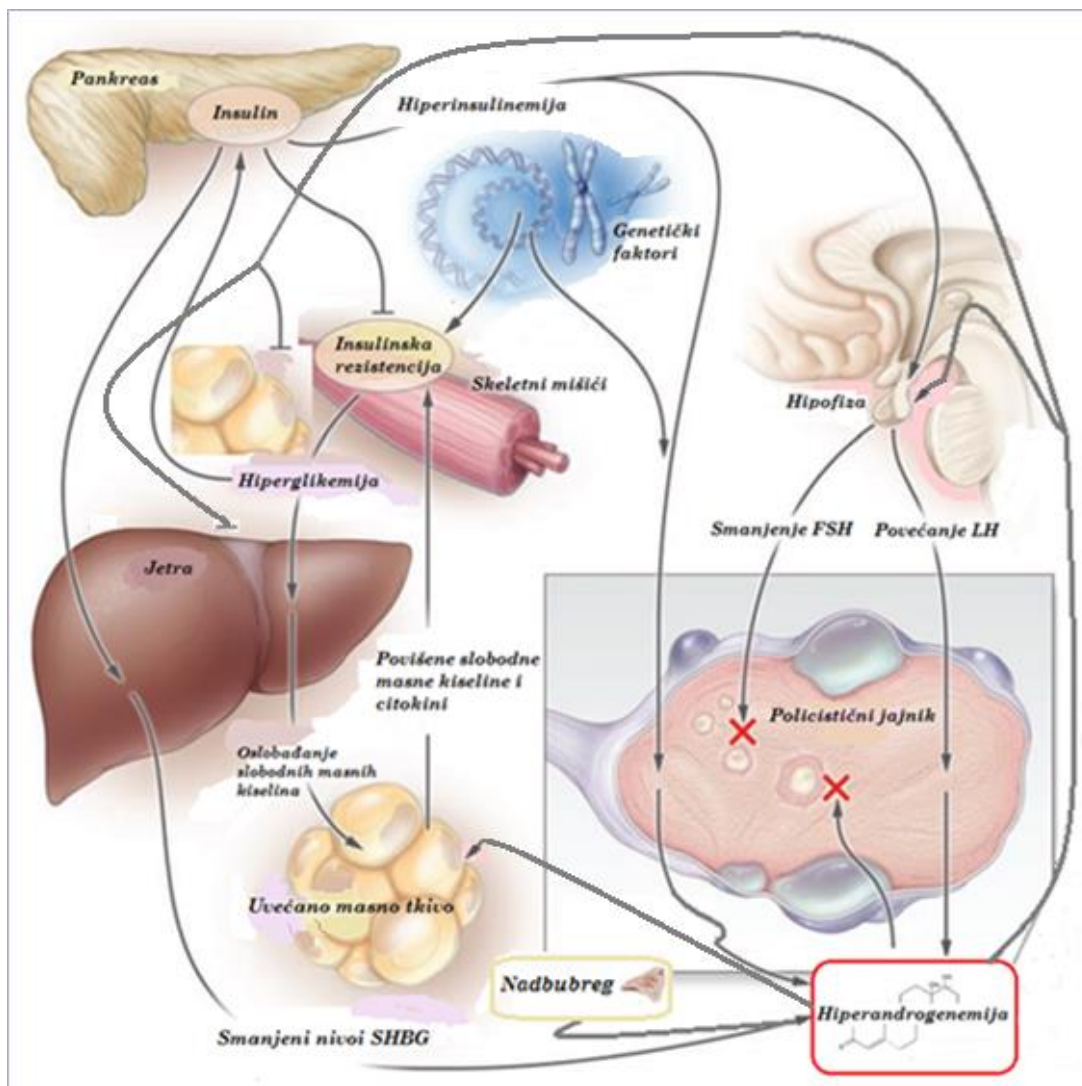
U decembru 2012. godine održana je metodološka radionica o PCOS-u u organizaciji NIH-a, praćena ekspertskim panelom čija je ocena da su na globalnom nivou kao dijagnostički kriterijumi najprikladniji i najinkluzivniji ESHRE/ASRM, uz preporuku da se identifikuje specifični fenotip kod svakog

pacijenta pojedinačno (Conway i sar. 2014). Korišćenjem mogućih kombinacija preporučenih kriterijuma mogu se identifikovati četiri varijante fenotipa PCOS:

- 1) prisustvo kliničkog i/ili biohemijskog hiperandrogenizma i hronične anovulacije,
- 2) hiperandrogenizam i ultrazvukom potvrđeno prisustvo cisti na jajnicima, ali uz održanje normalnih ciklusa,
- 3) hronična anovulacija i policistični jajnici bez hiperandrogenizma i, konačno,
- 4) hronična anovulacija, policistični jajnici i hiperandrogenizam (Conway i sar. 2014).

1.1.2 Patofiziologija PCOS-a

Definitivni patofiziološki mehanizmi PCOS-a nisu poznati, ali je jasno da na ispoljavanje varijante simptoma kod obolelih utiče genetički kontekst u kome deluju sredinski faktori (Deligeoroglou i sar. 2009). Generalno se smatra da reproduktivni, endokrini i metabolički poremećaji koji se ispoljavaju u PCOS-u formiraju začarani krug u kome višak androgena poreklom iz jajnika i/ili nadbubrega, nastao rano tokom života ili čak prenatalno, izaziva neuroendokrine poremećaje, disfunkciju jajnika, visceralnu gojaznost, narušen lipidni metabolizam i insulinsku rezistenciju, koja dalje, direktno i/ili indirektno, stimuliše hiperandrogenemiju (***Slika 1.1***) (Escobar-Morreale i San Millan 2007; Nestler 2008).



Slika 1.1. Začarani krugovi između reproduktivnih i metaboličkih promena u PCOS-u. Prilagođeno iz Nestler (2008).

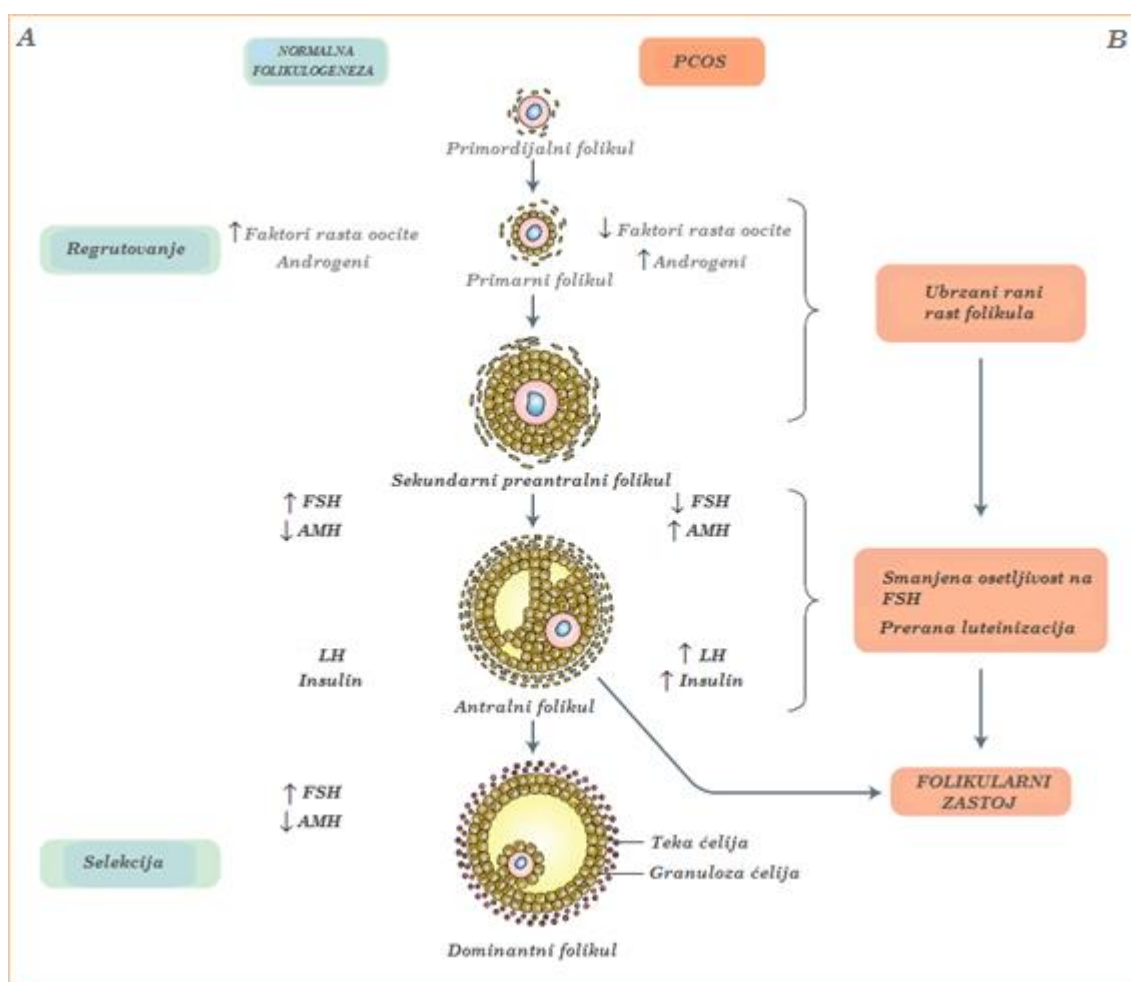
Primarni poremećaj u patogenezi PCOS-a i dalje nije poznat, pa je postavljeno nekoliko teorija o mehanizmima nastanka i razvoja PCOS-a. Prva teorija pretpostavlja da primarni poremećaj nastaje na nivou enzima steroidogeneze u ovarijumima i/ili adrenalnim žlezdama (Qin i Rosenfield 1998); druga da primarni defekt predstavlja pojačana pulsatilnost sekrecije gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH, od eng. *Gonadotropin Releasing Hormone*), koja uzrokuje povećano lučenje luteinizirajućeg hormona (Mansson i sar. 2008) u odnosu na folikulostimulirajući hormon (FSH) (Ehrmann 2005); treća da je rezistencija

na insulin sa pratećom hiperinsulinemijom primarni poremećaj (Legro i sar. 2004; Nestler 2008). Nešto novije teorije ističu lipotoksičnost kao primarni problem u patofiziologiji sindroma (de Zegher i sar. 2009).

Povećana produkcija i sekrecija ovarijalnih androgena predstavlja konzistentnu karakteristiku PCOS-a. Od strane nekih autora, sindrom se čak smatra oblikom funkcionalnog ovarijalnog hiperandrogenizma, što podupiru podaci koji ukazuju da se poremećaj sinteze androgena u jajnicima obolelih uspostavlja rano tokom detinjstva ili čak prenatalno, iako se njegove manifestacije ne uočavaju pre puberteta (Doi i sar. 2005). Danas se ovarijalni hiperandrogenizam uglavnom pripisuje genetički determinisanom inherentnom steroidogenom defektu u teka ćelijama jajnika, kojeg svojim uticajima mogu pojačati viškovi LH i insulina u odnosu na FSH (**Slike 1.1 i 1.2**) (Mansson i sar. 2008). Unutrašnji faktori jajnika, kao što su faktori rasta poreklom iz oocita, antimilerijalni hormon (AMH, od eng. *anti - Müllerian hormone*) i inhibini granulosa ćelija takođe se smatraju uključenim u patogenezu PCOS-a (**Slika 1.2**) (Diamanti-Kandarakis 2008).

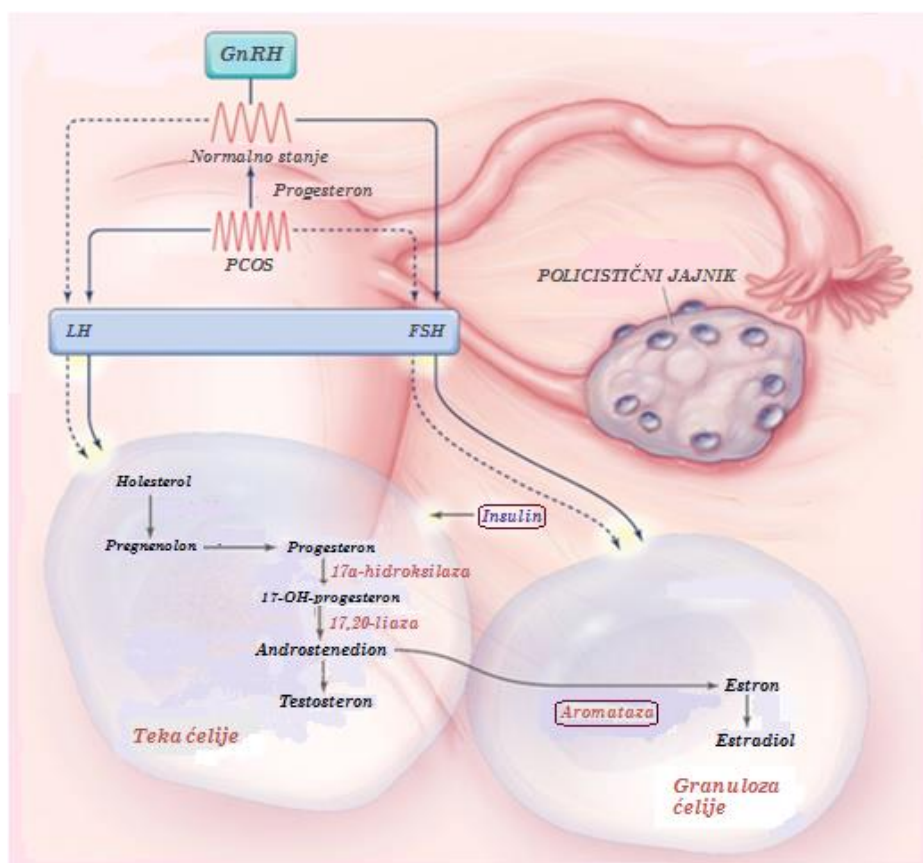
PCOS predstavlja najčešći uzrok normogonadotropne anovulacije (Diamanti-Kandarakis 2008). Anovulacija u PCOS-u smatra se posledicom karakterističnih poremećaja u folikulogenezi, čije su odlike ubrzan rani rast folikula, distorzija selekcije dominantnih folikula (folikularni zastoj), usporena atrezija i posledično povećanje broja malih, preantralnih folikula (**Slika. 1.2**). Tokom normalne folikulogeneze (**Slika. 1.2A**), faktori rasta poreklom iz oocite stimulišu prelaz iz primordijalne u primarnu fazu rasta folikula, dok FSH reguliše faze folikulogeneze koje prethode selekciji dominantnog folikula, a androgeni i insulin deluju sinergistički sa LH i stimulišu srednje i kasne faze folikulogeneze. Ravnoteža između FSH i AMH smatra se ključnom za aktivnost aromataze, enzima koji prevodi androgene u estrogene (**Slika. 1.3**) tokom i posle selekcije dominantnih folikula. Povećana produkcija estradiola od strane dominantnog folikula smanjuje nivo FSH i dovodi do smrti subordinantnih folikula, a to na kraju rezultuje ovulacijom. U PCOS-u (**Slika 1.2B**) ubrzana rana folikulogeneza, koja se

javlja kao posledica viška androgena u ovarijumima, vodi sprečavanju sazrevanja folikula prema dominantnoj fazi, uspostavljanju viška malih folikula, interferenciji AMH sa odgovorom FSH i anovulaciji (Jonard i Dewailly 2004). Rani folikuli, naime, stižu androgenski receptor pre ostalih, tako da androgeni mogu izazvati produženje FSH-nezavisne faze odabira (Jonard i Dewailly 2004; Diamanti-Kandarakis 2008). Tokom kasnijih, faza zavisnih od FSH, ovi hormoni, međutim, promovišu ekspresiju receptora za FSH i pojačavaju diferencijaciju granuloza ćelija. Mogu i da interferiraju sa steroidogenezom sprečavajući dejstvo aromataze preko svojih nearomatizabilnih formi, pre svih dihidrotestosterona (**Slika 1.2B**) (Jonard i Dewailly 2004; Diamanti-Kandarakis 2008).



Slika 1.2. Folikulogeneza kod zdravih i žena sa PCOS-om. Prilagođeno iz Diamanti-Kandarakis (2008).

Izmenjena dinamika gonadotropina takođe se u literaturi navodi kao jedan od mogućih uzroka anovulacije u PCOS-u (Jonard i Dewailly 2004). Postoje podaci koji ukazuju na to da žene sa PCOS-om karakteriše relativno smanjenje nivoa FSH u odnosu na LH, koje može ili direktnim uticajem prerane luteinizacije, ili indirektno, povećanjem ovarijalnih androgena, dovoditi do defektne ovulacije. Indirektne uticaje gonadotropini ostvaruju smanjenjem aktivnosti aromataze (**Slika 1.3**). Anovulacija u PCOS povezuje se, međutim, prvenstveno sa nereaktivnošću granuloza ćelija jajnika na FSH (**Slika. 1.2B**), ali i odsustvom pika ovog hormona u međuciklusima (Jonard i Dewailly 2004).



Slika 1.3. Uticaj izmenjene dinamike gonadotropina i insulina na uspostavljanje intraovarijalnog viška androgena u PCOS-u. Prilagođeno iz Ehrmann (2005).

1.1.3 Metabolički poremećaji u PCOS-u

Iako ih kriterijumi za postavljanje dijagnoze PCOS-a ne ubrajaju u neophodne za ustanovljavanje sindroma, metabolički poremećaji koji se povezuju sa PCOS-om - gojaznost, dislipidemija, hiperinsulinemija i insulinska rezistencija, mogu dovesti do težih posledica po metaboličko i zdravlje srca i krvnih sudova, ali i pojačati reproduktivne, endokrinološke i psihološke probleme obolelih (Legro i sar. 1999; Talbott i sar. 2004; Orio i sar. 2008; Tan i sar. 2008).

1.1.3.1 Gojaznost u PCOS-u

Gojaznost se generalno definiše kao višak masnog tkiva u telu i na svetskom nivou predstavlja izuzetno raširen zdravstveni problem (Tchernof i Despres 2013), ali je česta i u PCOS-u, s obzirom da je pokazano da od 38 do čak 88% obolelih ima prekomernu težinu, ili je gojazno (Barber i Franks 2013). U kliničkoj praksi, gojaznost se procenjuje izražavanjem mase tela u funkciji visine, najčešće pomoću indeksa telesne mase (ITM), koji predstavlja količnik mase tela (izražene u kg) i kvadrata visine (izražene u m²). Osobama sa prekomernom težinom smatraju se one sa $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$, dok se gojaznim smatraju osobe sa $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Populacione studije su pokazale asocijaciju između povećanog ITM-a i rizika za nastanak hipertenzije, dislipidemije, insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, čireva i nekih tipova kancera (Tchernof i Despres 2013; Conway i sar. 2014).

Masno tkivo je raspoređeno u telu u diskretnim anatomskim depozitima (Lee i sar. 2013). Postoje dve osnovne, funkcionalno i po poreklu različite vrste masnog tkiva – belo i mrko masno tkivo, ali se gojaznost primarno karakteriše povećanim skladištenjem lipida i ekspanzijom belog masnog tkiva (White i Tchoukalova 2014). Adipociti belog masnog tkiva odlikuju se

jedinstvenom morfologijom, sa pojedinačnom velikom lipidnom kapi koja zauzima najveći deo zapremine ćelije i ciotoplazmom i jedrom smeštenim na periferiji. U belom masnom tkivu se nalaze i krvne ćelije strome, koje uključuju multipotentne stem ćelije, preadipocite, endotelijalne ćelije, pericite, kao i brojne ćelije imunskog sistema (makrofagi, T-ćelije, neutrofili, limfociti) (Lee i sar. 2013). Na patogenezu PCOS-a utiču defekti kako subkutanog, površinskog, tako i unutrašnjeg dela belog masnog tkiva, visceralnog masnog tkiva (de Zegher i sar. 2009; Barber i Franks 2013).

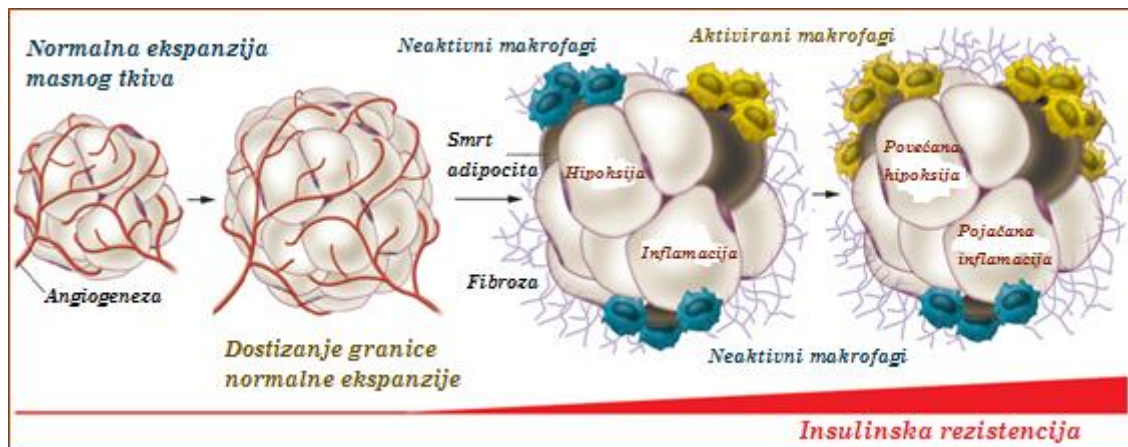
Brojne studije ukazale su da centralna/abdominalna gojaznost, koja podrazumeva uvećanje subkutanog masnog tkiva oko struka i ekspanziju visceralnog masnog tkiva, generalno korelira sa većom podložnošću metaboličkim komplikacijama, dok gomilanje glutealnog subkutanog masnog tkiva ima protektivno dejstvo u odnosu na nastanak metaboličkih i drugih zdravstvenih posledica gojaznosti (White i Tchoukalova 2014). Zato je odnos obima struka i kukova (WHR, od eng. *waist-to-hip ratio*) bolji pokazatelj rizika od metaboličkih komplikacija od ITM-a. Vrednosti WHR veće od 0.8 kod žena uzimaju se za granice povećanog metaboličkog rizika (Alberti i sar. 2009). Žene generalno, uključujući i one sa PCOS-om, sklone su centralnom tipu gojaznosti (Manneras-Holm i sar. 2011; Villa i Pratley 2011; Barber i Franks 2013; Spritzer i sar. 2015). Visceralna gojaznost je naročito stimulirana kod obolelih od PCOS-a, pošto androgeni, delujući intrauterino, ili tokom ranog detinjstva, preko svojih visoko eksprimiranih receptora u visceralnom masnom tkivu, dovode do njenog povećanja (Rodriguez-Cuenca i sar. 2005). Između gojaznosti i hiperandrogenemije se, zapravo, uspostavlja začarani krug koji pospešuje i reproduktivne i metaboličke probleme obolelih od PCOS-a (Diamanti-Kandarakis 2008). Gojaznost, naime, može izazivati poremećaje u ishrani i povećan unos, nastanak i nagomilavanje citotoksičnih produkata metabolizma ugljenih hidrata, što uzrokuje oštećenja svih tipova ćelija jajnika i poremećaje njihovog rada (Diamanti-Kandarakis 2008). Na taj način, gojaznost izaziva povećanje sinteze i koncentracije svih steroidnih hormona, a među njima i estrogena, koji posredno, preko povećanja

pulsatilnosti LH, dovodi do ovarijalne hiperandrogenemije. Osim toga, uvećanje visceralnog masnog tkiva može dovesti i do poremećaja rada hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) ose, odnosno povećanih koncentracija glukokortikoida i androgena poreklom iz nadbubrežne žlezde (Rojas i sar. 2014).

Centralna gojaznost, međutim, u najvećoj meri utiče na patofiziologiju i samopropagaciju PCOS-a pospešivanjem hiperinsulinemije i insulinske rezistencije i hronične inflamacije niskog stepena, kao i uzrokovanjem generalnog stanja lipotoksičnosti (Diamanti-Kandarakis 2008; de Zegher i sar. 2009; Lee i sar. 2013; Tchernof i Despres 2013; Spritzer i sar. 2015). Lipidne kapi belog masnog tkiva, naime, predstavljaju skladišta triglicerida, koji, kada se za to ukaže fiziološka potreba, mogu biti razloženi u precizno regulisanom i postepenom procesu lipolize, do slobodnih masnih kiselina (FFA, od eng. *free fatty acids*) i glicerola (Lee i sar. 2013). FFA se u cirkulaciji vezuju za albumine i u toj formi bivaju transportovane do mišića (gde se oksiduju), jetre (gde su supstrat za sintezu triglicerida, ili se oksiduju) i adipocita (gde se reesterifikuju) (Lee i sar. 2013). Na taj način FFA se po potrebi koriste između obroka i u gladovanju, ali se u gojaznosti uspostavlja njihov višak, koji može biti metabolički štetan (White i Tchoukalova 2014). Ovo naročito predstavlja problem u visceralnoj gojaznosti, jer visceralno masno tkivo, zbog svog položaja i činjenice da se preko portne vene drenira direktno u jetru, dovodi do njenog prekomernog izlaganja FFA, a preko njih i do insulinske rezistencije i povećanja glukoneogeneze u ovom organu. Osim toga, FFA smanjuju i insulinsku osetljivost u mišićima, odnosno snižavaju sekreciju insulina iz pankreasa (Tchernof i Despres 2013). FFA povećavaju i hepatičnu proizvodnju i sekreciju lipoproteina izrazito niske gustine (VLDL, od eng. *very low density lipoproteins*) i apolipoproteina B i tako potencijalno izazivaju hepatosteatozu i masnu jetru. Krajnja posledica ovih poremećaja je hipertrigliceridemija, povećana glikemija, sistemska hiperinsulinemija i insulinska rezistencija

(Tchernof i Despres 2013). Androgeni, pri tome, povećavaju oslobađanje FFA iz visceralnog masnog tkiva (Diamanti-Kandarakis 2008).

Ekspanzija masnog tkiva, tj. povećanje adipoznosti se može ostvariti na dva načina: uvećanjem postojećih adipocita praćeno uvećanjem masnih kapi – hipertrofijom, ili povećanjem broja adipocita – hiperplazijom. Visceralno masno tkivo ima izraženu tendenciju da se uvećava hipertrofijom, praćenom infiltracijom i unutarćivnom aktivacijom makrofaga i pojačanom sekrecijom proinflammatoryh molekula, kako od strane makrofaga, tako i od strane samih adipocita. Produkcija antiinflammatoryh molekula u hipertrofičnim adipocitima istovremeno je suprimirana. Pošto se vaskularizacija ne povećava proporcionalno ekspanziji volumena adipocita, vremenom dolazi do hipoksije tkiva i dodatne infiltracije proinflammatoryh makrofaga, odnosno inflamacije u samom masnom tkivu, kao i do hronične inflamacije niskog stepena koja pospešuje insulinsku rezistenciju na nivou organizma (**Slika 1.4**) (Sun i sar. 2011).



Slika 1.4. Hipertrofija i nastanak inflamacije u visceralnom masnom tkivu. Prilagođeno iz Sun i sar. (2011).

Takozvana “hipoteza preliivanja” (eng. “spillover hypothesis”) posmatra prekomernu visceralnu adipoznost kao posledicu prevazilaženja granice širenja subkutanog masnog tkiva, tj. nemogućnosti ostvarivanja njegove uloge metaboličkog pufera i zaštite organizma od lipotoksičnosti. Nastali

višak FFA i TG skladišti se, prema ovoj hipotezi u visceralnom masnom tkivu, a potom potencijalno i ektopično - u drugim tkivima, uključujući jetru, srce, skeletne mišiće, bubrege i pankreas, izazivajući insulinsku rezistenciju/dijabetes tipa 2, dislipidemiju, sistemsku inflamaciju i kardiovaskularne bolesti, remećenjem rada tih organa (Tchernof i Despres 2013). "Hipoteza prelivanja" iskorišćena je za postavljanje teorije o patofiziologiji PCOS-a, po kojoj različite fenotipske varijante sindroma mogu biti posledica lipotoksičnosti uzrokovane subkutanom gojaznošću, smanjenim intrauterinim rastom, ili genetički determinisanom lipodistrofijom (de Zegher i sar. 2009). U svim tim situacijama smanjena puferska sposobnost subkutanog masnog tkiva bi po ovoj hipotezi dovela do uspostavljanja začaranog kruga između hiperinsulinemije i hiperandrogenemije i nastanka bazičnih simptoma PCOS-a, a različite fenotipske varijante sindroma tumačile bi se odgovarajućom interakcijom genetičke osnove i sredinskih faktora (de Zegher i sar. 2009). Prema toj teoriji bi, zapravo, ubrzan rast subkutanog masnog tkiva tokom razvika i ranog detinjstva imao zaštitni efekat u odnosu na razvoj PCOS-a.

1.1.3.2 Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija u PCOS-u

Insulinska rezistencija se generalno definiše kao stanje metabolizma čija je glavna odlika smanjena sposobnost ciljnih ćelija ovog hormona da odgovore na njega (Rojas i sar. 2014), a javlja se kod 50–70% žena sa PCOS-om (Conway i sar. 2014). Rezistencija na insulin se pri tome uspostavlja na nivou skeletnih mišića i adipocita, dok jajnici ovih osoba ostaju osetljivi na dejstva insulina (Corbould i sar. 2005; Baillargeon i Carpentier 2007; Diamanti-Kandarakis 2008). Periferna rezistencija na insulin dovodi do povećane sekrecije insulina iz beta ćelija pankreasa i time do posledične, kompenzatorne hiperinsulinemije, dok zadržana osetljivost u ovarijumima pojačava lokalnu sekreciju androgena (*Slika 1.3*) i igra važnu ulogu u nastanku i održavanju PCOS-a. Sistemska dejstva insulina u jetri gde

stimuliše smanjenje sekrecije globulina koji vezuje polne hormone i u nadbubrežnoj žlezdi gde pospešuje steroidogenezu, kao i dejstva u hipotalamusu kojima utiče na rad HHA i hipotalamo-hipofizno-gonadalne (HHG) ose, predstavljaju dodatne načine hiperinsulinemije i insulinske rezistencije da pojačaju hiperandrogenizam kod žena sa PCOS-om (*Slike 1.2 i 1.3*) (Diamanti-Kandarakis 2008; Baptiste i sar. 2010). Hiperandrogenemija, sa druge strane, može uticati na insulinsku osetljivost povećavajući ekspresiju β_3 -adrenergičkih receptora, i lipolizu u visceralnom masnom tkivu. Androgeni tako povećavaju oslobađanje FFA u cirkulaciju. Osim toga, oni posredno inhibiraju insulinski signalni put u skeletnim mišićima, jetri i adipocitima. Androgeni utiču i na arhitekturu i funkcionalnost poprečno-prugastih mišića, indukujući povećanje broja vlakana sa smanjenom osetljivošću na insulin, a povećavaju i oslobađanje proinflamatornih citokina koji interferiraju sa signalima insulina iz visceralnog masnog tkiva (Rojas i sar. 2014). Između hiperandrogenemije i hiperinsulinemije se, dakle, uspostavlja jedan od začaranih krugova koji utiče na patogenezu i samopropagaciju PCOS-a.

1.1.3.3 Dislipidemija u PCOS-u

Dislipidemija je, sa učestalošću od oko 70%, najčešći metabolički problem u PCOS-u (Conway i sar. 2014). Žene sa ovim sindromom imaju tzv. aterogeni lipoproteinski profil, koji se karakteriše povećanim prisustvom lipoproteina niske gustine (LDL, od eng. *low density lipoproteins*) u odnosu na lipoproteine visoke gustine (HDL, od eng. *high density lipoproteins*) (Diamanti-Kandarakis i sar. 2007; Valkenburg i sar. 2008). Dislipidemija se sreće i kod gojaznih i kod žena sa PCOS-om koje imaju normalan indeks telesne mase (Macut i sar. 2006; Valkenburg i sar. 2008).

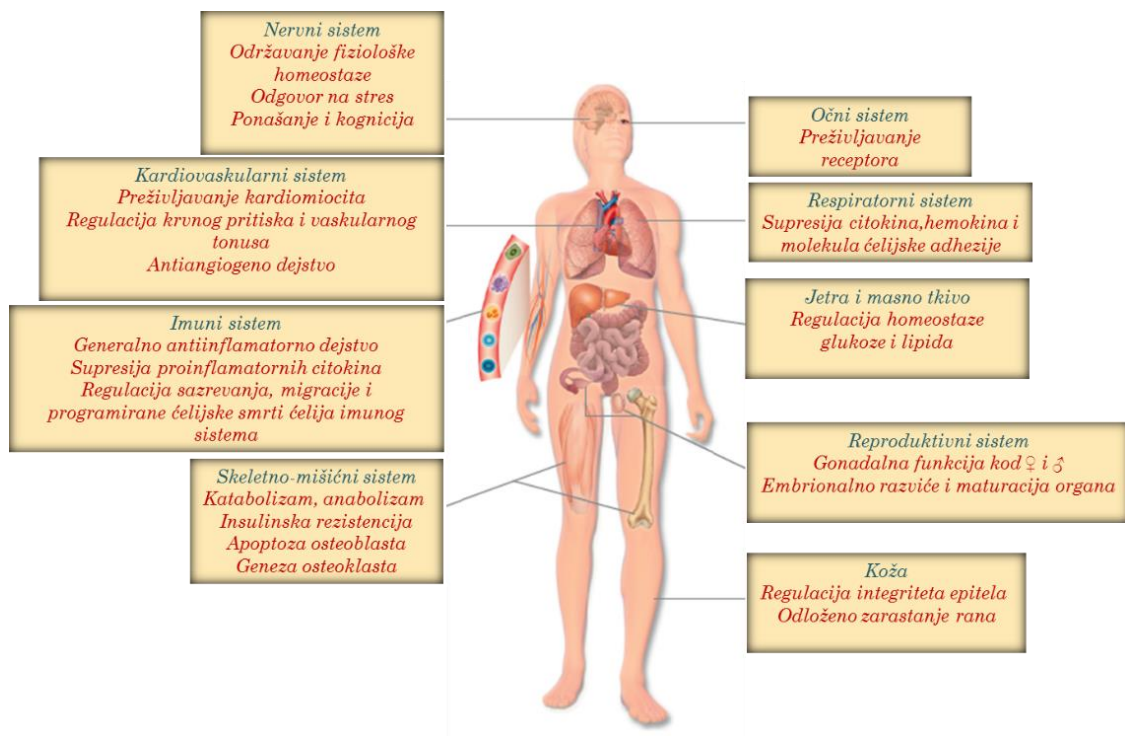
Hiperandrogenizam, anovulacija i insulinska rezistencija doprinose dislipidemiji u PCOS-u i povećavaju verovatnoću nastanka dijabetesa tipa 2 i kardiometaboličkih problema (Westerveld i sar. 2008; Barber i Franks 2013).

1.2 Glukokortikoidni hormoni

1.2.1 Fiziološki efekti glukokortikoidnih hormona

Glukokortikoidni hormoni imaju veliki broj važnih bioloških uloga i deluju na sve organe i tkiva. U najširem kontekstu, oni su uključeni u održanje homeostaze, kako tokom normalnih diurnalnih metaboličkih promena, tako i u stresnim uslovima, regulišući brojne fiziološke procese, kao što su intermedijerni metabolizam, imunski odgovor, rast skeleta, funkcionisanje kardiovaskularnog i reproduktivnog sistema, kognitivni procesi i ponašanje (**Slika 1.5**) (Oakley i Cidlowski 2013).

Sa aspekta patofiziologije metaboličkih poremećaja povezanih sa PCOS-om, naročito je važno učešće glukokortikoidnih hormona u kontroli energetske homeostaze.



Slika 1.5. Najvažnije funkcije glukokortikoidnih hormona. Prilagođeno iz Kadmiel i Cidlowski (2013).

1.2.2 Sinteza glukokortikoidnih hormona

Glukokortikoidni hormoni, kortizol kod ljudi, odnosno kortikosteron kod pacova, su derivati holesterola, koji se sintetišu i oslobađaju iz fascikulatne zone (lat. *zona fasciculata*) nadbubrežnih žlezda, pod dinamičkom, cirkadijalnom i ultradijalnom regulacijom HHA ose (**Slika 1.6A**). Pri tome, unutrašnji i spoljni signali dovode do oslobađanja kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH, od eng. *corticotropin-releasing hormone*) iz hipotalamusa, koji, onda, u prednjem režnju hipofize stimuliše sintezu i sekreciju adrenokortikotropnog hormona (ACTH, od eng. *adrenocorticotropic hormone*). ACTH potom deluje u kori nadbubrežne žlezde stimulišući produkciju i oslobađanje glukokortikoida. U klasičnoj negativnoj povratnoj sprezi, glukokortikoidi u hipotalamusu i hipofizi inhibiraju proizvodnju i oslobađanje CRH i ACTH i tako sami ograničavaju jačinu i trajanje sopstvene aktivnosti (Oakley i Cidlowski 2013).

Endogeni glukokortikoidi se transportuju kroz krvotok vezani za globulin koji vezuje kortikosteroide (CBG, od eng. *corticosteroid-binding globulin*). CBG ne olakšava samo distribuciju steroida, već igra ulogu i u njihovom kontrolisanom oslobađanju u ciljna tkiva. Glukokortikoid oslobođen sa CBG-a pasivno difunduje kroz plazma membranu ciljnih ćelija (Oakley i Cidlowski 2013).

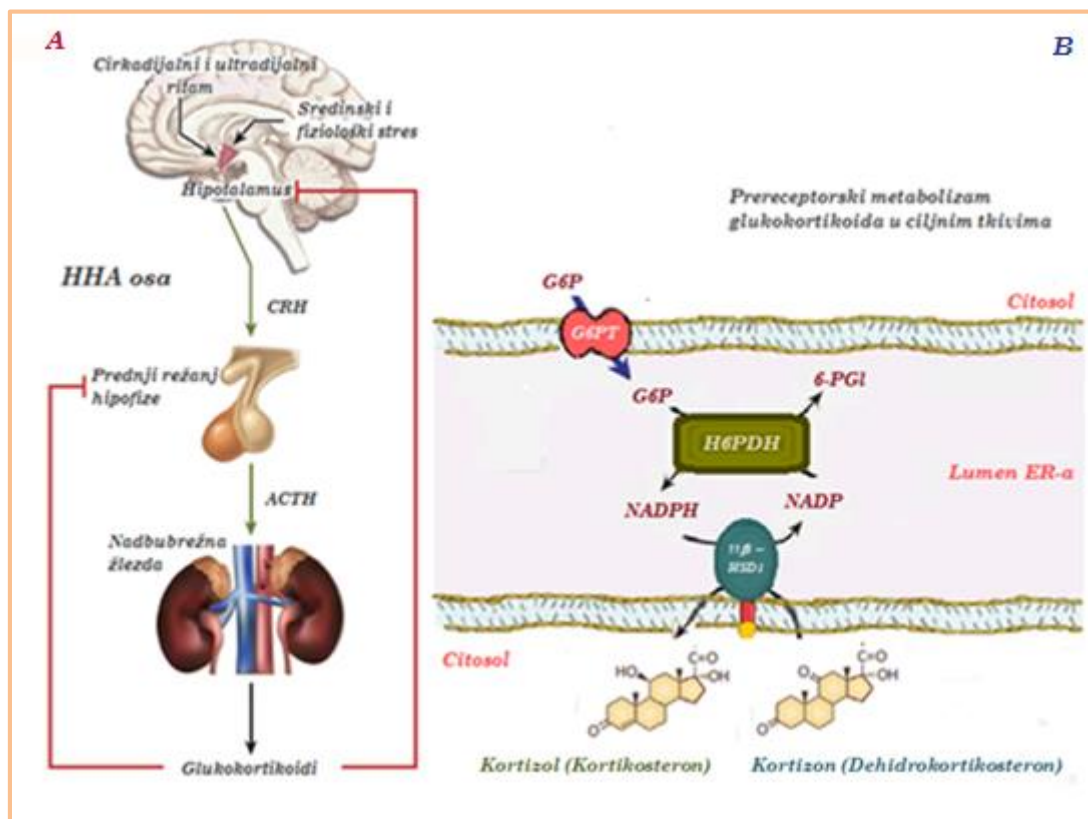
1.2.3 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

Dostupnost bioaktivnih glukokortikoida kontroliše se i u samoj ćeliji, pomoću lokalno eksprimiranih izozima 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (11 β -HSD) 1 i 2 (Kadmiel i Cidlowski 2013; Oakley i Cidlowski 2013). Izozimi 11 β -HSD su proizvodi ekspresije dva različita gena i imaju različite tkivne distribucije (Wang 2005). Sa aspekta gojaznosti i metaboličkih poremećaja 11 β -HSD1 izozim je značajniji, s obzirom da se između ostalih eksprimira i u masnom tkivu i jetri kao metabolički aktivnim tkivima, ali i u mozgu, kao

centralnom kontroloru metabolizma (Wang 2005). Neuravnoteženi nivoi glukokortikoida u pomenutim ciljnim tkivima, zbog njihove pojačane prereceptorske aktivacije se, naime, smatraju važnim činiocima metaboličkih poremećaja (Wang 2005; Gathercole i Stewart 2010; Czegle i sar. 2012). Skorašnje kliničke studije su pokazale povećanu ekspresiju 11 β -HSD1 u masnom tkivu obolelih od PCOS i ukazale da je izmenjena funkcija ovog enzima vezana za metaboličke probleme povezane sa PCOS-om (Mlinar i sar. 2011).

11 β -HSD1 je smešten na membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER) sa katalitičkim domenom orijentisanim ka njegovom lumenu. Ovaj enzim deluje bidirekciono, ponašajući se ili kao oksidoreduktaza, ili kao dehidrogenaza. Svojom reduktaznom aktivnošću, 11 β -HSD1 dovodi do prevođenja neaktivnih (kortizon, kod ljudi; dehidrokortikosteron, kod pacova) u aktivne forme glukokortikoida (kortizol, kod ljudi; kortikosteron kod pacova) (Gathercole i Stewart 2010). Smer delovanja ovog enzima zavisi od dostupnosti redukovane forme kofaktora nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u lumenu ER-a, generalno vezane za fiziološki status odgovarajućih ćelija. NADPH iz odgovarajuće oksidovane forme - NADP⁺ svojim delovanjem generiše enzim heksozo-6-fosfat dehidrogenaza (H6PDH, od eng. *hexoso-6-phosphate dehydrogenase*), kao glavni koenzim 11 β -HSD1 (Gathercole i Stewart 2010; Czegle i sar. 2012). 11 β -HSD1 i H6PDH povezani su ne samo funkcionalno već i fizički, a H6PDH je enzim čija je bazična funkcija katalizovanje prva dva koraka puta pentozo-fosfata, tj. nastanak 6 - fosfoglukonata (6-PG1, od eng. *6-phosphogluconate*) iz glukozo-6-fosfata (G6P, od eng. *glucoso-6-phosphate*), pri čemu se NADP⁺ redukuje do NADPH. Dostupnost supstrata i specifičnost H6PDH obezbeđuje transporter G6P-a (G6PT, od eng. *glucose-6-phosphate transporter*), protein smešten na membrani ER-a. 11 β -HSD1 se čak smatra komponentom kompleksnog sistema, odnosno trijade sa H6PDH i G6PT-om u adipocitima, hepatocitima i u još nekoliko drugih tipova ćelija, koja omogućava redukciju neaktivnih u

aktivne forme glukokortikoida u inače oksidujućoj sredini lumena ER-a (Czegle i sar. 2012) (**Slika 1.6B**).



Slika 1.6. Negativna povratna sprega u funkcionisanju HHA ose (A) i prereceptorski metabolizam glukokortikoida pomoću 11β-HSD1-H6PDH-G6PT trijade u jetri, masnom tkivu i mozgu (B). Prilagođeno iz Oakley i Cidlowski (2013) i sa <http://phmd.pl>

1.2.4 Mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona

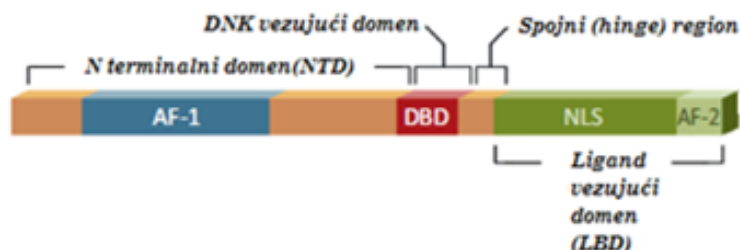
Glukokortikoidi svoja dejstva na ćelijskom nivou ostvaruju posredstvom glukokortikoidnog receptora (GR), proteina koji pripada superfamiliji jedarnih receptora – transkripcionih regulatora zajedno sa drugim steroidnim receptorima, tiroidnim i receptorom retinoične kiseline. GR funkcioniše kao ligand-zavisni transkripcioni regulator koji reguliše ekspresiju odgovarajućih gena pozitivno, ili negativno (Nicolaidis i sar. 2010).

U odsustvu hormona, GR je predominantno smešten u citoplazmi, kao deo multiproteinskog kompleksa sa proteinima toplotnog šoka (Hsp, od eng. *heat shock proteins*) 90, 70, p23 i imunofilinima iz familije FK506 (FKBP51 i FKBP52). Ovi proteini održavaju GR u konformaciji koja je transkripciono neaktivna, ali ima visok afinitet za vezivanje hormona. Posle vezivanja glukokortikoida, GR prolazi kroz konformacionu promenu, koja rezultuje disocijacijom iz proteinskog kompleksa sa šaperonima i strukturnim rearanžmanima koji dovode do brzog premeštanja receptora u jedro kroz jedarne pore (Oakley i Cidlowski 2013).

U jedru GR može samostalno da reguliše transkripciju sa promotora koji sadrže regulatorne sekvence DNK koje odgovaraju na glukokortikoide (GRE, od eng. *glucocorticoid response elements*), formiranjem dimera i direktnim vezivanjem za DNK, ali može i da ostvaruje protein-protein interakcije sa drugim transkripcionim regulatorima i tako utiče na transkripciju gena (Nicolaidis i sar. 2010; Rose i sar. 2010; Kadmiel i Cidlowski 2013). Pri tome može indukovati kako transaktivaciju, tako i transrepresiju transkripcije sa odgovarajućih promotora (Kadmiel i Cidlowski 2013).

GR je modularni protein sačinjen iz transaktivacionog domena smeštenog na njegovom N-kraju (NTD, od eng. *N-terminal transactivation domain*), centralnog domena za vezivanje za DNK (DBD, od eng. *DNA binding domain*) koji u svojoj strukturi sadrži dva motiva Zn^{2+} prstiju i C-terminalnog domena za vezivanje hormona (LBD, od eng. *ligand-binding domain*), dok se fleksibilni spojni region nalazi između DBD-a i LBD-a. NTD ima snažnu funkciju aktivacije transkripcije (AF-1, od eng. *activation function-1*), koja omogućava regrutovanje transkripcionih koregulatora i transkripcione mašinerije. Posle vezivanja hormona, druga funkcija aktivacije (AF-2 od eng. *activation function-2*), locirana u LBD-u ostvaruje interakciju sa koregulatorima. Na granici između DBD i spojnog, i u LBD regionu smešteni su signali za lokalizaciju u jedro (NLS, od eng. *nuclear*

localization signal), koji omogućavaju translokaciju receptora u nukleus, mehanizmom zavisnim od importina (Kadmiel i Cidlowski 2013) (**Slika 1.7**).



Slika 1.7. Šematski prikaz domena glukokortikoidnog receptora (GR). Prilagođeno iz Kadmiel i Cidlowski (2013).

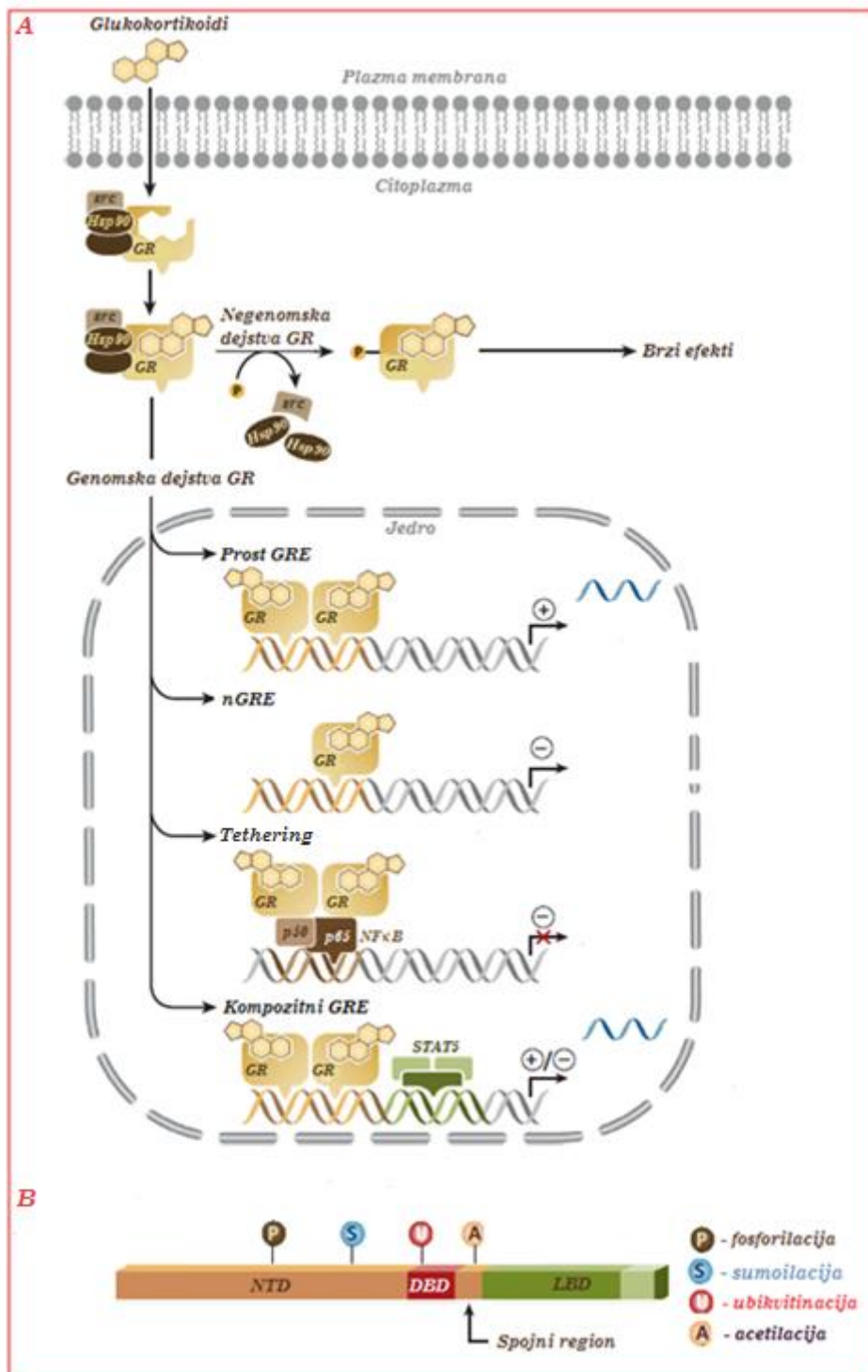
GR je produkt gena NR3C1 koji podleže alternativnoj obradi, pre svega alternativnom isecanju primarnog transkripta, kao i alternativnoj inicijaciji transkripcije i translacije, tako da postoji veliki broj strukturno i funkcionalno različitih izoformi ovog receptora. Široka distribucija transkripcionih i translacionih izoformi GR-a omogućava fino podešavanje signala koje on prenosi, na bazi relativne dostupnosti pojedinih varijanti ovog receptora u odgovarajućem tipu ćelija ili tkiva. Diverzitet u signalima koje daje GR uspostavlja se i korišćenjem različitih varijanti GRE. Postoje, naime, tzv. prosti GRE, posle čijeg vezivanja GR regrutuje koaktivatore i odgovarajuće komplekse za remodelovanje hromatina, aktivirajući ili inhibirajući transkripciju. Druga varijanta regulacije genske ekspresije od strane GR je vezivanje za tzv. kompozitne GRE, pri čemu ciljni gen zapravo, pored GRE ima sekvence za koje se vezuju drugi transkripcioni faktori (Kadmiel i Cidlowski 2013; Oakley i Cidlowski 2013). GR može i indirektno da reguliše transkripciju vezivanjem (eng. *tethering*) za druge transkripcione regulatore vezane za DNK. Nivoi transkripcije odgovarajućih gena pri interakcijama GR sa drugim transkripcionim regulatorima može da se poveća, kao na primer u slučaju vezivanja prenosnika signala i aktivatora transkripcije (STAT, od eng. *signal transducers and activators of*

transcription) tipa 3 (STAT3) ili interakcije sa STAT5 na kompozitnoj GRE sekvenci. Sa druge strane, vezivanje jedarnog faktora κB (NF κB , od eng. *nuclear factor κB*) kao i interakcija sa AP1 (od eng. *activating protein 1*) na odgovarajućem kompozitnom GRE smanjuje nivo transkripcije odgovarajućih gena i predstavlja osnovni mehanizam klasične antiinflamatorne funkcije glukokortikoida (Oakley i Cidlowski 2013). Ranije je preovladavalo mišljenje da je ovakva interakcija primarna varijanta represije transkripcije od strane GR, ali se danas zna da se represija transkripcije prevashodno ostvaruje na direktan način, vezivanjem GR-a za tzv. negativne GRE sekvence (Corbould i sar. 2005) u promotorima ciljnih gena. Posle vezivanja za ove sekvence GR regrutuje transkripcione korepresore i dezacetilaze histona i tako dovodi do smanjenja nivoa transkripcije odgovarajućih gena. Otkriveno je da i same GRE sekvence mogu da spreče ili podstaknu dimerizaciju GR-a i alosterički modulišu strukturu i transkripcionu aktivnost receptora i tako utiču na njegovu funkciju i aktivnost (Rose i sar. 2010; Kadmiel i Cidlowski 2013).

Funkcija GR-a može se regulisati i višestrukim posttranslacionim modifikacijama receptora, uključujući fosforilaciju, acetilaciju, ubikvitinaciju i sumoilaciju (Rose i sar. 2010). Fosforilacija se najčešće dešava pri aktivaciji receptora posle vezivanja hormona, acetilacija je povezana sa dejstvima GR na inflamatorne procese, dok su njegova ubikvitinacija i sumoilacija važne za usmeravanje GR-a ka degradaciji (Kadmiel i Cidlowski 2013).

Glukokortikoidi neke svoje efekte mogu ostvariti brzim, nengenomskim mehanizmima, koji se ostvaruju u roku od nekoliko minuta, za razliku od klasičnih, genomskih kojima je za ostvarivanje obično potrebno nekoliko sati. Ovi efekti se postižu aktivacijom signalnih puteva protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, od eng. *mitogen-activated protein kinases*), fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K, od eng. *phosphoinositol-3-kinase*), ili protein kinaze B (PKB) od strane citoplazmatičnog, ili GR-a vezanog za ćelijsku ili membranu mitohondrija. Nengenomski efekti glukokortikoida do sada su registrovani u kardiovaskularnom, imunskom i neuroendokrinom sistemu, a posreduju i u

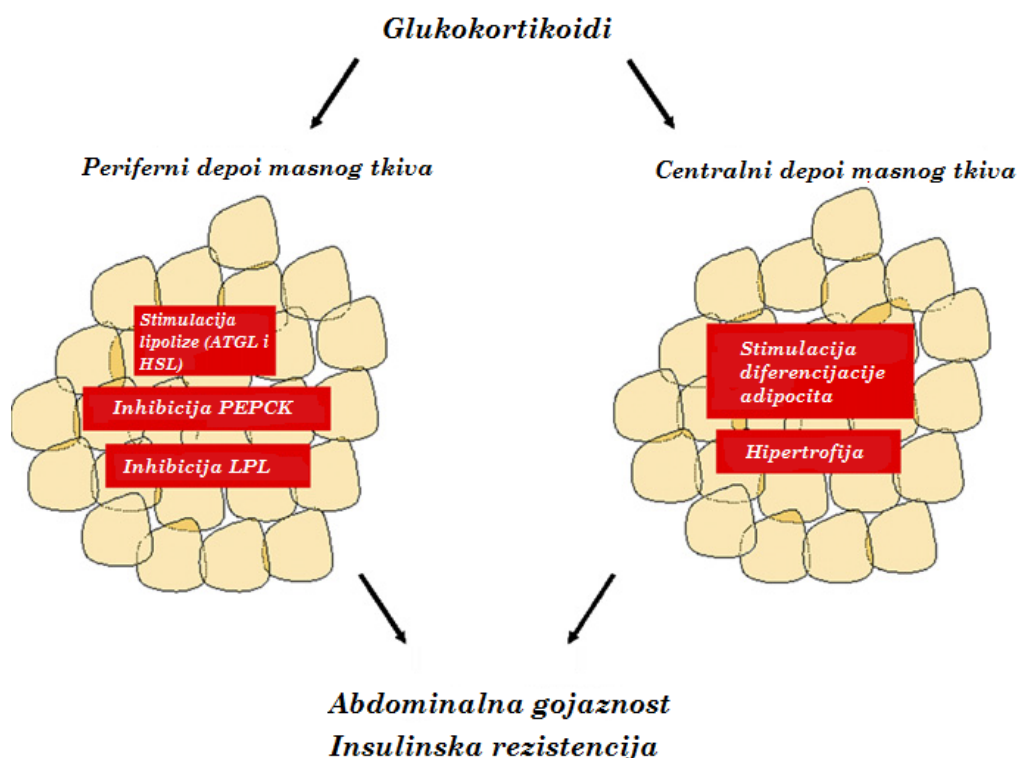
nekim važnim fiziološkim funkcijama, kao što je antiinflamatorno smanjenje oslobađanja arahidonske kiseline (Rose i sar. 2010; Kadmiel i Cidlowski 2013) (*Slika 1.8*).



Slika 1.8. Mehanizmi delovanja glukokortikoidnih hormona (A) i mesta posttranslacionih modifikacija GR-a (B). Prilagođeno iz Kadmiel i Cidlowski (2013).

1.3 Metabolizam lipida u masnom tkivu: uloge glukokortikoida

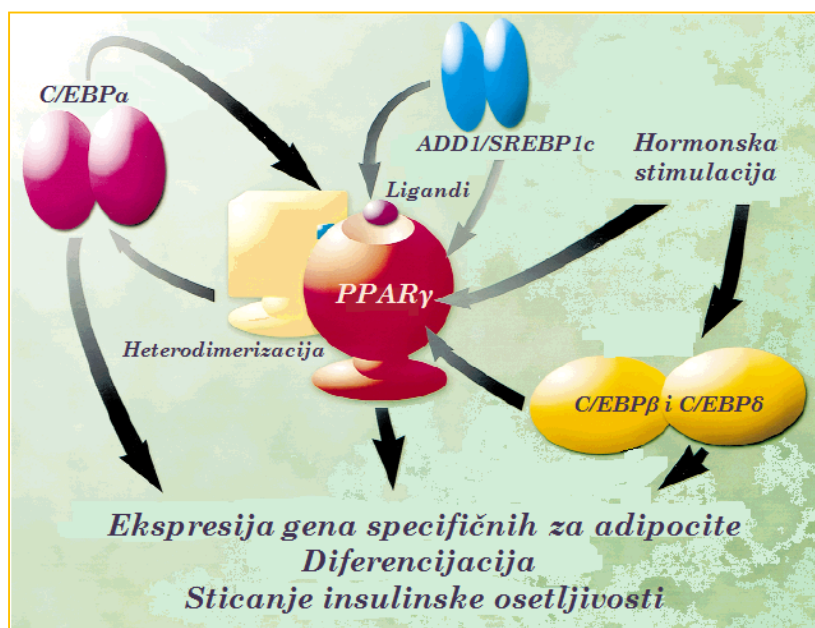
Formiranje i ekspanzija belog masnog tkiva ostvaruje se zahvaljujući procesima diferencijacije preadipocita u adipocyte – adipogeneze i sinteze masnih kiselina i triglicerida – lipogeneze. Posle dostizanja granice širenja odgovarajućih depoa masnog tkiva u njihovim delovima može preovladati razlaganje triglicerida kroz kontrolisani proces lipolize (Farmer 2006; Mandard i Kersten 2006; Lee i sar. 2013). Glukokortikoidi su u subkutanom i visceralnom masnom tkivu uključeni u regulaciju svih tih procesa (Peckett i sar. 2011; Patel i sar. 2014). Efekat njihovog dejstva, pri tome, zavisi od konkretnog depoa belog masnog tkiva u kome deluju (Vegiopoulos i Herzig 2007; Lee i sar. 2014) (***Slika 1.9***), ali divergira i u pojedinim segmentima istog tkiva, pošto je ono sačinjeno iz populacija adipocita u raznim fazama diferencijacije, koje različito reaguju na glukokortikoide. Ovi hormoni, naime, stimulišu adipogenezu, a posle završetka diferencijacije i lipogenezu da bi u zrelim i uvećanim adipocitima imali primarno lipolitičke efekte (Ayala-Summano i sar. 2013). U perifernim depovima belog masnog tkiva, ovi hormoni mahom stimulišu katabolizam lipida, dok, sa druge strane, u visceralnom masnom tkivu hronični višak glukokortikoida ima prevashodno anaboličke efekte (Vegiopoulos i Herzig 2007). Efekti glukokortikoida u različitim depovima masnog tkiva nisu do kraja objašnjeni, ali je pokazano da je ekspresija GR-a veća u visceralnom nego u subkutanom masnom tkivu (Geer i sar. 2014), što predstavlja potencijalan razlog uspostavljanja abdominalne gojaznosti u situaciji hroničnog lokalnog viška ovih hormona i posledičnih metaboličkih poremećaja.



Slika 1.9. Diferencijalni efekti glukokortikoida u različitim depovima masnog tkiva u nastanku abdominalne gojaznosti i insulinske rezistencije. Prilagođeno iz Vegiopoulos i Herzig (2007).

Uticaj glukokortikoida na diferencijaciju i sazrevanje adipocita, odnosno na uspostavljanje fenotipa zrelog adipocita omogućen je zahvaljujući njihovom delovanju na ekspresiju transkripcionih regulatora adipogeneze i lipogeneze (Ayala-Summano i sar. 2013; Patel i sar. 2014). Proadipogeni regulatori transkripcije, naime, formiraju mrežu, čije glavne članove predstavljaju proteini koji se vezuju za pojačivač CCAAT (C/EBP β , δ i α , od eng. *CCAAT/enhancer binding proteins* β , δ , α) i izoforma γ receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PPAR, od eng. *peroxisome proliferator-activated receptor*) (Rosen i sar. 2000; Farmer 2006), koja omogućava aktivaciju ili povećanje nivoa ekspresije velikog broja gena tokom adipogeneze (**Slika 1.10**). PPAR γ je ključni proadipogeni faktor, jer je utvrđeno da su preadipociti bez njega potpuno nesposobni da uspostave bilo koji poznati

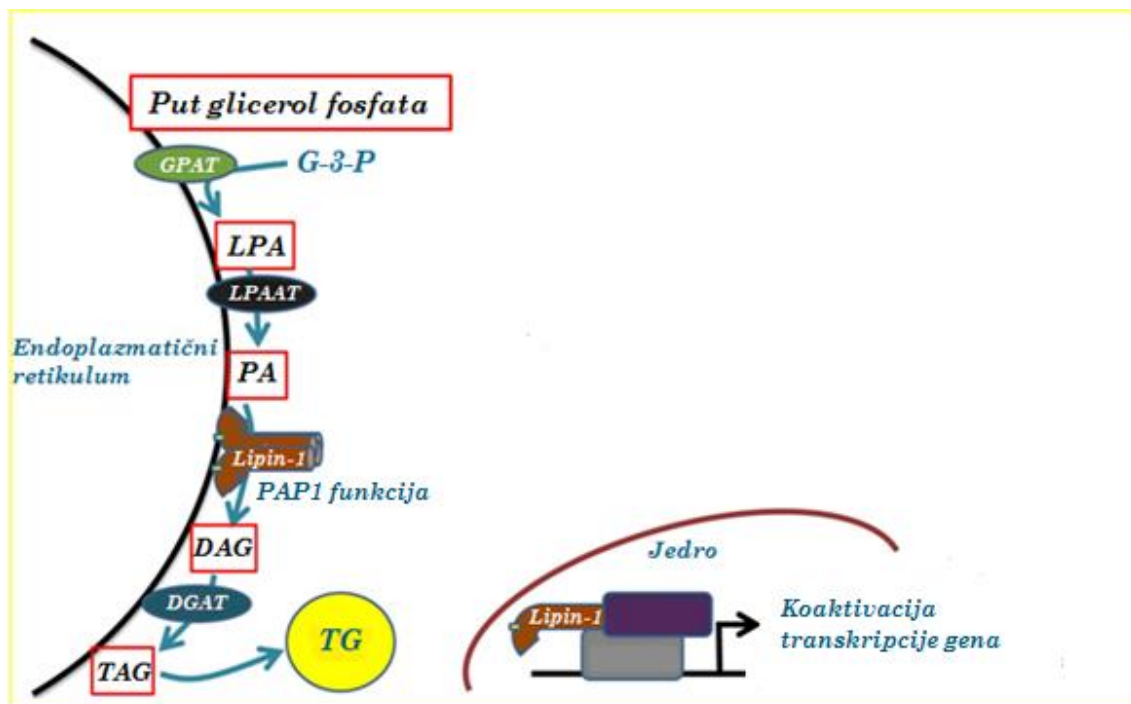
aspekt fenotipa zrelih masnih ćelija (Rosen i sar. 2000), a njegova aktivnost je neophodna i posle terminalne diferencijacije preadipocita u adipocite, za njihovo preživljavanje i odvijanje lipogeneze (Mandard i Kersten 2006). PPAR γ je predstavnik superfamilije jedarnih receptora, koji se vezuje za odgovarajuće promotore u formi heterodimera sa drugim jedarnim receptorima (Rosen i sar. 2000). U pomenutoj mreži transkripcionih regulatora ekspresiju gena za PPAR γ direktno stimulišu C/EBP β i δ , a on zatim povećava ekspresiju C/EBP α , koji ima pozitivan uticaj na nivo ekspresije PPAR γ . Uspostavljanje pomenute mreže i održavanje neophodnog nivoa PPAR γ čitavim tokom adipogeneze ostvaruje se pod sinergističkim hormonskim dejstvom glukokortikoida i insulina (Rosen i sar. 2000; Farmer 2006) (**Slika 1.10**). Modulacija aktivnosti PPAR γ ostvaruje se preko specifičnog liganda – masne kiseline u čiju sintezu je uključen faktor determinacije i diferencijacije adipocita 1/ protein koji se vezuje za elemente regulisane sterolom tipa 1c, (ADD1/SREBP-1c, od eng. *adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c*) (Rosen i sar. 2000), čiju ekspresiju glukokortikoidi takođe promovišu (Ayala-Summano i sar. 2013). ADD1/SREBP-1c pripada familiji transkripcionih regulatora sa motivom spirala-zavoj-spirala (Amemiya - Kudo i sar. 2002), a osim ekspresije PPAR γ (Fajas i sar. 1999; Farmer 2006; Mandard i Kersten 2006), stimuliše i ekspresiju gena za centralne enzime *de novo* lipogeneze – sintazu masnih kiselina (FAS, od eng. *fatty acid synthase*) i acetil koenzim A karboksilazu (ACC, od eng. *acetyl CoA carboxilase*) (Amemiya-Kudo i sar. 2002; Farmer 2006).



Slika 1.10. Mreža centralnih proadipogenih/prolipogenih faktora. Prilagođeno iz Rosen, Walkey i sar. (2000).

Još jedan bitan proadipogeni/prolipogeni faktor čija je ekspresija pod direktnom kontrolom glukokortikoida je protein lipin-1 (Reue i Brindley 2008). Aktivnost lipina-1 kao transkripcionog koaktivatora neophodna je za normalnu ekspresiju adipogenih transkripcionih faktora C/EBPα i PPARγ (Zhang i sar. 2008a), pa mu se pridaje velika važnost u uspostavljanju proadipogenog programa rano tokom diferencijacije preadipocita u adipocyte (Reue i Zhang 2008) (**Slika 1.11**). Lipin-1 može, međutim, imati i ulogu transkripcionog koaktivatora gena koji kodiraju enzime uključene u β-oksidaciju masnih kiselina u hepatocitima, ali postoje podaci koji ukazuju da u zrelim adipocitima moduliše transkripciju gena uključenih u *de novo* lipogenezu (Reue i Zhang 2008) (**Slika 1.11**). Kod transgenih miševa sa selektivno povišenom ekspresijom lipina 1 specifičnog za adipocyte pokazana je, naime, povišena ekspresija gena uključenih u *de novo* lipogenezu, uključujući i FAS, ACC i diacilglicerol aciltransferazu (DGAT) (Reue i Zhang 2008). Sa aspekta sinteze triglicerida i uvećanja lipidnih kapi prvenstveno je, ipak, važna njegova enzimska funkcija, jer, kao fosfatidat fosfataza 1 (PAP1, od eng. *phosphatidate phosphatase 1*)

privremeno lokalizovana na membrani endoplazmatičnog retikuluma, učestvuje u *de novo* sintezi triacilglicerola (TAG) katalizujući konverziju fosfatidata u prekursora ovih lipida, diacilglicerol (DAG) (Carman i Han 2006; Reue i Zhang 2008) (**Slika 1.11**). Utvrđeno je da prekomerna ekspresija gena koji kodira lipin-1 (*Lpin1*) promoviše gojaznost i pojačava insulinsku rezistenciju u mišićima, ali je smanjuje u masnom tkivu, podsticanjem ekspresije transportera glukoze tipa 4 (GLUT4, od eng. *glucose transporter 4*) i transporta glukoze u adipocyte (Phan i Reue 2005; Carman i Han 2006; Reue i Brindley 2008). Lipin-1 može i da spreči ektopično nagomilavanje masti u perifernim tkivima i smanji lipotoksičnost pozitivnim uticajem na preferencijalno skladištenje lipida u masnom tkivu (Reue i Brindley 2008). Zahvaljujući prisustvu GRE u promotoru *Lpin-1* gena, povišena aktivnost glukokortikoida dovodi do povećanja ekspresije ovog gena, nivoa samog lipina-1 i njegove PAP-1 aktivnosti (Reue i Brindley 2008) i, u krajnjoj liniji, pospešivanja rasta lipidnih kapi posle završetka terminalne diferencijacije preadipocita u adipocyte.



Slika 1.11. Dvostruka funkcija lipina-1.

U putu glicerol fosfata Lipin-1 defosforiliše fosfatidat (**PA**), pri čemu nastaje **DAG**, koji se dejstvom **DGAT** transformiše u odgovarajući **TAG** za put triglicerida u lipidnim kapima (Livak i Schmittgen 2001). Legenda: **G-3-P** – glicerol-3-fosfat, **GPAT** - aciltransferaza glicerol fosfata, **LPA** – lipofosfatidat (od eng. *lypophosphatidate*), **LPAAT** - aciltransferaza lipofosfatidata (od eng. *lypophosphatidate acyltransferase*).

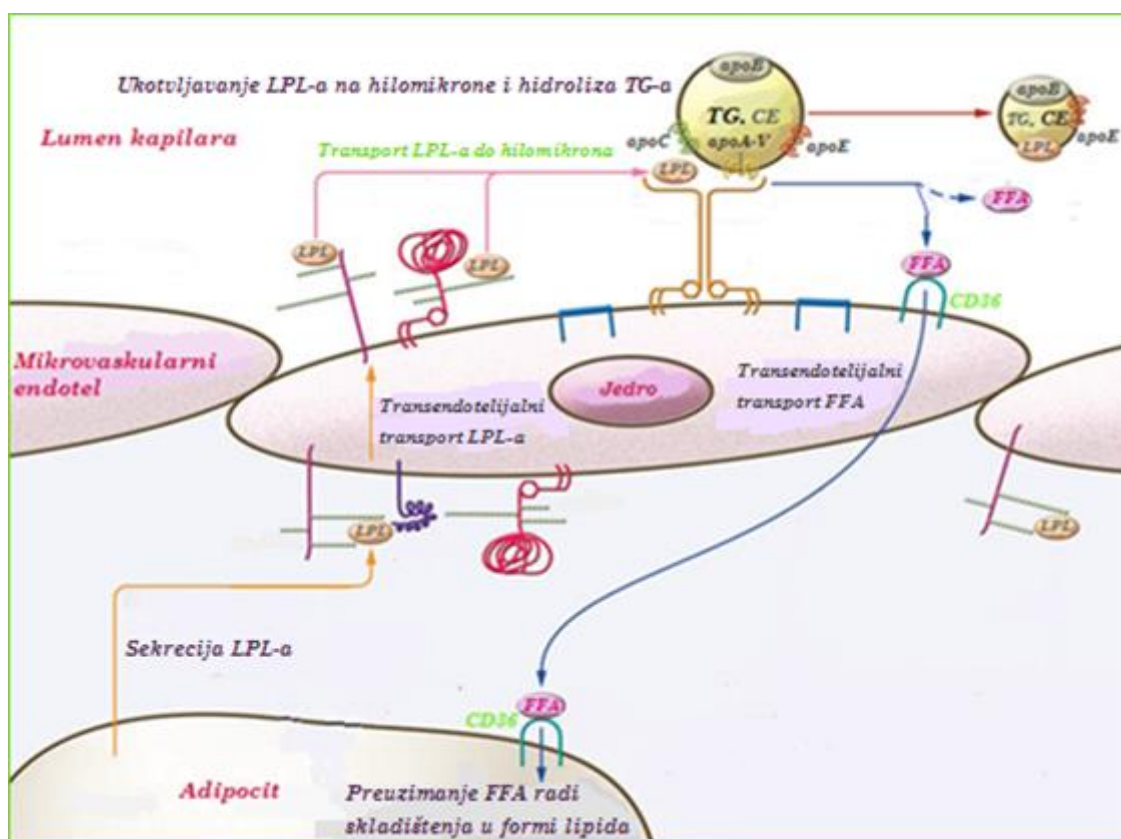
Preuzeto i prilagođeno sa : <http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/lipins/index.htm>.

Kvalitet efekata glukokortikoida na lipogenezu u principu zavisi od fiziološkog stanja organizma i prisustva drugih hormona, pa tako u bazalnim i stanjima smanjenog unosa energije, oni inhibiraju lipogenezu i unos FFA u adipocyte, dok u stanjima povećanog energetskeg balansa i u prisustvu insulina povećavaju *de novo* lipogenezu, uljučujući i ekspresiju ključnih enzima ovog procesa, FAS i ACC (Lee i sar. 2014). Glukokortikoidi u takvim uslovima mogu posredno podsticati lipogenezu i kroz stimulaciju gliceroneogeneze u visceralnom masnom tkivu. U tom depou masnog tkiva oni, naime, podstiču ekspresiju gena za fosfoenolpiruvat karboksikinazu (PEPCK, od eng. *phosphoenolpyruvate carboxikinase*), enzim koji katalizuje transformaciju oksaloacetata u fosfoenolpiruvat tokom gliceroneogeneze (Lee i sar. 2014).

Trigliceridi uskladišteni u lipidnim kapima su sačinjeni od tri masne kiseline vezane za glicerolsku kičmu. Uklanjanjem jedne masne kiseline sa glicerola TAG se konvertuje u DAG, a hidrolizom druge masne kiseline formira se poslednji, monoaciliglicerolski (MAG) intermedijer. Enzimi koji katalizuju razlaganje TG do njihovih bazičnih komponenti označeni su kao lipaze (Peckett i sar. 2011). Hidrolitičku konverziju TAG u DAG predominantno vrši lipaza triglicerida masnog tkiva (ATGL, od eng. *adipose triglyceride lipase*), mada to u mnogo manjoj meri može ostvarivati i lipaza osetljiva na hormone (HSL, od eng. *hormone sensitive lipase*), čija je glavna uloga, ipak, hidroliza DAG u MAG. U bazalnom stanju, HSL se nalazi u citoplazmi i ima veoma malo učešće u lipolizi, da bi odgovarajuća stimulacija dovela do njenog smeštanja na lipidnu kap i značajnog povećanja lipolitičke aktivnosti. Poslednji korak lipolize – konverziju MAG do glicerola i treće masne kiseline katalizuje enzim monoacil glicerol lipaza (Peckett i sar. 2011). Glukokortikoidi modifikuju aktivnosti ATGL i HSL, pri čemu povećavaju nivoe odgovarajućih iRNK pri stimulaciji lipolize u masnom tkivu, ali mogu delovati i posttranskripciono, povećavajući nivoe odgovarajućih proteina (Vegiopoulos i Herzig 2007; Xu i sar. 2009). Stimulaciju lipolize glukokortikoidi mogu ostvarivati i posrednim podsticanjem translokacije HSL-a na lipidne kapi i pozitivnom regulacijom signalnog puta kateholamina, mada takvi efekti nisu sasvim istraženi (Xu i sar. 2009; Peckett i sar. 2011; Lee i sar. 2014).

Adipociti belog masnog tkiva sintetišu i luče i lipazu lipoproteina (LPL, od eng. *lipoprotein lipase*), enzim koji transendotelijalnim transportom dospeva u lumen mikrovaskulature masnog tkiva i tamo vrši oslobađanje i razlaganje triglicerida prisutnih u hilomikronima ili VLDL česticama (ili kompleksima). Pri tome dolazi do oslobađanja FFA koje onda mogu biti iskorišćene lokalno od strane samih adipocita, ili dospeti u sistemski krvotok (Williams 2008) (**Slika 1.12**). Najbolje okarakterisanu varijantu translokacije FFA u adipocite radi skladištenja u formi lipida vrši transmembranski transporter, klaster diferencijacije 36 (CD36, od eng.

cluster of differentiation 36). Diferencijalna regulacija LPL-a u masnom tkivu i poprečno prugastim mišićima u principu omogućava skladištenje lipida u masnom tkivu u stanjima pozitivnog energetskeg balansa i preusmeravanje triglicerida u mišiće radi korišćenja tokom fizičke aktivnosti ili u stanjima negativnog energetskeg balansa (Williams 2008; Goldberg i sar. 2009).



Slika 1.12. Funkcija LPL-a i CD36 u masnom tkivu. Oznake: *apo* – apolipoproteini, *TG* - trigliceridi, *CE* - ceramid. *Prilagođeno iz Williams (2008).*

Glukokortikoidi povećavaju ekspresiju gena za LPL u visceralnom masnom tkivu, ali imaju suprotne efekte u perifernim depovima belog masnog tkiva (Vegiopoulos i Herzig 2007; Lee i sar. 2014), što je jedna od specifičnosti koja im omogućava da doprinose povećanju FFA u cirkulaciji bez obzira na hipertrofiju visceralnih adipocita. Glukokortikoidi imaju i transrepresivni efekat na ekspresiju CD36 u masnom tkivu (Patel i sar. 2014; Stechschulte i sar. 2014).

1.4 Glukokortikoidi i metabolička inflamacija u visceralnom masnom tkivu

Adipociti i makrofagi masnog tkiva sekretuju i brojne proinflamatorne citokine i adipokine, kao što su interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), faktor nekroze tumora α (TNF α , od eng. *tumor necrosis factor-alpha*) i leptin, proteine akutno-faznog odgovora i faktore, kao što su FFA, koji dovode do razvoja sistemske inflamacije i insulinske rezistencije (Tchernof i Despres 2013). Disfunkcionalno masno tkivo u gojznosti pojačano luči proinflamatorne molekule i citokine, dok je lučenje antiinflamatornih citokina, kao što je adiponektin smanjeno (Lee i sar. 2013; Tchernof i Despres 2013). Glukokortikoidi na sekreciju proinflamatornih činilaca u masnom tkivu deluju u skladu sa njihovim generalnim antiinflamatornim efektima, smanjujući ekspresiju proinflamatornih citokina, dok sa druge strane povećavaju ekspresiju molekula uključenih u akutno-fazne odgovore i ćelijsku imunost. Najčešći mehanizam antiinflamatornog dejstva glukokortikoida u masnom tkivu odvija se putem interakcije GR-a sa NF κ B (Lee i sar. 2014) (**Slika 1.8**). U gojznosti, u hipertrofiranom masnom tkivu, uočen je i recipročni efekat proinflamatornih citokina TNF α i IL-1 β na glukokortikoide, kroz stimulaciju ekspresije gena za 11 β -HSD1 od strane tih citokina (Staab i Maser 2010).

Glukokortikoidni hormoni mogu delovati stimulatorno na lučenje nekih proinflamatornih citokina. Sa aspekta gojznosti i metaboličkih bolesti, naročito je u tom smislu interestantan faktor koji inhibira migraciju makrofaga (MIF, od eng. *macrophage migration inhibitory factor*), koji deluje antagonistički sa glukokortikoidima, smanjujući osetljivost tkiva na njihova dejstva (Aeberli i sar. 2006). MIF, zapravo, povećava ekspresiju gena koje GR inhibira i smanjuje ekspresiju gena stimulisanih od strane GR-a (Aeberli i sar. 2006). Na taj način, MIF može da dovede do prevazilaženja antiinflamatornih tkivnih efekata glukokortikoida (Staab i Maser 2010), pri čemu oni, naizgled paradoksalno, stimulišu njegovu sintezu. Smatra se da je

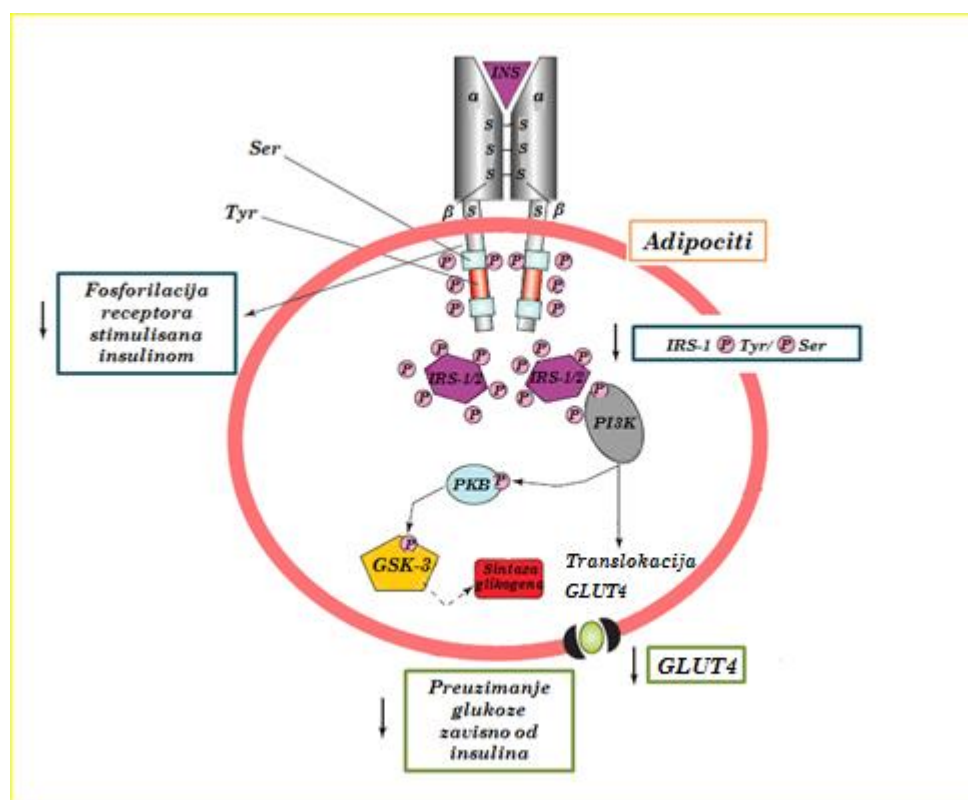
fiziološka uloga ovakvog odnosa između MIF-a i glukokortikoida zapravo održavanje normalne funkcionalnosti imunskog sistema u miljeu u kome su glukokortikoidi stalno prisutni, kao hormoni neophodni za normalno funkcionisanje organizma (Aeberli i sar. 2006). Utvrđeno je da ekspresija MIF-a pozitivno koreliše sa veličinom adipocita u gojaznosti (Staab i Maser 2010).

1.5 Signalni putevi insulina i razvoj insulinske rezistencije: uloga glukokortikoida

Rezistencija na insulin je na molekularnom nivou posredovana poremećajima insulinskog signalnog puta u njegovim perifernim ciljnim tkivima. U ćelijama tih tkiva dolazi do uspostavljanja različitih, tkivno specifičnih obrazaca posttranslacionih modifikacija komponenti tog signalnog puta, koje na kraju dovode do smanjenja signalne transdukcije posredovane insulinskim receptorom i periferne insulinske rezistencije (Diamanti - Kandarakis i Papavassiliou 2006). Signalni put insulina započinje vezivanjem ovog hormona za odgovarajući receptor na površini ćelije. Receptor za insulin (IR, od eng. *insulin receptor*) je heterotetramer sačinjen iz dva α - β dimera međusobno povezanih bisulfidnim mostovima. Domen za vezivanje liganda nalazi se u α subjedinicama IR koje su smeštene van ćelije. Sa druge strane, unutarćelijski deo β -subjedinice ima aktivnost kinaze tirozina, koja se aktivira posle vezivanja insulina za IR i dalje autofosforiliše ostatke tirozina na β -subjedinici. To rezultuje fosforilacijom molekula supstrata insulinskog receptora (IRS, od eng. *insulin receptor substrate*), privremeno vezanih za aktivirani IR. Fosforilisani delovi IRS-ova služe kao mesta ukotvljavanja proteina koji sadrže domene homologe proteinu Src 2 (SH2, od eng. *Src homology 2*), kao što je fosfoinozitol-3-kinaza (PI3K, od eng. *phosphoinositide-3-kinase*). Aktivacija ovih proteina dovodi do fosforilacije protein kinaze B (PKB), koja fosforiliše kinazu sintaze glikogena tipa 3 (GSK-3, od eng. *glycogen synthase kinase-3*). Ona, konačno, aktivira

sintezu glikogena u ciljnim ćelijama delujući na odgovarajuću sintazu. Aktivacija PI3K dovodi i do translokacije transportera GLUT4 na membranu i povećanja preuzimanja glukoze u ciljne ćelije (Dunaif 1997; Venkatesan i sar. 2001).

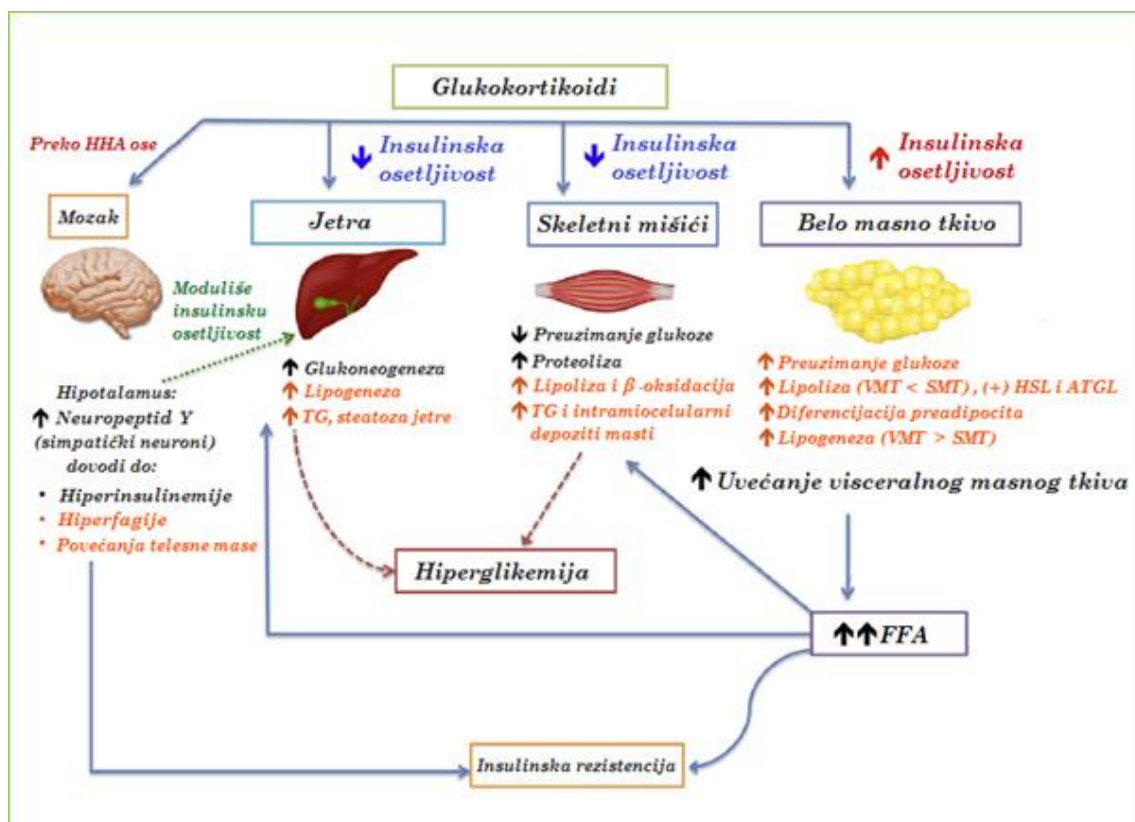
U adipocitima žena sa PCOS-om do sada je pokazano postojanje poremećaja signalnog puta insulina: smanjenjem nivoa autofosforilacije IR, umanjenim preuzimanjem glukoze preko GLUT4 zbog inhibicije njegove ekspresije i smanjenjem aktivirajućih (na Tyr), odnosno povećanjem inhibitornih fosforilacija (na Ser) na molekulima IRS-1 (Chu i sar. 2004; Diamanti-Kandarakis i Papavassiliou 2006) (*Slika 1.13*).



Slika 1.13. Mogući poremećaji signalnog puta insulina u adipocitima žena obolelih od PCOS-a. Prilagođeno iz Diamanti-Kandarakis i Papavassiliou (2006).

Glukokortikoidi podstiču nastanak insulinske rezistencije na nivou organizma (Geer i sar. 2014), ali imaju i tkivno-specifične efekte na signalni put insulina, odnosno posrednim i neposrednim dejstvima podstiču razvoj tog

poremećaja u jetri i mišićima (Vegiopoulos i Herzig 2007; Geer i sar. 2014; Patel i sar. 2014; Kang i sar. 2015) (**Slika 1.14**). Inhibitorno dejstvo glukokortikoida na signalni put insulina u mišićima i jetri ostvaruje se stimulacijom serin-kinaza i odgovarajućih inhibitornih fosforilacija na IR i IRS-1, što u jetri dovodi do stimulacije glukoneogeneze, dok je u mišićima preuzimanje glukoze smanjeno. Sa druge strane, u adipocitima glukokortikoidi pospešuju signalizaciju insulina na molekularnom nivou pojačavanjem stimulatornih fosforilacija IRS-1 i PKB, odnosno povećanjem ekspresije IR, IRS2 i regulatorne subjediniice PI3K, p85. Pored toga, u masnom tkivu i mišićima glukokortikoidi imaju suprotne efekte na insulinom-posredovano preuzimanje glukoze, tako da u mišićima smanjuju, a u adipocitima povećavaju ekspresiju transportera GLUT4 (Geer i sar. 2014). Mogući dodatni mehanizam povećanja osetljivosti na insulin od strane glukokortikoida u masnom tkivu su njihova antiinflamatorna dejstva kroz smanjenje sekrecije proinflamatornih citokina (Geer i sar. 2014).



Slika 1.14. Tkivno-specifični efekti glukokortikoida na nastanak insulinske rezistencije na nivou organizma. Prilagođeno iz Geer, Islam i sar. 2014.

Glukokortikoidi, dakle, zahvaljujući diferencijalnim efektima na insulinsku osetljivost u različitim ciljnim tkivima ovog hormona mogu dovesti do simultanog uvećanja visceralnog masnog tkiva i povišenih FFA u cirkulaciji i u isti mah pospešiti nastanak hiperglikemije i sistemske insulinske rezistencije (**Slika 1.14**).

1.6 Komunikacija visceralnog masnog tkiva i centralnog nervnog sistema u regulaciji energetskeg metabolizma

Dodatni aspekt uticaja gojaznosti na metaboličke karakteristike, a tako i patofiziologiju i težinu simptoma PCOS-a predstavljaju poremećaji unosa hrane.

U regulaciji unosa hrane, kao važnom aspektu održanja energetske homeostaze, ključnu ulogu ima hipotalamus, pošto u njemu dolazi do integracije perifernih i centralnih signala, tj. odgovarajućih hormona i neuropeptida koji izveštavaju centralni nervni sistem (CNS) o energetskeg statusu organizma. Neuroni uključeni u regulaciju energetske ravnoteže i telesne težine smešteni su, naime, u arkuatnom (ARC, od eng. *arcuate*) i paraventrikularnom (PVN, eng. *paraventricular nucleus*) jedru hipotalamusa, zatim dorzomedijalnim i ventromedijalnim jedrima tog dela mozga, kao i njegovim lateralnim regionima (Simerly 2008). Ukupan unos hrane, u principu, predstavlja rezultat aktivnosti oreksigenih neurona pobrojanih jedara koji ga stimulišu i anoreksigenih neurona koji ga inhibiraju, a zavisi od ravnoteže između odgovarajućih peptida koje ti neuroni sekretuju (Simerly 2008). Najvažnijii oreksigeni peptidi hipotalamusa su neuropeptid Y (NPY, od eng. *neuropeptide Y*) i peptid srodan *Agouti* proteinu (AgRP, od eng. *agouti-related peptide*), dok je glavni anoreksigeni neuropeptid hormon koji stimuliše α -melanocyte (α -MSH, od eng. *α -melanocyte-stimulating hormone*), čiji je AgRP direktni antagonist. α -MSH nastaje u srednjem režnju hipofize kao proizvod tkivno-specifične posttranslacione kontrolisane proteolize proopiomelanokortina (POMC, od eng. *proopiomelanocortin*) (Munzberg i sar. 2005; Yang i Barouch 2007).

Balans između sekrecije oreksigenih i anoreksigenih peptida se uspostavlja na osnovu signala koji pristižu sa periferije (Schwartz i sar. 2000; Korner i sar. 2001). Ti signali mogu biti mehanički, endokrini, nervni i metabolički i prenose u CNS informacije o unosu i razgradnji hranljivih

sastojaka. Ulazak hrane u želudac i crevo je glavni mehanički signal, jer rasteže ove organe i tako aktivira receptore koji prenose odgovarajuću informaciju u mozak. Osim toga, gastrointestinalni hormoni holecistokinin, amilin, peptid YY, apolipoprotein A-IV, i glukagonu-sličan peptid-1 luče se u crevu nakon obroka i predstavljaju važne kratkoročne signale sitosti. Signali ovog tipa su i glukoza, slobodne masne kiseline i aminokiseline (Byun i sar. 2011). Hormoni čija je uloga u dugoročnoj regulaciji telesne težine i ishrane najvažnija su insulin, leptin i grelin (Hosoda i sar. 2002; Simerly 2008), ali su u tom smislu bitna i direktna i indirektna dejstva glukokortikoidnih hormona na ciljna tkiva insulina (Oakley i Cidlowski 2013). Masno tkivo predstavlja posebno važan organ sa aspekta dugoročne kontrole unosa hrane i potrošnje energije, jer luči peptidne hormone i bioaktivne molekule – adipokine, koji na njih utiču (Lee i sar. 2013; Tchernof i Despres 2013). Najvažniji u tom smislu su peptidi leptin i adiponektin. Oba faktora utiču na regulaciju pomenutih metaboličkih procesa, a adiponektin reguliše i lipidnu oksidaciju u jetri. Osim njih, adipociti luče i visfatin, omentin, i rezistin, koji takođe utiču na energetske homeostazu (Lee i sar. 2013).

1.6.1 Leptin

Leptin je mali peptidni hormon molekulske mase 16 kDa sa velikim brojem ciljnih tkiva (Munzberg i sar. 2005; Yang i Barouch 2007). Sekretuje se iz belih adipocita nakon obroka, a njegova koncentracija u krvi pozitivno koreliše sa veličinom adipocita i količinom masti u organizmu. Sintezu i sekreciju leptina stimulišu insulin, glukokortikoidi, estrogen i proinflamatorni citokini, a testosteron i adrenergička stimulacija je inhibiraju. Nutritivni sadržaj hrane je takođe bitan činilac uticaja na sintezu leptina (Ahima i Osei 2001; Ribiere i Plut 2005).

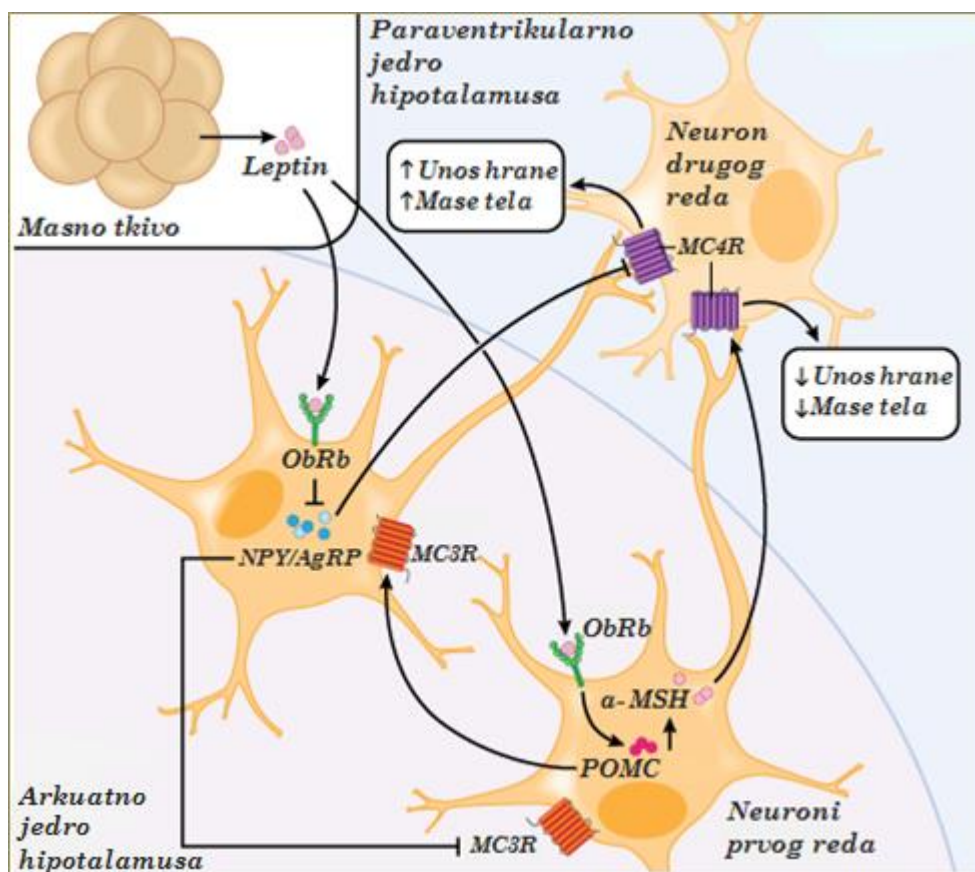
1.6.1.1 Periferni efekti leptina

Ključna periferna uloga leptina je kontrola telesne težine i usmeravanje lipida u odgovarajuće depoe. Pod uticajem leptina višak kalorija se skladišti u subkutanom masnom tkivu, čime se sprečava ektopična akumulacija masti (Brietzke 2007). U jetri i mišićima leptin stimuliše β -oksidaciju masnih kiselina i inhibira sintezu triglicerida, čime sprečava deponovanje masti u ovim organima. S druge strane, u adipocitima leptin stimuliše re-esterifikaciju FFA i njihovo skladištenje u obliku triglicerida (Gade i sar. 2010). Pored toga, leptin učestvuje u održanju homeostaze glukoze i inhibira oslobađanje insulina, dok insulin stimuliše sekreciju leptina (Phillips i Prins 2008). Leptin takođe ima ulogu u regulaciji energetski zahtevnih procesa, kao što su reprodukcija, angiogeneza, homeostaza koštanog tkiva, zarastanje rana i regulacija imunskog odgovora (Wauman i Tavernier 2011). Sa aspekta patofiziologije PCOS-a, važni su direktni negativni efekti ovog hormona na folikulogenezu u jajnicima (Pallares i sar. 2010; Rojas i sar. 2014).

1.6.1.2 Centralni efekti leptina

Posle sekrecije iz adipocita, leptin ulazi u cirkulaciju, prolazi krvno-moždanu barijeru i dospeva u hipotalamus. Tu ispoljava svoj anoreksigeni efekat: smanjuje apetit i unos hrane, a povećava potrošnju energije, što kao posledicu može da ima smanjenje telesne težine (Simerly 2008). Ovi efekti se, u najvećoj meri, ostvaruju zahvaljujući njegovom uticaju na neurone ARC-a i PVN-a hipotalamusa. U ARC-u, naime, leptin, aktivirajući POMC neurone hipotalamusa, pospešuje sekreciju α -MSH, dok sa druge strane u istom jedru inhibira neurone koji luče NPY i AgRP. Preko receptora za melanokortin (MC4R, od eng. *melanocortin 4 receptor*) na sekundarnim neuronima smeštenim u PVN-u, pobrojani molekuli u krajnjoj liniji indukuju smanjenje unosa hrane. (**Slika 1.15**) (Munzberg i sar. 2005; Yang i Barouch 2007). Osim na opisani način, leptin može i direktnije da utiče na smanjenje mase tela

aktivacijom simpatičkih neurona, kojom indukuje povećanje termogeneze i oksidaciju masti u masnom tkivu (Simerly 2008).

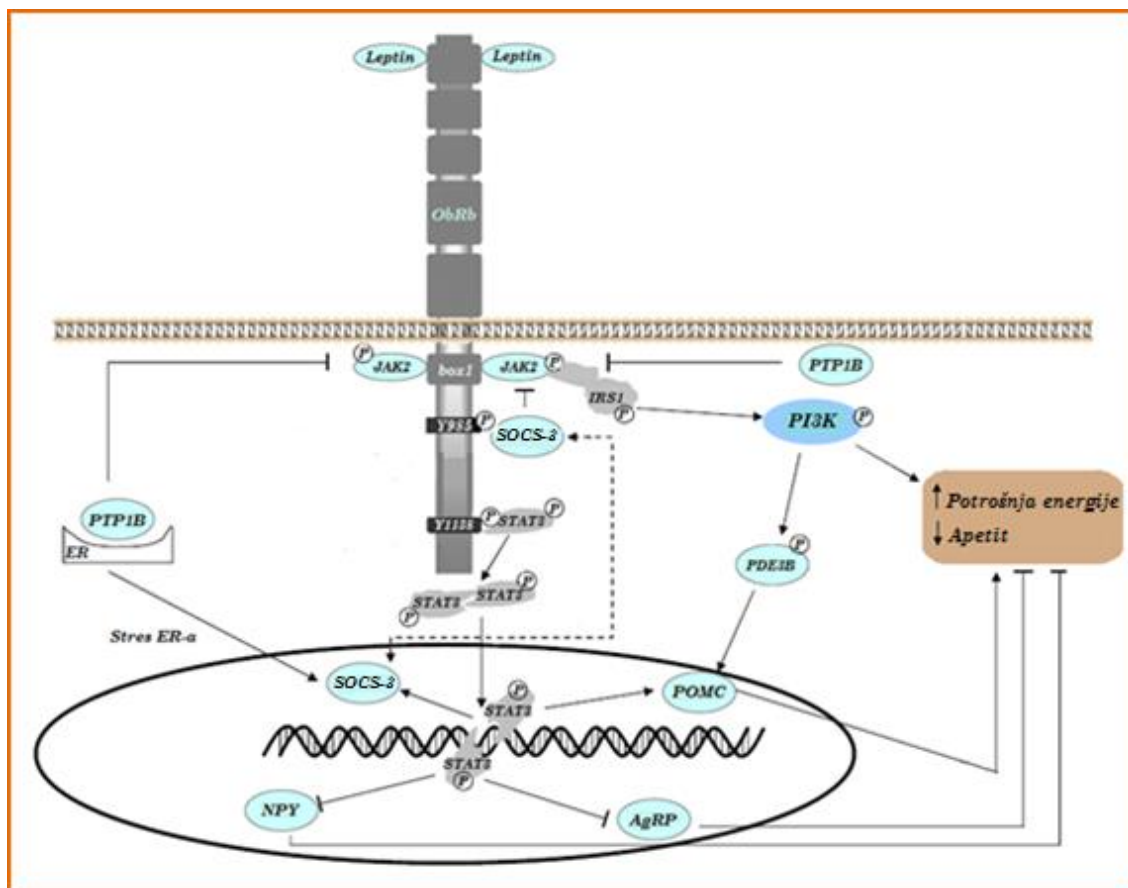


Slika 1.15. Posredna i neposredna dejstva leptina u neuronima hipotalamusa.
Prilagođeno sa: <https://mutagenetix.utsouthwestern.edu>

Jedan od centralnih efekata leptina bitnih za patogenezu PCOS-a je činjenica da povećavanjem pulsatilnosti LH preko dejstva na AgRP/NPY neurone hipotalamusa, on može posredno da pojača hiperandrogenemiju (Pallares i sar. 2010; Rojas i sar. 2014).

1.6.1.3 Prenos leptinskog signala

Ćelijska dejstva leptina se ostvaruju posle vezivanja hormona za dugu, b formu receptora za leptin (ObR, od eng. *obesity receptor*), iz familije citokinskih receptora klase 1. ObRb poseduje vanćelijski domen za vezivanje liganda, transmembranski domen i domen za prenos signala smešten u citoplazmi. Funkcioniše u obliku transmembranskog homodimera i za njega se nekovalentno vezuje kinaza *Janus* tipa 2 (JAK2, od eng. *Janus kinase 2*). Posle vezivanja leptina, konformacija receptora se menja, što omogućava transfosforilaciju, a tako i aktivaciju JAK2. Ona dalje fosforiliše odgovarajuće ostatke Tyr u okviru ObRb/JAK2 kompleksa i tako aktivira nizvodne komponente signalnog puta. Svi citokinski receptori moraju imati konzervirani *box1* motiv da bi mogli da ostvare interakciju sa i aktiviraju JAK, a prema COOH-kraju proteina u odnosu na *box1* obično je smeštena i slabije konzervirana *box2* sekvenca, koja vrši selekciju JAK izoforme sa kojom će doći do interakcije. Nastavak prenosa signala sa tirozin-kinaznih receptora odvija se regrutovanjem signalnih proteina sa SH2 domenima, koji se vezuju za fosfotirozine locirane u okviru specifičnih nizova aminokiselina na receptoru. Za uticaj na energetski balans i gojaznost, najvažnija je takva interakcija ObRb-a sa STAT3 u neuronima hipotalamusa, koja rezultuje u fosforilaciji odgovarajućeg Tyr na STAT3 i njegovoj translokaciji u jedro, gde on u obliku dimera aktivira ili suprimira transkripciju gena, među kojima su i geni koji kodiraju NPY, AgRP i POMC. JAK2 može da aktivira i put PI3K fosforilacijom IRS-1, što je bitno kao dodatni način da se pod uticajem leptina poveća ekspresija POMC u neuronima ARC jedra (**Slika 1.16**) (Pan i sar. 2014).



Slika 1.16. Signalna mreža leptina. Prilagođeno iz Pan, Guo i sar. (2014).

Glukokortikoidni hormoni deluju na prenos leptinskog signala smanjujući ekspresiju ObRb-a i STAT3 i povećavajući nivo SOCS-3 iRNK, na šta ukazuju istraživanja vršena na adenalektomisanim pacovima (la Fleur 2006).

1.6.1.4 Rezistencija na leptin

Povećanje koncentracije leptina u krvi – hiperleptinemiju prati uspostavljanje tzv. leptinske rezistencije, koja se definiše kao neuspeh leptina u ostvarivanju njegovih perifernih i centralnih efekata uprkos visokim koncentracijama koje on dostiže u cirkulaciji (Myers i sar. 2008).

Leptinska rezistencija naročito je izražena u visceralnoj gojaznosti (Myers i sar. 2008), a izaziva poremećaje apetita koji mogu pospešivati njene efekte na patogenezu PCOS-a (Rojas i sar. 2014). Iz ugla razumevanja tih poremećaja, ključne su promene odgovora na leptin u mozgu, odnosno tzv. centralna leptinska rezistencija. Ona se može uspostaviti u različitim fazama njegovog transporta kroz cirkulaciju i krvno-moždanu barijeru (KMB), ili na nivou transdukcije leptinskog signala u samim ciljnim ćelijama, kada se označava imenom ćelijska leptinska rezistencija (Yang i Barouch 2007; Myers i sar. 2008; Morris i Rui 2009).

Leptinski receptor osim ObRb-a ima i više kraćih formi koje vezuju i prenose hormon kroz krvotok i regulišu dostupnost slobodnog leptina, a učestvuju i u njegovom transportu kroz KMB (Wauman i Tavernier 2011). Najznačajnijom za ostvarivanje te funkcije smatra se ravnoteža između pospešivanja transporta leptina kroz KMB preko ObRa i funkcije ObRe forme leptinskog receptora, koja ga zadržava u krvotoku. Poremećaj te ravnoteže i time nemogućnost dospevanja leptina do ciljnih ćelija hipotalamusa mogu da predstavljaju uzrok centralne leptinske rezistencije (Wauman i Tavernier 2011; Pan i sar. 2014). Neki autori ukazuju, međutim, da se centralna leptinska rezistencija pre može objasniti povećanom dostupnošću leptina u ARC neuronima hipotalamusa u odnosu na druge delove mozga, s obzirom da do njih leptin ne mora da dospe kroz KMB, već prolaskom kroz cirkumventrikularne organe, odnosno eminenciju medijanu (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008). U tom slučaju, ustvari, povećana izloženost ObRb neurona u ARC jedru višku leptina u odnosu na ostale neurone zaštićene od hiperleptinemije KMB-om, dovela bi do poremećaja njegove centralne signalizacije i leptinske rezistencije (Morton i sar. 2006). Razlozi za to leže, pak, u činjenici da hiperleptinemija može dovesti do ćelijske leptinske rezistencije na više načina. Prvi je povezan sa činjenicom da između ekspresija gena za leptin i njegov receptor postoji inverzan odnos, tako da hiperleptinemija može uzrokovati leptinsku rezistenciju smanjujući ekspresiju gena za ObRb (Scarpace i Zhang 2009). Hiperleptinemija može da

dovede do leptinske rezistencije i pojačavanjem negativne regulacije prenosa signala sa receptora usled povećane fosforilacije odgovarajućih Tyr ObRb-a (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011).

Važnu ulogu u razvoju centralne leptinske rezistencije može imati i lokalna inflamacija zahvaljujući dejstvu TNF α , IL-6, IKKB/NF κ B sistema i proinflamatornom dejstvu FFA preko receptora sličnog *toll* molekulu tipa 4 (TLR4, od eng. *toll like receptor 4*) (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011; Pan i sar. 2014). Ipak, najklasičnijom varijantom uspostavljanja ćelijske leptinske rezistencije, naročito u gojaznosti i metaboličkom sindromu, smatra se povećana ekspresija gena za SOCS-3, koja dovodi do pojačane negativne povratne regulacije signalnog puta leptina u odgovoru na sam leptin ili neke druge citokine (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011). Leptin, naime, stimuliše ekspresiju gena koji kodira ovaj protein, aktivacijom JAK2/STAT3 puta preko ObRb-a (Pan i sar. 2014). SOCS-3 povratno inhibira leptinsku signalizaciju, vezujući se za određene Tyr na tom receptoru, kao i za specifično mesto na proteinu JAK2 (**Slika 1.16**) (Yang i Barouch 2007; Myers i sar. 2008; Morrison i sar. 2009).

Za genezu metaboličkih poremećaja važan je i inhibitorni uticaj SOCS-3 na signalni put insulina u masnom tkivu, kroz smanjivanje nivoa aktivirajućih fosforilacija Tyr na IRS-1 i IR, odnosno stimulaciju proteazomalne degradacije tih proteina. Time SOCS-3 pospešuje lokalno smanjenje insulinske osetljivosti (Palanivel i sar. 2012; Carow i Rottenberg 2014).

Još jedan zajednički regulator signalnih puteva leptina i insulina je protein tirozin fosfataza 1B (PTP1B). Ona, naime, ograničava leptinsku signalizaciju defosforilišući odgovarajuće Tyr JAK2 kinaze, ali može da defosforiliše i IR i protein IRS1 na aktivirajućim mestima, čime atenuira insulinski signalni put (**Slika 1.16**) (Morrison i sar. 2009; Pan i sar. 2014).

Budući da i leptin i insulin regulišu funkciju masnog tkiva, kao i isti skup neurona u hipotalamusu (Morrison i sar. 2009), preklapajuće funkcije

SOCS-3 i PTP1B u signalnim putevima ovih hormona proizvode komunikaciju leptinskog i insulinskog signala potencijalno značajnu za patogenezu metaboličkih poremećaja povezanih sa PCOS-om.

1.7 Životinjski modeli u izučavanju PCOS-a

Uprkos visokoj prevalenci i velikom uticaju PCOS-a na zdravlje žena u reproduktivnom dobu, etiologija ovog sindroma ostaje nejasna, naročito pitanje da li su reproduktivni i endokrini poremećaji primarni, ili sekundarni u odnosu na metaboličke tokom patogeneze PCOS-a.

Zbog organizacionih i etičkih ograničenja humanih studija, razvoj dobrih životinjskih modela PCOS-a, ali i njihovo adekvatno korišćenje u izučavanju raznih aspekata sindroma, smatra se vrlo značajnim za produbljivanje shvatanja patogeneze i napratak tretmana PCOS-a.

Do sada je razvijen veliki broj različitih modela, ali ne postoji konsenzus oko najbolje animalne imitacije PCOS-a, pošto ni jedna ne uključuje sve endokrine, reproduktivne i pridružene metaboličke karakteristike sindroma. U svrhe generisanja tih modela korišćene su različite životinje, pre svih glodari, ovce i primati. Glodarski modeli su se pokazali najkorisnijim sa aspekta ekonomičnosti, lakoće rukovanja i održavanja, genetičke stabilnosti i mogućnosti odgovarajućih manipulacija, odnosno trajanja reproduktivnog doba i estrusnih ciklusa.

Glodarski modeli razlikuju se po načinu uspostavljanja simptoma sličnih humanom PCOS-u, tako da su u osnovi podeljeni u dve grupe: modele dobijene hormonskom indukcijom ili fiziološkom manipulacijom i modele dobijene genetičkim modifikovanjem (Walters i sar. 2012). U ***Tabeli 2*** sumirane su karakteristike najviše korišćenih glodarskih modela PCOS-a.

Modeli dobijeni tretmanom estrogenima (E1 i E2) i njihovim derivatima, pre svih estradiol valeratom (EV) predstavljaju dobre imitacije reproduktivnih karakteristika PCOS-a, ali ne i njegovih endokrinih i

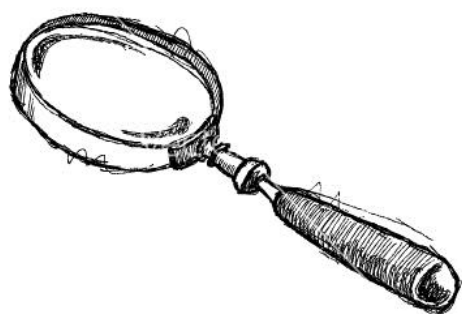
metaboličkih osobina (Manneras i sar. 2007; Walters i sar. 2012). Slična je situacija i sa modelom dobijenim primenom antagonista progesteronskih i glukokortikoidnih receptora, kao što je RU-486 (Walters i sar. 2012). S obzirom na konzistentnost hiperandrogenizma (viškova testosterona (T) i dehidroepiandrosterona (DHEA)) kao karakteristike PCOS-a, razvijeni su modeli dobijeni njihovom egzogenom primenom, koji razvijaju reproduktivne promene karakteristične za PCOS, ali ne i metaboličke osobine sindroma. U skorije vreme razvijen je model koji se dobija kontinualnom, postnatalnom primenom nearomatizabilne forme testosterona, 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (Walters i sar. 2012). Ovaj model je izuzetno pogodan za proučavanje etiologije i potencijalnih modaliteta lečenja PCOS-a, jer ispoljava i reproduktivne i metaboličke karakteristike ove bolesti (Manneras i sar. 2007; Walters i sar. 2012). Osim pobrojanih modela dobijenih egzogenom administracijom androgena, generisan je i model PCOS-a u kome se posredno, davanjem blokatora aromataze – letrozola, uspostavlja njihov endogeni višak. Primena tog modela u izučavanju etiologije sindroma ograničena je za sada nedovoljno konzistentnim podacima o prisustvu metaboličkih karakteristika PCOS-a (Walters i sar. 2012).

Modeli dobijeni genetičkim manipulacijama većinski se zasnivaju na uspostavljanju poremećaja leptinske signalizacije: deficijenciji samog hormona, ili leptinskog receptora (*ob/ob*, *db/db* i JCR:LA-*cp* pacovi), odnosno poremećenom transportu leptina kroz krvno-moždanu barijeru (Novozelandski gojazni miš). Ovi modeli ukazuju na definitivan uticaj gojaznosti i leptinske rezistencije na propagaciju PCOS-a, ali se ne smatraju dobrim za proučavanje njegove etiologije, pošto zanemaruju brojne slučajeve ovog sindroma koji ne uključuju pojavu gojaznosti, a samim tim i previše naglašavaju njenu ulogu u patofiziologiji sindroma. (Walters i sar. 2012).

Tabela 2. Sumarni prikaz reproduktivnih i metaboličkih karakteristika PCOS-a u glodarskim modelima ovog sindroma. Prilagođeno iz Walters, Allan i sar. 2012.

	Osobine humanog PCOS-a									
<i>Modeli dobijeni postnatalnim tretmanima</i>	<i>Neregularni ciklusi</i>	<i>↑ androgeni (T)</i>	<i>Oligo/anovulacija</i>	<i>Ciste na jajnicima</i>	<i>↑ atrezija folikula</i>	<i>Stanjeni granulosa ćel. sloj jajnika</i>	<i>↑ LH</i>	<i>Insulinska rezistencija</i>	<i>Gojaznost</i>	<i>Dislipidemija</i>
<i>T</i>	+	+	+	+	+	?	?	+	?	?
<i>DHT</i>	+	/	+	+	+	+	?	+	+	+
<i>DHEA</i>	+	+	+	+	+	+	++	+	/	?
<i>EV</i>	+	/	+	+	+	?	/	/	+	?
<i>E2</i>	+	?	+	+	?	+	?	?	?	?
<i>Letrozol</i>	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+
<i>RU-486</i>	+	+	+	+	+	+	+	/	/	?
<i>Konst. svetlost</i>	+	?	+	+	?	?	/	?	?	?
<i>Modeli generisani genetičkim modifikovanjem</i>										
<i>ob/ob</i>	+	+	+	/	+	?	/	+	+	?
<i>Novozelandski gojazni miš</i>	?	/	+	/	+	?	/	+	+	+
<i>JCR:LA-cp</i>	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+

Legenda: +, prisutno; /, odsutno; ?, nepoznato; *, podaci su nekonzistentni u različitim publikacijama.

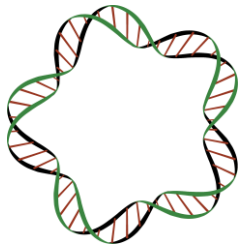
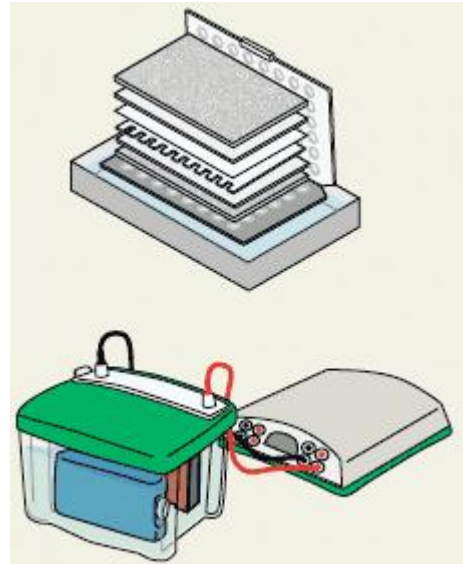
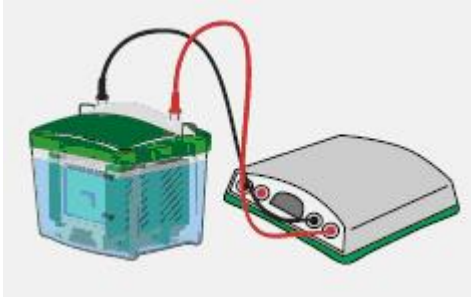


2 Cilj rada

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se doprinese razumevanju uloge glukokortikoidnih hormona u patogenezi PCOS-a. U okviru ovog opšteg cilja postavljena su tri posebna cilja:

1. S obzirom na značaj glukokortikoida za razvoj visceralne gojaznosti, koja je jedan od glavnih metaboličkih poremećaja u PCOS-u, u ovoj studiji je posebna pažnja bila posvećena uticaju ovih hormona na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu.
2. Imajući u vidu anti-inflamatorna dejstva glukokortikoida, studija je obuhvatila i analizu povezanosti inflamacije u visceralnom masnom tkivu sa promenama sistemske i periferne osetljivosti na insulin.
3. Posebna pažnja bila je usmerena ka ispitivanju interakcije signalnih puteva glukokortikoida i leptina u hipotalamusu, zbog značaja centralnih dejstava leptina za regulaciju energetskog metabolizma i potencijalne modulirajuće uloge glukokortikoida.

U ispitivanjima su korišćene ženke pacova soja Wistar podvrgnute dugotrajnom tretmanu 5 α -dihidrotestosteronom, kao animalni model PCOS-a. Ispitivanjima uloge glukokortikoidnih hormona u lipidnom metabolizmu, metaboličkoj inflamaciji i centralnoj regulaciji unosa hrane prethodila je detaljna morfološka, biohemijska i histološka karakterizacija reproduktivnih i metaboličkih promena u korišćenom modelu PCOS-a.



3 Materijali i metode

3.1 Materijal

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

Placebo i peleti koji sadrže 7,5 mg DHT-a kupljeni su od firme Innovative research of America sa sedištem u Sarasoti, Florida, SAD.

Od firme MultiCare strips, Biochemical Systems International, Italija nabavljeni su automatski analizatori krvne koncentracije glukoze i triglicerida.

Natrijum dodecil sulfat (*SDS*, od eng. *sodium dodecyl sulphate*), fenilmetilsulfonyl hlorid (*PMSF*, od eng. *phenylmethylsulfonyl chloride*), Nonidet-P40, CBBG (od eng. *Coomassie brilliant blue G*), Brom Fenol Plavo, saharoza, natrijum fluorid, natrijum ortovanadat, natrijum pirofosfat, kalcijum hlorid, β-merkaptotanol, ditiotreitol (*DTT*), etilendiaminotetrasirćetna kiselina (*EDTA-Na₂*), etilenglikoltetrasirćetna kiselina (*EGTA-Na₂*) akrilamid, bisakrilamid, hidroksietil - 1 - piperazinetansulfonska kiselina (*HEPES*, od eng. *4 - (2 - hydroxyethyl) - 1 - piperazine ethane sulphonic acid*), Tris baza, N,N,N',N' - tetrametiletildiamin (*TEMED*), dietilpirokarbonat (*DEPC*), agaroza i albumin iz seruma govečeta (*BSA*, od eng. *bovine serum albumin*) nabavljeni su od firme Sigma Chemical Company, St Louis, USA.

Od firme SERVA electrophoresis, Heidelberg, Nemačka, nabavljeni su glicin, boja *Ponceau S*, Tween 20, kao i proteazni inhibitori aprotinin, leupeptin i antipain.

Etanol, metanol, fosforna kiselina, ksilol, izopropanol, hloroform i kalijum fosfat korišćeni u eksperimentima proizvedeni su i nabavljeni od firme LACH-NER, iz Češke.

Od firme Zorka Šabac iz Srbije nabavljeni su glicerol i urea, dok je Trizol® nabavljen od nemačke firme Ambion. Veterinarski zavod Subotica, Srbija je proizvođač komercijalne hrane za pacove i glukoze.

3,3-diaminobenzidin nabavljen je od firme DAB; DAKO A/S, Glostrup, Danska.

Za određivanje koncentracije kortikosterona u krvi i tkivima korišćen je *Corticosterone High Sensitivity* EIA, proizvođača Immunodiagnostic Systems Ltd, American Laboratory Products Co, dok je za određivanje krvne koncentracije leptina korišćen Rat Millipore kit, (Billerica, MA, SAD). Koncentracija estradiola u krvi izmerena je pomoću odgovarajućeg enzimskog imunoeseja (Estradiol (E2) Enzyme Immunoassay Test Kit, BioCheck Inc., CA., SAD), dok je za određivanje koncentracije insulina u plazmi korišćen INEP-ov radioimunoesej (Srbija).

Prepisivanje RNK u cDNK rađeno je pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a firme Applied Biosystems, iz SAD. Hemikalije korišćene za reakciju kvantitativne lančane polimerizacije u stvarnom vremenu (qPCR, od eng. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) su takođe proizvodi ove firme, kao i eseji za TaqMan Real-time PCR analizu pobrojani u ***Tabeli 3***. Real time PCR analiza ekspresije gena za IL-1 β rađena je pomoću Power SYBR® Green PCR Master Mix-a firme Applied Biosystems, SAD i specifičnih prajmera za selektivno umnožavanje IL-1 β (prajmer: F 5'-CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG-3', R 5'-GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC-3'), koji su proizvedeni od strane firme Metabion, Martinsried, Nemačka. Kao endogena kontrola u ovoj analizi korišćen je β -aktin, selektivno amplifikovan pomoću prajmera: F 5'-CCC TGG CTC CTA GCA CCA T-3', R 5'-GAG CCA CCA ATC CAC ACA GA-3'.

Tabela 3. Oznake eseja endogenih kontrola i ciljnih gena korišćenih u TaqMan real-time PCR analizi

Oznaka gena	Ime gena	Oznaka eseja
BA	β -aktin	Rn00667869_m1
B2M	β_2 -mikroglobulin	Rn00560865_m1
HPRT1	Hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza	Rn01527840_m1
TBP	TATA-vezujući protein	Rn01455646_m1
11 β -HSD1	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza 1	Rn00567167_m1
H6PDH	Heksozo-6-fosfat dehidrogenaza	Rn01519771_m1
GR	Glukokortikoidni receptor	Rn00567167_m1
LIPE	Lipaza osetljiva na dejstvo hormona	Rn00563444_m1
PEPCK	Fosfoenolpiruvat karboksikinaza	Rn01529014_m1
FAS	Sintaza masnih kiselina	Rn01463550_m1
LPL	Lipoproteinska lipaza	Rn00561482_m1
CD36	Klaster diferencijacije 36	Rn02115479_g1
ATGL	Adipocitna lipaza triglicerida	Rn0147969_m1
NPY	Neuropeptid Y	Rn01410145_m1
SOCS-3	Supresor signalnog puta citokina 3	Rn00585674_s1
IL-6	Interleukin 6	Rn01410330_m1
IL-1 β	Interleukin 1 β	Rn00580432_m1
TNF α	Faktor nekroze tumora α	Rn01525859_g1

Razdvajanje proteina elektroforezom vršena su na aparatu Mini-Protean II Electrophoresis Cell System, dok je prenos proteina sa gela na PVDF membranu rađen u aparaturi Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell system Bio-Rad Laboratorija, firme Hercules, Kanada. U Western blot analizama korišćena je poliviniliden difluoridna (PVDF) membrana Immobilon-FL, veličine pora 0.45 μ m, korporacije Millipore iz Italije.

Smeša proteina poznatih molekulskih masa korišćena kao marker pri razdvajanju proteina raspona 10 – 170 kDa je Page Ruler™ Plus Restrained Protein Ladder, firme Fermentas iz Litvanije.

Primarna antitela i njihova razblaženja korišćena u Western blot i imunohistohemijskim analizama prikazana su u *Tabeli 4*. Sva sekundarna

antitela proizvodi su firme Amersham Biosciences iz Velike Britanije. Za hemifluorescentnu detekciju proteina metodom Western blot upotrebljavan je koncentrovani supstrat za pojačanu hemifluorescenciju (ECF, od eng. *enhanced chemifluorescence*), istog proizvođača. Kao sekundarno antitelo u imunohistohemijskim analizama korišćen je kozji konjugat IgG-a i peroksidaze rena (HRP, od eng. *horseradish peroxidase*) (sc - 2054), firme Santa Cruz Biotechnology, sa sedištem u Dalasu, Teksas, SAD.

Tabela 4. Primarna antitela korišćena u Western blot i imunohistohemijskim analizama

Primarno antitelo	Oznaka	Poreklo	Upotrebljeno razblaženje	Proizvođač
β-aktin	AC-15	Miš	1:10000	Sigma-Aldrich
Kalneksin	ab22595	Kunić	1:10000	Abcam
GR	PA1-511	Kunić	1:1000	Thermo Scientific
11β-HSD1	ab109554	Kunić	1:1000	Abcam
H6PDH	sc-67394	Kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Lipin-1	sc-98450	Kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
SREBP-1	sc-366	Kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
PPAR_γ	sc-7273	Miš	1:250	Santa Cruz Biotechnology
NFκB/p65	sc-372	Kunić	1:500	Santa Cruz Biotechnology
ObRb	ab5593	Kunić	1:1000	Abcam
GLUT4	sc-7938	Kunić	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
IRS-1	sc-8038	Kunić	1:500	Santa Cruz Biotechnology
p-IRS-1 Ser³⁰⁷	sc-33956	Kunić	1:500	Santa Cruz Biotechnology
PTP1B	sc-1718-r	Kunić	1:250	Santa Cruz Biotechnology
Kaspaza-3	#9611	Kunić	1:100	Cell signaling

Vizuelizacija imunopozitivnih traka tokom Western blot analize vršena je pomoću specifičnog, ECF supstrata firme GE Healthcare, iz SAD.

3.2 Metode

3.2.1 Tretman životinja

U eksperimentima su korišćene ženke pacova soja Wistar, koje su dvadesetprvog dana posle rođenja razdvojene od majki i podeljene u dve eksperimentalne grupe. **DHT grupu** činile su ženke pacova sa potkožno postavljanim hormonskim peletima koji sadrže 7,5 mg DHT-a i kontinualno tokom 90 dana oslobađaju hormon, u dnevnoj dozi od 83 µg. **Placebo grupu** činile su ženke pacova iste starosti sa potkožno postavljanim placebo peletima koji su u sebi sadržali matriks, ali ne i hormonsku komponentu. DHT je odabran za tretman kao nearomatizabilni, potentni androgen i primenjen je u dozi koja odgovara povećanju koncentracije androgena od 1,7 puta, prethodno izmerenom u krvi žena sa PCOS-om (Fassnacht i sar. 2003; Silfen i sar. 2003). Obe eksperimentalne grupe sačinjavalo je po 12 životinja ($n=12$), gajenih u grupama od po 3 u kavezu, pod standardnim laboratorijskim uslovima, na konstantnoj temperaturi ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) i vlažnosti vazduha, u svetlosnom režimu 12h svetlo/ 12h mrak. Svim životinjama su standardna hrana i voda bile dostupne *ad libitum*. Tokom tretmana, unos hrane i vode mereni su dnevno, dok su promene telesne mase registrovane jednom nedeljno. Energetski unos izračunat je na osnovu dnevnog unosa hrane, prema formuli:

$$\text{Energetski unos} = \text{masa unešene hrane (g)} \times 11 \text{ kJ}.$$

Faza estrusnog ciklusa određivana je mikroskopskom analizom preovlađujućeg tipa ćelija u vaginalnim brisevima pacova uzimanim dnevno od pojedinačnih životinja, počevši od 10. nedelje, pa sve do kraja tretmana. Po završetku tretmana i posle prekonoćnog lišavanja hrane, pacovi su žrtvovani brzom dekapitacijom pomoću giljotine u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa uvek u isto vreme (između 9:00 i 10:00 h). Studija je urađena u skladu sa etičkim načelima Evropske komisije za zaštitu životinja (201/63/EU) i

odobrena je od strane Etičkog komiteta za upotrebu laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" (Broj 2-20/10).

3.2.2 Sakupljanje krvi, priprema krvne plazme i izolovanje jajnika, materice, visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa

Posle dekapitacije, krv iz trupa životnja brzo je sakupljana u falkone obložene antikoagulansom etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA- Na_2) uz lagano mućkanje, a zatim korišćena za merenje glukoze i triglicerida. Krvna plazma izolovana je centrifugiranjem tako prikupljene krvi na 1600 x g, 15 min, na sobnoj temperaturi (Eppendorf 5804/R), a zatim skladištena na - 70°C radi kasnije upotrebe u biohemijskim i fiziološkim analizama.

Jajnici, materica i visceralno masno tkivo pažljivo su odstranjeni, oprani hladnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), osušeni i izmereni, a masno tkivo je podeljeno u delove namenjene za Western blot, qPCR i histološke analize. Izolovano visceralno masno tkivo bilo je smešteno u abdominalnoj šupljini i uključivalo je omentalni, retroperitonealni i perirenalni depo. Mozak životinja je izolovan i brzo prebačen na led, a zatim je iz njega izdvojen hipotalamus. Deo masnog tkiva namenjen za qPCR i Western blot analize i hipotalamus su trenutno zamrzavani i čuvani u tečnom azotu do izolacije RNK i proteina.

3.2.3 Histološka analiza i imunohistohemija

Za potrebe histološke analize uzorci visceralnog masnog tkiva i jajnika su neposredno nakon izolovanja, radi očuvanja ćelijske morfologije i održanja imunoreaktivnosti antigenskih epitopa, fiksirani u 10% formaldehidu (formalinu) (24 h, 4°C). Pre kalupljenja tkiva u parafinu, vršena je dehidracija tkiva u seriji alkohola rastućih koncentracija (30% etanol - 2 x 30 min; 50% etanol – 2 x 30 min, 70% etanol – 5 dana, 96% etanol - 24 h, 100% etanol - 4 h, na sobnoj temperaturi). Da bi se omogućila impregnacija tkiva parafinom, etanol je zamenjen ksilolom – dehidratisanim agensom, u kome se parafin rastvara (2 x po 5 min, na sobnoj temperaturi). Nakon toga, tkivo je prebacivano u posudice sa rastopljenim parafinom (52-57°C) koji sadrži 7% voska, i ostavljano u termostatu 5 h (sa jednom promenom parafina nakon 1,5 h). Parafin sa kalupljenim tkivom je potom brzo izlivan u posudice za kalupljenje, i ostavljan da se stvrdne.

Ukalupljeni uzorci visceralnog masnog tkiva sečeni su na preseke debljine 10 µm, dok su jajnici bili longitudinalno i serijski sečeni na preseke debljine 5 µm. Preseci su, zatim, montirani na želatinizirana predmetna stakla (1% želatin) i deparafinizirani. Deparafinizacija je vršena ksilolom (2 x po 5 min), posle čega su preparati sprovedeni kroz seriju alkohola sve nižih koncentracija, do vode: 100%; 96%; 70%; 50% etanol; voda. U svakom alkoholu i u vodi preparati su stajali po 5 min.

Posle sečenja, preseci su bojeni hematoksilin eozin metodom. Dobijeni histološki preparati analizirani su mikroskopom (Olympus, BX-51, Olympus Corp., Japan) sa CCD video kamerom (PixeLINK, Ottawa, ON, Kanada) koji je povezan sa monitorom i nalazi se pod kontrolom softvera newCAST (Visiopharm Integrator System, verzija 3.2.7.0, Visiopharm, Danska). Za analizu adipocita manjeg prečnika korišćeno je uvećanje od 10 puta.

Morfometrijska analiza visceralnih adipocita urađena je na digitalnim fotografijama visoke rezolucije i obuhvatala je određivanje prečnika i površine ćelija korišćenjem komercijalno dostupnog, Adiposoft softvera, automatizovanog i specijalizovanog za histološku analizu belog masnog tkiva (Galarraga i sar. 2012). Dijametar i površina ćelija određivani su u 100 adipocita po preseku, pri čemu su analizirana tri preseka po životinji, i pet životinja po eksperimentalnoj grupi.

Preseci jajnika su imunohistohemijski analizirani na prisustvo aktivirane kaspaze-3, shodno uputstvima proizvođača, korišćenjem peroksidazno-antiperoksidazne metode. Ukratko, posle deparafinizacije, dehidratacije i demaskiranja antigena u mikrotalasnoj pećnici (10 min u 10mM citratu, pH 6), i blokiranja endogenih peroksidaza pomoću 3% H₂O₂ u metanolu, preseci jajnika su sat vremena inkubirani sa 10% kozjim serumom, a zatim preko noći na 4°C sa primarnim antitelom na aktiviranu kaspazu-3 (1:100). Konjugat IgG-a i HRP u razblaženju 1:200 korišćen je kao sekundarno antitelo. Antigen–antitelo kompleks je vizuelizovan inkubiranjem preseka sa 3,3-diaminobenzidinom.

3.2.4 Određivanje biohemijskih i fizioloških parametara

3.2.4.1 Određivanje koncentracije glukoze i triglicerida u krvi

Koncentracija glukoze i triglicerida u krvi prikupljenoj iz trupa eksperimentalnih životinja izmerena je odmah nakon dekapitovanja automatskim analizatorima.

3.2.4.2 Određivanje koncentracije FFA u plazmi

Koncentracija FFA u plazmi određivana je modifikovanom metodom Duncombe-u (Duncombe 1964). Metoda se zasniva na činjenici da FFA u hloroformu, u prisustvu odgovarajućeg reagensa (trietanolaminski pufer + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) grade soli bakra, koje u kontaktu sa dietilditiokarbamatom (DDC, od eng. *diethyldithiocarbamate*) grade kompleksno jedinjenje žute boje (kompleks FFA-Cu), sa maksimumom apsorpcije svetlosti na 436 nm. Intenzitet boje je direktno proporcionalan količini slobodnih masnih kiselina. Koncentracija FFA (mmol/l) dobijena je očitavanjem sa standardne krive, za čije formiranje su korišćeni rastvori palmitinske kiseline različitih, već poznatih koncentracija (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 i 2,5 mmol/l). U uzorke plazme dodata je određena količina trietanolaminskog pufera (pH 7,8) i hloroforma, reakciona smeša je potom intenzivno mešana 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana 10 min na 800 x g u kliničkoj centrifugi (Tehtnica LC-321). Posle uklanjanja gornjeg plavozelenog sloja (vodene faze), uzorcima je dodavan 0,2% DDC, i nakon inkubacije u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbanca na 436 nm (Ultrospec II, LKB).

3.2.4.3 Određivanje koncentracije hormona i MIF-a u krvnoj plazmi i visceralnom masnom tkivu

Koncentracija leptina, kortikosterona i MIF-a u krvnoj plazmi i kortikosterona i MIF-a u citoplazmatičnoj frakciji masnog tkiva izmerena je pomoću kompetitivnih ELISA testova (od eng. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) u kojima je poliklonsko antitelo za leptin i kortikosteron, odnosno monoklonsko antitelo za MIF vezano za unutrašnju površinu mikrotitar ploče. Pri određivanju koncentracije leptina i kortikosterona standardi,

kontrolni uzorci i uzorci nepoznatih koncentracija (krvna plazma je razblažena 20 puta; citoplazmatična frakcija nije razblažena) su najpre zagrevani 30 min na 80°C, a potom nanešeni na mikrotitar ploču i četiri sata inkubirani na sobnoj temperaturi sa antitelom konjugovanim sa HRP-om. Mikrotitar ploča je zatim ispirana više puta za redom, potom je dodat hromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB), a reakcija je prekinuta posle 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi dodavanjem 0.5 M HCl. Apsorbance su zatim spektrofotometrijski očitavane na 450 nm i 590 nm (korekciona OD) pri određivanju koncentracije leptina, dok su pri određivanju koncentracije kortikosterona one očitavane na 450 nm i 650 nm (korekciona OD) pomoću automatskog ELISA čitača za mikrotitar ploče (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska).

S druge strane, pri određivanju koncentracije MIF-a, krvna plazma nije razblaživana, a uzorci citosola visceralnog masnog tkiva tretiranih životinja svedeni su na koncentracije od 2 µg/µl, odnosno ukupno 100 µg proteina po uzorku. Uzorci su nanešeni na mikrotitar ploču i sat vremena inkubirani na 37°C sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa avidin - biotinom. Posle više ispiranja mikrotitar ploče i dodavanja TMB-a, reakcija je prekinuta nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi, dodavanjem fosforne kiseline (1M H₃PO₄). Apsorbance su zatim spektrofotometrijski očitavane na 450 nm i 650 nm (korekciona OD). Vrednosti su očitane sa semilogaritamske standardne logističke krive sa četiri parametra (4PL kriva, od eng. *4-parameter logistic curve*), upotrebom ReaderFit programa, (MiraiBio Group of Hitachi Solutions America, Ltd). Izračunate vrednosti izražene su u ng/ml za uzorke krvne plazme, odnosno u ng/mg proteina za uzorke tkiva. Koncentracija estradiola izmerena je pomoću odgovarajućeg enzimskog imunoeseja i izražena u ng/ml krvne plazme.

3.2.4.4 Određivanje koncentracije insulina i parametara insulinske osetljivosti

Određivanje koncentracije insulina u plazmi urađeno je RIA metodom, pomoću kita testiranog za određivanje insulina u plazmi pacova. Princip metode zasnovan je na kompetitivnom vezivanju insulina iz uzorka i radioaktivno obeleženog insulina (^{125}I -insulin) za određeni broj epitopa na specifičnim anti-insulinskim antitelima, tako da uporedo nastaju obeleženi i neobeleženi imunokompleksi. Zbog toga sa povećanjem koncentracije insulina u uzorku opada broj uspostavljenih radioaktivno obeleženih kompleksa. Posle inkubacije uzoraka plazme sa obeleženim insulinom i antitelima tokom 20 h na sobnoj temperaturi, nastali kompleksi su taloženi inkubacijom sa imunoabsorbentom 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 25 min na 3000 x g. Nevezani insulin i antitela zaostaju u tečnoj fazi, dok talog predstavlja kombinaciju sekundarnih antitela, polietilenglikola i vezanog insulina. Radioaktivnost taloga je merena tokom jednog minuta scintilacionim brojačem 1219 LKB, a koncentracija insulina zatim određena upoređivanjem sa standardnom krivom, formiranom tretiranjem standarda sa precizno definisanim koncentracijama insulina (0,3; 3; 10; 30; 100 i 300 mIU/l). Osetljivost eseja je 0,6 mIU/l, a unutaresejski koeficijent varijacije je iznosio 5,24%.

Za procenu sistemske insulinske osetljivosti primenjeni su intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IP-GTT, od eng. *Intraperitoneal Glucose Tolerance Test*) i indeks modela za određivanje homeostaze (HOMA, od eng. *homeostasis assessment model*).

Tri dana pre kraja eksperimentalnog tretmana životinjama je nakon prekonoćnog gladovanja intraperitonealno ubrizgavan rastvor glukoze u količini od 2 g/kg telesne mase. Koncentracije glukoze merene su zasecanjem repne vene neposredno pre injiciranja glukoznog rastvora, kao i 15, 30, 60, 90 i 120 min nakon toga. Parametar stepena tolerancije na glukozu je

matematički određena površina ispod krive (AUC, od eng. *area under curve*), koja prikazuje nivo glukoze u funkciji vremena (Le Floch i sar. 1990) .

Indeks HOMA izračunat je na osnovu vrednosti izmerenih koncentracija glukoze u krvi i insulina u krvnoj plazmi eksperimentalnih životinja nakon prekonoćnog gladovanja, korišćenjem sledeće formule (Turner i sar. 1979):

$$HOMA = insulin (mIU/l) \times [glukoza(mmol/l)/22.5].$$

3.2.4.5 Određivanje visine sistolnog krvnog pritiska i merenje pulsa

Sistolni krvni pritisak i puls mereni su kod svesnih pacova indirektno, montiranjem prstena na rep uz prethodno spoljašnje zagrevanje (Song i sar. 2004).

3.2.5 Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije

3.2.5.1 Izolacija RNK

Ukupna RNK iz visceralnog masnog tkiva i hipotalamusa izolovana je korišćenjem Trizol® reagensa. Zamrznuto tkivo homogenizovano je u Potter-Elvehjem staklo-teflon homogenizeru u odnosu 1 ml Trizol®-a na 100 mg visceralnog masnog tkiva ili hipotalamusa. Dobijeni homogenati su zatim inkubirani 5 min na 30°C, radi potpune disocijacije nukleoproteinskih kompleksa. U svaki homogenat dodato je po 0,2 ml hloroforma i posle snažnog mućkanja uzorci su inkubirani 3 min na temperaturi od 30°C. Posle centrifugiranja (12000 x g, 15 min, 4°C) i na taj način ostvarenog razdvajanja donje (organske) faze, interfaze i gornje (vodene faze), vodena faza, u kojoj se nalazi RNK, preneti je u nove epruvete. U nju je zatim dodato 0,5 ml izopropanola i smeša je inkubirana 10 min na 30°C. Talog dobijen nakon centrifugiranja (12000 x g, 10 min, 4°C), resuspendovan je u jednoj zapremini 75% etanola i potom centrifugiran (12000 x g, 5 min, 4°C). Novodobijeni talog je osušen na vazduhu i onda rastvoren u 100 µl 0,1% DEPC vode. Ovako izolovana RNK je čuvana na - 70°C. Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm. Aparat (BioPhotometer, Eppendorf) je automatski izračunavao koncentraciju RNK prema formuli **$c = (40 \times A_{260} \times \text{faktor razblaženja})$** , polazeći od toga da apsorbancija jedne optičke jedinice na 260 nm odgovara količini od 40 µg/ml RNK u uzorku. Za određivanje čistoće uzorka i eventualne kontaminacije proteinima, ugljenim hidratima, fenolima i drugim nečistoćama, korišćen je odnos apsorbanci na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}), kao i na 260 i 230 nm (A_{260}/A_{230}), pri čemu se čistoća smatra zadovoljavajućom kada su ti odnosi veći od 1,8. Provera očuvanosti dobijene RNK rađena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu, u trajanju od 30 min, pri konstantnoj voltaži (100V).

3.2.5.2 Reakcija reverzne transkripcije

Reakcije reverzne transkripcije, tj. prevođenja RNK molekula kao matrice u tzv. komplementarnu DNK (cDNK, od eng. *complementary DNA*) ostvarena je pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a. Reakciona smeša, ukupne zapremine 20 µl bila je sačinjena od: 2 µg ukupne RNK, smeše četiri dezoksiribonukleozidtrifosfata (100 mM 25 x dNTP Mix), smeše nasumičnih prajmera (10 x RT Primers), 50 U/µl enzima reverzne transkriptaze (Multiscribe™), reakcionog pufera (10 x TaqMan RT Buffer) i ribonukleaznog inhibitora. Reakcija se odvijala po sledećem temperaturnom profilu: 10 min na 25°C, 120 min na 37 °C, a zaustavljena je zagrevanjem reakcione smeše na 85°C u trajanju od 5 min. Tako dobijena cDNK skladištena je na -70°C do upotrebe.

3.2.5.3 Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Određivanje nivoa genske ekspresije vršeno je pomoću lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*). Analiza relativnih nivoa iRNK pojedinačnih gena urađena je pomoću aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000 Sequence Detection Applied Biosystems, USA) korišćenjem TaqMan i SYBR® Green tehnologije.

Za određivanje optimalnih uslova real-time PCR reakcije za pouzdanu kvantifikaciju transkripcije ciljnih gena neophodno je izvršiti odabir adekvatne endogene kontrole. Kao endogene kontrole koriste se geni koji se u svim ćelijama eksprimiraju konstitutivno (eng. *housekeeping genes*) i stabilno, tj. nezavisno od promene uslova, eventualne primene eksperimentalnog tretmana i/ili patofizioloških stanja koja mogu nastati tokom eksperimenta.

Validacija endogenih kontrola urađena je upoređivanjem nivoa ekspresije i efikasnosti amplifikacije nekoliko često korišćenih endogenih kontrola: β_2 - mikroglobulina (B2M), β -aktina (BA), hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaze (HPRT1, od eng. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase type 1*) i proteina koji se vezuje za TATA blok (TBP, od eng. *TATA binding protein*), pomoću programa GeNorm (Vandesompele i sar. 2002) i NormFinder (Andersen i sar. 2004) koji na osnovu količine RNK transkripta izračunavaju stabilnost genske ekspresije, intergrupnu i intragrupnu varijabilnost, kao i najstabilniju kombinaciju endogenih kontrola. Na ovaj način kao adekvatna endogena kontrola za analizu ekspresije gena u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu odabrana je HPRT1, a potom su urađene real-time PCR reakcije za gene od interesa. U analizi su korišćeni eseji pobrojani u **Tabeli 3**. Reakcionu smešu, ukupne zapremine 25 μ l činili su: 1 x TaqMan Universal Master Mix, 1 x TaqMan Gene Expression Assay Mix i 20 ng cDNK. Uslovi PCR reakcije bili su: 2 min na 50°C, 10 min na 95°C, pa 50 ciklusa u trajanju od 15 s na 95°C i na kraju 60 s na 60°C. Odabran je jedan uzorak cDNK koji je nanošen na sve ploče i korišćen kao kalibrator za daljapoređenja među pločama. Procena kontaminacije reakcionih komponenti vršena je nanošenjem na ploče negativnih kontrola za svaki esej, sa svim reagensima za PCR izuzev cDNK. Sve reakcije rađene su u triplicatu, na mikrotitar pločama sa 96 mesta.

Na grafiku umnožavanja ciljne sekvence određuje se C_t vrednost (od eng. *Cycle threshold*), koja određuje ciklus u kome fluorescencija uzorka prelazi liniju praga (eng. *threshold*). Linija praga automatski se izračunava na osnovu bazalnog fluorescentnog signala početnih ciklusa. C_t vrednost je obrnuto proporcionalna početnom broju kopija ciljnog gena prisutnih u uzorku.

Relativna kvantifikacija ekspresije gena izvršena je primenom komparativne $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metode, kojom se C_t vrednosti za gene od interesa normalizuju prema C_t vrednostima endogene kontrole i kalibratora (Livak i

Schmittgen 2001). Dobijeni rezultati su analizirani pomoću programskog paketa Sequence Detection RQ Study Add ON za 7000 System SDS, verzija 1.2.3 (Applied Biosystems, USA), sa odabranim intervalom poverenja od 95% ($p \leq 0.05$).

3.2.6 Izolovanje proteina i priprema odgovarajućih ćelijskih frakcija

Određivanje nivoa proteina od interesa vršeno je u citosolnoj, mikrozomalnoj i jedarnoj ćelijskoj frakciji visceralnog masnog tkiva i u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa placebo i životinja tretiranih DHT-om.

3.2.6.1 Priprema citosolne, jedarne i mikrozomalne frakcije visceralnog masnog tkiva

Subćelijske frakcije visceralnog masnog tkiva dobijene su metodom diferencijalnog centrifugiranja (Spencer i sar. 2000). Tkivo je homogenizovano u Ultra-Turrax homogenizeru (T25, Junke & Kunkel, Nemačka) u jednoj zapremini hladnog (4°C), 20mM Tris-HCl pufera (pH 7,4), koji je sadržao 10% glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA - Na₂, 1 mM EGTA - Na₂, 2 mM DTT, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, proteazne inhibitore (20 mM Na₂MoO₄, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml antipaina, 5 µg/ml leupeptina i 5 µg/ml aprotinina) i fosfatazne inhibitore (20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇ x 10 H₂O i 25 mM NaF). Dobijeni homogenat je profiltriran kroz troslojnu gazu i centrifugiran na maloj brzini (2000 x g, 10 min, 4°C), posle čega je supernatant iskorišćen za dobijanje citosolne i mikrozomalne, a talog za dobijanje jedarne frakcije.

Supernatant je, naime, ponovo centrifugiran na srednjoj brzini (10000 x g, 30 min, 4°C), a potom i u ultracentrifugi (10500 x g, 90 min, 4°C, Beckman L8-M). Tako dobijeni supernatant je čista citosolna frakcija, pa je alikvotiran i uskladišten na -70°C do upotrebe, a talog je iskorišćen za dobijanje mikrozomalne frakcije, tako što je inicijalno opran u 100 mM Na - pirofosfatnom puferu (pH 7,4), a zatim ultracentrifugiran (10500 x g, 90 min, 4°C, Beckman L8-M). Na taj način dobijeni talog resuspendovan je u 50 mM kalijum fosfatnom puferu (pH 7,4), sa 0,1 mM EDTA-Na₂, 20% glicerolom i 0,1 mM DTT-om, sonifikovan tri puta po 5 s sa pauzama od po 30 s (1 A, 50/60 Hz, 30% amplitude; Hielscher Ultrasound Processor), alikvotiran kao čista mikrozomalna frakcija i potom čuvan na - 70°C do upotrebe.

Talog dobijen posle centrifugiranja homogenata ispran je dva puta (2000 x g, 10 min, 4°C) u puferu za pranje jedara koji je sadržao 25 mM HEPES, pH 7,6, 10% glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM EGTA-Na₂, 2 mM DTT, 0,15 mM spermin, 0,15 mM spermidin, proteazne inhibitore (20 mM Na₂MoO₄, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin i 5 µg/ml aprotinin) i fosfatazne inhibitore (20 mM β - glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇ x 10H₂O i 25 mM NaF). Nakon pranja, pročišćena jedra u talogu su resuspendovana u jednoj zapremini pufera za liziranje jedara sačinjenog od 25 mM HEPES-a, pH 7,6, 1 M uree, 300 mM NaCl i 1% deterdženta Nonidet P-40. Resuspendovana jedra su inkubirana na ledu najmanje 60 min, uz intenzivno mešanje, a zatim centrifugirana (8400 x g, 10 min, 4°C). Dobijeni supernatant je prečišćena jedarna frakcija, pa je alikvotiran i uskladišten na -70°C do upotrebe.

3.2.6.2 Priprema ukupnog ćelijskog ekstrakta hipotalamusa

Hipotalamusi su homogenizovani u staklo-teflon homogenizeru (Potter-Elvehjem) sa 20 zaveslaja tučkom, u jednoj zapremini rashlađenog (4°C) RIPA pufera sačinjenog od 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA- Na_2 , 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% deterdženta Nonidet P-40, 0,15 mM spermina, 0,15 mM spermidina, proteaznih inhibitora (20 mM Na_2MoO_4 , 0,1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ antipaina, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina i 5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina) i fosfataznih inhibitora (20 mM β -glicerofosfata, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ i 25 mM NaF-a). Dobijeni homogenat je sonifikovan tri puta po 5 s sa pauzama od po 30 s (1 A, 50/60 Hz, 30% amplitude; Hielscher Ultrasound Processor), inkubiran na ledu najmanje 60 min uz intenzivno vorteksovanje, a zatim je centrifugiran (14000 x g, 20 min, 4°C). Dobijeni supernatant je ukupni ćelijski ekstrakt, koji je alikvotiran i uskladišten na -70°C do upotrebe.

3.2.6.3 Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Određivanje koncentracije proteina u ćelijskim frakcijama visceralnog masnog tkiva i ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa urađeno je modifikovanom Bradford kolorimetrijskom metodom (Spector 1978).

U 20 μl u odgovarajućoj meri razblaženih uzoraka i BSA standarda dodato je po 180 μl Spector-ovog reagensa (0.01% Coomasie Brilliant Blue G - 250, 4,8% etanol i 8,5% fosforna kiselina), te je, nakon 5 min inkubacije, u mikrotitar pločama sa 96 mesta izmerena apsorbanca na 595 nm pomoću spektrofotometra (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finska).

Koncentracija proteina očitana je sa standardne krive automatski konstruisane na osnovu apsorbaneci rastvora standarda, u opsegu poznatih koncentracija od 15 $\mu\text{g/ml}$ do 200 $\mu\text{g/ml}$ i izražena je u μg proteina/ml uzorka.

3.2.6.4 Western Blot analiza proteina

3.2.6.4.1 Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS - poliakrilamidnom gelu

Proteini iz ispitivanih uzoraka razdvojeni su elektroforezom na SDS - poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) na osnovu međusobnih razlika u molekulskoj masi, po modifikovanoj Laemmli metodi (Laemmli 1970).

Elektroforetskom razdvajanju prethodilo je kuvanje uzoraka (5 min na 100°C) u podjednakoj zapremini dvostruko koncentrovanog pufera za uzorke (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% β-merkaptotanol, 4% SDS, 1% Brom Fenol Plavo i 20% glicerol), tako da je na gel nanošena odgovarajuća količina proteina (40 μg proteina citosolne frakcije, ili 80 μg proteina jedarne i mikrozomalne frakcije visceralnog masnog tkiva, odnosno 100 μg proteina ukupnog ćelijskog ekstrakta hipotalamusa). Proteini su onda elektroforetski razdvojeni na 7,5% ili 10% poliakrilamidnim, denturišućim gelovima u puferu koji sadrži 0,025 M Tris, 0,192 M glicin i 0,1% SDS, u trajanju 90 min i pri konstantnom naponu od 120 V. Kao molekulski marker korišćena je smeša proteina poznatih molekulskih masa u opsegu od 10-170 kDa.

3.2.6.4.2 Western blot

Prenos proteina sa poliakrilamidnih gelova na PVDF membrane ostvaren je prekonoćnim mokrim transferom, pri konstantnoj struji od 135 mA po gelu, na temperaturi od 4°C. Prenosu je prethodilo polučasovno potapanje gelova u pufer za transfer (192 mM glicin 20% metanol i 25 mM Tris, pH 8,3) odmah po završetku elektroforeze. PVDF membrane su aktivirane držanjem u 100% metanolu u trajanju od 30 s, nakon čega su membrane inkubirane 20 min u puferu za transfer. Kvalitet transfera proveravan je bojenjem membrana 1% rastvorom *Ponceau S-a* u 5% sirćetnoj kiselini. Nespecifična mesta vezivanja antitela na membranama blokirana su njihovim inkubiranjem uz blago mućkanje u puferu za blokiranje [PBS pufer – (1,5 mM KH_2PO_4 , 16,3 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,14 M NaCl, pH 7,2)], koji je sadržao 3% obrano mleko], na sobnoj temperaturi, u trajanju od 60 min. Membrane su zatim inkubirane sa primarnim antitelima koja se specifično vezuju za protein od interesa, preko noći na 4°C (***Tabela 4***). Nakon ekstenzivnog ispiranja primarnih antitela u PBST puferu (0.1% Tween u PBS puferu), membrane su inkubirane 90 min na sobnoj temperaturi sa, u odgovarjućoj meri razblaženim (1:20000), sekundarnim antitelima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom. Nakon ispiranja PBST-om i PBS-om, imunopozitivne trake su vizuelizovane ECF metodom. Membrane su u tu svrhu inkubirane sa ECF supstratom čiju konverziju u fluorescirajući produkt katalizuje alkalna fosfataza, konjugovana sa sekundarnim antitelom. Fluorescencija je detektovana pomoću STORM skenera (Amersham Bioscience, Velika Britanija) i njen intenzitet je proporcionalan koncentraciji ciljnog proteina u uzorku.

Kvantitativno određivanje relativne optičke gustine imunoreaktivnih proteinskih traka na membranama urađeno je pomoću ImageQuant softvera (GE Healthcare, SAD) za analizu signala. Intenzitet svake trake normalizovan je prema intenzitetu trake β -aktina (za citosolnu frakciju i nuklearni ekstrakt visceralnog masnog tkiva i ukupni ćelijski ekstrakt hipotalamusa), odnosno kalneksina (za mikrozomalnu frakciju visceralnog masnog tkiva), koji su korišćeni kao kontrole za podjednako nanošenje proteina na gel. Membrane su pre vizuelizacije signala β -aktina i kalneksina ECF metodom inkubirane sa odgovarajućim primarnim i sekundarnim antitelima po 60 min, na sobnoj temperaturi.

3.3 Statistička obrada rezultata

Statistička analiza morfoloških, biohemijskih, fizioloških i histoloških parametara, kao i analiza rezultata dobijenih Western blot i real-time PCR analizom urađena je parametarskim Studentovim *t*-testom. Normalnost raspodele ispitana je *Shapiro-Wilk* testom koji se koristi za proveru tipa distribucije podataka kada je u analiziranoj grupi manje od 50 subjekata. Rezultati morfoloških, biohemijskih i fizioloških parametara su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD), dok su rezultati koji se odnose na *Western blot* i *qPCR* prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška (SEM, od eng. *standard error of the mean*). Statistički značajnima su smatrane vrednosti $p < 0,05$. Sve analize su urađene upotrebom statističkog programa GraphPad Prism v5.



4 Rezultati

Polazeći od postavljenih ciljeva istraživanja, u ovoj studiji su praćeni efekti hormonskog tretmana na razvoj reproduktivnih i metaboličkih karakteristika PCOS-a kod DHT-om tretiranih ženki pacova. Takođe, proučavan je i uticaj promena u signalnom putu glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu i hipotalamusu na nastanak metaboličkih karakteristika PCOS-a u ovom modelu.

4.1 Ženke pacova tretirane DHT-om kao model PCOS-a

4.1.1 Reproductivni parametri

Posle devedesetodnevnog tretmana DHT-om, ženke pacova bile su aciklične i u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa, uz dominanciju leukocita u vaginalnim brisevima. Kontrolne životinje su sa druge strane zadržale normalnu cikličnost, sa estrusnim ciklusom trajanja od 4 do 5 dana.

4.1.1.1 Morfometrijske karakteristike ovarijuma

Poređenja apsolutnih i relativnih masa ovarijuma i uterusa, ukazuju na statistički značajno smanjenje ovih parametara kod DHT-om tretiranih u odnosu na placebo životinje ($p < 0,05$). Sa druge strane, tretman nije doveo do promena koncentracije estradiola u krvnoj plazmi eksperimentalnih životinja (***Tabela 5***).

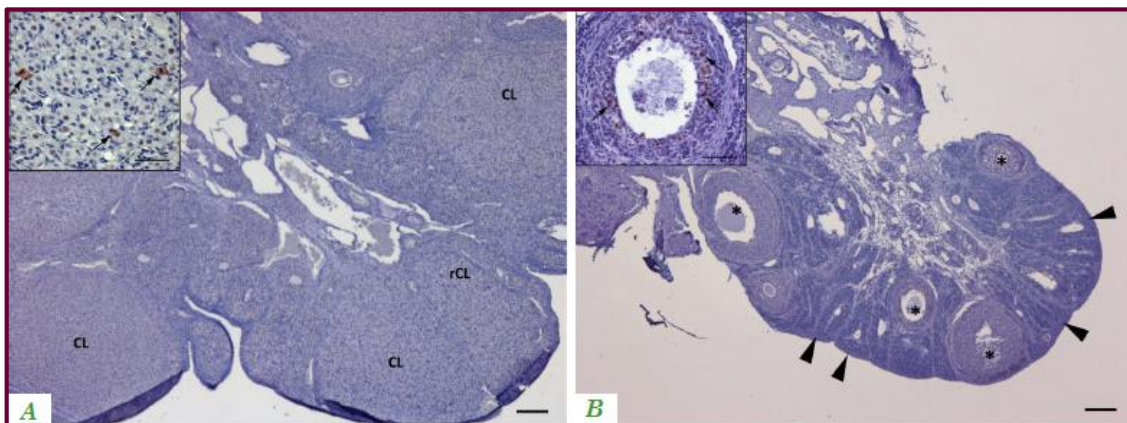
Tabela 5. Apsolutne i relativne mase ovarijuma i uterusa i koncentracija estradiola u krvnoj plazmi DHT-om tretiranih i placebo životinja

	<i>Placebo</i>	<i>DHT</i>
Ovarijum (g)	0,039 ± 0,008	0,024 ± 0,015 **
Ovarijum/telesna masa (x100)	0,015 ± 0,003	0,009 ± 0,006 **
Uterus (g)	0,44 ± 0,08	0,33 ± 0,14 *
Uterus/telesna masa (x100)	0,17 ± 0,02	0,11 ± 0,05 **
Estradiol (pg/ml)	4,74 ± 0,40	4,50 ± 0,43

Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Za statistički značajne smatrane su međugrupne razlike pri $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

4.1.1.2 Histološka i imunohistohemijska analiza jajnika

U skladu sa normalnim odvijanjem estrusnih ciklusa, jajnike placebo grupe odlikovalo je prisustvo nekoliko generacija žutih tela (CL, *corpora lutea*), zdravih folikula u svim fazama folikulogeneze i retkih atretičnih folikula u različitim stadijumima odumiranja (**Slika 4.1**). U regresivnim CL, aktivirana apoptotska kaspaza-3 prisutna je u imunoreaktivnim *granulosa* luteinskim ćelijama (**Slika 4.1A**). Ovarijumi DHT-om tretiranih životinja manji su u odnosu na jajnike placebo pacova, bez prisustva CL (**Slika 4.1B**). Analiza svetlosnim mikroskopom pokazala je da se većina folikula u jajnicima DHT tretiranih životinja nalazi u različitim fazama atrezije, sa brojnim sekundarnim intersticijalnim žlezdama na površini jajnika (**Slika 4.1B**). Folikuli u ranijim stadijumima atrezije sadrže aktiviranu kaspazu-3 u ćelijama *granulosa* sloja, dok u ona nije prisutna sekundarnim intersticijalnim žlezdama, pošto su u ovoj fazi *granulosa* ćelije već prošle kroz programiranu ćelijsku smrt (**Slika 4.1B**).



Slika 4.1. *Imunohistohemijska lokalizacija aktivne kaspaze-3 u jajnicima placebo (A) i DHT-om tretiranih (B) ženki pacova.*

A. Brojna zdrava žuta tela (corpora lutea (CL)) i retka regresivna CL (rCL) prisutna su u ovarijumima placebo ženki. U rCL su uočene granulosa luteinske ćelije imunoreaktivne na aktiviranu kaspazu-3 (**umetak-strelice**). **B.** Ovarijumi DHT-om tretiranih ženki manji su i odlikuje ih odsustvo CL i prisustvo brojnih sekundarnih intersticijalnih žlezda (**glave strelica**). Atretični folikuli (*) sa granulosa ćelijama pozitivnim na aktiviranu kaspazu-3 su takođe uočeni u jajnicima ženki tretiranih hormonom (**umetak –strelice**). Razmere: 100 μ m, umetci – 50 μ m.

4.1.2 Morfološki i metabolički parametri

4.1.2.1 Kalorijski unos, visina krvnog pritiska i pulsa, masa tela i apsolutna i relativna masa visceralnog masnog tkiva

Kod životinja izloženih dejstvu DHT-a tokom 90 dana uočeno je statistički značajno povećanje kalorijskog unosa ($p < 0,01$) u odnosu na placebo životinje. Kontinualno devedesetodnevno izlaganje ženki pacova tretmanu DHT-om dovelo je do visceralne gojaznosti, to jest statistički značajnog povećanja telesne mase, apsolutne mase visceralnog masnog tkiva ($p < 0,01$), kao i relativne mase visceralnog masnog tkiva izražene u odnosu na masu tela ($p < 0,05$) kod hormonom tretiranih u odnosu na placebo životinje (**Tabela 6**).

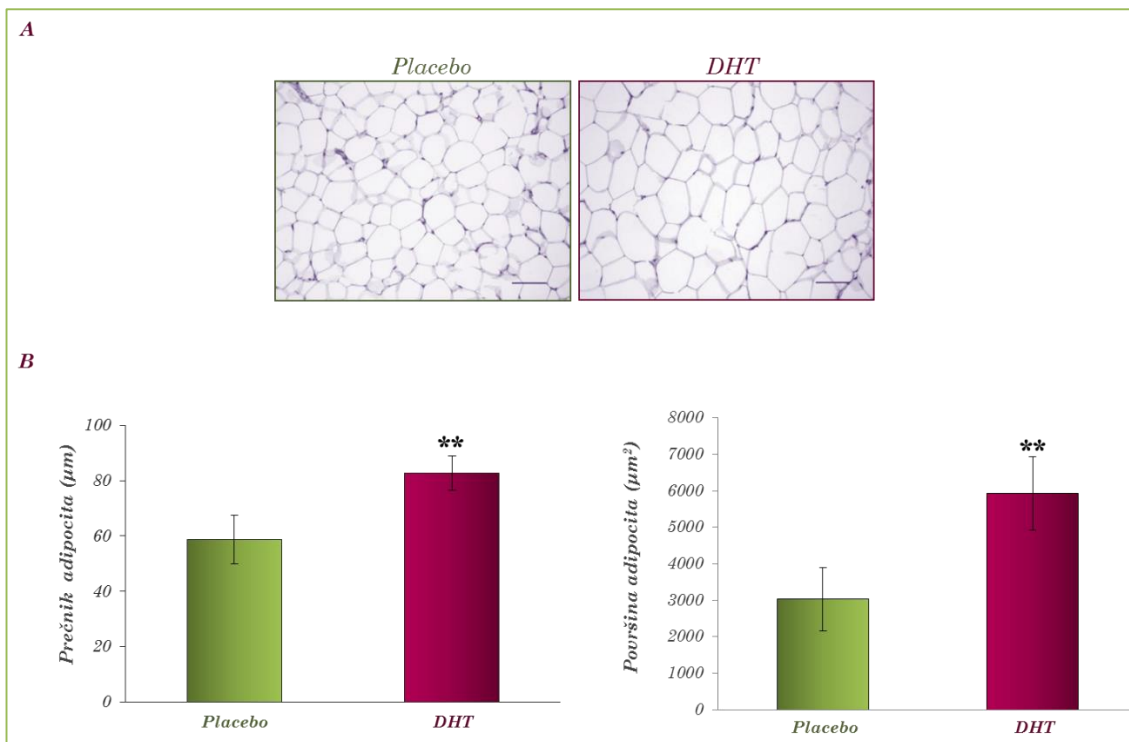
Tabela 6. Morfološki i metabolički i parametri placebo životinja i životinja tretiranih DHT-om

	<i>Placebo</i>	<i>DHT</i>
<i>Kalorijski unos (kJ/dan/pacov)</i>	177,20 ± 30,10	191,30 ± 34,90 **
<i>Telesna masa (g)</i>	255,10 ± 13,50	295,80 ± 40,27 **
<i>Masa visceralnog masnog tkiva (g)</i>	9,34 ± 2,29	13,02 ± 2,48 **
<i>Masa visceralnog masnog tkiva/masa tela (x100)</i>	3,60 ± 0,92	4,31 ± 0,48 *
<i>Sistolni krvni pritisak (mmHg)</i>	115,80 ± 10,50	122,0 ± 11,40
<i>Puls (otkucaji/min)</i>	453,30 ± 43,60	464,10 ± 55,40

Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Za statistički značajne smatrane su razlike pri $p < 0,05$ (, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).*

4.1.2.2 Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva

Histološkom analizom poprečnih preseka visceralnog masnog tkiva, uočeno je statistički značajno povećanje veličine adipocita kod ženki pacova tretiranih DHT-om u odnosu na adipocite placebo životinja (*Slika 4.2A*). Daljom morfometrijskom analizom potvrđeno je da kod DHT grupe postoji statistički značajno povećanje prečnika i površine adipocita u odnosu na iste parametre kod placebo grupe životinja ($p < 0,01$) (*Slika 4.2B*).



Slika 4.2. Histološka i morfometrijska analiza visceralnog masnog tkiva

A. Histološki preparati visceralnog masnog tkiva dobijeni nakon bojenja hematoxilin-eozinom. **B.** Rezultati morfometrijske analize adipocita visceralnog masnog tkiva placebo i DHT-om tretiranih životinja. Pri analizi je korišćen program Adiposoft. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD. Za statistički značajne smatrane su međugrupne razlike pri $p < 0,05$ (**, $p < 0,01$).

4.1.2.3 Slobodne masne kiseline i trigliceridi u krvnoj plazmi

Rezultati merenja koncentracija triglicerida u krvi i FFA u plazmi ukazuju na statistički značajno povećanje ovih parametara kod DHT-om tretiranih u odnosu na placebo životinje ($p < 0,001$ i $p < 0,05$, redom) (*Tabela 7*).

Tabela 7. Koncentracija triglicerida u krvi i slobodnih masnih kiselina u plazmi DHT-om tretiranih i placebo pacova

	<i>Placebo</i>	<i>DHT</i>
<i>Trigliceridi (mmol/l)</i>	<i>1,09 ± 0,17</i>	<i>1,59 ± 0,34 ***</i>
<i>FFA (mmol/l)</i>	<i>0,46 ± 0,10</i>	<i>0,59 ± 0,14 *</i>

Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$ (, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).*

4.1.2.4 Parametri insulinske osetljivosti

Koncentracija glukoze u krvnoj plazmi i tolerancija na glukozu određena IP-GTT-om nisu izmenjene kod ženki pacova tretiranih DHT-om u poređenju sa placebo životinjama. Sa druge strane, koncentracija insulina i HOMA indeks, kao mere sistemske insulinske osetljivosti, značajno ($p<0,05$) su se povećali kod DHT-om tretiranih u odnosu na placebo pacove (*Tabela 8*) (Tepavčević i sar. 2014).

Tabela 8. Parametri insulinske osetljivosti, kod DHT-om tretiranih i placebo životinja

	<i>Placebo</i>	<i>DHT</i>
<i>Glukoza (mmol/l)</i>	$3,48 \pm 0,49$	$3,20 \pm 0,43$
<i>Insulin (mIU/l)</i>	$9,61 \pm 5,15$	$18,83 \pm 12,17^*$
<i>HOMA indeks</i>	$1,47 \pm 0,72$	$2,62 \pm 1,75^*$
<i>IPGTT-glukozni maksimum</i>	$10,75 \pm 3,38$	$12,92 \pm 4,38$
<i>IPGTT glukoza- AUC</i>	$924,2 \pm 187,60$	$965,5 \pm 166,10$

Rezultati su obrađeni studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (, $p<0,05$).*

4.1.2.5 Koncentracija leptina i kortikosterona u plazmi i kortikosterona u visceralnom masnom tkivu

Koncentracija kortikosterona u plazmi pacova ostala je nepromenjena, dok se koncentracija ovog hormona u citosolnoj frakciji ćelija visceralnog masnog tkiva i leptina u plazmi posle tretmana DHT-om statistički značajno povećala u odnosu na koncentraciju izmerenu kod placebo životinja (*Tabela 9*).

***Tabela 9.** Koncentracija leptina i kortikosterona u krvnoj plazmi i kortikosterona u citosolnoj frakciji ćelija visceralnog masnog tkiva DHT-om tretiranih i placebo pacova*

	<i>Placebo</i>	<i>DHT</i>
<i>Leptin u plazmi (ng/ml)</i>	1,57 ± 0,97	3,15 ± 2,42**
<i>Kortikosteron u plazmi (ng/ml)</i>	91,94 ± 46,37	116,50 ± 32,73
<i>Kortikosteron u visceralnom masnom tkivu (ng/mg)</i>	1,67 ± 1,47	4,08 ± 1,85*

Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$ (, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).*

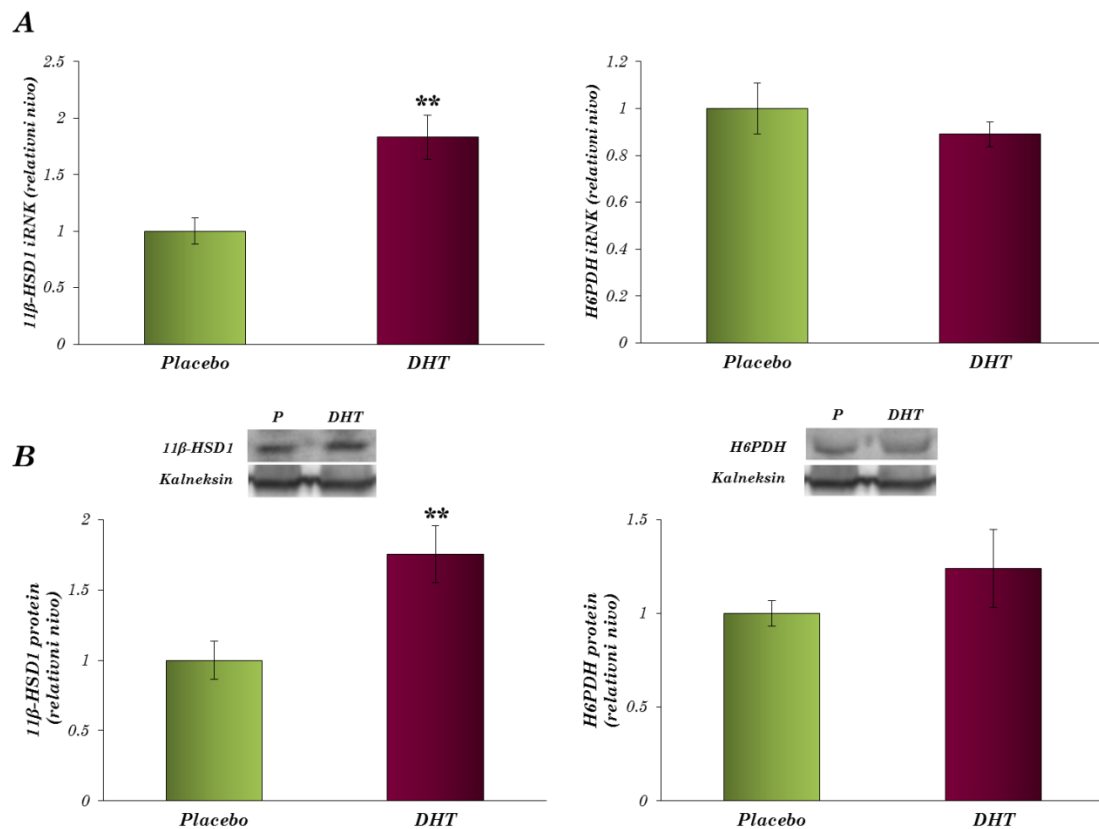
4.2 Signalni put glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu

Osim merenjem reproduktivnih i metaboličkih parametara, efekti devedesetodnevnog tretmana DHT-om praćeni su i analizom signalnog puta glukokortikoida, odnosno faktora uključenih u lipogene i lipolitičke procese i inflamaciju u visceralnom masnom tkivu. Ti faktori odabrani su za analize transkripcionih i proteinskih nivoa jer se njihova ekspresija i/ili funkcija nalaze pod posrednom ili neposrednom kontrolom glukokortikoidnim hormonima u visceralnom masnom tkivu.

4.2.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida

Prereceptorski metabolizam glukokortikoida analiziran je osim određivanjem koncentracije kortikosterona u visceralnom masnom tkivu (odeljak 4.1.2.5) i praćenjem nivoa transkripcije i proteinskih nivoa elemenata enzimskog sistema zaduženog za unutarćelijsku regeneraciju ovih hormona. 11 β -HSD1 i H6PDH su mikrozomalni enzimi ključni za konverziju neaktivne forme glukokortikoida, dehidrokortikosterona u biološki aktivni kortikosteron.

Real-time PCR analiza relativnog nivoa iRNK za 11 β -HSD1 pokazala je da nakon tretmana životinja DHT-om dolazi do njenog statistički značajnog povećanja ($p < 0,01$), dok je relativni nivo iRNK za H6PDH ostao nepromenjen. Iste takve promene za 11 β -HSD1 ($p < 0,01$) i H6PDH uočene su i nakon Western blot analize relativnih nivoa odgovarajućih proteina u mikrozomalnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (*Slika 4.3*).



Slika 4.3. Relativne koncentracije proteina i iRNK za 11β-HSD1 i H6PDH u visceralnom masnom tkivu tretiranih pacova

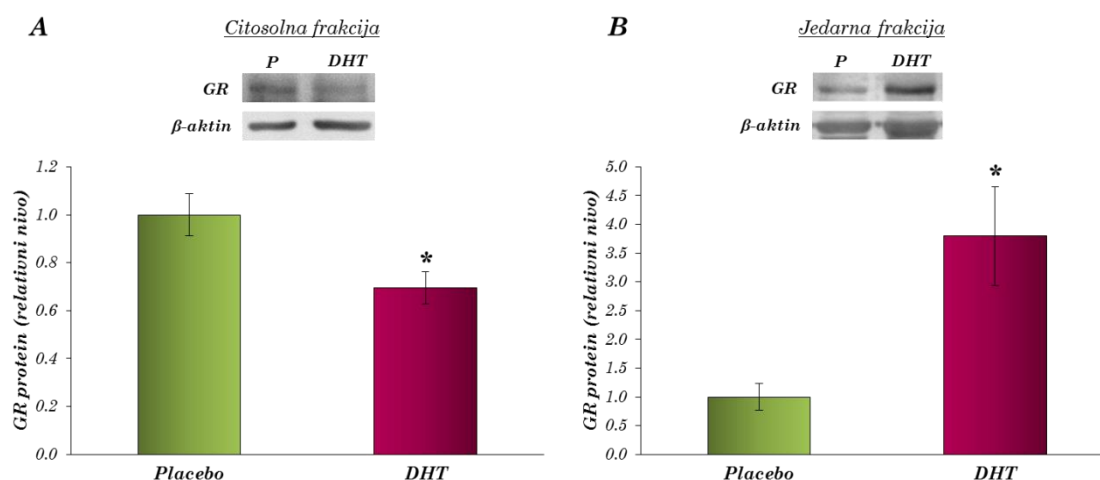
A. Relativna koncentracija iRNK za 11β-HSD1 i za H6PDH u visceralnom masnom tkivu placebo i životinja tretiranih DHT-om. Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju HPRT1, kao endogene kontrole.

B. Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativni nivoi 11β-HSD1 i H6PDH u mikrozomalnoj frakciji visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih DHT-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je kalneksin. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Statistički značajnim smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$ (**, $p < 0,01$). Oznake: **P** - placebo, **DHT** - grupa tretirana 5α-dihidrotestosteronom.

4.2.2 Unutarćelijska distribucija GR-a

Radi utvrđivanja uticaja povećanja koncentracije kortikosterona na aktivaciju i prelaz GR-a iz citosola u jedro ćelija visceralnog masnog tkiva, Western blot analizom je praćena unutarćelijska raspodela ovog regulatora transkripcije.

Nakon tretmana DHT-om došlo je do statistički značajnog smanjenja nivoa proteina GR-a u citosolnoj frakciji (*Slika 4.4A, $p < 0,05$*) i istovremenog povećanja ovog proteina u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva (*Slika 4.4B, $p < 0,05$*), odnosno do aktivacije GR-a i njegovog prelaska iz citoplazme u jedro.



Slika 4.4. Unutarćelijska distribucija GR-a između citosolne i jedarne frakcije ćelija visceralnog masnog tkiva placebo i DHT grupe životinja

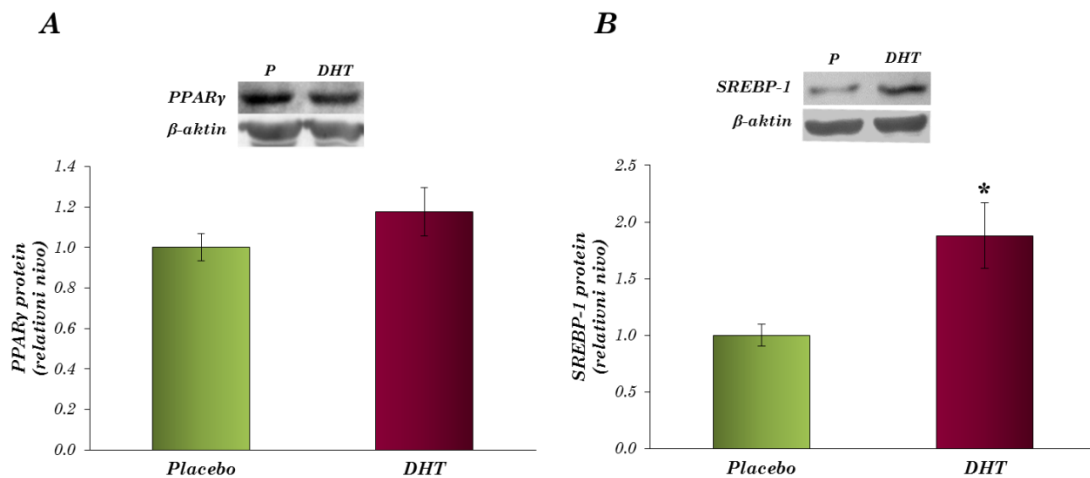
Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativni nivoi GR-a u citosolnoj (A) i jedarnoj (B) frakciji visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih DHT-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β-aktin. Rezultati su analizirani Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$). Oznake: **P-placebo**, **DHT-grupa tretirana 5α-dihidrotetosteronom**.

4.2.3 Ekspresija enzima lipidnog metabolizma regulisanih glukokortikoidima u visceralnom masnom tkivu DHT-om tretiranih pacova

Uvećanje masnog tkiva može biti rezultat dva različita procesa – hiperplazije i hipertrofije adipocita. Glukokortikoidi u visceralnom masnom tkivu mogu paralelno imati i kataboličke i anaboličke efekte na lipidni metabolizam u zavisnosti od toga u kojoj populaciji ćelija i kojem depou masnog tkiva ostvaruju svoja dejstva. U tom smislu, praćene su promene transkripcije i nivoa proteina, kako proadipogenih i prolipogenih, tako i prolipolitičkih faktora čija su ekspresija i aktivnost povezana sa dejstvima glukokortikoida, radi utvrđivanja efekata ovih hormona na lipidni metabolizam u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om.

4.2.3.1 Transkripcioni i proteinski nivoi proadipogenih i prolipogenih faktora

Određivanjem unutarćelijske distribucije i nivoa transkripcionih regulatora PPAR γ , SREBP-1 i lipina-1, kao i određivanjem promene nivoa transkripcije gena za FAS izvršena je analiza adipogenih i lipogenih procesa pod uticajem glukokortikoida u visceralnom masnom tkivu DHT-om tretiranih pacova.



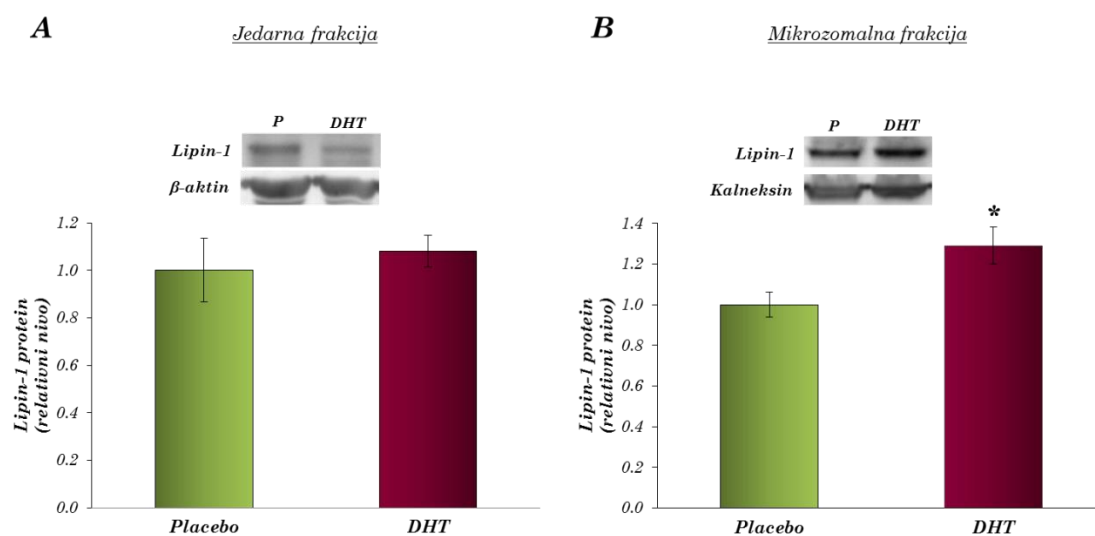
Slika 4.5. Relativne koncentracije proteina PPAR γ i SREBP-1 u jedarnoj frakciji ćelija visceralnog masnog tkiva

Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i promene relativnih nivoa proteina PPAR γ (**A**) i SREBP-1 (**B**) u jedarnoj frakciji ćelija visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih DHT-om. Rezultati su analizirani Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajnu smatrana je razlika između grupa pri $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$). Oznake: **P-placebo**, **DHT-grupa tretirana 5 α -dihidrotestosteronom**.

Prikaz na **Slici 4.5.** pokazuje da posle tretmana DHT-om nema statistički značajne promene relativnog nivoa proteina PPAR γ u jedarnoj frakciji visceralnog masnog tkiva. Sa druge strane, u istoj frakciji je uočeno statistički značajno povećanje nivoa proteina SREBP-1 ($p < 0,05$) kod DHT-om tretiranih u odnosu na placebo pacove, pa se može reći da posle primene DHT-a dolazi do uspostavljanja proadipogenog i prolipogenog dejstva ovog transkripcionog regulatora.

Analizom ćelijske distribucije lipina-1 između jedarne i mikrozomalne frakcije ćelija visceralnog masnog tkiva potvrđeno je da posle hormonskog tretmana dolazi do aktivacije procesa lipogeneze. Nivo lipina-1, naime, ostao je nepromenjen u nuklearnoj frakciji, ali je došlo do njegovog statistički značajnog povećanja u mikrozomalnoj frakciji ($p < 0,05$), što ukazuje na

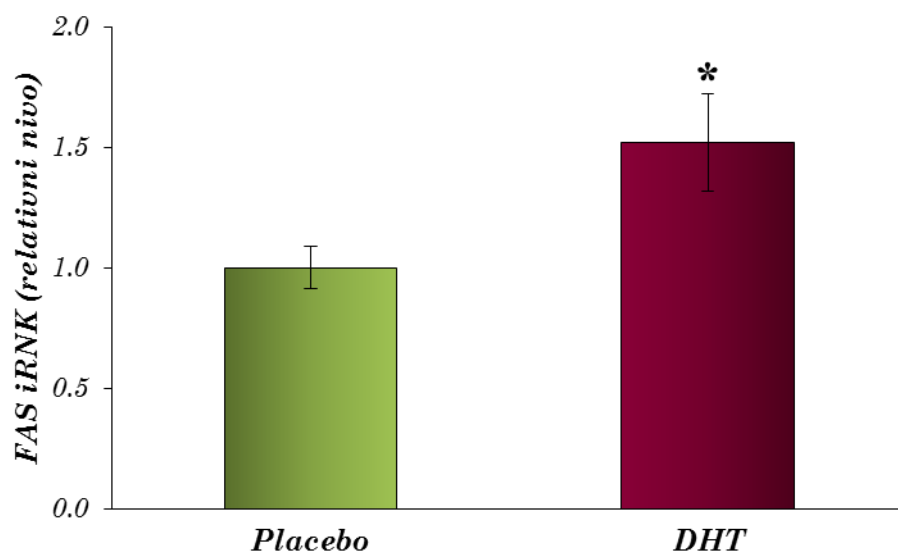
povećanje enzimske (PAP-1) aktivnosti lipina-1, u ćelijama visceralnog masnog tkiva kod DHT-om tretiranih životinja (*Slika 4.6*).



Slika 4.6. Unutarćelijska distribucija lipina-1 u ćelijama visceralnog masnog tkiva DHT-om tretiranih pacova

Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativni proteinski nivoi lipina-1 u jedarnoj (A) i mikrozomalnoj frakciji (B) visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih DHT-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β -aktin u jedarnoj i kalneksin u mikrozomalnoj frakciji. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p < 0.05$ (*, $p < 0.05$). Oznake: **P-placebo**, **DHT-grupa tretirana 5 α - dihidrotestosteronom**.

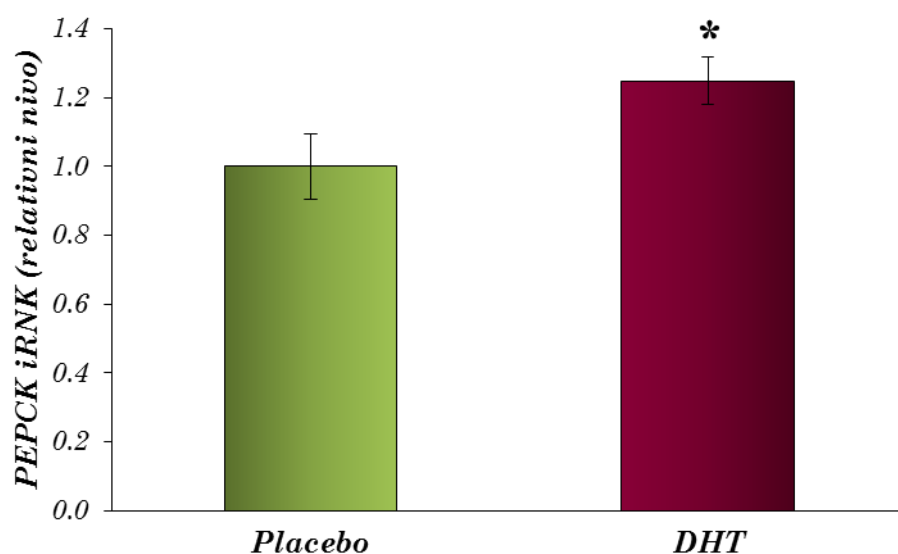
Osim analizom ekspresije lipina-1, uticaji tretmana DHT-om na lipogenezu procenjeni su i analizom ekspresije gena za FAS. Uočeno je statistički značajno povećanje transkripcije ovog gena u visceralnom masnom tkivu ($p < 0.05$, *Slika 4.7*) kod DHT-om tretiranih u poređenju sa placebo životinjama.



Slika 4.7. Relativna koncentracija iRNA prolipogenog gena za FAS u visceralnom masnom tkivu placebo i DHT-om tretiranih pacova

Relativna koncentracija iRNA za FAS je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNA za HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Statistički značajnim smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$).

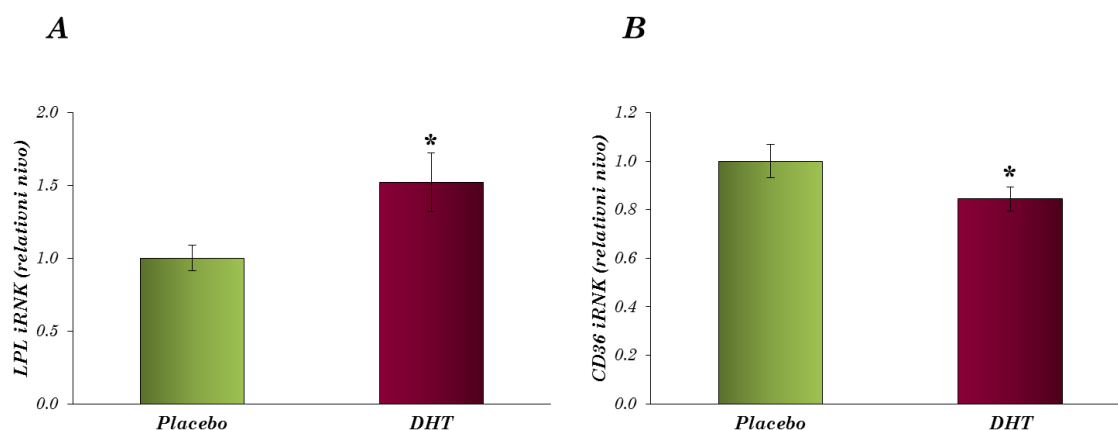
Transkripcija gena za PEPCK je takođe statistički značajno povećana ($p<0,05$) kod hormonom tretiranih u odnosu na placebo životinje (*Slika 4.8*)



Slika 4.8. Relativna koncentracija iRNK za PEPCK u visceralnom masnom tkivu placebo i životinja tretiranih DHT-om

Relativna koncentracija iRNK je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Statistički značajnim smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$).

U ovoj studiji praćene su i promene ekspresije gena za LPL, vaskularnu lipazu koja oslobađa masne kiseline iz hilomikrona i VLDL čestica prisutnih u krvotoku. One potom bivaju unešene u adipocite pomoću transportera, CD36, čija je ekspresija takođe praćena u ovoj studiji. Na **Slici 4.9** može se uočiti da je došlo do statistički značajnog povećanja transkripcije gena za LPL, odnosno smanjenja ekspresije gena za CD36 ($p<0,05$) posle tretmana DHT-om.



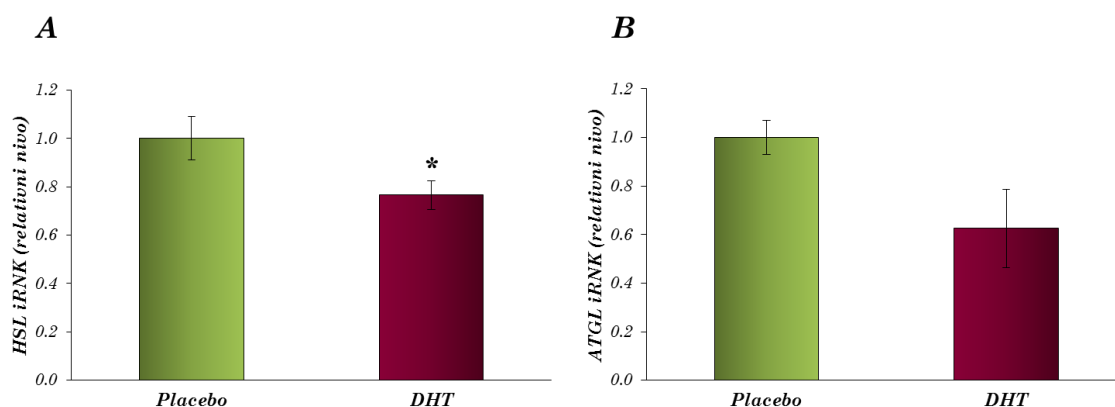
Slika 4.9. Relativna koncentracija iRNA LPL (A) i CD36 gena (B) u visceralnom masnom tkivu placebo i životinja tretiranih DHT-om

Relativna koncentracija iRNA je izračunata u odnosu na koncentraciju HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$).

4.2.3.2 Transkripcioni nivoi prolipolitičkih faktora regulisanih GR-om

Ekspresija prolipolitičkih gena regulisanih GR-om praćena je radi analize promena lipidnog katabolizma pod uticajem glukokortikoida kod DHT-om tretiranih životinja.

Posle devedesetodnevnog tretmana androgenom došlo je do statistički značajnog smanjenja transkripcije gena za HSL ($p<0,05$; *Slika 4.10A*), ali nije uočena promena relativne ekspresije iRNK ATGL gena (*Slika 4.10B*).



Slika 4.10. Relativna koncentracija iRNK za HSL (A) i ATGL (B) u visceralnom masnom tkivu placebo i životinja tretiranih DHT-om

Relativna koncentracija iRNK za ciljane gene je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni su kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$).

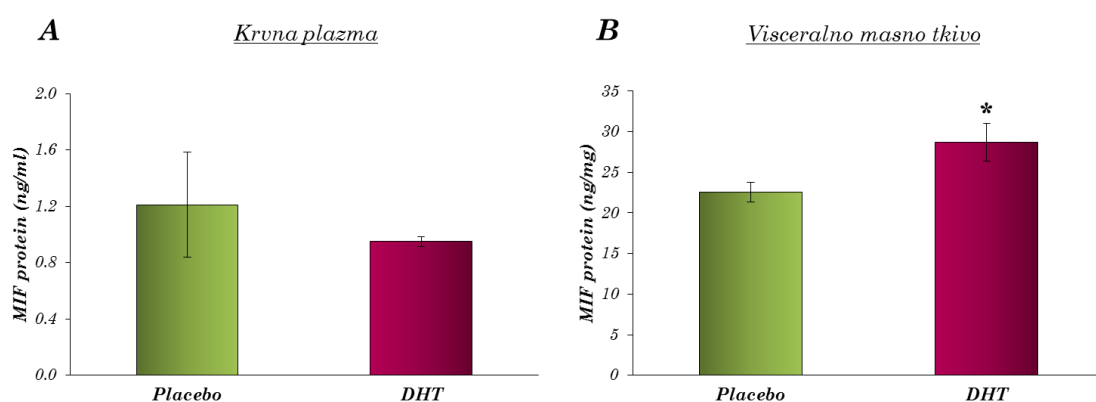
4.3 Metabolička inflamacija i insulinska rezistencija u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om

Jedna od mogućih posledica visceralne gojaznosti je pojava metaboličke inflamacije, koja, sa svoje strane, pospešuje uspostavljanje insulinske rezistencije na nivou organizma. Visceralno masno tkivo jedno je od ciljnih tkiva insulina, pa je u ovoj studiji analizirana insulinska osetljivost tog tkiva, radi sticanja generalne predstave o njenom učešću u razvoju insulinske rezistencije kod DHT-om tretiranih pacova.

4.3.1 Metabolička inflamacija u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om

Metabolička inflamacija ispitana je merenjem koncentracije MIF kao proinflamatornog citokina, u plazmi i visceralnom masnom tkivu, kao i transkripcionog faktora NF κ B u visceralnom masnom tkivu tretiranih ženki pacova. Pored navedenih analizirani su i nivoi iRNK za proinflamatorne citokine TNF α , IL-6 i IL-1 β .

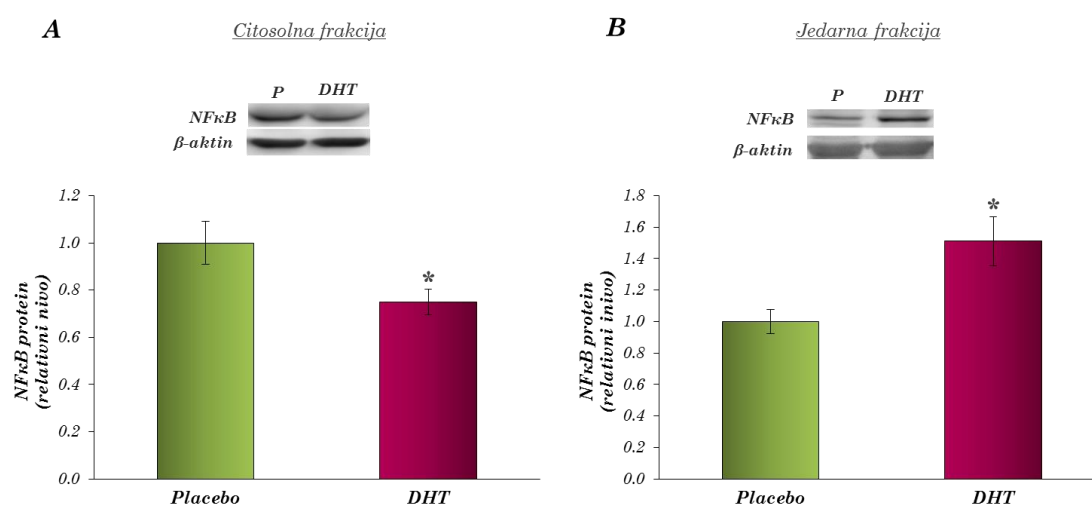
Posle tretmana DHT-om, koncentracija MIF u krvnoj plazmi ženki pacova nije se promenila, za razliku od tkivne koncentracije ovog faktora koja se statistički značajno povećala ($p<0,05$, *Slika 4.11*).



Slika 4.11. Koncentracije proteina MIF u krvnoj plazmi (A) i citosolu ćelija visceralnog masnog tkiva (B)

Tkivna koncentracija MIF u citosolnoj frakciji visceralnog masnog tkiva normalizovana je u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina u ovoj frakciji. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$).

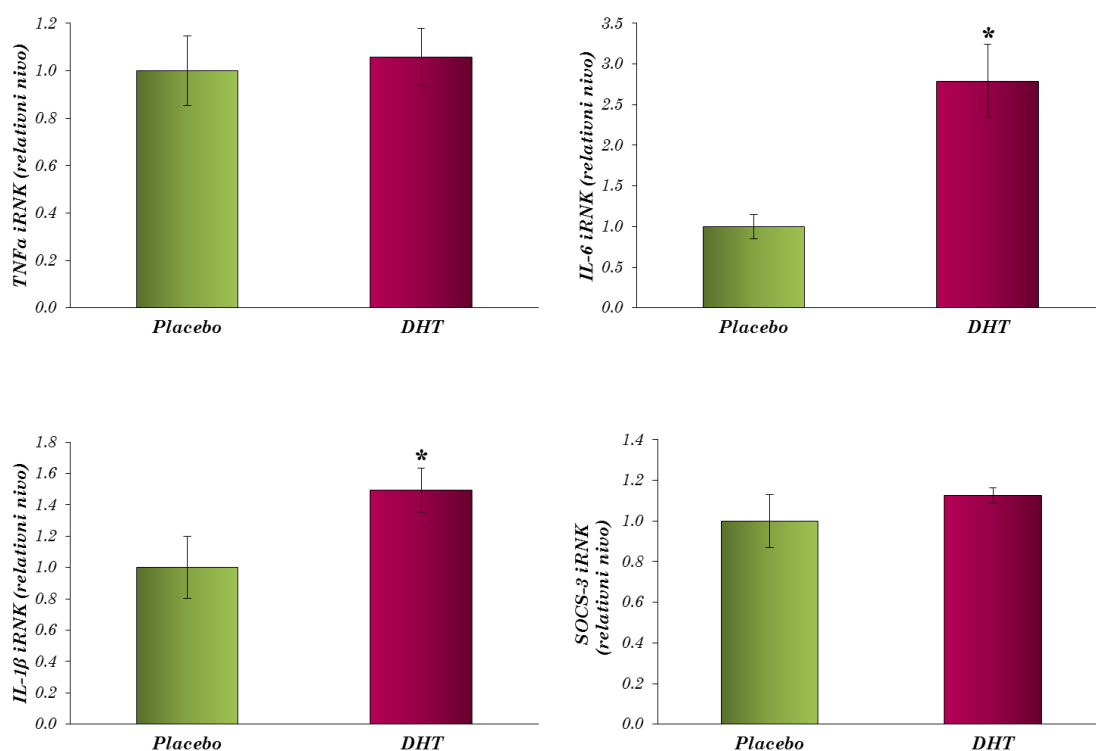
Rezultati Western blot analize ćelijske distribucije transkripciono aktivne subjedinice NFκB (p65), ukazuju na prelazak ovog proteina iz citosola u jedro, s obzirom na statistički značajno smanjenje njegovog nivoa u citosolnoj i odgovarajuće povećanje nivoa ovog transkripcionog faktora u jedarnoj frakciji ćelija visceralnog masnog tkiva pacova tretiranih DHT-om ($p<0,05$; *Slika 4.12*).



Slika 4.12. Unutarćelijska distribucija proteina NFκB između citosolne i jedarne frakcije visceralnog masnog tkiva DHT-om tretiranih pacova.

Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativni proteinski nivoi NFκB u citosolnoj (A) i jedarnoj (B) frakciji visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih DHT-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β-aktin za obe frakcije. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$). Oznake: P-placebo, DHT-grupa tretirana 5α - dihidrotestosteronom.

Ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-6 i IL-1 β je statistički značajno povećana ($p<0,05$), dok su nivoi iRNK za TNF α i SOCS-3 ostali nepromenjeni u ćelijama visceralnog masnog tkiva DHT-om tretiranih životinja (**Slika 4.13**). Izloženi rezultati sugerišu da je posle tromesečnog tretmana ženki pacova DHT-om došlo do uspostavljanja inflamacije niskog stepena u visceralnom masnom tkivu, ali da uticaji SOCS-3 na inflamatorne procese i smanjenje insulinske signalizacije nisu izraženi u visceralnim masnom tkivu našeg modela PCOS-a.

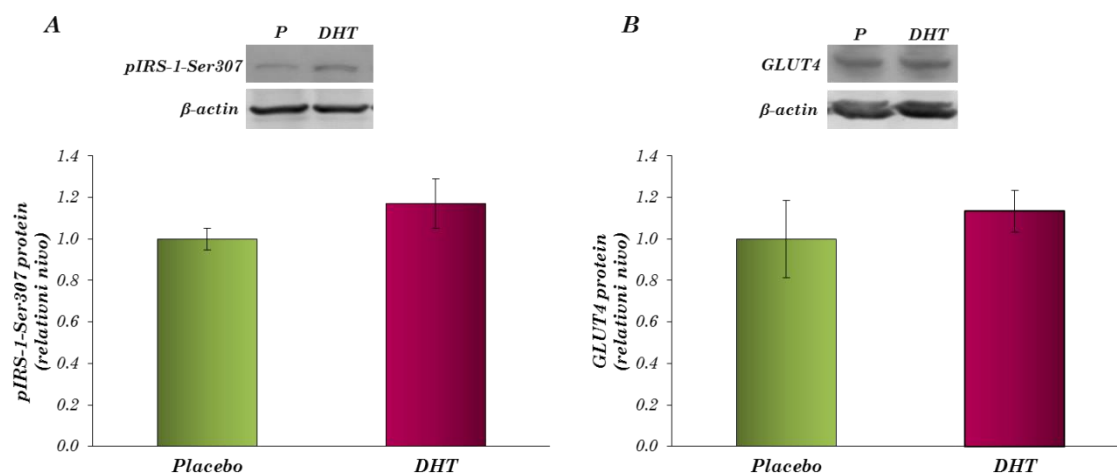


Slika 4.13. *Relativne koncentracije iRNK za TNF α , IL6, IL-1 β i SOCS-3 u visceralnom masnom tkivu pacova tretiranih DHT-om.*

Relativna koncentracija iRNK za ciljane gene je izračunata u odnosu na koncentraciju iRNK za HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p<0,05$ (*, $p<0,05$).

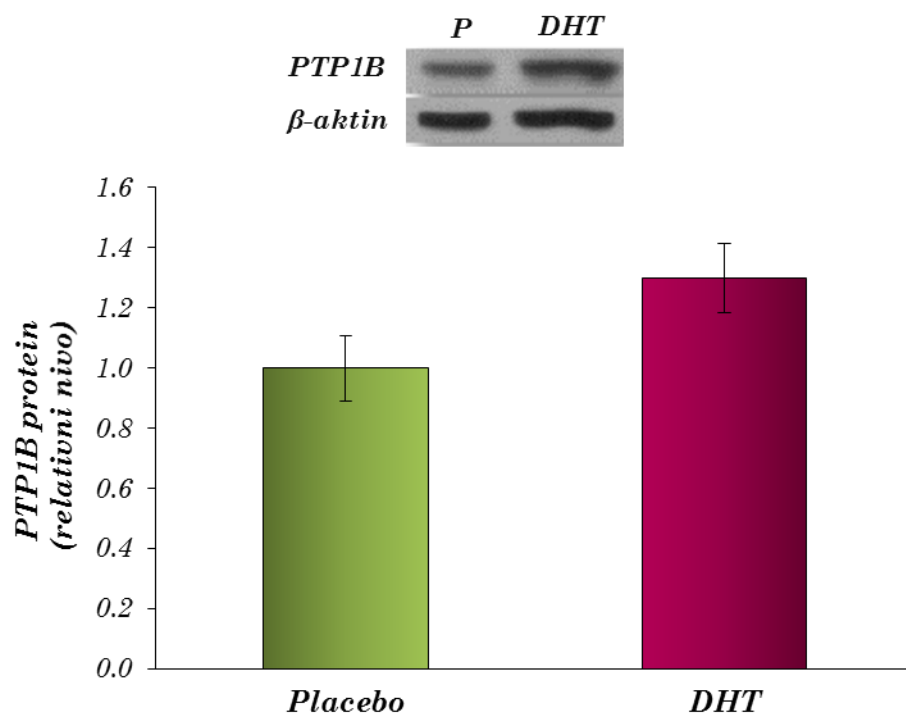
4.3.2 Signalni put insulina u visceralnom masnom tkivu DHT-om tretiranih pacova

Na **Slikama 4.14.** i **4.15.** prikazani su rezultati Western blot analiza komponenti signalnog puta insulina u visceralnom masnom tkivu, proteina IRS-1 sa inhibitornom fosforilacijom na Ser 307, glukoznog transportera GLUT4, kao i fosfataze PTP1B. Analiza ovih molekula ukazuje na nepromenjenu osetljivost visceralnog masnog tkiva na insulin posle tretmana DHT-om, mada treba naglasiti da relativna koncentracija proteina PTP1B pokazuje trend povećanja ($p < 0,08$).



Slika 4.14. Relativne koncentracije proteina pIRS-1-Ser³⁰⁷ i GLUT4 u ćelijama visceralnog masnog tkiva

Reprezentativni blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativni proteinski nivoi pIRS-1 (A) i GLUT4 (B) u ćelijama visceralnog masnog tkiva placebo (P) i životinja tretiranih DHT-om (DHT). Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β -aktin. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Oznake: P - placebo, DHT - grupa tretirana 5 α -dihidrotestosteronom.



Slika 4.15. Relativna koncentracija proteina *PTP1B* u ćelijama visceralnog masnog tkiva

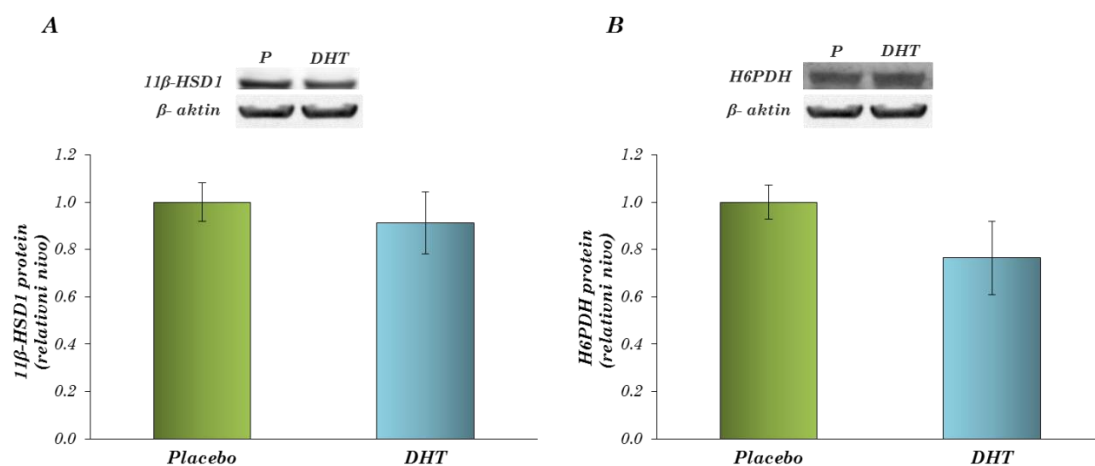
Reprezentativni Western blot sa imunoreaktivnim trakama i relativni proteinski nivoi *PTPB1* proteina u ćeljama visceralnog masnog tkiva placebo i životinja tretiranih *DHT*-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β -aktin. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Oznake: ***P***-placebo, ***DHT***-grupa tretirana 5 α -dihidrotestosteronom.

4.4 Signalni putevi glukokortikoida i leptina i inflamacija u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om

Posledice tretmana androgenom na uspostavljanje metaboličkih poremećaja asociranih sa PCOS-om analizirane su i na nivou centralnog nervnog sistema, to jest u hipotalamusu kao delu mozga zaduženom za regulaciju energetske ravnoteže. U tom smislu, praćene su promene glukokortikoidne i leptinske signalizacije.

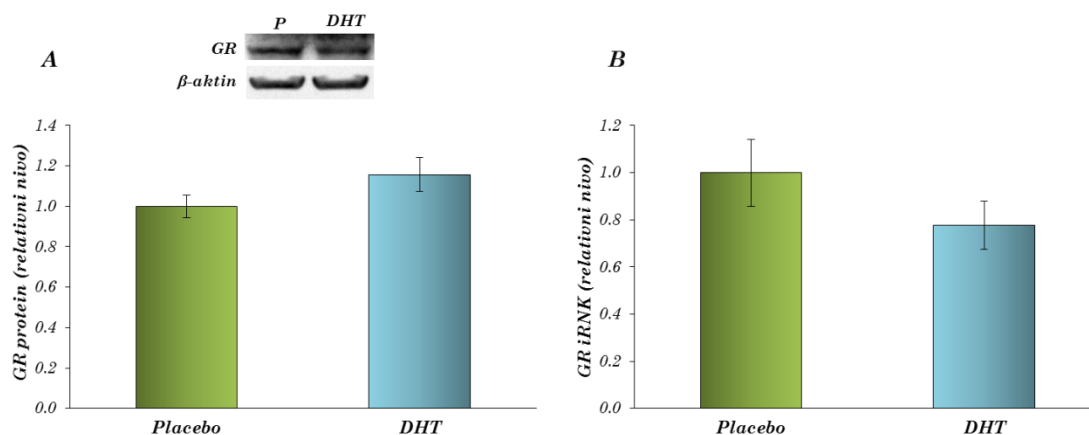
4.4.1 Prereceptorski metabolizam glukokortikoida i unutarćelijski nivoi GR-a u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om

Promene u signalizaciji glukokortikoida ispitivane su Western blot analizama prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, real-time PCR analizama tanskripcije gena za GR i Western blot analizama relativnog nivoa proteina GR u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa. Rezultati ovih analiza predstavljeni su grafički, na ***Slikama 4.16.*** i ***4.17.*** i ukazuju na neizmenjenu regeneraciju i signalizaciju glukokortikoida u hipotalamusu DHT-om tretiranih pacova.



Slika 4.16. Relativne koncentracije enzima uključenih u prereceptorski metabolizam glukokortikoida u hipotalamusu tretiranih pacova

Reprezentativni Western blotovi sa imunoreaktivnim trakama i relativne koncentracije 11β-HSD1 (A) i H6PDH (B) enzima u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa placebo i životinja tretiranih DHT-om. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β-aktin. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Oznake: *P*-placebo, *DHT*-grupa tretirana 5α-dihidrotestosteronom.

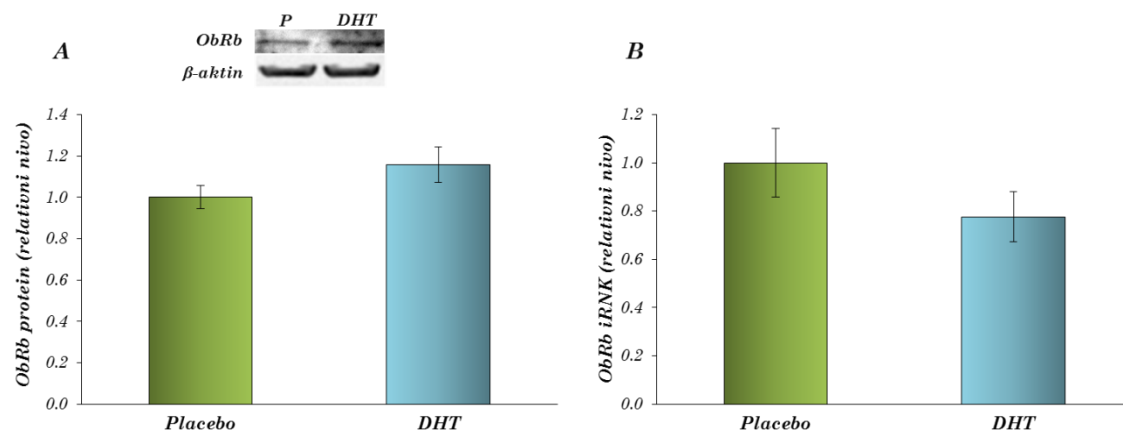


Slika 4.17. *Relativne koncentracije proteina i iRNK za GR u hipotalamusu tretiranih pacova*

Reprezentativni Western blot sa imunoreaktivnim trakama i relativni nivo GR-a u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa placebo (P) i životinja tretiranih DHT-om (DHT) (A). Relativni nivo iRNK za GR u hipotalamusu (B). Kao kontrola jednakog nanošenja proteina u Western blot eksperimentima korišćen je β -aktin, a kao endogena kontrola u real-time PCR eksperimentima korišćena je HPRT1. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM.

4.4.2 Komponente leptinskog signalnog puta čija je ekspresija pod kontrolom glukokortikoidnih hormona

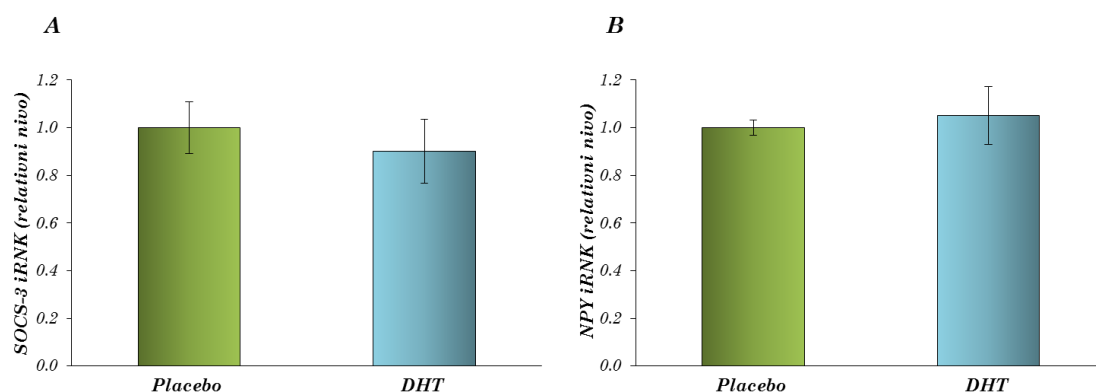
Osim prereceptorskog metabolizma glukokortikoida i nivoa njihovog receptora, u hipotalamusu su određivane i komponente leptinskog signalnog puta čija se ekspresija nalazi pod kontrolom ovih hormona. Real time PCR analizom određeni su relativni nivoi ekspresije gena za ObRb i SOCS-3, dok je Western blot analizom određen relativni nivo ObRb. Na *Slici 4.18* prikazani su rezultati koji ukazuju da centralna leptinska rezistencija nije uspostavljena smanjenjem ekspresije gena za ObRb i relativnih nivoa odgovarajućeg proteina u hipotalamusu pacova tretiranih DHT-om.



Slika 4.18. Relativne koncentracije proteina i iRNA za ObRb u hipotalamusu tretiranih pacova

Reprezentativni Western blot sa imunoreaktivnim trakama i relativni nivo ObRb-a u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa placebo (**P**) i životinja tretiranih DHT-om (**DHT**) **A**. Relativni nivoi iRNA za ObRb u hipotalamusu **B**. Kao kontrola jednakog nanošenja proteina u Western blot eksperimentima korišćen je β-aktin, a za endogenu kontrolu u real time PCR eksperimentima korišćena je HPRT1. Rezultati su obrađeni Studentovim t-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM.

Jedan od potencijalnih markera uspostavljanja centralne leptinske rezistencije je i povišena ekspresija gena za SOCS-3. Na **Slici 4.19A** se može videti da do promene relativnih nivoa iRNA za SOCS-3 nije došlo kod životinja tretiranih DHT-om, što implicira da hormonski tretman ne uzrokuje smanjenje centralne osetljivosti na leptin uticajem na ekspresiju ovog regulatora.



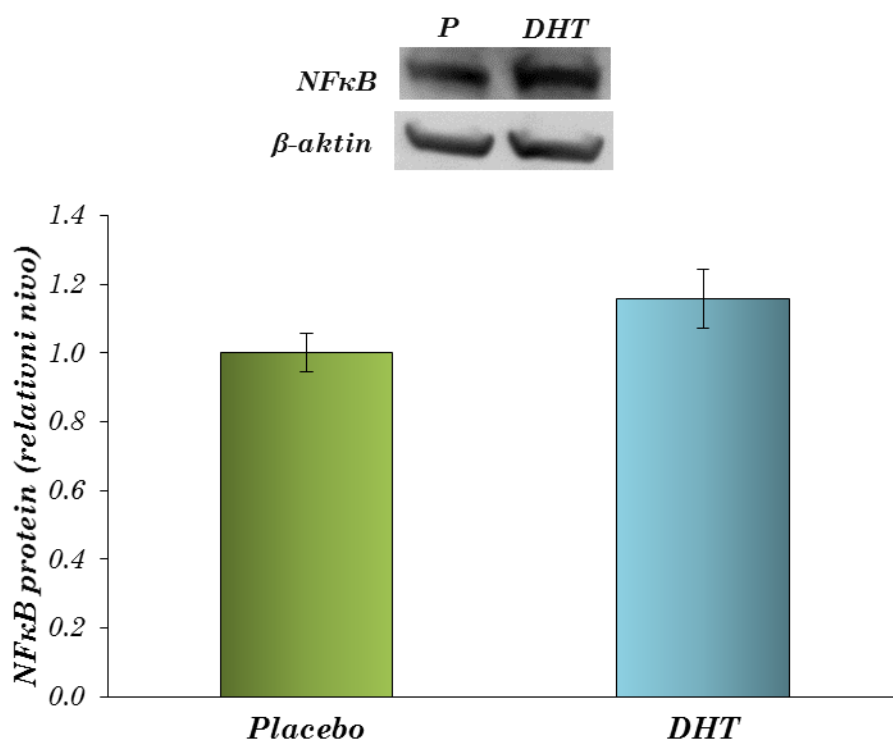
Slika 4.19. Relativne koncentracije iRNA za SOCS-3 i NPY u hipotalamusu DHT-om tretiranih pacova

Relativne koncentracije iRNA za SOCS-3 (**A**) i NPY (**B**) izračunate su u odnosu na koncentraciju HPRT1, kao endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM.

Ekspresija gena za oreksigeni NPY može se smatrati jednom od tačaka dodira glukokortikoidne i leptinske signalizacije u hipotalamusu, jer se nalazi pod antagonističkom kontrolom tih hormona – dok je glukokortikoidi povećavaju, leptin dovodi do njenog smanjenja. Zbog toga je ta ekspresija upoređivana kod placebo i pacova tretiranih DHT-om i pokazalo se da tretman hormonom nije doveo do promena nivoa odgovarajuće iRNA (**Slika 4.19B**), odnosno da povećan kalorijski unos posle tretmana DHT-om nije uzrokovan izmenama dejstva ovog peptida.

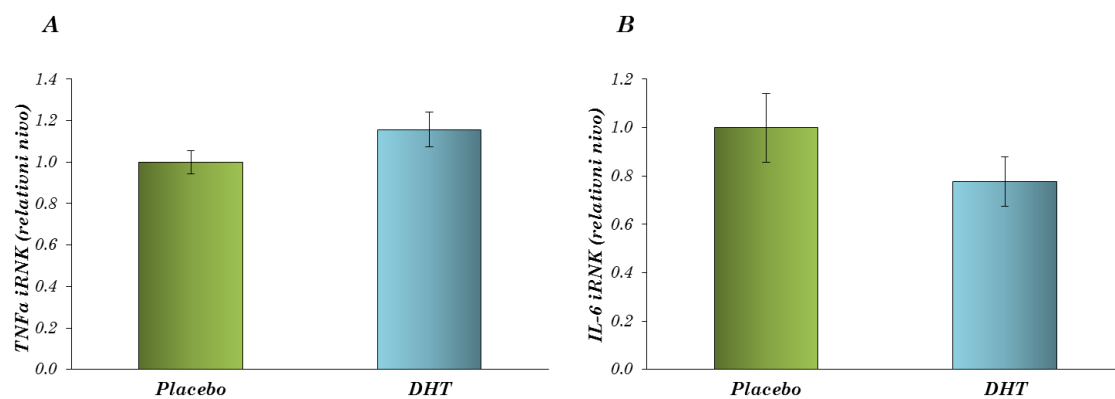
4.4.3 Lokalna inflamacija u hipotalamusu pacova tretiranih DHT-om

Osim parametara glukokortikoidne signalizacije i leptinske osetljivosti, u ovoj studiji su u hipotalamusu tretiranih životinja određivani i relativni nivoi i ekspresija nekoliko citokina, kao parametara lokalne inflamacije. Na **Slikama 4.20** i **4.21** uočava se da tretman DHT-om ne dovodi do statistički značajnih promena relativnog nivoa NFκB i ekspresije gena za TNFα i IL-6 u hipotalamusu ženki pacova.



Slika 4.20. Relativni nivo proteina NFκB u ukupnim ćelijskim ekstraktima hipotalamusa tretiranih pacova

Reprezentativni Western blot sa imunoreaktivnim trakama i relativni nivo NFκB u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa placebo (**P**) i životinja tretiranih DHT-om (**DHT**). Kao kontrola jednakog nanošenja proteina korišćen je β-aktin. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM.



Slika 4.21. Relativna ekspresija *TNFα* (A) i *IL-6* (B) u hipotalamusu ženki pacova

Relativna koncentracija iRNA za ciljane gene u hipotalamusu placebo (**P**) i životinja tretiranih DHT-om (**DHT**), izračunata je u odnosu na koncentraciju iRNA za *HPRT1*, kao odabrane endogene kontrole. Rezultati su obrađeni Studentovim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Za statistički značajne smatrane su razlike između grupa pri $p < 0,05$.



5 Diskusija

5.1 Reproktivne i metaboličke karakteristike životinjskog modela PCOS-a

Literaturni podaci ukazuju na asocijaciju hiperandrogenemije uspostavljene tokom ranog puberteta i predpuberteta sa PCOS-om, naročito kod gojaznih pacijentkinja (Apter 1998; de Zegher i sar. 2009). U cilju boljeg razumevanja etiologije PCOS-a razvijani su različiti pacovski modeli PCOS-a upotrebom raznih androgena (testosterona, testosteron propionata, androstenediona, dehidroepiandrosterona i dr.) i blokatora aromataze, letrozola.

Ovakvi tretmani, međutim, nisu generisali sve glavne metaboličke karakteristike sindroma, ali je nedavno razvijen hiperandrogenemični pacovski model PCOS-a koji se uspostavlja kontinuiranom subkutanom administracijom DHT-a, nearomatizabilne forme testosterona, visoko specifične za androgeni receptor, od početka puberteta do dostizanja odraslog doba (Manneras i sar. 2007). Zahvaljujući ovim specifičnostima DHT-a može se smatrati da su potencijalni efekti preko androgenog receptora posledica tretmana, a ne odgovarajućeg kompetitivnog dejstva estrogena.

U ovoj studiji, dugotrajnim, devedesetodnevnom tretmanom mladih ženki pacova DHT-om uspostavljen je model PCOS-a, čije su osnovne karakteristike sumarno prikazane i upoređene sa rezultatima prethodnih studija na ovom modelu u ***Tabeli 10***. Može se uočiti da su u našem modelu prisutne sve važne reproduktivne karakteristike PCOS-a. Tretman DHT-om je doveo do zaustavljanja estrusnog ciklusa u diestrusnoj fazi i anovulacije, te pojave uvećanog broja folikula i folikularnih cisti na jajnicima, uz smanjenje mase jajnika i uterusa hormonom tretiranih pacova. Histološka analiza ovarijuma potvrdila je poremećaje folikulogeneze i ovulacije, uz naglašene degenerativne procese, dokazane prisustvom aktivirane kaspaze-3 u granulosa ćelijama ranih atretičnih folikula i potvrđene odsustvom žutih tela i predominacijom intersticijalnih žlezda u jajnicima DHT-om tretiranih

pacova. Pri tome, do promene nivoa estradiola u plazmi tretiranih životinja nije došlo.

Tabela 10. Poređenje prisustva karakteristika humanog PCOS-a u prethodnim studijama rađenim na modelima sindroma indukovanim DHT-om i u našoj studiji modela dobijenog devedesetodnevnim tretmanom ovim hormonom.

Karakteristike	Manneras i sar. (2007) Van Houten i sar. (2012)	Nikolić i sar. (2015)
Masa tela	↑	↑
Abdominalna gojaznost	↑	↑
Veličina adipocita	↑ u mezenteričnom MT-u	↑ u VMT-u
Insulinska osetljivost	↓	↓
Veličina/masa jajnika i uterusa	↓	↓
Folikularna atrezija	DA	DA
Broj folikula	↑	↑
Prisustvo folikularnih cisti	DA	DA
Poremećaji ovulacije	DA	DA
Leptin	↑	↑
Trigliceridi	—	↑
Estradiol	—	—

Uočene reproduktivne karakteristike sindroma bile su praćene pojavom najvažnijih metaboličkih osobina PCOS-a, kao što su povećanje kako telesne, tako i mase visceralnog masnog tkiva hormonom tretiranih pacova, odnosno poremećajima metabolizma lipida, smanjenom sistemskom osetljivošću na insulin, hiperleptinemijom i hiperfagijom.

Histološka analiza visceralnog masnog tkiva pokazala je da je povećanje njegove mase posledica dominantno hipertrofičnog stanja visceralnih adipocita, koje se ogleda u povećanim dijametru i površini adipocita i u skladu je sa ranije objavljenim nalazima iz eksperimenata na miševima tretiranim DHT-om (van Houten i sar. 2012), ali i rezultatima odgovarajućih humanih studija (Manneras-Holm i sar. 2011; Villa i Pratley 2011; Barber i Franks 2013; Spritzer i sar. 2015). Osim opisanih histoloških promena, uočena su i značajna povećanja nivoa triglicerida i FFA u krvnoj plazmi tretiranih pacova, saglasna sa podatkom

da je dislipidemija najčešća metabolička abnormalnost u PCOS-u (Macut i sar. 2008; Conway i sar. 2014). Na osnovu rezultata HOMA i IPGTT testova, može se reći i da je tretman doveo do pojave sistemski smanjene osetljivosti na insulin, uočene i kod većine žena obolelih od PCOS-a (Diamanti-Kandarakis i Papavassiliou 2006; Conway i sar. 2014). Primena hormonskog tretmana dovela je, takođe, i do poremećaja regulacije apetita u hipotalamusu tretiranih pacova, koji se ogleda u povećanom unosu hrane i sistemske hiperleptinemiji. Poremećaji u ishrani su inače uočeni i kod žena obolelih od PCOS-a (Mansson i sar. 2008; Teede i sar. 2010; Kanaya i sar. 2013). Iz prethodno navedenog može se zaključiti da kontinualna primena DHT-a tokom puberteta u pacovskom modelu korišćenom u ovoj studiji uslovljava razvoj svih metaboličkih obeležja humanog PCOS-a, što ovaj model čini veoma pogodnim za analizu ovih poremećaja i uloge glukokortikoida u njihovoj pojavi.

5.2 Uloga glukokortikoida u metaboličkim promenama u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om

U našoj studiji sistemska koncentracija kortikosterona nije se promenila nakon tretmana androgenom, ali je u uvećanom visceralnom masnom tkivu izmereno statistički značajno povećanje njegove lokalne koncentracije. Posmatrajući ovaj podatak u kontekstu statistički značajnog relativnog povećanja ekspresije gena i proteinskog nivoa 11 β -HSD1 kao glavnog enzima trijade preko koje se ostvaruje prereceptorski metabolizam glukokortikoida, može da se zaključi da je posle tretmana DHT-om u visceralnom masnom tkivu pacova došlo do povećanja reduktazne aktivnosti ovog enzima i intenziviranja tkivne regeneracije kortikosterona, iako nivo koenzima H6PDH nije promenjen. Literaturni podaci (Senesi i sar. 2008; Czegle i sar. 2012), naime, ukazuju da je moguće uspostavljanje viška kofaktora NADP⁺ u odnosu na NADPH, tj. sredine koja favorizuje dominantno reduktaznu aktivnost 11 β -HSD1 i bez promene nivoa tog

koenzima tokom adipogeneze. Pomenuti višak kofaktora može se uspostaviti i aktivnošću drugih enzima smeštenih u lumenu ER-a, kao što je na primer izocitrat dehidrogenaza (Margittai i Banhegyi 2008; Senesi i sar. 2008). Rezultati ove studije su, stoga, u skladu sa već etabliranom predstavom o povezanosti lokalnog viška glukokortikoida sa gojaznošću i bolestima metabolizma (Wang 2005; Gathercole i Stewart 2010; Czegle i sar. 2012). Paralelno sa povećanjem koncentracije glukokortikoida, u visceralnom masnom tkivu tretiranih životinja je uočen i povišen nivo GR-a u nukleusu, tj. njegova translokacija iz citoplazme u jedro, što ukazuje da lokalno povećanje bioaktivnog kortikosterona indukuje aktivaciju receptora, a posledično i potencijalne promene ekspresije njegovih ciljnih gena u visceralnom masnom tkivu proučavanog modela PCOS-a.

Kao što je već istaknuto u poglavlju 1.2, dosadašnja istraživanja ukazuju da glukokortikoidi imaju veoma značajan i složen uticaj na metabolizam lipida u masnom tkivu, pri čemu krajnji efekti njihovog dejstva zavise od konkretnog depoa masnog tkiva na koji deluju, ali i nivoa diferencijacije pojedinih populacija adipocita u okviru istog depoa (Vegiopoulos i Herzig 2007; Ayala-Summano i sar. 2013; Lee i sar. 2014). To praktično znači da u istom depou glukokortikoidi mogu istovremeno stimulisati i ekspresiju i aktivnost proadipogenih molekula, ali i prolipogenih i lipolitičkih enzima (Vegiopoulos i Herzig 2007; Geer i sar. 2014).

Jedan od proteina čiju ekspresiju i aktivnost u masnom tkivu posle vezivanja glukokortikoida direktno stimuliše GR je lipin-1 (Reue i Brindley 2008), za koga se, posle tretmana DHT-om, pokazalo da se dominantno translocira u mikrozome, dok je njegov nivo u jedrima tretiranih životinja ostao nepromenjen. U mikrozomima, lipin-1 ima enzimsku, PAP-1 funkciju, to jest posreduje u sintezi DAG-a u endoplazmatičnom retikulumu ćelija visceralnog masnog tkiva (Reue i Zhang 2008), tako da se može zaključiti da je u posmatranom modelu PCOS-a lipin-1 prevashodno uključen

u proces *de novo* lipogeneze, odnosno da posreduje u anaboličkom uticaju glukokortikoida na metabolizam lipida u visceralnom masnom tkivu.

Prolipogeni SREBP-1 je transkripcioni regulator čiju ekspresiju glukokortikoidi direktno stimulišu (Ayala-Summano i sar. 2013). U našoj studiji relativna koncentracija proteina SREBP-1 značajno je povećana u jedru ćelija visceralnog masnog tkiva posle tretmana DHT-om. Ovo je u saglasnosti sa hipertrofičnim stanjem visceralnih adipocita tretiranih životinja, obzirom da SREBP-1 pojačava *de novo* sintezu i akumulaciju lipida, delimično i kroz transaktivaciju gena za FAS i ACC (Amemiya-Kudo i sar. 2002). U skladu sa tim, uočeno je i statistički značajno povećanje iRNK za FAS u visceralnom masnom tkivu izučavanog modela PCOS-a.

Poznato je da je i ekspresija gena za PEPCK, ključni enzim gliceroneogeneze u adipocitima, takođe nalazi pod kontrolom GR-a (Lee i sar. 2014). U našoj studiji, nivo iRNK za PEPCK povećao se posle tretmana DHT-om, što, s obzirom na prethodne nalaze koji ukazuju da ektopična ekspresija PEPCK u adipocitima povećava esterifikaciju FFA u lipide (Franckhauser i sar. 2002; Lee i sar. 2014), predstavlja argument u korist teze da je ona usmerena na olakšavanje lipogeneze u visceralnim adipocitima DHT-om tretiranih životinja.

Nivo centralnog proadipogenog transkripcionog regulatora, PPAR γ , čija se ekspresija nalazi pod posrednom kontrolom glukokortikoida (Farmer 2006), ostao je nepromenjen u visceralnom masnom tkivu posle hormonskog tretmana, što odgovara hipertrofičnom stanju adipocita, odnosno nedostatku uočljivog hiperplastičnog rasta i adipogeneze za čije se odigravanje povišena ekspresija i aktivnost ovog faktora smatra ključnom. Tokom hipertrofije, odnosno *de novo* lipogeneze kao njenog integralnog dela, sa druge strane, sintetišu se masne kiseline kao ligandi čijim se vezivanjem održava aktivnost PPAR γ , bez neophodnosti promene dostignutih nivoa ekspresije odgovarajućeg gena i proteina u ćeliji (Rosen i sar. 2000). Sintezi tih liganada, odnosno odgovarajućih masnih kiselina stimuliše i SREBP-1c, čija je ekspresija, kao što je već rečeno, povećana u našem modelu PCOS-a.

U kontekstu anabolizma lipida u visceralnom masnom tkivu, praćena je i promena ekspresije LPL-a i translokaze masnih kiselina CD36. U našoj studiji, nivo iRNK za LPL je povišen posle tretmana DHT-om što ukazuje na mogući uticaj glukokortikoida na povećanje oslobađanja FFA iz VLDL partikula i hilomikrona u lokalnu cirkulaciju tretiranih životinja. U principu, poenta ovog procesa je preuzimanje FFA iz cirkulacije i njihovo korišćenje u lipogenim procesima u adipocitima, što se ostvaruje zahvaljujući CD36 molekulu smeštenom na njihovoj površini (Williams 2008; Goldberg i sar. 2009). Naši rezultati pokazuju da je ekspresija gena koji kodira CD36 smanjena posle tretmana DHT-om, što ukazuje na to da povećani nivo FFA u cirkulaciji može biti posledica nedovoljnog preuzimanja ovih molekula u visceralne adipocyte posle oslobađanja od strane LPL-a. Pokazano je da glukokortikoidni hormoni imaju transrepresivno dejstvo na ekspresiju gena za CD36 u masnom tkivu, dok je PPAR γ povećava (Patel i sar. 2014; Stechschulte i sar. 2014), pa je moguće da pojačana glukokortikoidna signalizacija inhibira transkripciju gena za CD36, i na taj način ga održava na niskom nivou u visceralnom masnom tkivu životinja sa PCOS-om. Pri tome, prethodno izloženi rezultati sugerišu da glukokortikoidi pojačavaju *de novo* lipogenezu u visceralnom masnom tkivu tretiranih životinja. Postoje istraživanja koja ukazuju da glukokortikoidni hormoni upravo kroz stimulaciju ovog procesa podstiču anabolizam lipida u adipocitima, što je zaključeno na osnovu neproporcionalno visokih nivoa FFA u odnosu na glicerol u okolini uvećanih adipocita tretiranih potentnim agonistom GR-a – deksametazonom (Peckett i sar. 2011). Potpora ideji da se ovako nešto zaista dogodilo kod pacova tretiranih DHT-om i realnija procena povezanosti uticaja glukokortikoidnih hormona u visceralnom masnom tkivu sa povećanjem FFA u cirkulaciji zahteva, međutim, dodatna, direktnija ispitivanja prisustva odgovarajućih formi GR-a i PPAR γ na promotoru gena koji kodira CD36 u visceralnim adipocitima. Pored navedenog, dodatna ispitivanja lipidnog metabolizma u subkutanom masnom tkivu tretiranih životinja, bi ukazala na to da li je višak FFA u cirkulaciji posledica

prevaziđenog kapaciteta njihovog skladištenja od strane ovog depoa masnog tkiva.

S obzirom da glukokortikoidi mogu stimulirati i katabolizam lipida u masnom tkivu, od interesa je bilo analizirati i ekspresiju ključnih lipolitičkih enzima pod njihovom kontrolom u ovom tkivu, a to su ATGL i HSL. Ekspresija HSL je statistički značajno smanjena, dok je nivo iRNK za ATGL u ćelijama visceralnog masnog tkiva ostao je nepromenjen, što navodi na zaključak da pojačana lokalna glukokortikoidna signalizacija i aktivacija GR-a nema za posledicu usmeravanje metabolizma lipida ka lipolizi u visceralnim adipocitima tretiranih životinja. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima (Vegiopoulos i Herzig 2007; Geer i sar. 2014), ali i prethodno iznetim rezultatima ove studije koji govore o povećanoj *de novo* lipogenezi kod životinja tretiranih DHT-om.

Opisani rezultati ukazuju na uključenost glukokortikoida u anabolizam lipida i nastanak visceralne gojaznosti sa hipertrofičnim adipocitima kod životinja tretiranih DHT-om. Mora se, međutim, istaći da i sam DHT ima važne efekte na metabolizam lipida i diferencijaciju adipocita (Gupta i sar. 2008; O'Reilly i sar. 2014) i da može, preko androgenog receptora, menjati ekspresiju većine analiziranih prolipogenih gena osim lipina-1 (Bolduc i sar. 2004; McInnes i sar. 2006; Zhang i sar. 2008b). Ta činjenica upućuje na mogućnost direktnog uticaja hormonskog tretmana na pomenute procese i dovodi u pitanje direktne efekte glukokortikoida. Podaci o efektima DHT-a u masnom tkivu su, međutim, kontroverzni, a veći broj novijih studija mu pripisuje antiadipogena, antilipogena i prolipolitička dejstva (Gupta i sar. 2008; Veilleux i sar. 2012; O'Reilly i sar. 2014). Neka istraživanja ukazuju, takođe, da u složenoj interakciji između ova dva hormona u adipocitima glukokortikoidi mogu indukovati inaktivaciju DHT-a u preadipocitima pomoću enzima aldoketoreduktaze 1 (Veilleux i sar. 2012), ili onemogućiti dejstvo androgena u adipocitima sprečavanjem translokacije androgenog receptora u jedro (Hartig i sar. 2012). Dostupni podaci čak dovode u pozitivnu korelaciju i povećanje 11 β -HSD1 sa inaktivacijom DHT-a u

ćelijama visceralnog masnog tkiva, pri čemu androgeni povećavaju ekspresiju gena koji kodira ovaj enzim (Zhu i sar. 2010). Prethodno pomenuti autori (Veilleux i sar. 2012) čak govore o mogućnosti da glukokortikoidi smanjivanjem efekata DHT-a tokom diferencijacije visceralnih adipocita kreiraju permisivnu hormonalnu sredinu za adipogenezu i akumulaciju lipida u ovom tkivu i tako ostvaruju i indirektne pozitivne efekte na njegov rast. Sve to ukazuje da se nagomilavanje visceralnog masnog tkiva u proučavanom modelu PCOS-a može, bar u određenoj meri, smatrati posledicom pojačane lokalne glukokortikoidne signalizacije.

5.3 Metabolička inflamacija i insulinska osetljivost u visceralnom masnom tkivu ženki pacova tretiranih DHT-om

Kao što je već rečeno, žene sa PCOS-om pored hiperandrogenemije, gojaznosti i dislipidemije, odlikuju i insulinska rezistencija i inflamacija niskog stepena (Villa i Pratley 2011; Conway i sar. 2014; Spritzer i sar. 2015). Gojazne žene sa PCOS-om odlikuju uvećani visceralni adipociti sa endokrinim profilom izmenjenim ka povećanoj produkciji proinflamatornih citokina i stanju smanjene insulinske osetljivosti (Villa i Pratley 2011; Spritzer i sar. 2015).

U našoj studiji, analiza markera inflamacije u visceralnom masnom tkivu ukazuje na lokalno uspostavljanje inflamacije niskog stepena u ispitivanom modelu PCOS-a. Imajući u vidu hipertrofično stanje adipocita u našem modelu, postojanje inflamacije niskog stepena sa povišenim nivoima IL-6 i IL-1 β je u saglasnosti sa literaturnim podacima o specifičnom remodelovanju masnog tkiva, tj. infiltraciji i aktivaciji makrofaga i pojačanom lučenju proinflamatornih citokina iz ovih ćelija i hipertrofičnih adipocita, kao i podacima koji ukazuju da je hipertrofija adipocita jedno od mogućih objašnjenja hronične inflamacije u PCOS-u (Sun i sar. 2011; Spritzer i sar. 2015). Osim toga, tkivna koncentracija MIF-a, poznatog proinflamatornog antagonista glukokortikoidnih hormona

(Aeberli i sar. 2006) je značajno povećana kod tretiranih u odnosu na placebo životinje dok njegova koncentracija nije izmenjena u cirkulaciji (**Slika 4.11**). Pošto je utvrđeno da ekspresija MIF-a pozitivno koreliše sa veličinom adipocita u gojaznosti (Staab i Maser 2010), njegovo povećanje može da se posmatra i kao dodatni marker hipertrofičnog rasta visceralnog masnog tkiva u našem modelu PCOS-a. S druge strane, pojačana tkivna regeneracija glukokortikoidnih hormona i aktivacija njihovog receptora u visceralnom masnom tkivu, kao i činjenica da ovi hormoni povećavaju ekspresiju MIF-a (Aeberli i sar. 2006), ukazuju da u visceralnom masnom tkivu ispitivanog modela PCOS-a glukokortikoidni hormoni učestvuju u uspostavljanju proinflammatory miljea, bez obzira na njihovo generalno antiinflammatory dejstvo. Ovo je u skladu i sa podacima koji povezuju povišeni MIF sa povećanom ekspresijom gena za IL-1 β i IL-6 (Aeberli i sar. 2006).

Western blot analiza unutarćelijske redistribucije NF κ B pokazala je da se ovaj proinflammatory transkripcioni regulator premešta iz citoplazme u jedro visceralnih adipocita posle tretmana DHT-om. Tamo ostvaruje svoje efekte stimulacijom transkripcije većeg broja gena, uključujući i u ovoj studiji praćene proinflammatory citokine TNF α , IL-1 β i IL-6 (De Bosscher i sar. 2003). Stupajući u interakciju sa njim, aktivirani GR može da spreči te efekte (**Slika 1.8**) (De Bosscher i sar. 2003; Kadmiel i Cidlowski 2013), ali je ova njegova funkcija u visceralnom masnom tkivu ispitivanoog modela PCOS-a izgleda prevaziđena dejstvom MIF-a, sudeći po lokalnom povećanju nivoa iRNK za IL-6 i IL-1 β kod životinja tretiranih DHT-om (**Slika 4.13**). Međutim, nivoi iRNK za TNF α se nisu promenili u visceralnom masnom tkivu posle tretmana (**Slika 4.13**), što se može protumačiti kao deo uspostavljanja odgovarajućeg miljea za favorizovanje procesa lipogeneze u adipocitima tretiranih životinja, s obzirom da je utvrđeno da je TNF α jedan od njegovih inhibitora, jer smanjuje ekspresiju i/ili aktivnost FAS-a, ACC-a, i LPL-a (Warne 2003; Cawthorn i Sethi 2008). U prilog te teze idu povećane ekspresije gena za FAS, LPL i druge lipogene gene uočene u ovoj studiji. Sa druge strane, poznato je da TNF α podstiče uspostavljanje rezistencije na insulin u masnom

tkivu (Hotamisligil i Spiegelman 1994; Kang i sar. 2015), pa se nepromenjena ekspresija ovog faktora može tumačiti i u kontekstu održavanja insulinske osetljivosti visceralnog masnog tkiva kod DHT-om tretiranih ženki pacova. Rezultati novijih humanih studija pokazuju ili nepromenjene, ili povećane koncentracije TNF α , IL-6 i IL-1 β u plazmi žena sa PCOS-om (Spritzer i sar. 2015).

Pored proinflammatoryh medijatora, važnu ulogu u regulaciji insulinske osetljivosti imaju i glukokortikoidni hormoni. Noviji radovi, naime, ukazuju na tkivno-specifične efekte glukokortikoida kojima oni podstiču očuvanje ili čak povećanje insulinske osetljivosti belog masnog tkiva, dok suprotno deluju u mišićima i jetri, što dovodi do uspostavljanja insulinske rezistencije na sistemskom nivou (Geer i sar. 2014).

Rezultati određivanja HOMA indeksa u našoj studiji (Tepavčević i sar. 2014) pokazuju statistički značajno smanjenje insulinske osetljivosti na sistemskom nivou kod ženki pacova tretiranih DHT-om. To je u skladu sa literaturnim podacima koji govore o mogućnosti sistemskog smanjenja osetljivosti na insulin uz njeno održanje u visceralnom masnom tkivu, pri lokalnom povećanju glukokortikoida (Geer i sar. 2014). Analize molekularnih promena u insulinskom signalnom putu ćelija visceralnog masnog tkiva pacova tretiranih DHT-om takođe odgovaraju ovom tumačenju. Western blot analiza relativne koncentracije fosforilisane forme IRS-1 na Ser³⁰⁷, kao molekularnog indikatora insulinske rezistencije, (**Slika 4.14**), pokazala je, naime, da nema statistički značajne promene nivoa te komponente insulinskog signalnog puta u ćelijama visceralnog masnog tkiva tretiranih pacova. Osim toga, u datom tkivu, nivo GLUT4 transportera je ostao nepromenjen (**Slika 4.14**), što je u skladu sa nepromenjenom koncentracijom glukoze u krvnoj plazmi i rezultatima IP-GTT testa. Nivo fosfataze PTP1B u visceralnom masnom tkivu životinja tretiranih DHT-om nije promenjen (**Slika 4.15**), što implicira da insulinska signalizacija u tom tkivu nije pod inhibitornim uticajem defosforilacije IR i IRS-1 od strane ove fosfataze. Na osnovu prethodnih rezultata može se zaključiti da tretman

DHT-om nije doveo do promene lokalne insulinske osetljivosti u visceralnom masnom tkivu ženki pacova, ali jeste do smanjene sistemske osetljivosti na insulin, jer su veće koncentracije insulina u plazmi neophodne za održavanje glukoze na normalnom nivou. Rezultati Tepavčević i sar. (2014) idu u prilog ovoj tezi, pošto pokazuju da u srcima ženki pacova tretiranih DHT-om proteinska ekspresija IRS-1, nije izmenjena, dok je fosforilacija IRS-1 na Ser³⁰⁷ značajno povećana, čime impliciraju smanjenu insulinsku osetljivost u srcu ispitivanog modela PCOS-a. Jasnije objašnjenje pojave smanjene sistemske osetljivosti na insulin posle tretmana DHT-om, odnosno moguće uloge glukokortikoida u njenoj etiologiji, moguće je tek kada postojeći rezultati budu dopunjeni i odgovarajućim analizama u jetri ovih životinja.

Iznešeni rezultati upućuju na zaključak da je kod ženki pacova tretman DHT-om doveo do razvoja inflamacije niskog intenziteta u visceralnom masnom tkivu, koja, međutim, nije praćena promenama u osetljivosti tog tkiva na insulin. Promene molekularnih parametara osetljivosti masnog tkiva na insulin registrovane su, međutim, kod žena sa PCOS-om i sistemsom rezistencijom na ovaj hormon (Chu i sar. 2004; Diamanti-Kandarakis i Papavassiliou 2006).

5.4 Glukokortikoidna i leptinska signalizacija u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om

Glukokortikoidna i leptinska signalizacija u hipotalamusu, kao glavnom centru regulacije unosa hrane i energetske homeostaze (Elmqvist i sar. 1999; Morton i sar. 2006), takođe su analizirani kod životinja tretiranih DHT-om. Rezultati analiza sprovedenih u ovoj studiji, ukazuju na pojavu hiperfagije i povišenog unosa energije posle tretmana, koji mogu biti posledica leptinske rezistencije, s obzirom na izmerenu hiperleptinemiju kod životinja tretiranih DHT-om. Naime, hiperleptinemija je često praćena izmenjenim efektima leptina u centralnom nervnom sistemu i perifernim ciljnim tkivima (Morris i Rui 2009), s tim da je za razumevanje poremećaja energetskog balansa ključna nemogućnost ostvarivanja efekata leptina u mozgu (Morris i Rui 2009), tj. centralna leptinska rezistencija.

Razvoj centralne leptinske rezistencije može uključivati poremećaje mehanizama transporta leptina kroz cirkulaciju i krvno-moždanu barijeru, ili transdukcije signala u samim ciljnim ćelijama posle vezivanja tog hormona za dugu formu odgovarajućeg receptora ObRb (Yang i Barouch 2007). U literaturi je smanjena leptinska signalizacija sa ObRb receptora označena kao ćelijska leptinska rezistencija (Myers i sar. 2008). U gojaznosti i metaboličkom sindromu najčešći razlog ćelijske rezistencije na leptin je povećana ekspresija SOCS-3 gena, u odgovoru na sam leptin ili neke druge citokine, što dovodi do pojačane negativne povratne regulacije ObRb receptora u hiperleptinemiji i stanjima hronične inflamacije (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011). Zbog toga, kao i zbog činjenice da na ekspresiju gena za ObRb i SOCS-3 utiču glukokortikoidi (la Fleur 2006), u ovoj studiji je praćena ekspresija gena za SOCS-3. Međutim, nije zapažena promena u nivoima iRNK za ObRb i SOCS-3, kao ni promena relativnog nivoa ObRb proteina u hipotalamusu ženki pacova tretiranih DHT-om. Drugi potencijalni uzrok razvoja ćelijske leptinske rezistencije je povećana

fosforilacija određenih tirozinskih ostataka ObRb-a stimulirana leptinom, koja pojačava negativnu regulaciju prenosa signala sa receptora (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011). Hiperleptinemija, tako, i pored nedostatka promene nivoa ukupnog ObRb-a, može da dovede do inhibicije leptinske signalizacije povećanjem nivoa inhibitorne fosforilisane forme tog receptora.

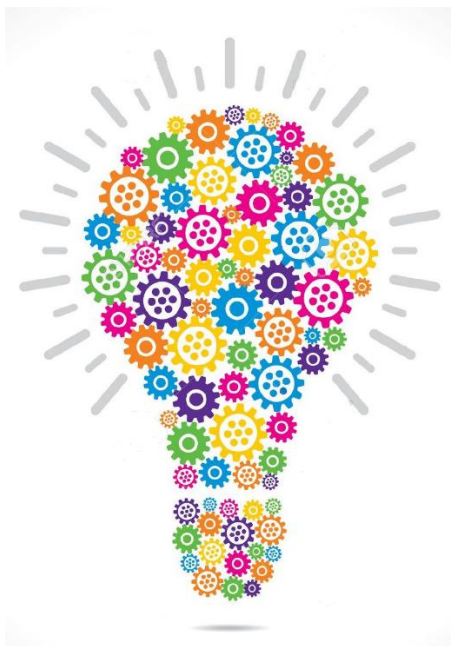
Jedan od najvažnijih efektorskih molekula leptina u kontroli energetskog balansa je NPY (Pan i sar. 2014), čija je ekspresija pod uticajem glukokortikoida i insulina (Patel i sar. 2014). Dejstva glukokortikoida na lučenje NPY u hipotalamusu su, pri tome, suprotna u odnosu na efekte leptina i insulina (Morton i sar. 2006). Glukokortikoidi, naime, povećavaju ekspresiju gena za ovaj neuropeptid posle vezivanja za visoko eksprimirani GR u ARC i PVN neuronima hipotalamusa (Geer i sar. 2014; Patel i sar. 2014). U ovoj studiji analizirana je promena nivoa odgovarajuće iRNK za NPY u animalnom modelu PCOS-a, a rezultati su pokazali da tretman DHT-om nije doveo do statistički značajnog povećanja ekspresije gena za NPY, koje se smatra jednim od mogućih markera leptinske rezistencije. Treba ukazati da u ovoj studiji nisu praćene promene POMC-a, kao još jednog vrlo bitnog činioca kontrole unosa hrane i energetske homeostaze (Pan i sar. 2014) čije se smanjenje takođe smatra potencijalnim markerom centralne leptinske rezistencije. Molekularne promene koje bi dovele do smanjenja POMC-a mogu, međutim, biti posledica poremećaja osetljivosti na insulin, a ne same leptinske rezistencije (Pan i sar. 2014).

Zbog veoma važnog ukrštanja glukokortikoidnog i leptinskog signalnog puta u regulaciji unosa hrane i energetskog metabolizma u hipotalamusu, prevashodno reflektovanog u već pomenutom uticaju glukokortikoida na transaktivaciju gena za NPY, ObRb i komponentu leptinskog signalnog puta SOCS3 (la Fleur 2006; Morton i sar. 2006; Patel i sar. 2014), u ovoj studiji je urađena i analiza ekspresije i relativne koncentracije enzima 11 β -HSD1 i H6PDH u hipotalamusu, kao pokazatelja lokalne regeneracije aktivne forme glukokortikoida. Poznato je, naime, da se glukokortikoidi reaktiviraju

dejstvom ovog enzimskog sistema u neuronima ARC i PVN jedara hipotalamusa (Geer i sar. 2014). Statistički značajne promene prereceptorskog metabolizma glukokortikoida, kao ni promene ekspresije gena i reativnog nivoa GR proteina u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa ženki pacova tretiranih DHT-om nisu uočene. Zbirno, ovi rezultati ukazuju na neizmenjenu glukokortikoidnu signalizaciju i izostanak njenog uticaja na leptinsku signalizaciju i ekspresiju oreksigenih peptida u hipotalamusu ispitivanog modela PCOS-a.

Bitnu ulogu u razvoju centralne leptinske rezistencije može imati i lokalna inflamacija. Leptinska rezistencija može biti posledica prekomerne aktivnosti IKK β /NF κ B sistema, ili povećanja nivoa proinflamatornih medijatora TNF α i IL-6 (Munzberg i sar. 2005; Myers i sar. 2008; Wauman i Tavernier 2011; Pan i sar. 2014). U ovoj studiji promene ekspresije gena za TNF α i IL-6 nisu zabeležene, što je u skladu i sa odsustvom promene relativne koncentracije NF κ B proteina u ukupnom ćelijskom ekstraktu hipotalamusa ženki pacova tretiranih DHT-om. Glavnim medijatorima uticaja lokalne inflamacije na nastanak leptinske rezistencije smatraju se, ipak, FFA, koje preko TLR4 dovode do inhibicije STAT3 signala (Pan i sar. 2014). Naši rezultati ukazuju na statistički značajno povećanje koncentracije FFA u plazmi životinja tretiranih DHT-om, što navodi na zaključak da bi ono moglo imati inhibitorni uticaj na leptinski signalni put u ćelijama hipotalamusa ispitivanog modela PCOS-a. S tim u vezi, detaljnije molekularne analize na nivou pojedinačnih jedara hipotalamusa dale bi jasniji odgovor.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je kod ženki pacova tretman DHT-om doveo do pojave hiperfagije i povećanog unosa energije, praćenih hiperleptinemijom, ali bez promena u leptinskoj i glukokortikoidnoj signalizaciji u hipotalamusu tretiranih životinja.



6 Zaključci

Na osnovu analize rezultata dobijenih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Dugotrajan tretman mladih ženki pacova DHT-om je doveo do razvoja reproduktivnih i metaboličkih promena koji se sreću kod žena sa PCOS-om;
- Uočena visceralna gojaznost i dislipidemija kod ženki pacova tretiranih DHT-om su posledice hipertrofije adipocita, u kojoj je favorizovano nagomilavanje lipida;
- Povećanje mase visceralnog masnog tkiva prate molekularne promene koje delimično potiču od pojačane glukokortikoidne signalizacije, koja metabolizam lipida usmerava ka lipogenezi;
- Visceralna gojaznost i dislipidemija su praćene inflamacijom niskog intenziteta, ali ne i smanjenom insulinskom osetljivošću u visceralnom masnom tkivu. S druge strane, životinje tretirane DHT-om pokazuju smanjenu sistemsku insulinsku osetljivost, koja se ogleda u povećanim koncentracijama insulina potrebnim za održavanje normalnog nivoa glukoze u krvi.
- Tretman ženki pacova DHT-om doveo je do povećanog kalorijskog unosa praćenog visceralnom gojaznošću i hiperleptinemijom. Ovi metabolički poremećaji nisu rezultat promena i interakcija glukokortikoidne i leptinske signalizacije u hipotalamusu tretiranih životinja.
- Ukupne reproduktivne i metaboličke promene dobijene u ovoj studiji na animalnom modelu PCOS-a, uključujući hiperandrogenizam, anovulaciju, visceralnu gojaznost, dislipidemiju, hiperleptinemiju i smanjenu sistemsku insulinsku osetljivost, ukazuju na adekvatnost primenjenog tretmana za izučavanje raznih aspekata ovog sindroma kod žena.



7 Literatura

Aeberli D, Leech M, Morand EF. 2006. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology* 45: 937-943.

Ahima RS, Osei SY. 2001. Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends in molecular medicine* 7: 205-213.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., International Diabetes Federation Task Force on E, Prevention, National Heart L, Blood I, American Heart A, World Heart F, International Atherosclerosis S, International Association for the Study of O. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120: 1640-1645.

Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. 2002. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *Journal of lipid research* 43: 1220-1235.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245-5250.

Apter D. 1998. How possible is the prevention of polycystic ovary syndrome development in adolescent patients with early onset of hyperandrogenism. *Journal of endocrinological investigation* 21: 613-617.

Ayala-Summano JT, Velez-delValle C, Beltran-Langarica A, Marsch-Moreno M, Hernandez-Mosqueira C, Kuri-Harcuch W. 2013. Glucocorticoid paradoxically recruits adipose progenitors and impairs lipid homeostasis and glucose transport in mature adipocytes. *Scientific reports* 3: 2573.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF, Androgen Excess S. 2006. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91: 4237-4245.

Baillargeon JP, Carpentier A. 2007. Role of insulin in the hyperandrogenemia of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity. *Fertility and sterility* 88: 886-893.

Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. 2010. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 122: 42-52.

Barber TM, Franks S. 2013. Adipocyte biology in polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* 373: 68-76.

Bolduc C, Larose M, Yoshioka M, Ye P, Belleau P, Labrie C, Morissette J, Raymond V, Labrie F, St-Amand J. 2004. Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *Journal of molecular endocrinology* 33: 429-444.

Brietzke SA. 2007. Controversy in diagnosis and management of the metabolic syndrome. *The Medical clinics of North America* 91: 1041-1061, vii-viii.

Byun HR, Kim DK, Koh JY. 2011. Obesity and downregulated hypothalamic leptin receptors in male metallothionein-3-null mice. *Neurobiology of disease* 44: 125-132.

Carman GM, Han GS. 2006. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends in biochemical sciences* 31: 694-699.

Carow B, Rottenberg ME. 2014. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology* 5: 58.

Cawthorn WP, Sethi JK. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS letters* 582: 117-131.

Chu YL, Sun YY, Qiu HY, Li HF. 2004. [Tyrosine phosphorylation and protein expression of insulin receptor substrate-1 in the patients with polycystic ovary syndrome]. *Zhonghua fu chan ke za zhi* 39: 176-179.

Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz BO. 2014. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol* 171: P1-29.

Corbould A, Kim YB, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, Dunaif A. 2005. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288: E1047-1054.

Czeglé I, Csala M, Mandl J, Benedetti A, Karadi I, Banhegyi G. 2012. G6PT-H6PDH-11betaHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World journal of hepatology* 4: 129-138.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. 2003. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews* 24: 488-522.

de Zegher F, Lopez-Bermejo A, Ibanez L. 2009. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20: 418-423.

Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. 2009. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 25: 603-609.

Diamanti-Kandarakis E. 2008. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert reviews in molecular medicine* 10: e3.

Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends in molecular medicine* 12: 324-332.

Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG, Kandarakis SA, Chrousos GP. 2007. Pathophysiology and types of dyslipidemia in PCOS. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18: 280-285.

Doi SA, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KA. 2005. PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 118: 4-16.

Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine reviews* 18: 774-800.

Duncombe WG. 1964. The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 9: 122-125.

Ehrmann DA. 2005. Polycystic ovary syndrome. *The New England journal of medicine* 352: 1223-1236.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. 1999. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.

Escobar-Morreale HF, San Millan JL. 2007. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18: 266-272.

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and cellular biology* 19: 5495-5503.

Farmer SR. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism* 4: 263-273.

Fassnacht M, Schlenz N, Schneider SB, Wudy SA, Allolio B, Arlt W. 2003. Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 2760-2766.

Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F. 2002. Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51: 624-630.

Gade W, Schmit J, Collins M, Gade J. 2010. Beyond obesity: the diagnosis and pathophysiology of metabolic syndrome. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology* 23: 51-61; quiz 62-55.

Galarraga M, Champion J, Munoz-Barrutia A, Boque N, Moreno H, Martinez JA, Milagro F, Ortiz-de-Solorzano C. 2012. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of lipid research* 53: 2791-2796.

Gathercole LL, Stewart PM. 2010. Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 122: 21-27.

Geer EB, Islam J, Buettner C. 2014. Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 43: 75-102.

Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research* 50 Suppl: S86-90.

Gupta V, Bhasin S, Guo W, Singh R, Miki R, Chauhan P, Choong K, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Flanagan JN, Hamilton JA, Viereck JC, Narula NS, Kirkland JL, Jasuja R. 2008. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 296: 32-40.

Hartig SM, He B, Newberg JY, Ochsner SA, Loose DS, Lanz RB, McKenna NJ, Buehrer BM, McGuire SE, Marcelli M, Mancini MA. 2012. Feed-forward inhibition of androgen receptor activity by glucocorticoid action in human adipocytes. *Chemistry & biology* 19: 1126-1141.

Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. 2002. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Molecular interventions* 2: 494-503.

Hotamisligil GS, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278.

Jonard S, Dewailly D. 2004. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Human reproduction update* 10: 107-117.

Kadmiel M, Cidlowski JA. 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* 34: 518-530.

Kanaya N, Vonderfecht S, Chen S. 2013. Androgen (dihydrotestosterone)-mediated regulation of food intake and obesity in female mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 138: 100-106.

Kang S, Tsai LT, Zhou Y, Evertts A, Xu S, Griffin MJ, Issner R, Whitton HJ, Garcia BA, Epstein CB, Mikkelsen TS, Rosen ED. 2015. Identification of nuclear hormone receptor pathways causing insulin resistance by transcriptional and epigenomic analysis. *Nature cell biology* 17: 44-56.

Korner J, Savontaus E, Chua SC, Jr., Leibel RL, Wardlaw SL. 2001. Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* 13: 959-966.

la Fleur SE. 2006. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology & behavior* 89: 110-114.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. 1990. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes care* 13: 172-175.

Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. 2014. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochimica et biophysica acta* 1842: 473-481.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK. 2013. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular aspects of medicine* 34: 1-11.

Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. 2004. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstetrical & gynecological survey* 59: 141-154.

Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A. 1999. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 165-169.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

Macut D, Damjanovic S, Panidis D, Spanos N, Glisic B, Petakov M, Rouso D, Kourtis A, Bjekic J, Milic N. 2006. Oxidised low-density lipoprotein concentration - early marker of an altered lipid metabolism in young women with PCOS. *Eur J Endocrinol* 155: 131-136.

Macut D, Panidis D, Glisic B, Spanos N, Petakov M, Bjekic J, Stanojlovic O, Rouso D, Kourtis A, Bozic I, Damjanovic S. 2008. Lipid and lipoprotein profile in women with polycystic ovary syndrome. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 86: 199-204.

- Mandard S, Kersten S.** 2006. Regulation of Lipogenic Genes in Obesity In *Nutritional Genomics: Impact on Health and Disease*, ed. R Brigelius-Flohé, HG Joost. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Manneras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Oden A, Holm G, Hellstrom M, Lonn L, Olivecrona G, Stener-Victorin E, Lonn M.** 2011. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96: E304-311.
- Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E.** 2007. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148: 3781-3791.
- Mansson M, Holte J, Landin-Wilhelmsen K, Dahlgren E, Johansson A, Landen M.** 2008. Women with polycystic ovary syndrome are often depressed or anxious--a case control study. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1132-1138.
- Margittai E, Banhegyi G.** 2008. Isocitrate dehydrogenase: A NADPH-generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Archives of biochemistry and biophysics* 471: 184-190.
- McInnes KJ, Corbould A, Simpson ER, Jones ME.** 2006. Regulation of adenosine 5',monophosphate-activated protein kinase and lipogenesis by androgens contributes to visceral obesity in an estrogen-deficient state. *Endocrinology* 147: 5907-5913.
- Mlinar B, Marc J, Jensterle M, Bokal EV, Jerin A, Pfeifer M.** 2011. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral and subcutaneous adipose tissues of patients with polycystic ovary syndrome is associated with adiposity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 123: 127-132.
- Morris DL, Rui L.** 2009. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297: E1247-1259.
- Morrison CD, Huypens P, Stewart LK, Gettys TW.** 2009. Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. *Biochimica et biophysica acta* 1792: 409-416.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW.** 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295.

Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr. 2005. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62: 642-652.

Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual review of physiology* 70: 537-556.

Nestler JE. 2008. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *The New England journal of medicine* 358: 47-54.

Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. 2010. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75: 1-12.

O'Reilly MW, House PJ, Tomlinson JW. 2014. Understanding androgen action in adipose tissue. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 143: 277-284.

Oakley RH, Cidlowski JA. 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132: 1033-1044.

Orio F, Vuolo L, Palomba S, Lombardi G, Colao A. 2008. Metabolic and cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome. *Minerva ginecologica* 60: 39-51.

Palanivel R, Fullerton MD, Galic S, Honeyman J, Hewitt KA, Jorgensen SB, Steinberg GR. 2012. Reduced Socs3 expression in adipose tissue protects female mice against obesity-induced insulin resistance. *Diabetologia* 55: 3083-3093.

Pallares P, Garcia-Fernandez RA, Criado LM, Letelier CA, Fernandez-Toro JM, Esteban D, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A. 2010. Substantiation of ovarian effects of leptin by challenging a mouse model of obesity/type 2 diabetes. *Theriogenology* 73: 1088-1095.

Pan H, Guo J, Su Z. 2014. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiology & behavior* 130: 157-169.

Patel R, Williams-Dautovich J, Cummins CL. 2014. Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. *Molecular endocrinology* 28: 999-1011.

Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. 2011. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism: clinical and experimental* 60: 1500-1510.

- Phan J, Reue K.** 2005. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell metabolism* 1: 73-83.
- Phillips LK, Prins JB.** 2008. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Current hypertension reports* 10: 156-164.
- Qin KN, Rosenfield RL.** 1998. Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* 145: 111-121.
- Reue K, Brindley DN.** 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Journal of lipid research* 49: 2493-2503.
- Reue K, Zhang P.** 2008. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS letters* 582: 90-96.
- Ribiere C, Plut C.** 2005. Nutritional regulation of leptin signaling. *Current hypertension reports* 7: 11-16.
- Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM, Roca P.** 2005. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288: E200-207.
- Rojas J, Chavez M, Olivar L, Rojas M, Morillo J, Mejias J, Calvo M, Bermudez V.** 2014. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth. *International journal of reproductive medicine* 2014: 719050.
- Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S.** 2010. Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 122: 10-20.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM.** 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development* 14: 1293-1307.
- Rotterdam EA-SPCWG.** 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 81: 19-25.
- Scarpace PJ, Zhang Y.** 2009. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 296: R493-500.

- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG.** 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
- Senesi S, Marcolongo P, Manini I, Fulceri R, Sorrentino V, Csala M, Banhegyi G, Benedetti A.** 2008. Constant expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase during differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of molecular endocrinology* 41: 125-133.
- Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM, Lobo RA, Jaffe R, Ferin M, Levine LS, Oberfield SE.** 2003. Early endocrine, metabolic, and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 4682-4688.
- Simerly RB.** 2008. Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiology & behavior* 94: 79-89.
- Sirmans SM, Pate KA.** 2013. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical epidemiology* 6: 1-13.
- Song D, Arikawa E, Galipeau D, Battell M, McNeill JH.** 2004. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 43: 667-672.
- Spector T.** 1978. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Analytical biochemistry* 86: 142-146.
- Spencer RL, Kalman BA, Cotter CS, Deak T.** 2000. Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis. *Brain research* 868: 275-286.
- Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM.** 2015. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* 149: R219-227.
- Staab CA, Maser E.** 2010. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 119: 56-72.
- Stechschulte LA, Hinds TD, Jr., Khuder SS, Shou W, Najjar SM, Sanchez ER.** 2014. FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GRalpha and PPARgamma. *Molecular endocrinology* 28: 1265-1275.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation* 121: 2094-2101.

Talbott EO, Zborowskii JV, Boudraux MY. 2004. Do women with polycystic ovary syndrome have an increased risk of cardiovascular disease? Review of the evidence. *Minerva ginecologica* 56: 27-39.

Tan S, Hahn S, Benson S, Janssen OE, Dietz T, Kimmig R, Hesse-Hussain J, Mann K, Schedlowski M, Arck PC, Elsenbruch S. 2008. Psychological implications of infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Human reproduction* 23: 2064-2071.

Tchernof A, Despres JP. 2013. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews* 93: 359-404.

Teede H, Deeks A, Moran L. 2010. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC medicine* 8: 41.

Tepavčević S, Vojnović Milutinović D, Macut D, Žakula Z, Nikolić M, Božić-Antić I, Romić S, Bjekić-Macut J, Matić G, Korićanac G. 2014. Dihydrotestosterone deteriorates cardiac insulin signaling and glucose transport in the rat model of polycystic ovary syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 141: 71-76.

Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. 1979. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism: clinical and experimental* 28: 1086-1096.

Valkenburg O, Steegers-Theunissen RP, Smedts HP, Dallinga-Thie GM, Fauser BC, Westerveld EH, Laven JS. 2008. A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93: 470-476.

van Houten EL, Kramer P, McLuskey A, Karels B, Themmen AP, Visser JA. 2012. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. *Endocrinology* 153: 2861-2869.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3: RESEARCH0034.

- Vegiopoulos A, Herzig S.** 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and cellular endocrinology* 275: 43-61.
- Veilleux A, Cote JA, Blouin K, Nadeau M, Pelletier M, Marceau P, Laberge PY, Luu-The V, Tchernof A.** 2012. Glucocorticoid-induced androgen inactivation by aldo-keto reductase 1C2 promotes adipogenesis in human preadipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302: E941-949.
- Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A.** 2001. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent progress in hormone research* 56: 295-308.
- Villa J, Pratley RE.** 2011. Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Current diabetes reports* 11: 179-184.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ.** 2012. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of reproduction* 86: 149, 141-112.
- Wang M.** 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutrition & metabolism* 2: 3.
- Warne JP.** 2003. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *The Journal of endocrinology* 177: 351-355.
- Wautman J, Tavernier J.** 2011. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Frontiers in bioscience* 16: 2771-2793.
- Westerveld HE, Hoogendoorn M, de Jong AW, Goverde AJ, Fauser BC, Dallinga-Thie GM.** 2008. Cardiometabolic abnormalities in the polycystic ovary syndrome: pharmacotherapeutic insights. *Pharmacology & therapeutics* 119: 223-241.
- White UA, Tchoukalova YD.** 2014. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochimica et biophysica acta* 1842: 377-392.
- Williams KJ.** 2008. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *The Journal of clinical investigation* 118: 3247-3259.
- Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S, Xu G.** 2009. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Molecular endocrinology* 23: 1161-1170.
- Yang R, Barouch LA.** 2007. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circulation research* 101: 545-559.

Zhang P, O'Loughlin L, Brindley DN, Reue K. 2008a. Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *Journal of lipid research* 49: 1519-1528.

Zhang Y, Calvo E, Martel C, Luu-The V, Labrie F, Tchernof A. 2008b. Response of the adipose tissue transcriptome to dihydrotestosterone in mice. *Physiological genomics* 35: 254-261.

Zhu L, Hou M, Sun B, Buren J, Zhang L, Yi J, Hernell O, Li X. 2010. Testosterone stimulates adipose tissue 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in a depot-specific manner in children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95: 3300-3308.

8 Prilozi

Biografija autora

Marina (Milan) Nikolić rođena je 13.08.1983. godine u Beogradu.

Osnovnu školu je završila u Beogradu, kao dobitnik Vukove diplome. 2002. godine završila je Prvu beogradsku gimnaziju, nakon čega je, školske 2002./03. godine, kao pobednik republičkog takmičenja Fonda za mlade talente, upisala studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,69 tokom studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Od 2011. godine zaposlena je u Odeljenju za biohemiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Uloga steroidnih hormona u neuroendokrinoj adaptaciji na stres i patofiziologiji metaboličkog sindroma – molekularni mehanizmi i kliničke implikacije“ (br. III 41009) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a pod rukovodstvom prof. dr Gordane Matić. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u okviru studijskog programa Molekularna biologija i modula Molekularna biologija eukariota. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je pod rukovodstvom dr Danijele Vojnović Milutinović. Zvanje istraživač saradnik stekla je 2013. godine.

Dobitnik je stipendije Evropskog društva za endokrinologiju za učešće u Letnjoj školi endokrinologije u Bregenzu, Austrija, 2012. godine.

Marina Nikolić je do danas objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 4 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марина М. Николић

број уписа Б3020/2010

Изјављујем

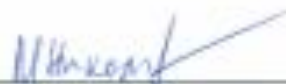
да је докторска дисертација под насловом

"Метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника у висцералном мањим ткиву и лептинска резистенција у хипоталамусу пацијената третираних 5 α -дихидротестостероном: улога глукортикоида"

- 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, 5.10.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марина М. Николић

Број уписа Б3020/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада "Метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника у висцералном масном ткиву и лептинска резистенција у хипоталамусу пацова третираног 5 α -дихидротестостероном: улога глукокортикоида"

Ментор др Данијела Војисевић Милутиновић

Потписани Марина М. Николић

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, 5.10.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника у висцералном масном ткиву и лептинска резистенција у хипоталамусу пацова третираног 5 α -дихидротестостероном: улога гљукортикоида”

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 спис лиценци дат је на пољеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 5.10.2015.



1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.