



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марина Р. Николић

**УЛОГА КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ
АНТАГОНИСТЕ AT_1 РЕЦЕПТОРА И
ИНХИБИТОРА НЕПРИЛИЗИНА У
ПРОМОЦИЈИ *BROWNING*-А НА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ
МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА И *IN SILICO*
ИДЕНТИФИКАЦИЈА СИГНАЛНИХ
ПУТЕВА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marina R. Nikolić

**THE ROLE OF COMBINED
ADMINISTRATION OF AT₁ RECEPTOR
ANTAGONIST AND NEPRILYSIN
INHIBITOR IN THE PROMOTION OF
BROWNING IN AN EXPERIMENTAL
MODEL OF METABOLIC SYNDROME AND
IN SILICO IDENTIFICATION OF SIGNALING
PATHWAYS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Марина Р. Николић
Датум и место рођења: 29.09.1995. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Физиологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Улога комбиноване примене антагонисте АТ ₁ рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији <i>browning</i> -а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и <i>in silico</i> идентификација сигналних путева
Број страница: 201
Број слика: 56 слика, 58 графика, 18 табела и 2 схеме
Број библиографских података: 304
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Коментори: проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор за ужу научну област Физиологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу проф. др Невена Јеремић, ванредни професор за ужу научну област Фармацеутска хемија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број одлуке и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-14/13 од 19.01.2023. године

Identifikaciona stranica doktorske disertacije na engleskom jeziku

Author
Name and surname: Marina R. Nikolic
Date and place of birth: September 29 th , 1995, Kragujevac, Serbia
Current employment: Teaching assistant of Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: The role of combined administration of AT ₁ receptor antagonist and neprilysin inhibitor in the promotion of browning in an experimental model of metabolic syndrome and <i>in silico</i> identification of signaling pathways
No. of pages: 201
No. of images: 56 images, 58 graphics, 18 tables and 2 schemes
No. of bibliographic data: 304
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Co-mentors: Prof. Vladimir Jakovljevic, Full Professor of Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Assoc. prof. Nevena Jeremic, Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date: October 11 th , 2022.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-14/13, January 19 th , 2023

ЗАХВАЛНИЦА

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору проф. др Владимиру Јаковљевићу, мом животном учитељу и човеку великог срца. Велика ми је част и задовољство што сам имала прилику да ме у научном погледу обликује један такав људски и научни великан. Понашајући се као други отац, проф. др Владимир Јаковљевић је отворио врата Лабораторије, препознао таленат и пробудио у мени жељу да кренем светом науке. Тада, као студенту треће године основних студија фармације докторат је био једна велика жеља али и огроман изазов. Уз неизмерну подршку, сугестије и смернице мој ментор је утицао и веровао да можемо да постигнемо ово данас, да изађемо као победници у још једној животној борби. Неизмерно сам му захвална јер сам под његовим менторством спознала не само карактеристике доброг научника већ и нешто много битније, да на која год висока пространства ме вине успех да ме првенствено води принцип бити човек великога срца.

Захваљујем се менторки проф. др Невени Јерemiћ на свом труду и помоћи при изради ове докторске дисертације, корисним саветима и подршци, што је веровала у мене и дозволила да учим и развијам се у професионалном смеру под њеним менторством.

Огромну захвалност дугујем члановима своје катедре и драгим колегама из Центра за претклиничка и функционална истраживања на свој подршци, пријатељским саветима и позитивној атмосфери која нас подстиче да функционисемо као једна велика породица у свету науке. Посебну захвалност дугујем Александри Стојановић, Анђели Милојевић Шамановић, Невени Лазаревић, Маријани Анђић и Александру Кочовићу на огромној помоћи при спровођењу експерименталног дела ове докторске дисертације, зато што сте пре свега моји пријатељи.

Велико хвала проф. др Слободанки Митровић на огромној помоћи при изради ове докторске дисертације, саветима и подршци коју ми је пружала на овом путу.

Хвала мом Марку и проф. др Драгани Стаматовић, који у мом срцу заузимају посебно место, захваљујући којима сам успела све ово.

Посебно хвала сунругу Милошу, која је моја подршка, ослонац и база, који ме је увео у свет науке и научио да корачам тим стопама. Хвала за свако прочитано слово ове докторске дисертације, савете и труд. Што је имао безгранично разумевање, љубав и стрпљења према мени.

Мојој највећој животној подршци, сестри Марији. Хвала јој што је била мој ослонац и борила се раме уз раме са мном онда када је то било најважније али и најтеже. Ово је наш заједнички успех!

Најзад, хвала мојим родитељима мајци Зорици и оцу Рајку на љубави и разумевању, што су ми омогућили да корачам светом науке пружајући неизмерну подршку из тоглог породичног гнезда. Они су били мој ветар у леђа у данима наше заједничке олује и постигли да будемо овде где смо сада. Хвала што су увек веровали у мене. Њима и посвећујем ову докторску дисертацију.

Ваша Марина

САЖЕТАК

Овим истраживањем испитан је утицај комбиноване примене валсартан/сакубитрила на промоцију *browning*-а код здравих и пацова са метаболичким синдромом (МС) на собној или ниској температури. Коришћењем *in silico* студија идентификовани су сигнални путеви којима примењени третман индукује *browning*. Студија је спроведена на 48 *Wistar Albino* пацова груписаних у здраве и животиње којима је индукован МС, а у зависности од третмана ове групе су даље подељене на по четири подгрупе. Животиње из експерименталних група су биле третиране *per os* суспензијом валсартан/сакубитрила (68 mg/kg) током 4 недеље, док је протокол хлађења подразумевао свакодневно излагање животиња температури од +4°C током 4 сата. Након жртвовања одређивани су биохемијски параметри, док су три врсте масног ткива (ретроперитонеално, епидидимално и ингвинално) коришћене за даљу патохистолошку и PCR анализу, уз процену густине и површине адипоцита. Користећи *Langendorff*-ов апарат и модел *ex vivo* исхемијско-реперфузионе повреде испитан је потенцијални кардиопротективни ефекат примењеног третмана. Третман валсартан/сакубитрилом уз истовремено излагање хладноћи остварио је вишеструки позитиван учинак на хемодинамске параметре животиња са МС, побољшавајући гликорегулацију, ниво инсулина и липидни сатус ових животиња. Поред значајног антиоксидационог и антиинфламацијског ефекта, примењени третман је посебно у условима хипотермије промовисао *browning* белог масног ткива повећаном експресијом UCP-1 као главног термогеног биомолекула. Посебан допринос ове студије се огледа у расветљавању механизма којим валсартан/сакубитрил индукују *browning*, а превасходно се односи на активацију mTORC1 као заједничког циљаног молекула којим ова дуална фармаколошка терапија потенцира експресију UCP-1 у масном ткиву животиња са МС-ом.

Кључне речи: валсартан; сакубитрил; масно ткиво; *browning*; метаболички синдром; пацов; *in silico* студије

ABSTRACT

This study examined the effect of combined valsartan/sacubitril administration on the browning promotion in healthy and rats with metabolic syndrome (MS) at room and low temperatures. Using *in silico* studies, the signaling pathways by which the applied treatment induces browning were identified. The study included 48 *Wistar Albino* rats, grouped into healthy and MS-induced animals, further divided into four subgroups depending on the applied treatment. Animals from the experimental groups were treated orally with valsartan/sacubitril suspension (68 mg/kg) for 4 weeks, while the cooling protocol included daily exposure of animals to +4°C for 4 hours. After sacrifice biochemical parameters were determined, while three types of adipose tissue (retroperitoneal, epididymal and inguinal) were used for pathohistological and PCR analysis with adipocyte density and surface area assessment. Using the *Langendorff* apparatus and *ex vivo*-induced ischemia-reperfusion injury, cardioprotective effect of applied treatment was examined. Valsartan/sacubitril treatment with simultaneous cold exposure had multiple positive effect on the hemodynamic parameters of MS animals, improving glycoregulation, insulin levels and lipid status. Beside antioxidant and antiinflammatory effects, the applied treatment, especially under hypothermic conditions, promotes browning by increased UCP-1 expression as the main thermogenic biomolecule. The special contribution of this study is reflected through elucidation of the mechanisms by which valsartan/sacubitril induce browning, and primarily refers to mTORC1 activation as a common target molecule by which this dual pharmacological therapy induces UCP-1 expression in adipose tissue of animals with MS.

Key words: valsartan; sacubitril; adipose tissue; browning; metabolic syndrome; rat; *in silico* studies

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Гојазност.....	2
1.1.1. Дефиниција и преваленција	2
1.1.2. Узроци, последице и приступи у лечењу гојазности.....	2
1.2. Масно ткиво	3
1.2.1 Масно ткиво као ендокрини орган	3
1.2.2. Анатомија масног ткива	4
1.2.3. Бело масно ткиво	5
1.2.4. Браон масно ткиво.....	7
1.2.5. Беж масно ткиво	9
1.3. <i>Browning</i>	10
1.3.1. Појам и значај <i>browning</i> -a.....	10
1.3.2. Сигнални путеви у активацији <i>browning</i> -a	12
1.3.3. UCP-1 у контроли <i>browning</i> -a	13
1.3.4. PGC-1 α -PPAR γ сигнални пут у промоцији <i>browning</i> -a	13
1.3.5. PRDM-16 посредована активација <i>browning</i> -a	14
1.4. Промотори <i>browning</i> -a	16
1.4.1. Утицај излагања хладноћи	16
1.4.2. Фармаколошки приступи у промоцији <i>browning</i> -a.....	17
1.5. Антагонисти AT ₁ рецептора и инхибитора неприлизина.....	20
1.5.1. Утицај антагониста AT ₁ рецептора на промоцију <i>browning</i> -a	21
1.5.2. Утицај инхибиције неприлизина на промоцију <i>browning</i> -a	26
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	33
3.1. Експерименталне животиње	34
3.2. Индуција метаболичког синдрома.....	35
3.3. Третман валсартан/сакубитрилом	35
3.4. Протокол излагања хладноћи.....	35
3.5. Протокол молекулског уклапања и молекулске динамике	37
3.5.1. Студије молекулског уклапања.....	37
3.5.2. Студије симулације молекулске динамике.....	39
3.6. Варијабле мерене након експерименталног протокола.....	40
3.6.1. Морфолошке карактеристике	40
3.6.2. Ниво глукозе након теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)	40
3.6.3. Липидни профил.....	40
3.6.4. Крвни притисак и срчана фреквенца.....	40
3.6.5. Процена <i>in vivo</i> срчане функције	41
3.7. Параметри системског оксидационог стреса.....	42
3.7.1. Системски прооксидациони параметри	43
3.7.2. Ензими антиоксидационе заштите	45
3.8. Технике ензимске имуноанализе у детектовању различитих параметара из узорака серума	46
3.9. Експериментални протокол на масном ткиву	48
3.9.1. Квантификација АТР-а	49
3.9.2. Патохистолошка анализа масног ткива (техника Н/Е бојења)	49
3.9.3. Имунохистохемијска анализа масног ткива	50

3.9.4. Анализа ткивне експресија термогених и (анти/про)инфламацијских гена методом квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (енгл. <i>Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR</i>).....	53
3.10. <i>Ex vivo</i> функција срца – техника по <i>Langendorff</i> -у.....	55
3.10.1. <i>Langendorff</i> -ов апарат.....	56
3.10.2. Изоловање срца пацова.....	57
3.10.3. Протокол исхемијско/реперфузионе (И/Р) повреде срца.....	58
3.10.4. Биохемијски параметри из коронарног венског ефлуента.....	58
3.11. Патохистолошка анализа ткива миокарда	59
3.12. Статистичке анализе	60
3.12.1. Снага студије и величина узорка	60
3.12.2. Статистичка обрада података.....	60
4. РЕЗУЛТАТИ	61
4.1. Ефекат експерименталног протокола на телесну масу, масу срца, однос масе срца и телесне масе и на масу масних ткива	62
4.2. Ефекат експерименталног протокола на метаболичке параметре.....	64
4.2.1. Ниво глукозе након теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)	64
4.2.2. Ефекат фармаколошког третмана и температуре окружења на ниво инсулина	66
4.2.3. Ефекат фармаколошког третмана и различите температуре окружења на липидни профил	67
4.3. Ефекат експерименталног протокола на хемодинамске параметре	70
4.3.1. Крвни притисак и срчана фреквенца.....	70
4.3.2. <i>In vivo</i> процена функције миокарда.....	72
4.4. Утицај експерименталног протокола на системски редокс статус	75
4.4.1. Ефекат на ниво прооксидационих молекула у крвној плазми	75
4.4.2. Ефекат третмана на параметре антиоксидационе заштите	78
4.5. Ефекат експерименталног протокола на системски ниво адипокина	81
4.5.1. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију адипонектина	81
4.5.2. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију лептина	82
4.5.3. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију грелина	83
4.6. Утицај експерименталног протокола на ниво пуринских нуклеотида	84
4.6.1. Ефекат фармаколошког третмана и температурног окружења на ниво cGMP-a	84
4.6.2. Ефекат фармаколошког третмана и температурног окружења на ниво АТР-a	85
4.7. Утицај примењеног третмана на патохистолошке карактеристике масног ткива	88
4.7.1. Ефекат експерименталног протокола на структуру масног ткива - Н/Е бојење	88
4.7.2. Ефекат експерименталног протокола на проценат густине и површине адипоцита	91
4.7.3. Имунохистохемијска детекција UCP-1 молекула у узорцима масног ткива	98
4.7.4. Имунохистохемијска детекција mTOR у узорцима масног ткива.....	104
4.7.5. Имунохистохемијска детекција PGC-1 α у узорцима масног ткива	107
4.7.6. Имунохистохемијска детекција PPAR γ у узорцима масног ткива.....	110

4.8. Ефекат експерименталног протокола на експресију специфичних гена у узорцима масног ткива.....	113
4.8.1. Ефекат примењеног третмана на експресију гена који су укључени у термогенезу.....	113
4.8.2. Ефекат примењеног третмана на експресију гена укључених у инфламацију	125
4.9. Утицај експерименталног протокола на <i>ex vivo</i> функцију срца пацова.....	140
4.9.1. Упоредна анализа кардиодинамских параметара и вредности коронарног протока изолованог срца животиња које су биле чуване на собној температури .	140
4.9.2. Упоредна анализа кардиодинамских параметара и вредности коронарног протока изолованог срца животиња које су биле изложене протоколу хлађења ..	142
4.9.3. Упоредна анализа утицаја температурних разлика на кардиодинамске параметре и вредности коронарног протока	143
4.10. Утицај експерименталног протокола на вредност прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента	145
4.10.1. Упоредна анализа нивоа прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента између група животиња које су биле чуване на собној температури	145
4.10.2. Упоредна анализа нивоа прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента између група животиња које су биле изложене протоколу хлађења	146
4.10.3. Упоредна анализа утицаја температурних разлика на нивое прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента	147
4.11. Патохистолошка анализа ћелија срчаног ткива након <i>ex vivo</i> -индуковане И/Р повреде	149
4.11.1. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања хладноћи на структуру кардиомиоцита - Н/Е бојење	149
4.11.2. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања хладноћи на структуру кардиомиоцита - <i>Picroious Sirious Red</i> бојење	151
4.12. <i>In silico</i> резултати	153
4.12.1. Анализа молекулског уклапања.....	153
4.12.2. Анализа молекулске динамике и ММ/GBSA израчунавања.....	158
5. ДИСКУСИЈА	161
6. ЗАКЉУЧЦИ	181
7. ЛИТЕРАТУРА	184
8. ПРИЛОЗИ	202
Прилог 1	203

1. УВОД

1.1. Гојазност

1.1.1. Дефиниција и преваленција

Дуготрајна неравнотежа између уноса и потрошње енергије главни је узрок глобалне пандемије гојазности. У последње четири деценије гојазност је постала значајан проблем јавног здравља широм света при чему као светски феномен није ограничен на одређену заједницу или старосну групу појединаца нити је детерминисан социоекономским статусом или животном доби појединца. У циљу грубе процене степена гојазности рутински се користи индекс телесне масе (енгл. *Body mass index* - BMI) као једноставан индикатор за класификацију прекомерне телесне масе оба пола и дефинише се телесном масом особе изражене у килограмима подељене са квадратом телесне висине појединца изражене у метрима (kg/m^2). Према Светској здравственој организацији (енгл. *World Health Organization* -WHO), вредност $\text{BMI} \geq 25$ указује на прекомерну телесну масу, док се дијагноза гојазности поставља када је $\text{BMI} \geq 30$ (1).

На значајан пораст инциденце гојазности широм света указују и подаци WHO истичући да се стопа прекомерне телесне масе у општој популацији готово утростручила у 2016. години у поређењу са подацима добијеним из 1975. године. Такође, преваленца гојазности је драматично порасла и у млађој популацији у протекле четири деценије, при чему је преко 340 милиона деце и адолесцената имало прекомерну телесну масу.

1.1.2. Узроци, последице и приступи у лечењу гојазности

У етиологији гојазности леже бројни фактори укључујући начин живота, генетске факторе, употребу појединих лекова и демографске детерминанте попут старости, пола, места становања, нивоа образовања и других. Сматра се да неравнотежа између смањене физичке активности и уноса хране са високим садржајем енергије уз неодговарајућу централну супресију апетита доводи до развоја гојазности (2). Наиме, уколико је дневни унос енергије већи од потрошње, вишак калорија се у телу складишти у облику масти доводећи до прекомерне телесне масе. Стога, условљена хронично нарушеном равнотежом и прекомерном акумулацијом масти у телу, гојазност има снажан утицај на осетљивост ткива на инсулин нарушавајући системску хомеостазу глукозе. Због тога су људи са прекомерном телесном масом склони развоју разних болести укључујући дијабетес мелитус типа 2 (ДМ2), кардиоваскуларне болести (КВБ) и метаболички синдром (МС) (3-5). Заправо, код гојазних особа хронична инфламација ниског степена удружена са дислипидемијом узрокује настанак васкуларне дисфункције, атеросклерозе и нарушене фибринолизе. Сви ови фактори чине плодно тло за настанак различитих КВБ, можданог удара и венске тромбоемболије. Као мултисистемска болест, гојазност утиче и на активност респираторних мишића, смањујући комплијансу грудног коша доводећи на тај начин до хипоксије и опструктивне апнеје у сну (6). Поред ризика за развој различитих системских обољења, гојазност има утицаја на ментално здравље укључујући развој депресије, анксиозности и недостатка самопоуздања. Такође, примећена је и значајна веза у настанку гојазности и повећане стопе морталитета. Наиме, животни век гојазних људи смањује се у просеку за 5-10 година живота при чему се стопа смртности скоро удвостручује код оних особа које пуше (6, 7).

Услед изнетих поражавајућих чињеница постоји све већи интерес и неопходност да се усвоје нови приступи у лечењу гојазности који ће подстаћи губитак масе али и омогућити одржавање постигнутог BMI. До сада су се већина коришћених метода за превазилажење овог епидемијског проблема првенствено заснивале на превенцији

настанка гојазности у смислу промене начина живота, смањеном уносу калорија или на повећаној потрошњи енергије кроз повећану физичку активност. Међутим, фармаколошки приступ у смањењу телесне масе се углавном заснива на примени новосинтетисаних лекова који су дизајнирани тако да контролишу унос хране кроз централну супресију апетита што представља реверзибилан процес у третману овог стања. Сходно томе, проналажење безбедног и ефикасног начина којим ће се повећати енергетска потрошња манипулацијом периферних механизма је од изузетне важности не само у сузбијању прекомерне телесне масе већ и у смањењу нежељених ефеката лекова или других примењених интервенција у терапији гојазности (5, 8, 9).

1.2. Масно ткиво

1.2.1 Масно ткиво као ендокрини орган

Узимајући у обзир да се вишак енергије у телу акумулира у облику масног ткива, овај орган је постао централни фокус бројних истраживања која се тичу механизма укључених у настанак различитих обољења повезаних са гојазношћу (10, 11). Наиме, основне улоге масног ткива су складиштење триацилглицерола чиме масне ћелије представљају главни енергетски резервоар, као и заштита унутрашњих органа од механичких оштећења (12). Међутим, изучавањем биологије масног ткива дошло се до сазнања да не само што представља највећи ендокрини орган у људском телу, масно ткиво је и сложен орган инервисан од стране централног нервног система (ЦНС) који обавља различите ендокрине и имунолошке функције у организму (13).

Структуру масног ткива, као метаболички активаног органа, чине: адипоцити (основна градивна и функционална ћелија масног ткива), фибробласти, ендотелне ћелије и имунолошке ћелије попут макрофага, дендритских ћелија и Т лимфоцита. У зависности од локације масног депоа у телу, ове ћелије заједно доприносе ослобађању различитих метаболита, липида, цитокина, као и протеина – адипокина. Адипокини представљају сигналне молекуле који регулишу аутокрину, паракрину и ендокрину улогу масног ткива и на тај начин контролишу бројне биолошке процесе у људском телу. Заправо, најзначајније улоге адипокина као секреторних молекула огледају се у одржавању хомеостазе глукозе у телу, секрецији инсулина и осетљивости ткива на инсулин, расту ћелија, ангиогенези и репродукцији као и у постизању равнотеже између складиштења вишка масти у телу и потрошњи енергије. На тај начин масно ткиво одражава своју паракрину улогу утичући првенствено на функцију мишића, јетре, мозга, срца, панкреаса али и других органа (13, 14).

Од великог броја до сада истражених адипокина, за неколико њих се верује да имају важну улогу у патогенези болести у чијој основи се налази гојазност као фактор ризика (15). Експериментална истраживања спроведена крајем прошлог века на мишевима указала су на постојање позитивне корелације између дефицијенције *ob* гена (енгл. *obese gene* - *ob*) и настанка гојазности. Наиме, овај ген експримиран у масном ткиву кодира синтезу лептина (16). Секреција лептина прати циркардијални ритам при чему је концентрација овог адипокина највећа током ноћи а најнижа ујутру. Са друге стране, концентрација лептина у масном ткиву као и у крвној плазми је уско повезана са процентом депонованог масног ткива. Процесом егзоцитозе лептин пролази хематоенцефалну баријеру и на тај начин шаље повратни сигнал хипоталамусу о енергетским резервама у телу (15). С обзиром да се рецептори за лептин не налазе само у ЦНС-у већ и у хематопоезном и имуном систему, овај пептид остварује и друге значајне физиолошке улоге поред основне у контроли уноса хране и регулацији енергетске дневне потрошње. Узимајући у обзир дневну секрецију лептина, различити хормони

(нпр. хормона раста, инсулин, кортизол) могу утицати на његову секрецију зависно од пола, састава и врсте унете хране. Међутим, иако су значајно високе концентрације лептина примећене код гојазних људи, често се уочава и стање резистенције на овај адипокин. Високе вредности лептина даље ометају правилан метаболизам липида и угљених хидрата, остварујући неповољан ефекат на ангиогенезу, кардиоваскуларни, репродуктивни и имуни систем (15). Са друге стране, различити стимулуси попут излагања ниским температурама као и неки хормони (хормон раста, тиреоидни хормони и мелатонин) могу смањити циркулишући ниво лептина (17).

Поред лептина, адипонектин представља још један протеин секретован од стране адипоцита који заузима значајно место у етиологији гојазности као и настанка ДМ2. Адипонектин има кључну улогу у енергетском метаболизму при чему су ниске концентрације овог хормона измерене код гојазних особа. Поред основног ефекта у повећању сензитивности ткива на инсулин, адипонектин поседује и антиинфламацијско, антиоксидационо и кардиопротективно дејство (18). Као циркулишући протеин, адипонектин се складишти у срцу, васкуларном систему и скелетним мишићима и интерагује са Т-кадхерином, круцијалним протеином неопходним за постизање кардиопротективних ефеката адипонектина. Антидијабетично дејство адипонектина посредовано је активацијом два основна сигнална пута који укључују активацију AMPK (енгл. 5' AMP-activated protein kinase - AMPK) и PPAR α (енгл. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha - PPAR α). Иако многобројни сигнални путеви леже у основи механизма којим адипонектин повећава сензитивност периферних ткива на дејство инсулина, чини се да овај ефекат адипонектин остварује примарно преко супресије глуконеогенезе и индукције експресије гена за глукозне транспортере тип 4 (енгл. Glucose Transporter Type 4 - GLUT4) (19).

За разлику од лептина и адипонектина који представљају анорексигене пептиде, грелин припада групи орексигених хормона који повећавају апетит посредством специфичних рецептора у хипоталамусу (20). Грелин секретује првенствено оксинтичке ћелије фундуса желуца, док се у мањој мери секретује у епителу других партија гастроинтестиналног тракта, уrogenиталним органима, плућима и хипофизи. Пулсатилна секреција грелина узрокује високе вредности овог хормона у плазми током гладовања и достиже референтне вредности одмах након уноса хране. Поред тога, храна обилна липидима или глукозом редукује циркулишући грелин, док се уносом течности не мења ниво овог хормона у плазми што указује на то да је ослобађање грелина регулисано уносом макронутријената а не волуминозношћу obroка. Међутим, код абнормално гојазних особа контрола секреције грелина је нарушена у смислу одржавања ниских вредности пре уноса хране и високих концентрација након obroка (21). Претходно спроведена истраживања показала су да егзогена примена грелина не само да повећава апетит већ смањује метаболичку активност и катаболизам масти доводећи на тај начин до пораста у телесној маси. Сматра се да се блокадом сигналних путева у ЦНС-у одговорних за ендогену секрецију грелина редукује спонтани унос хране а самим тим не долази до повећања ВМІ. Као орексигени хормон, грелин учествује у адаптивном одговору на унос хране због чега овај пептид може служити као мета у различитим терапијским приступима лечења гојазности (22).

1.2.2. Анатомија масног ткива

Према локализацији масно ткиво се дели на два основна анатомска депоа: субкутано (поткожно) и висцерално масно ткиво. Док је субкутано масно ткиво локализовано како и сама реч каже испод коже, висцерално масно ткиво облаже унутрашње органе па се додадно може класификовати на основу анатомске локализације

на оментално, мезентерично, ретроперитонеално, гонадално и перикардијално висцерално масно ткиво (23). Са друге стране, субкутано масно ткиво је локализовано на седам основних депоа испод коже али се доминантно налази у пределу глутеофеморалне регије, на леђима и предњем абдоминалном зиду. Према проценту заступљености у телу, субкутано масно ткиво чини око 80% укупних масти док проценат висцералног масног ткива варира у зависности од пола и година старости. Постоји значајна разлика у врсти адипоцита, ендокриној функцији и липолитичкој активности између субкутаног и висцералног масног ткива као и њиховој сензитивности на дејство инсулина и других хормона (24).

Субкутано масно ткиво поседује метаболички капацитет за складиштење вишка енергије при уносу хиперкалоричне хране када се слободне масне киселине (СМК) и глицерол складиште у адипоцитима поткожног масног ткива у виду триглицерида. Наиме, услед засићења складишног капацитета масног ткива адипоцити постају све већи при чему губе функцију у апсорпцији СМК и триглицерида у постпрандијалном периоду. Велики адипоцити су неосетљиви на антилиполитичко дејство инсулина и чешће су у саставу висцералног масног ткива у поређењу са субкутаним што објашњава физиолошке и метаболичке разлике између ове две врсте масног ткива (14). Уз то инсулинска резистенција представља најзначајнији фактор ризика за настанак КВБ а управо је условљена измењеном морфологијом адипоцита висцералног масног ткива. Поред тога, инфламацијске ћелије, на првом месту макрофаги, преовлађују у висцералном масном ткиву у односу на субкутано. Док се крв до субкутаног масног ткива допрема путем системске циркулације, висцерално масно ткиво је инервисано преко портне вене којом се крв допрема иницијално до јетре. Портна дренажа висцералног масног ткива омогућава хепатичној циркулацији дирекатан приступ СМК и адипокинима који се секретују у овом масном ткиву активирајући различите механизме имуног система, продукцију бројних проинфламацијских медијатора, повећану синтезу липопотеина богатих триглицеридима, стимулацију глуконеогенезе и смањени хепатички клиренс инсулина (25, 26). У поређењу са субкутаним, висцерално масно ткиво се одликује богатијом васкуларном мрежом. Такође, метаболичка активност висцералног масног ткива је значајно већа у односу на субкутано при чему се акумулација висцералног масног ткива уско повезује са настанком МС, атеросклерозе и других КВБ (24, 27-29). Са друге стране, висцерално масно ткиво је осетљивије на губитак телесне масе у односу на субкутано масно ткиво при чему је свака редукција телесне масе праћена првенствено смањењем висцералног масног ткива пре него поткожног (24).

На основу функције, морфолошких и биохемијских карактеристика као и на основу профила експерисије гена, масно ткиво се даље може поделити на три основна типа и то: бело масно ткиво (енгл. *White Adipose Tissue* – WAT), браон масно ткиво (енгл. *Brown Adipose Tissue* – BAT) и беж масно ткиво (енгл. *Beige Adipose Tissue* – BeAT) (24).

1.2.3. Бело масно ткиво

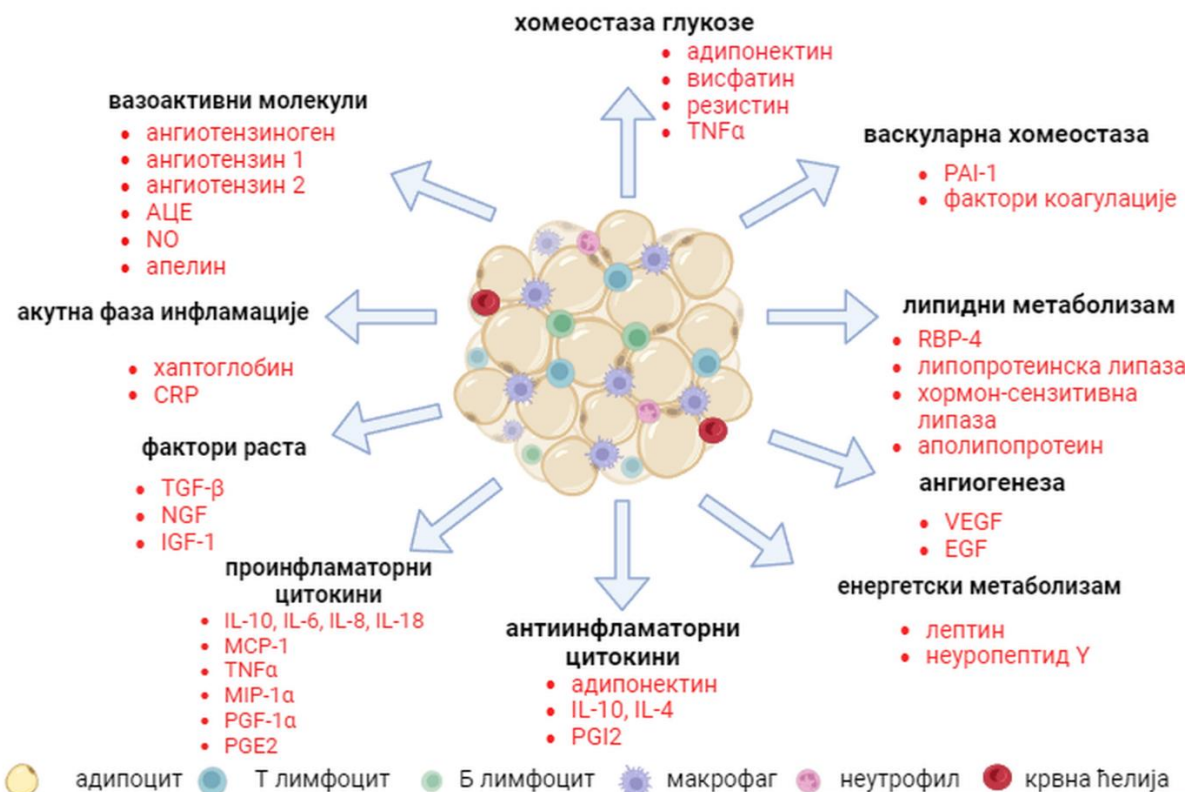
Развој WAT-а започиње још *in utero* али се његова диференцијација обавља након рођења када специјализоване ћелије овог масног ткива започињу своју примарну функцију у складиштењу масти која ће служити као „гориво“ током периода смањеног уноса хране. WAT је распрострањен у целом организму при чему је анатомски локализован у пределу субкутаног и висцералног масног ткива. Адипоцити WAT-а су сферичног облика међусобно повезани лабавим везивним ткивом. Карактеристична морфологија WAT-а огледа се у унилокуларној грађи адипоцита - присуство једне велике

липидне капљице која заузима 90% запремине ћелије. Танки слој цитоплазме зрелог белог адипоцита садржи једро, ендоплазматски ретикулум, танке, ретке и издужене митохондрије, Голџијев комплекс, везикуле и друге органеле (23, 30, 31).

Претходно описана улога WAT-а у складиштењу високоенергетских молекула умногоме зависи од адекватне функционалности ових адипоцита. Да би бели адипоцити правилно обављали своју метаболичку функцију неопходна је равнотежа три главна процеса: липогенезе (синтеза липида), β оксидације (оксидација масних киселина) и липолизе (ослобађање масних киселина). Процес липогенезе регулисан је SREBP-1c протеином (енгл. *Sterol regulatory element-binding protein-1c* - SREBP-1c) при чему се синтетишу естерификоване масне киселине а затим формирају триглицериди из угљених хидрата или других макромолекула унетих храном. За процес β оксидације одговоран је PPAR α као транскрипциони фактор који у митохондријама регулише разградњу масних киселина до ацетил коензима А (ацетил-КоА) и стварање енергије у виду аденозин трифосфата (енгл. *Adenosine triphosphate* - АТР). Како би се извршило ослобађање масних киселина из триглицерида током процеса липолизе неопходна је активност специфичних ензима - липаза. Различите липазе облажу липидну капљицу и приступају хидролизи триглицерида тек након процеса фосфорилације помоћу протеин киназе А (енгл. *Protein kinase A* - PKA) услед β -адренергичке стимулације или глукагоном индиковане активације (32).

Ендокрина функција WAT-а огледа се у ослобађању преко 50 различитих адипокина који функционишу као мрежа у регулацији апетита, хомеостазе глукозе, липида, инфламације и кардиоваскуларних функција. Основни адипокини секретовани од стране белих адипоцита су лептин, адипонектин, резистин, апелин, висфатин, оментин, ретинол везујући протеин 4, интерлеукин (енгл. *Interleukin* – IL) -1, IL-4, IL-10, Фактор некрозе тумора алфа (енгл. *Tumor necrosis factor alpha* – TNF α), ангиотензиноген, Ц реактивни протеин (енгл. *C reactive protein* – CRP) и моноцитни хемоатрактантни протеин 1 (енгл. *Monocyte chemoattractant protein - 1* – MCP-1) (Слика 1). Међутим, у стању гојазности хомеостаза у циркулишућим нивоима адипокина/citoкина је нарушена што доприноси нарушеном метаболизму адипоцита и настанку инфламације (24, 32).

Поред метаболичке и ендокрине функције, адипоцити WAT-а имају значајну улогу и у метаболизму аминокиселина разгранатог ланца (леуцин, изолеуцин и валин) чија је неадекватна регулација уско повезана са настанком метаболичких дисфункција у стању гојазности. Управо оментално масно ткиво представља ткиво са највећим капацитетом за катаболизам ових аминокиселина при чему хипертрофија адипоцита, настала као последица гојазности значајно редукује активност ензима укључених у разградњу аминокиселина разгранатог ланца. Претпоставља се да повећана концентрација ових аминокиселина у крви или ткиву гојазних особа представља важан фактор за настанак инсулинске резистенције и MC (32).



Слика 1. Адипокини укључени у метаболичке и физиолошке процесе WAT-а

1.2.4. Браон масно ткиво

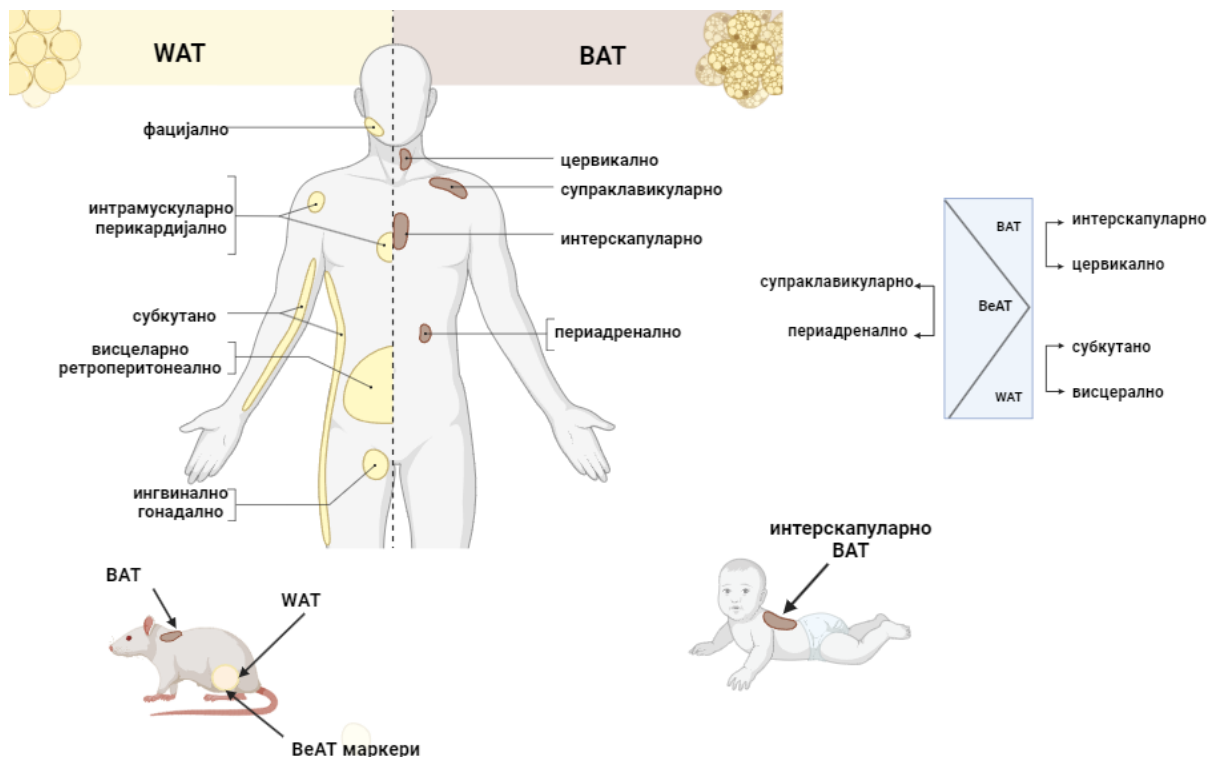
За разлику од белих адипоцита, ВАТ одликује специфична мултилокуларна структура адипоцита (већи број липидних капљица мањег дијаметра) што значи да се триглицериди налазе у мањим и многобројним вакуолама. Морфологија смеђих адипоцита је карактеристична по великом броју митохондрија, сферичног облика са густо збијеним ламинарним кристама на унутрашњој страни мембране. Захваљујући овако пакованим митохондријама а уједно и добро васкуларизованој мрежи капилара, адипоцити ВАТ-а имају карактеристичну браон боју (33).

Основна улога ВАТ-а односи се на регулацију температуре и производњу енергије. Користећи ускладиштене липидне капљице, браон адипоцити распршују енергију као топлоту у процесу који се назива „термогенеза без дрхтања“ (енгл. *Non-shivering thermogenesis*). Овај процес одвија се уз помоћ глюкозе и СМК насталих као производ катаболизма WAT-а, које сада браон адипоцити користе као „гориво“ за производњу енергије. Главни биомолекул који посредује у овом процесу је „одвајајући протеин“ (енгл. *Uncoupling protein-1* - UCP-1) који се налази на унутрашњој страни мембране митохондрија браон адипоцита. Овај протеин повећава проводљивост унутрашње стране митохондрија за H⁺ јоне при чему обавља своју основну улогу у преносу протона из међумембранског простора у митохондријски матрикс. Протони који стварају протонски градијент неопходан за индукцију синтезе АТФ-а сада прелазе у матрикс митохондрија али без синтезе АТФ-а. Овај процес преноса јона који се обавља одвојено од фосфорилације аденозин дифосфата (енгл. *Adenosine diphosphate* - ADP) објашњава зашто се овај протеин управо назива „одвајајући протеин“. Другим речима, то је протеин који стимулише потрошњу енергије али без истовремене производње АТФ-а (34). Заправо, у еукариотским ћелијама, енергија је ускладиштена на рачун

постојања протонског градијента на унутрашњој страни митохондрија и управо ту енергију користе протони при кретању низ свој концентрациони градијент за стварање АТР-а помоћу ензима АТР синтазе. Међутим, у условима када се протони крећу низ свој градијент без стварања АТР-а, ускладиштена енергија се ослобађа преко UCP-1 у виду топлоте (31, 35). Захваљујући густо пакованим UCP-1 у митохондријама смећих адипоцита, сматра се да ВАТ обезбеђује око 10-20% већу потрошњу енергије у поређењу са стопом базалног метаболизма. Због тако веће потребе за кисеоником, адипоцити ВАТ-а садрже гушће неуронско снабдевање што представља још једну карактеристику по којој се ови адипоцити разликују од белих масних ћелија (14, 36, 37).

Дуго времена се сматрало да само новорођенчад и деца имају браон адипоците који обезбеђују ослобађање топлоте у хладном окружењу са којим се новорођена деца сусрећу при рођењу. Међутим, старењем се запремина овог ткива драстично смањује при чему код одраслог човека заузима свега 1% од укупне телесне масе. Наиме, заступљеност ВАТ-а у телу расте током пубертета и достиже највећи удео у укупном проценту масти у телу током адолесценције а затим се брзо смањује старењем (38, 39). Код одраслих људи, ВАТ се налази на неколико анатомских региона и то: цервикални, суправентрикуларни, аксиларни, паравертебрални, медијастинални и горњи абдоминални регион (14). Сматра се да оваква расподела браон адипоцита у телу омогућава адекватну термогенезу и снабдевање виталних органа крвљу (24, 31, 40). Узимајући у обзир да ВАТ користи глукозу и СМК за производњу енергије, ово ткиво је у негативној корелацији са повећаним ВМІ, нивоом глукозе у крви и настанком ДМ2. Поред старења као основног фактора који нарушава равнотежу у расподели белих и браон адипоцита у корист белих масних ћелија, сматра се да метаболичке болести и смањена осетљивост ткива на β -адренергичке стимулусе у великој мери редукују депое ВАТ-а. Са друге стране, повећане резерве ВАТ-а уочене су код особа које су биле изложене ниским спољашњим температурама (становници Скандинавије) или код пацијената са феохромоцитомом (карцином надбубрежне жлезде). Наиме, учестало излагање ниским температурама одржава већи проценат браон адипоцита у телу и спречава развој гојазности. Дакле, одржавање метаболички активних ВАТ депоа у телу доприноси смањењу ризика од настанка метаболичких болести и повезаних компликација (10, 40, 41).

Локализација различитих типова адипоцита у анатомским депоима одојчета, одраслог човека и глодара приказани су на **Слици 2**.



Слика 2. Анатомска локализација различитих типова масног ткива.

1.2.5. Беж масно ткиво

Недавно, откривен је и трећи, нови тип адипоцита морфолошки сличних карактеристика као браон адипоцити али локализованих у депоима WAT-а. Овај тип масног ткива назива се беж или смеђе масно ткиво (BeAT) (39). Са морфолошког аспекта, мултилокуларна грађа карактеристична за BAT присутна је и у беж адипоцитима са великим бројем митохондрија и експресијом специфичних гена карактеристичних за браон адипоците. Иако и BeAT поседује способност да се подвргне процесу термогенезе као и BAT-а, присутне су разлике у структурама ова два масна ткива. Ове разлике се односе на прекурсорске ембрионалне ћелије од које потичу браон адипоцити као и на експресију специфичних гена. Док се при базалним условима у браон адипоцитима UCP-1 експримира у великој мери, за експресију овог молекула у BeAT-у потребна је активација β -адренергичких рецептора. Међутим, иако беж адипоцити експримирају мањи ниво UCP-1 у поређењу са класичним BAT, ове масне ћелије поседују изузетан капацитет у индукцији експресије овог молекула под дејством различитих стимулуса (42-45).

Разлике у морфолошким карактеристикама као и функцијама које ова три типа масног ткива обављају приказане су у **Табели 1**.

Табела 1. Поређење морфолошких и функционалних карактеристика белих, беж и браон адипоцита

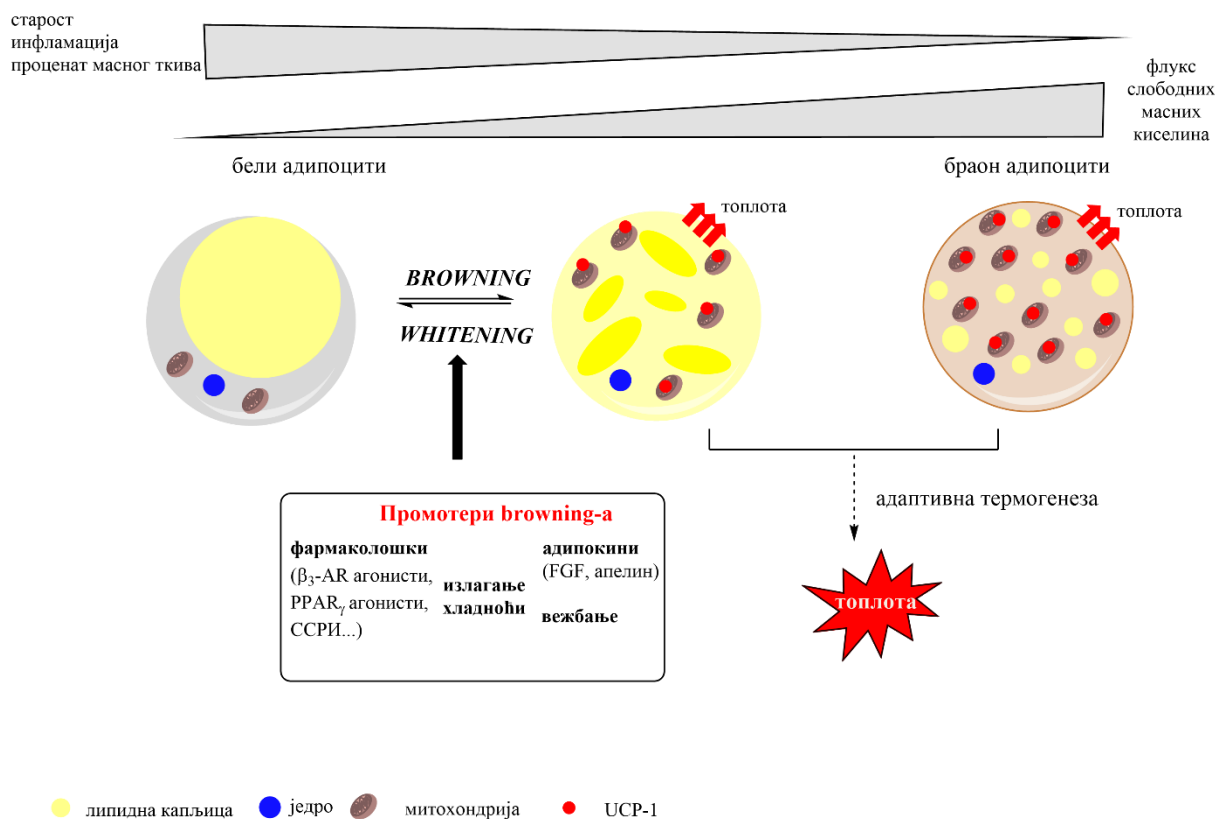
	WAT	BAT	BeAT
Порекло	Myf5 ⁻	Myf5 ⁺	Myf5 ⁺
Функција	Акумулација вишка енергије у облику масти, ендокрина функција	Термогенеза, ендокрина	Адаптивна термогенеза (стимулисана)
Фенотип	Једна велика липидна капљица (унилокуларни фенотип)	Више малих липидних капљица (мутилокуларни фенотип)	Више малих липидних капљица услед стимулуса
UCP-1 експресија	Негативна	Позитивна (у изобиљу)	Позитивна (услед стимулуса)
Густина митохондрија	Ретка	Велика	Средња
Специфични ген/адипокин	Липопротеинска липаза, лептин, адипонектин	PGC1 α PRDM16	PRDM16

1.3. Browning

1.3.1. Појам и значај *browning*-а

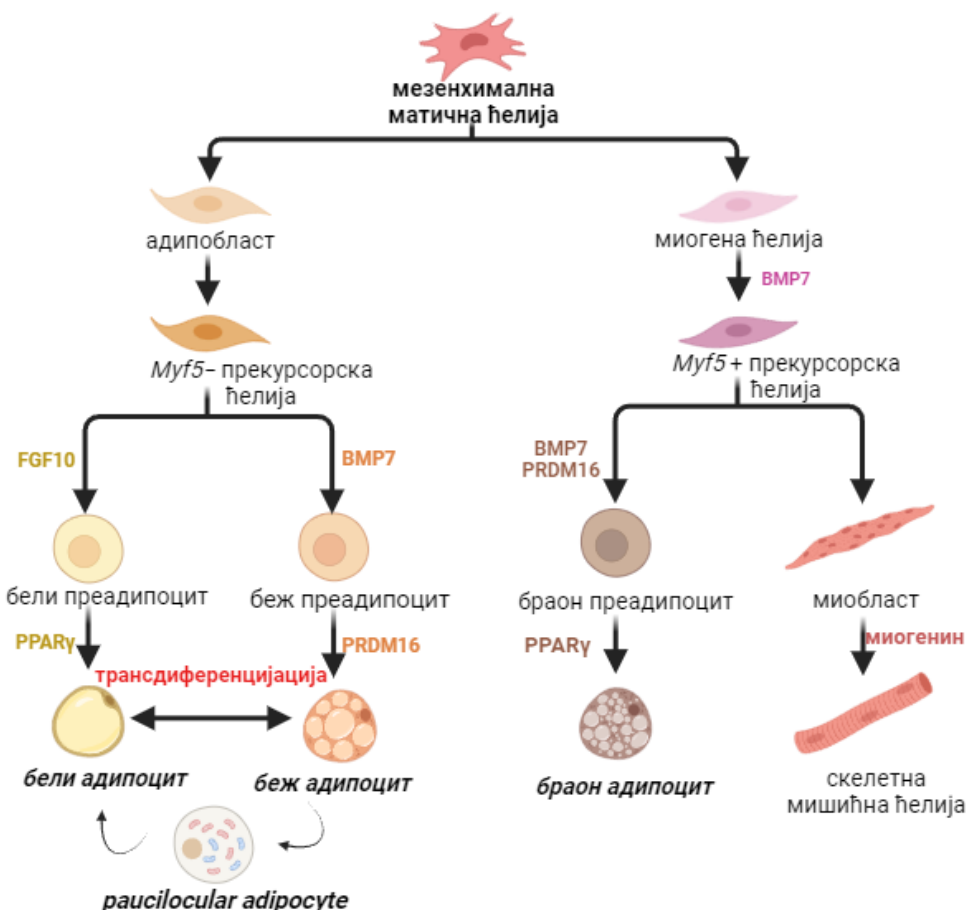
Узимајући у обзир све набројане функције браон адипоцита које доприносе одржавању метаболичке хомеостазе као и повезаност између акумулације WAT-а и настанка метаболичких болести, урађене су експерименталне студије које су указале на значај индукције процеса којим ће бели адипоцити стећи карактеристике браон адипоцита – процес познат као „*browning*“ (46-48).

Примећено је да недостатак BAT-а у телу као и генетичка дефицијенција UCP-1 повећавају предиспозицију организма за настанак гојазности, као и то да је прекомерна телесна маса често повезана са инхибицијом стварања браон адипоцита (49). Стога, одржавање равнотеже у прерасподели WAT и BAT у телу је од изузетне важности за постизање енергетске хомеостазе, док је нарушавање овог баланса у корист акумулације белих адипоцита скопчана са настанком кардиоваскуларних и метаболичких компликација (Слика 3). Као главни активатор у процесу превођења белих у беж адипоците препознат је UCP-1, чију експресију могу активирати различити стимулуси (50).



Слика 3. Типови адипоцита и молекули који фаворизују стварање браон адипоцита

Диференцијација браон адипоцита који се могу наћи у депоима WAT-а (беж адипоцити) се разликује у односу на диференцијацију зрих браон адипоцита у BAT депоима. Претходно спроведеним истраживањима дошла се до сазнања да браон адипоцити воде порекло од исте прогениторске ћелије које експримира миогени фактор 5 (енгл. *Myogenic factor 5* - Myf5⁺) као и ћелије скелетних мишића (51). Са друге стране, адипоцити у WAT депоима као и беж адипоцити активирани *browning*-ом потичу од Myf5⁻ прогениторских ћелија (52). Наиме, у литератури се Myf5⁻ мезенхималне прекурсорске ћелије у WAT-у које се различитим стимулусима диференцирају у браон адипоците називају беж/смеђи адипоцитима, док се Myf5⁺ браон ћелије локализоване у BAT депоима називају „класични или конститутивни“ браон адипоцити (49, 53). Међутим, једна група научника утврдила је постојање још једне групе адипоцита које посредују процесу диференцијације WAT у BeAT (тзв. *paucilocular adipocyte*). Ови адипоцити поседују UCP-1 позитивну морфолошку грађу при чему се у одговору на различите стимулусе из белог адипоцита конвертују у индуцибилне беж/смеђе адипоците. Процес диференцијације различитих форми адипоцита приказан је на **Слици 4**.



Слика 4. Схематски приказ диференцијације различитих типова адипоцита

1.3.2. Сигнални путеви у активацији *browning-a*

Са функционалног аспекта, диференцијација адипоцита се може посматрати као промена у обрасцима експресије гена тако да процес њихове транскрипције иницира диференцијацију преадипоцита (адипогенезу) и детерминише функцију зрих адипоцита. Специфична мрежа транскрипционих фактора кодира на стотине протеина одговорних за контролу транскрипције (54). Међу њима, два мастер транскрипциона регулатора се издвајају као кључна за индукцију специфичних гена који започињу процес адипогенезе. То су PPAR γ (енгл. *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* - PPAR γ) и C/EBP α (енгл. *CCAAT/enhancer-binding protein α* - C/EBP α). Колико је PPAR γ важан транскрипциони фактор за диференцијацију и функцију адипоцита говори у прилог чињеница да у одсуству овог мастер регулатора транскрипције прекурсорске ћелије немају способност експресије фенотипа карактеристичног за било коју врсту адипоцита. Са друге стране, C/EBP α заузима важно место у регулацији сензитивности ћелија на дејство инсулина али нема директан утицај на промоцију *browning-a*. Међутим, иако не утиче на превођење WAT у BeAT, C/EBP α интерагује са PPAR γ и тако индукује експресију гена који су специфични за диференцијацију адипоцита. Другим речима, у транскрипционој каскади диференцијације адипоцита постоје такозвана два „таласа“. Први талас се односи на експресију проадипогених и антиадипогених транскрипционих кофактора који се након дејства неког стимулуса везују за ДНК или хроматин и интерагују са глукокортикоидним рецептором, експримираним у раној фази диференцијације адипоцита. На овај начин се контролише

ћелијски циклус и раст као и експресија специфичних гена. На крају, први талас адипогенезе иницира транскрипциону каскаду и на тај начин покреће други, финални талас који се односи на активацију PPAR γ и C/EBP α као мастер регулаторних протеина у процесу диференцијације адипоцита (37, 55, 56).

1.3.3. UCP-1 у контроли *browning-a*

Класични браон адипоцити експримирају широк спектар тзв. термогених гена који поред контроле процеса *browning-a* утичу и на метаболичку активност ових ћелија. Међу њима, UCP-1 заузима најзначајније место у контроли функције браон и беж адипоцита што га уједно чини и специфичним транскрипционим фактором за ове две врсте масних ћелија (37, 57). UCP постоји у пет различитих изоформи (UCP-1 до UCP-5) које су експримиране у неколико различитих органа (58). У литератури, најчешће описан механизам којим се бели адипоцити преводе у беж се управо односи на индукцију термогенезе посредством UCP-1 молекула. Најпре се то односи на механизам ослобађања норепинефрина из терминалних завршетака симпатичких неурона који инервишу WAT, што доводи до активације β 3-адренергичких рецептора (59).

Активација β 3-адренергичких рецептора даље урокује активацију ензима аденилат циклазе што последично повећава ниво интрацелуларног цикличног аденозин монофосфата (енгл. *Cyclic adenosine monophosphate* - cAMP). У овој сигналној каскади, активира се и ензим РКА који даље фосфорилише супстрате као што су перилипин, (протеин који облаже липидне капљице у адипоцитима), протеин киназу активiranу p38 митогеном (енгл. *p38 mitogen-activated protein kinases* - p38MAPK) и хормон-сензитивне липазе, што све заједно узрокује мобилизацију СМК из липидних капљица ради активирања UCP-1 молекула. На крају, велики број митохондрија врше оксидацију метаболичких супстрата како би се на овај начин произвела енергија у виду топлоте тј. индуковао *browning* (60). Активацијом овог сигналног пута фосфорилишу се и други транскрипциони фактори који регулишу експресију ензима јодотиронин дејодиназе типа 2 (енгл. *Type II iodothyronine deiodinase* - DIO2). Овај ензим катализује конверзију неактивног тетрајодотиронина (Т4) у тријодтиронин (Т3) и директно промовише експресију UCP-1 у масном ткиву (61, 62). Друга мета p38MAPK сигналног пута је активација PGC-1 α (енгл. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* - PGC-1 α) који се везује за PPAR γ и последично повећава експресију UCP-1 на унутрашњој страни митохондрија адипоцита (61, 63).

1.3.4. PGC-1 α -PPAR γ сигнални пут у промоцији *browning-a*

PGC-1 α представља транскрипциони коактиватор PPAR γ рецептора који посредује у бројним биолошким процесима. Познато је да се PGC-1 α експримира у раној фази диференцијације адипоцита при чему су зрели браон адипоцити примарно место његове експресије у поређењу са белим масним ћелијама. Поред основне улоге овог молекула у активацији PPAR γ рецептора и последичној индукцији експресије UCP-1, PGC-1 α контролише биогенезу митохондрија као и процесе оксидативног метаболизма у многим ћелијама (64).

Међу бројним стимулусима, сматра се да излагање ниским спољашњим температурама најјаче индукује експресију PGC-1 α молекула што јасно указује на то да PGC-1 α представља важан регулаторни протеин у процесима термогенезе (65). Начин на који PGC-1 α посредује у процесу термогенезе свакако је повезан са повећаном експресијом UCP-1 молекула у адипоцитима. Међутим, различити сигнални путеви посредују у овој транскрипционој каскади. С обзиром да је експресија UCP-1 молекула

условљена фосфорилацијом горепоменутог cAMP-РКА-p38МАРК сигналног пута, PGC-1 α представља регулаторни протеин који је неопходан за cAMP индуковану транскрипцију гена који ће даље експримирати UCP-1 молекула у зрелим адипоцитима. Такође, PGC-1 α је лиганд многих нуклеарних хормонских рецептора попут PPAR α , PPAR γ и RXR (енгл. *retinoid X receptor* – RXR) за које се зна да директно индукују експресију UCP-1 молекула. Стога, примена агониста ових рецептора условиће PGC-1 α посредовану транскрипцију UCP-1 гена а тиме и превођење WAT у BAT (66, 67).

Литературни подаци указују на то да браон адипоцити активирани адренергичком стимулацијом који имају недовољну експресију PGC-1 α остварују оскудан ниво термогенезе што имплицира да је експресија овог регулаторног протеина неопходна за акутну транскрипциону активацију термогених процеса али не и за диференцијацију браон масних ћелија (68). Заправо, браон адипоцити без PGC-1 α молекула након активације хладноћом неће експримирати већи ниво UCP-1 молекула али ће се експресија UCP-1 одржавати на базалном нивоу. Ово сазнање потврђује хипотезу да је PGC-1 α круцијални молекула за процес термогенезе али његова повећана експресија није неопходна за експресију UCP-1 молекула у адипоцитима који су стимулирани акутном адренергичком активацијом (69).

Поред основне улоге PPAR γ као транскрипционог регулатора у процесу диференцијације адипоцита, овај протеин обавља неколико важних хомеостатских функција попут контроле метаболизма глукозе и липида услед регулације коришћења, оксидације и складиштења СМК. Међутим, одржавањем релативно стабилне експресије гена за PPAR γ примећен је значајан пораст у нивоу UCP-1 молекула. Транскрипциона каскада којом PPAR γ индукује трансдиференцијацију WAT у BAT заснована је на стабилизацији PRDM16 протеина (енгл. *PR domain containing 16* - PRDM16) који активира комплетан сет BAT гена у белим адипоцитима. Претходно спроведена истраживања показала су да је *browning* белих адипоцита услед примене PPAR γ агониста заснован управо на стабилизацији иРНК PRDM16 протеина који активира PGC-1 α и интерагује са њим, што за крајњи циљ има експресију гена специфичних за класичне браон адипоците у депоима белих адипоцита (58, 70).

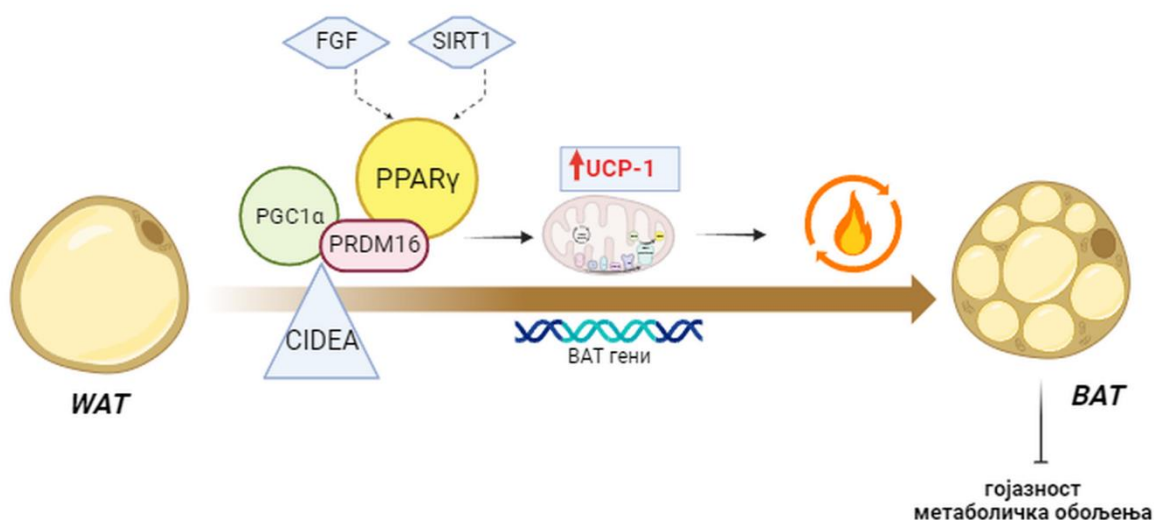
Превођење WAT у BAT се може постићи деацетилацијом фамилије PPAR рецептора у присуству SIRT1 протеина (енгл. *Sirtuin 1* - SIRT1) при чему се на тај начин мимикује хронична активација PPAR рецептора и последична активација PGC-1 α молекула (71). Како би се посредством PGC-1 α -PPAR сигналног пута индуковала експресија гена специфичних за браон адипоците, првенствено је неопходна активација SIRT1 протеина. AMPK је добро познат енергетски сензор који заузима важно место у регулацији хомеостазе ћелије. Показано је да AMPK-посредована активација SIRT1 протеина води ка активацији сигналне каскаде која учествује у покретању PGC-1 α -PPAR сигналног пута као и повећане експресије UCP-1 у адипоцитима (72-74). Са друге стране, активност PPAR рецептора може се постићи и посредством фактора раста фибробласта (енгл. *Fibroblast Growth Factor* - FGF) који стабилизују PGC-1 α у белим адипоцитима и доприносе активности PGC-1 α -PPAR сигналног пута (75, 76).

1.3.5. PRDM-16 посредована активација *browning-a*

Поред неизоставне улоге PRDM16 у активацији PPAR γ рецептора и уједно промоције *browning-a*, овај транскрипциони протеин индукује и диференцијацију фибробласта у браон адипоците ко-експресијом са C/EBP протеинима. У одсуству C/EBP и PRDM16 смањује се и експресија UCP-1 а тиме и гена специфичних за BAT (14). PRDM16 је молекула који је високоспецифичан за браон адипоците и функционише по принципу гена који има “on/off” активност за иницирање термогенезе и диференцијације

ВАТ-а. Заправо, овај транскрипциони протеин представља јасну детерминанту за диференцијацију Myf5 прекурсорских ћелија. То значи да висока експресија PRDM16 протеина иницира диференцијацију ВАТ прекурсорских ћелија и експресију ВАТ специфичних гена (UCP-1 и PGC-1 α) (70, 77). Међутим, иако је експресија PRDM16 карактеристична за ВАТ, његова експресија у белим адипоцитима супримира гене специфичне за ово ткиво при чему повећава ниво UCP-1 молекула, посебно у депоима субкутаног WAT-а (78, 79). То значи да се *browning* посредован PRDM16 протеином одвија двојачко и то: активацијом специфичних гена за браон адипоците и инхибицијом експресије гена карактеристичних за беле адипоците (80).

Студије спроведене на PRDM16 „knockout“ мишевима показале су да су браон адипоцити са недостатком овог гена у потпуности изгубили термогену функцију као и то да су ове животиње осетљиве на настанак инсулинске резистенције и гојазности (60, 81). Познато је да неки кофактори могу блокирати експресију PRDM16 молекула. Наиме, појачана експресија TLE3 (енгл. *Transducin-like enhancer of split 3* - TLE3) инхибира PRDM16-PPAR γ интеракцију што доприноси прекомерној липидној акумулацији у WAT депоима, док са друге стране делеција у експресији TLE3 гена узрокује транскрипцију гена укључених у процесу термогенезе (82). Други важни посредни молекул који детерминише стварање беж адипоцита је CIDEA фактор (енгл. *Cell-death inducing DNA fragmentation factor-like effector A* - CIDEA). Првобитно је овај фактор сматран митохондријским протеином, међутим касније је уочен утицај овог молекула на величину липидних капљица а тиме и на морфолошку грађу WAT-а. Повећана експресија CIDEA молекула утиче на термогенезу стварањем беж адипоцита и то услед инхибиције LXRs рецептора (енгл. *Liver-X receptors* – LXRs). Наиме, активацијом ових рецептора директно се инхибира експресија UCP-1 молекула. У складу са тим, CIDEA се сматра промотером *browning*-а услед директне стимулације UCP-1 експресије, инхибиције LXRs рецептора али и услед агонистичког дејства на PPAR γ рецепторе чиме покреће генску експресију карактеристичну за браон масне ћелије (58, 61, 73) (Слика 5).



Слика 5. Схематски приказ PGC- α -PPAR сигналног пута у промоцији *browning*-а

1.4. Промотери *browning*-а

С обзиром на високу преваленцу гојазности широм света од суштинског значаја је проналажење новог приступа у превенцији настанка и лечењу овог стања, као и третману компликација које настају као последица повећаног BMI. Узимајући у обзир да промене у начину живота попут смањеног уноса висококалоричне хране уз повећану физичку активност захтевају строгу дисциплину појединца, активација ВАТ-а у анатомским депоима белих адипоцита представља нови приступ у лечењу гојазности.

Недавно, резултати неколико спроведених студија указали су на корисна дејства појединих група лекова који могу испољити позитивне ефекте у смањењу телесне масе изазивајући термогенезу активацијом различитих сигналних путева. Међутим, поред многих истражених фармаколошких агенаса који могу иницирати *browning* чини се да активација симпатичког нервног система услед излагања ниским температурама (енгл. „*Cold-induced browning*”) представља златни стандард за превођење белих у беж адипоците (14).

1.4.1. Утицај излагања хладноћи

Добро је познато да температура окружења у ком се налазимо може имати снажан утицај на системску модулацију различитих биохемијских, инфламацијских и имунолошких процеса у организму (44). При ниској спољашњој температури, која служи као сензорни стимулус, долази до активације терморецептора у кожи и сензибилизације аферентних нервних влакана који даље шаљу импулс до ЦНС-а изазивајући терморегулаторни одговор у виду вазоконстрикције и ослобађања катехоламина (83). Међу секретованим катехоламинима доминантно долази до ослобађања норадреналина из симпатичких нервних влакана који након везивања за β -адренергичке рецепторе активира сАМР-РКА сигнални пут. Као последица стимулације овог сигналног пута долази до акумулације различитих адипокина и повећане експресије ВАТ-специфичних гена, првенствено UCP-1 молекула. То даље узрокује повећану ВАТ активност, мобилизацију и оксидацију СМК у белим као и у браон адипоцитима и промоцију *browning*-а у анатомским депоима WAT-а (5, 58, 84, 85).

Занимљиво је истаћи да излагање хладноћи не само да утиче на експанзију зрелих адипоцита током процеса пролиферације већ се активацијом β -адренергичких рецептора поспешује и *de novo* диференцијација ВАТ прекурсорских ћелија (86). Највећу сензитивност на овај стимулус показују бели адипоцити субкутаног масног ткива док је епидидимално масно ткиво, као тип висцералног WAT-а, делимично резистентно на промоцију *browning*-а овим стимулусом (87). Примећено је да прекид у стимулацији симпатичког нервног система услед излагања топлијем спољашњем окружењу узрокује мању експресију UCP-1 молекула на унутрашњој страни беж адипоцита и у том случају ове ћелије добијају морфологију карактеристичну за беле адипоците. Међутим, при следећем излагању хладноћи, а тиме и стимулацији β -адренергичких рецептора, ови адипоцити имају способност да поврате експресију гена за UCP-1 и тако стекну карактеристичну мултилокуларну морфологију адипоцита. Сумарно гледано, термогени фенотип беж адипоцита је реверзибилан указујући на то да је потребна континуирана адренергичка стимулација како би овај тип масног ткива учествовао у термогеним процесима (88, 89).

Морфолошке и функционалне промене адипоцита настале као одговор на излагање хладноћи су такође истражене и са имунолошког аспекта. Ово окружење индукује активацију еозинофила у адипоцитима, повећава циркулишући ниво IL-4 и IL-13 што за последицу има алтернативну активацију M2 макрофага. Наиме, овај тип

макрофага поспешује неоваскуларизацију и ангиогенезу као и диференцијацију и ремоделовање мезенхималних стромалних ћелија (90). Хладноћом активирани М2 макрофаги додатно појачавају ослобађање катехоламина из симпатичких нервних завршетака што доприноси интензивнијој термогенези и превођењу белих у беж адипоците (91, 92). Штавише, повећана инфилтрација субкутаног масног ткива овим типом макрофага примећена је код особа са опекотинама када М2 макрофаги подлежу алтернативној активацији и индукцији ензима тирозин хидроксилазе који последично доводи до синтезе катехоламина. Последица ове каскадне реакције је постизање системске термогенезе, ослобађање енергије и промоција стварања беж адипоцита (4, 91).

Поред модификације хормон сензитивних липаза као и протеина који повезују липидне капљице адипоцита, активација сАМР-РКА услед излагања хладноћи доводи и до ослобађања СМК, глицерола и глутамата који служе као „гориво“ за отпочињање процеса термогенезе. Даље, ослобођене СМК иницирају експресију UCP-1 активацијом PGC-1 α -PPAR сигналног пута и превођење WAT у BAT (93-95). Међутим, иако аклиматизација на нижим температурама доводи до ослобађања различитих молекула који доприносе иницијацији процеса термогенезе, чини се да глукоза заузима најзначајније место у одржавању хомеостазе BAT-а. Повећана експресија GLUT4 транспортера било након акутног (4 - 48 часова) или хроничног (10 или више дана) излагања ниским температурама доводи до побољшане толеранције на глукозу и сензитивности ткива на дејство инсулина. Узимајући у обзир чињеницу да је преузимање глукозе у условима нижих температура израженије у браон адипоцитима у поређењу са другим ткивима (WAT, скелетни мишићи, мозак, јетра и срце), овај стимулус се посматра као моћна стратегија за повећање осетљивости масног ткива на дејство инсулина (94, 96). У прилог томе говоре резултати претходно спроведеног истраживања истичући да је преузимање глукозе у BAT депоима до 12 пута веће при излагању ниским температурама у односу на инсулином-стимулисано преузимањем глукозе у браон адипоцитима. Ово сазнање истиче повољан ефекат излагања хладноћи на одржавање хомеостазе глукозе посебно код гојазних пацијената или особа код којих је постављена дијагноза ДМ2 (97-99).

Још један позитиван ефекат који настаје као последица хладноћом индуковане активације сАМР-посредованог сигналног пута је ослобађање FGF21. Овај фактор раста индукује катаболизам СМК услед активације термогене активности браон адипоцита чиме повећава телесну температуру и индукује ослобађање енергије (100). Као адипокин који се примарно ствара у јетри, FGF21 је интензивно експримиран у браон адипоцитима одраслог човека али поседује способност индукције термогенезе и у неонаталним браон адипоцитима (101). Чак и при акутном излагању хладноћи циркулишући ниво FGF21 се значајно повећава и покреће активацију транскрипционе мреже која посредује у промоцији *browning*-а (102-104).

1.4.2. Фармаколошки приступи у промоцији *browning*-а

Напредак у пољу истраживања о пореклу, биологији и улогама различитих врста масног ткива постакао је већу пажњу у проналажењу и дизајну лекова који би фаворизовали стицање беж фенотипа у анатомским локализацијама WAT-а. Импресиван напредак у овом пољу истраживања довело је до сазнања да различити сигнални путеви леже у основи *browning*-а чијом активацијом се повећава утрошак енергије и превенира настанак гојазности. Док се појединим третманима/лековима постиже индукција *browning*-а белих адипоцита, поједини агенси активирају и диференцијацију класичних браон адипоцита (57). У даљем тексту биће описани фармаколошки агенси који

посредују у превођењу WAT у ВеАТ као и молекуларни механизми којим ова једињења промовишу *browning*.

1.4.2.1. Агонисти симпатичког нервног система

Већина агенаса промовишу *browning* посредством активације симпатичког нервног система изазивајући липолизу, липидну оксидацију и експресију гена карактеристичних за браон адипоците. Овај пут активације термогенезе описан је још 1992. године када је значајан пораст у експресији UCP-1 гена примећен након третмана животиња агонистом β 3-адренергичких рецептора или након излагања животиња хипотермијским условима окружења (105). Друга пионирска студија која је испитивала улогу симпатичког нервног система у промоцији *browning*-а истакла је три до четири пута већу експресију UCP-1 гена у браон адипоцитима хронично третираних агонистима β 3-адренергичких рецептора. Штавише, резултати ове студије указали су на централно место активације симпатичких нервних влакана не само у пролиферацији и диференцијацији браон адипоцита и њиховој следственој улози у ослобађању енергије, већ и у способности да успоре развој WAT-а у раном стадијуму гојазности (106). Примена агониста β 3-адренергичких рецептора условила је појаву беж адипоцита у анатомским локацијама белих адипоцита као што су ингвинално, епидидимално, ретроперитонеално и мезентерично WAT (107). Међутим, поред активације ових рецептора применом различитих фармаколошких агенаса β 3-адренергички рецептори заузимају важно место у активацији термогенезе услед излагања хладноћи. Наиме, одсуство ових рецептора у WAT-у које је било изложено ниским температурама довело је до одсуства експресије термогених маркера а тиме и појаве беж адипоцита. Заправо, морфологија белих адипоцита β 3-*knockout* мишева који су били изложени хладноћи задржала је унилокуларну грађу без експресије UCP-1 гена у одговору на ниске температуре. То указује да β 3-адренергички рецептори имају важније место у *browning*-у WAT-а пре него у активацији BAT-а, као и то да је постојање ових рецептора неопходно за хладноћом индуковани *browning* (108-109).

Узимајући у обзир важну улогу симпатичких нервних влакана у стицању мутилокуларне морфологије белих адипоцита, велики број селективних β 3-адренергичких рецептора је подвргнут клиничким испитивањима. Међутим, већина ових лекова није ушла у завршну фазу испитивања због слабе ефикасности у активацији ових рецептора у хуманој популацији. Иако је први тестиран селективни агониста β 3-адренергичких рецептора довео до повећане енергетске потрошње за око 8% без нежељених ефеката на кардиоваскуларни систем, хронични третман овим леком није изазвао значајну BAT-индуковану термогенезу. Са друге стране, нови селективни агониста β 3-адренергичких рецептора, мирабегрон, примећен код здравих мушкараца довео је до значајног повећања стопе метаболизма (око 13%). Насупрот позитивним ефектима на масно ткиво, мирабегрон остварује нежељене ефекте на нивоу кардиоваскуларног система. Међутим, претходно спроведеним истраживањима дошло се до закључка да овај лек има безбедан профил уколико се користи у терапијским дозама (110-112). Свеобухватно гледано, чини се да агонисти симпатичких нервних влакана представљају обећавајућу групу лекова у терапији гојазности узимајући у обзир снажан потенцијал у повећаној експресији UCP-1 и других гена који посредују у термогенези.

1.4.2.2. Орални хипогликемици

Стварање беж адипоцита активацијом PPAR γ рецептора представља механизам којим група оралних хипогликемика (тиазолидиндиони) индукује превођење WAT-а у BAT. Наиме, тиазолидиндиони се понашају као потпуни агонисти PPAR γ директно се везујући за ове рецепторе како у белим тако и у браон адипоцитима. Мултилокуларна морфологија адипоцита након примене тиазолидиндиона постиже се услед активације PGC-1 α -PPAR γ сигналног пута што последично доводи до повећане експресије UCP-1 и других *browning*-специфичних гена у WAT депоима (57, 111). Биолошки ефекат агониста PPAR α рецептора повезан је са промоцијом BAT фенотипа у депоима белих адипоцита, при чему се ова група лекова понаша као стабилизатори PGC-1 α и PRDM16 комплекса који покрећу каскаду догађаја у експресији термогених молекула. Показано је да агониста PPAR α рецептора, безафибрат, индукује оксидацију масних киселина и митохондријску биогенезу, док редукцијом депоа WAT-а и повећаном експресијом UCP-1 у гонадалном масном ткиву остварује позитиван ефекат у промоцији *browning*-а (113, 114).

С обзиром да је повећан ниво ензима дипептидил пептидазе 4 (енгл. *Dipeptidyl peptidase 4* - DPP-4) примећен код особа са прекомерном телесном масом, употреба инхибитора овог ензима представља ефикасан приступ у лечењу гојазности. Линаглиптин, као антагониста DPP-4, показује снажан потенцијал у експресији PGC-1 α као основног молекула у покретању сигналног пута који посредује у стварању беж адипоцита. Поред тога, инхибитори DPP-4 остварују плејотропни ефекат активацијом PPAR α рецептора што опет доводи до активације PGC-1 α и индукције митохондријске биогенезе, експресије UCP-1 у белим адипоцитима а тиме и до промоције *browning*-а (115).

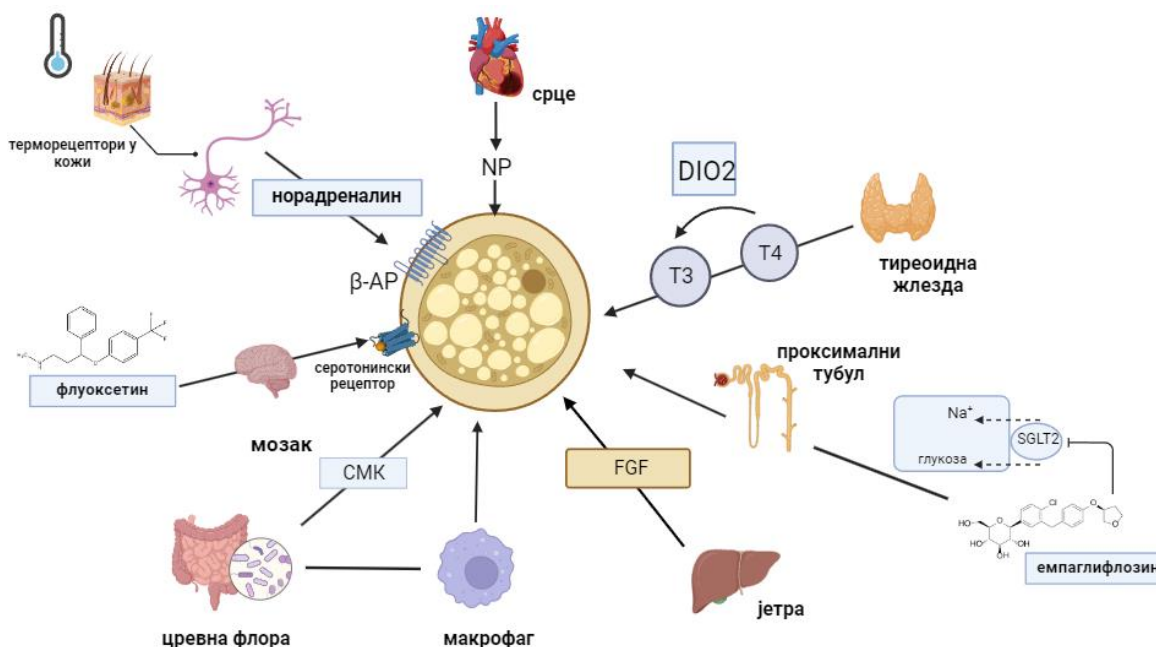
Понашајући се као селективни антагониста натријум-глукозног котранспортера типа 2, емпаглифлозин повећава потрошњу енергије и експресију UCP-1 у белим али и у зрелим браон адипоцитима. Као фармаколошки промотер *browning*-а, емпаглифлозин контролише враћање протона у матрикс митохондрија при чему у исто време омогућава потрошњу енергије у виду топлоте без синтезе АТФ-а (116). Као што је већ описано, FGF21 се доминантно експримира у одговору на ниске температуре окружења, активирајући β 3-адренергичке рецепторе у белим адипоцитима преводећи их у беж масне ћелије. Дуготрајна примена емпаглифлозина повећава ниво FGF21 у плазми и јетри што указује на то да овај фактор раста може утицати на енергетски метаболизам и потрошњу масти као одговор на примењен лек. Поред тога, емпаглифлозин редукује инфилтрацију масног ткива M1 проинфламацијским макрофагима док повећава ниво M2 антиинфламацијских макрофага у WAT-у, што представља још један механизам којим ова група лекова посредује у стварању беж адипоцита (8, 116).

1.4.2.3. Лекови који утичу на серотонинергички систем

Централна модулација серотонинергичке неуротрансмисије заузима важно место у контроли гојазности услед стимулације термогенезе масног ткива и стварање беж адипоцита. Сходно томе, инхибитори поновног преузимања серотонина као што је флуоксетин су широко прописивана група лекова који модулацијом централних механизма смањују телесну масу. Наиме, серотонинергичка модулација има два одељка - централни и периферни. Док се дејством на централну регулацију секреције серотонина мења можда функција у правцу инхибиције уноса хране и тиме настанка гојазности, модулација периферне контроле секреције серотонина доприноси акумулацији масти и добијању у телесној маси. Недавно спроведена студија показала је

да хронична употреба флуоксетина као централног модулятора серотонинергичке активности поред редукције телесне масе повећава и експресију UCP-1 белих адипоцита и анатомске депое у којима су локализовани зрели браон адипоцити (117).

Различити транскрипциони механизми у промоцији *browning*-а приказани су на Слици 6.



Слика 6. Различити транскрипциони механизми у промоцији *browning*-а

1.5. Антагонисти AT₁ рецептора и инхибитора неприлизина

Нова комбинација два фармаколошка агенса са одвојеним механизмом дејства показала се ефикаснијим у терапији КВБ у односу на конвенционално примењену терапију инхибиторима ангиотензин-конвертујућег ензима (енгл. *Angiotensin converting enzyme* - ACE). Заправо, фармацеутска кућа Novartis® је комбинацију антагонисте рецептора за ангиотензин тип 1 (AT₁) - валсартана и инхибитора неприлизина - сакубитрила регистровала под именом Entresto®, при чему се поменути лек рутински користи у лечењу пацијената са КВБ смањујући стопу кардиоваскуларних догађаја и смрти код ових пацијената (118). Међутим, поред ове основне индикације у терапији КВБ, до данас нема јасних података о потенцијалу комбиноване примене валсартан/сакубитрила у промоцији *browning*-а ни о прецизним молекулским механизмима који леже у основи термогених процеса потенцијално индукованих применом ова два лека.

У последње време биоинформатичке методе представљају незаобилазне алате који се широко користе у *in silico* дизајну нових лекова, у изградњи *de novo* протеинских модела, у предвиђању биохемијских особина биомолекула и у идентификацији нових сигналних путева (119, 120). Основна предност поменутог приступа је уштеда времена и средстава која су неопходна за спровођење сложених лабораторијских анализа. Упркос доступности бројних експерименталних података о биохемијским путевима, још увек је велики изазов математички описати биохемијски пут у структурној молекуларној биологији. Биолошке базе података чине важан извор информација о биолошким реакцијама укљученим у биохемијске путеве, при чему се величина ових база података у последње време значајно повећава (121). Студије молекулског моделовања које

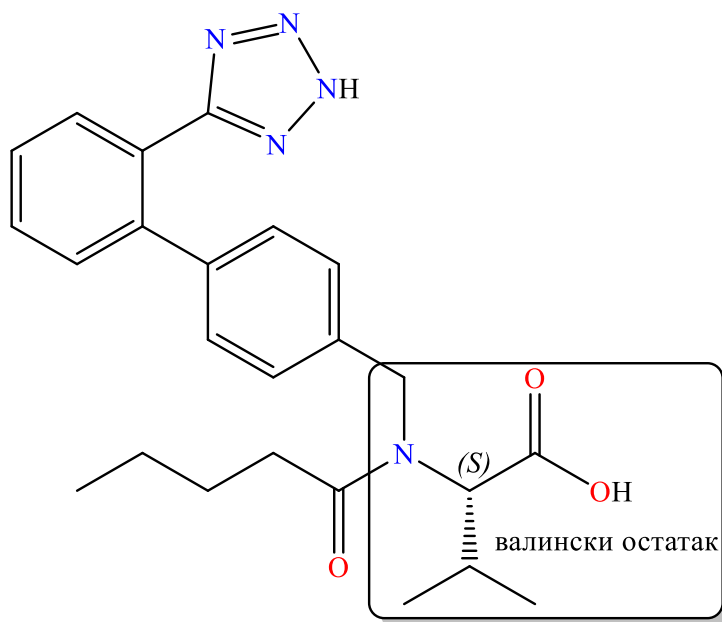
укључују анализу молекулског докинга и симулацију молекулске динамике представљају последњих година кључни алат у струкурној молекуларној биологији и компјутерски потпомогнутом дизајну лекова. Анализа молекулског докинга омогућава предвиђање интеракције између малог молекула од интереса и протеина на атомском нивоу, док симулација молекулске динамике предвиђа конформациону стабилност комплекса молекул-протеин кроз време (122). Примена студија молекулског моделовања у испитивању биохемијских сигналних путева огледа се управо у идентификацији протеинских макромолекула у оквиру сигналног пута, утврђивању везујућег афинитета различитих биолошки активних једињења према овим циљним протеинима, као и у симулацији молекулских интеракција између испитиваног молекула и протеина у сложеним условима биосредине кроз време.

Према доступним литературним подацима до сада је спроведена само једна *in silico* студија која је анализирала молекулску интеракцију валсартана/сакубитрила и неприлизина и рецептора за ангиотензин, при чему је утврђен инхибиторни капацитет валсартана/сакубитрила према овим биомолекулима (123). Са друге стране механизам молекулског препознавања и интеракције између валсартана/сакубитрила и молекула укључених у регулацију *browning*-а као што је mTORC1 (енгл. *Mammalian target of rapamycin complex 1* - mTORC1) до сада није испитиван.

1.5.1. Утицај антагониста AT₁ рецептора на промоцију *browning*-а

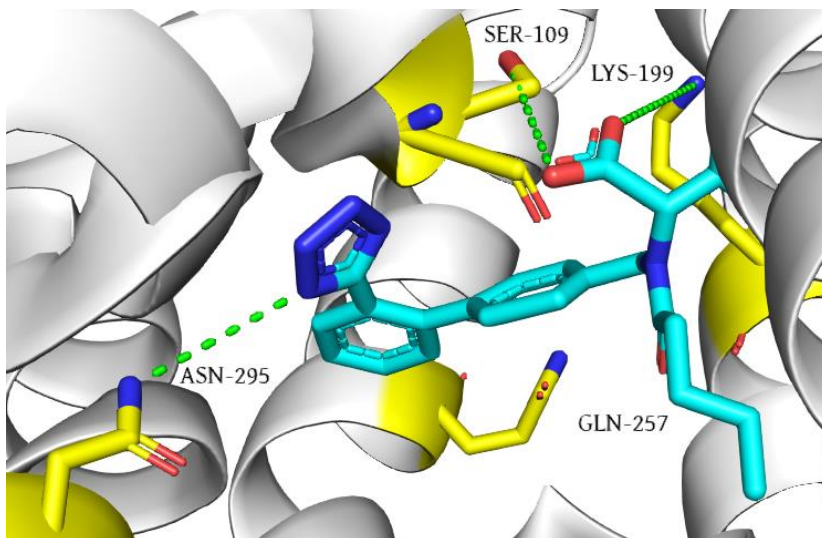
Валсартан као антихипертензивни лек припада групи селективних и компетитивних инхибитора рецептора за AT₁ (енгл. *Angiotensin II receptor type 1 antagonists* – ARBs) који је одобрен за клиничку примену 2012. године од стране Америчке агенције за храну и лекове. Са хемијског аспекта валсартан представља бифенилтетразолски монокарбоксилни и амидни дериват који у бочном низу садржи остатак аминокиселине L-валин (Слика 7).

Назив лека по IUPAC-у је (2S)-3-метил-2-[пентаноил-[[4-[2-(2H-тетразол-5-ил)фенил]фенил]метил]амино]бутанска киселина. Због присуства једног хиралног угљениковог атома оптички је активно једињење, моларне масе 435,23 g/mol које садржи 11 ротативних веза (124).



Слика 7. Хемијска структура валсартана са обележеним остатком валина

Присуство тетразолског прстена у структури лека утиче на везивање за AT_1 рецептор услед структурне сличности поменутог киселог прстена са киселим групама ангиотензина II. Додатно, бочни ланац карбоксилне киселине у оквиру валинског остатка такође има значајну улогу у везивању за рецептор за ангиотензин II, због тога што гради водоничне везе са аминокиселинским остацима активног центра рецептора за ангиотензин (Слика 8) (125).



Слика 8. Претпостављени начин везивања валсартана за AT_1 рецептор. Зеленим испрекиданим линијама су приказане водоничне везе.

Још 70-их година прошлог века установљено је да повећан ниво ангиотензина 2 и ренина у плазми доводи до штетних ефеката на нивоу бубрежног и кардиоваскуларног система, повећавајући ризик за настанак инфаркта миокарда и možданог удара. С тим у вези, развој нове групе лекова који блокирају систем ренин-ангиотензин (енгл. *Renin-Angiotensin System* - RAS) представљао је значајан помак у терапијском приступу пацијентима са КВБ. Ензимска каскада RAS система отпочиње ослобађањем ренина из југстагломерулалних ћелија бубрега који протеолитичким дејством преводи ангиотензиноген у ангиотензин 1. Затим се ангиотензин 1 под дејством ACE конвертује до ангиотензина 2, врло моћног вазоконстриктора (126).

Поред улоге RAS система на нивоу кардиоваскуларног система, резултати претходно спроведених студија доказали су функцију RAS у регулацији енергетске хомеостазе. Наиме, WAT представља место синтезе ангиотензина 2 експримирајући оба типа рецептора за овај вазоконстриктор (AT_1 и AT_2), са доминантном експресијом AT_1 рецептора (127, 128). Повећана активација AT_1 рецептора у белим адипоцитима доводи до продукције различитих проинфламацијских цитокина који се налазе у основи патогенезе настанка гојазности и метаболичких поремећаја (129-131). Међутим, инхибицијом AT_1 рецептора спречава се акумулација вишка масти, стварање реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS) и проинфламацијских цитокина у диференцираним адипоцитима (132). С обзиром на присуство AT_1 рецептора у масном ткиву и уједно благотворним ефектима њихове инхибиције, прекомерна телесна маса представља оправдану индикацију за примену антагониста ових рецептора. Поред утицаја на диференцијацију адипоцита и секрецију адипокина, RAS регулише и транспорт глукозе. У том смислу, инхибицијом AT_1 рецептора се поред редукције телесне масе постиже и адекватна гликемијска контрола. Штавише, блокадом овог

рецептора долази до повећане експресије гена који учествују у процесима термогенезе што доприноси настанку мултилокуларне грађе адипоцита у депоима WAT-а (133-135).

Стицање мултилокуларне морфологије белих адипоцита услед блокаде AT_1 рецептора последица је повећане секреције адипонектина али и апелина, адипокина који промовише преузимање глукозе у скелетне мишиће и масно ткиво чиме се смањује секрецију инсулина и индукује адипогенезу класичних браон ћелија (14). Такође, инхибиција ових рецептора индукује фосфорилацију АМПК што за последицу има активацију РКА и ензима који индукују интрацелуларну липолизу (136, 137). Сартани, као антагонисти AT_1 рецептора инхибирају NF- $\kappa\beta$ (енгл. *Nuclear factor-kappa β* - NF- $\kappa\beta$) у масном ткиву чиме се редукује експресија IL-6 и TNF α . Поред тога, ова каскадна реакција праћена је повећаним нивоом PGC-1 α и последичном активацијом PPAR γ . На основу ових доказа, може се претпоставити да осовина NF- $\kappa\beta$ -PGC-1 α -PPAR γ представља још један сигнални пут којим антагонисти AT_1 рецептора посредују у конверзији WAT-а у BeAT (138). Штавише, активацијом овог сигналног пута повећава се експресија гена за UCP-1 као најзначајнијег термогеног молекула. Међутим, повећана PPAR γ активност води ка експресији и PRDM16, гена неопходних за формирање беж фенотипа у депоима белих адипоцита. Наиме, услед супресије у експресији PRDM16 беж адипоцити се трансдиференцирају у беле што наглашава кључну улогу овог гена у одржавању мултилокуларне ћелијске грађе и њиховог термогеног потенцијала (133, 138, 139).

Антагонисти AT_1 рецептора утичу на синтезу још једаног липокина који заузима важно место у активацији PPAR γ рецептора и промоцији *browning*-а. Наиме, липокин 12,13-diHOME (енгл. *12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid* - 12,13-diHOME) пореклом из полинезасићених масних киселина се хидролизује под дејством епоксид хидроксилаза и механизмима аутокрине-паракрине секреције иницира преузимање СМК у адипоцитима масног ткива и смањене вредности циркулишућих триглицерида. Везивањем за PPAR γ , 12,13-diHOME представља лиганд ових рецептора који учествује у процесима термогенезе (140-142). Иако је већ позната улога PPAR као транскрипционих регулатора у процесу термогенезе, литературни подаци указују на то да лигандом-посредована активација PPAR γ заузима важно место у стимулацији mTORC1. Заправо, ова атипична серин/треонин протеин киназа (енгл. *mammalian target of rapamycin* - mTOR) контролише различите ћелијске функције које су повезане са растом ћелија, синтезом протеина, метаболизмом, преживљавањем и пролиферацијом ћелија. У зависности од тога за који регулаторни протеин је везан, mTOR формира два структурно и функционално различита типа протеинских комплекса (143). Већ поменути mTORC1 представља димерни комплекс који се састоји од mTOR и две подјединице: RAPTOR (енгл. *Regulatory associated protein of mTOR*) и mLST-8 (енгл. *Mammalian lethal with Sec13 protein 8*) (144) (Слика 9).

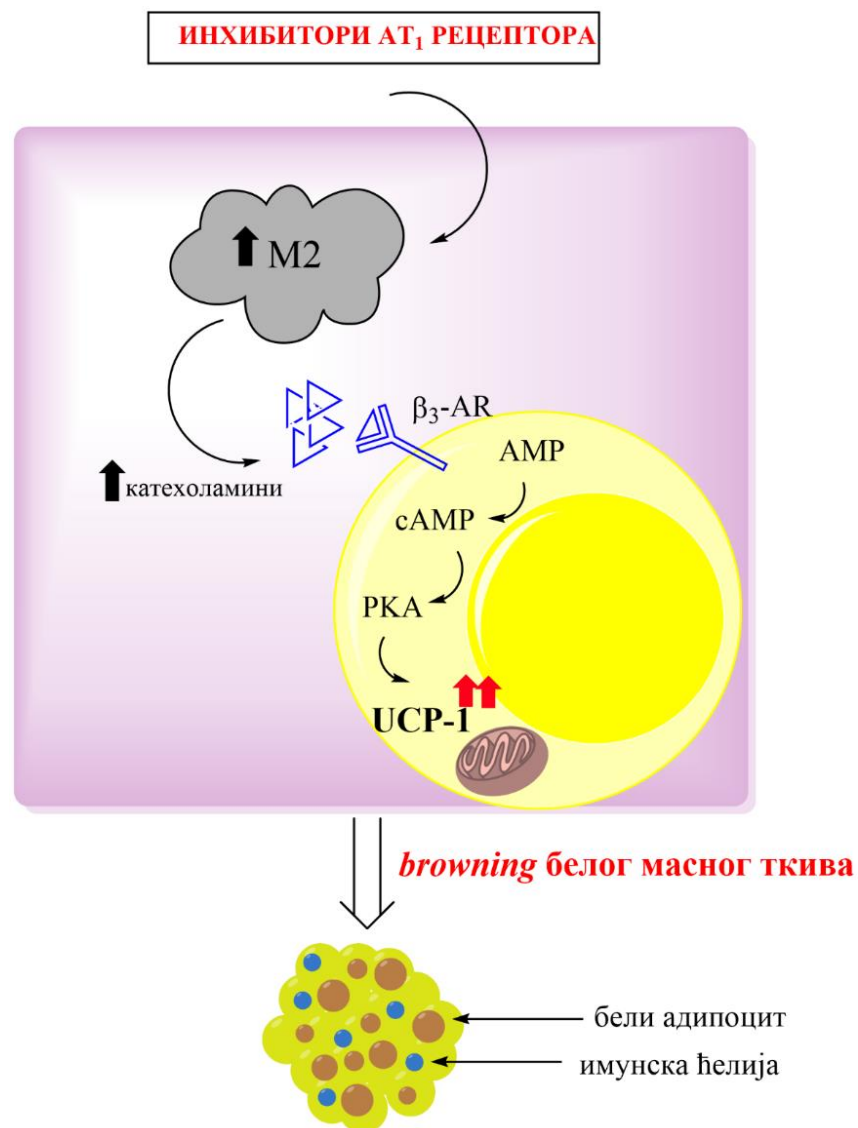
Претходне студије показале су значај PPAR γ -mTORC1 интеракције у регулацији метаболизма масног ткива у смислу повећане секреције адипонектина и других адипокина у адипоцитима WAT-а. Са друге стране, смањена експресија mTORC1 узрокује негативну регулацију експресије PPAR γ и C/EBP α као два главна транскрипциона регулатора адипогенезе (145). Међутим, још увек се не зна тачан механизам којим AT_1 блокатори, као директни агонисти PPAR γ , активирају mTORC1 у масном ткиву и испољавају позитивни ефекат на метаболизам овог ткива.



Слика 9. Молекулска структура mTORC1 комплекса. Структурни домени mTORC1 су представљени различитим бојама: mLST-8 (*Mammalian lethal with Sec13 protein 8*) је обележен зеленом бојом, RAPTOR (*Regulatory associated protein of mTOR*) је обележен сивом бојом, серин/треонин-протеин киназа mTOR је обележена жутом бојом, док је 4EBP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) обележен зеленом бојом и црним словима. Структурни домени mTOR су такође представљени различитим бојама: FRB (*Rapamycin binding domain*) је обележен наранџастом бојом, FAT (*Trans-activation domain-associated protein domain*) је обележен тиркизно-плавом бојом, FATC (*C-terminal FAT domain*) је обележен плавом бојом, док су CD C и N режњи (каталитички домен) обележени љубичастом и црвеном бојом.

Инфилтрација масног ткива M1 субпопулацијом макрофага се налази у основи метаболичких болести изазивајући инсулинску резистенцију и хроничну продукцију проинфламацијских медијатора у ћелијама масног ткива. Са друге стране, M2 алтернативно активирани макрофаги спречавају настанак хроничне инфламације као последице претеране акумулације масног ткива у телу. Сматра се да неколико различитих сигналних путева леже у основи механизма активације M2 макрофага укључујући и активацију PPAR γ и PPAR δ рецептора (142, 146). Недавно спроведена студија показала је да примена антагониста AT $_1$ рецептора доводи до алтернативне активације M2 макрофага и стварања беж адипоцита (145). Наиме, значај интеракције сартана и PPAR γ рецептора у активацији M2 макрофага је претходно потврђен узимајући у обзир да примена фармаколошких агенаса који не активирају PPAR γ рецепторе не подстичу алтернативну активацију M2 макрофага. Стога, ефекат антагониста AT $_1$ рецептора на субпопулацију M2 макрофага није последица блокаде ових рецептора већ потенцијале активације PPAR γ транскрипционог регулатора. Поред различитих секреторних молекула који се ослобађају у масном ткиву као последица активације M2 макрофага под дејством агониста PPAR γ рецептора, чини се да последични ефекат ове интеракције може бити и секреција катехоламина који заузимају важно место у стимулацији термогенезе. На овај начин ослобођени катехоламини активирају β 3-адренергичке рецепторе а тиме и cAMP-РКА сигнални пут. На крају, РКА као

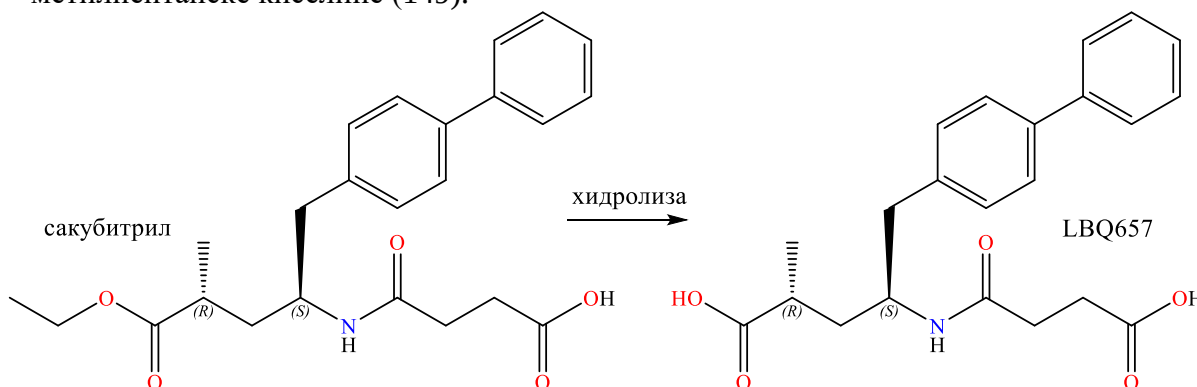
завршни медијатор ове сигналне каскаде директно активира mTORC1 и доприноси *browning*-у, односно превођењу WAT-а у BAT (134, 147, 148) (Слика 10).



Слика 10. Сигнални пут индукције *browning*-а применом антагониста AT_1 рецептора

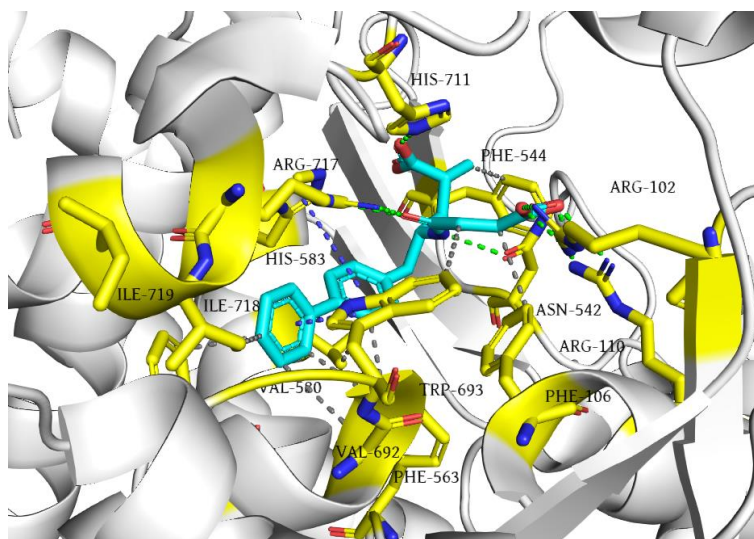
1.5.2. Утицај инхибиције неприлизина на промоцију *browning-a*

Сакубитрил представља естарски пролек који у *in vivo* условима под дејством естераза хидролизује до активног облика лека сакубитрилата (LBQ657) (Слика 11). Хидролизом етил естра сакубитрила настаје активни дикарбоксилни диастереоизомер који представља потентни инхибитор неприлизина. Са хемијског аспекта сакубитрил је дериват α -метил- γ -амино- δ -бифенил пентанске киселине. Назив молекула по *IUPAC*-у је етил естар (2*R*,4*S*)-5-(бифенил-4-ил)-4-((3-карбоксипропионил)амино)-2-метилпентанске киселине (149).



Слика 11. Хидролиза сакубитрила

Метаболит LBQ657 се везује за активно место неприлизина остварујући читаву мрежу интеракција које обухватају све функционалне групе молекула, због чега константа инхибиције метаболита износи 5 nM (Слика 12). Карбоксилне групе молекула граде вишеструке водоничне везе, док је бифенилни остатак укључен у формирање мреже бројних хидрофобних и π - π интеракција (Слика 12) (150).

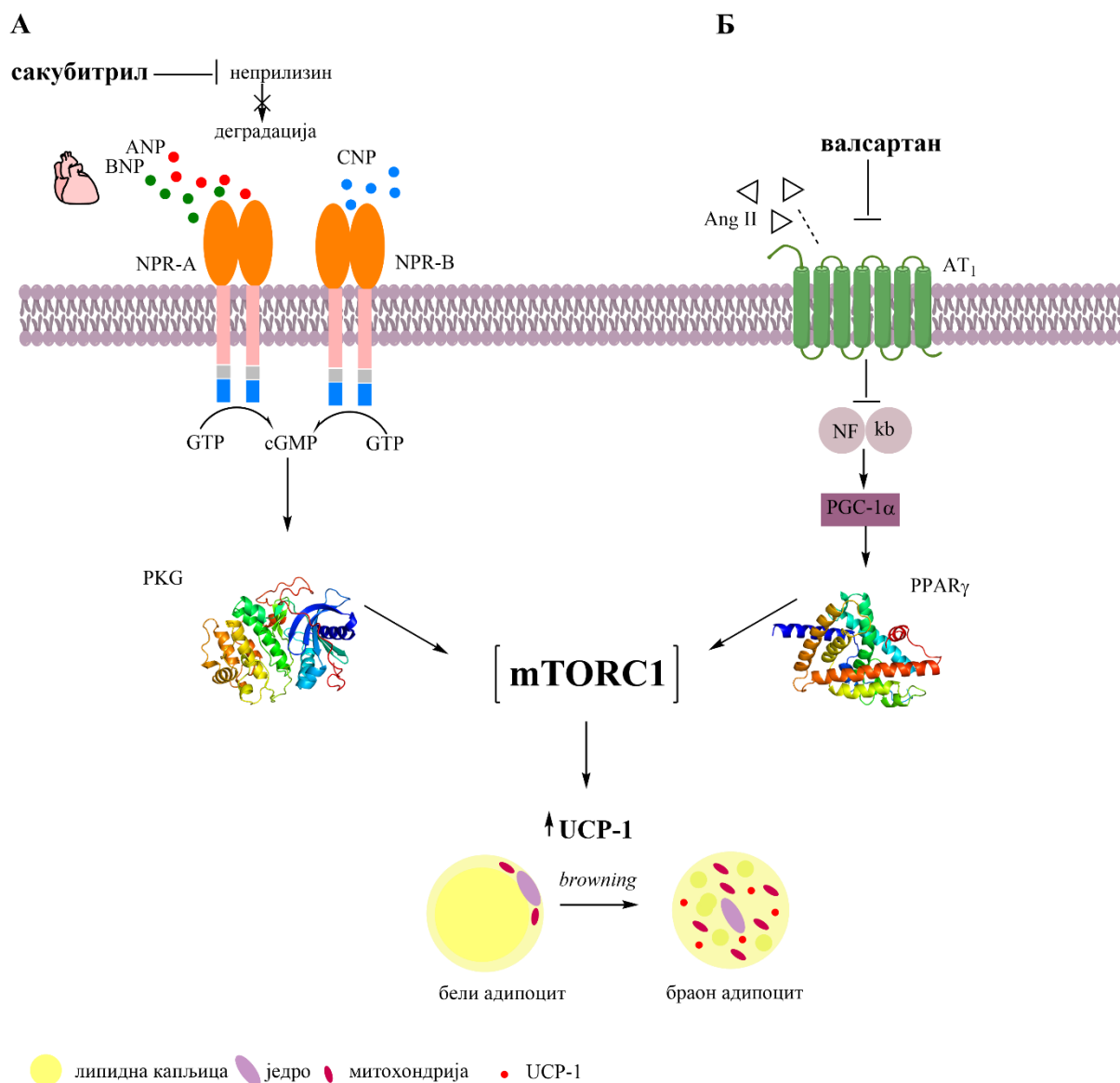


Слика 12. Везивање сакубитрилата за активно место неприлизина. Зеленим испрекиданим линијама су приказане водоничне везе, плавим испрекиданим линијама су приказане π - π интеракције, док су сивом бојом приказане хидрофобне интеракције.

Неприлизин припада групи металопротеиназа високо експримираних у многим ткивима са снажним потенцијалом деградације различитих супстрата. Као ендопептидаза, неприлизин разграђује а тиме и смањује слободну фракцију ендогених

вазоактивних пептида у које се убрајају и натриуретски пептиди (енгл. *Natriuretic Peptides* - NPs) (151). Дакле, инхибицијом неприлизина спречава се деградација NPs и повећава њихов циркулишући ниво чиме се сузбија прекомерна неуроهورмонска активација. Позитивни ефекти NPs огледају се у повећаној натриурези и диурези, инхибицији секреције алдостерона и ренина, вазодилатацији, редукцији крвног притиска и других кардиопротективних дејстава (152). Наиме, постоје три различита типа NPs и то: ANP (енгл. *Atrial Natriuretic Peptide*), BNP (енгл. *Brain Natriuretic Peptide*) и CNP (енгл. *C-type Natriuretic Peptide*). Док ANP паракрином и ендокрином секрецијом активира сигналне путеве којима посредује у смањењу крвног притиска и хипертрофије срца, BNP постиже кардиопротективно својство локалним дејством узимајући у обзир да се у највећим концентрацијама налази у коморама срца. Заправо, ANP и BNP се као пептидни хормони у одговору на постојање срчане инсуфицијенције и прекомерног оптерећења срца ослобађају у системску циркулацију обављајући главне хемодинамске функције на нивоу кардиоваскуларног система. Са друге стране, CNP се ствара у ендотелу крвних судова и ћелијама миокарда при чему поред бројних физиолошких улога ова врста NPs допуњава дејство ANP-а и BNP-а и утиче на физиологију и патофизиологију васкуларне и срчане дисфункције. Постоје три различита типа рецептора за NP (енгл. *natriuretic peptide receptor* - NPR): NPR-A, NPR-B и NPR-C. Своју биолошку активност ANP и BNP остварују доминантно се везујући за NPR-A, док је NPR-B примарно место везивања за CNP. Са друге стране, главна улога NPR-C јесте у елиминацији слободних NPR из циркулације процесом рецептор-посредоване интернализације и деградације (153).

Сакубитрил, као инхибитор неприлизина, покреће и низ других реакција поред основне у индукцији везивања NP за своје циљане рецепторе. Заправо, последица интеракције NP и NPR-A је превођење GMP (енгл. *Guanosine monophosphate* - GMP) у cGMP (енгл. *Cyclic guanosine monophosphate* - cGMP). Понашајући се као секундарни гласник, cGMP даље активира PKG (енгл. *Protein kinase G* - PKG) која у завршном кораку овог сигналног пута активира mTORC1 (8, 154, 155). Поред добро истражених ефеката NPs на нивоу кардиоваскуларног и бубрежног система, идентификација експресије NPR у ћелијама масног ткива привукла је велику пажњу и направила искорак у испитивању нових хемодинамских ефеката ових вазодилаторних пептида (8). Све је више доказа који указују на способност NPs у регулацији хомеостазе глукозе и одржавању енергетске равнотеже (156). Такође, повећани циркулишући нивои NPs су уско повезани са смањењем телесне масе услед индукције липолизе у адипоцитима хуманог порекла (35). Заправо, повећана слободна фракција ANP-а покреће липолизу у ћелијама WAT-а али и индукцију експресије гена задужених за процес термогенезе. Под утицајем NPs, стицање мутилокуларне морфологије белих адипоцита услед повећане експресије UCP-1 гена остварује се активацијом cGMP-PKG-mTORC1 сигналног пута. На тај начин NPs омогућавају стварање беж адипоцита тј. понашају се као директни индуктори *browning*-а (156, 157). На основу свега наведеног, претпоставља се да завршна активација mTORC1 у сигналној каскади представља заједнички циљани молекул у масном ткиву којим валсартан и сакубитрил индукују *browning* адипоцита смештених у анатомским депоима WAT-а (Слика 13).



Слика 13. Претпостављени заједнички пут А) сакубитрила и Б) валсартана у активацији mTORC1 и промоцији *browning*-а

Промоцију *browning*-а преко активације PKG, NPRa не остварују само стварањем беж адипоцита у депоима WAT-а, већ и интензивирањем експресије термогених протеина у класичним браон адипоцитима. Интересантно је да PKG, исто као и PKA, активира p38MAPK иницирајући транскрипцију термогених гена попут UCP-1 и PGC-1α у анатомским локализацијама WAT-а (35, 157, 158). Резултати бројних експерименталних и клиничких студија указали су на потпуну дефицијенцију NPRs у плазми пацијената са прекомерним BMI или дијагнозом ДМ2 и других метаболичких болести. Такође, већина доказа упућује на то да примена лекова који повећавају циркулишући ниво NPRs може бити корисна у лечењу ових пацијената (159). Примећено је да директна интравенска примена ANP-а повећава постпрандијалну липидну оксидацију и доприноси потрошњи енергије, док примена BNP-а смањује ниво грелина и осећај глади и тако позитивно утиче на метаболички профил (160). Поред тога, оба поменута NPRs повећавају синтезу адипонектина у адипоцитима WAT-а активацијом AMPK сигналног пута. Активација овог пута за последицу има контролу метаболизма

глукозе уз повећану сензитивност ткива на инсулин као и смањење степена инфламације уз редукцију проинфламацијских цитокина IL-6 и TNF α (159).

Ефекат NPs на метаболизам липида огледа се у значајно већем проценту WAT депоа код експерименталних животиња код којих постоји генетска дефицијенција рецептора за ове пептиде (157). Поред бројних ендокриних фактора који учествују у активацији cGMP-PKG сигналног пута, концентрација циркулишућих NPs се може значајно повећати и услед излагања ниским температурама. Показано је да примена ANP-а у комбинацији са егзогеним фактором излагања хладноћи повећава интрацелуларну температуру услед активације p38MAPK-UCP-1 сигналног пута (161). Активацијом овог пута ствара се толеранција на излагање спољашним ниским температурама указујући на адаптивни потенцијал NPs да се у условима ниских температура задржи ослобађање топлоте (156). Једно од потенцијалних објашњења којим се може претпоставити начин на који хладноћа индукује повећање у нивоу NPs може бити у одговору површинских крвних судова на ниске температуре који настоје да спрече губитак топлоте и тиме пумпају крв у веће крвне судове и повећавају производњу NPs у ћелијама срца (146).

Услед свих наведених чињеница, потребно је детаљније испитивање механизма који посредују у активацији *browning*-а применом дуалне терапије антагонисте AT₁ рецептора и инхибитора неприлизина као и упоређивање синергистичког дејства валсартан/сакубитрила и хладноћом индукованог *browning*-а, као златног стандарда, у настанку овог феномена.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Општи циљеви

У циљу испитивања потенцијалног ефекта примењене оралне суспензије валсартан/сакубитрила на индукцију *browning*-а општи циљ спроведене студије био је усмерен ка испитивању утицаја примењених лекова на превођење белог масног ткива у беж масно ткиво на експерименталном моделу метаболичког синдрома, као и идентификацији сигналних путева који се налазе у основи механизма остварених ефеката. Главни циљ истраживања био је усмерен на упоређивање ефекта примењеног третмана на промоцију *browning*-а у експерименталном моделу метаболичког синдрома самостално или у комбинацији са истовременим излагањем животиња хладноћи као златног стандарда у индукцији *browning*-а.

На основу претходних тврдњи постављени су специфични циљеви истраживања.

Специфични циљеви

1. Испитати утицај субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на телесну масу, масу органа, липидни и гликемијски профил здравих и животиња са метаболичким синдромом.
2. Процена утицаја субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на хемодинамске параметре здравих и животиња са метаболичким синдромом.
3. Евалуација ефекта субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на системски редокс статус здравих и животиња са метаболичким синдромом.
4. Испитати изоловани ефекат хлађења као и истовремену примену валсартан/сакубитрила на системски ниво адипокина и пуринских нуклеотида здравих и животиња са метаболичким синдромом.
5. Испитати утицај субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на морфолошке карактеристике субкутаног и висцералних масних ткива код здравих и пацова са метаболичким синдромом.
6. Испитати изоловани ефекат хлађења као и истовремену примену валсартан/сакубитрила на синтезу молекула специфичних за индукцију *browning*-а у масном ткиву код здравих и пацова са метаболичким синдромом.
7. Испитати ефекат хлађења, самостално или у комбинацији са субакутном применом валсартан/сакубитрила, на експресију гена у субкутаном и висцералним масним ткивима здравих и пацова са метаболичким синдромом.
8. Проценити густину и површину адипоцита код здравих и пацова са метаболичким синдромом који су били третирани субакутном применом валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења.
9. Испитивање потенцијалних кардиопротективних механизма услед субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на моделу исхемијско/реперфузионе повреде здравих и животиња са метаболичким синдромом.
10. *In silico* методама молекулског уклапања и молекулске динамике идентификовати сигналне путеве којима валсартан/сакубитрил индукују *browning*.

2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

Општа хипотеза

Основна хипотеза истраживања била је да орална суспензија валсартан/сакубитрила, примењена самостално или уз истовремено излагање протоколу хлађења, утиче на превођење белог у беж масно ткиво на анималном експерименталном моделу метаболичког синдрома активацијом различитих сигналних путева.

Специфичне хипотезе

1. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на телесну масу, масу органа, липидни и гликемијски профил здравих и животиња са метаболичким синдромом.
2. Самостално примењена орална суспензија валсартан/сакубитрила или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на хемодинамске параметре здравих и животиња са метаболичким синдромом.
3. Третман валсартан/сакубитрила самостално или у комбинацији са ефектом хлађења се одражава на системски редокс статус здравих и животиња са метаболичким синдромом.
4. Излагање здравих и животиња са метаболичким синдромом протоколу хлађења као и истовременој примени валсартан/сакубитрила утиче на системски ниво адипокина и пуринских нуклеотида.
5. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на морфолошке карактеристике субкутаног и висцералних масних ткива здравих и пацова са метаболичким синдромом.
6. Излагање хладноћи као и симултана примена валсартан/сакубитрила утиче на синтезу молекула специфичних за индукцију *browning*-а у масном ткиву здравих и пацова са метаболичким синдромом.
7. Релативни ниво експресије маркера *browning*-а у масним ткивима здравих и пацова са метаболичким синдромом се мења након излагања протоколу хлађења самостално или уз истовремену примену валсартан/сакубитрила.
8. Густина и површина адипоцита здравих и пацова са метаболичким синдромом је модификована након третмана валсартан/сакубитрилом самостално или у комбинацији са ефектом хлађења.
9. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења има кардиопротективни потенцијал на моделу исхемијско/реперфузионе повреде здравих и животиња са метаболичким синдромом.
10. Валсартан/сакубитрил ступају у молекулске интеракције са регулаторима *browning*-а у оквиру сигналних путева.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ово истраживање рађено по дизајну хроничне експерименталне студије на материјалу анималног порекла и *in silico* студије молекулског моделовања. Студија је спроведена на животињском моделу *in vivo* и *ex vivo* и одобрена је од стране Етичког комитета за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број: 01-4636). Све експерименталне процедуре примењене у овој хроничној студији биле су у складу са принципима етичности и нормама важећих прописа (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) као и са принципима добре лабораторијске праксе.

Супстанце коришћене у овој студији биле су *pro analysis* квалитета набављене од произвођача *Sigma–Aldrich Chemie GmbH* (Немачка), док је фиксна комбинација валсартан/сакубитрил набављена као комерцијално доступни производ произведен од стране фармацеутске компаније *Novartis Pharma AG* (Швајцарска).

3.1. Експерименталне животиње

У студију је укључено 48 пацова, мушког пола, *Wistar albino* соја, старости 8 недеља са просечном телесном масом 200 ± 20 грама који су набављени са Војномедицинске академије у Београду. У циљу адаптације на ново окружење, животиње су седам дана пре почетка експерименталног протокола биле смештене у карантин са строго контролисаним условима (циклус светлост:тама 12:12 часова, влажност ваздуха $55 \pm 10\%$, температура 22 ± 3 °C) и приступом храни и води према потреби (*ad libitum*). Након периода адаптације, животиње су распоређене у две једнаке групе у зависности од дијететског режима. Половина животиња била је на режиму стандардне дијете (20% протеина, 53% угљених хидрата, 9% масти и 5% влакана), док су преостале животиње биле на режиму исхране са високим садржајем масти (15% протеина, 51% угљених хидрата, 25% масти и 5% влакана) у циљу изазивања метаболичког синдрома. У зависности од примењеног третмана као и температуре окружења, животиње су даље подељене на по четири подгрупе (по 6 животиња у свакој подгрупи):

1. Контролна група здравих пацова која је чувана на собној температури ($+25^{\circ}\text{C}$) током 4 недеље - **CTRL**
2. Контролна група здравих пацова која је била изложена 4 сата дневно температури $+4^{\circ}\text{C}$ током 4 недеље - **CTRL + 4°C**
3. Група здравих животиња која је третирана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила током 4 недеље и чувана на собној температури ($+25^{\circ}\text{C}$) - **CTRL + E**
4. Група здравих животиња која је третирана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила током 4 недеље и истовремено била изложена 4 сата дневно температури $+4^{\circ}\text{C}$ - **CTRL + E + 4°C**
5. Група пацова са метаболичким синдромом која је чувана на собној температури ($+25^{\circ}\text{C}$) током 4 недеље - **MetS**
6. Група пацова са метаболичким синдромом која је била изложена 4 сата дневно температури $+4^{\circ}\text{C}$ током 4 недеље - **MetS + 4°C**
7. Група пацова са метаболичким синдромом која је третирана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила током 4 недеље и чувана на собној температури ($+25^{\circ}\text{C}$) - **MetS + E**
8. Група животиња са метаболичким синдромом која је третирана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила током 4 недеље и истовремено била изложена 4 сата дневно температури $+4^{\circ}\text{C}$ - **MetS + E + 4°C**

3.2. Индукција метаболичког синдрома

Метаболички синдром (МС) се заправо дефинише као сложен поремећај кога чине низ међусобно повезаних поремећаја укључујући гојазност, инсулинску резистенцију и хипертензију. Узимајући у обзир да МС представља главни узрок морбидитета и морталитета широм света, спровођење експерименталних студија на анималним моделима са наведеним карактеристикама је од изузетне важности у циљу проналажења различитих стратегија у превенцији настанка овог синдрома. Један од најчешће примењених протокола за индукцију МС-а на анималном моделу пацова базира се на исхрани са високим садржајем масти која претходи једнократној умереној дози стрептозотоцина (СТЗ). Овај модел представља одличан начин за индукцију хипергликемије код животиња уз повећани ниво инсулина у крви и последични настанак инсулинске резистенције (162).

Како бисмо изазвали метаболички синдром у овој студији, пацови су током 4 недеље били храњени храном са високим садржајем масти, а након дванаесточасовног гладовања примењен је СТЗ у једној интраперитонеалној дози од 25 mg/kg, који је растворен у свежем раствору 0,01 М цитратног пуфера, pH=4,5. Након три дана овим животињама измерен је ниво инсулина и гликемије наше као и вредност крвног притиска. Животиње са вредностима инсулина преко 6 mmol/L, гликемијом изнад 7 mmol/L и крвним притиском изнад 130/90 mmHg (163) су даље укључене у студију и насумично распоређене у групе пацова са МС-ом: **MetS**, **MetS + 4°C**, **MetS + E** и **MetS + E + 4°C**.

3.3. Третман валсартан/сакубитрилом

Комерцијално доступна филм таблета валсартан/сакубитрила у облику натријумове соли валсартан/сакубитрил комплекса примењивана је у виду оралне суспензије *per os* у дози од 68 mg/kg телесне масе животињама из **CTRL + E**, **CTRL + E + 4°C**, **MetS + E** и **MetS + E + 4°C** групе. Филм таблете валсартан/сакубитрила су најпре растворене у дестилованој води у запреминском односу 34 mg/ml, а затим је свакој животињи давано 0,2 mL ове суспензије током 4 недеље третмана. На основу релевантних литературних података, изабрана је доза као и начин и дужина примене комбинације валсартан/сакубитрила (164).

3.4. Протокол излагања хладноћи

За потпуну активацију маркера *browning*-а (на првом месту UCP-1) потребно је неколико недеља хроничне активације због кратког полуживота ових маркера. Зато је неопходно спровести излагање ниској температури у трајању од најмање 2 x 2 сата дневно како би се постигао ефекат као током хроничне активације. Животиње из група **CTRL + 4°C**, **CTRL + E + 4°C**, **MetS + 4°C** и **MetS + E + 4°C** су сваког дана током 4 недеље у трајању од 4 сата биле излагане температури од +4°C у специјалним коморама у којима је назначена температура контролисана уз помоћ дигиталног термометра. За време боравка у овим коморама, животиње су чуване у индивидуалним кавезима без хигијенске подлоге за животиње како би се спречило евентуално повећање телесне температуре, уз довољан приступ храни (стандардној или обогаченој високим садржајем масти) и води. Свакодневно излагање хладноћи, дужина трајања протокола као и температура којој су животиње биле изложене током овог третмана одабрани су на основу литературних података (84).

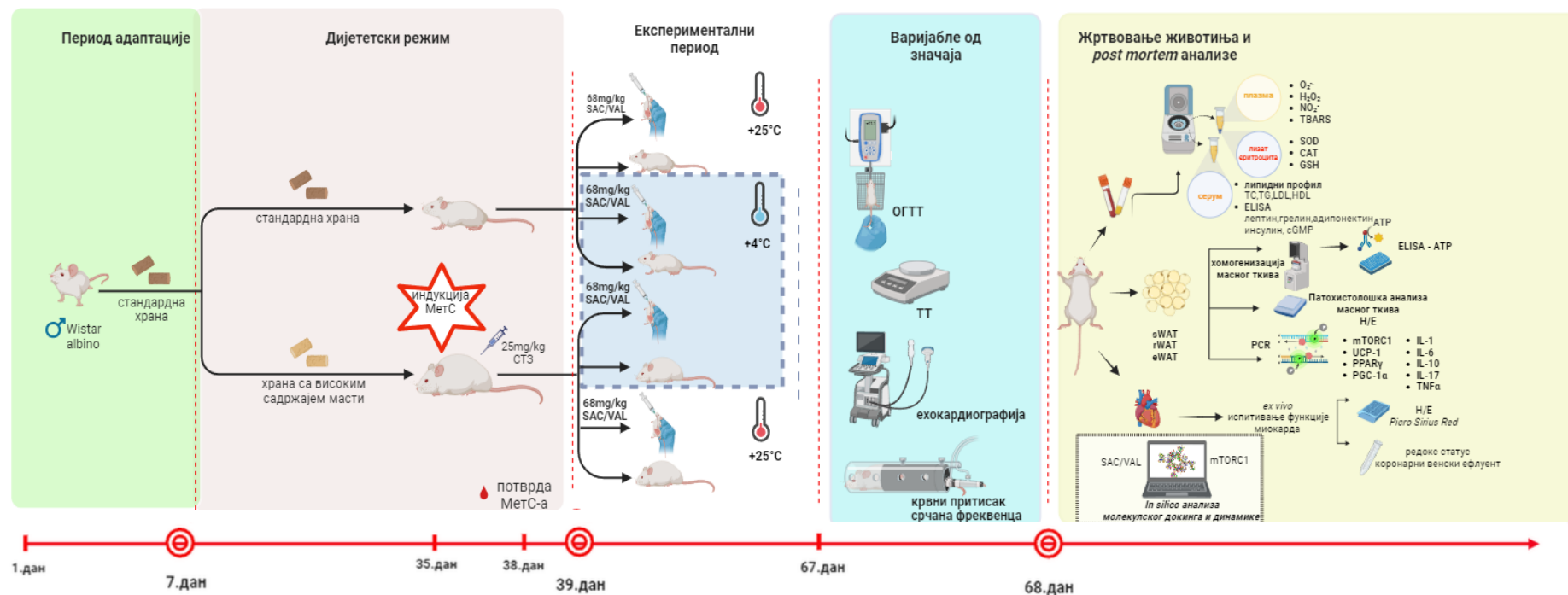
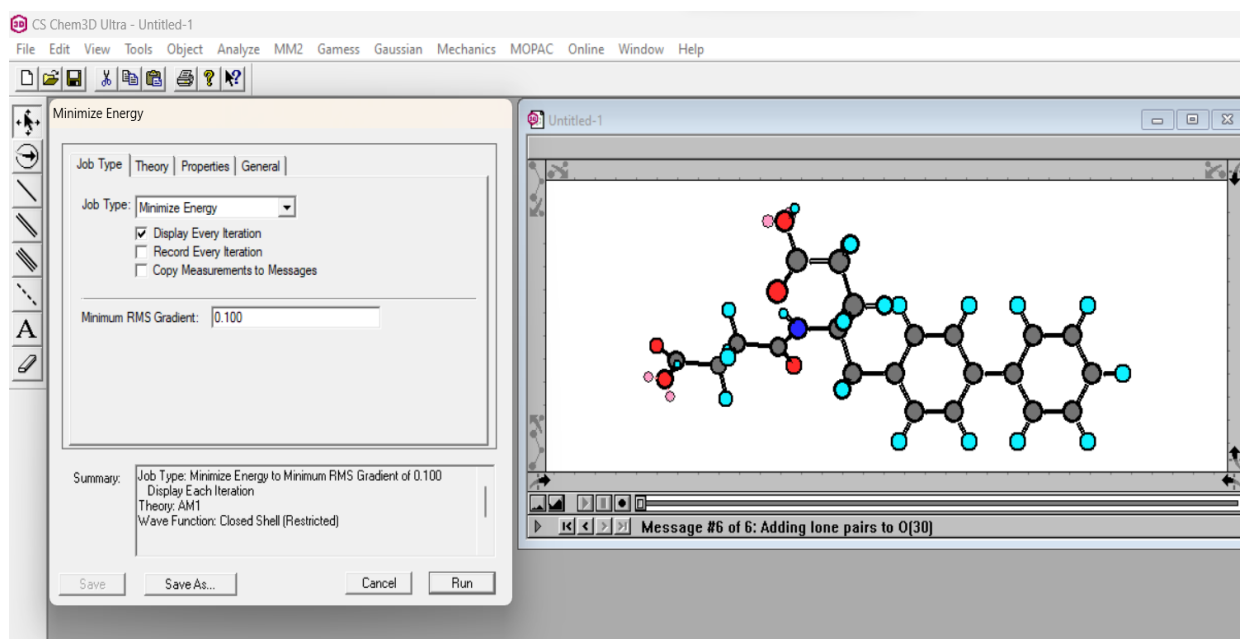


Схема 1. Схематски приказ експерименталног протокола

3.5. Протокол молекулског уклапања и молекулске динамике

3.5.1. Студије молекулског уклапања

У циљу процене афинитета везивања сакубитрилата и валсартана према циљаном молекулу mTORC1, ова два једињења су одвојено молекулски уклапана у подјединице циљаног протеина применом програма *AutoDock 4.2* (165). Енергетска минимизација конформација сакубитрилата и валсартана спроведена је коришћењем софтвера *Chem3D Ultra 7.0* (166), уз употребу AM1 семи-емпиријске методе (Слика 14).



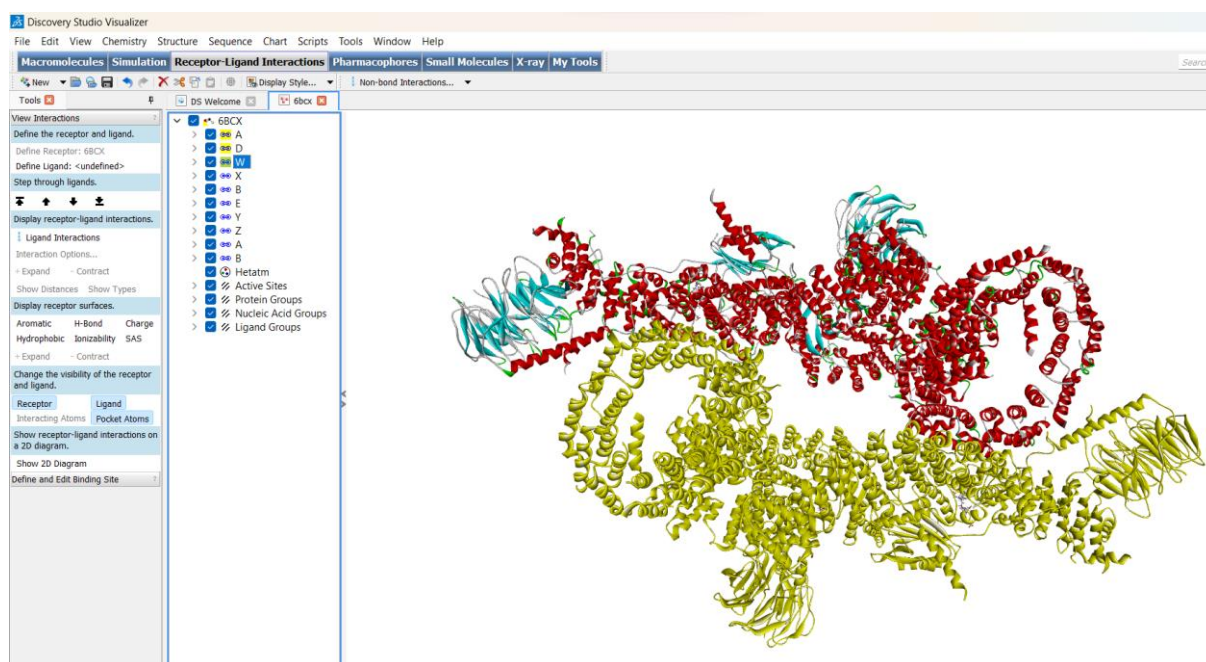
Слика 14. Енергетска оптимизација сакубитрилата

Октамерна кристална структура mTORC1 (PDB ID: 6BCX) (167) преузета је са RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) протеинске базе података (168). Основни подаци о кристалној структури циљаног протеина приказани су у Табели 2.

Табела 2. Подаци о кристалној структури циљаног протеина

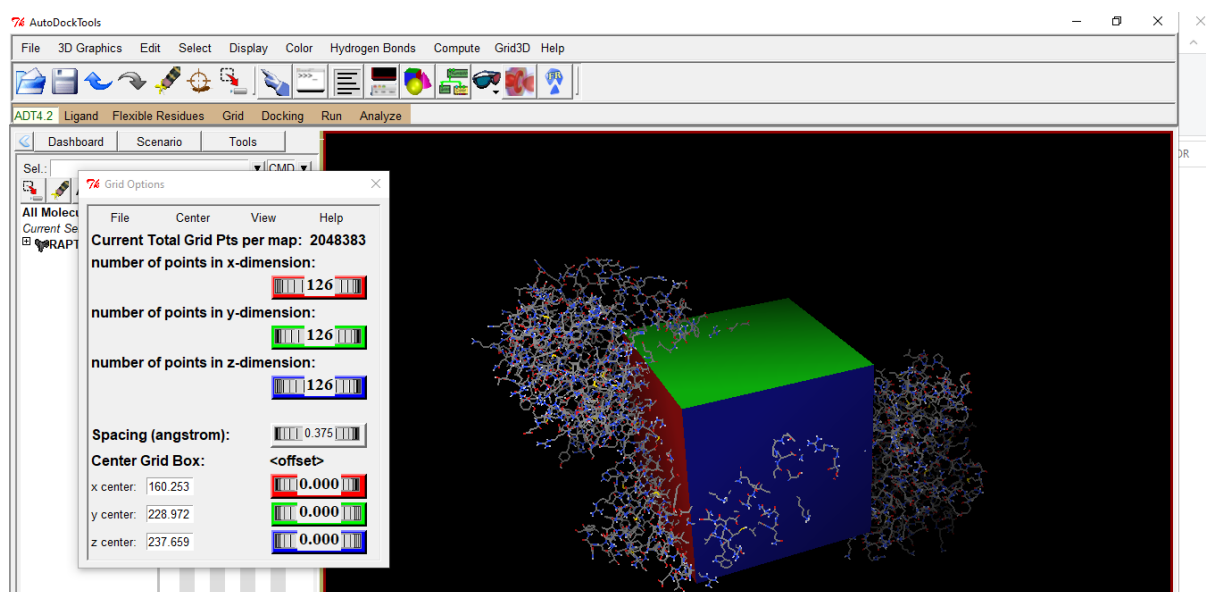
Назив циљаног протеина	PDB код	Организам	Резолуција	Кокристални лиганди	Протеински ланци	Протеински ланци одабрани за анализу
mTORC1	6BCX	<i>Homo sapiens</i>	3,23 Å	ATP, јони Mg	A, B, D, E, W, Y, X, Z	A, D, W

Протеински октамер је припремљен за процес молекулског докинга у софтверу *BIOVIA Discovery Studio* (169) при чему су из кристалне структуре уклоњени кокристални лиганди (ATP и јони магнезијума). Анализа молекулског уклапања спроведена је на ланцу A (mTOR подјединица), ланцу D (mLST8 подјединица) и ланцу W (RAPTOR подјединица), док је преосталих пет ланаца (X, B, E, Y и Z) избрисано у склопу припреме циљаног протеина (Слика 15).



Слика 15. Припрема циљаног молекула mTORC1

У софтверу *AutoDockTools* су у следећем кораку подјединицама циљаног протеина додати поларни водоникови атоми и *Kollman*-ова парцијална наелектрисања (165). Докинг протокол у коме је протеин био конформационо ригидан а лиганд конформационо флексибилан спроведен је коришћењем *Lamarckian* генетичког алгорита са подразумеваним подешавањима. „Слепе“ студије молекулског уклапања су спроведене појединачно на свакој подјединици mTORC1 дефинисањем максималне коцке за претрагу на циљаном протеину са димензијама $126 \times 126 \times 126$ тачака, уз дефинисани размак од 0,375 Å. Центар коцке за претрагу у x, y и z координатама је дефинисан на следећи начин: 269,346, 215,47 и 240,765 за mTOR подјединицу, 255,76, 161,095 и 281,284 за mLST8 подјединицу и 160,253, 228,972 и 237,659 за RAPTOR подјединицу (Слика 16).



Слика 16. Дефинисање простора за претрагу на RAPTOR подјединици

Тродимензионалне доковане конформације сакубитрилата и валсартана, као и њихове нековалентне везујуће интеракције са аминокиселинама циљаног протеина су визуелизоване коришћењем програма *Pymol* 2.5.5 (170).

AutoDock софтвер рачуна слободну енергију везивања на основу следеће једначине:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{Intermol. Energy}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{total}} + \Delta G_{\text{tor}} - \Delta G_{\text{unb}}$$

где параметар ΔG_{bind} представља слободну енергију везивања, параметар $\Delta G_{\text{Intermol. Energy}}$ означава збир енергија дисперзије и репулзије, водоничних веза и десолватације, параметар ΔG_{elec} представља електростатичку енергију, параметар ΔG_{total} означава укупну унутрашњу енергију, параметар ΔG_{tor} представља торзиону слободну енергију, док параметар ΔG_{unb} означава невезујућу енергију система.

Равнотежна константа везивања (K_b) је израчуната из вредности слободне енергије везивања на основу следеће једначине:

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

где T представља температуру од 298 K, R означава универзалну гасну константу која има вредност $1,9872036 \cdot 10^{-3} \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, док K_b представља равнотежну константу везивања.

3.5.2. Студије симулације молекулске динамике

На основу афинитета везивања сакубитрилата и валсартана према подјединицама mTOR и mLST8 који је утврђен у студијама молекулског уклапања, испитана је конформациона стабилност ових лиганд-протеин комплекса кроз време. У ту сврху извршена је екстракција везујућих места сакубитрилата и валсартана на одговарајућим подјединицама mTORC1, при чему су координате везујућих места утврђене у студијама молекулског докинга. Након овог корака, спроведене су студије симулације молекулске динамике за сакубитрилат-mTOR и валсартан-mLST8 комплексе коришћењем *Schrödinger Desmond* 2020-4 софтвера (171). Испитивани комплекси су оптимизовани коришћењем *OPLS3e* поља сила (172) при чему је за неутрализацију комплекса коришћен 0,15 M NaCl. Солватација испитиваних система спроведена је коришћењем *TIP3P* воденог модела (173). Дужина симулације молекулске динамике износила је 25 ns, при чему је симулација спроведена на константном притиску (1,01325 бара) са интервалима снимања од 4,8 ps за трајекторију и 1,2 ps за енергију. Еквилибрација система је спроведена на температури од 300 K коришћењем *OPLS3e* поља сила. За израчунавање просечне слободне енергије везивања (ΔG_{avg}) примењен је *MM/GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area)* метод (174) при чему је коришћено 3000-5000 фрејмова из сваке системске трајекторије. *Prime* модул *Schrödinger* софтверског пакета рачуна просечну слободну енергију везивања на основу следеће једначине:

$$\text{MM/GBSA } \Delta G_{\text{avg}} = G_{\text{complex}} - G_{\text{protein}} - G_{\text{ligand}}$$

3.6. Варијабле мерене након експерименталног протокола

3.6.1. Морфолошке карактеристике

На крају експерименталног периода, измерена је телесна маса, маса срца, субкутаног, ретроперитонеалног и епидидималног масног ткива у свим експерименталним групама као и однос масе срца и телесне масе (енгл. *Heart mass/Body mass*– Hm/Bm).

3.6.2. Ниво глукозе након теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)

Препознат као златни стандард, ОГТТ пружа информације о хомеостазу глукозе што га чини значајним лабораторијским тестом у постављању дијагнозе преддијабетеса или настанка ДМ2. Тест се изводи у раним јутарњим сатима наше при чему се концентрација глукозе прати обично током једног до три сата (175).

Након завршеног експерименталног протокола и 12-14 сати гладовања, спроведен је ОГТТ непосредно пре жртвовања животиња. Како бисмо одредили ниво глукозе наше узет је узорак крви из репне вене пацова (на графицима и у тексту назначен као тренутак 0h) а затим је животињама дата глукоза у дози од 2 g/kg телесне масе у виду оралне суспензије. Узорци крви из репне вене животиња су узимани и након 30, 60 и 120 минута од *per os* примењене глукозе у циљу мерења гликемије помоћу глюкометра са трачицама (*Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, САД*).

3.6.3. Липидни профил

Поред поремећаја толеранције на глукозу, МС је стање праћено и абнормалностима у вредностима параметара липидног статуса (176). Из тог разлога, како бисмо испитали утицај примењеног експерименталног протокола на липидни статус, у овој студији одређиван је ниво укупног серумског холестерола (ТС), триглицерида (TG), LDL-а и HDL-а коришћењем програмираног биохемијског анализатора (*Dimension Xpand, Siemens, IL, САД*).

3.6.4. Крвни притисак и срчана фреквенца

Хипертензија као главни и основни критеријум за постављање дијагнозе МС-а има значајну преваленцију у општој популацији, при чему је показано да је уско повезана са развојем МС-а кроз патофизиологију гојазности (177). Имајући то у виду, у овом истраживању праћене су вредности систолног (енгл. *Systolic blood pressure* – SBP) и дијастолног (енгл. *Diastolic blood pressure* – DLVP) крвног притиска као и срчане фреквенце (енгл. *Heart rate* – HR).

Након завршеног експерименталног периода, користећи неинвазивну методу репне плетизмографије (тзв. *Tail-cuff* метода) свим животињама је измерен системски крвни притисак и вредности срчане фреквенце (*Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems - MRBP-R, ITC Life Science Inc. САД*). Метода се заснива на постављању посебне манжетне на реп пацова чиме се детектују измене у вредностима притиска у самом крвном суду. Серија мерења је подразумевала понављање поступка мерења 8-10 пута док је за коначну вредност узета аритметичка средина измерених вредности (178).



Слика 17. Фотографија снимљена током мерења крвног притиска и срчане фреквенце помоћу апарата коришћеног у овом истраживању

3.6.5. Процена *in vivo* срчане функције

Ехокардиографија представља веома корисну неинвазивну процедуру у циљу процене срчане функције и структуре миокарда, постављања дијагнозе одређеног дефекта али и за праћење ефикасности примењене терапије. У циљу одређивања структурних и функционалних кардиоваскуларних карактеристика код малих експерименталних животиња, трансторакална ехокардиографија представља поуздану методу која се користи у процени ових параметара (179).

Иако је добро познато да срчана инсуфицијенција са смањеном ејекционом фракцијом представља основну индикацију за комбиновану примену валсартан/сакубитрила, у нашем истраживању изведен је ехокардиографски мониторинг у циљу процене ефикасности примењеног протокола на експерименталном моделу МС-а. У последњој недељи експерименталног периода свим животињама је спроведена трансторакална ехокардиографија коришћењем ехокардиограма (*Hewlett-Packard Sonas 5500*, Андовер, МА, САД) са сондом од 15,0-MHz (180). Интраперитонеална анестезија постигнута је комбинацијом анестетика: кетамин у дози од 75 mg/kg телесне масе и ксилазин у дози од 5 mg/kg телесне масе. Перпендикуларним постављањем сонде коришћењем дводимензионалног режима рада на апарату омогућено је јасно уочавање интравентрикуларног септума и задњег зида леве коморе. У тренутку када је пронађен најадекватнији положај, ехокардиографске слике су направљене из М-режима при чему су измерене структурне варијабле од интереса (вредност изражена у милиметрима изузев FS који је исказан у процентима) (Табела 3). Коришћењем формуле израчуната је вредност ејекционе фракције (EF) чије су вредности представљене процентуално:

$$\text{LVESV} = \frac{7 \times \text{LVIDs}^3}{[2,4 + \text{LVIDs}]}$$

$$\text{LVEDV} = \frac{7 \times \text{LVIDd}^3}{[2,4 + \text{LVIDd}]}$$

$$\text{EF} = \frac{\text{LVEDV} - \text{LVESV}}{\text{LVEDV}} \times 100$$



Слика 18. Фотографија ехокардиографа

Табела 3. Ехокардиографски параметри од интереса праћени у овом истраживању

IVSd енгл. interventricular septal wall thickness at end diastole	дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле
LVIDd енгл. left ventricle internal dimension at end diastole	унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле
LVPWd енгл. left ventricle posterior wall thickness at end diastole	дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле
IVSs енгл. interventricular septal wall thickness at end systole	дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле
LVIDs енгл. left ventricle internal dimension at end systole	унутрашња димензија леве коморе на крају систоле
LVPWs енгл. left ventricle posterior wall thickness at end systole	дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле
FS енгл. fractional shortening	проценат фракционог скраћења
EF енгл. ejection fraction	ејекциона фракција

3.7. Параметри системског оксидационог стреса

Као стање које се налази у патофизиологији различитих хроничних болести, оксидациони стрес је уско повезан и са настанком МС-а, стањем које се поред претходно наведених параметара карактерише и повећаним БМИ. Услед повећане адипозности нарушава се равнотежа у продукцији прооксидационих молекула и активности ензима антиоксидационе заштите у корист прооксидационих маркера (181).

У овом истраживању, узорци пуне крви су сакупљани у тренутку жртвовања животиња а затим центрифугирани у циљу одвајања еритроцита и крвне плазме. Из узорака лизираних еритроцита одређивала се активност ензима антиоксидационе заштите, док су се прооксидациони параметри мерили у узорцима крвне плазме (Слика 19). Све анализе одређивале су се спектрофотометријском методом (Shimadzu UV 1800, Јапан). (Слика 20)



Слика 19. Испитивани параметри редокс статуса



Слика 20. Фотографија спектрофотометра који је коришћен за процену редокс статуса животиња

3.7.1. Системски прооксидациони параметри

3.7.1.1. Индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације заснивао се на индиректној методи мерења концентрације продуката липидне пероксидације насталих као производ реакције малонилдиалдехида са тиобарбитурном киселином (енгл. *thiobarbituric acid* - TBA).

Након пипетирања 400 μL крвне плазме у епрувету је додато 200 μL 28% трихлорсирћетне киселине а затим је узорак инкубиран током 15 минута на леду. По завршеној инкубацији узорак је центрифугиран 15 минута при брзини од 6000 rpm (енгл. *Revolutions per minute* - rpm) како би се издвојио супернатант (400 μL) и сјединио са 100 μL 1% TBA у натријум хидроксиду. Други део ове анализе заснивао се на загревању узорка у воденом купатилу током 15 минута на температури од 100 $^{\circ}\text{C}$. Након завршене инкубације узорци су остављени на собној температури још 10 минута а затим је спектрофотометријски мерена концентрација TBARS-а при таласној дужини од 530 nm коришћењем следеће једначине:

$$\mu\text{mol TBARS/ml плазма} = \Delta A (As - Abt) / 1,56 \times 1,25$$

ΔA – финална апсорбанца

As – апсорбанца узорка

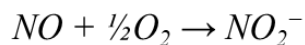
Abt – апсорбанца следеће пробе

1,56 и 1,25 – фактори корекције

За припрему следеће пробе користио се исти поступак као за припрему узорка с тим да се уместо узорка плазме користила дестилована вода у истој запремини (182).

3.7.1.2. Нитрити (NO_2^-)

Метода мерења ослобођених нитрита заснива се на индиректном одређивању азот монооксида (NO) који интерагује са молекулским кисеоником што је представљено следећом хемијском реакцијом:



Припрема узорка заснивала се на пипетирању 400 μL 20 mM етилендиаминтетрасирћетне киселине, 100 μL перхлорне киселине и 200 μL крвне плазме. Након мешања на vortex мешалици, узорци су инкубирани на леду 15 минута а затим центрифугирани током 15 минута на брзини од 6000 rpm. Након центрифугирања супернатант је одвојен а у талог је додато 220 μL K_2CO_3 . Из тако припремљеног узорка у нову епандорфу је пренето 200 μL ове смеше и сједињено са 250 μL Griess-овог реагенса (125 μL N -(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида и 125 μL сулфанилне киселине) и истом запремином пуфера за азот монооксид. Након петнаестоминутне инкубације, на таласној дужини од 550 nm мерена је апсорбанца коришћењем следеће пробе која је припремљена идентичним поступком са коришћењем дестиловане воде уместо узорка крвне плазме (183).

Концентрација ослобођених нитрита одређивала се уз помоћ калибрационе криве која је конструисана на основу узорака са добро познатом концентрацијом NaNO_2 чије су апсорбанце мерене на 550 nm таласне дужине. Одређивање стандардног фактора (F) из следеће једначине служио је за прерачунавање нитрита у узорцима крвне плазме:

$$\frac{\text{екстинција стандарда} - \text{екстинција следеће пробе}}{\text{концентрација } \text{NaNO}_2 \text{ у стандардима}}$$

Представљена једначина примењивана је за сваки стандард понаособ (укупно четири F1-F4) док је коначани стандардни фактор (F) добијен као њихова средња вредност и даље се користио за прерачунавање узорка. Коначно, концентрација ослобођених нитрита у узорку плазме добијена је на основу следеће реакције:

$$\mu\text{mol NO}_2/\text{ml плазма} = \Delta E (E_s - E_{bt}) / F$$

ΔA – финална апсорбанца

A_s – апсорбанца узорка

A_{bt} – апсорбанца следеће пробе

F – средња вредност добијених стандарда

3.7.1.3. Супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Количина ослобођеног $\text{O}_2^{\cdot-}$ одређена је интеракцијом овог радикала са нитро тетразолијумом плавим када настаје нитро формазон плави. Поступак се заснивао на пипетирању 50 μL крвне плазме у епрувету у коју се *ex tempore* додаје есејна смеша у запремини од 950 μL а затим је апсорбанца мерена 3 пута уз мешање при таласној дужини од 550 nm. Слепа проба у овој анализи подразумевала је додавање дестиловане воде уместо узорка крвне плазме у есејну смешу (184). На основу следеће реакције одређена је концентрација ослобођеног $\text{O}_2^{\cdot-}$:

$$nmol O_2^- / ml \text{ плазме} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05$$

$$\Delta E = \Delta E_s - \Delta E_{bt} = E_{2bt} - E_{1bt} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E_s = E_{2s} - E_{1s} \text{ (за узорке)}$$

ΔA – финална апсорбанца

A_s – апсорбанца узорка

A_{bt} – апсорбанца слепе пробе

0,015 и 0,05 – фактори корекције

3.7.1.4. Водоник пероксид (H_2O_2)

Реакција помоћу које се одређује концентрација ослобођеног H_2O_2 катализована је пероксидазом из рена (енгл. *horseradish peroxidase* – HRP) при чему се фенол црвени оксидује под дејством H_2O_2 . Цео поступак заснива се на пипетирању 800 μL раствора фенол црвеног, 200 μL узорка крвне плазме и 10 μL пероксидазе. Ова смеша се затим инкубира током 10 минута на собној температури а затим се мери апсорбанца на таласној дужини од 610 nm. За припрему слепе пробе користи се дестилована вода уместо узорка плазме у истом запреминском односу (185).

Коришћењем стандардне криве одређивао се фактор апсорбанције (F) по 1 nmol у H_2O_2 :

$$\Delta A = A_s - A_{bt}$$

$$F = \Delta A / nmol H_2O_2 / cuv$$

$$nmol H_2O_2 / ml \text{ плазма} = \Delta A / F$$

ΔA –финална апсорбанца

A_{bt} – апсорбанца слепе пробе

A_s – апсорбанца узорка

F – фактор апсорбанце/nmol H_2O_2

3.7.2. Ензими антиоксидационе заштите

3.7.2.1. Каталаза (енгл. *Catalase* - CAT)

Каталаза представља један од најзначајнијих ензима антиоксидационе заштите који као супстрат користи H_2O_2 . Током двостепене реакције каталаза катализује разградњу два молекула H_2O_2 при чему настаје један молекул кисеоника и два молекула воде. На тај начин овај ензим одржава оптимални ниво H_2O_2 у еукариотским ћелијама спречавајући настанак оксидационог стреса (186).

У овом истраживању активност каталазе је одређивана из узорака лизираних еритроцита са уделом воде 1:7 и етанола 0,1:1. Тако припремљена смеша у запремини од 100 μL додата је у епрувете где је претходно пипетирано 50 μL САТ пуфера а затим додато и 1 mL 10 mM H_2O_2 . Уместо узорка лизираних еритроцита за припрему слепе пробе користила се иста запремина дестиловане воде. Активност САТ у једном узорку мерена је шест пута при таласној дужини од 230 nm. Користећи предвиђену схему добијене су четири вредности за један узорак чија је средња вредност представљала коначну активност ензима у датом узорку (187).

3.7.2.2. Супероксид дизмутаза (енгл. *Superoxide dismutase - SOD*)

Као антиоксидациони ензим, SOD „хвата“ кисеоничне радикале кроз процесе оксидације/редукције посредством прелазних метала у свом активном месту. Антиоксидациона активност огледа се у разлагању $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 уз ослобађање молекулског кисеоника. За постизање максималне каталитичке активности SOD-а неопходно је присуство кофактора попут Cu, Mn, Zn, Fe и других металних јона. У зависности од врсте металног јона као и места где се овај ензим налази, постоји три различита SOD облика (SOD1 – у цитоплазми; SOD2 – у митохондријама и SOD3 – ван ћелије). Који год да је облик у питању, SOD неутралише кисеоничне радикале унутар или изван ћелије тако да су молекули ДНК, као и ћелијска мембрана, заштићени од дејства слободних кисеоничних врста (188).

Користећи лизат еритроцита, 100 μ L узорка је пренесено у епрувету у коју је додато 1 mL карбонатног пуфера а након мешања на *vortex* мешалици је додато 100 μ L адреналина. Сваки узорак је мерен два пута на таласној дужини од 470 nm а затим се према епинефринској методи по *Beutler*-у дошло до коначних вредности. Поступак припреме следеће пробе разликовао се у додавању еквимоларне количине дестиловане воде уместо узорка лизираних еритроцита (189).

3.7.2.3. Редуковани глутатион (GSH)

Оксидована форма глутатиона (GSSG) се путем редукционих реакција конвертује у редуковани облик GSH који представља снажан антиоксидациони молекул.

Спектрофотометријска метода којом је праћена активност GSH у овом истраживању заснивала се на оксидацији глутатиона методом по *Beutler*-у. Поступак се заснивао на додавању 200 μ L 0,1% етилендиаминтетраацетата у епрувету са претходно пипетираних 50 μ L узорка еритроцита. Затим се у ову смешу додаје 385 μ L преципитационог пуфера и све инкубира на леду током 15 минута а затим центрифугира 10 минута на 4000 rpm. У нове епрувете пренесено је 300 μ L супернатанта и додато 750 μ L NaH_2PO_4 и 100 μ L 5,5-дитиобис-6,2-нитробензојеве киселине. После петнаестоминутне инкубације узорци су измерени спектрофотометријски при таласној дужини од 412 nm. Уместо узорка лизата еритроцита, за слепоу пробу коришћена је дестилована вода у смеси са претходно поменутих растворима. Како бисмо одредили концентрацију GSH у нашим узорцима, калибрациона крива је конструисана уз коришћење 4 стандарда у којима је већ позната концентрација глутатиона (190).

3.8. Технике ензимске имуноанализе у детектовању различитих параметара из узорка серума

По завршетку експерименталног периода а након интраперитонеалне анестезије постигнуте комбинованом применом анестетика (5 mg/kg кетамин; 10 mg/kg ксилазин), животиње су жртвоване декапитацијом. Узорци пуне крви прикупљени су у епрувете у којима се налази сепарациони гел ради издвајања серума који се даље користи за одређивање различитих маркера ELISA методом (ензимски имуноесеј високе сензитивности и селективности; енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*). У циљу испитивања примењеног експерименталног протокола на промоцију *browning*-а из узорка серума одређивана је концентрација адипокина (тзв. адипоцитокина) као сигналних молекула (цитокина) који се продукују у масном ткиву обављајући важне улоге у одржавању адекватног енергетског/метаболичког статуса. Услед експресије у

масном ткиву, адипокини индукују хроничну инфламацију ниског степена, инсулинску резистенцију и настанак кардиометаболичких болести.

У овој студији, из узорак серума одређивана је активност адипокина попут лептина (pg/mL), адипонектина (ng/mL) и грелина (ng/mL) *sandwich* ELISA методом употребом комерцијалних ELISA китова према инструкцијама произвођача:

- Rat Leptin ELISA kit (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Немачка, каталошки број: RAB0335-1KT)
- Rat Adiponectin ELISA kit (*Abcam*, Уједињено Краљевство, каталошки број: AB108784)
- Rat/Mouse Ghrelin (Total) ELISA kit (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Немачка, каталошки број: EZRGRA-91K)

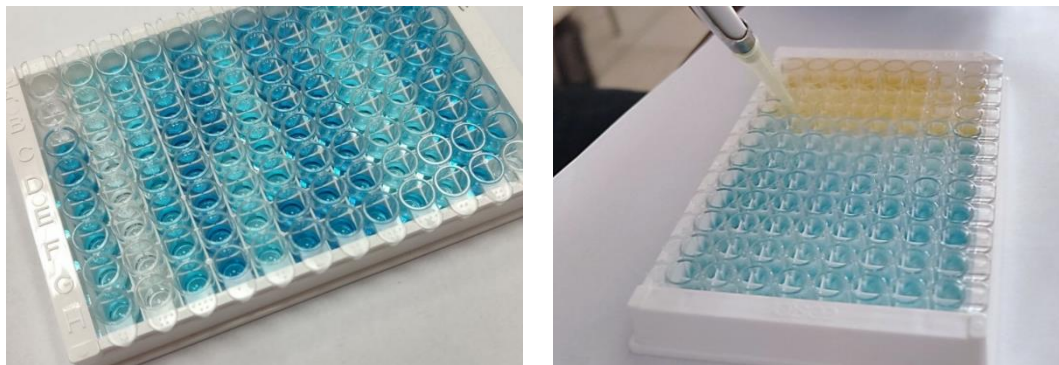
Како бисмо одредили ефекат примењеног протокола на гликорегулацију као и молекуле које се налазе у сигналној каскади путем које примењени фармаколошки агенси индукују промоцију *browning*-а, у овој студији је из узорак серума одређивана концентрација инсулина (pg/mL) као и cGMP (ng/mL) *sandwich* ELISA методом употребом комерцијалних китова пратећи упутства произвођача:

- Rat insulin ELISA kit (*FineTest, Wuhan*, Кина, каталошки број: ER1113)
- Rat Pde5a (cGMP-specific 3',5' - cyclic phosphodiesterase) ELISA kit (*FineTest, Wuhan*, Кина, каталошки број: ER0301)

У овом истраживању ELISA *sandwich* метода као врста ензимског имуносорбент теста примењена је за квантитативну детекцију горепоменутих маркера од интереса. Назив „сендвич“ указује на то да се циљани антиген налази везан између два антитела (једно анитело за „хватање“ гена - *Capture antibody*, а друго за детекцију тог истог гена – *Detection antibody* коњуговано са ензимом – у овом случају HRP (енгл. *Horseradish Peroxidase*)). Комерцијални ELISA китови коришћени у овој студији су у свом саставу имали микротитар плочу са 96 бунарчића у којима се већ налазило *Capture antibody* неопходно за иницијално „хватање“ антигена у узорку серума.

- Пре самог пипетирања узорка у бунарчиће микротитар плоче неопходно је припремити одговарајуће стандарде у опадајућим концентрацијама који се у дупликату пипетирају ради добијања калибрационе криве и даље квантификације испитиваног антигена у нашим узорцима.
- Испитивани узорци серума се разблажују у одговарајућем запреминском односу (најчешће 1:4) а затим се пипетирају у дупликату и инкубирају према упутству произвођача.
- Након инкубације, плоча се испира како би се уклонили они молекули антигена који се нису везали за *Capture* антитело а затим се додаје *Detection* антитело и плоча се поново инкубира према упутству произвођача.
- Након завршене инкубације плоча се испира а затим додаје стрептавидином обележен ензим (стрептавидин-HRP) при чему се процес инкубације као и испирања понавља.
- У следећем кораку се додаје хромоформни супстрат (тзв. триметилбензедин - TMB) како би се визуелизовала HRP - ензимска реакција. Заправо HRP-индукована катализа TMB-а огледа се у појави плаве боје чији интензитет варира у зависности од количине везаног антигена.

- Ова реакција се зауставља када се без испирања плоче у бунарчиће дода нека јака киселина попут HCl или H₂SO₄ (тзв. *Stop solution*) што је праћено променом плаве боје у жуту.
- Последња фаза подразумева мерење апсорбанце на ELISA читачу (*BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, California, САД*) на таласној дужини према упутству произвођача, конструисање калибрационе криве и квантификавање концентрације анализираних маркера у тестираним узорцима.



Слика 21. Извођење ELISA *sandwich* методе у овој студији



Слика 22. ELISA читач коришћен за мерење апсорбанце испитиваних маркера у овом истраживању

3.9. Експериментални протокол на масном ткиву

По завршетку експерименталног периода животиње су жртвоване при чему су изоловане три врсте белог масног ткива: субкутано (енгл. *Subcutaneous white adipose tissue* – sWAT), ретроперитонеално (енгл. *Retroperitoneal white adipose tissue* – rWAT) и епидидимално (енгл. *Epididymal white adipose tissue* – eWAT) масно ткиво. Након мерења, део масног ткива је одвојен за хистолошку и имунохистохемијску анализу, а преостали део масног ткива је замрзнут на -80°C.

3.9.1. Квантификација АТФ-а

У циљу квантификације концентрације АТФ-а и одређивања биохемијских анализа, узорци замрзнутих ткива су хомогенизовани ради издвајања супернатанта. Протокол се заснивао на хомогенизацији масног ткива у фосфатном пуферу (pH=7,4) у запреминском односу 1:10, коришћењем електричног хомогенизатора на леду (*OmniPrep™ multi-sample homogenizer, Omni International, GA, САД*). Тако хомогенизовани узорци масног ткива су даље центрифугирани 20 минута при брзини од 12 000 rpm како би се издвојио супернатант. До тренутка одређивања маркера од интереса, изоловани супернатанти су пренесени у нове епандорфе и чувани на температури од -80°C (191).

Из узорака хомогената различитог типа белог масног ткива користећи *sandwich ELISA* методу (претходно описан поступак) употребом комерцијалног кита одређена је концентрација АТФ-а (ng/mL) пратећи упутства произвођача:

- Rat Adenosine triphosphate (ATP) ELISA Kit (*MyBioSource*, Канада, каталошки број: MBS166244)

3.9.2. Патохистолошка анализа масног ткива (техника Н/Е бојења)

Исечци масног ткива који су се користили за патохистолошку анализу су најпре (одмах након жртвовања животиња) били фиксирани у 4% пуферисаном раствору параформалдехида на собној температури, а затим су дехидрирани користећи растуће концентрације етанола (70%, 96% и 100%) и испрани у ксилену. Како би се добили фиксирани и интактни калупи ткива, узорци су инкубирани током 12 сати у парафину на температури од 56 - 60°C. Тако укалупљени узорци су уз помоћ микротоме сечени на секције ткива дебљине 5 μ m а потом бојени хематоксилин/еозин (Н/Е) методом. Како би се обезбедила максимална објективност а уједно избегла и пристрасност, патохистолошке анализе су спроведене од стране двоје специјалиста патологије који нису имали увид у то који исечак масног ткива припада којој групи експерименталних животиња.

Као једна од најчешће примењених техника бојења у хистологији, Н/Е се често користи у циљу постављања дијагноза различитих болести. У овој студији, техника Н/Е бојења коришћена је у циљу испитивања ефекта примењених фармаколошких агенаса као и протокола излагања хладноћи на величину липидних капљица три врсте белог масног ткива и индукцију мултилокуларне ћелијске грађе која је карактеристична за браон масне ћелије. Прва фаза протокола Н/Е бојења подразумевала је загревање парафинских калупа на температури од 56°C у трајању од 45 минута а затим урањање у ксилол у трајању од 5 минута (поступак потапања у ксилол се понављао два пута). Затим су ткива рехидратисана у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96% и 70%), по 5 минута у свакој концентрацији. Користећи методу по *Mayer*-у секције ткива су уроњене у хематоксилин, инкубиране током 5 минута а затим испране дестилованом водом у трајању од 10 минута. Затим су исечци потопљени у еозин током 3 минута и испрани дестилованом водом. На самом крају протокола, ткива су поново дехидратисана претходно објашњеном методом потапања секција у растуће концентрације алкохола а затим уроњена у ксилол. После финалног фиксирања, ткива су прекривена покровним стаклом за плочице и анализирана после 24 сата сушења. За анализу ткива користио се светлосни микроскоп (*Olympus Corporation, BX51, Shinjuku, Tokyo, Јапан*) док су промене од интереса фотографисане дигиталном камером (*PC 1089; Canon*) (192). Поред тога, ове плочице су служиле за одређивање процента густине, површине и дијаметра адипоцита

при чему су фотографије добијених пресека анализиране уз помоћ програма *Adiposoft – Image J (CIMA, University of Navarra, САД) (193)*.

3.9.3. Имунохистохемијска анализа масног ткива

Имунохистохемија представља изузетно важну методу која се заснива на специфичном везивању/реакцији антиген-антитело у циљу детекције и откривања локализације специфичног антигена у испитиваном ткиву услед везивања за обележено антитело. Иако постоје различити приступи и протоколи у спровођењу имунохистохемијских метода, кључни кораци у овој анализи подразумевају припрему и бојење узорака. Заправо поступак имунохистохемијске анализе се састоји од следећих корака:

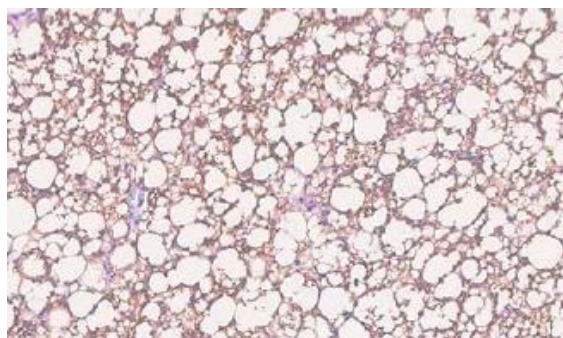
- Припрема антигена - односи се на адекватну припрему узорка како би се постигла већа сензитивност антигена у испитиваном узорку и на тај начин учинио доступнијим за везивање антитела. Различите технике се користе у ову сврху а неке од њих подразумевају фиксацију узорка формалином, примену ултразвучних метода или излагање високим температурама (инкубација узорка у воденом купатилу).
- Додавање примарног антитела (моноклонално/поликлонално) у циљу оптимизације контраста између позитивно обојеног ткива и неспецифично обојене позадине. Разблажење примарног антитела се спроводи према упутству произвођача.
- Секундарно антитело је специфично обележено и наноси се у циљу појачавања сигнала тј. реакције антиген-антитело при чему се може користити за различите врсте примарних антитела. Различити молекули се могу користити за обележавање секундарног антитела, најчешће флуоресцентни молекули, ензими попут HRP или алкалне фосфатазе које стварају обојене производе реакције након инкубације са хромогеним супстратом (нпр. диаминобензидин (енгл. *Diaminobenzidine* - DAB).
- Визуелизација светлосним микроскопом (*Olympus Corporation, BX51, Shinjuku, Tokyo, Јапан*), фотографисање дигиталном камером (*PC 1089; Canon*) и квантификација према скали специфичној за одређени маркер (194).

У овом истраживању како бисмо испитали ефекат третмана валсартан/сакубитрилом као и протокол излагања хладноћи на промоцију маркера специфичних за феномен *browning*-а, један део масног ткива је приликом жртвовања животиња изолован а затим инкубиран различитим антителима у циљу откривања потенцијалних сигналних путева. Антитела су коришћена према претходно описаном упутству произвођача:

- Rabbit monoclonal anti-UCP1 antibody (*Abcam, Уједињено Краљевство, каталошки број: ab234430*)
- Rabbit polyclonal anti - MTOR antibody (*FineTest, Wuhan, Кина, каталошки број: FNab05417*)
- Rabbit polyclonal PGC1 alpha Antibody (*Invitrogen, Massachusetts, САД, каталошки број: PA5-72948*)
- Rabbit monoclonal PPAR gamma Antibody (*Invitrogen, Massachusetts, САД, каталошки број: MA5-14889*)

3.9.3.1. Имунохистохемијско одређивање UCP-1 у узорцима масног ткива

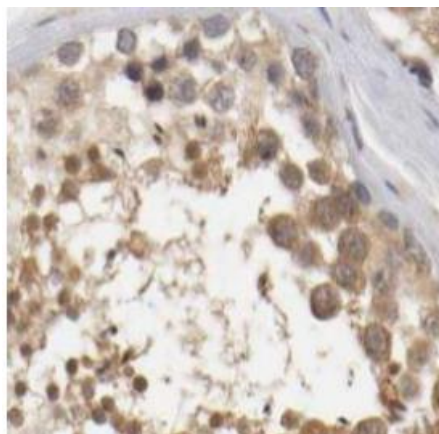
Како бисмо квантификовали и детектовали локализацију UCP-1 у исечцима масног ткива, узорци су током ноћи били инкубирани са примарним моноклонским UCP-1 антителом у односу разблажења 1:500. У другој фази протокола, ткива су испрана а затим инкубирана HRP-коњугованим секундарним антителом (енгл. *anti-rabbit IgG antibody*) на собној температури у трајању од 60 минута. Након инкубације са DAB као супстратом, узорци су посматрани под светлосним микроскопом и фотографисани дигиталном камером. Квантификација добијених резултата изведена је на 10 различитих секција ткива по експерименталној групи коришћењем *Image J* софтвера при чему су резултати представљени као проценат (%) позитивно обојених ћелија масног ткива (195). У циљу поређења специфичности као и квалитета спроведене имунохистохемијске методе, у студији је коришћена позитивна контрола тј. браон масно ткиво са високим процентом обојених ћелија UCP-1 антителом (Слика 23).



Слика 23. Браон масно ткиво са високим процентом обојених ћелија UCP-1 антителом

3.9.3.2. Имунохистохемијско одређивање mTOR у узорцима масног ткива

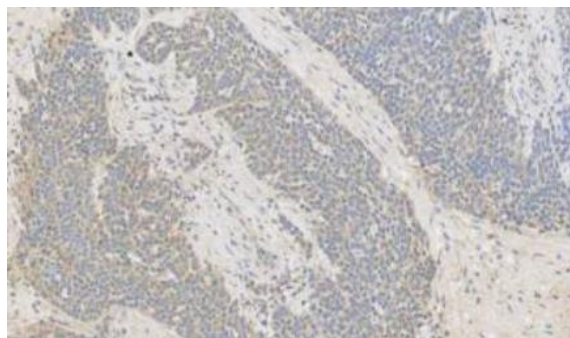
Протокол детекције mTOR у узорцима масног ткива заснивао се на инкубацији ткива са mTOR антителом током ноћи на температури од 4°C у односу разблажења 1:200. Након инкубације, ткива су испрана фосфатним пуфером а потом инкубирана секундарним антителом (енгл. *Anti-rabbit IgG antibody*). По завршеној инкубацији плочице са исечцима ткива су прекривене течним раствором (*Prolong Gold Antifade Reagent*) и инкубиране на собној температури током ноћи. У завршној фази протокола, узорци у посматрани под светлосним микроскопом и фотографисани. Семиквантитативни имунохистохемијски скор је коришћен за процену интензитета бојења ткивних узорака mTOR антителом при чему су резултати представљени као негативан, слаб, умерен и јак интензитет бојења (196). У циљу поређења специфичности као и квалитета спроведене имунохистохемијске методе, у студији је коришћена позитивна контрола тј. ткиво тестиса са позитивним интензитетом mTOR бојења (Слика 24).



Слика 24. Ткиво тестиса са позитивним интензитетом mTOR бојења

3.9.3.3. Имунохистохемијско одређивање PGC-1 α у узорцима масног ткива

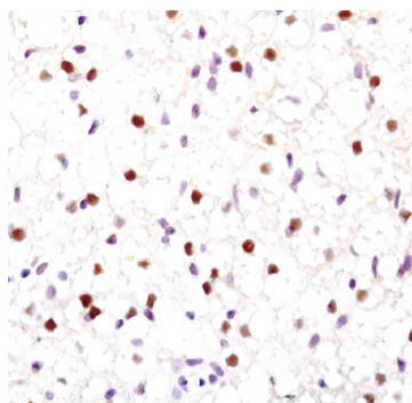
Секције масног ткива укалупљене у парафинске блокове су најпре исечене, дехидриране и припремљене за пренос на специјална предметна стакла. Имунохистохемијско обележавање PGC-1 α антитела спроведено је према упутству произвођача који је подразумевао инкубацију узорка са примарним поликлонским PGC-1 α антителом током ноћи на температури од 4°C у односу разблажења 1:200. Сутрадан, након инкубације, плочице су испране раствором фосфатног пуфера а затим инкубиране HRP-коњугованим секундарним антителом (однос разблажења 1:10 000). На крају, плочице су испране и фиксиране течним раствором (*Prolong Gold Antifade Reagent*) и остављене да се осуше током ноћи а затим посматране под светлосним микроскопом. Имунохистохемијски скор бојења ткивних секција PGC-1 α антителом представљао је проценат позитивно обојених ткивних узорака изражених у виду скорa: 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) и 4 (76-100%) при чему је скор 0 означен као негативно бојење, 1 - слабо, 2 - умерено, 3 и 4 - бојење високог интензитета (197, 198). У циљу поређења специфичности као и квалитета спроведене имунохистохемијске методе, у студији је коришћена позитивна контрола тј. ћелије оваријума са позитивним интензитетом PGC-1 α бојења (слика 25).



Слика 25. Ћелије оваријума са позитивним интензитетом PGC-1 α бојења

3.9.3.4. Имунохистохемијско одређивање PPAR γ у узорцима масног ткива

Инкубација узорака масног ткива са примарним моноклонским PPAR γ антителима спроведена је у односу разблажења 1:200 током ноћи на температури од 4°C. Након инкубације секције ткива су испране раствором фосфатног пуфера а затим инкубиране и третиране са 1 μ l (DAB) *chromogen* и 20 μ l DAB супстрата током 1 минута. Затим су узорци инкубирани секундарним антителима (енгл. *anti-rabbit IgG antibody*) у односу разблажења 1:500. Финална фаза протокола односила се на испирање узорака и прекривање покровним стаклом а затим и посматрањем под светлосним микроскопом у циљу скорирања добијених резултата. Семиквантитативни имунохистохемијски скор је коришћен за процену интензитета бојења ткивних узорака PPAR γ антителима при чему су резултати представљени као негативан, слаб, и јак интензитет бојења (199, 200). У циљу поређења специфичности као и квалитета спроведене имунохистохемијске методе, у студији је постојала позитивна контрола тј. браон масно ткиво са позитивним интензитетом PPAR γ бојења (Слика 26).



Слика 26. Браон масно ткиво са позитивним интензитетом PPAR γ бојења

3.9.4. Анализа ткивне експресија термогених и (анти/про)инфламацијских гена методом квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR*)

Применом qRT-PCR методе одређена је експресија гена специфичних за феномен *browning*-а (UCP-1, mTOR, PGC-1 α и PPAR γ) као и гена одговорних за про/антиинфламацијске цитокине (IL-1, IL-6, IL-10, IL-17 и TNF α).

Иzolовани узорци масног ткива који су намењени за PCR анализу су након жртвовања животиња складиштена на температури од -80 °C до момента спровођења анализе. Протокол спровођења PCR анализе на изолованим узорцима масног ткива обухватао је следеће кораке:

- Узорак замрзнутог масног ткива је механички хомогенизован а затим пребачен у нову епендорфу у коју је додат TRIzol (*TRIzol™ Reagent; Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Немачка) и хлороформ (*Serva, Heidelberg*, Немачка). Ради издвајања укупне информационе РНК из узорака масног ткива коришћен је *Extractme Total RNA kit (Blirt S.A., Gdansk, Пољска, каталошки број: EM09.2, EM11.2)*. Након центрифугирања узорка издвојене су три фазе при чему је површинска (бистра) фаза пренесена у нову епендорфу у коју је додат изопропанол (*Serva, Heidelberg*, Немачка). По завршеној инкубацији на собној температури у

трајању од 10 минута узорак је центрифугиран на 4°C при брзини од 12 000 rpm током 10 минута. Издвојени супернатант је пажљиво одливиен а у епандорфу са преосталом РНК је додат 70% етанол (*Sani-Hem*, Нови Бечеј, Србија). Узорак је затим центрифугиран на 4°C при брзини од 7 500 rpm током 5 минута како би се издвојио супернатант односно информациона РНК. Добијена РНК је затим пренесена у нову епандорфу, растворена у води без нуклеаза (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Немачка) и чувана на -80°C до спровођења наредних анализа.

- Процена приноса изоловане РНК у сваком узорку појединачно извршена је мерењем концентрације РНК као и проценом чистоће и то пипетирањем 1 µl узорка на *BioTek Epoch Microplate* спектрофотометру (*California*, САД). Принос изоловане РНК између 1,75 – 2,00 оцењен је као оптималан.
- Коришћењем комплета за комплементарну ДНК - *cDNA* (*iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR*, *Bio-Rad Laboratories, Inc.*, САД, каталошки број: 1708841) према упутству произвођача, извршена је реверзна транскрипција тј. превођење добијене информационе РНК у комплементарну ДНК (енгл. *complementary DNA – cDNA*).
- У последњем кораку методом qRT-PCR одређена је експресија гена од интереса упоређивањем релативне експресије информационе РНК у нашем узорку у односу на β-актин, који је коришћен као *housekeeping* ген. Реакција је изведена уз помоћ *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, САД*) и додавањем специфичних прајмера (Табела 4). У ову смешу је затим додата *cDNA* и вода без нуклеазе до постизања финалне запремине од 10 µL у бунарчићима микроплејта. Рекације су реализоване у *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (*Bio-Rad*) постављањем почетне денатурације на 95°C у трајању од пола минута а затим 40 циклуса спроведених у два корака: денатурација при 95°C током 15 секунди и *annealing* (везивање прајмера за ланац), а затим елонгација при 60°C у трајању од пола минута.
- Након завршених циклуса, крива топљења је узета за даљу анализу док је релативна експресија гена израчуната на основу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методе и то према следећој формули:

$$\Delta C_t = C_t (\text{гена од интереса}) - C_t (\beta\text{-актин})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{узорак ткива експерименталне групе}) - \Delta C_t (\text{узорак ткива контролне групе})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{релативна промена нивоа експресије гена од интереса у експерименталној у односу на контролну групу}$$

- Сваки узорак је мерен у дупликату а сваки узорак исказан је као однос експресије испитиваног гена и експресије β-актина као *housekeeping* гена (201).

Табела 4. Списак прајмера коришћених у овом истраживању

Прајмер	Секвенца прајмера (5' - 3')
UCP-1	F : GTACCCAGCTGTGCAATGAC
	R : GATGACGTTCCAGGATCCGA
mTOR	F : TGCTGGTGTCTTTGTGAAG
	R : TTGTGCTCTGGATTGAGGTG
PGC-1α	F : GCAGCGGTCTTAGCACTC
	R : GAGGAGTTAGGCCTGCAGTT
PPARγ	F : TTCAGAAAGTGCCTTGCTGTG
	R : CCAACAGCTTCTCCTTCTCG
IL-1	F : TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG
	R : GCAAGTGTCTGAAGCAGCTATG
IL-6	F : GATACCACCCACAACAGACCAG
	R : GTGCATCATCGCTGTTCATACA
IL-10	F : CTTACTGGCTGGAGTGAAGACC
	R : CTGGGAAGTGGGTGCAGTTATT
IL-17	F : GCAAGAGATCCTGGTCCTGAAG
	R : AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG
TNFα	F : GAAAGCATGATCCGAGATGTGG
	R : CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGG

F – forward; R – reverse

Релативна експресија специфичних гена (UCP-1, mTOR, PGC-1 α и PPAR γ) је одређивана у циљу испитивања ефекта примењеног протокола на промоцију *browning*-а узимајући у обзир да су ови гени високоекспримирани у ћелијама BAT-а. Са друге стране, праћење експресије ових гена у групама које су биле третиране валсартан/сакубитрилом омогућио је увид у сигналне путеве којима ова дуална терапија промовише стварање беж адипоцита.

Добро је познато да адипоцити секретују бројне адипокине и тако утичу на одржавање локалне хомеостазе масног ткива. Најновији подаци указују на то да антиинфламацијски (IL-10) као и проинфламацијски (IL-1, IL-6, IL-17, TNF α) цитокини могу утицати на диференцијацију а онда и на функцију масног ткива (202). На основу ових сазнања, у спроведеном истраживању праћена је релативна експресија наведених цитокина у три различита депоа масног ткива.

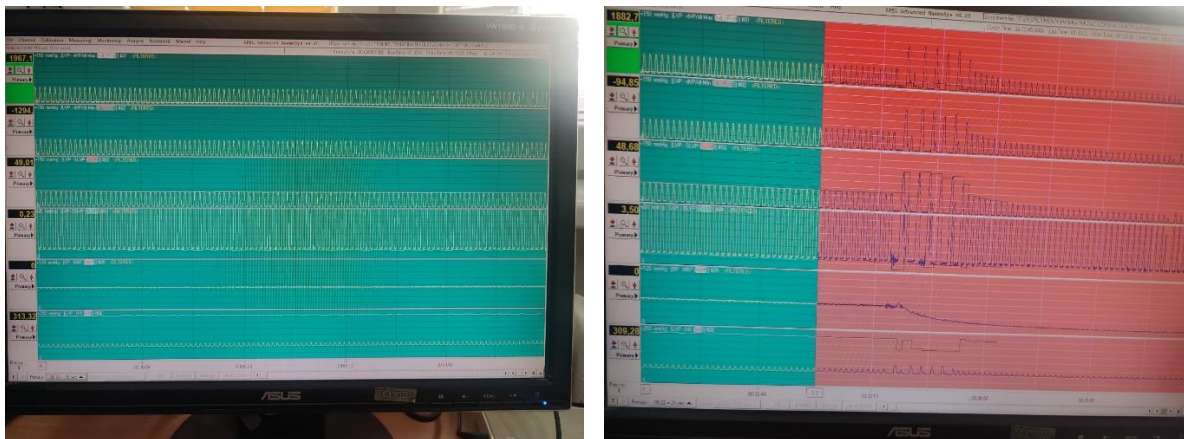
3.10. *Ex vivo* функција срца – техника по *Langendorff*-у

Други део овог истраживања односио се на проучавање ефекта примењеног експерименталног протокола на *ex vivo* функцију изолованог срца пацова. Узимајући у обзир да у литератури нису описани ефекти комбиноване примене валсартан/сакубитрила у стању дијабетесне кардиомиопатије, у овој студији у ту сврху коришћен је експериментални модел MC-а. Након завршеног експерименталног протокола и жртвовања животиња, користећи модел ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Мађарска*) изолована срца пацова су ретроградно перфундована по протоколу: 30 минута исхемије и 60 минута ретроградне реперфузије. Применом овог протокола могли смо да испитамо ефекат примењеног третмана на *ex vivo* функцију изолованог срца пацова али и да проценимо способност срца да смањи оштећење након *ex vivo* изазване исхемијско-реперфузионе повреде.

3.10.1. Langendorff-ов апарат

Техника названа по немачком научнику (*Oskar Langendorff*) представља идеалну методу за испитивање функције изолованог срца експерименталних животиња чији се принцип рада заснива на ретроградној перфузији срца раствором сличним екстрацелуларној течности (*Krebs-Henseleit*-ов раствор). Овај раствор исхрањује изоловано срце животиње и на тај начин омогућава несметан рад. Иако је сам принцип перфузије супротан физиолошком току (раствор преко коронарних артерија доспева до коронарне циркулације и десне коморе), на овај начин се омогућава да изоловано срце ради несметано и ван тела животиње. Постоје два протокола перфузије срца кроз коронарну циркулацију: перфузија при константном протоку и променљивим притиску или перфузија уз константни притисак а при променљивом протоку (203, 204).

У овом истраживању сви експерименти на изолованом срцу пацова спроведени су моделом ретроградне перфузије срца при константном притиску од 70 cm H₂O при чему је коронарни проток био варијабилан. Испитивање *ex vivo* функције срца пацова спроведено је на *Langendorff*-овом апарату који представља систем затворених цеви (цев мањег пречника се налази у већој цеви) које се загревају уз помоћ воденог купатила. Такође, раствор који протиче кроз апарат се загрева до температуре од 37 °C и гасира мешавином CO₂ и O₂ (однос 5% : 95%). Фиксирање изолованог срца пацова заснивало се на постављању срца преко аорте за канилу апарата при излазу мање цеви. Поред тога, пласирањем сензора (трансдјусер *BS4 73-0184*) у леву комору срца бележили су се кардиодинамски параметри што је праћено путем одговарајућег софтверског пакета (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) (Слика 27), док је вредност коронарног протока праћена флуориметријски (сакупљањем коронарног венског ефлуента у току једног минута и читавањем резултата (Табела 5).



Слика 27. Софтверски запис кардиодинамских параметара праћених *ex vivo*

Табела 5. Кардиодинамски параметри праћени у овом истраживању

Параметри од интереса	
dp/dt max	максимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s)
dp/dt min	минимална стопа промене притиска у левој комори (mmHg/s)
SLVP	сistolни притисак леве коморе (mmHg)
DLVP	дијастолни притисак леве коморе (mmHg)
HR	фреквенца рада срца која се изражава као број откуцаја по минути (bpm)
CF	коронарни венски ефлуент који је сакупљан у току једног минута (mL/min)

3.10.2. Изоловање срца пацова

Након спроведеног експерименталног протокола животиње су анестезиране комбинацијом анестетика (кетамин 100mg/kg; ксилазин 10mg/kg) а затим жртвоване. Применом хируршких метода приступило се изоловању срца пацова пресецањем грудног коша, дијафрагме и перикарда. Ресецирањем крвних судова базе миокарда изоловано је срце и одмах стављено у ледени физиолошки раствор како би се потребе миокарда свеле на минимум и очувала виталност органа (тзв. физиолошка клешта). Даљом препарацијом срца, отклоњени су сви непотребних делова ткива како би се потпуно издвојила аорта помоћу које је срце прикачено на канилу *Langendorff*-овог апарата. Током процеса изоловања и препарације срца водило се рачуна о интервалу од приступања отварању грудног коша до тренутка пласирања срца на апарат (максимум 3 минута) како би се избегло оштећење миокарда услед хипоперфузије и хипоксије (203).

Изоловањем аорте приступило се постављању срца на апарат а затим би се услед отварања леве преткоморе и пресецања митралних залистака омогућило пласирање трансдјусера у леву комору. Након постизања стабилизације срчаног рада (након пола сата од пласирања срца и када је вредност свих кардиодинамских параметра без значајних одступања током неколико серија мерења) приступа се испитивању *ex vivo* функције срца пацова (205).



Слика 28. Фотографија *Langendorff*-овог апарата

3.10.3. Протокол исхемијско/реперфузионе (И/Р) повреде срца

У нашем истраживању протокол тридесетоминутне глобалне исхемије постигнут је потпуним прекидом у перфузији срца *Krebs-Henseleit*-овим раствором а затим је уследио период шездесетоминутне реперфузије (поновно успостављање коронарног протока). Сви наведени кардиодинамски параметри као и вредност коронарног протока бележени су у периоду стабилизације (тренутак обележен као С) и у току 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 и 60 минута реперфузионог периода. Схематски приказ примењеног И/Р протокола приказан је на **Схеми 2**.

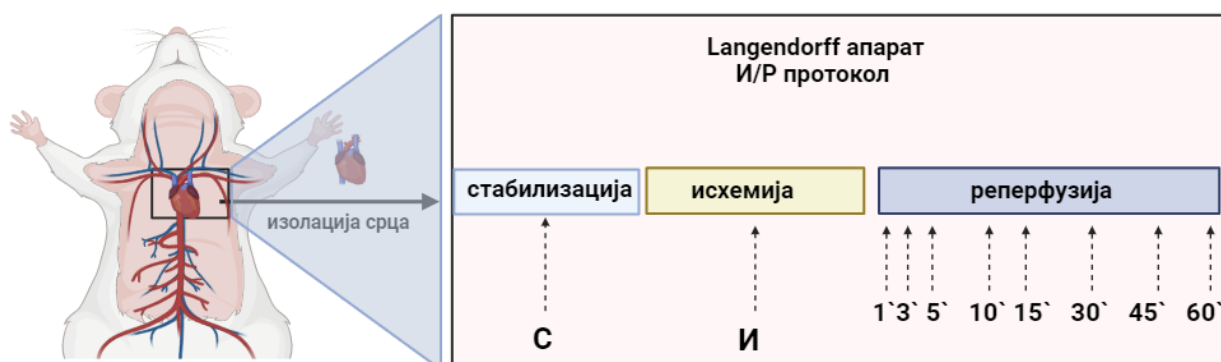


Схема 2. Схематски приказ протокола исхемијско/реперфузионе (И/Р) повреде срца пацова на *Langendorff*-овом апарату

3.10.4. Биохемијски параметри из коронарног венског ефлуента

Из сакупљених узорка коронарног венског ефлуента пацова мерени су нивои прооксидационих молекула (TBARS, NO_2^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2). Спектрофотометријски принцип мерења ових параметара из узорка коронарног венског ефлуента је исти као када је узорак крвна плазма али се протокол разликује у неколико корака у мерењу нивоа ових

маркера из узорак коронарног венског ефлуента у односу на протокол примењен за узорке крвне плазме.

3.10.4.1. Индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Протокол одређивања нивоа TBARS у узорцима коронарног венског ефлуента подразумевао је преношење 800 μL узорка у епендорфе у које је додато 200 μL 0,1 М раствора 1% ТВА у NaOH. Након тога узорци су инкубирани при температури од 100 $^{\circ}\text{C}$ у трајању од 15 минута што је праћено инкубацијом од 10 минута на собној температури. Уместо узорка коронарног венског ефлуента за припрему следеће пробе коришћена је дестилована вода. Спектрофотометријско мерење апсорбанце спроведено је на таласној дужини од 530 nm при чему су коначни резултати добијени коришћењем једначине као када је узорак плазма уз корекцију са вредностима коронарног венског ефлуента (182).

3.10.4.2. Нитрити (NO_2^-)

Индиректно мерење нивоа NO_2^- из узорак коронарног венског ефлуента заснивало се на пипетирању 1 mL узорка у епрувете у које је додато 250 μL Griess-овог реагенса и пуфера за NO у запремини од 125 μL . Уместо узорка коронарног венског ефлуента за припрему следеће пробе пипетирана је иста запремина дестиловане воде. Након инкубације узорак на собној температури током 15 минута, измерена је апсорбанца на 550 nm таласне дужине а затим су вредности добијене коришћењем исте једначине као када је узорак крвна плазма уз корекцију вредности према коронарном протоку (183).

3.10.4.3. Супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Потокол за мерење нивоа ослобођеног $\text{O}_2^{\cdot-}$ је исти као када је узорак крвна плазма (50 μL и 950 μL assay-а за $\text{O}_2^{\cdot-}$). Мерење на 550 nm се такође спроводило у трипликату уз мешање при чему се за добијање коначних вредности користи иста једначина као када је узорак крвна плазма уз корекцију резултата према вредностима коронарног протока (184).

3.10.4.4. Водоник пероксид (H_2O_2)

Метода за мерење нивоа H_2O_2 у узорцима коронарног венског ефлуента подразумевала је пипетирање 200 μL узорка, 800 μL фенол црвеног и 10 μL пероксидазе. По завршеној инкубацији на собној температури од 10 минута, спектрофотометријски је прочитана апсорбанца на 610 nm, користећи следећу пробу припремљену са истом запремином дестиловане воде уместо узорка коронарног венског ефлуента. Коначни резултати добијени су коришћењем једначине примењене као када је узорак крвна плазма, уз корекцију према вредностима коронарног протока (185).

3.11. Патохистолошка анализа ткива миокарда

Након спроведеног експеримента на Langendorff-овом апарату, изолована срца животиња су фиксирана у 10% раствору формалина а затим укалупљена према претходно описаном протоколу (Поглавље 3.9.2.) и обојене хематоксилин/еозином. У циљу детекције колагена у ткиву миокарда коришћена је техника бојења Picro Sirius red при чему се у пресецима изолованог ткива жутом бојом уочавају цитоплазматске формације

док се црвеном бојом издваја колаген. Поступак је подразумевао бојење ткивних плочица раствором *Picro Sirius Red*-а услед урањања плочица у припремљен раствор, двоструког испирања у раствору 2% глацијалне сирћетне киселине а затим и дехидратисања у 100% алкохолу. На крају, ткива су уроњена у ксилол и фиксирана на покривна стакла. Финално припремљене плочице ткива обојене Н/Е методом или техником *Picro Sirius red*-а су анализиране уз помоћ светлосног микроскопа (*Olympus Corporation, BX51, Shinjuku, Tokyo, Japan*) док су промене од интереса фотографисане дигиталном камером (*PC 1089; Canon*). Квантификација колагена спроведена је коришћењем *Image J* софтвера при чему су резултати представљени процентуално (192, 206).

3.12. Статистичке анализе

3.12.1. Снага студије и величина узорка

Величина укупног узорка израчуната је на основу резултата претходно објављене студије (134). За прорачун је коришћен двострани Т-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G*Power - Universität Düsseldorf: Psychologie - HHU*). Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 48.

3.12.2. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података спроведена је коришћењем софтверског пакета *GraphPad Prism 8 (Version for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, САД)* за оперативни систем *Windows*. Процена нормалности расподеле извршена је применом *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестова као и конструисањем хистограма и нормалног *QQ* графикана. У зависности од природе варијабле и нормалности расподеле података за испитивање постојања разлика међу групама коришћен је одговарајући параметарски (*Independent-Samples T test, Paired-Samples T test, One-way/Two-way ANOVA*) или непараметарски (*Mann-Whitney U Test, Wilcoxon signed-rank test, Kruskal-Wallis test*) тестови. За поређење категоријских варијабли коришћени су Хи-квадрат тест или Фишеров тест тачне вероватноће. За испитивање повезаности међу варијаблама коришћени су Пирсонов или Спирманов тест корелације. Вредност $p < 0,05$ сматра се статистички значајном. У *in silico* анализи су издвојене најниже вредности слободне енергије везивања које указују на настанак најстабилнијег комплекса лек-циљани молекула.

4. РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

Експериментални резултати овог истраживања представљени су табеларно и графички и даље коментарисани у зависности од примењеног експерименталног протокола и температуре окружења којој су животиње биле изложене:

1. групе животиња које су за време експерименталног периода биле чуване на собној температури (22 ± 3 °C) и
2. групе животиња које су биле изложене хладноћи ($+4$ °C).

4.1. Ефекат експерименталног протокола на телесну масу, масу срца, однос масе срца и телесне масе и на масу масних ткива

У Табели 6 приказан је ефекат четворонедељног третмана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила као и утицај температуре окружења којој су животиње биле изложене током експерименталног периода на телесну масу (измерену на крају експерименталног протокола), масу срца, масу sWAT, eWAT и rWAT (измерену након жртвовања животиња), као и на однос масе срца и телесне масе.

Табела 6. Ефекат фармаколошког третмана и излагања собној или температури од $+4$ °C на телесну масу, масу срца, однос масе срца и телесне масе и на масу масних ткива

Група	Bm (g)	Hm (g)	Hm/Bm (mg/g)	sWATm (g)	eWATm (g)	rWATm (g)
CTRL	374,40 $\pm$ 22,04	1,60 $\pm$ 0,25	222,67 $\pm$ 29,70	1,06 $\pm$ 0,45	0,30 $\pm$ 0,05	8,62 $\pm$ 1,06
CTRL+E	345,33 $\pm$ 33,86	1,54 $\pm$ 0,27	212,93 $\pm$ 20,36	1,12 $\pm$ 0,66	0,25 $\pm$ 0,04	8,44 $\pm$ 0,96
MetS	541,75 $\pm$ 87,40*	1,50 $\pm$ 0,10	359,01 $\pm$ 37,77*	2,28 $\pm$ 0,41*	0,33 $\pm$ 0,04	11,56 $\pm$ 1,95*
MetS+E	465,25 $\pm$ 21,41	1,35 $\pm$ 0,13	363,91 $\pm$ 25,79	2,08 $\pm$ 0,53	0,31 $\pm$ 0,05	10,00 $\pm$ 0,88
CTRL+4°C	349,75 $\pm$ 12,97 ^a	1,62 $\pm$ 0,23	219,50 $\pm$ 33,36	1,23 $\pm$ 0,57	0,18 $\pm$ 0,02 ^a	4,15 $\pm$ 0,85 ^a
CTRL+E+4°C	277,75 $\pm$ 13,15 [#]	1,19 $\pm$ 0,15	211,75 $\pm$ 39,94	0,87 $\pm$ 0,57 [#]	0,14 $\pm$ 0,02 ^{#a}	2,23 $\pm$ 0,58 ^{#a}
MetS+4°C	413,00 $\pm$ 12,46 ^{#a}	1,39 $\pm$ 0,17	244,92 $\pm$ 25,93 ^a	1,68 $\pm$ 0,61 ^a	0,25 $\pm$ 0,01	5,84 $\pm$ 0,56 ^a
MetS+E+4°C	320,33 $\pm$ 28,29 ^{la}	1,24 $\pm$ 0,02 ^l	194,51 $\pm$ 13,90 ^a	1,09 $\pm$ 0,80 ^{la}	0,19 $\pm$ 0,02 ^l	4,10 $\pm$ 0,77 ^{la}

Bm (енгл. body mass) - телесна маса; Hm (енгл. heart mass) - маса срца; Hm/Bm (енгл. heart mass/body mass) - однос масе срца и телесне масе; sWATm (енгл. subcutaneous white adipose tissue mass) - маса субкутаног белог масног ткива; eWATm (енгл. epididymal white adipose tissue mass) - маса епидидималног белог масног ткива; rWATm (енгл. retroperitoneal white adipose tissue mass) - маса ретроперитонеалног белог масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са CTRL ($p < 0,05$); [#] статистички значајна разлика у поређењу са CTRL+4°C ($p < 0,05$); ^l статистички значајна разлика у поређењу са MetS+4°C ($p < 0,05$); ^a статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом није утицао на промену телесне масе, масе срца, Hm/Bm односа као ни на масу изолованих масних ткива у односу на здраву контролну групу пацова. Међутим, индукција МС-а је довела до статистички значајног повећања у телесној маси, односу Hm/Bm као и масама sWAT и rWAT у поређењу са здравом групом животиња, али без утицаја на масу срца и масу eWAT. Са

друге стране, фармаколошки третман животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури није довео до статистички значајних разлика у телесној маси, маси срца, Hm/Vm односу и масама изолованих органа у односу на нетретирану групу животиња са МС-ом (Табела 6).

Комбинована примена валсартан/сакубитрила и изложености ниској температури код здравих животиња је значајно редуковала телесну масу као и масе изолованих масних ткива на свим анатомским локализацијама у односу на здраве животиње које су биле изложене протоколу хлађења, али без утицаја на масу срца и Hm/Vm однос. Телесна маса животиња из MetS+4°C групе била је значајно већа у односу на здраву нетретирану групу пацова која је била изложена четворонедељном протоколу хлађења, док разлике у масама изолованих органа као и Hm/Vm односу између ове две групе животиња нису биле статистички значајне. Са друге стране, излагање животиња са индукованим МС-ом ниским температурама у комбинацији са оралном суспензијом валсартан/сакубитрилом довела је до значајног смањења у телесној маси, маси срца и маси изолованих масних ткива у поређењу са животињама из MetS+4°C групе, док разлике у Hm/Vm односу између ове две групе животиња нису биле статистички значајне (Табела 6).

Поређењем ефекта различитог температурног окружења на телесну масу као и масу изолованих органа, уочено је значајно смањење телесне масе као и масе eWAT и rWAT здравих животиња које су биле изложене протоколу хлађења у односу на контролну групу пацова која је била чувана на собној температури. Са друге стране, није било утицаја на масу срца, Hm/Vm однос и масу sWAT. Комбиновани приступ излагању хладноћи и фармаколошком третману здравих животиња довео је до статистички значајно нижих вредности у маси eWAT и rWAT у односу на групу здравих пацова која је била третирана валсартан/сакубитрилом али без излагања протоколу хлађења. Да је протокол хлађења од боравка на собној температури значајно ефикаснији у редукцији телесне масе уочава се кроз значајно ниже вредности телесне масе, односа Hm/Vm као и маси изолованих масних ткива (sWAT и rWAT) у групи пацова са МС-ом који су били чувани на +4°C у односу на групу пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури. Сличан ефекат је примећен и у групи пацова са МС-ом која је била третирана комбинацијом валсартан/сакубитрила и уједно изложена ниским температурама, при чему је овај комбиновани третман значајно смањио телесну масу пацова, однос Hm/Vm као и масу sWAT и rWAT у поређењу са животињама из MetS+E групе. Са друге стране, излагање пацова са МС-ом ниским температурама у комбинацији или без фармаколошког третмана није утицао на масу срца као ни на масу eWAT у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури (Табела 6).

4.2. Ефекат експерименталног протокола на метаболичке параметре

4.2.1. Ниво глукозе након теста оралног оптерећења глукозом (ОГТТ)

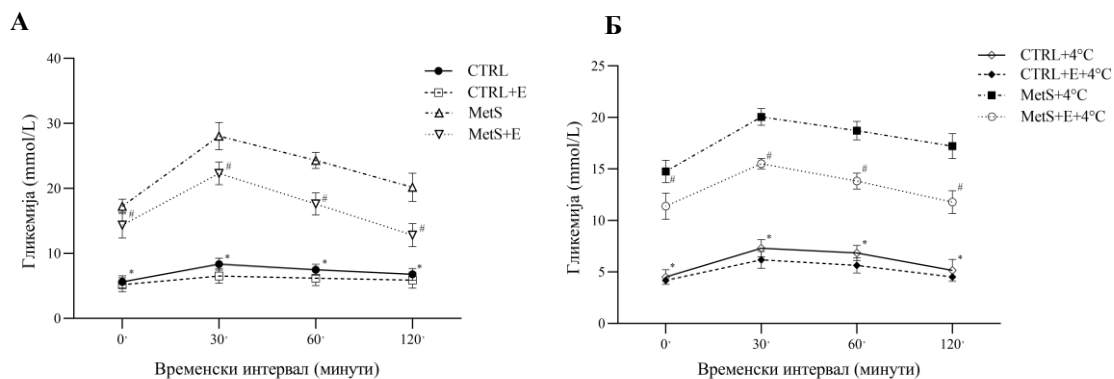


График 1. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом на нивое глукозе током ОГТТ-а код животиња које су биле чуване на (А) собној температури и (Б) +4°C. Вредности гликемије одређене наште (тренутак означен као 0') и након 30', 60' и 120' од примене глукозе у дози од 2 g/kg телесне масе у виду оралне суспензије. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика у поређењу са аналогном групом пацова са MetS ($p < 0,05$).

Ниво глукозе наше (0') био је значајно повећан у групама пацова са МС-ом (било да је примењен протокол хлађења или чувања на собној температури) у поређењу са здравим животињама. Исти тренд је задржан до краја спровођења теста. Међутим, нивои глукозе наше (0') као и у 30', 60' и 120' након примене глукозе били су значајно снижени у групи пацова са МС-ом која је била третирана фармаколошком комбинацијом (и чувана на собној температури или изложена протоколу хлађења) у поређењу са нетретираном групом МС пацова. Са друге стране, протокол излагања хладноћи као ни фармаколошки третман здравих животиња није утицао на ниво глукозе у поређењу са здравим нетретираним пацовима било да су чувани на собној температури или су изложени хладноћи (График 1).

Табела 7. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на нивое глукозе током ОГТТ-а.

Група	0'	30'	60'	120'
CTRL	6,03±0,10	8,68±0,70	7,75±0,66	7,03±0,82
CTRL+E	5,18±1,05	6,50±1,12	6,17±1,13	5,88±1,24
CTRL+4°C	4,50±0,72 ^a	7,30±0,84	6,84±0,73	5,16±1,07 ^a
CTRL+E+4°C	4,18±0,29	6,18±0,81	5,64±0,73	4,52±0,24
MetS	17,48±1,11	28,85±1,35	24,75±0,92	21,00±1,48
MetS+E	11,38±1,27	22,32±1,75	17,62±1,70	12,82±1,78
MetS+4°C	15,75±0,90	20,05±0,82 ^a	18,73±0,90 ^a	17,23±1,22
MetS+E+4°C	12,98±0,66	15,50±0,50*	13,92±0,77 ^a	11,78±1,10

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

У Табели 7 је приказана разлика у ефектима излагања ниским температурама окружења на гликорегулацију у односу на боравак на собној температури. Група здравих пацова која је била подвргнута протоколу хлађења имала је значајно ниже вредности гликемија наше (0') као и на крају ОГТТ-а (120') у поређењу са здравим пацовима који су били чувани на собној температури. Са друге стране, комбиновани третман излагања хладноћи и примена валсартан/сакубитрила током 4 недеље није смањио вредности гликемије наше (0') као ни током ОГТТ-а у односу на групу животиња која је била чувана на собној температури и третирана истом комбинацијом фармаколошких агенаса. Међутим, чување животиња са МС-ом при температури од +4°C условило је значајно ниже вредности гликемије у 30' и 60' ОГТТ-а у односу на групу пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури, без разлика у вредностима гликемије наше (0') као ни на крају теста (120'). Штавише, упоредни фармаколошки третман и протокол излагања хладноћи пацова са МС-ом показао се ефикаснији у смањењу гликемије у 30' и 60' ОГТТ-а у односу на гликемију животиња из MetS+E групе измерену у истом тренутку ОГТТ-а. Са друге стране, није било статистички значајних разлика у вредностима гликемије у 0' и 120' између животиња из MetS+E+4°C и MetS+E групе (Табела 7).

4.2.2. Ефекат фармаколошког третмана и температуре окружења на ниво инсулина

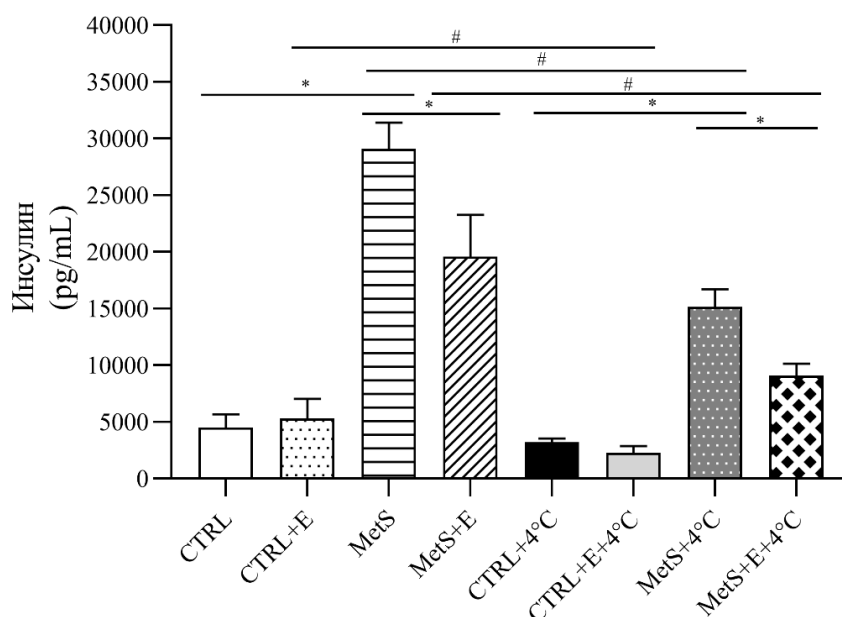


График 2. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на серумски ниво инсулина. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Концентрација инсулина у серуму животиња са МС-ом који су чувани на температури од $22 \pm 3^\circ\text{C}$ била је значајно већа у поређењу са здравом групом животиња које су биле чуване на истом температурном окружењу. Штавише, четворонедељни третман животиња валсартан/сакубитрилом значајно је смањивао ниво инсулина у серуму животиња са МС-ом при собној температури али се вредности инсулина код здравих животиња које су биле третиране фармаколошком терапијом нису разликовале у односу на здраву нетретирану групу пацова које су боравиле на собној температури. Исти ефекат је уочен и између група које су биле изложене протоколу хлађења (График 2).

Поређењем група животиња које су биле подвргнуте истом експерименталном протоколу али при различитим температурама окружења примећено је благо смањење нивоа инсулина у серуму здравих пацова који су били третирани валсартан/сакубитрилом и изложене протоколу хлађења у односу на концентрацију инсулина у серуму пацова из аналогне групе која је била чувана на собној температури. Са друге стране, није било статистички значајне разлике у вредностима инсулина у серуму здравих нетретираних животиња које су биле изложене различитим температурама окружења. Позитиван ефекат излагања ниским температурама на ниво инсулина уочен је и у групи пацова са МС-ом при чему су серумске вредности инсулина ових животиња биле значајно ниже у односу на пацове са МС-ом које су боравиле на собној температури. Поред тога, синергистички ефекат протокола хлађења и третмана валсартан/сакубитрилом одразио се на значајно ниже вредности инсулина у серуму животиња које су биле подвргнуте овом протоколу у односу на вредности измерене код

пацова који су били третирани комбинацијом ова два лека без излагања ниским температурама (График 2).

4.2.3. Ефекат фармаколошког третмана и различите температуре окружења на липидни профил

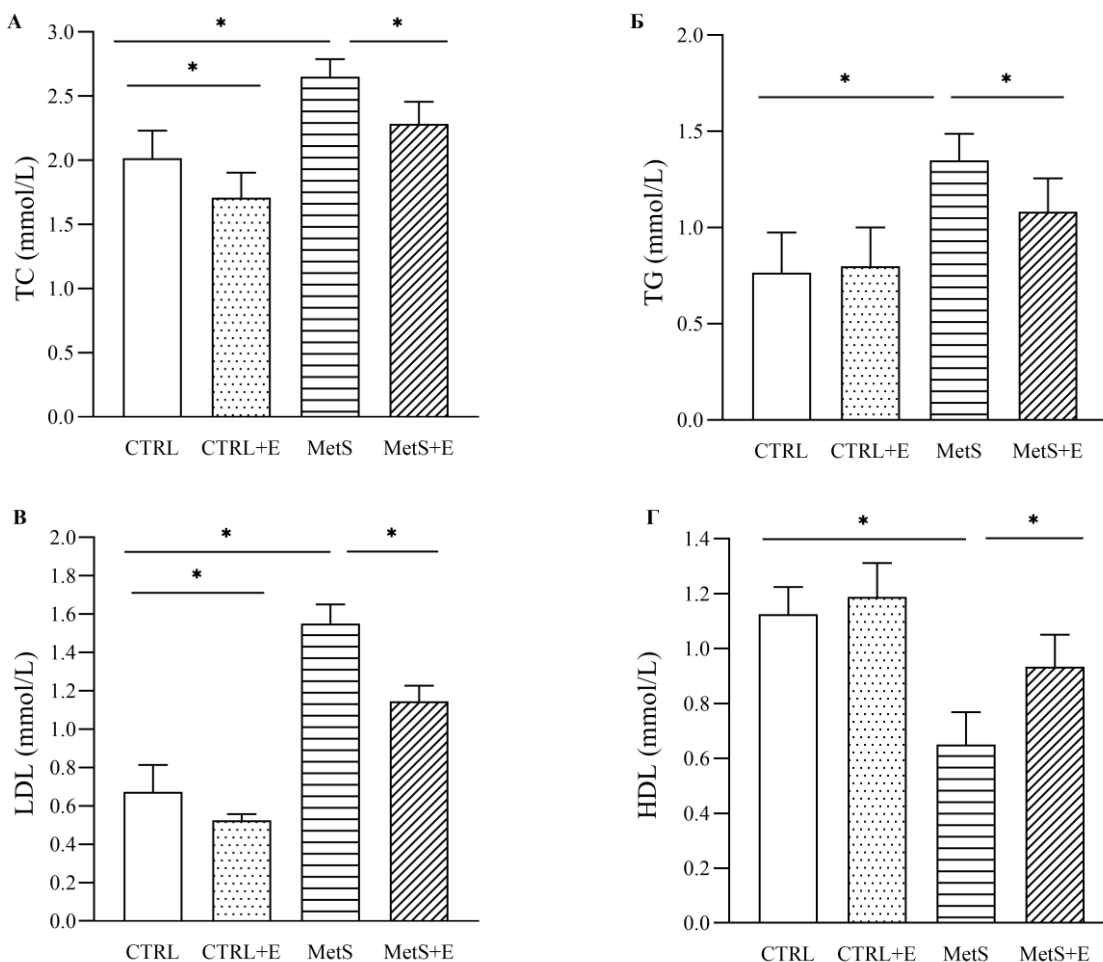


График 3. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом на липидни профил животиња које су биле чуване на собној температури. (А) TC - укупни холестерол; (Б) TG - триглицериди, (В) LDL - липопротеин ниске густине; (Г) HDL - липопротеин високе густине. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Серумска концентрација липидних параметара се значајно разликовала између животиња са МС-ом у односу на здраве пацове, као и између животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом у односу на нетретирану групу пацова. Наиме, индукција МС-а код животиња које су боравиле на собној температури довела је до значајно повећане концентрације TC, TG и LDL као и редукције HDL у односу на групу здравих нетретираних пацова. Поред тога, здрава контролна група животиња која је била чувана на собној температури имала је већи ниво TC и LDL у односу на здраве животиње које су биле подвргнуте фармаколошком третману, док статистички значајне разлике у серумским концентрацијама TG и HDL између ове две групе животиња нису биле примећене. Такође, позитиван учинак примене валсартан/сакубитрила код животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури може се уочити кроз значајно

снижене TC, TG и LDL и повећане HDL вредности у односу на концентрације ових липидних параметара измерених у узорцима серума нетретираних животиња са MC-ом (График 3).

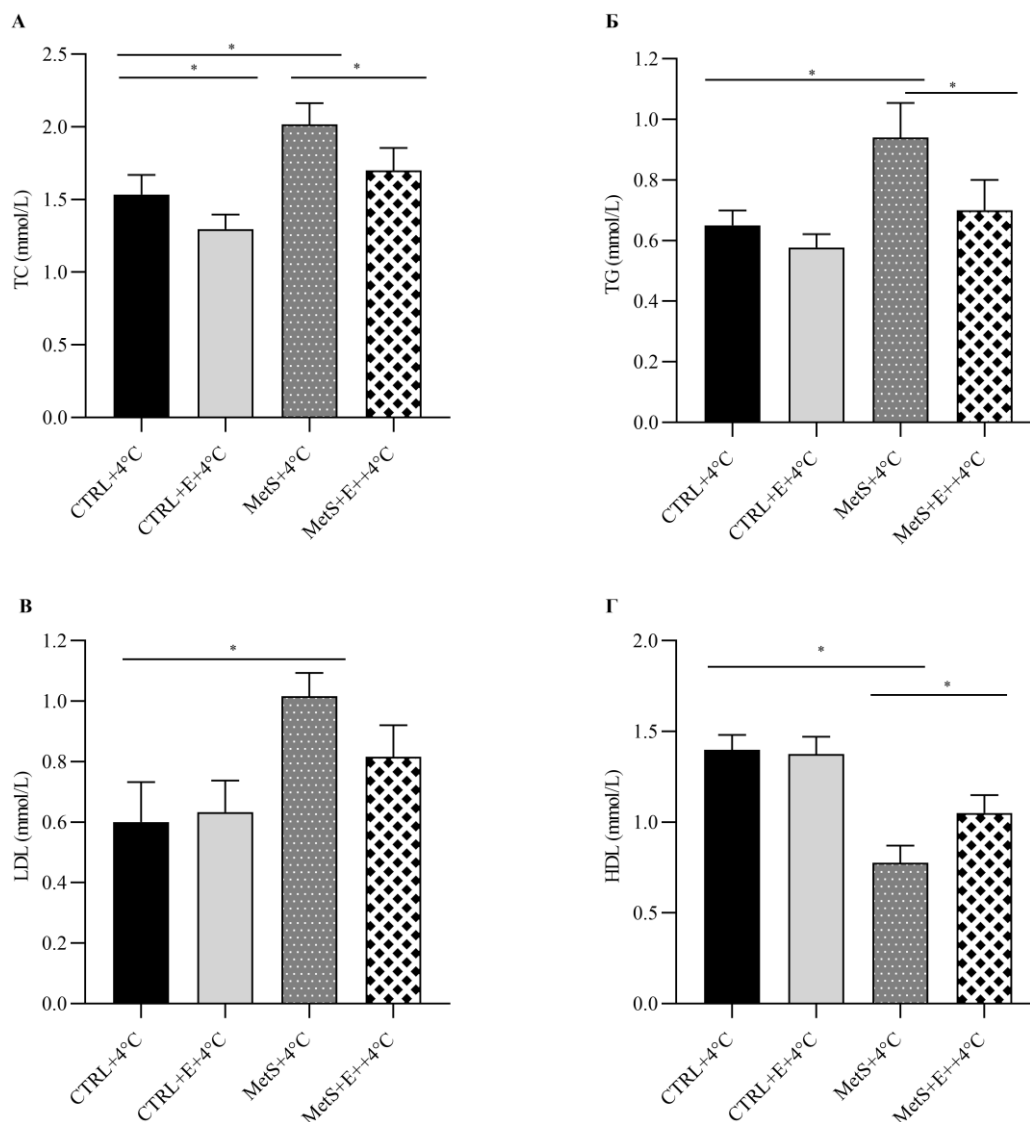


График 4. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на липидни профил животиња. (А) TC - укупни холестерол; (Б) TG - триглицериди, (В) LDL - липопротеин ниске густине; (Г) HDL - липопротеин високе густине. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). *статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Индукција MC-а значајно је утицала на липидни профил свих испитаних параметара код животиња које су биле изложене протоколу хлађења у односу на здраву контролну групу пацова која је била изложена истој температури. Са друге стране, комбиновани третман фармаколошким агенсима и протокола хлађења здравих животиња смањивао је серумски ниво TC у односу на групу здравих животиња која је била изложена само протоколу хлађења, док статистички значајна разлика у концентрацијама TG, LDL и HDL између ове две групе није примећена. Када је реч о животињама са индукованим MC-ом, примењени експериментални протокол хлађења и третмана валсартан/сакубитрилом не само да је редуковао нивое TC и TG, него је довео и до повећане концентрације HDL-а у серуму ових животиња у односу на пацове који су били

изложени протоколу хлађења без фармаколошког третмана. Међутим, овакав тренд није примећен у вредностима LDL-а између ове две групе животиња (График 4).

Табела 8. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на липидне параметре.

Група	TC	TG	LDL	HDL
CTRL	2,02±0,21	0,77±0,09	0,67±0,09	1,13±0,10
CTRL+E	1,71±0,16	0,80±0,09	0,53±0,03	1,19±0,12
CTRL+4°C	1,53±0,14 ^a	0,65±0,04	0,60±0,09	1,40±0,06 ^a
CTRL+E+4°C	1,30±0,09 ^a	0,58±0,04	0,63±0,09	1,38±0,07
MetS	2,65±0,14	1,35±0,14	1,55±0,10	0,65±0,08
MetS+E	2,28±0,17	1,08±0,17	1,15±0,08	0,93±0,05
MetS+4°C	2,02±0,15 ^a	0,94±0,05 ^a	1,02±0,07 ^a	0,79±0,08
MetS+E+4°C	1,70±0,15 ^a	0,70±0,09 ^a	0,82±0,09 ^a	1,05±0,08

TC - укупни холестерол; TG - триглицериди, LDL - липопротеин ниске густине; HDL - липопротеин високе густине. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

У Табели 8 се може приметити да је самостално примећен протокол излагања хладноћи код здравих животиња значајно смањио ниво TC и повећао концентрацију HDL у односу на здраве пацове који су били чувани на собној температури. Са друге стране, нису примећене разлике у концентрацијама TG и LDL између ове две групе. Статистички значајно смањење у нивоу TC примећено је и у групи здравих животиња која је била подвргнута протоколу хлађења заједно са фармаколошким приступом у односу на животиње које су биле третиране валсартан/сакубитрилом на собној температури. Међутим, утицај различитог температурног окружења на концентрације TG, LDL и HDL у серуму животиња које су биле третиране дуалном фармаколошком терапијом није примећен. Са друге стране, хлађење животиња код којих је индукован MC довео је до значајног смањења у серумској концентрацији TC, TG и LDL у односу на ниво ових липидних параметара у серуму животиња са MC-ом који су били чувани на собној температури, али без утицаја на ниво HDL-а. Идентичан ефекат је уочен и између животиња са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом, при чему се протокол хлађења у комбинацији са фармаколошким приступом показао ефикаснијим у редукцији TC, TG и LDL у односу на групу третираних животиња које су биле на собној температури. Такође, разлике у серумским концентрацијама HDL-а између животиња из MetS+E и MetS+E+4°C група нису биле примећене (Табела 8).

4.3. Ефекат експерименталног протокола на хемодинамске параметре

4.3.1. Крвни притисак и срчана фреквенца

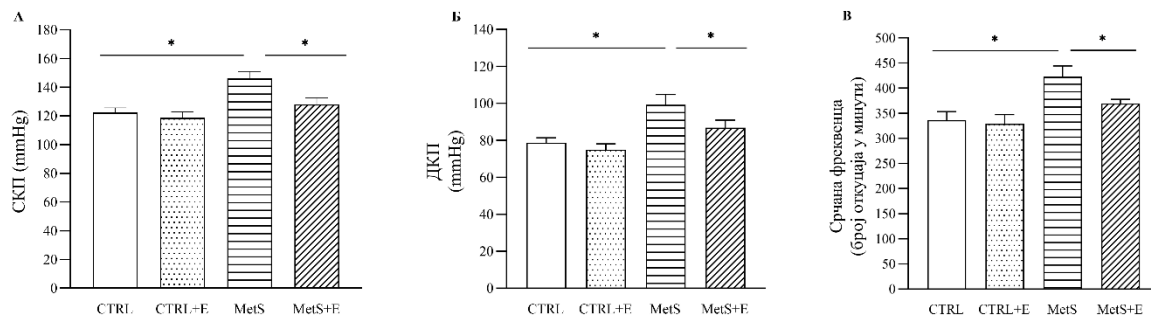


График 5. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом животиња које су биле чуване на собној температури на (А) СКП - систолни крвни притисак; (Б) ДКП - дијастолни крвни притисак и (В) срчану фреквенцу. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Индукција МС-а довела је до значајног пораста у вредностима систолног и дијастолног крвног притиска као и у вредностима срчане фреквенце у односу на здраве нетретиране животиње које су биле чуване на собној температури. Међутим, примена валсартан/сакубитрила код животиња са потврђеним МС-ом довела је до статистички значајне редукције у вредностима свих испитиваних параметара у односу на групу пацова које нису биле поврђнуте терапији. Са друге стране, вредности систолног и дијастолног крвног притиска као и срчане фреквенце се нису статистички разликовале између здравих пацова који су били третиран валсартан/сакубитрилом и здраве контролне групе животиња која је била чувана на собној температури (График 5).

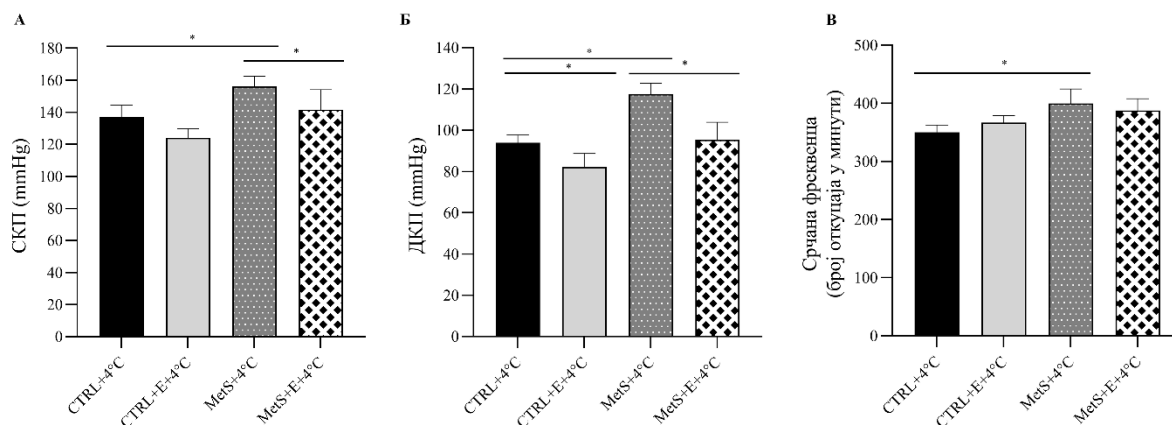


График 6. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на (А) СКП - систолни крвни притисак; (Б) ДКП - дијастолни крвни притисак и (В) срчану фреквенцу. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Фармаколошки третман здравих животиња које су биле изложене протоколу хлађења смањио је дијастолни крвни притисак у односу на нетретирану здраву групу животиња која је била изложена ниским температурама. Међутим, разлике у вредностима систолног крвног притиска као и срчане фреквенце нису примећене између

ове две групе животиња. Са друге стране, сви испитивани параметри били су статистички значајно виши у групи животиња са МС-ом која је била изложена протоколу хлађења у поређењу са здравом нетретираном групом пацова која је била чувана на ниским температурама. Експериментални протокол истовременог излагања хладноћи и администрације два лека примењен у групи животиња са МС-ом статистички је смањив вредности систолног и дијастолног крвног притиска али без утицаја на вредност срчане фреквенце у односу на поменуте параметре код фармаколошки нетретираних животиња са МС-ом које су биле подвргнуте протоколу хлађења (**График 6**).

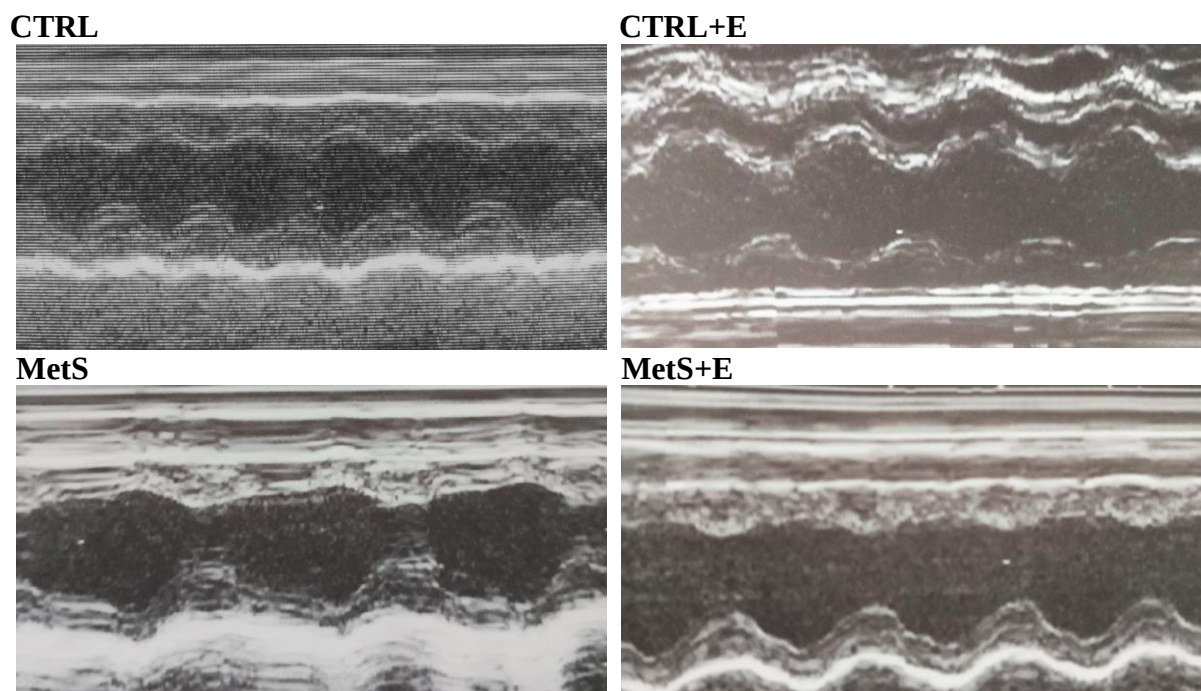
Табела 9. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на вредности крвног притиска и срчане фреквенце.

Група	СКП	ДКП	Срчана фреквенца
CTRL	122,00±3,54	78,40±2,97	336,20±18,99
CTRL+E	117,20±2,28	74,33±1,15	326,33±1,53
CTRL+4°C	134,80±4,87 ^a	93,80±4,09 ^a	353,00±12,78
CTRL+E+4°C	122,40±4,04	81,60±6,80	366,00±13,47 ^a
MetS	145,00±4,90	99,80±6,02	422,00±24,01
MetS+E	127,20±4,82	87,20±4,44	367,60±7,09
MetS+4°C	156,60±7,06 ^a	116,00±4,18 ^a	403,00±27,65 ^a
MetS+E+4°C	142,20±13,81 ^a	94,60±9,07	380,00±16,52

СКП - систолни крвни притисак; ДКП - дијастолни крвни притисак. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). ^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Утицај температуре на којој су животиње биле чуване током ове студије уочава се и у вредностима систолног и дијастолног крвног притиска које су биле статистички значајно веће у групи здравих нетретираних пацова у односу на здраве животиње које су биле чуване на собној температури без администрације дуалне терапије. Међутим, разлике у вредностима срчане фреквенце између ове две групе животиња нису примећене. Са друге стране, фармаколошки третман здравих животиња које су биле изложене хладноћи довео је до значајног повећања у вредностима срчане фреквенце у односу на контролну групу животиња које су примале исте фармаколошке агенсе али на собној температури само без утицаја на вредности систолног и дијастолног крвног притиска (**Табела 9**).

Чување животиња са индукованим МС-ом на ниским температурама условило је статистички значајно веће вредности систолног и дијастолног крвног притиска али ниже вредности срчане фреквенце у односу на вредности измерених у групи животиња са МС-ом која је била чувана на собној температури током експерименталног периода. Поред тога, четворонедељни третман животиња валсартан/сакубитрилом код којих је индукован МС и које су биле изложене протоколу хлађења довео је до значајно већих вредности систолног крвног притиска у односу на групу пацова са МС-ом која је била чувана на истој температури али без примене фармаколошких агенаса. Статистички значајне разлике у вредностима дијастолног крвног притиска као и срчане фреквенце нису биле примећене између ове две групе животиња (**Табела 9**).

4.3.2. *In vivo* процена функције миокарда

Слика 29. Приказ репрезентативних фотографија *in vivo* функције миокарда праћене ехокардиографијом из М-режима у групама животиња које су биле чуване на собној температури.

Табела 10. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом животиња које су биле чуване на собној температури на *in vivo* праћене димензије леве коморе, фракцију скраћења и ејекциону фракцију.

	CTRL	CTRL+E	MetS	MetS+E
IVSd (cm)	0,163±0,02	0,175±0,02*	0,123±0,14*	0,149±0,01 [#]
LVIDd (cm)	0,609±0,03	0,589±0,05	0,618±0,04	0,615±0,02
LVPWd (cm)	0,203±0,04	0,186±0,05	0,223±0,03	0,210±0,02
IVSs (cm)	0,315±0,04	0,332±0,02*	0,210±0,05*	0,290±0,03 [#]
LVIDs (cm)	0,234±0,05	0,206±0,04	0,210±0,05	0,258±0,04 [#]
LVPWs (cm)	0,306±0,04	0,298±0,06	0,320±0,02	0,339±0,04
FS (%)	55,50±4,18	68,48±5,32*	41,23±5,49*	51,25±6,02 [#]
EF(%)	99,02±8,81	95,09±7,78	74,75±6,99*	89,42±9,05 [#]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

*статистички значајна разлика у односу на CTRL ($p < 0,05$); [#]статистички значајна разлика у односу на MetS ($p < 0,05$).

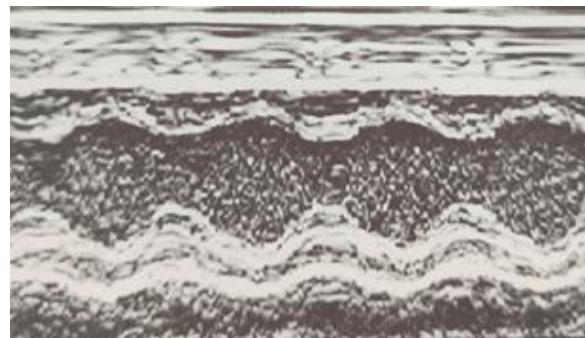
Индукција MC-а код животиња које су биле чуване на собној температури током експерименталног протокола је утицала на функцију миокарда што се огледа у значајно нижим вредностима IVSd и IVSs као и процентима фракционог скраћења и ејекционе фракције у односу на контролну групу здравих пацова. Остали ехокардиографски параметри се нису значајно разликовали између ове две групе животиња. Са друге стране, субакутни третман валсартан/сакубитрилом здравих пацова при собној температури побољшао је IVSd и IVSs. Такође, фармаколошки третман здравих животиња је повећао ејекциону фракцију као и проценат фракционог скраћења у односу на здраву контролну групу, али без статистички значајних разлика у вредностима

осталих параметара. Ехокардиографски параметри IVSd, IVSs, LVID, FS и EF у групи експерименталних животиња са МС-ом на третману фармаколошким агенасима били су значајно побољшани у односу на контролну групу пацова са МС-ом. Међутим, примена два лека код животиња са МС-ом није утицала на вредности осталих ехокардиографских параметара праћених у овој студији (Табела 10).

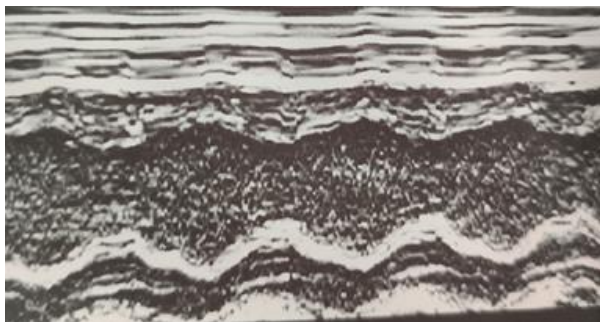
CTRL+4°C



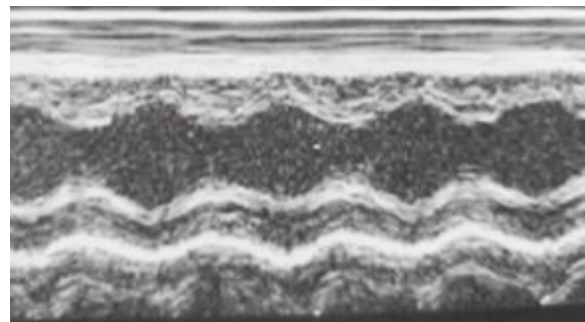
CTRL+E+4°C



MetS+4°C



MetS+E+4°C



Слика 30. Приказ репрезентативних фотографија *in vivo* функције миокарда праћене ехокардиографијом из М-режима у групама животиња које су биле изложене протоколу хлађења.

Табела 11. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом животиња које су биле изложене протоколу хлађења на *in vivo* праћене димензије леве коморе, фракцију скраћења и ејекциону фракцију.

	CTRL+4°C	CTRL+E+4°C	MetS+4°C	MetS+E+4°C
IVSd (cm)	0.158±0,02	0,164±0,01	0,139±0,02*	0,144±0,02
LVIDd (cm)	0.598±0,04	0,600±0,05	0,576±0,05	0,599±0,05
LVPWd (cm)	0.214±0,03	0,200±0,03	0,225±0,03	0,217±0,02
IVSs (cm)	0.340±0,02	0,322±0,02	0,295±0,03*	0,305±0,03
LVIDs (cm)	0.246±0,02	0,230±0,02	0,258±0,02	0,242±0,02 [#]
LVPWs (cm)	0.294±0,03	0,296±0,04	0,300±0,04	0,308±0,04
FS (%)	50,52±2,12	51,05±4,42	42,37±3,57*	46,30±5,02
EF (%)	99,11±10,02	93,57±8,85	79,07±8,02*	92,63±9,88 [#]

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

* статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Вредности ехокардиографских параметара између здравих животиња које су биле изложене протоколу хлађења са или без администрације фармаколошких агенаса се нису међусобно значајно разликовале. Са друге стране, група животиња која је била изложена протоколу хлађења са индукованим МС-ом имале је значајно ниже вредности IVS на крају дијастоле и систоле као и проценат фракционог скраћења и ејекционе фракције у односу на здраву контролну групу пацова која је била изложена ниским температурама.

Остале вредности ехокардиографских параметара између ове две групе животиња биле су без значајних разлика. Међутим, истовремени протокол хлађења и примена валсартан/сакубитрила довела је до смањења у вредностима LVIDs у односу на нетретирану групу животиња са МС-ом која је била изложена ниским температурама. Такође, третман валсартан/сакубитрилом животиња код којих је индукован МС уз истовремено излагање хладноћи значајно је повећао ејекциону фракцију у односу на фармаколошки нетретирану контролну групу пацова са МС-ом, али без статистичких значајних разлика у осталим ехокардиографским параметрима (Табела 11).

Табела 12. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на *in vivo* праћене димензије леве коморе, фракцију скраћења и ејекциону фракцију.

Група	IVSd (cm)	LVIDd (cm)	LVPWd (cm)	IVSs (cm)	LVIDs (cm)	LVPWs (cm)	FS (%)	EF (%)
CTRL	0,163±0,02	0,609±0,03	0,203±0,04	0,315±0,04	0,234±0,05	0,306±0,04	55,50±4,18	99,02±8,81
CTRL+E	0,175±0,02	0,589±0,05	0,186±0,05	0,332±0,02	0,206±0,04	0,298±0,06	68,48±5,32	95,09±7,78
CTRL+4°C	0,158±0,02	0,598±0,04	0,214±0,03	0,340±0,02	0,246±0,02	0,294±0,03	50,52±2,12	99,11±10,02
CTRL+E+4°C	0,164±0,01	0,600±0,05	0,200±0,03	0,322±0,02	0,230±0,02	0,296±0,04	51,05±4,42	93,57±8,85
MetS	0,123±0,14	0,618±0,04	0,223±0,03	0,210±0,05	0,380±0,05	0,320±0,02	41,23±5,49	74,75±6,99*
MetS+E	0,149±0,01	0,615±0,02	0,210±0,02	0,290±0,03	0,258±0,04	0,339±0,04	51,25±6,02	89,42±9,05
MetS+4°C	0,139±0,02	0,602±0,05	0,225±0,03	0,295±0,03 ^a	0,258±0,02 ^a	0,300±0,04 ^a	42,37±3,57	79,07±8,02
MetS+E+4°C	0,144±0,02	0,608±0,05	0,217±0,02	0,305±0,03	0,239±0,02	0,308±0,04	46,30±5,02	92,63±9,88

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења

Ефекат излагања здравих нетретираних пацова ниским температурама није утицао на промену у вредностима ехокардиографских параметара у поређењу са вредностима које су измерене код здравих животиња које су биле чуване на собној температури. Исти тренд је примећен и у групи животиња која је била изложена протоколу хлађења уз истовремено примењену дуалну терапију валсартаном и сакубитрилом у односу на животиње које су биле чуване на собној температури и третиране овим фармаколошким агенсима (Табела 12).

Излагање протоколу хлађења животиња са МС-ом резултирало је у значајно нижим вредностима IVS, LVID и LVPW на крају систоле у поређењу са групом пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури, али без утицаја на остале ехокардиографске параметре. Са друге стране, животиње са МС-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и чуване на собној температури или изложене протоколу хлађења имале су сличне вредности ехокардиографских параметара, без статистички значајних разлика (Табела 12).

4.4. Утицај експерименталног протокола на системски редокс статус

4.4.1. Ефекат на ниво прооксидационих молекула у крвној плазми

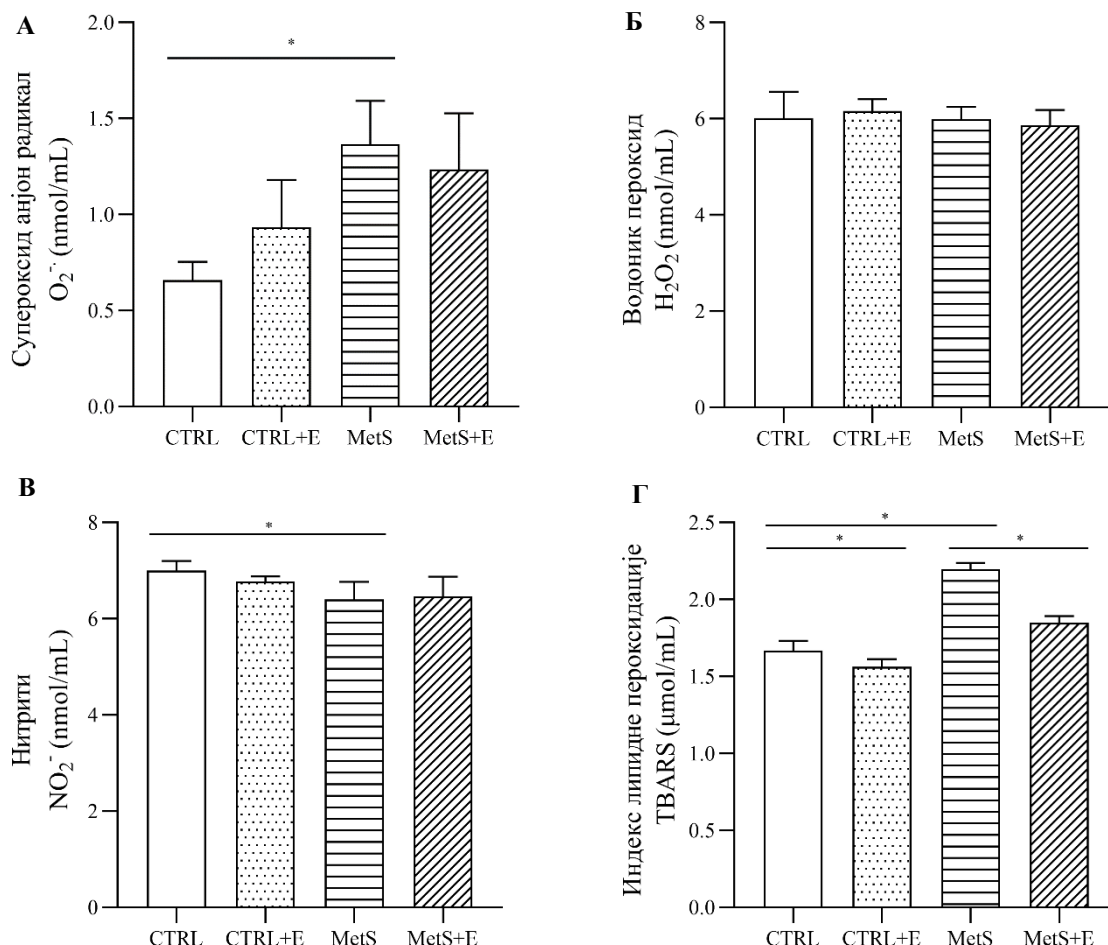


График 7. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом животиња које су биле чуване на собној температури на ниво (А) $O_2^{\bullet-}$ - супероксид анјон радикала; (Б) H_2O_2 - водоник пероксида, (В) $NO_2^{\bullet-}$ - нитрита; (Г) TBARS - индекса липидне пероксидације. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

У узорцима плазме животиња код којих је индукован МС измерен је статистички значајно виши ниво $O_2^{\bullet-}$ и TBARS-а у односу на здраву контролну групу пацова, изузев у вредностима H_2O_2 које се нису значајно разликовале између ове две групе. Међутим, вредности нитрита биле су значајно ниже у групи животиња са МС-ом. Са друге стране, примена валсартан/сакубитрила и код здравих и животиња са индукованим МС-ом значајно је смањила ниво TBARS-а у поређењу са аналогном нетретираним групом. Међутим, примењени фармаколошки агенси нису довели до статистички значајних разлика у нивоу преосталих испитиваних прооксидационих молекула у односу на вредности које су измерене у плазми нетретираних животиња (График 7).

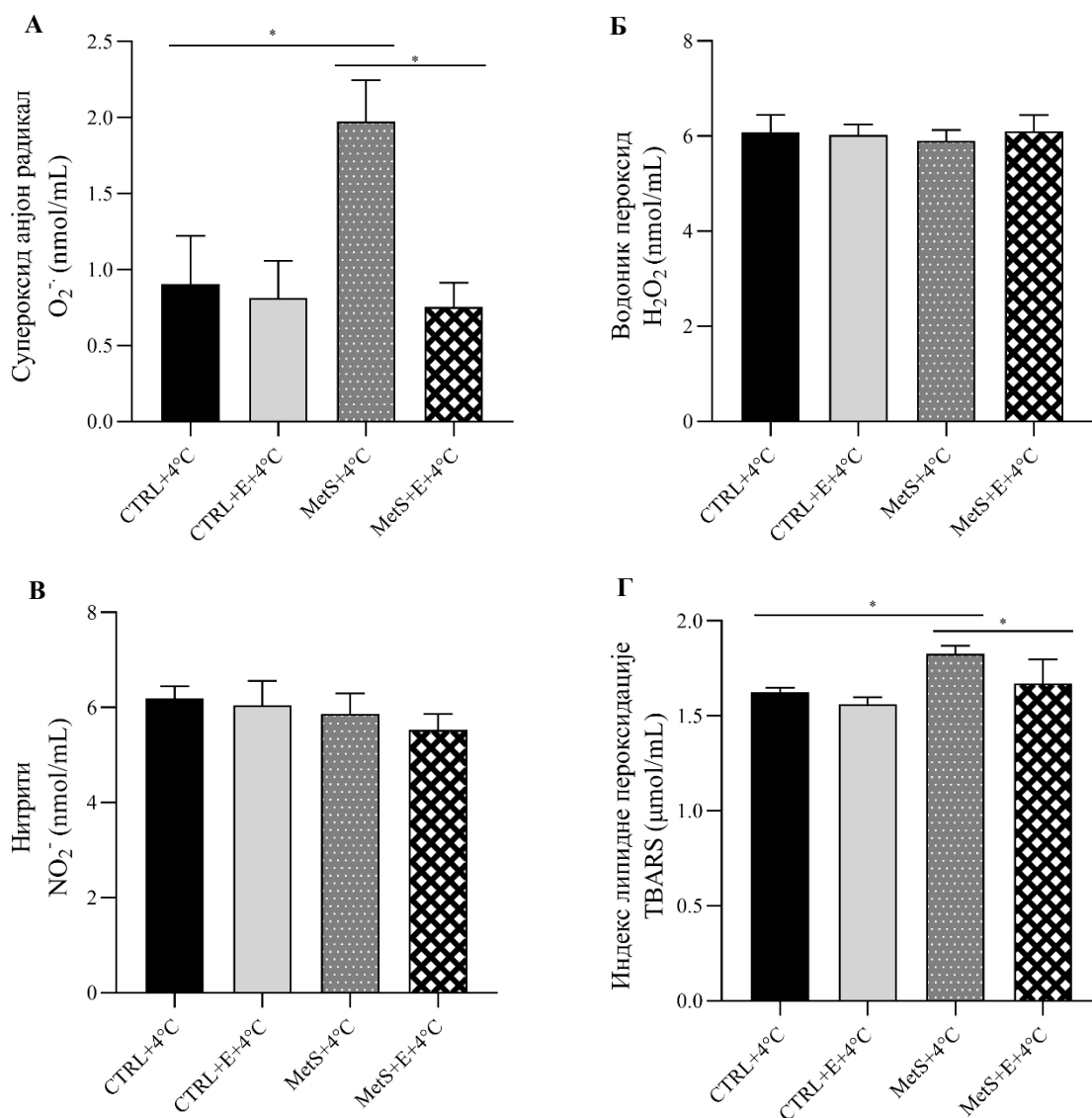


График 8. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на ниво (А) $O_2^{\cdot-}$ - супероксид анион радикала; (Б) H_2O_2 - водоник пероксида, (В) $NO_2^{\cdot-}$ - нитрита; (Г) TBARS - индекса липидне пероксидације. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Излагање животиња са МС-ом протоколу хлађења довело је до значајног пораста у вредностима $O_2^{\cdot-}$ и TBARS-а у поређењу са вредностима ових прооксидационих молекула које су измерене у плазми здравих нетретираних пацова који су били подвргнути протоколу хлађења. Међутим, разлике у нивоима H_2O_2 и $NO_2^{\cdot-}$ између ове две групе животиња нису примећене. Такође, примена валсартан/сакубитрила код здравих животиња које су биле изложене протоколу хлађења није довела до статистички значајних разлика у нивоима испитиваних прооксидационих параметара у односу на здраву контролну групу пацова која је била изложена ниским температурама. Са друге стране, комбиновани третман фармаколошким агенсима и примењени протокол хлађења код животиња са МС-ом значајно је смањио ниво $O_2^{\cdot-}$ и TBARS-а у поређењу са вредностима које су измерене у плазми животиња са МС-ом које су биле изложене само

протоколу хлађења, али без утицаја на ниво преостала два испитивана прооксидациона молекула (График 8).

Табела 13. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на ниво прооксидационих молекула који су измерени у плазми животиња.

Група	Супероксид анјон радикал (O ₂ ⁻)	Водоник пероксид (H ₂ O ₂)	Нитрити (NO ₂ ⁻)	Индекс липидне пероксидације (TBARS)
CTRL	0,66±0,10	6,02±0,55	7,00±0,20	1,67±0,06
CTRL+E	0,93±0,25	6,16±0,25	6,78±0,10	1,56±0,05
CTRL+4°C	0,91±0,32	6,08±0,377	6,19±0,26 ^a	1,63±0,04
CTRL+E+4°C	0,79±0,29	6,02±0,23	6,05±0,51 ^a	1,56±0,04
MetS	1,37±0,23	6,00±0,25	6,40±0,37	2,20±0,04
MetS+E	1,24±0,29	5,87±0,32	6,46±0,41	1,85±0,04
MetS+4°C	1,98±0,27 ^a	5,91±0,22	5,87±0,43	1,83±0,02 ^a
MetS+E+4°C	0,75±0,16 ^a	6,10±0,34	5,13±0,30 ^a	1,67±0,13 ^a

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$).

^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Протокол хлађења значајно је смањио ниво NO₂⁻ у плазми како код здравих нетретираних пацова тако и у групи животиња које су примале оралну суспензију валсартан/сакубитрила у поређењу са аналогним групама животиња које су биле чуване на собној температури. Међутим, утицај различите температуре окружења на ниво осталих прооксидационих параметара који су измерени у узорцима здравих животиња са или без третмана валсартан/сакубитрилом није примећен. Док је при излагању ниским температурама у групи животиња са MC-ом повећан ниво O₂⁻, вредност TBARS-а у узорцима ових животиња је био значајно нижи у односу на вредности које су измерене у плазми пацова са MC-ом који су били чувани на собној температури. Са друге стране, излагање животиња са MC-ом различитим температурама окружења није значајно утицало на разлике у вредностима H₂O₂ и NO₂⁻ између ове две групе пацова. Међутим, животиње са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и излагане протоколу хлађења имале су статистички значајно ниже вредности O₂⁻, NO₂⁻ и TBARS-а у плазми у односу на вредности ових прооксидационих параметара које су измерене у плазми животиња из MetS+E групе, али без значајне разлике у вредностима H₂O₂ (Табела 13).

4.4.2. Ефекат третмана на параметре антиоксидационе заштите

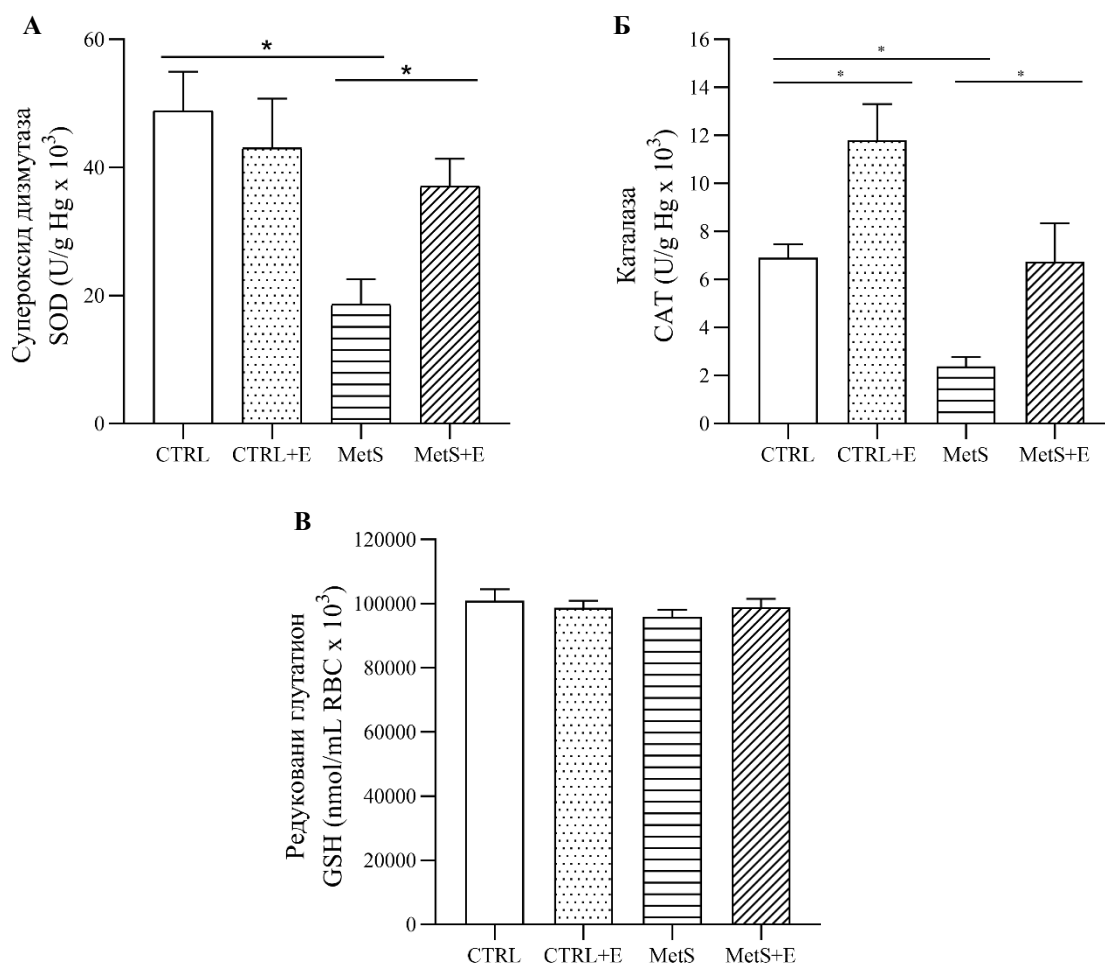


График 9. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом код животиња које су биле чуване на собној температури на параметре антиоксидационе заштите. (А) SOD - супероксид дизмутаза; (Б) CAT- каталаза и (В) GSH - редуковани глутатион. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). *статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Док су активности SOD-а и CAT-е биле статистички значајно више у групи здравих пацова у односу на животиње са MC-ом, вредности GSH-а се нису статистички разликовале између ове две групе животиња. Третман здравих животиња валсартан/сакубитрилом повећао је активност CAT-е у односу на активност овог ензима у лизату здравих нетретираних пацова, али без утицаја на активност SOD-а и вредност GSH-а. Такође, примењени третман код животиња са MC-ом није утицао на вредност GSH-а али је значајно повећао активност SOD-а и CAT-е у поређењу са активношћу ових ензима у лизату нетретираних животиња са MC-ом (График 9).

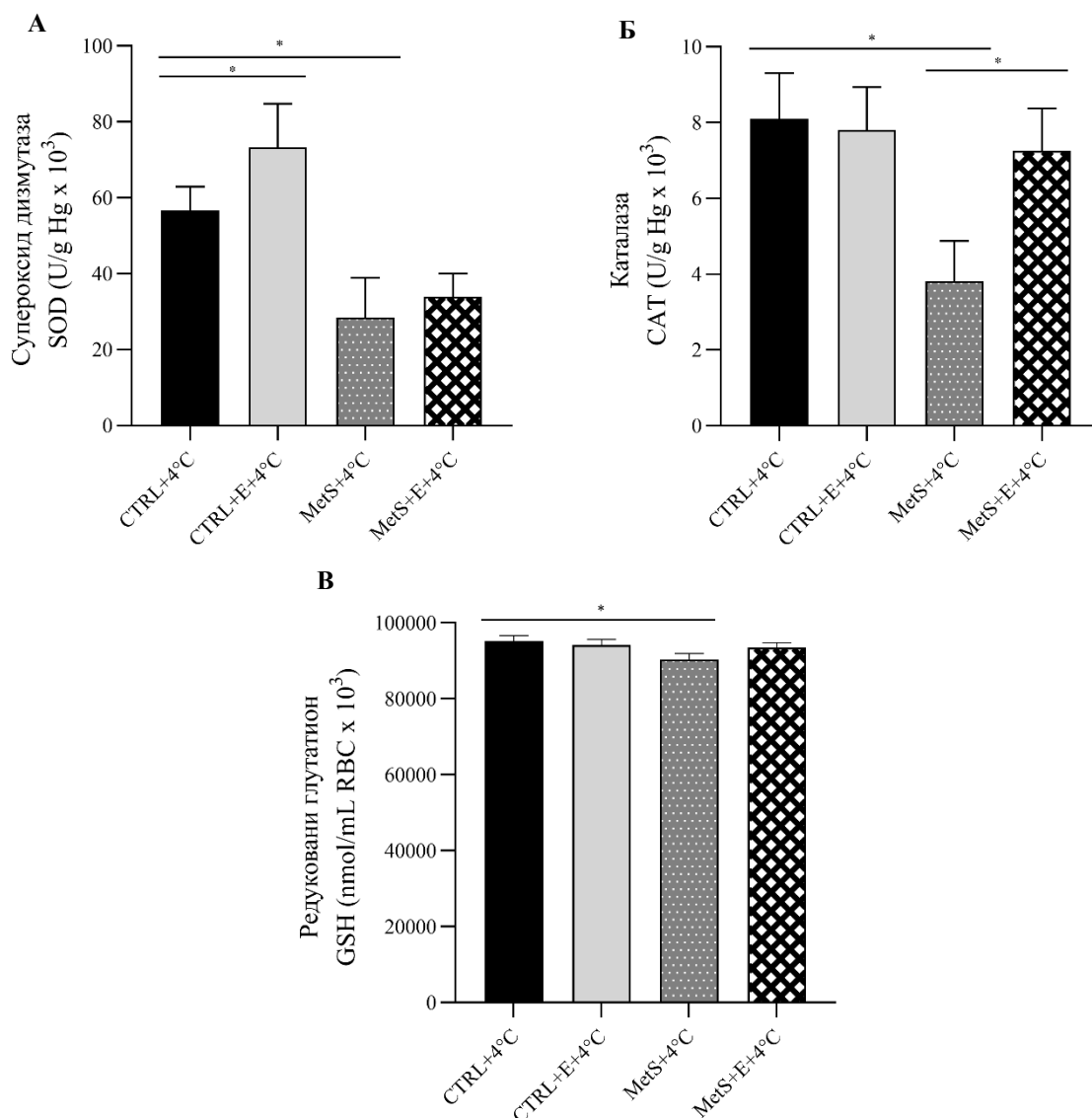


График 10. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на параметре антиоксидационе заштите. (А) SOD - супероксид дизмутаза; (Б) CAT- каталаза и (В) GSH - редуковани глутатион. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). * статистички значајна разлика између група ($p < 0,05$).

Сви испитивани параметри антиоксидационе заштите били су статистички значајно смањен у лизату животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења у односу на антиоксидациону заштиту здравих животиња које су биле подвргнуте истом протоколу хлађења. Међутим, комбиновани третман фармаколошким агенсима и протокол излагања хладноћи је значајно повећао активност CAT-е у групи животиња са МС-ом у поређењу са групом нетретираних пацова код којих је индукован МС и које су биле изложене ниским температурама окружења, али без статистички значајних разлика у активности SOD-е и нивоу GSH. Штавише, активност SOD-е била је значајно већа у лизату здравих пацова који су били третирани валсартан/сакубитрилом и изложени протоколу хлађења у односу на нетретирану групу здравих пацова која је била изложена ниским температурама, али без разлике у активности CAT-е и нивоу GSH између ове две групе животиња (График 10).

Табела 14. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на параметре антиоксидационе заштите у лизату еритроцита.

Група	Супероксид дизмутаза (SOD)	Каталаза (CAT)	Редуковани глутатион (GSH)
CTRL	48,84±6,15	6,92±0,56	100927,91±3634,80
CTRL+E	43,03±7,74	11,80±1,51	98707,74±2241,75
CTRL+4°C	56,75±6,25	8,13±1,55	95287,74±1680,28 ^a
CTRL+E+4°C	73,26±11,51 ^a	7,80±2,04 ^a	94129,74±1517,80 ^a
MetS	18,61±3,97	2,40±0,38	95814,10±2373,95
MetS+E	37,65±4,21	7,44±2,52	99369,07±2453,32
MetS+4°C	28,49±10,51	3,81±1,07	90393,92±1568,72 ^a
MetS+E+4°C	33,92±6,13	7,29±1,02	93473,81±1300,88 ^a

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).

^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења

Вредност GSH-а била је значајно већа у групи здравих пацова која је била чувана на собној температури у односу на контролну групу животиња која је била изложена ниским температурама, али без разлике у активностима SOD-а и CAT-е између ове две групе животиња. Са друге стране, у лизату здравих животиња којима је током четири недеље давана орална суспензија валсартан/сакубитрила и које су биле изложене протоколу хлађења измерена је статистички значајно већа активност SOD-а али значајно нижа активност CAT-е и ниво GSH-а у поређењу са групом животиња која је била чувана на собној температури и третирана истом комбинацијом фармаколошких агенаса (Табела 14).

Излагање ниским температурама животиња са MC-ом довело је до значајно нижих вредности GSH-а у поређењу са вредностима овог антиоксидационог параметра у лизату пацова са MC-ом који су били чувани на собној температури, али без утицаја на активност SOD-а и CAT-е. Исти тренд је примећен и између животиња са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и изложене протоколу хлађења у односу на аналогну групу пацова која је била чувана на собној температури при чему је статистичка значајност примећена у вредностима GSH-а, али без разлика у активностима SOD-а и CAT-е између ових група животиња (Табела 14).

4.5. Ефекат експерименталног протокола на системски ниво адипокина

4.5.1. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију адипонектина

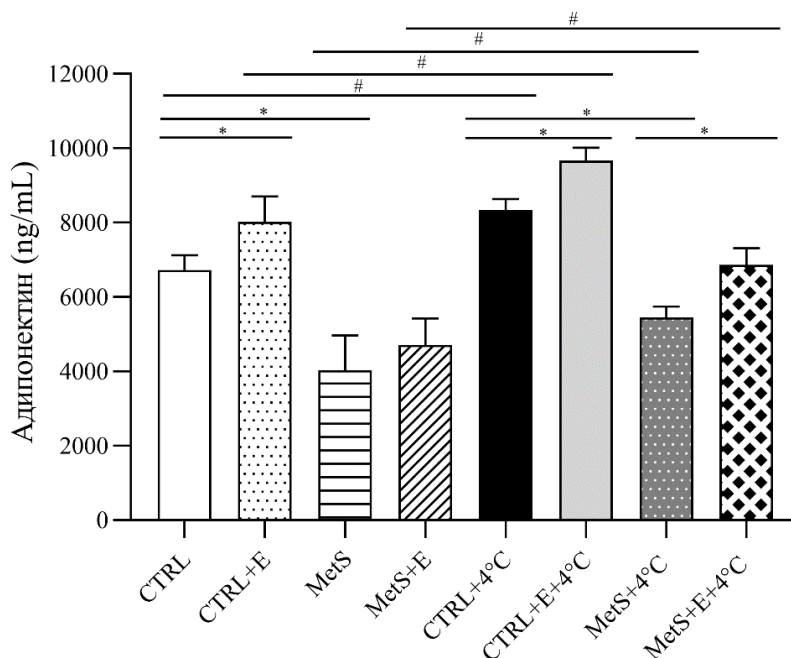


График 11. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на серумски ниво адипонектина. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Ниво адипонектина у серуму животиња са МС-ом је био статистички значајно нижи у односу на вредности које су измерене у серуму аналогних здравих нетретираних животиња, било да су чувани на собној температури или су изложени протоколу хлађења. Са друге стране, субакутна орална примена валсартан/сакубитрила довела је до значајног пораста у нивоу овог адипокина у односу на здраву нетретирану групу животиња у условима оба температурна протокола. Штавише, комбиновани протокол излагања хладноћи и третман валсартан/сакубитрилом повећао је серумски ниво адипонектина у групи животиња са МС-ом у поређењу са нетретираном групом МС животиња која је била изложена само протоколу хлађења. Међутим, статистички значајна разлика није уочена између пацова са МС-ом који су били чувани на собној температури и животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом код којих је индукован МС при истој температури окружења (**График 11**).

Протокол излагања хладноћи утицао је на повећање адипонектина у свим експерименталним групама у односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури, изузев здравих пацова који су били третиран валсартан/сакубитрилом код којих протокол излагања ниским температурама није утицао на пораст адипонектина у односу на здраве животиње које су биле подвргнуте истом фармаколошком третману и чуване на собној температури (**График 11**).

4.5.2. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију лептина

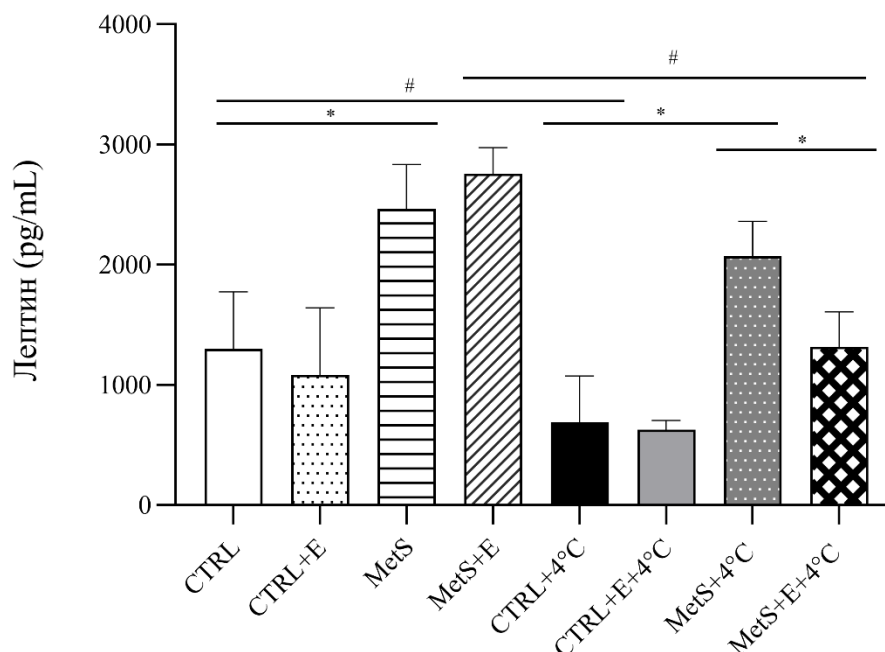


График 12. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на серумски ниво лептина. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција МС-а значајно је повећала серумски ниво лептина у односу на здраву контролну групу животиња које су биле чуване на собној температури током трајања студије. Са друге стране, фармаколошки третман није успео да смањи циркулишући ниво лептина како здравих тако и животиња код којих је индукован МС у поређењу са аналогним нетретираним групама пацова које су биле чуване на собној температури. Међутим, здрава контролна група животиња имала је значајно ниже вредности лептина након протокола излагања хладноћи у односу на групу пацова са МС-ом која је била чувана на истој температури. Такође, комбиновани третман валсартан/сакубитрилом и излагање протоколу хлађења значајно је смањио вредности лептина у серуму животиња са МС-ом у односу на групу пацова код којих је индукован МС и која је била чувана на ниским температурама. Са друге стране, овај комбиновани протокол који је примењен на здравим животињама није довео до статистички значајних разлика у вредностима лептина у односу на здраву групу животиња која је била изложена хлађењу без фармаколошког третмана (График 12).

Ефекат излагања ниским температурама окружења на циркулишући ниво лептина уочен је у групи здравих животиња које су имале статистички значајно ниже вредности овог адипокина у односу на контролну групу здравих животиња која је била чувана на собној температури. Смањење у серумској концентрацији лептина уочен је и у групи животиња са МС-ом која је била третирана валсартан/сакубитрилом и изложена протоколу хлађења у односу на ниво лептина у серуму пацова са МС-ом код којих је примењена иста фармаколошка терапија али без ефекта хлађења. Међутим, утицај

температурног окружења на серумски ниво лептина у осталим групама експерименталних животиња није уочен у поређењу са концентрацијама измереним у серуму аналогних група животиња које су биле чуване на собним температурама (График 12).

4.5.3. Утицај фармаколошког третмана и температурног окружења на секрецију грелина

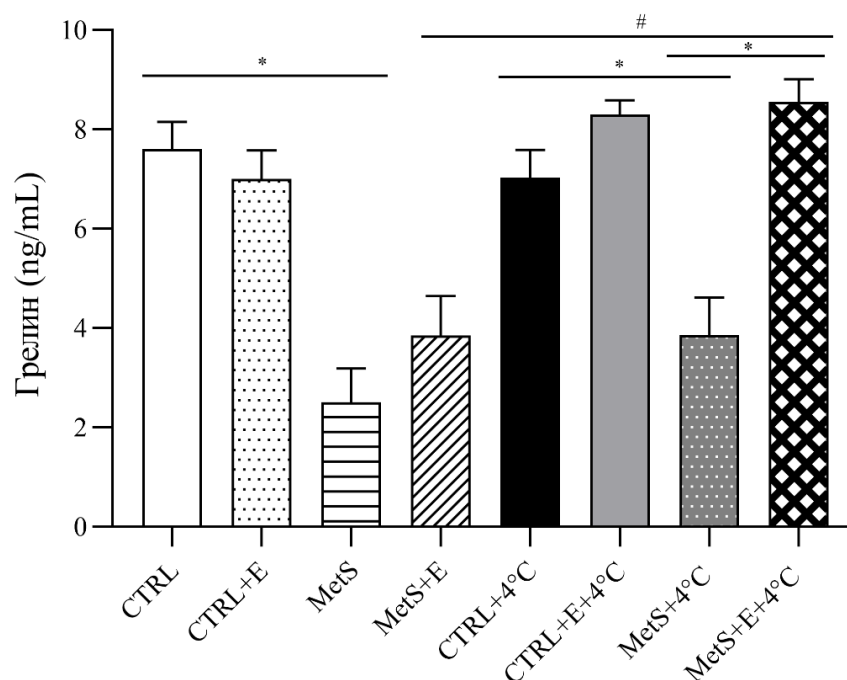


График 13. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на серумски ниво грелина. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

У узорцима серума животиња које су биле чуване на собној температури и код којих је индукован МС измерене су значајно ниже вредности грелина у односу на вредности које су измерене у серуму здравих нетретираних животиња. Међутим, четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом није довео до повећања нивоа грелина у серуму како здравих тако ни животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури у поређењу са аналогном групом нетретираних животиња. Иако протокол хлађења животиња са МС-ом није био ефикасан да повећа ниво грелина до вредности измерених у серуму здравих фармаколошки нетретираних пацова који су били изложени ниским температурама, комбиновани протокол хлађења и примене валсартан/сакубитрила код животиња са МС-ом значајно је повећао концентрацију грелина у односу на измерен ниво у серуму животиња из MetS+4°C групе. Са друге стране, комбинација ова два фармаколошка агенса уз протокол хлађења здравих животиња није утицао на вредност грелина у односу на ниво који је детектован у серуму здравих пацова које су биле изложене само протоколу хлађења (График 13).

Утицај температурне разлике на серумске концентрације грелина није уочен између аналогних група животиња, при чему је само примена валсартан/сакубитрила код

пацова са индукованим МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења узроковала статистички значајно већу серумску концентрацију грелина у односу на пацове са МС-ом који су били чувани на собној температури и третирани истим фармаколошким агенсима (График 13).

4.6. Утицај експерименталног протокола на ниво пуринских нуклеотида

4.6.1. Ефекат фармаколошког третмана и температурног окружења на ниво cGMP-a

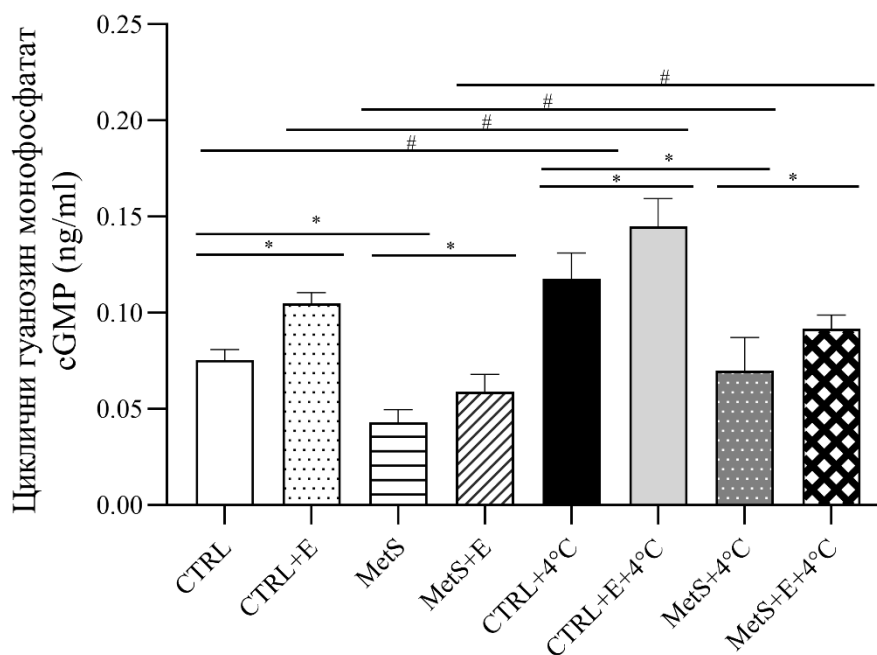


График 14. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на серумски ниво цикличног гуанозин монофосфата. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Концентрација cGMP-a била је значајно нижа у групи животиња са МС-ом у односу на здраву нетретирану групу пацова при оба температурна протокола. Међутим, субакутна примена валсартан/сакубитрила повећала је ниво испитиваног параметра у серуму здравих и животиња са МС у поређењу са аналогним контролним групама при оба температурна протокола (График 14).

Статистички значајно веће концентрације cGMP-a измерене су у свим групама животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења у односу на концентрације овог молекула измерених у серумима аналогних група животиња које су биле чуване на собној температури (График 14).

4.6.2. Ефекат фармаколошког третмана и температурног окружења на ниво АТР-а

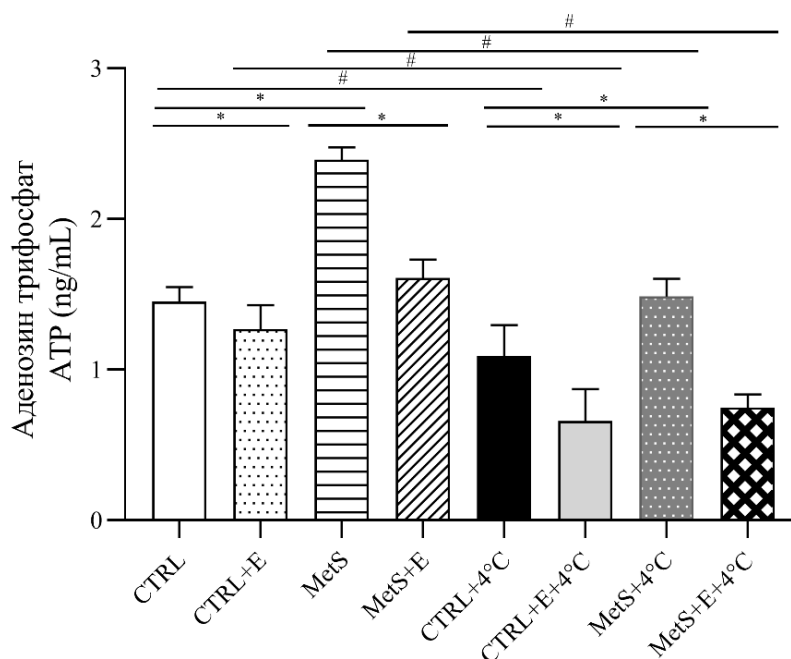


График 15. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на ниво аденозин трифосфата у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Ниво АТР-а био је изразитије нижи у sWAT-у здравих животиња у поређењу са аналогним групама пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури. Штавише, орална администрација валсартан/сакубитрила смањила је концентрацију АТР-а како у sWAT-у здравих животиња тако и у ткиву животиња са МС-ом у поређењу са аналогним контролним групама које су биле чуване на собној температури. Поред тога, концентрација АТР-а била је статистички нижа у групи здравих нетретираних животиња која је била изложена протоколу хлађења у поређењу са групом животиња код којих је индукован МС и које су боравиле на ниским температурама у току експерименталног периода. Истовремени протокол хлађења и примена валсартан/сакубитрила довела је до значајног смањења у нивоу АТР-а у sWAT-у здравих као и животиња са МС-ом у поређењу са концентрацијом овог молекула која је измерена у аналогним нетретираним групама које су биле подвргнуте само протоколу хлађења (График 15).

Протокол излагања ниским температурама смањивао је ниво АТР-а у sWAT-у свих животиња у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури (График 15).

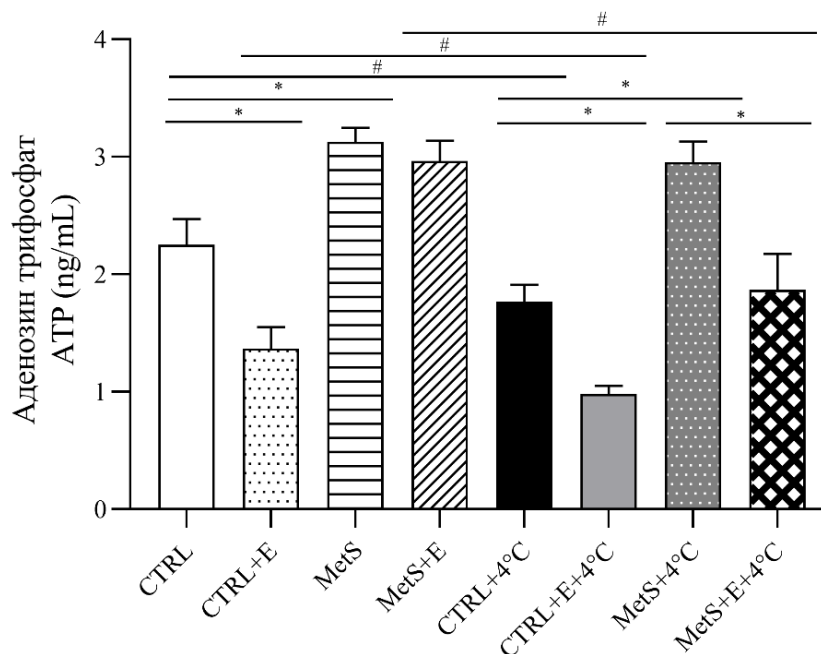


График 16. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на ниво аденозин трифосфата у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Концентрација АТР-а у гWAT-у животиња са МС-ом била је, као и у претходним анализираним масним ткивима, значајно виша у поређењу са здравом нетретираном групом животиња која је била чувана на собној температури или изложена протоколу хлађења. Међутим, примена валсартан/сакубитрила је значајно смањила концентрацију АТР-а у гWAT-у здравих животиња у односу на здраву контролну групу пацова при оба примењена температурна протокола. Са друге стране, третман валсартан/сакубитрилом није значајно смањив ниво АТР-а у гWAT-у животиња са МС при собној температури у односу на аналогну контролну групу пацова са МС, међутим уз истовремено примењен протокол хлађења довео је до смањења нивоа АТР-а у гWAT-у животиња са МС-ом (График 16).

Протокол хлађења значајно је смањив ниво АТР-а у гWAT-у свих група животиња у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури, изузев контролне групе пацова са МС где није утицао на вредност испитиваног маркера у односу на аналогну групу животиња које су биле чуване на собној температури (График 16).

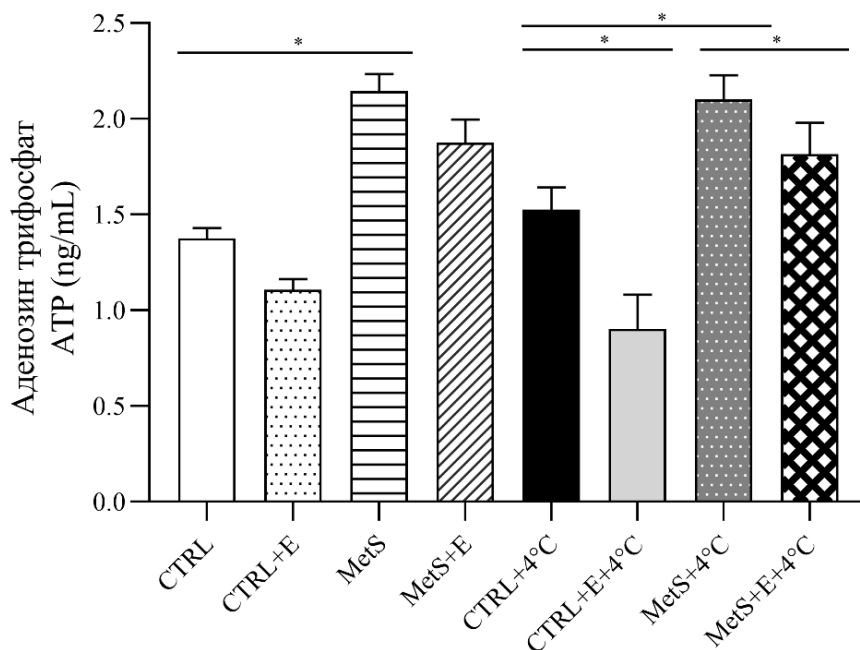


График 17. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на ниво аденозин трифосфата у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

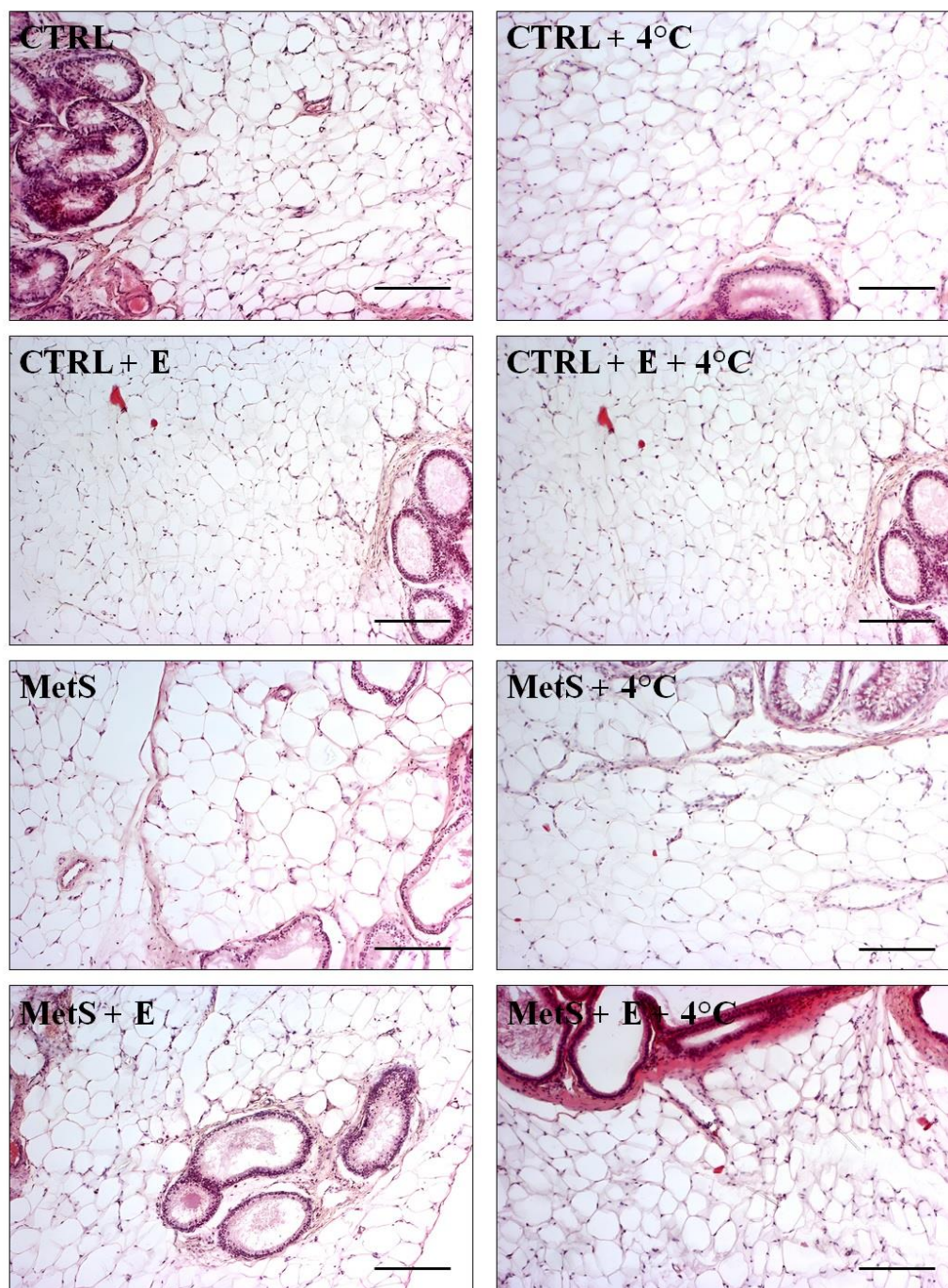
У групи здравих нетретираних животиња измерена је значајно нижа концентрација АТР-а у еWAT-у ових животиња у поређењу са групом пацова код којих је индукован МС и које су биле чуване на собној температури. Међутим, четворонедељни третман здравих али и животиња са МС-ом, оралном суспензијом валсартан/сакубитрила које су биле чуване на собној температури, није довео до значајног смањења нивоа АТР-а у еWAT-у у поређењу са концентрацијом овог молекула измереном у ткиву аналогних нетретираних животиња. Такође, ниво АТР-а био је статистички значајно виши у еWAT-у пацова са МС-ом који су били изложени протоколу хлађења у поређењу са здравом нетретираном групом животиња која је била изложена истом протоколу. Са друге стране, примена фармаколошких агенаса смањила је ниво АТР-а у ткиву животиња са МС-ом као и код здравих пацова у поређењу са аналогном групом фармаколошки-нетретираних пацова које су биле изложене протоколу хлађења (График 17).

Протокол излагања ниским температурама није утицао на промене у концентрацији АТР-а у еWAT-у животиња из свих експерименталних група у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури (График 17).

4.7. Утицај примењеног третмана на патохистолошке карактеристике масног ткива

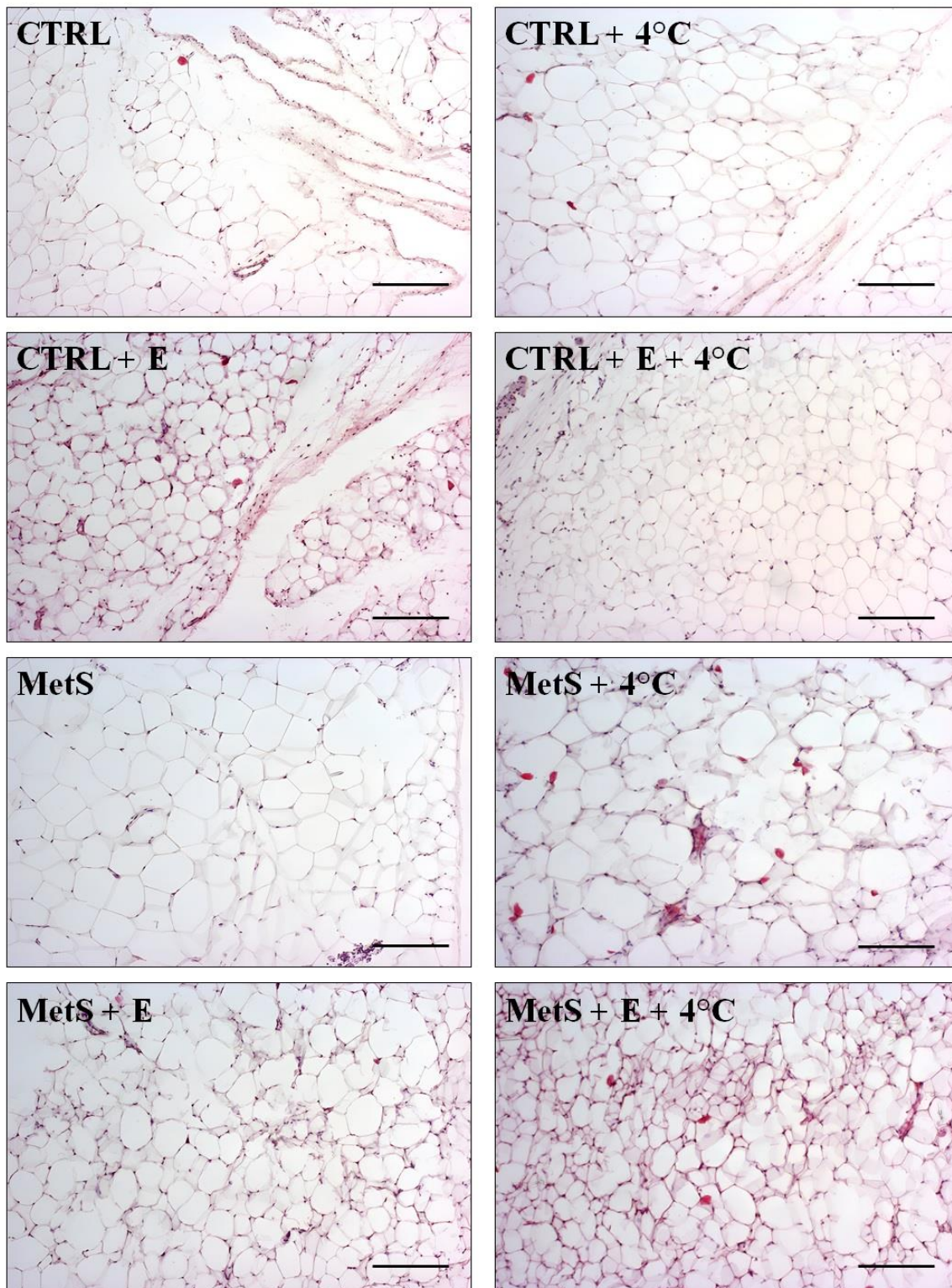
4.7.1. Ефекат експерименталног протокола на структуру масног ткива - Н/Е бојење

На Слици 31 се може јасно уочити значајно већи дијаметар липидних капљица sWAT-а у групи животиња код којих је индукован МС у односу на здраву контролну групу. Са друге стране, третман валсартан/сакубитрилом значајно је смањio величину адипоцита док је уз истовремено излагање протоколу хлађења овај фармаколошки третман индуковао најизразитију мултилокуларну грађу.



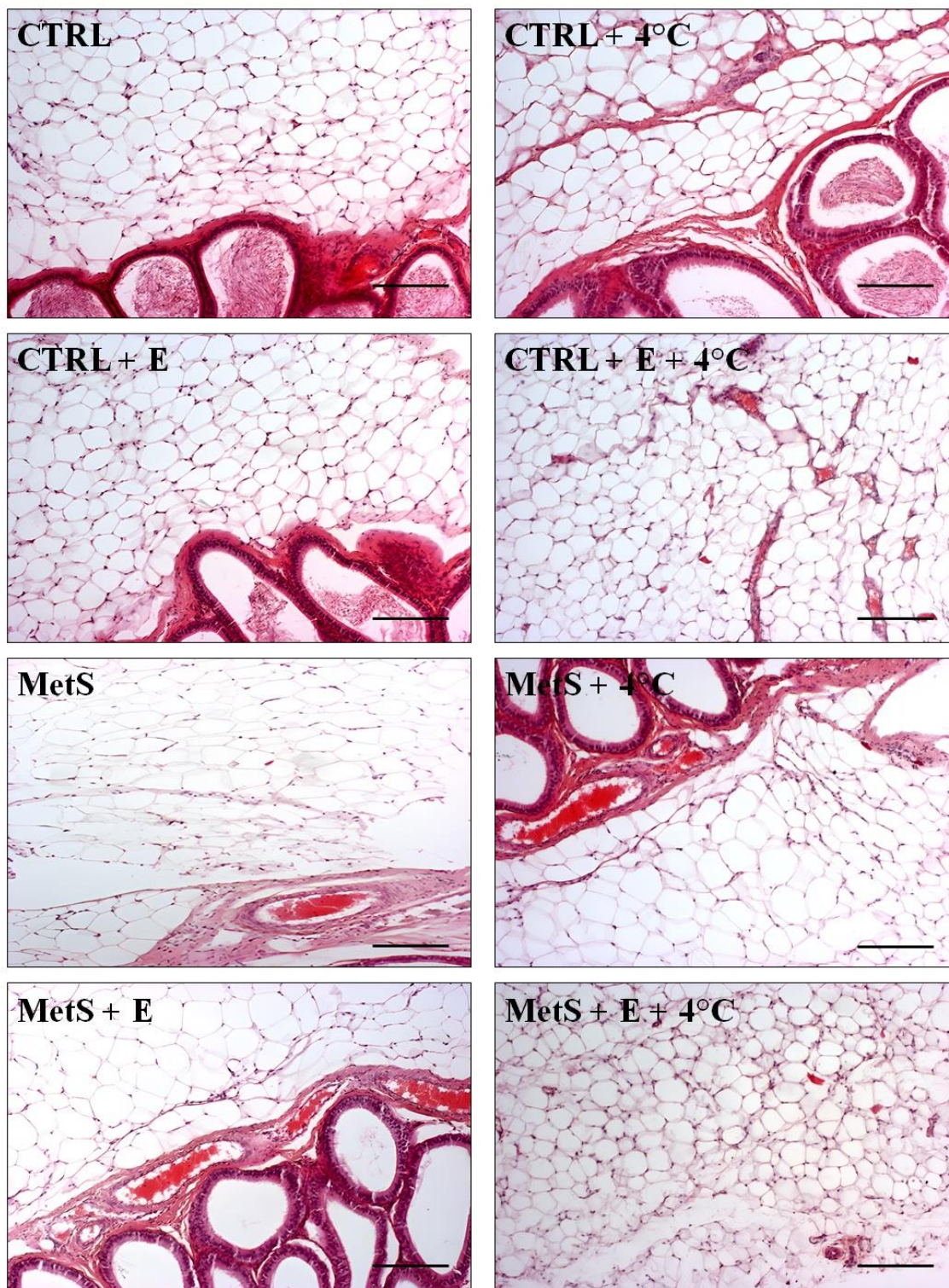
Слика 31. Репрезентативне слике обојеног субкутаног масног ткива Н/Е техником бојења. Увећање 200 x; скала 5 mm.

На **Слици 32** се уочава унилокуларна морфолошка грађа адипоцита rWAT-а у групи пацова код којих је индукован МС, при чему је излагање ових животиња ниским температурама значајно смањило величину липидних капљица. Штавише, протокол хлађења уз истовремени третман валсартан/сакубитилом животиња са МС-ом условио је значајно смањење адипоцита и појаву густо спакованих митохондрија у масним ћелијама rWAT-а.



Слика 32. Репрезентативне слике обојеног ретроперитонеалног масног ткива Н/Е техником бојења. Увећање 200 х; скала 5 mm.

Утицај фармаколошког третмана и излагања хладноћи на морфолошку грађу адипоцита еWAT-а приказан је на **Слици 33**. Значајно мањи дијаметар липидних капљица као и карактеристична мутилокуларна морфологија постигнута је у групама животиња које су биле изложене протоколу хлађења у односу на животиње које су боравиле на собној температури. Међутим, снажан утицај на смањење адипоцита уочен је и након примене валсартан/сакубитрила у односу на нетретиране групе животиња при оба температурна протокола.



Слика 33. Репрезентативне слике обојеног епидидималног масног ткива Н/Е техником бојења. Увећање 200 х; скала 5 mm.

4.7.2. Ефекат експерименталног протокола на проценат густине и површине адипоцита

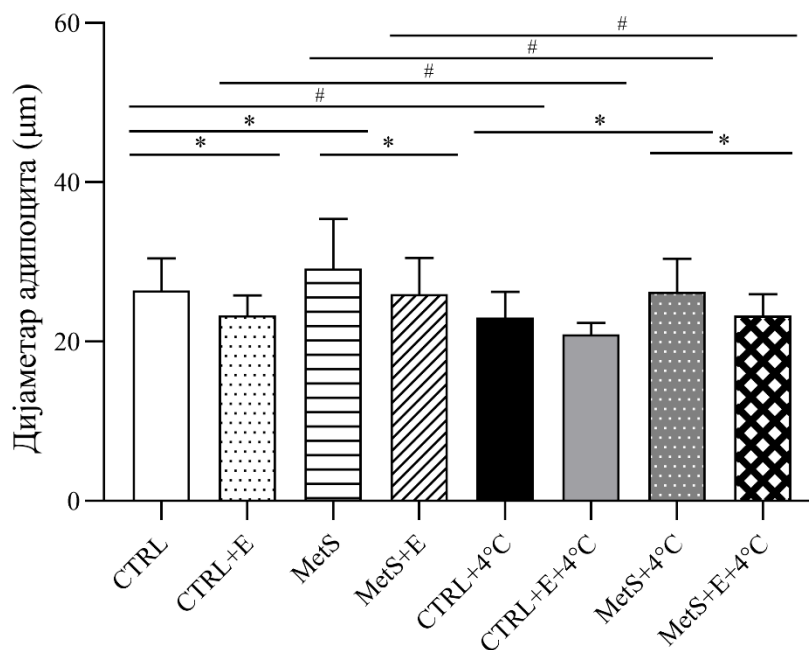


График 18. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на просечан дијаметар адипоцита субкутаног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Дијаметар адипоцита sWAT-а у групи животиња код којих је индукован МС при оба температурна протокола био је значајно већи у односу на здраве нетретиране животиње. Међутим, четворонедељни третман здравих као и пацова са МС-ом оралном суспензијом валсартан/сакубитрила значајно је смањио дијаметар адипоцита у односу на аналогну контролну групу животиња. Уз истовремено излагање хладноћи овај фармаколошки приступ значајно је смањио величину адипоцита животиња са МС-ом али без значајне разлике код здравих животиња које су биле подвргнуте истом протоколу у односу на аналогну контролну групу пацова (**График 18**).

Излагање ниским температурама значајно је смањио дијаметар адипоцита sWAT-а у свим групама односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури (**График 18**).

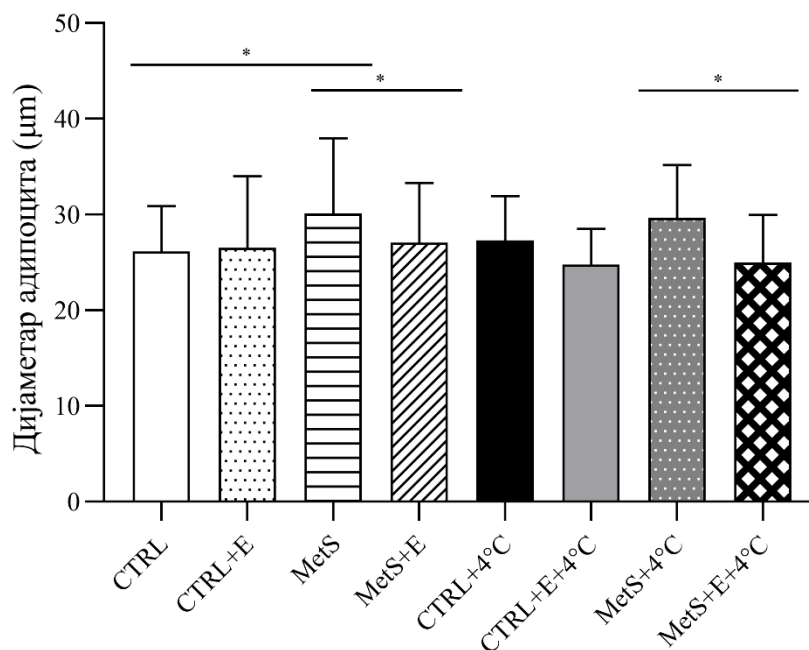


График 19. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на просечан дијаметар адипоцита ретроперитонеалног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

У контролној групи пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури примећен је значајно већи дијаметар адипоцита rWAT-а у односу на здраву контролну групу животиња. Третман валсартан/сакубитрилом животиња код којих је индукован МС значајно је смањио дијаметар ових ћелија у односу на нетретирану контролну групу пацова при оба температурна протокола. Између осталих група није уочена статистички значајна разлика у вредностима испитиваног параметра (График 19).

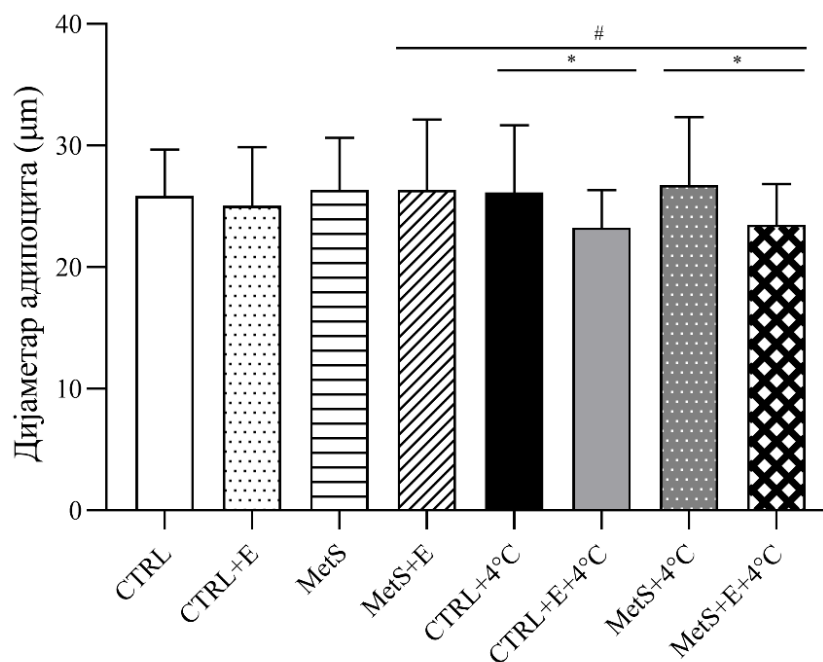


График 20. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на просечан дијаметар адипоцита епидидималног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Анализом дијаметра адипоцита eWAT-а није примећена статистички значајна разлика између аналогних група које су биле чуване на собној температури. Међутим, истовремено излагање хладноћи и примена валсартан/сакубитрила значајно је смањило дијаметар адипоцита eWAT-а здравих као и пацова са МС-ом у односу на аналогне контролне групе животиња (**График 19**).

Утицај хладноће на дијаметар адипоцита eWAT-а једино је примећен у групи животиња са МС-ом које су истовремено биле третиране валсартан/сакубитрилом, док код осталих група третман хлађења није значајно утицао на вредност овог параметра (**График 19**).

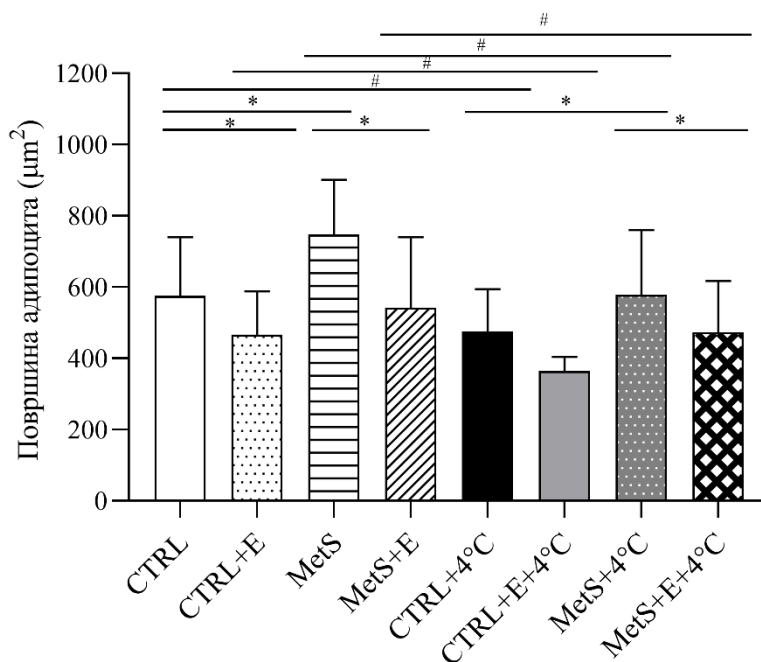


График 21. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на површину адипоцита субкутаног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Површина адипоцита sWAT-а код животиња са МС-ом била је значајно већа при оба температурна протокола у односу на здраву контролну групу пацова. Међутим, третман валсартан/сакубитрилом здравих и животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури значајно је смањив површину ових масних ћелија у односу на аналогне контролне групе пацова. Са друге стране, примена ове фиксне фармаколошке терапије уз излагање хладноћи смањила је површину адипоцита у групи пацова са МС-ом али без значајне разлике у групи здравих животиња које су биле подвргнуте истом експерименталном протоколу (**График 21**).

Протокол излагања ниским температурама смањив је површину адипоцита sWAT-а у свим групама у односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури (**График 21**).

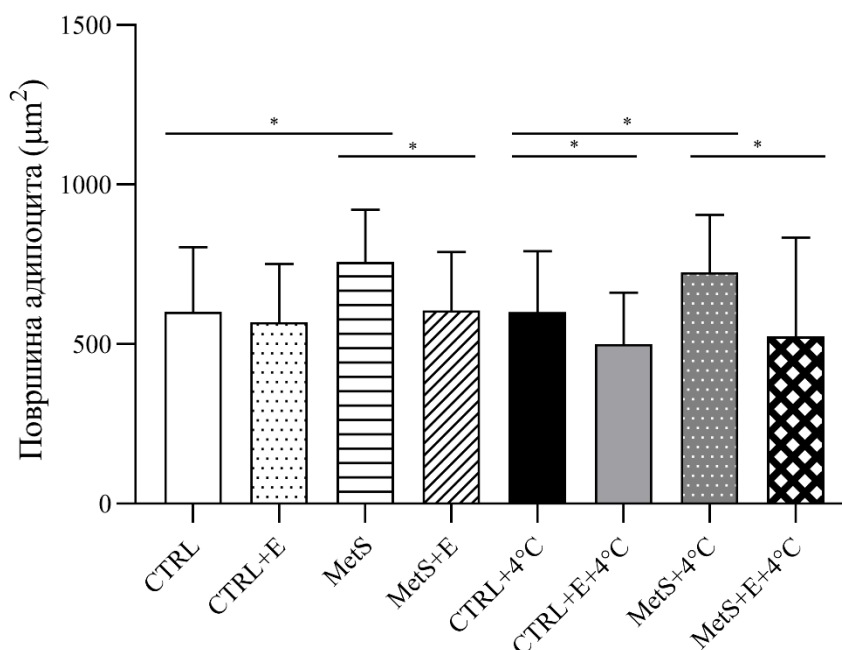


График 22. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на површину адипоцита ретроперитонеалног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Третман валсартан/сакубитрилом животиња са МС-ом условио је значајно смањење површине адипоцита гWAT-а при оба температурна протокола у односу на нетретирану групу пацова са МС-ом. Такође, површина адипоцита гWAT-а здравих пацова које су биле третиране овим фармаколошким агенсима уз истовремено излагање хладноћи била је значајно мања у односу на аналогну контролну групу животиња. Међутим, животиње код којих је индукован МС имале су значајно већу површину адипоцита гWAT-а при оба температурна протокола у односу на аналогну групу здравих пацова (**График 22**).

Протокол излагања ниским температурама није утицао на промене у површини адипоцита гWAT-а у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури (**График 22**).

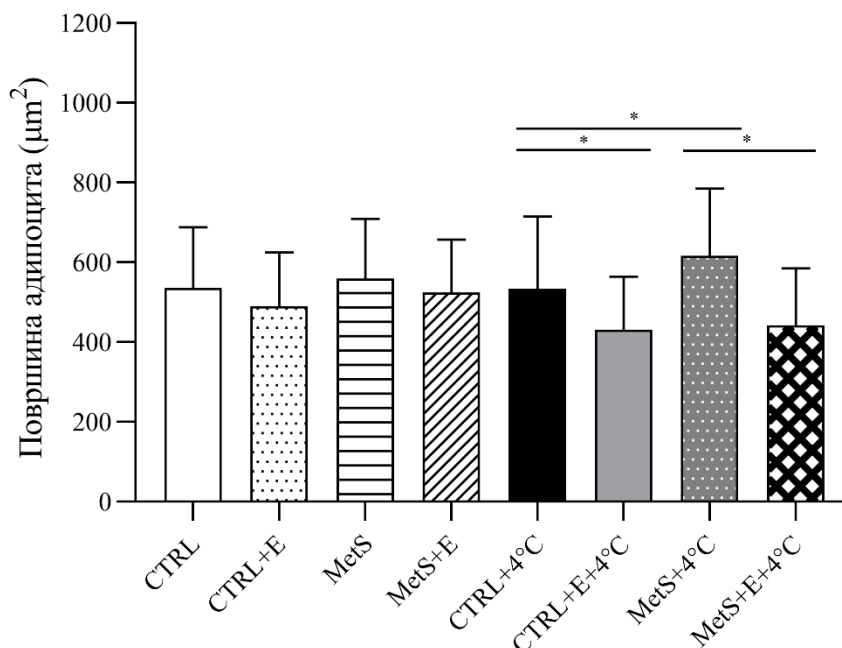


График 23. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на површину адипоцита епидидималног масног ткива. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Једина статистички значајна разлика у површини адипоцита eWAT-а уочена је између здравих и животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури, при чему је и истовремено излагање хладноћи и третман валсартан/сакубитрилом значајно смањило површину ових адипоцита у односу на аналогне контролне групе животиња. Статистички значајне разлике у површини адипоцита eWAT-а нису примећене између осталих група животиња (График 23).

Табела 15. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на густину адипоцита субкутаног, ретроперитонеалног и епидидималног масног ткива.

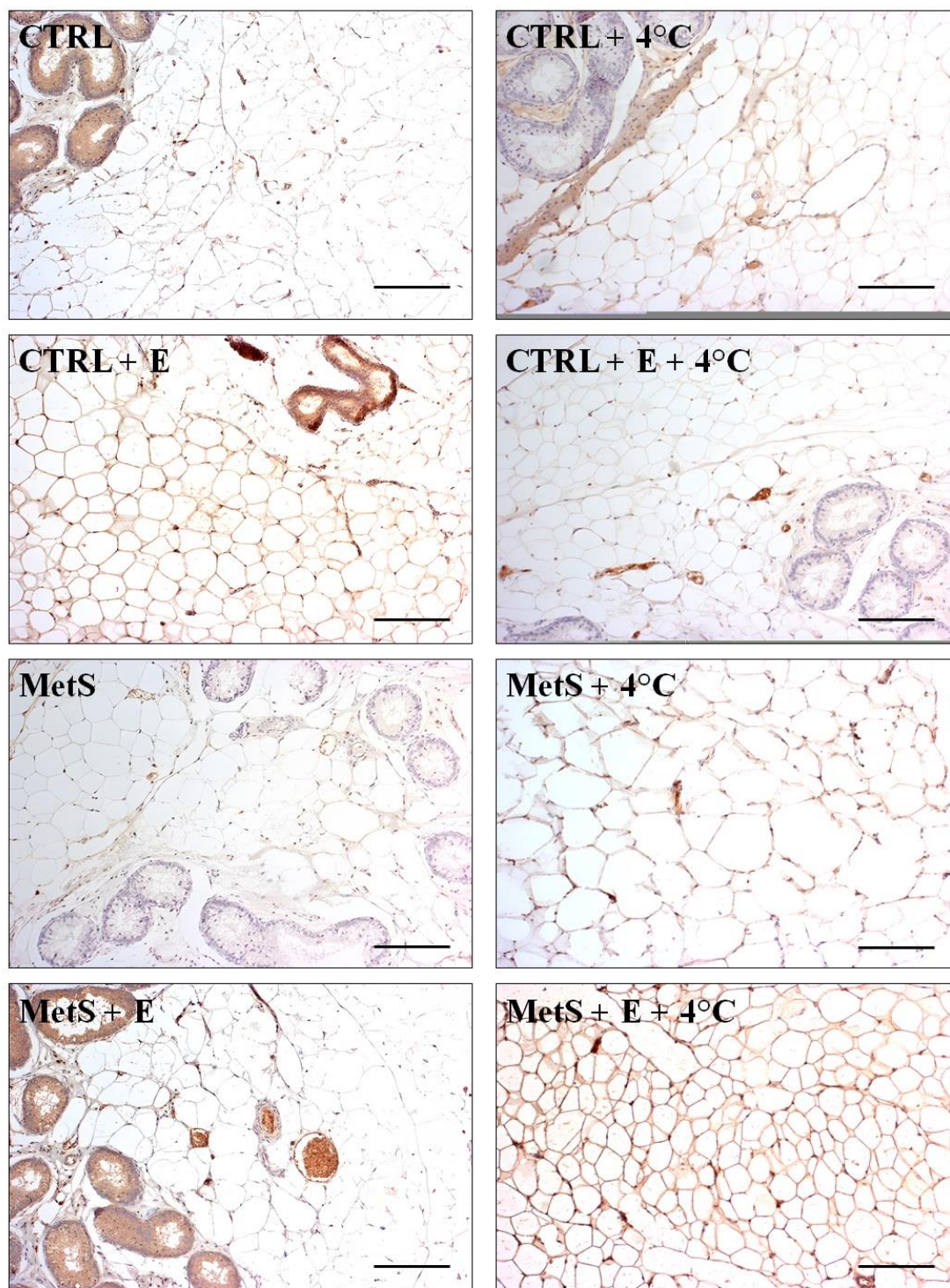
Група	sWAT	rWAT	eWAT
CTRL	$5,12 \cdot 10^{-5}$	$6,24 \cdot 10^{-5}$	$7,15 \cdot 10^{-5}$
CTRL+E	$4,76 \cdot 10^{-5}$	$4,13 \cdot 10^{-5}$	$8,13 \cdot 10^{-5}$
CTRL+4°C	$6,73 \cdot 10^{-5}$	$6,87 \cdot 10^{-5}$	$6,17 \cdot 10^{-5}$
CTRL+E+4°C	$3,85 \cdot 10^{-5}$	$5,59 \cdot 10^{-5}$	$6,07 \cdot 10^{-5a}$
MetS	$6,73 \cdot 10^{-5}$	$8,13 \cdot 10^{-5}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$
MetS+E	$5,39 \cdot 10^{-5}$	$7,64 \cdot 10^{-5}$	$4,59 \cdot 10^{-5}$
MetS+4°C	$5,68 \cdot 10^{-5}$	$6,38 \cdot 10^{-5a}$	$5,18 \cdot 10^{-5}$
MetS+E+4°C	$5,25 \cdot 10^{-5}$	$6,31 \cdot 10^{-5a}$	$5,25 \cdot 10^{-5}$

Вредности су приказане као број адипоцита по површини (μm^2) ^aстатистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Протокол хлађења самостално или уз истовремени третман валсартан/сакубитрилом значајно је смањио густину адипоцита гWAT-а животиња са МС-ом у односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури. Такође, излагање ниским температурама уз примену ове фармаколошке терапије довео је до смањења густине адипоцита еWAT-а здравих животиња у односу на аналогну групу која је била чувана на собној температури. Између осталих група није примећена статистички значајна разлика (**Табела 15**).

4.7.3. Имунохистохемијска детекција UCP-1 молекула у узорцима масног ткива

Као што је приказано на **Слици 34** и **Графику 24** изразито висок степен експресије UCP-1 примећен је у адипоцитима sWAT-а животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом, при чему је најјачи интензитет бојења UCP-1 примећен у групама пацова које су истовремено биле третиране овом комбинацијом лекова уз излагање протоколу хлађења.



Слика 34. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног UCP-1 молекула у узорцима субкутаног масног ткива. Увећање 200 x; скала 5 mm.

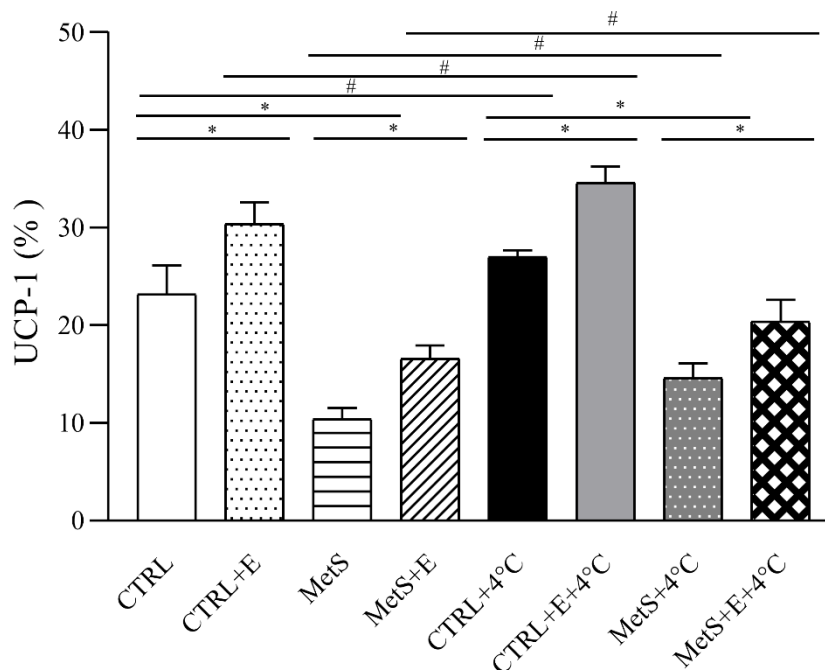
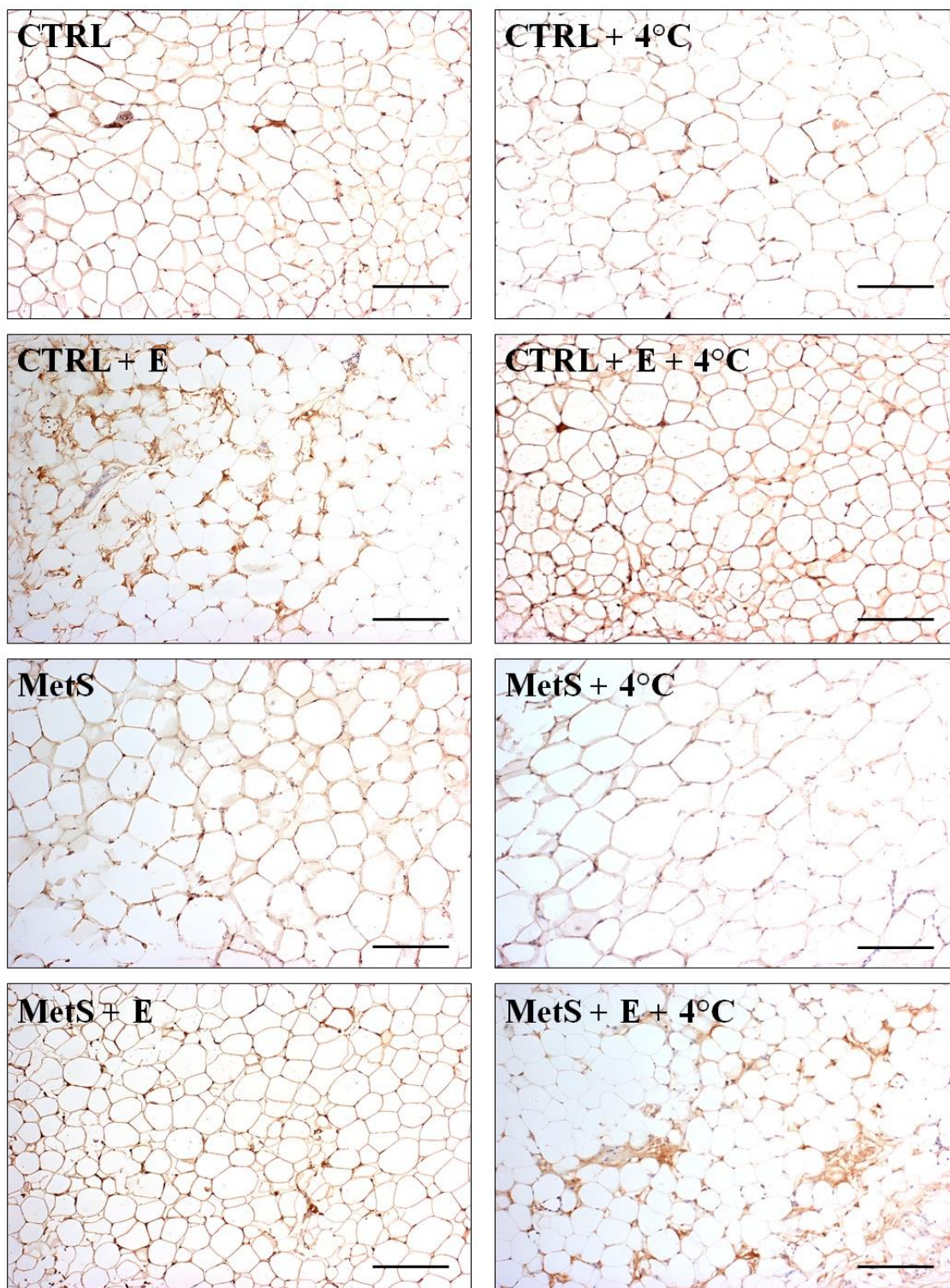


График 24. Квантификација UCP-1 молекула у узорцима субкутаног масног ткива. Вредности су приказане као проценат позитивно обојених ћелија субкутаног масног ткива *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Проценат обојених ћелија UCP-1 антителом био је значајно редукован у sWAT-у животиња са MC-ом при оба температурна протокола у поређењу са здравом контролном групом пацова. Међутим, примењени фармаколошки агенси утицали су на повећање у проценту позитивно обојених ћелија sWAT-а здравих али и животињама са MC-ом, које су биле чуване при собној температури или $+4^{\circ}\text{C}$, у односу на аналогну контролну групу (График 24).

Излагање ниским температурама довело је до повећања у проценту позитивно обојених ћелија sWAT-а UCP-1 антителом у свим групама у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури (График 24).

Третман валсартан/сакубитрилом значајно је појачао интензитет бојења UCP-1 у адипоцитима rWAT-а у односу на аналогну контролну групу животиња која је била чувана на собној температури. На **Слици 35** и **Графику 25** се може уочити изразито већи проценат позитивно обојених ћелија у ткиву животиња које су биле истовремено излагане протоколу хлађења и третману валсартан/сакубитрилом током четири недеље експерименталног протокола у односу на нетретирану групу пацова која је била изложена хладноћи.



Слика 35. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног UCP-1 молекула у узорцима ретроперитонеалног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

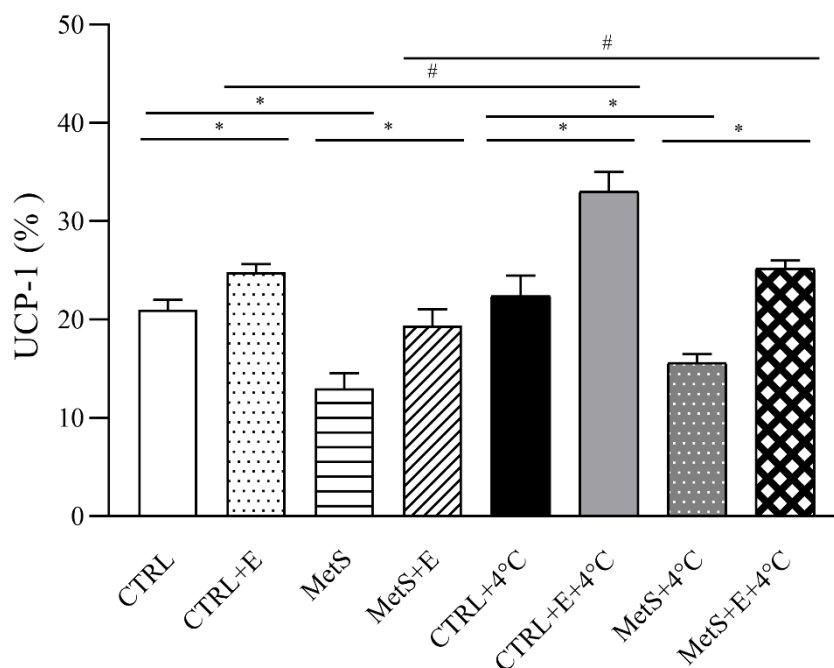
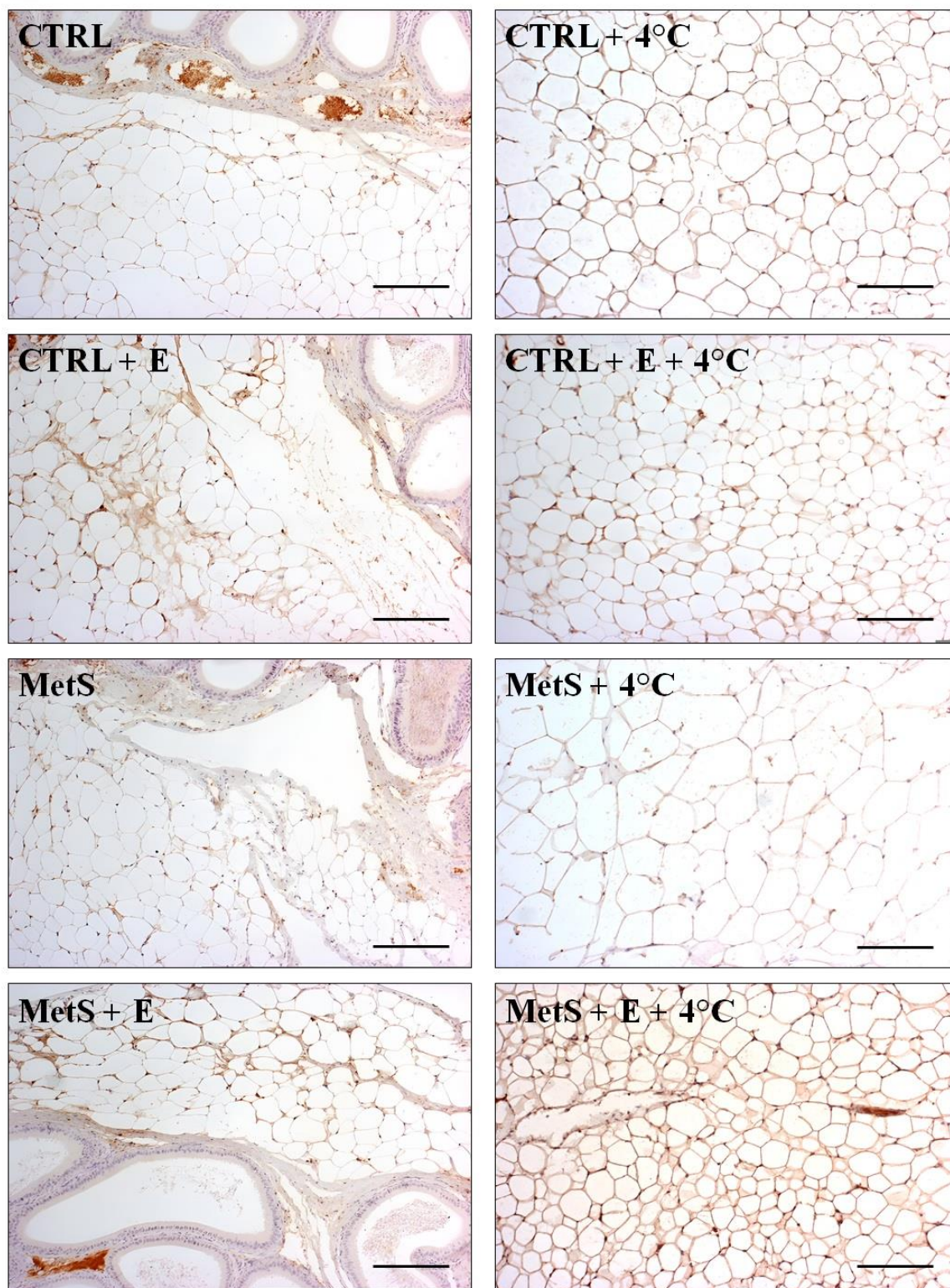


График 25. Квантификација UCP-1 молекула у узорцима ретроперитонеалног масног ткива. Вредности су приказане као проценат позитивно обојених ћелија ретроперитонеалног масног ткива *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Квантификацијом UCP-1 позитивно обојених ћелија rWAT-а примећен је значајан утицај четворонедељног третмана валсартан/сакубитрилом на интензитет бојења овог маркера у ткиву здравих али и животиња са МС-ом при оба температурна протокола (**График 25**).

Протокол излагања хладноћи значајно је повећао проценат UCP-1 ћелија у rWAT-у здравих животиња али и пацова са МС-ом који су били третирану дуалном фармаколошком терапијом у односу на аналогне експерименталне групе животиња које су биле чуване на собној температури (**График 25**).

На Слици 36 и Графику 26 приказан је значајно већи проценат UCP-1 обојених адипоцита eWAT-а у CTRL+E+4°C и MetS+E+4°C групама у односу на аналогне контролне групе пацова изложених само протоколу хлађења. Штавише, третман валсартан/сакубитрилом интензивирао је експресију UCP-1 у eWAT-а здравих пацова.



Слика 36. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног UCP-1 молекула у узорцима епидидималног масног ткива. Увећање 200 x; скала 5 mm.

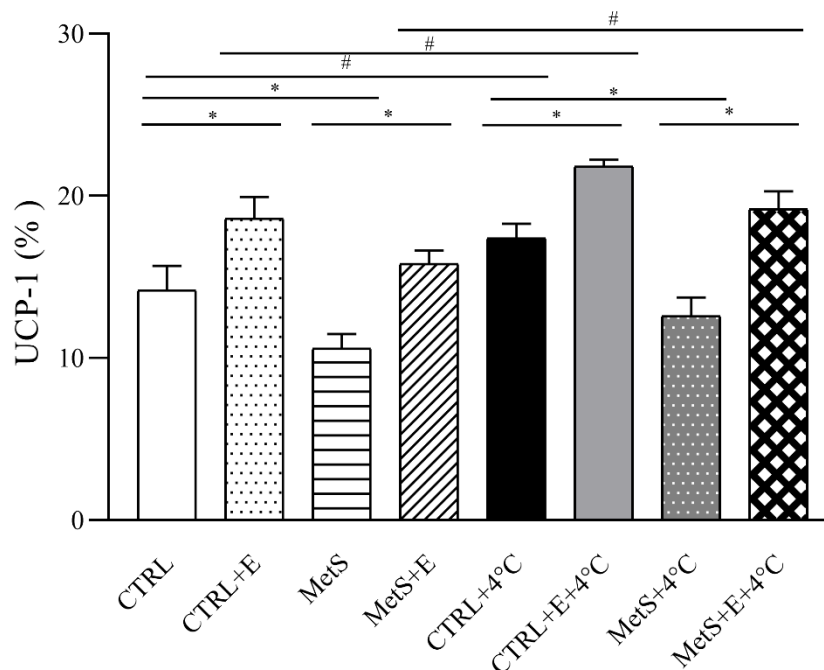


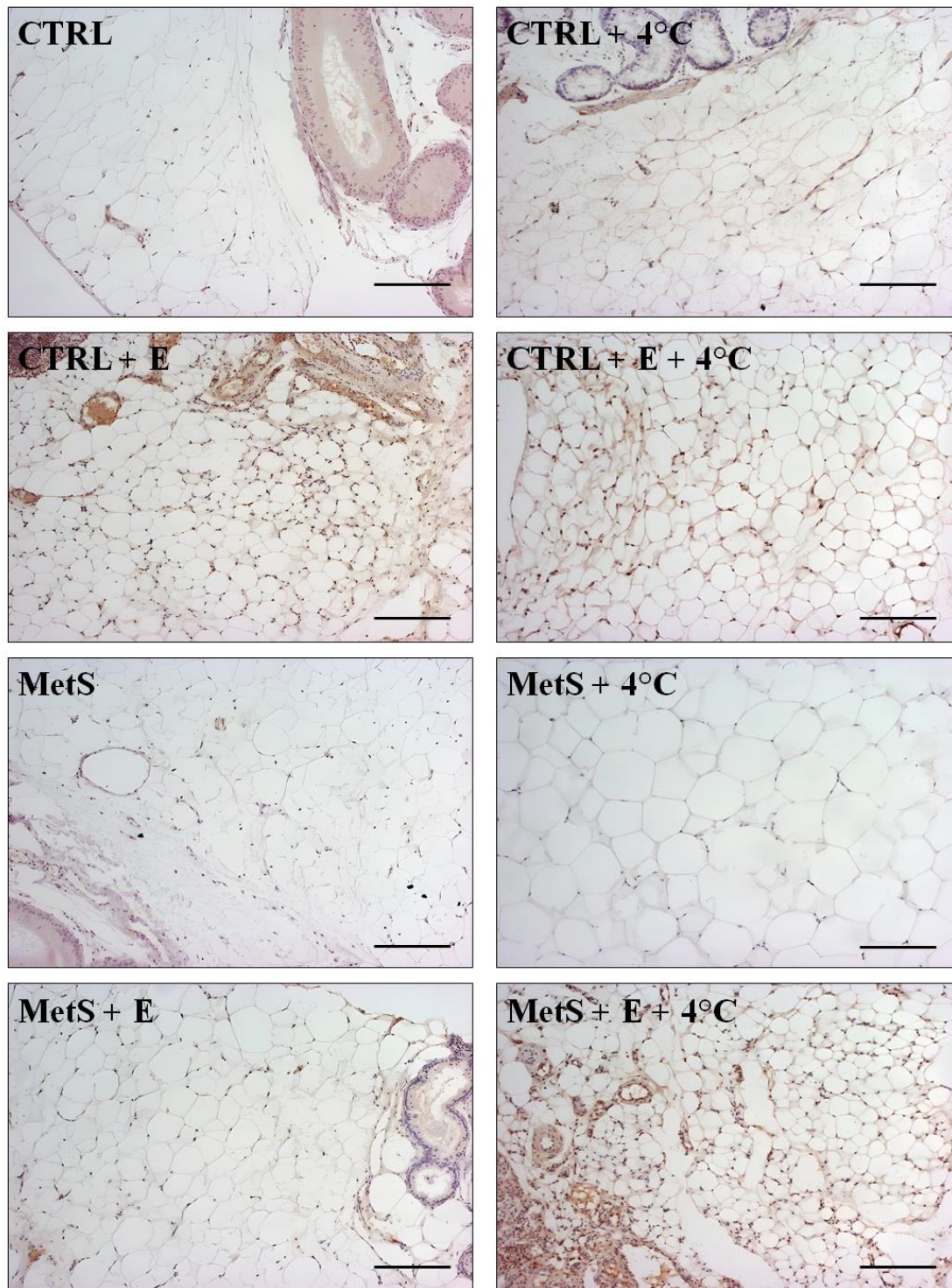
График 26. Квантификација UCP-1 молекула у узорцима епидидималног масног ткива. Вредности су приказане као проценат позитивно обојених ћелија епидидималног масног ткива *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$)

Иако је индукција МС-а значајно смањила проценат UCP-1 позитивних ћелија у депоима eWAT-а, субакутна примена валсартан/сакубитрила значајно је повећала овај маркер у eWAT-у животиња са МС-ом при оба температурна протокола (**График 26**).

Проценат позитивно обојених UCP-1 ћелија био је значајно већи у eWAT-има животиња из CTRL+4°C, CTRL+E+4°C и MetS+E+4°C група у поређењу са аналогним групама пацова који су били чувани на собној температури током експерименталног периода (**График 26**).

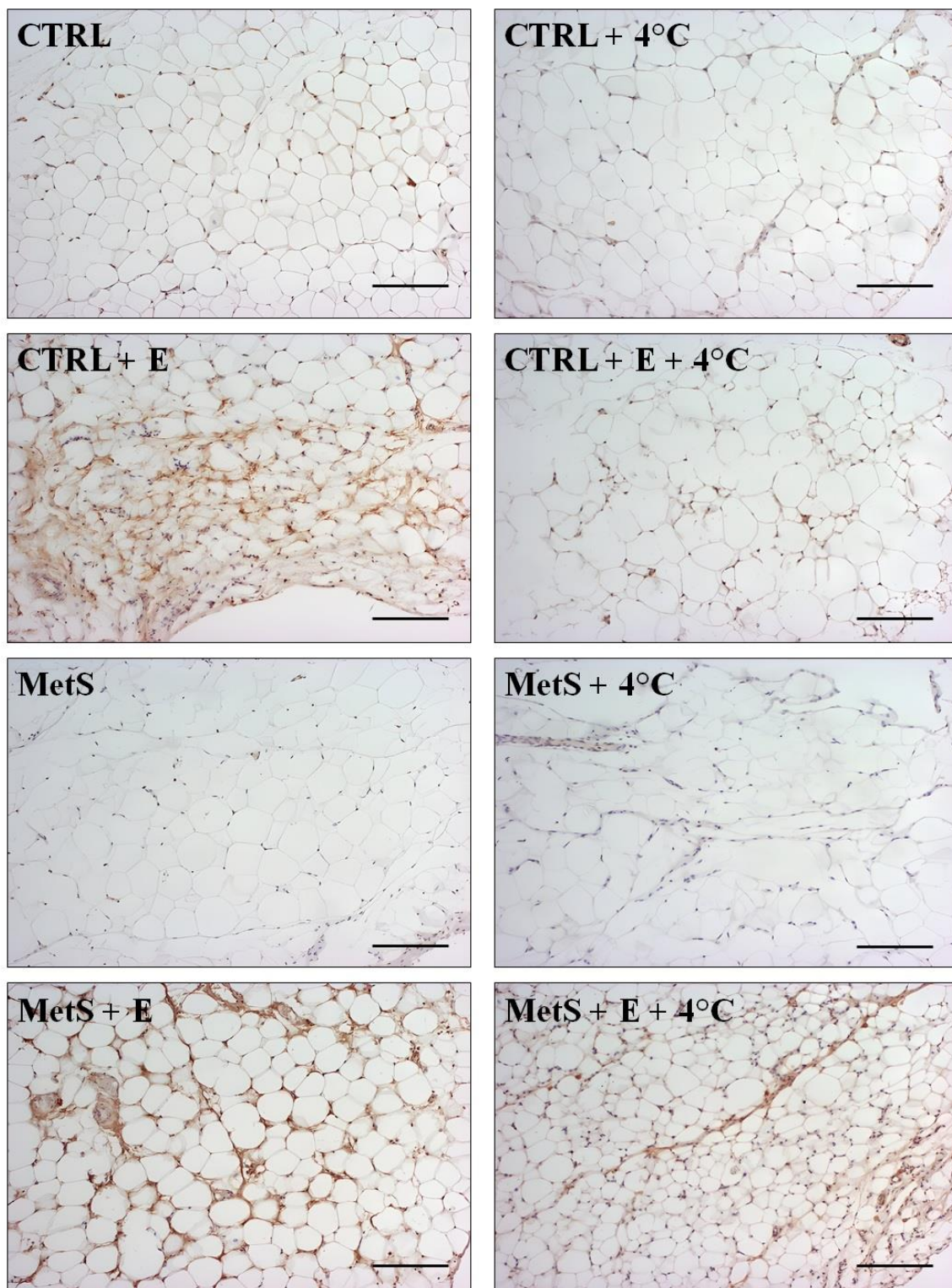
4.7.4. Имунохистохемијска детекција mTOR у узорцима масног ткива

Негативна експресија mTOR уочена је у адипоцитима sWAT-а животиња са MC-ом која је била чувана на собној температури. Међутим, на **Слици 37** се може уочити да протокол хлађења изазива слабу експресију mTOR у MetS+4°C групи док је јак интензитет бојења примећен у адипоцитима животиња из MetS+E+4°C групе.



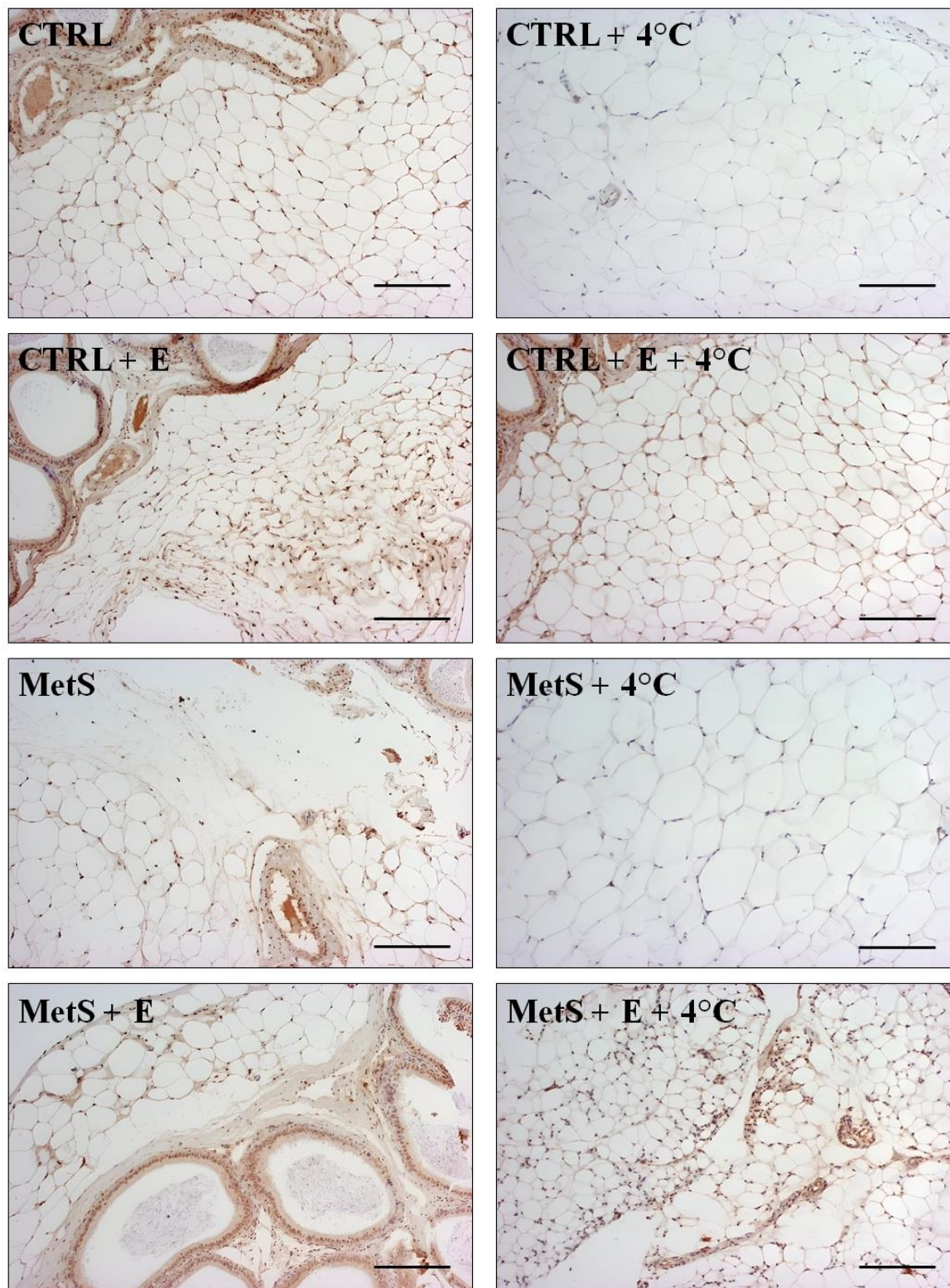
Слика 37. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног mTOR у узорцима субкутаног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

Умерен интензитет mTOR бојења примећен је у адипоцитима гWAT-а након третмана валсартан/сакубитрилом здравих али и животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури. Међутим, најјачи интензитет бојења mTOR примећен је у адипоцитима животиња са МС-ом које су истовремено биле изложене протоколу хлађења и третману валсартан/сакубитрилом, што је и приказано на **Слици 38**.



Слика 38. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног mTOR у узорцима ретроперитонеалног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

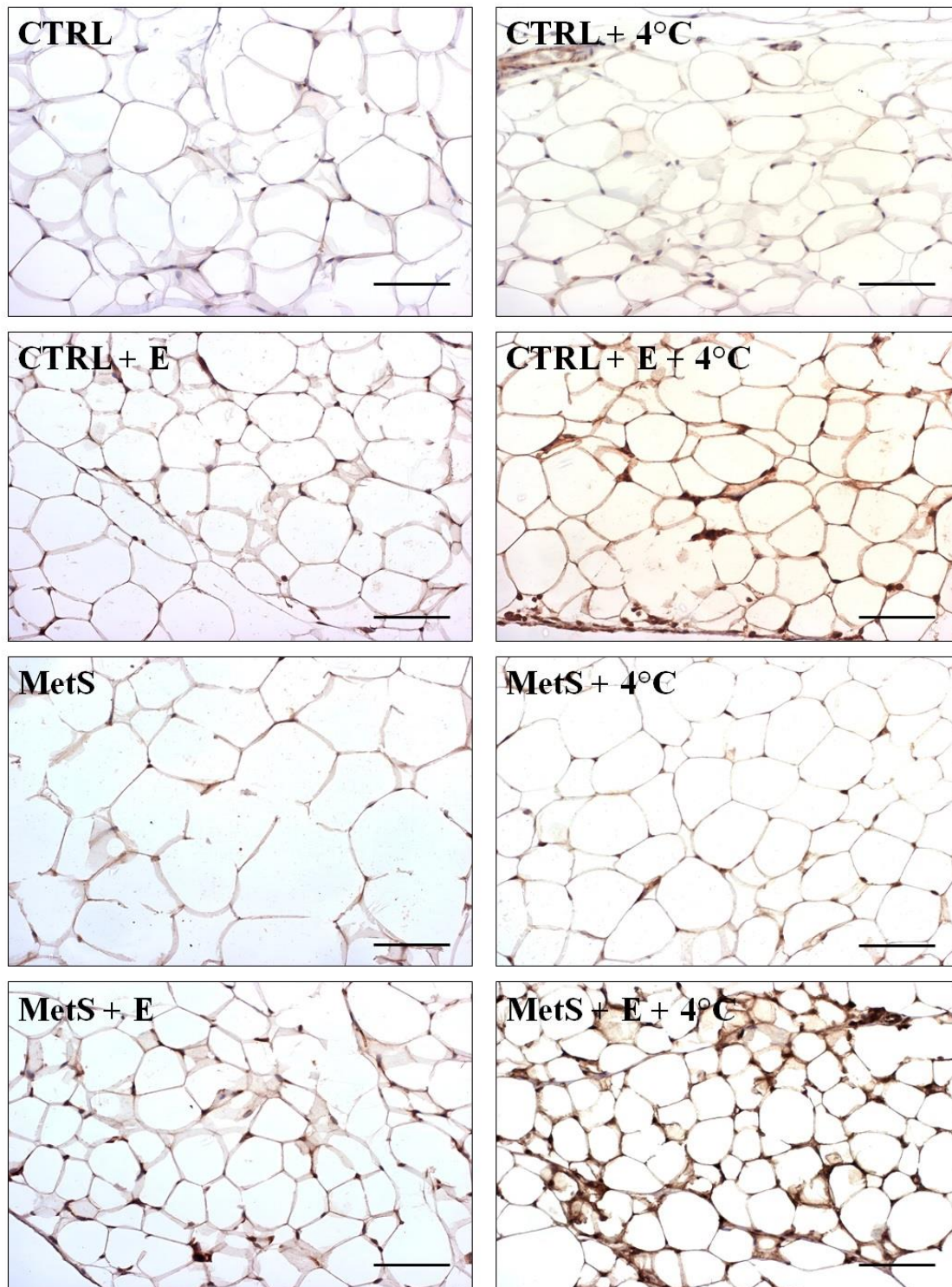
На **Слици 39** уочава се негативно бојење адипоцита еWAT-а mTOR молекулом у групи животиња са MC-ом чуваних на собној температури. Међутим, слаб интензитет бојења примећен је у MetS+4°C групи, умерен у групи здравих пацова истовремено третираних валсартан/сакубитрилом и изложених протоколу хлађења, док је јак интензитет примећен у адипоцитима еWAT животиња из MetS+E+4°C групе.



Слика 39. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног mTOR у узорцима епидидималног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

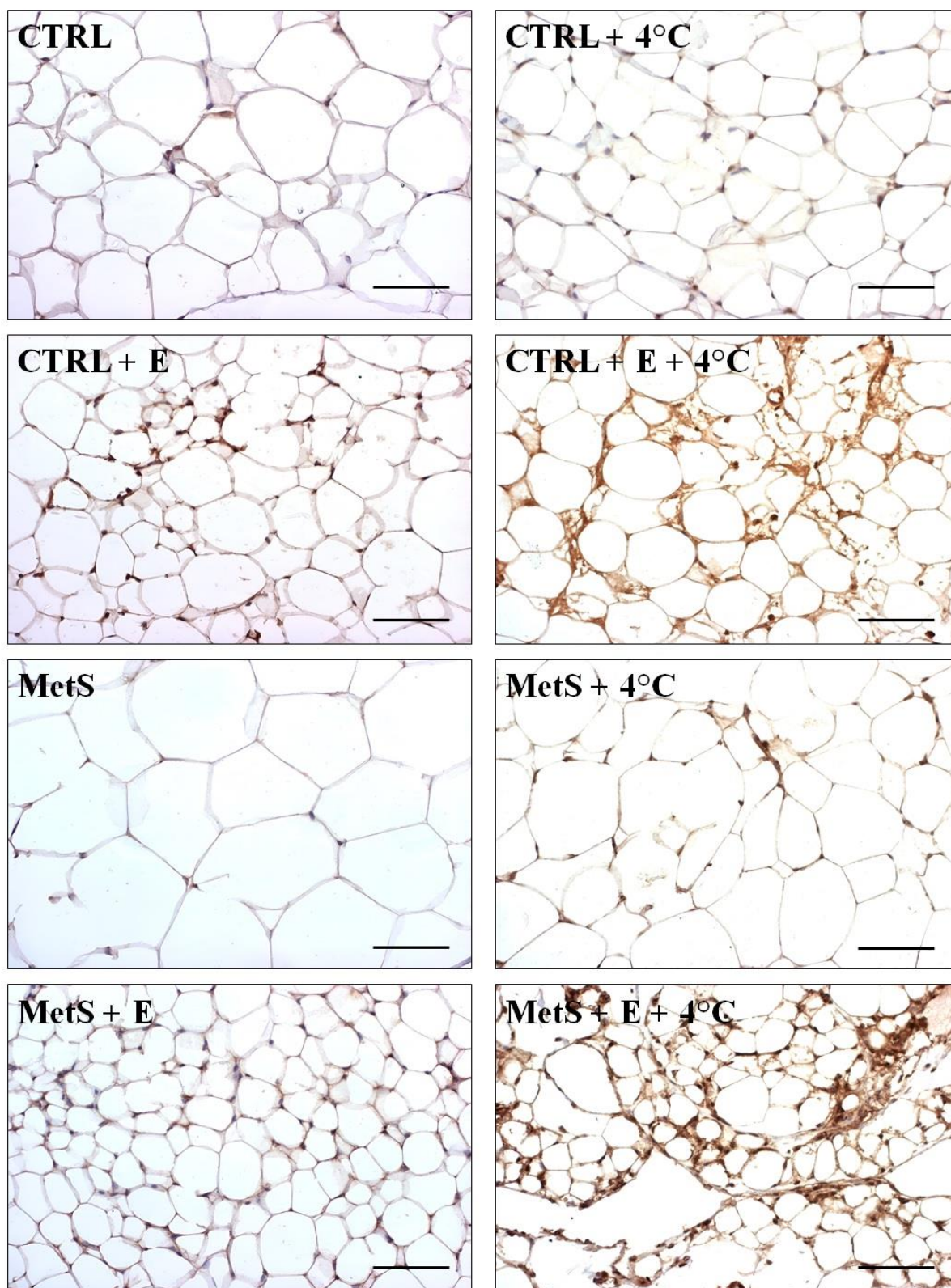
4.7.5. Имунохистохемијска детекција PGC-1 α у узорцима масног ткива

На Слици 40 приказано је негативно бојење PGC-1 α у адипоцитима sWAT-а у групи животиња код којих је индукован MC, али са slabим интензитетом бојења у MetS+4°C групи. Са друге стране, бојење високог интензитета примећено је у групама које су истовремено биле изложене хладноћи и третману валсартан/сакубитрилom.



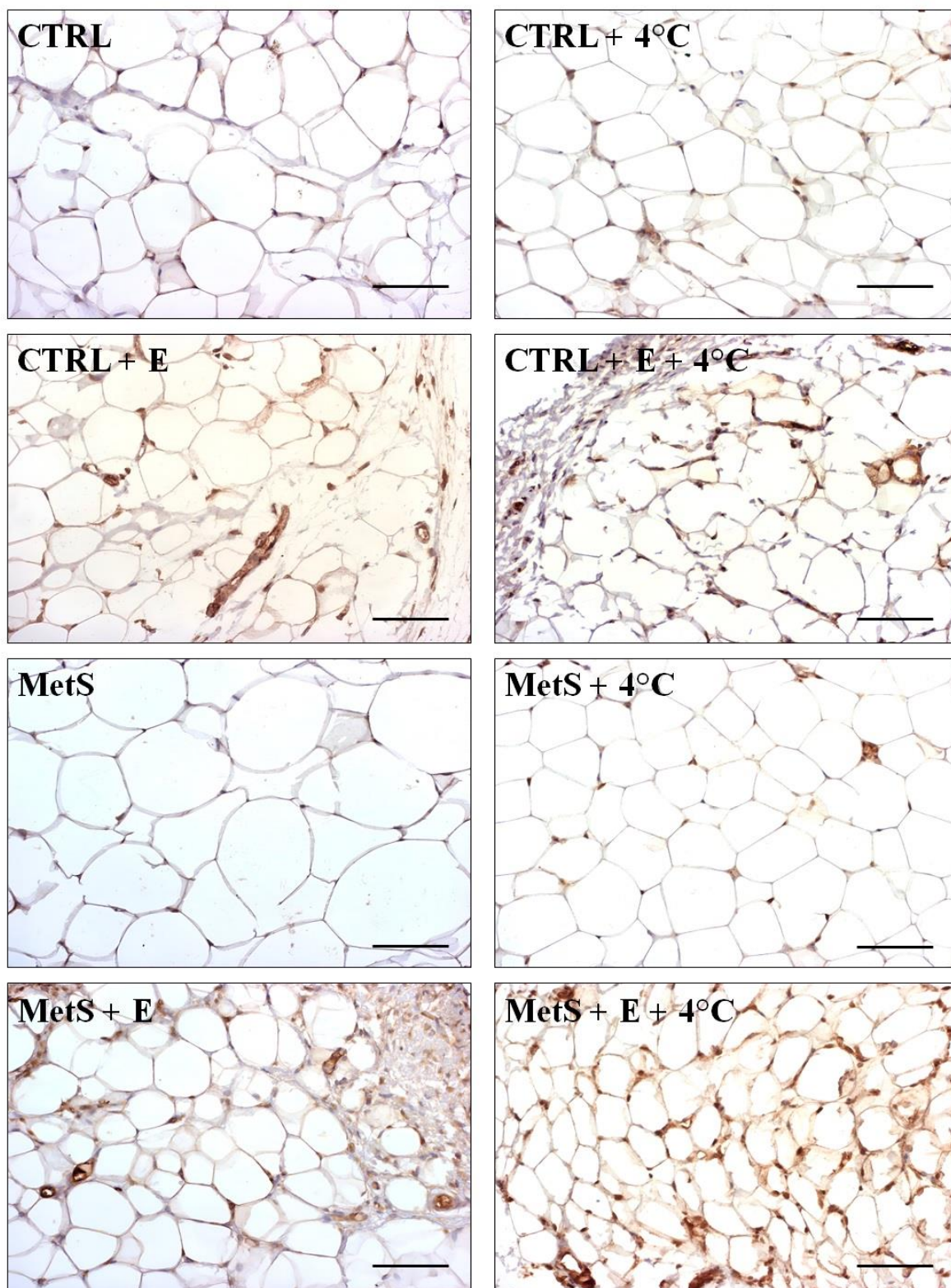
Слика 40. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PGC-1 α у узорцима субкутаног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

Умерен интензитет бојења PGC-1 α у адипоцитима rWAT-а здравих животиња приказан је на **Слици 41**, уз негативно бојење овог маркера у адипоцитима животиња код којих је индукован MC. Са друге стране, виосок интензитет PGC-1 α бојења примећен је у CTRL+E+4°C и MetS+E+4°C групама.



Слика 41. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PGC-1 α у узорцима ретроперитонеалног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

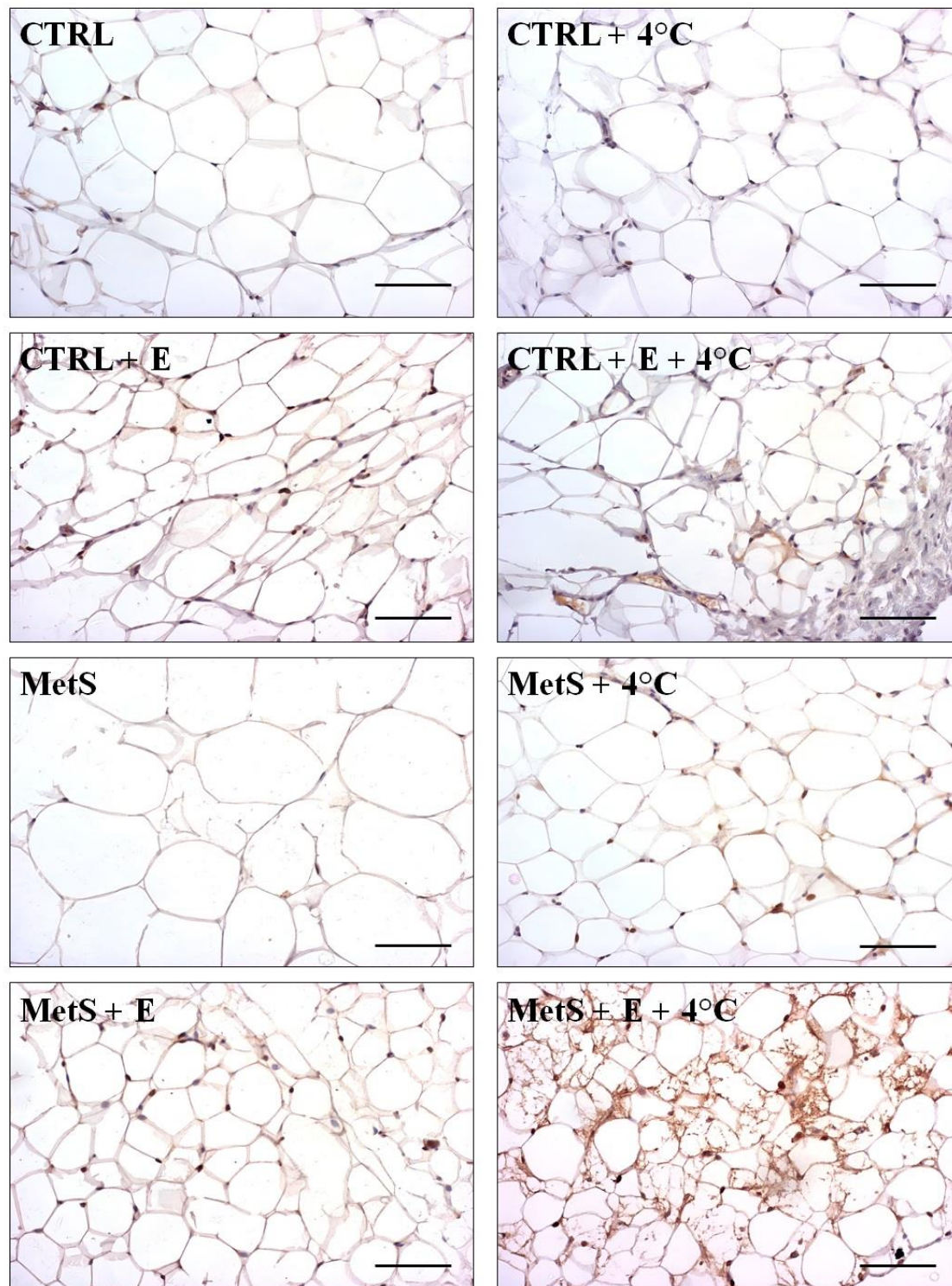
Адипоцити еWAT-а животиња са МС-ом су негативно обојени PGC-1 α , док је слаб интензитет примећен у контролној групи која је била чувана на собној температури. Међутим, третман валсартан/сакубитрилом узроковао је умерен интензитет бојења PGC-1 α у CTRL+E и MetS+E групама док је јак интензитет бојења показан уз истовремено излагање хладноћи (CTRL+E+4°C и MetS+E+4°C групе) (Слика 42).



Слика 42. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PGC-1 α у узорцима епидидималног масног ткива. Увећање 200 x; скала 5 mm.

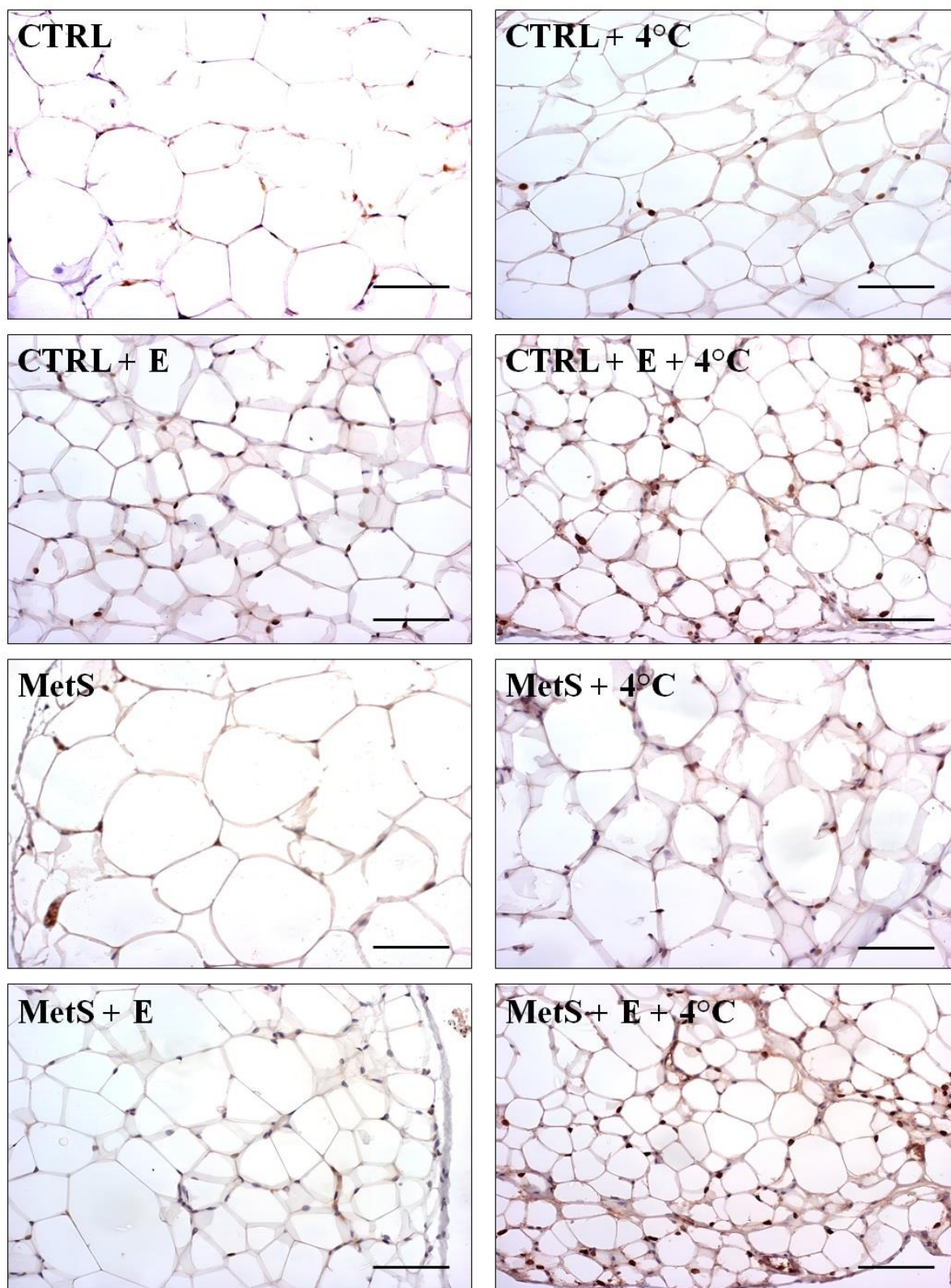
4.7.6. Имунохистохемијска детекција PPAR γ у узорцима масног ткива

Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом животиња код којих је индукован МС узроковао је слаб интензитет PPAR γ бојења адипоцита sWAT-а у односу на негативно обојене адипоците из MetS групе (Слика 43). Са друге стране, протокол хлађења довео је до јаког интензитета бојења PPAR γ у MetS+E+4°C групи.



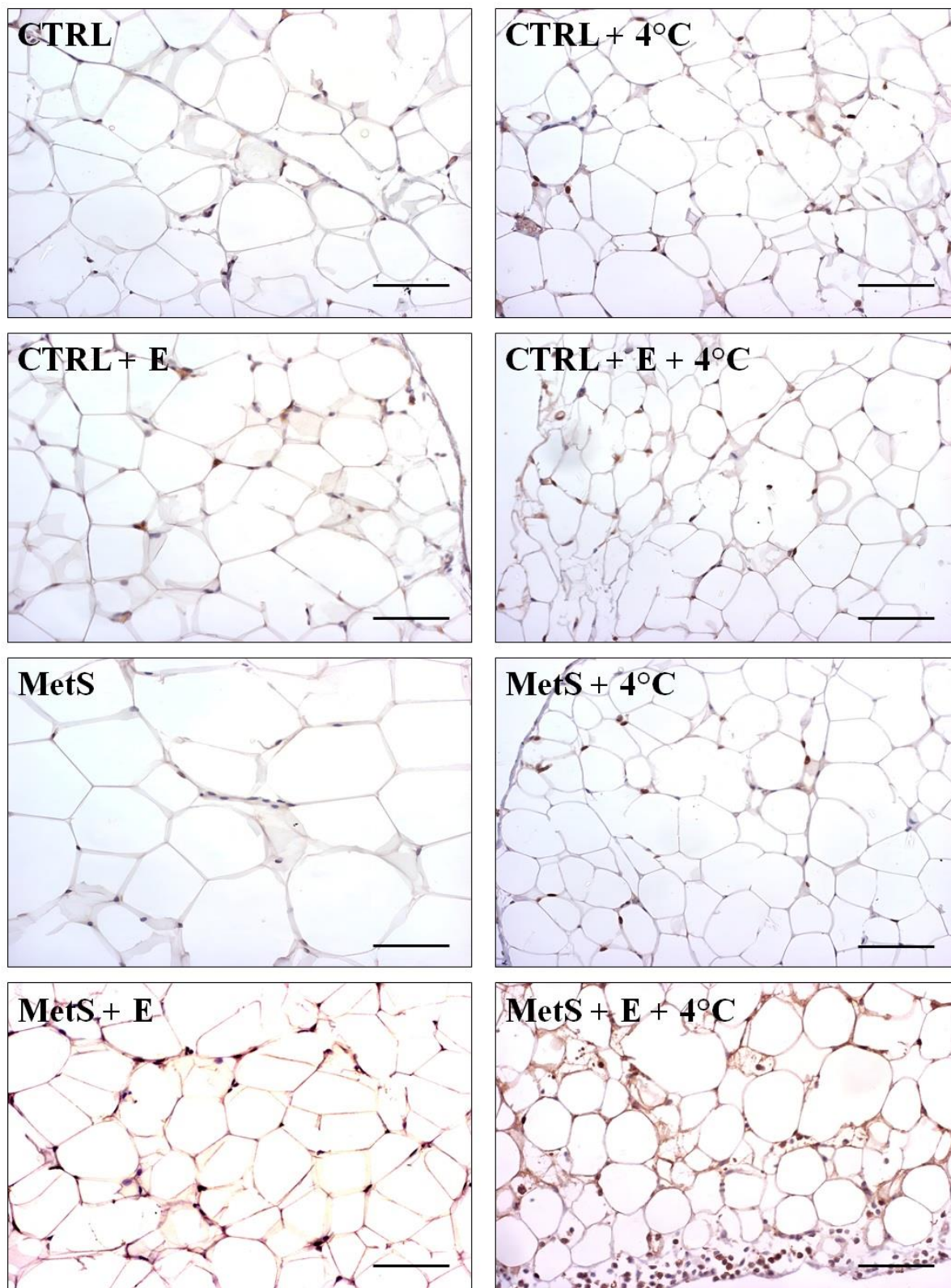
Слика 43. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PPAR γ у узорцима субкутаног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

На **Слици 44** приказан је интензитет PPAR γ бојења при чему су адипоцита rWAT-а животиња из CTRL+E+4°C и MetS+E+4°C групе имали највећи интензитет бојења у односу на умерен интензитет у CTRL+4°C и MetS+4°C групама.



Слика 44. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PPAR γ у узорцима ретроперитонеалног масног ткива. Увећање 200 x; скала 5 mm.

Умерено PPAR γ бојење адипоцита eWAT-а примећен је у CTRL+E и MetS+E групама, док је истовремено излагање хладноћи и третман валсартан/сакубитрилом довео до јачег интензитета PPAR γ бојења у MetS+E+4°C групи животиња (Слика 45).



Слика 45. Репрезентативне слике имунохистохемијски обојеног PPAR γ у узорцима епидидималног масног ткива. Увећање 200 х; скала 5 mm.

4.8. Ефекат експерименталног протокола на експресију специфичних гена у узорцима масног ткива

4.8.1. Ефекат примењеног третмана на експресију гена који су укључени у термогенезу

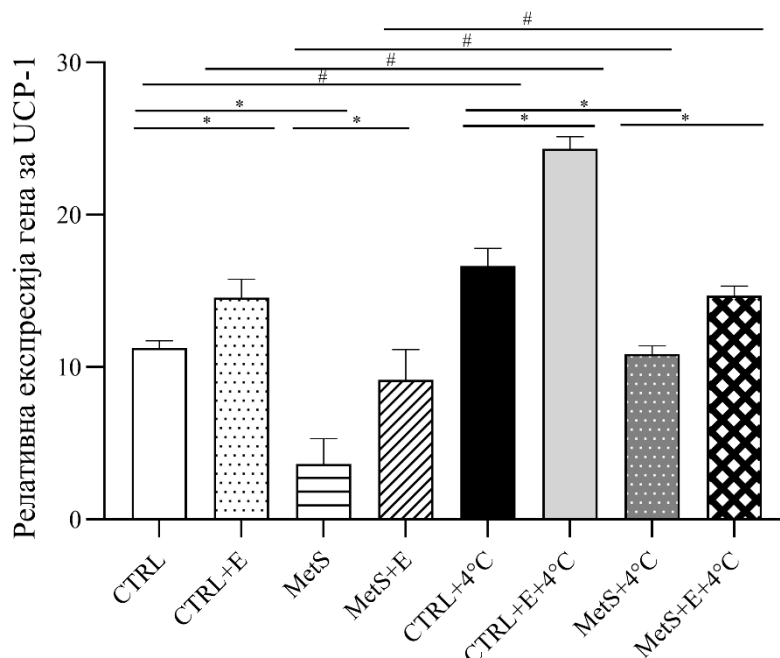


График 27. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију UCP-1 у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Експресија UCP-1 у sWAT-у животиња са MC-ом била је значајно нижа у односу на експресију овог маркера у ткиву здравих нетретираних животиња при оба температурна протокола. Са друге стране, у масном ткиву здравих али и животиња са MC-ом које су биле третиране оралном суспензијом валсартан/сакубитрила и које су биле чуване на собној температури, примећена је значајно већа експресија UCP-1 у поређењу са аналогном нетретираном групом животиња. Оваква статистичка значајност уочена је и између група животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења (График 27).

Статистички значајно већа експресија UCP-1 била је забележена у sWAT-у животиња које су биле изложене протоколу хлађења у поређењу са компарабилним групама пацова који су током експерименталног периода били чувани на собној температури (График 27).

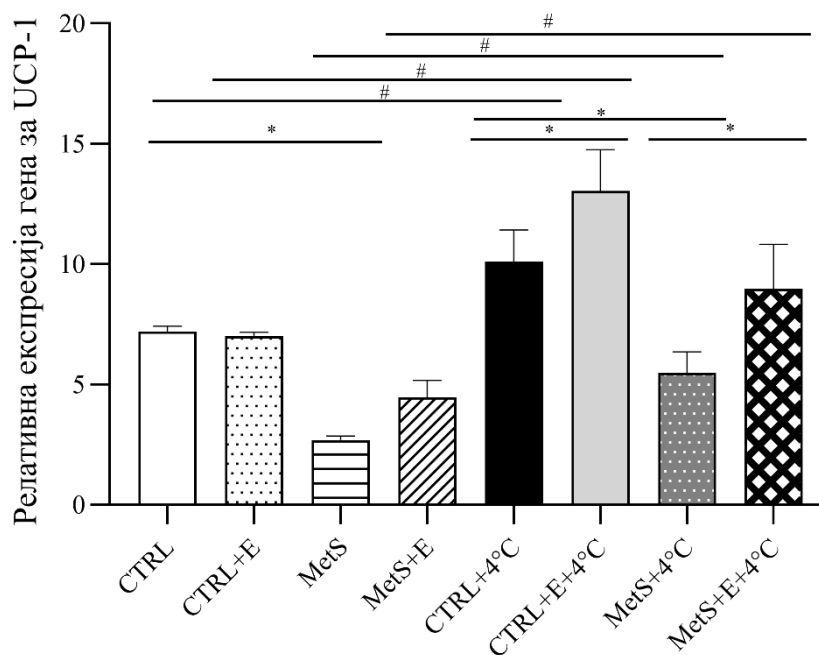


График 28. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију UCP-1 у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција МС-а значајно је смањила ниво UCP-1 у гWAT-у у поређењу са експресијом овог маркера у ткиву здравих животиња при оба температурна протокола. Иако примена валсартан/сакубитрила није индуковала повећану експресију UCP-1 у гWAT-у здравих као ни животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури у поређењу са контролним групама, комбиновани третман хлађења уз примену ових фармаколошких агенаса је значајно повећао експресију UCP-1 у гWAT-у како здравих тако и животиња са МС-ом у поређењу са нетретираним групама животиња које су биле изложене само протоколу хлађења (График 28).

Са друге стране, свакодневно излагање животиња протоколу хлађења током четири недеље резултирало је значајно већом експресијом UCP-1 у гWAT-у пацова свих група животиња у поређењу са концентрацијом овог молекула која је измерена у ткиву аналогних група животиња које нису биле подвргнуте протоколу хлађења (График 28).

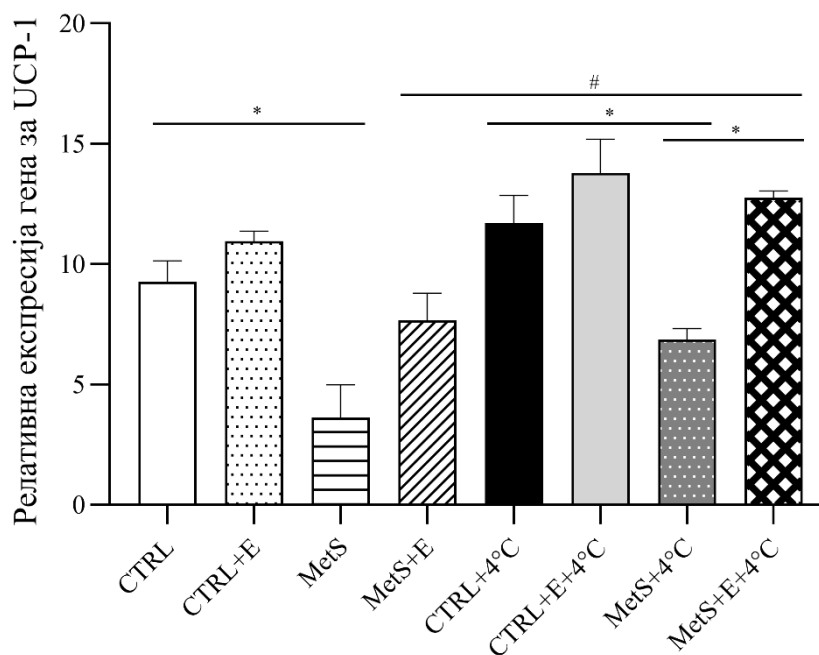


График 29. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију UCP-1 у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Значајно ниже концентрације UCP-1 измерене су у eWAT-у животиња код којих је индукован МС у поређењу са здравом контролном групом пацова која је била чувана на собној температури. Такође, експресија UCP-1 била је значајно нижа и у eWAT-у пацова са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења у односу на здраву контролну групу животиња које су биле подвргнуте истом протоколу хлађења. Међутим, четворонедељни третман здравих као и животиња са МС-ом које су биле чуване при собним температурама није довео до повећања концентрације UCP-1 у eWAT-у ових животиња у поређењу са аналогним контролним групама. Исти резултати уочени су и између здравих нетретираних пацова који су били изложени протоколу хлађења и групе животиња које су биле истовремено третиране фармаколошким агенсима и изложене ниским температурама окружења. Са друге стране, животиње код којих је индукован МС и које су биле третиране валсартан/сакубитрилом уз истовремено излагање протоколу хлађења имале су значајно већу концентрацију UCP-1 у eWAT-у у односу на ниво овог молекула који је измерен у масном ткиву нетретираних животиња са МС-ом које су биле подвргнуте протоколу хлађења (**График 29**).

Утицај излагања ниским температурама на експресију UCP-1 у eWAT-у уочен је једино код животиња са МС-ом уз истовремену примену валсартан/сакубитрила у поређењу са истом групом пацова које су биле чуване на собној температури. Између преосталих група није примећена статистички значајан утицај температурног окружења на експресију UCP-1 у eWAT-у животиња (**График 29**).

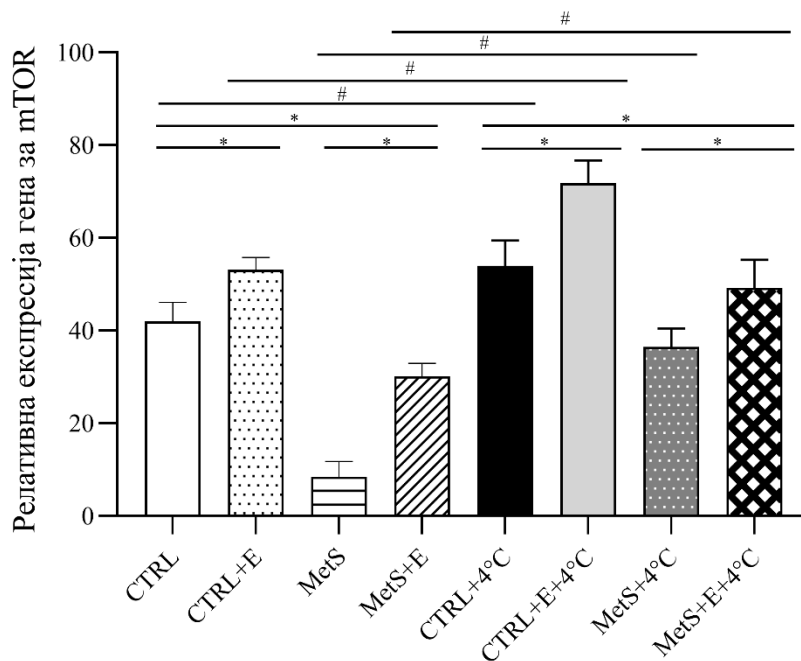


График 30. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију mTOR у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Статистички значајан пораст у експресији mTOR у sWAT-у примећен је у групама како здравих тако и животиња са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом у поређењу са контролним групама. Ова разлика у експресији mTOR примећена је и између фармаколошки третираних и нетретираних група које су биле изложене протоколу хлађења. Са друге стране, животиње код којих је индукован MC имале су значајно мању концентрацију mTOR у sWAT-у у односу на експресију овог маркера у ткиву здравих животиња при оба температурна протокола (**График 30**).

Снажан утицај протокола хлађења на индукцију експресије mTOR у sWAT-у примећен је у свим групама у поређењу са концентрацијом која је измерена у ткиву аналогних група животиња које су биле чуване на собној температури (**График 30**).

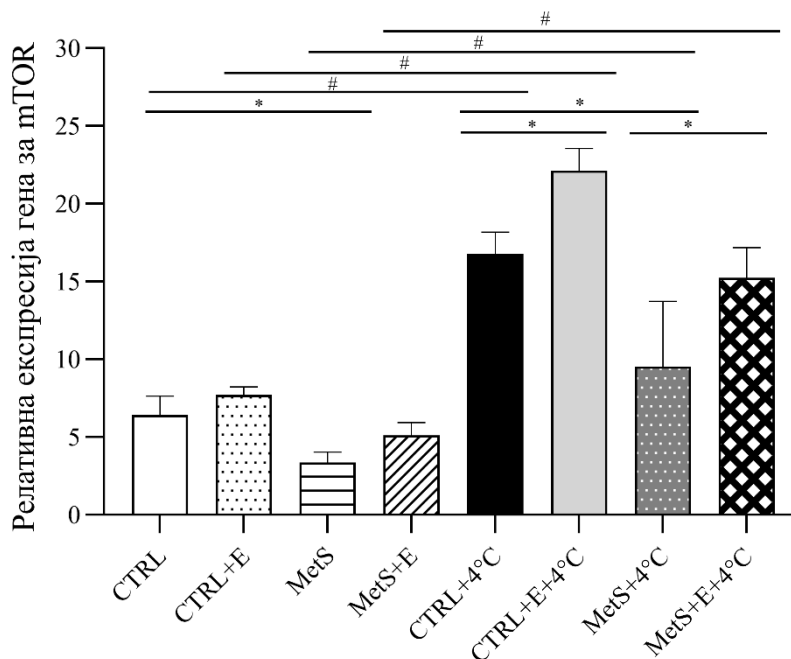


График 31. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију mTOR у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Концентрација mTOR у гWAT-у здравих животиња које су биле чуване на собној температури је била статистички значајно виша у односу на ниво који је измерен у ткиву животиња са МС-ом, али без статистички значајне разлике између осталих аналогних група животиња које нису биле изложене протоколу хлађења. Међутим, излагање ниским температурама окружења уз истовремену примену валсартан/сакубитрила индуковало је значајан пораст нивоа mTOR у гWAT-у како здравих тако и код животиња са МС-ом у поређењу са аналогним фармаколошки нетретираним животињама. Такође, концентрација mTOR у гWAT-у здравих животиња које су биле изложене само протоколу хлађења била је статистички значајно виша у поређењу са животињама из MetS+4°C групе (**График 31**).

С обзиром на значајно више концентрације mTOR у гWAT-у свих животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења, уочена је статистички значајна разлика у поређењу са експресијом овог маркера у гWAT-у аналогних група пацова које су биле чуване на собној температури (**График 31**).

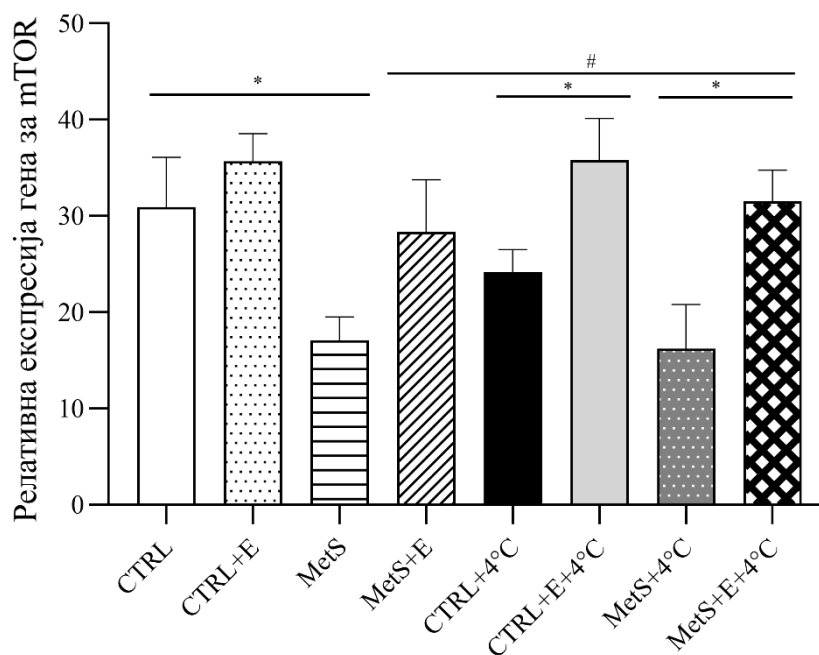


График 32. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију mTOR у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Фармаколошки нетретирани животиње које су током експерименталног периода биле смештене у просторијама са собном температуром и код којих је индукован МС имале су значајно ниже концентрације mTOR у eWAT-у у поређењу са здравом контролном групом пацова. Ипак, примена валсартан/сакубитрила није довела до повећања овог маркера у eWAT-у здравих, али ни животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури у поређењу са аналогним нетретираним групама животиња. Са друге стране, истовремена примена фармаколошких агенаса и излагање ниским температурама довеле су до повећане експресије mTOR у eWAT-у здравих и животиња са МС-ом у поређењу са нетретираним аналогним групама пацова које су биле изложене само протоколу хлађења. Са друге стране, нису примећене разлике у експресији mTOR у eWAT-у здравих и животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења (**График 32**).

Разлике у температурама којима су животиње биле изложене условиле су повећану експресију mTOR само у eWAT-у животиња са МС-ом које су истовремено биле изложене протоколу хлађења и третману валсартан/сакубитрилом у поређењу са релативном експресијом овог маркера у ткиву животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом, али при собној температури. Између осталих група, различите температуре окружења којима су животиње биле излагане нису утицале на статистички значајне разлике у експресији mTOR молекула у eWAT-у (**График 32**).

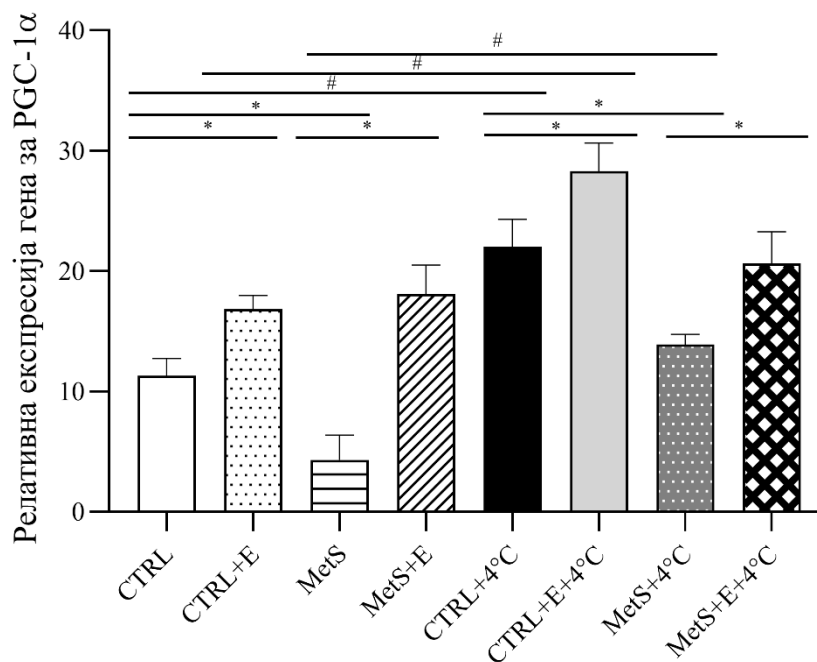


График 33. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PGC-1α у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Експресија PGC-1α у sWAT-у здравих животиња била је значајно виша у поређењу са пацовима код којих је индукован MC при оба температурна протокола. Са друге стране, субкутна примена валсартан/сакубитрила значајно је повећала експресију PGC-1α како код здравих тако и код животиња са MC-ом у поређењу са експресијом овог молекула у ткивима аналогних контролних група, било да су животиње чуване на собној температури или су биле изложене протоколу хлађења (**График 33**).

Излагање здравих нетретираних животиња протоколу хлађења довело је до значајног пораста нивоа PGC-1α у sWAT-у у поређењу са контролном групом пацова која је била чувана на собној температури. Такође, истовремено излагање здравих животиња ниским температурама окружења уз примену валсартан/сакубитрила значајно је повећало експресију PGC-1α у sWAT-у у односу на ниво експресије овог маркера у ткиву здравих животиња које су биле третиране комбинацијом ова два лека али без излагања протоколу хлађења. Иако је протокол хлађења значајно повећао експресију PGC-1α код животиња са MC-ом у поређењу са аналогном групом пацова која је била чувана на собној температури, комбиновани третман валсартан/сакубитрилом животиња са MC-ом уз излагање протоколу хлађења није значајно повећао експресију PGC-1α у sWAT-у ових животиња у односу на ниво измерен у ткиву животиња са MC-ом које су биле чуване на собној температури и третиране фармаколошким агенасима (**График 33**).

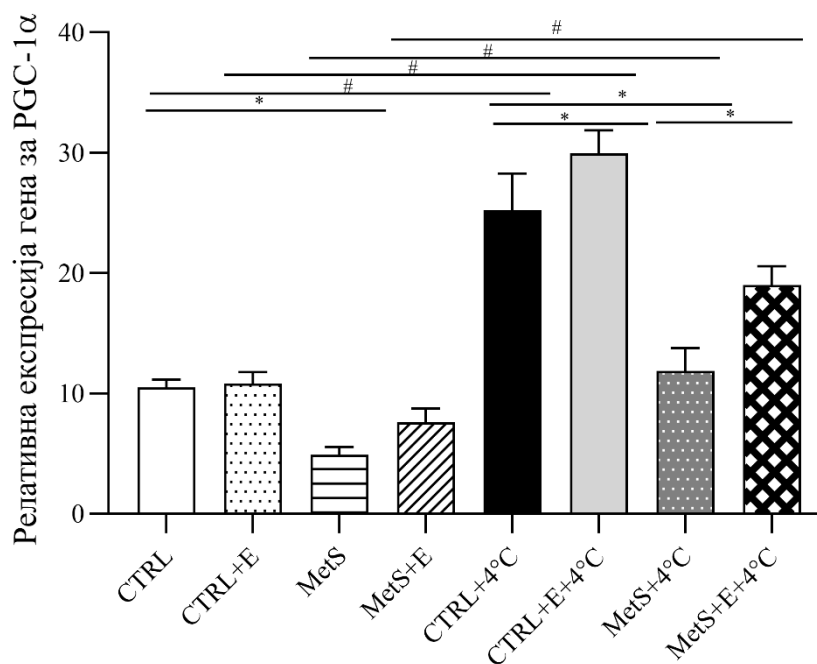


График 34. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PGC-1α у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција МС-а значајно је смањила ниво експресије PGC-1α у гWAT-у у односу на здраве животиње при оба температурна протокола. Са друге стране, третман здравих и животиња са МС-ом комбинацијом валсартан/сакубитрила при собној температури није довео до значајног повећања експресије PGC-1α у гWAT-у у поређењу са аналогним нетретираним групама животиња. Међутим, истовремени фармаколошки третман и протокол хлађења довео је до значајног повећања експресије PGC-1α у гWAT-у здравих али и код животиња са МС-ом у поређењу са контролним групама пацова које су биле изложене само протоколу хлађења (График 34).

Ниво експресије PGC-1α у гWAT-у свих група животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења био је статистички значајно већи у поређењу са измереном експресијом PGC-1α у ткивима аналогних група животиња које су биле чуване на собној температури (График 34).

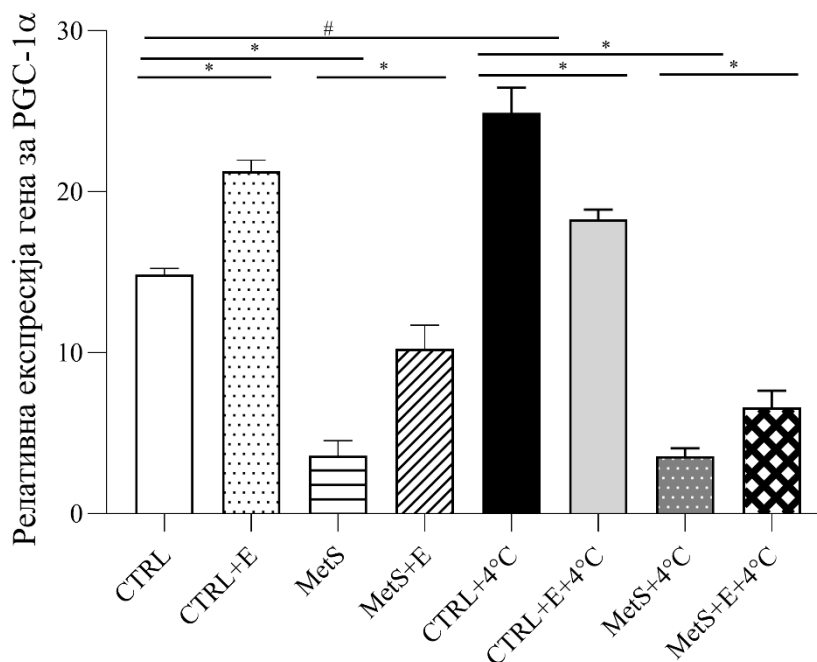


График 35. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PGC-1 α у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Значајно већа експресија PGC-1 α измерена је у eWAT-у здравих животиња које су биле чуване на собној температури или изложене протоколу хлађења у поређењу са нивоом експресије овог маркера у eWAT-у аналогних група животиња са MC-ом. Такође, примена валсартан/сакубитрила довела је до значајно веће експресије PGC-1 α у eWAT-у здравих али и животиња са MC-ом у поређењу са контролним нетретираним групама животиња при оба температурна протокола (**График 35**).

Протокол хлађења значајно је повећао ниво PGC-1 α у eWAT-у здравих животиња у поређењу са здравом контролном групом пацова која је била чувана на собној температури. Међутим, статистички значајна разлика у експресији овог маркера није примећена између осталих група које су биле изложене протоколу хлађења у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури (**График 35**).

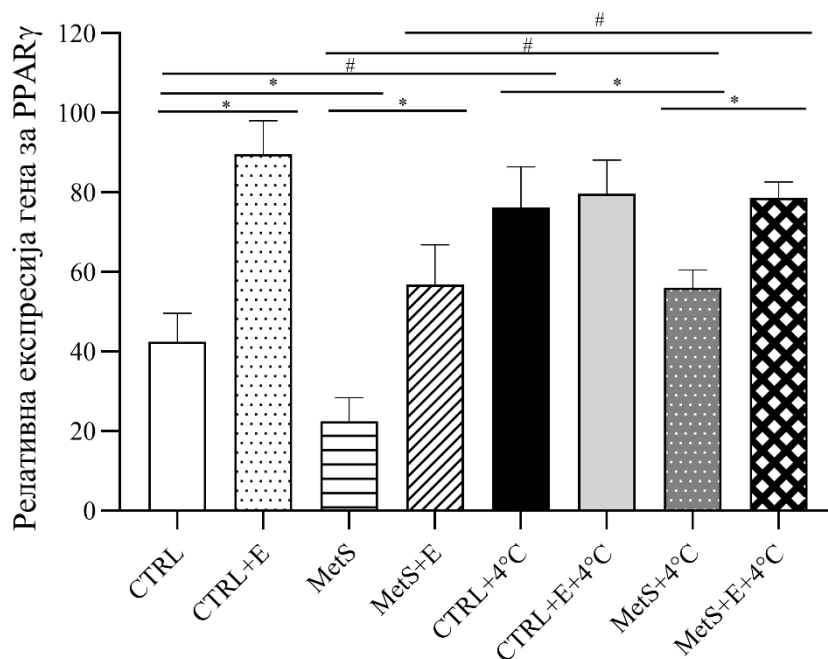


График 36. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PPAR γ у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

У sWAT-у здравих животиња које су биле чуване на собној температури, примећена је значајно већа експресија PPAR γ у односу на животиње са MC-ом. Међутим, третман валсартан/сакубитрилом повећао је експресију PPAR γ у sWAT-у здравих али и животиња са MC-ом у односу на контролне нетретираних група пацова. Такође, излагање здравих животиња протоколу хлађења резултирало је у значајно већим нивоом експресије PPAR γ у односу на животиње са MC-ом које су биле изложене четворонедељном протоколу хлађења. Штавише, истовремени третман валсартан/сакубитрилом и протокол излагања хладноћи довели су до повећане експресије PPAR γ у sWAT-у животиња са MC-ом у односу на групу пацова код којих је индукован MC и које су биле изложене само протоколу хлађења. Са друге стране, није примећена статистички значајна разлика у експресији овог маркера у sWAT-у здравих контролних и фармаколошки третираних животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења (**График 36**).

Експресија PPAR γ у sWAT-у свих група животиња које су биле подвргнуте протоколу хлађења била је значајно виша у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури. Ипак, статистички значајне разлике није било између здравих животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и чуване на различитим температурама (**График 36**).

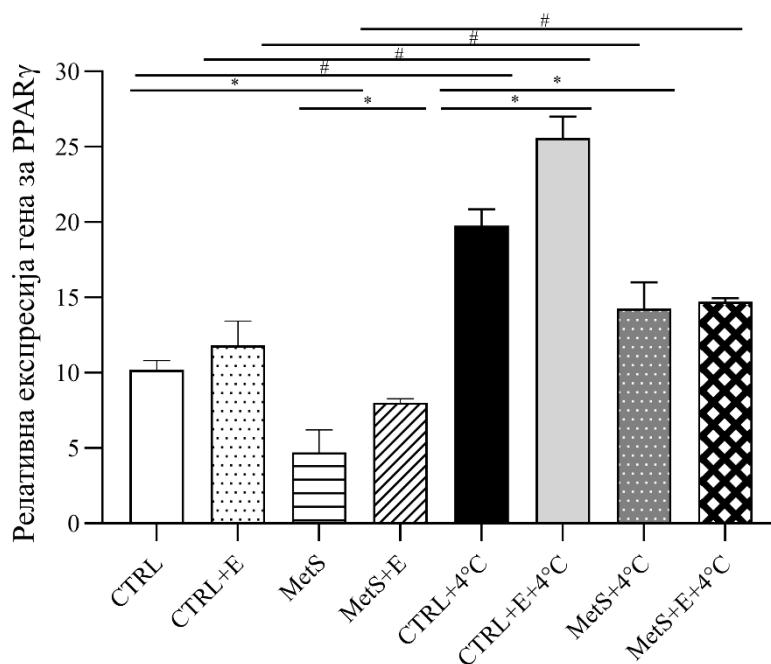


График 37. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PPARγ у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Животиње код којих је индукован МС и које су биле третиране валсартан/сакубитрилом имале су значајно већи ниво експресије PPARγ у rWAT-у у поређењу са нивоом овог маркера у ткиву нетретираних животиња са МС-ом. Ипак, ниво експресије PPARγ био је значајно већи у rWAT-у здравих контролних животиња у поређењу са групом пацова код којих је индукован МС, при оба температурна протокола. Међутим, примена валсартан/сакубитрила уз истовремено излагање протоколу хлађења здравих животиња значајно је повећао експресију PPARγ у rWAT-у ове групе пацова у поређењу са контролном групом која је била изложена само протоколу хлађења. Са друге стране, примењени фармаколошки третман код животиња са МС-ом које су изложене протоколу хлађења није довео до повећања у експресији PPARγ у rWAT-у (**График 37**).

Излагање протоколу хлађења значајно је повећао експресију PPARγ у rWAT-у свих животиња у поређењу са експресијом овог молекула у ткивима аналогних група животиња које су биле чуване на собној температури (**График 37**).

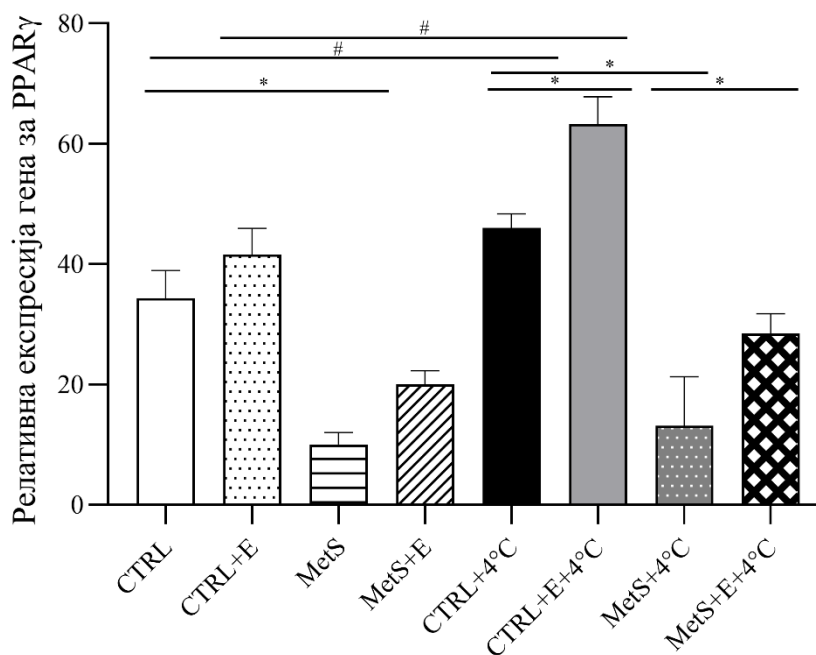


График 38. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију PPAR γ у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Релативна експресија PPAR γ била је значајно нижа у eWAT-у пацова са MC-ом у поређењу са контролном групом животиња при оба температурна протокола окружења. Међутим, фармаколошки третман валсартан/сакубитрилом како здравих тако и животиња са MC-ом које су боравиле на собној температури током експерименталног периода није успео да повећа експресију PPAR γ у eWAT-у ових животиња у поређењу са аналогним контролним групама пацова. Са друге стране, здраве али и животиње које су биле изложене протоколу хлађења и истовремено третиране валсартан/сакубитрилом имале су статистички значајно већу експресију PPAR γ у eWAT-у у поређењу са аналогним контролним групама пацова које су биле изложене само протоколу хлађења. Међутим, контролна група пацова са MC-ом која је била излагана четворочасовном протоколу хлађења имала је значајно нижи степен експресије PPAR γ у eWAT-у у поређењу здравом контролном групом животиња које су биле изложене истом протоколу (График 38).

Док је протокол хлађења значајно повећао експресију PPAR γ у eWAT-у здравих контролних и здравих фармаколошки третираних животиња у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури, излагање група пацова са MC-ом ниским температурама окружења није значајно повећао експресију PPAR γ у овом типу масног ткива у поређењу са аналогним групама животиња са MC-ом које су биле чуване на собној температури (График 38).

4.8.2. Ефекат примењеног третмана на експресију гена укључених у инфламацију

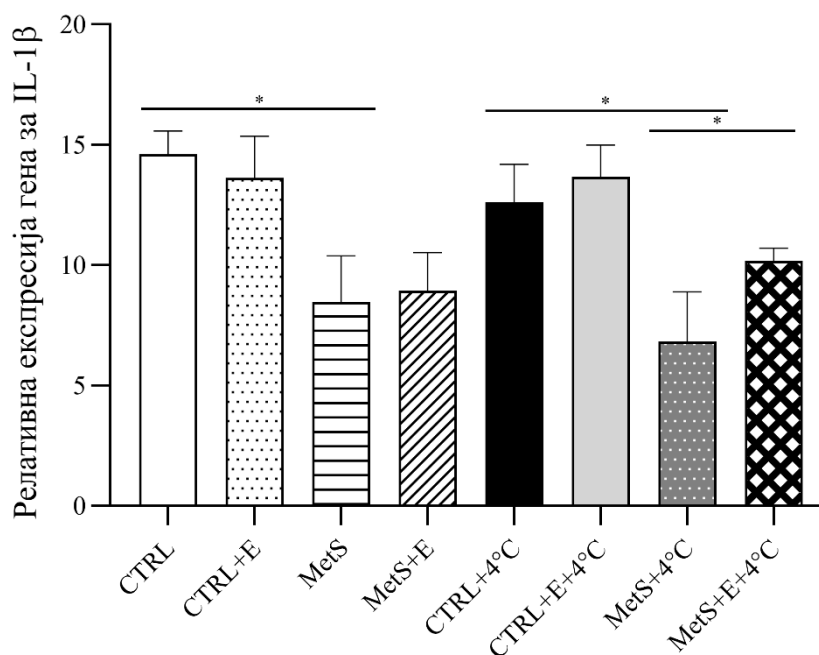


График 39. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-1 β у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Релативна експресија IL-1 β у sWAT-у здравих контролних животиња била је значајно виша при оба температурна протокола у односу на групу животиња са МС-ом. Међутим, субкутна примена валсартан/сакубитрила редуковала је експресију IL-1 β у sWAT-у животиња са МС-ом које су истовремено биле изложене протоколу хлађења, док код осталих животиња ова фармаколошка терапија није довела до значајних разлика у експресији IL-1 β у односу на аналогну групу (График 39).

Ефекат излагања ниским температурама на релативну експресију IL-1 β није уочен ни у једној од испитиваних група животиња (График 39).

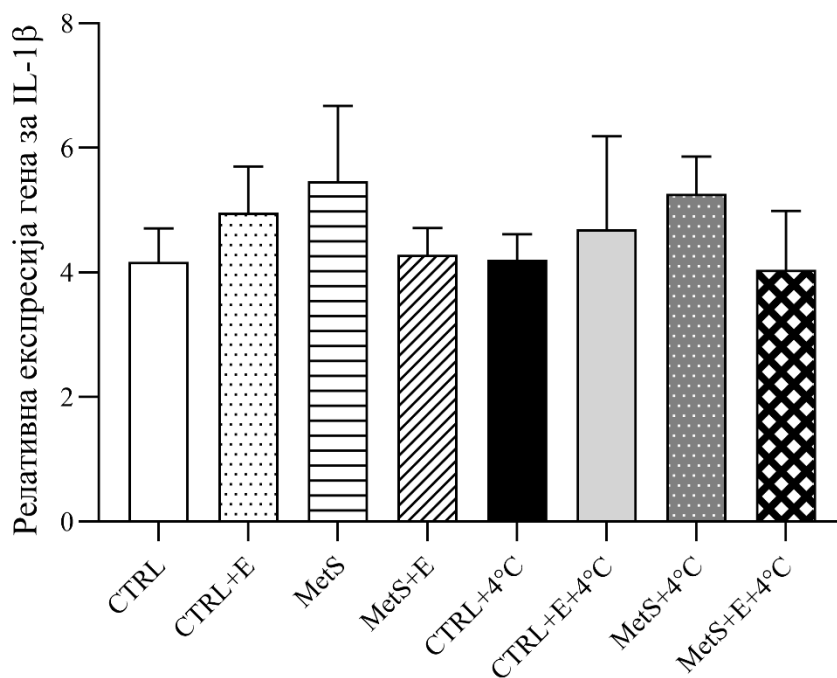


График 40. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-1 β у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Анализом релативне експресије IL-1 β у ретроперитонеалним адипоцитима здравих као ни животиња са МС-ом које су биле изложене различитим температурама окружења са или без третмана валсартан/сакубитрилом, нису уочене статистички значајне разлике (**График 40**).

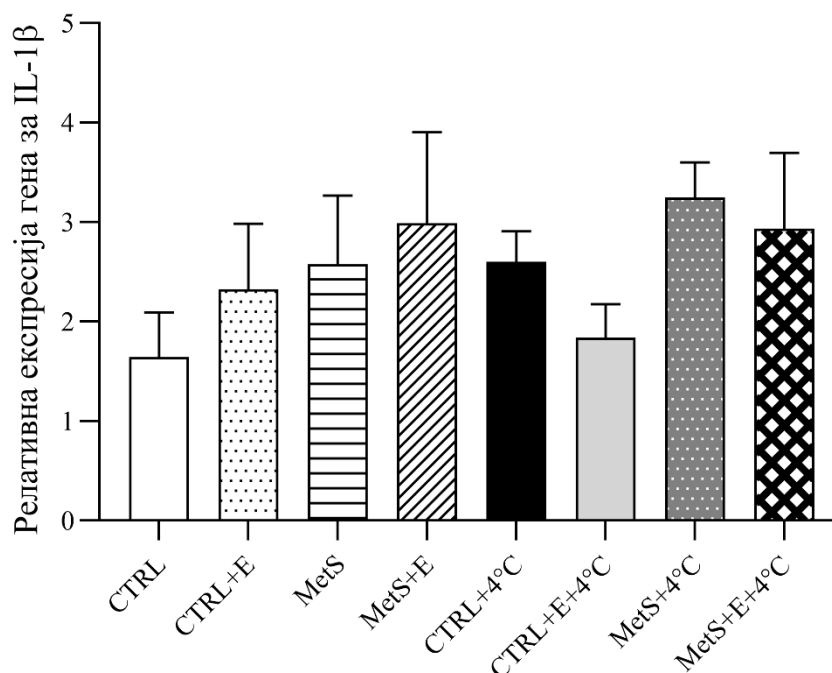


График 41. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-1 β у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Ниво релативне генске експресије IL-1 β остао је непромењен након примењених експерименталних протокола како у епидидималним масним ћелијама здравих, тако и животиња са МС-ом у поређењу са аналогном групом пацова (График 41).

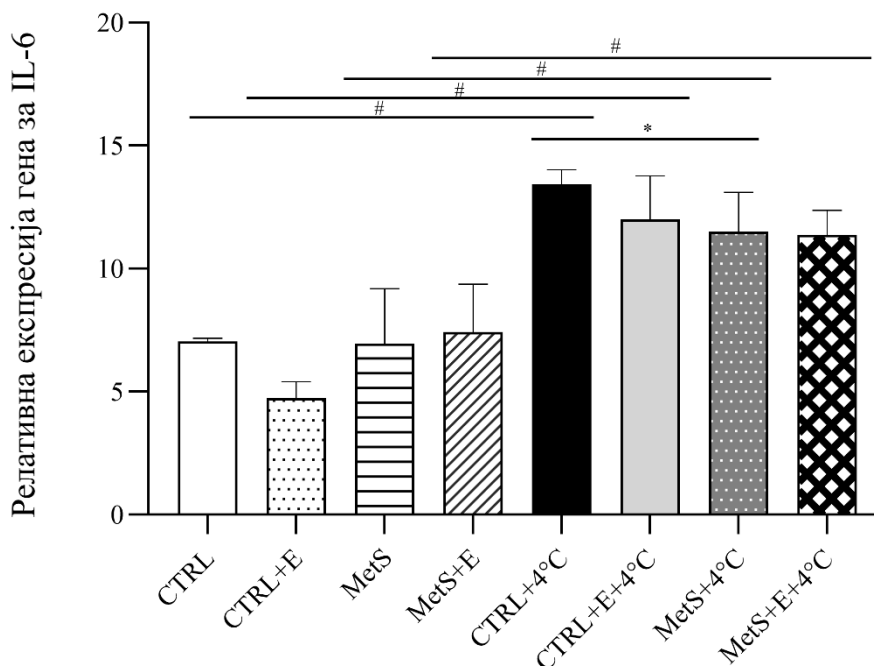


График 42. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-6 у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Разлике у нивоу експресије IL-6 у субкутаним адипоцитима између аналогних група животиња које су биле чуване на собној температури нису биле статистички значајне. Са друге стране, излагање хладноћи животиња код којих је индукован МС довело је до значајно мање експресије IL-6 у sWAT-у ових животиња у односу на здраву контролну групу пацова која је била изложена протоколу хлађења. Међутим, примена валсартан/сакубитрила код здравих или код животиња са МС-ом које су истовремено биле изложене хладноћи, није утицала на експресију IL-6 у ткиву ових животиња у односу на аналогне контролне групе пацова (График 42).

У sWAT-у свих група пацова које су биле подвргнуте протоколу хлађења примећена је значајно већа експресија IL-6 у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури током експерименталног периода (График 42).

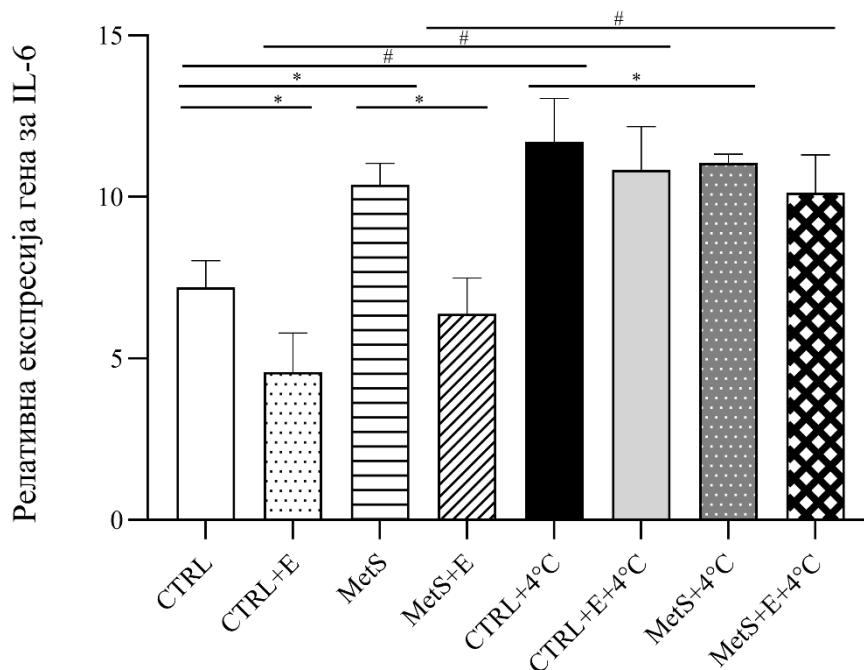


График 43. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-6 у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Групе животиња које су биле чуване на собној температури и третиране валсартан/сакубитрилом имале су значајно нижу релативну експресију IL-6 у гWAT-у у поређењу са аналогним контролним групама пацова. Такође, животиње са МС-ом имале су значајно већу експресију овог цитокина у поређењу са здравом контролном групом пацова која је била чувана на собној температури. Међутим, излагање животиња са МС-ом протоколу хлађења довело је до значајног смањења у нивоу IL-6 у гWAT-у у односу на аналогну контролну групу животиња. Са друге стране, истовремена примена валсартан/сакубитрила и протокола хлађења није резултирала променом нивоа овог цитокина у ретроперитонеалним адипоцитима здравих као ни животиња са МС-ом (График 43).

Протокол хлађења значајно је повећао експресију IL-6 у гWAT-у свих животиња у поређењу са аналогним контролним групама пацова које су биле чуване на собној температури, изузев групе пацова са МС-ом где третман хлађењем није значајно променио експресију овог цитокина (График 43).

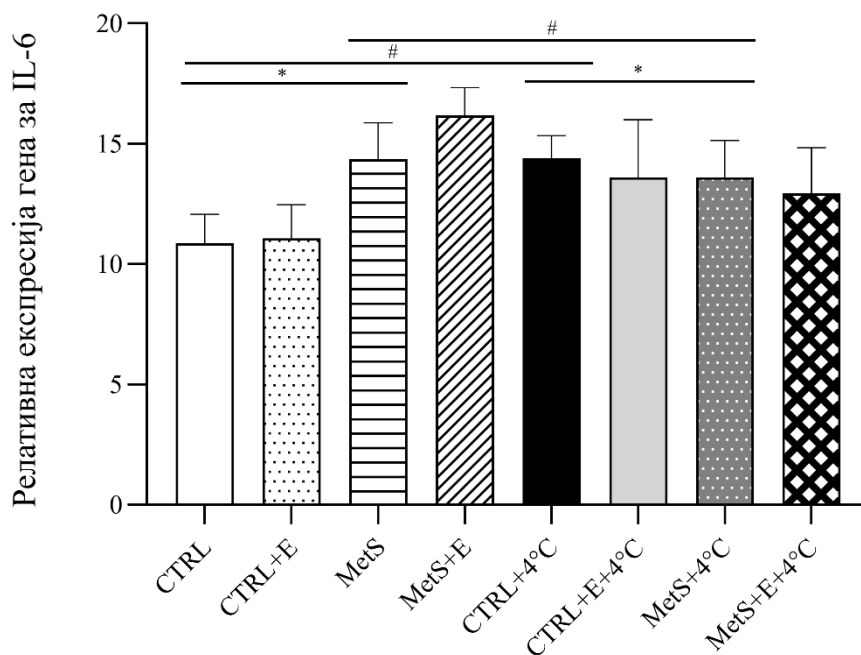


График 44. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-6 у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Четворонедељна примена валсартан/сакубитрила код здравих животиња као и код пацова са МС-ом није довела до статистички значајних разлика у нивоу експресије IL-6 у eWAT-у у поређењу са аналогним контролним групама животиња при оба температурна протокола. Једино су животиње код којих је индукован МС имале статистички значајно већу експресију IL-6 у eWAT-у у односу на здраву контролну групу пацова при оба температурна протокола (График 44).

Протокол излагања хладноћи довео је до статистички значајно већег нивоа релативне експресије IL-6 у eWAT-у здравих нетретираних животиња у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури, без утицаја на експресију овог маркера у другим експерименталним групама. Једино је протокол хлађења код животиња са МС-ом довео до благе редукције у експресији IL-6 у поређењу са контролном групом пацова са МС-ом која је била чувана на собној температури (График 44).

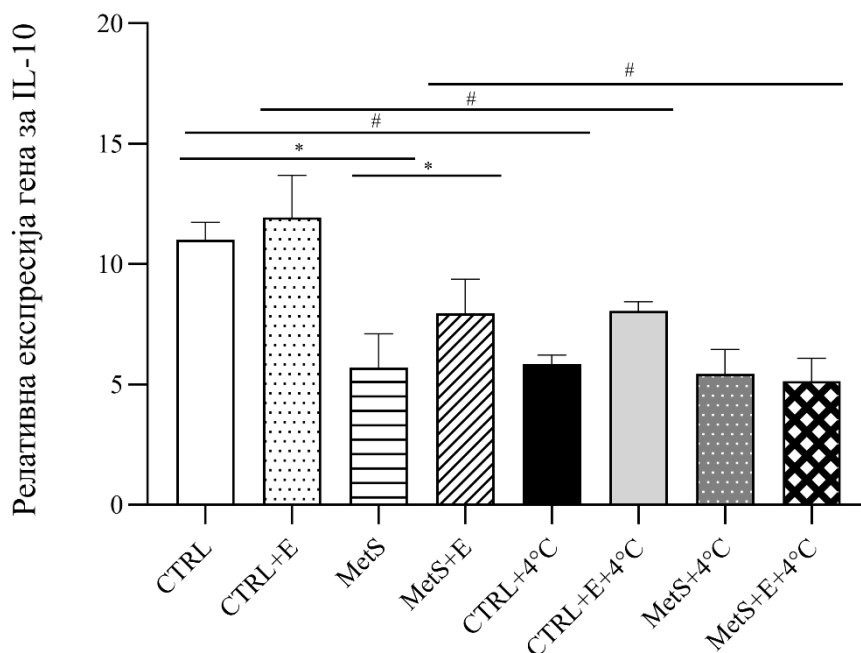


График 45. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-10 у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Релативна експресија IL-10 у sWAT-у животиња код којих је индукован MC била је значајно нижа у односу на здраву контролну групу пацова. Са друге стране, примена валсартан/сакубитрила није значајно смањила експресију IL-10 у sWAT-у здравих животиња у поређењу са нивоом овог маркера измереног у ткиву здравих нетретираних пацова који су били чувани на собној температури. Међутим, третман животиња са MC-ом фармаколошким агенсима значајно је повећао ниво релативне експресије IL-10 у sWAT-у у поређењу са контролном групом пацова са MC-ом који су боравили на собној температури. Са друге стране, нису примећене разлике у експресији IL-10 у sWAT-у здравих и животиња са MC-ом које су биле изложене протоколу хлађења. Штавише, ни истовремено примењена фармаколошка терапија и протокол хлађења нису утицали на промену у експресији овог цитокина код здравих али ни код пацова са MC-ом у поређењу са аналогним контролним групама које су биле изложене само протоколу хлађења (График 45).

Излагање протоколу хлађења резултирало је значајно нижом релативном експресијом IL-10 у sWAT-у свих животиња у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури изузев код пацова са MC-ом код којих протокол хлађења није довео до промена у експресији овог цитокина (График 45).

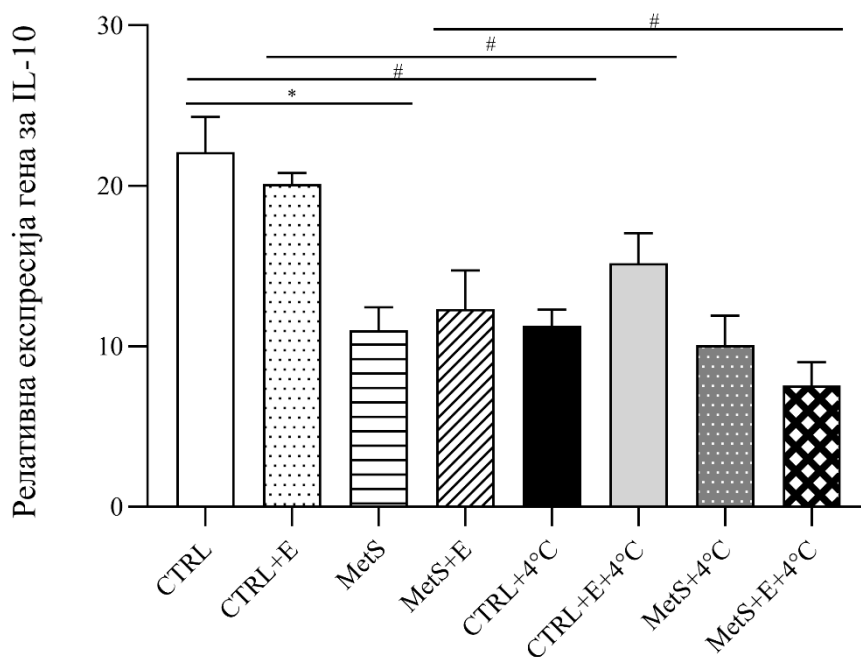


График 46. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-10 у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција МС-а довела је до значајно мање експресије IL-10 у rWAT-у у поређењу са здравом контролном групом нетретираних животиња која је била чувана на собној температури. Међутим, примена валсартан/сакубитрила није успела да значајно повећа релативну експресију IL-10 у rWAT-у здравих али ни код животиња са МС-ом при оба температурна протокола у поређењу са аналогним контролним групама пацова. Такође, није било разлике у експресији овог маркера у адипоцитима rWAT-а здравих и животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења (**График 46**).

Протокол хлађења значајно је смањио експресију IL-10 у rWAT-у свих животиња у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури, изузев у контролној групи пацова са МС-ом где нису уочене значајне промене у експресији овог цитокина (**График 46**).

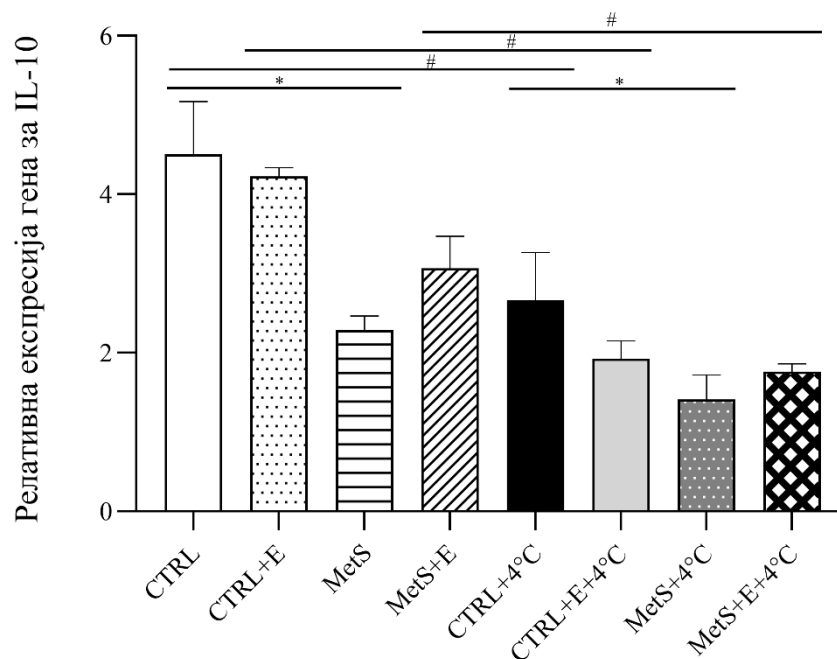


График 47. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-10 у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Значајно јача експресија IL-10 измерена је у eWAT-у здравих нетретираних пацова у односу на групу нетретираних животиња са MC-ом при оба температурна протокола. Ипак, четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом са или без истовременог излагања протоколу хлађења није довео до повећања експресије гена за IL-10 у eWAT-у здравих као ни пацова са MC-ом у поређењу са аналогним контролним групама животиња при истој температури окружења. Протоколом хлађења постигнут је значајно нижи степен експресије IL-10 у eWAT-у животиња са MC-ом у поређењу са здравом нетретираном групом пацова (**График 47**).

Протокол излагања ниским температурама окружења значајно је смањио релативну експресију IL-10 у eWAT-у животиња свих група у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури, изузев група нетретираних животиња са MC-ом код којих није уочен утицај температуре окружења на експресију овог цитокина у eWAT-у (**График 47**).

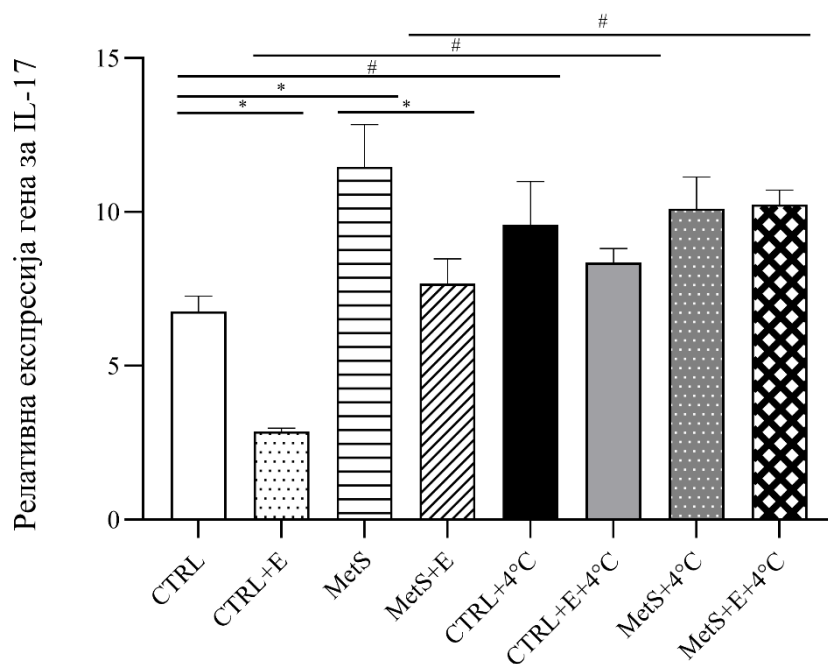


График 48. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-17 у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Степен релативне експресије IL-17 у sWAT-у животиња са MC-ом био је значајно виши у поређењу са здравом контролном групом животиња која је била чувана на собној температури. Међутим, субкутна примена валсартан/сакубитрила довела је до значајног пада у нивоу овог цитокина у sWAT-у здравих као и животиња са MC-ом у поређењу са аналогним контролним групама животиња које су биле чуване на собној температури. Са друге стране, статистички значајне разлике у експресији IL-17 у sWAT-у између аналогних група пацова које су биле изложене протоколу хлађења нису примећене (График 48).

Групе животиња које су боравиле на собној температури током трајања студије, имале су статистички значајно нижи степен експресије IL-17 у sWAT-у у поређењу са аналогним групама пацова које су биле изложене протоколу хлађења. Међутим, ова значајност једино није примећена у групи нетретираних животиња са MC-ом која је била изложена различитом температурном протоколу (График 48).

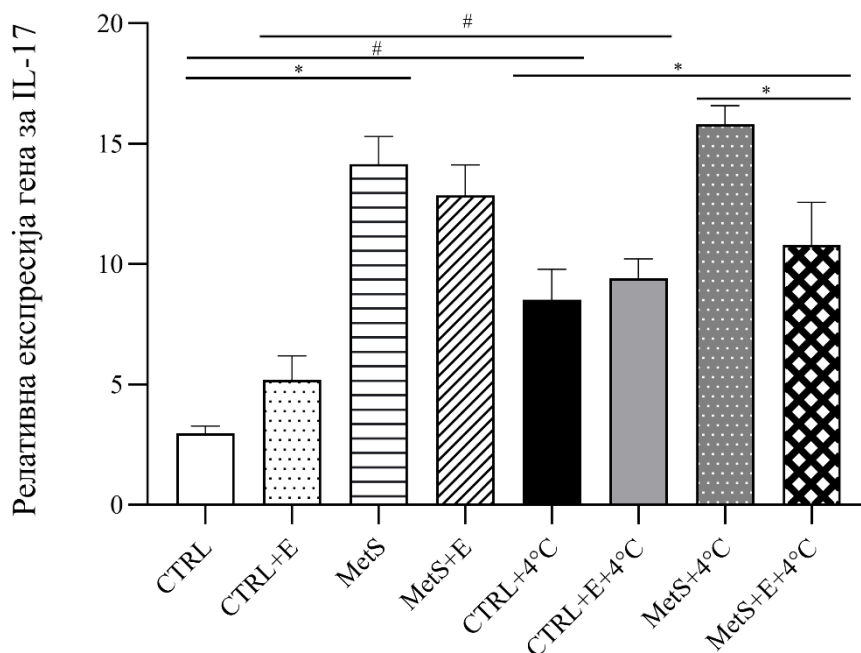


График 49. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-17 у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Експресија IL-17 у rWAT-у пацова са MC-ом била је значајно виша у поређењу са здравом контролном групом пацова при оба температурна протокола. Ипак, третман валсартан/сакубитрилом како здравих тако и пацова са MC-ом није успео да значајно смањи експресију IL-17 у rWAT-у ових животиња које су биле чуване на собној температури у поређењу са аналогним контролним групама пацова. Такође, примењени фармаколошки агенси уз истовремено излагање ниским температурама нису довели до значајне промене у релативној експресији IL-17 у rWAT-у здравих животиња у односу на контролну групу здравих пацова која је била изложена само протоколу хлађења. Са друге стране, комбиновани фармаколошки третман и протокол хлађења животиња са MC-ом значајно је смањио експресију IL-17 у rWAT-у ових животиња у поређењу са контролном групом пацова са MC-ом која је била изложена протоколу хлађења (График 49).

Изолагање хладноћи значајно је смањило експресију IL-17 у rWAT-у контролних здравих као и здравих пацова који су били третиран валсартан/сакубитрилом у поређењу са аналогним групама животиња које су биле чуване на собној температури. Међутим, утицај излагања хладноћи на експресију IL-17 у rWAT-у преосталих група животиња није био статистички значајан (График 49).

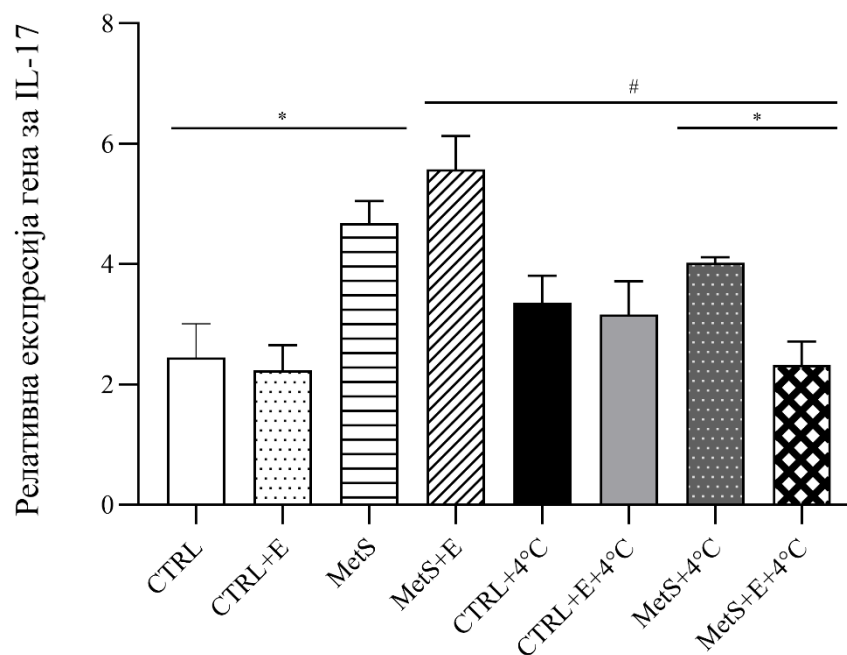


График 50. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију IL-17 у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција МС-а значајно је повећала експресију IL-17 у eWAT-у ових животиња у поређењу са здравом контролном групом пацова која је била чувана на собној температури. Међутим, субакутна администрација валсартан/сакубитрила није довела до статистички значајних промена у експресији овог интерлеукина у eWAT-у здравих као ни животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури у односу на аналогне групе контролних животиња. Излагање здравих животиња протоколу хлађења није довело до промена у експресији IL-17 у eWAT-у у односу на групу пацова са МС-ом које су биле подвргнуте протоколу хлађења. Такође, истовремена примена валсартан/сакубитрила и излагање ниским температурама није смањила експресију IL-17 у eWAT-у ових животиња у поређењу са контролном здравом групом пацова која је била изложена само протоколу хлађења. Међутим, овај комбиновани протокол је редуковао ниво IL-17 у eWAT-у животиња са МС-ом у односу на контролну групу пацова код којих је индукован МС и који су били изложени ниским температурама (**График 50**).

Протокол излагања хладноћи није утицао на промену у релативној експресији IL-17 у eWAT-у у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури, изузев у групи животиња са МС-ом при чему је истовремени третман валсартан/сакубитрилом и протокол хлађења значајно смањив ниво експресије IL-17 у eWAT-у ових животиња у односу на аналогну групу пацова која је била чувана на собној температури (**График 50**).

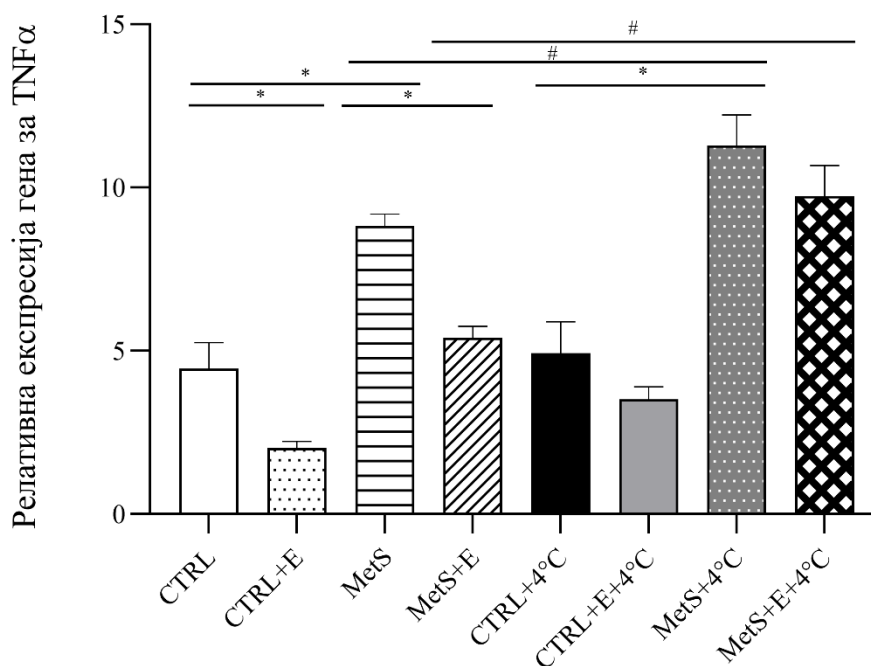


График 51. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију TNFα у субкутаном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Индукција MC-а значајно је повећала експресију TNFα у sWAT-у ових животиња у односу на ниво измерен у ткиву здравих пацова при оба температурна протокола. Штавише, примена валсартан/сакубитрила значајно је смањила експресију овог цитокина у sWAT-у здравих али и животиња са MC-ом које су биле чуване на собној температури у поређењу са аналогним контролним групама животиња. Са друге стране, истовремени третман комбинацијом ова два лека уз излагање ниским температурама није успео да смањи експресију TNFα у sWAT-у здравих као ни пацова са MC-ом у поређењу са аналогним контролним групама животиња које су биле изложене протоколу хлађења (График 51).

Протокол хлађења самостално примењен или уз истовремени третман валсартан/сакубитрило, значајно је повећао ниво експресије цитокина TNFα у sWAT-у животиња са MC-ом у поређењу са аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури. Са друге стране, утицај излагања хладноћи на повећање у нивоу TNFα експресије у sWAT-у здравих контролних као ни здравих пацова који су били третиран валсартан/сакубитрилом није примењен у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури (График 51).

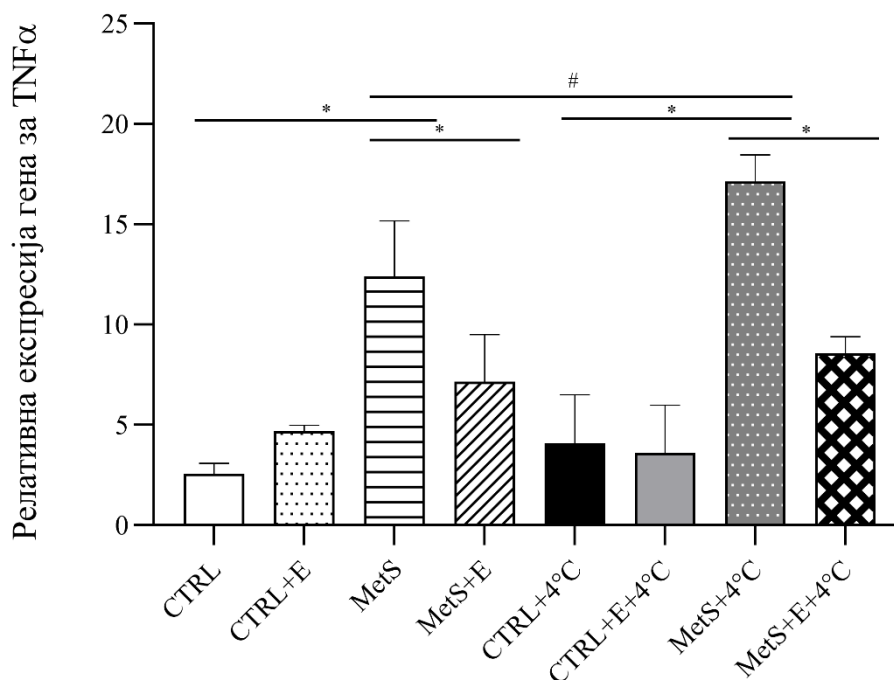


График 52. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију TNFα у ретроперитонеалном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). *статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); #статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Релативна експресија TNFα у rWAT-у здравих животиња била је значајно нижа у односу на групу пацова код којих је индукован MC при оба температурна протокола. Субакутна примена валсартан/сакубитрила није довела до статистички значајне разлике у експресији овог цитокина у rWAT-у здравих животиња у односу на здраву контролну групу пацова при оба температурна протокола. Са друге стране, третман животиња са MC-ом оралном суспензијом валсартан/сакубитрила значајно је смањила експресију TNFα у rWAT-у у поређењу са контролном групом пацова са MC-ом, при оба температурна протокола (**График 52**).

Протокол излагања хладноћи није довео до статистички значајних промена у релативној експресији TNFα у rWAT-у у односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури, изузев животиња са MC-ом код којих је протокол хлађења значајно повећао експресију TNFα у rWAT-у у поређењу са аналогном групом пацова која је била чувана на собној температури (**График 52**).

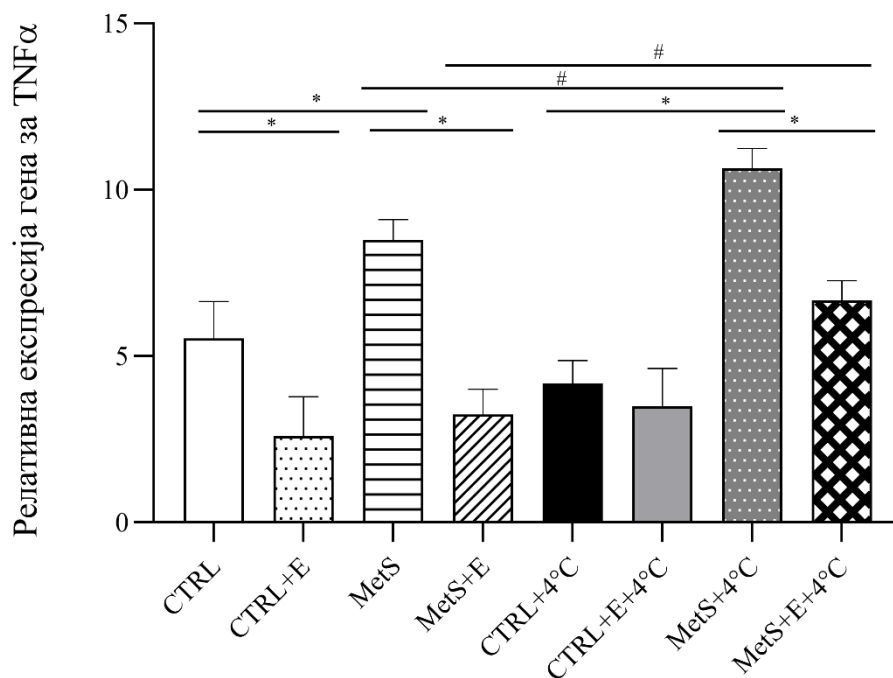


График 53. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања различитим температурама окружења на релативну генску експресију TNFα у епидидималном масном ткиву. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$); # статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења ($p < 0,05$).

Здраве животиње које су биле чуване на собној температури или изложене протоколу хлађења имале су значајно нижи степен релативне експресије TNFα у еWAT-у у односу на аналогне групе пацова код којих је индукован МС. Са друге стране, примена валсартан/сакубитрила значајно је смањила експресију TNFα у еWAT-у здравих али и животиња са МС-ом у односу на аналогне контролне групе пацова које су биле чуване на собној температури. Такође, третман комбинацијом ова два лека и излагање протоколу хлађења значајно је смањио ниво експресије TNFα у еWAT-у животиња са МС-ом у односу на контролну групу пацова са МС-ом која је била изложена протоколу хлађења. Међутим, истовремени третман валсартан/сакубитрилом и излагање протоколу хлађења није значајно самњио експресију TNFα у еWAT-у здравих животиња у односу на контролну групу здравих пацова која је била изложена ниским температурама окружења (График 53).

Протокол излагања ниским температурама смањио је значајно експресију TNFα у еWAT-у контролних као и фармаколошки третираних животиња са МС-ом у односу на аналогне групе пацова које су биле чуване на собној температури. Међутим, утицај излагања хладноћи здравих контролних као ни фармаколошки третираних здравих пацова на експресију TNFα у еWAT-у није примећен у поређењу са аналогним групама здравих пацова које су биле чуване на собној температури током експерименталног периода (График 53).

4.9. Утицај експерименталног протокола на *ex vivo* функцију срца пацова

4.9.1. Упоредна анализа кардиодинамских параметара и вредности коронарног протока изолованог срца животиња које су биле чуване на собној температури

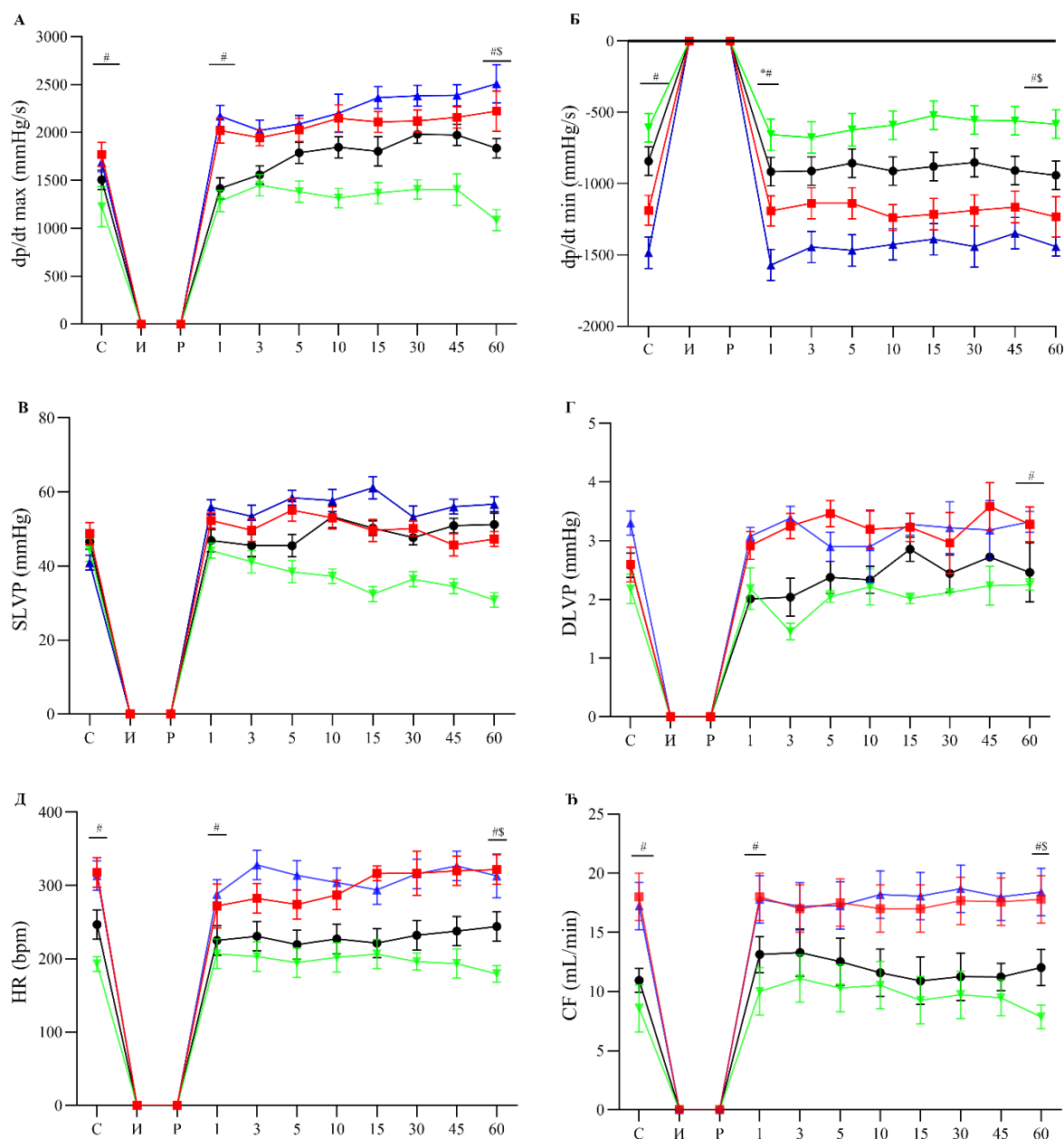


График 54. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом животиња на кардиодинамске параметре. (А) $dp/dt \max$ - максимална стопа развоја притиска у левој комори; (Б) $dp/dt \min$ - минимална стопа развоја притиска у левој комори; (В) SLVP - систолни притисак у левој комори; (Г) DLVP - дијастолни притисак у левој комори; (Д) HR - срчана фреквенца; (Ѕ) CF - коронарни проток. —■— здрава група нетретираних пацова; —▲— здрави пацови који су били третирани валсартан/сакубитрилом; —▼— животиње са MC-ом; —●— животиње са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). * $p < 0,05$ CTRL vs. CTRL+E; # $p < 0,05$ CTRL vs. MetS; \$ $p < 0,05$ MetS vs. MetS+E.

Утицај четворонедељног третмана оралном суспензијом валсартан/сакубитрила на кардиодинамске параметре здравих и животиња са МС-ом који су праћени на моделу *ex vivo* И/Р приказане су на **Графику 54**. Животиње са МС-ом имале су значајно мање вредности $dp/dt \max$ (C, R1', R60'), $dp/dt \min$ (C, R1', R60'), DLVP (R60'), HR (C, R1', R60') и CF(C, R1', R60') у поређењу са здравом контролном групом животиња. Са друге стране, субакутна примена валсартан/сакубитрила значајно је побољшала контрактилну способност миокарда ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$), срчану фреквенцу и коронарни проток на крају реперфузионог периода код животиња са МС-ом односу на аналогну контролну групу животиња.

4.9.2. Упоредна анализа кардиодинамских параметара и вредности коронарног протока изолованог срца животиња које су биле изложене протоколу хлађења

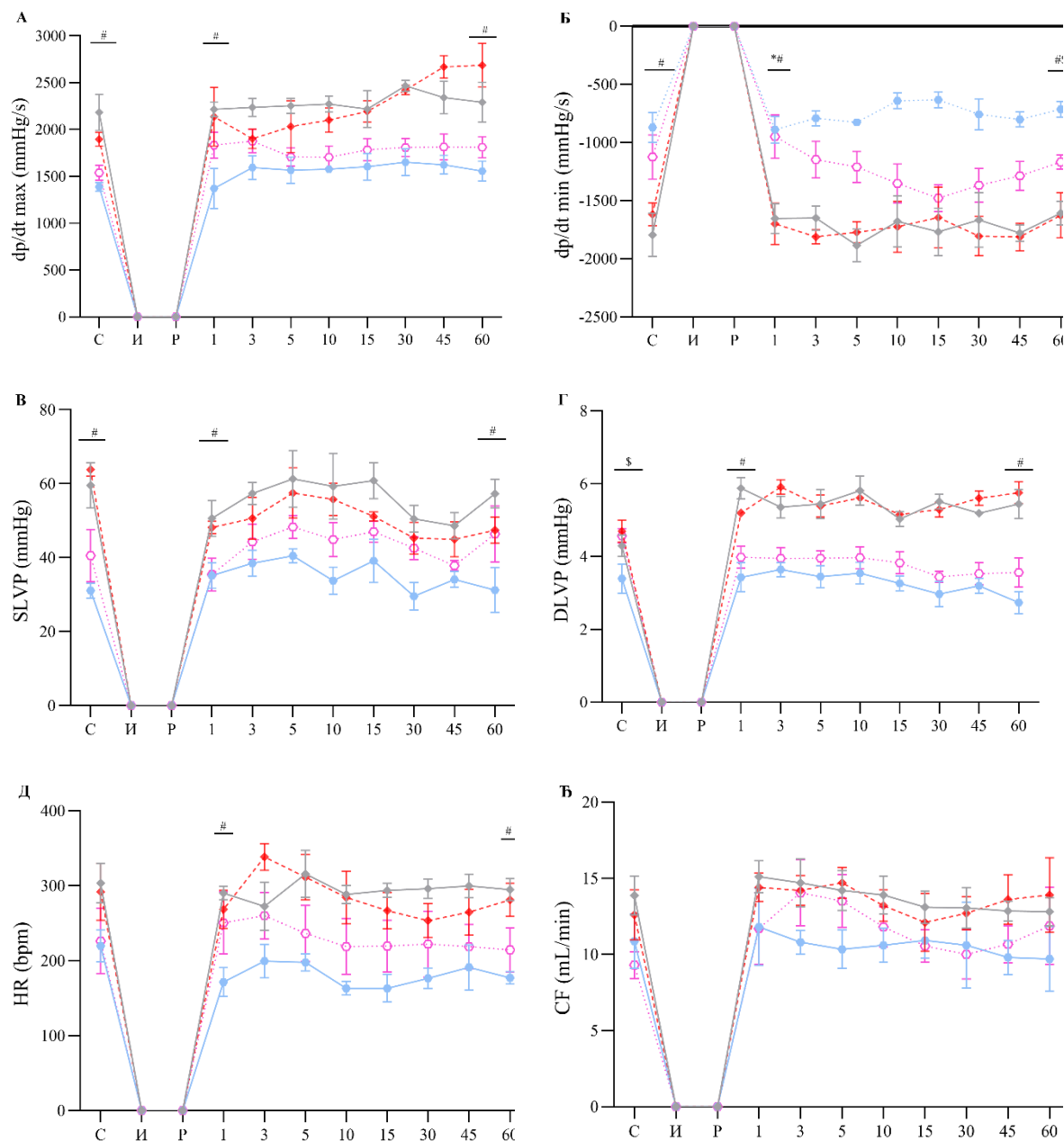


График 55. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на кардиодинамске параметре. (А) dp/dt max - максимална стопа развоја притиска у левој комори; (Б) dp/dt min - минимална стопа развоја притиска у левој комори; (В) SLVP - систолни притисак у левој комори; (Г) DLVP - дијастолни притисак у левој комори; (Д) HR - срчана фреквенца; (Е) CF - коронарни проток. —◆— здрава група нетретираних животиња; —◆— здрава група животиња која је била третирана валсартан/сакубитрилом; —■— животиње са MC-ом; —■— животиње са MC-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm SD$). * $p < 0,05$ CTRL+4C° vs. CTRL+E+4C°; # $p < 0,05$ CTRL+4C° vs. MetS+4C°; § $p < 0,05$ MetS+4C° vs. MetS+E+4C°.

Разлике у кардиодинамским параметрима након *ex vivo* индуковане И/П повреде здравих и животиња са MC које су биле подвргнуте протоколу хлађења и третману

валсартан/сакубитрилом приказане су на **Графику 55**. Значајно смањење dp/dt max (C, R1', R60'), dp/dt min (C, R1', R60'), SLVP (C, R1', R60'), DLVP (R1', R60') и HR (R1', R60') примећено је у групи нетретираних животиња са MC-ом у односу на здраву контролну групу пацова која је била изложена протоколу хлађења. Са друге стране, четворонедељни третман здравих животиња валсартан/сакубитрилом побољшао је dp/dt min (R1') у односу на здраву нетретiranу групу животиња, док је у групи пацова са MC-ом ова фармаколошка комбинација повећала dp/dt min на крају реперфузионог периода (R60').

4.9.3. Упоредна анализа утицаја температурних разлика на кардиодинамске параметре и вредности коронарног протока

Табела 16. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на кардиодинамске параметре.

Стабилизација	Кардиодинамски параметри					
	dp/dt max (mmHg/s)	dp/dt min (mmHg/s)	SLVP (mmHg)	DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (mL/min)
CTRL	1771,20±12,15	-1186,71±12,03	48,82±4,21	2,62±0,12	317,94±29,67	18,04±1,51
CTRL+E	1689,27±10,24	-1483,44±15,15	40,95±3,82	3,38±0,25	313,55±30,54	17,12±2,02
CTRL+4°C	2182,95±19,81 ^a	-1793,98±17,43 ^a	59,68±4,93	4,37±0,38	303,62±28,62	13,92±1,21
CTRL+E+4°C	1895,20±16,21	-1618,75±17,05	63,88±5,97	4,74±0,42	291,91±30,15	12,68±2,53
MetS	1226,28±9,47	-608,34±5,99	44,57±4,19	2,21±0,20	193,08±18,88	8,62±1,08
MetS+E	1506,16±14,21	-842,10±7,49	46,55±4,27	2,51±0,18	246,90±23,55	10,09±0,52
MetS+4°C	1388,57±11,85	-869,20±8,55 ^a	31,10±3,04	3,42±0,36	219,93±20,74	9,03±0,15
MetS+E+4°C	1538,22±13,34	-1123,85±12,11 ^a	40,63±3,91	4,65±0,42	226,19±23,06	10,81±0,99
R1'	Кардиодинамски параметри					
	dp/dt max (mmHg/s)	dp/dt min (mmHg/s)	SLVP (mmHg)	DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (mL/min)
CTRL	2020,82±19,54	-1190,71±10,88	52,31±5,18	2,91±0,25	272,17±28,15	18,05±1,45
CTRL+E	2171,74±22,51	-1570,18±16,52	55,91±5,63	3,13±0,29	288,13±29,05	17,82±2,02
CTRL+4°C	2137,21±19,52	-1652,35±15,97 ^a	50,77±4,87	5,91±0,52	290,05±27,44	15,12±1,69
CTRL+E+4°C	2215,05±20,65	-1697,96±17,01	48,28±5,06	5,25±0,58	268,55±27,11	14,46±1,33
MetS	1283,72±14,08	-656,61±7,41	44,23±3,92	2,23±0,19	206,96±19,93	10,07±1,25
MetS+E	1415,16±13,77	-916,09±11,06	46,25±4,45	2,07±0,14	225,33±21,11	13,17±1,52
MetS+4°C	1370,40±12,85	-889,17±9,16	35,08±3,20	3,45±0,31	171,36±18,04	11,55±1,36
MetS+E+4°C	1832,89±16,52 ^a	-949,14±10,18	35,46±3,11	4,07±0,39	250,44±24,49	11,72±1,45
R60'	Кардиодинамски параметри					
	dp/dt max (mmHg/s)	dp/dt min (mmHg/s)	SLVP (mmHg)	DLVP (mmHg)	HR (bpm)	CF (mL/min)
CTRL	2224,70±23,45	-1233,33±11,85	47,30±4,60	3,32±0,29	321,71±33,25	17,81±2,02
CTRL+E	2508,92±24,99	-1440,63±14,78	56,75±5,31	3,20±0,34	313,10±30,66	18,42±2,12
CTRL+4°C	2292,05±23,01	-1625,02±16,96 ^a	57,33±5,56	5,46±0,48	294,94±31,01	12,84±1,52
CTRL+E+4°C	2685,17±25,87	-1627,36±15,63	47,46±4,90	5,87±0,51	281,39±27,79	13,94±1,58
MetS	1084,34±9,98	-583,04±4,25	30,92±2,74	2,31±0,19	179,63±18,45	7,96±0,96
MetS+E	1837,28±19,02	-941,23±10,08	51,21±4,83	2,50±0,23	244,27±25,56	12,07±1,44
MetS+4°C	1557,98±16,22 ^a	-713,45±8,11	31,28±2,90	2,73±0,17	177,21±18,06	9,74±1,21
MetS+E+4°C	1810,93±19,11	-1166,84±13,56	46,46±4,42	3,61±0,27	214,64±20,99	11,92±1,49

dp/dt max - максимална стопа развоја притиска у левој комори; dp/dt min - минимална стопа развоја притиска у левој комори; SLVP - систолни притисак у левој комори; DLVP - дијастолни притисак у левој комори; HR - срчана фреквенца; CF - коронарни проток. R1' - први минут реперфузије; R60' - последњи минут реперфузије. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($X \pm SD$).^a статистички значајна разлика између аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Утицај излагања хладноћи на кардиодинамске параметре у односу на групе животиња које су биле чуване на собној температури током експерименталног периода приказан је у **Табели 16**. Излагање здравих нетретираних животиња протоколу хлађења побољшало је контрактилну способност миокарда dp/dt max (C) и dp/dt min (C, R1', R60') у односу на здраве нетретиране пацове који су били чувани на собној температури. Такође, нетретиране животиње којима је индукован MC и које су биле изложене ниским температурама имале су значајно веће вредности dp/dt max (R60') и dp/dt min (C) у односу на аналогну групу пацова која је била чувана на собној температури. Истовремени третман валсартан/сакубитрилом и излагање хладноћи значајно је побољшао контрактилну функцију миокарда животиња са MC-ом dp/dt max (R61') и dp/dt min (C) у односу на аналогну групу животиња са MC-ом које су боравиле на собној температури током експерименталног периода. Статистички значајна разлика у вредностима других испитиваних кардиодинамских параметара није примећена између аналогних група животиња које су биле изложене различитим температурама окружења (**Табела 16**).

4.10. Утицај експерименталног протокола на вредност прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента

4.10.1. Упоредна анализа нивоа прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента између група животиња које су биле чуване на собној температури

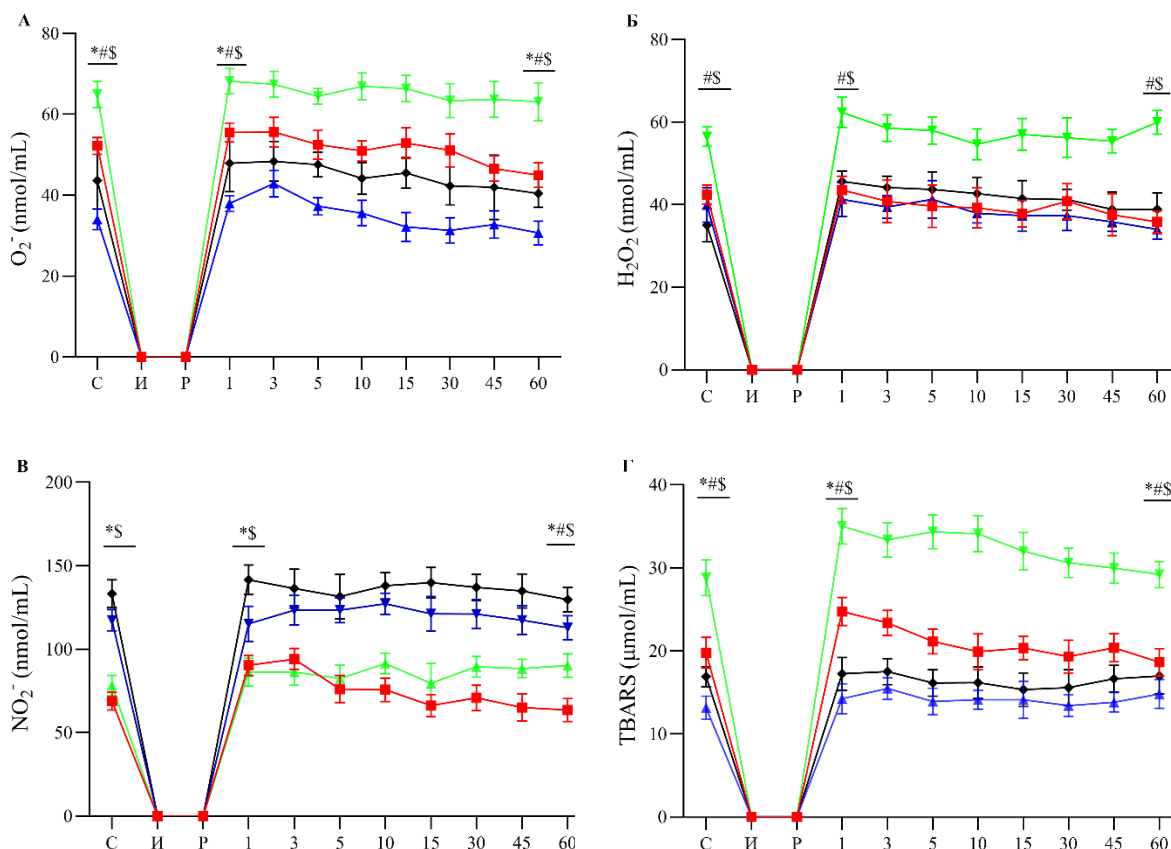


График 56. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом на ниво прооксидационих молекула у коронарном венском ефлуенту. (А) $O_2^{\bullet-}$ - супероксид анјон радикал; (Б) H_2O_2 - водоник пероксид; (В) $NO_2^{\bullet-}$ - нитрити и (Г) TBARS - индекс липидне пероксидације. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). —■— здрава група нетретираних пацова; —▲— здрави пацови који су били третиран валсартан/сакубитрилом; —▼— животиње са МС-ом; —◆— животиње са МС-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$). * $p < 0,05$ CTRL vs. CTRL+E; # $p < 0,05$ CTRL vs. MetS; \$ $p < 0,05$ MetS vs. MetS+E.

Утицај примене валсартан/сакубитрила на ниво прооксидационих молекула из узорака коронарног венског ефлуента здравих животиња приказан је на **Графику 56**. Нетретиране животиње са МС-ом имале су значајно већи ниво прооксидационих молекула $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и TBARS у поређењу са здравом контролном групом пацова у свим тачкама од интереса током експерименталног протокола. Међутим, примена валсартан/сакубитрила значајно је смањила ниво $O_2^{\bullet-}$ и TBARS у групи здравих и животиња са МС-ом у поређењу са нетретираном здравом групом животиња у периоду стабилизације као и током реперфузионог периода. Штавише, орална суспензија ових лекова смањила је концентрације $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и TBARS у групи животиња са МС-ом у односу на нетретирану групу пацова са индукованим МС-ом у тренутку С и периоду

реперфузије (R1' и R60'). Са друге стране, здраве али и животиње са МС-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом имале су значајно већи ниво NO_2^- у односу на аналогне контролне групе животиња.

4.10.2. Упоредна анализа нивоа прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента између група животиња које су биле изложене протоколу хлађења

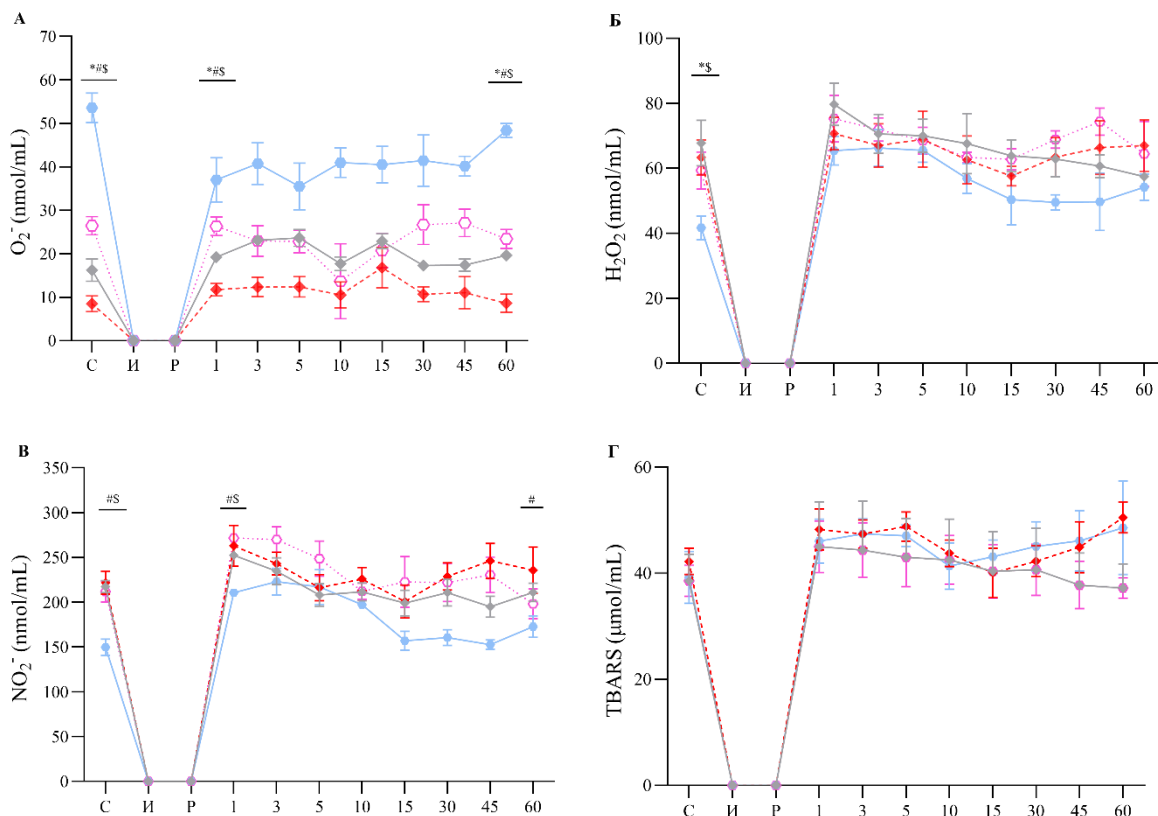


График 57. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и протокола излагања хладноћи на ниво прооксидационих молекула у коронарном венском ефлуенту. (А) O_2^- - супероксид анјон радикал; (Б) H_2O_2 - водоник пероксид; (В) NO_2^- - нитрити и (Г) TBARS - индекс липидне пероксидације. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm \text{SD}$). —◆— здрава група нетретираних животиња; —◆— здрава група животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом; —●— животиње са МС-ом; —●— животиње са МС-ом третиране валсартан/сакубитрилом. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($\bar{X} \pm \text{SD}$). * $p < 0,05$ CTRL+4C° vs. CTRL+E+4C°; # $p < 0,05$ CTRL+4C° vs. MetS+4C°; \$ $p < 0,05$ MetS+4C° vs. MetS+E+4C°.

Разлике у нивоу прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента здравих и животиња са МС-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом приказане су на **Графику 57**. Значајно више вредности O_2^- примећене су у групи животиња са МС-ом у поређењу са здравом контролном групом животиња током периода стабилизације као и у реперфузионом периоду. Са друге стране, субакутна примена валсартан/сакубитрила у групи здравих животиња довела је до значајног смањења нивоа O_2^- (C, R1', R60') и H_2O_2 (C) у поређењу са здравом нетретираном групом пацова. Такође, четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом животиња са МС-ом

смањено је ниво O_2^- (C R1', R60'), H_2O_2 (R60') и NO_2^- (C и R1') у односу на нетретирану групу животиња са MC-ом.

4.10.3. Упоредна анализа утицаја температурних разлика на нивое прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента

Табела 17. Поређење ефекта фармаколошког третмана и излагања различитим температурама окружења на ниво прооксидационих молекула у коронарном венском ефлуенту.

Стабилизација	Прооксидациони параметри			
	O_2^-	H_2O_2	NO_2^-	TBARS
CTRL	52,25±6,05	42,40±3,96	68,88±7,05	19,79±2,01
CTRL+E	34,06±4,11	39,94±4,15	117,42±12,11	13,16±1,25
CTRL+4°C	16,26±1,78 ^a	67,77±7,08 ^a	218,52±20,95 ^a	38,18±3,75 ^a
CTRL+E+4°C	8,50±0,78 ^a	63,39±7,12 ^a	221,95±21,36 ^a	42,20±4,02 ^a
MetS	64,88±6,32	56,49±6,03	78,23±8,12	28,81±3,06
MetS+E	43,63±5,01	35,04±3,78	133,19±14,16	16,92±2,12
MetS+4°C	53,55±5,98	41,69±3,99 ^a	149,67±13,89 ^a	39,24±4,12 ^a
MetS+E+4°C	26,46±2,84 ^a	59,38±6,56 ^a	211,79±20,84 ^a	38,56±3,78 ^a
R1'	Прооксидациони параметри			
	O_2^-	H_2O_2	NO_2^-	TBARS
CTRL	55,47±4,95	43,57±5,08	90,47±9,16	24,73±3,02
CTRL+E	37,99±4,11	41,29±4,58	115,21±12,15	14,26±1,75
CTRL+4°C	19,24±2,20 ^a	79,69±8,39 ^a	252,58±24,92 ^a	45,16±5,12 ^a
CTRL+E+4°C	11,77±1,32 ^a	70,72±8,02 ^a	262,84±26,02 ^a	48,28±4,99 ^a
MetS	68,14±7,12	62,33±6,95	86,37±9,08	35,00±3,75
MetS+E	47,91±5,01	45,62±4,71	141,62±13,99	17,23±2,02
MetS+4°C	37,04±4,12 ^a	65,44±6,14	210,59±20,39 ^a	46,07±5,54 ^a
MetS+E+4°C	26,35±3,01 ^a	75,25±7,05 ^a	271,62±26,33 ^a	45,00±5,36 ^a
R60'	Прооксидациони параметри			
	O_2^-	H_2O_2	NO_2^-	TBARS
CTRL	44,99±4,51	35,84±4,18	63,61±6,48	18,66±2,15
CTRL+E	30,67±3,52	34,06±3,78	112,92±12,01	14,82±1,62
CTRL+4°C	19,63±2,06 ^a	57,44±5,14 ^a	210,91±20,07 ^a	37,74±4,48 ^a
CTRL+E+4°C	8,63±7,52 ^a	67,07±8,02 ^a	235,85±24,74 ^a	50,55±6,01 ^a
MetS	63,12±6,19	59,97±6,12	90,19±9,57	29,21±3,03
MetS+E	40,45±4,17	38,91±4,04	129,67±13,67	16,99±1,85
MetS+4°C	48,41±5,12 ^a	54,19±5,09 ^a	172,73±16,68 ^a	48,57±6,98 ^a
MetS+E+4°C	23,39±3,01 ^a	64,43±6,15 ^a	198,14±20,28 ^a	37,22±3,12 ^a

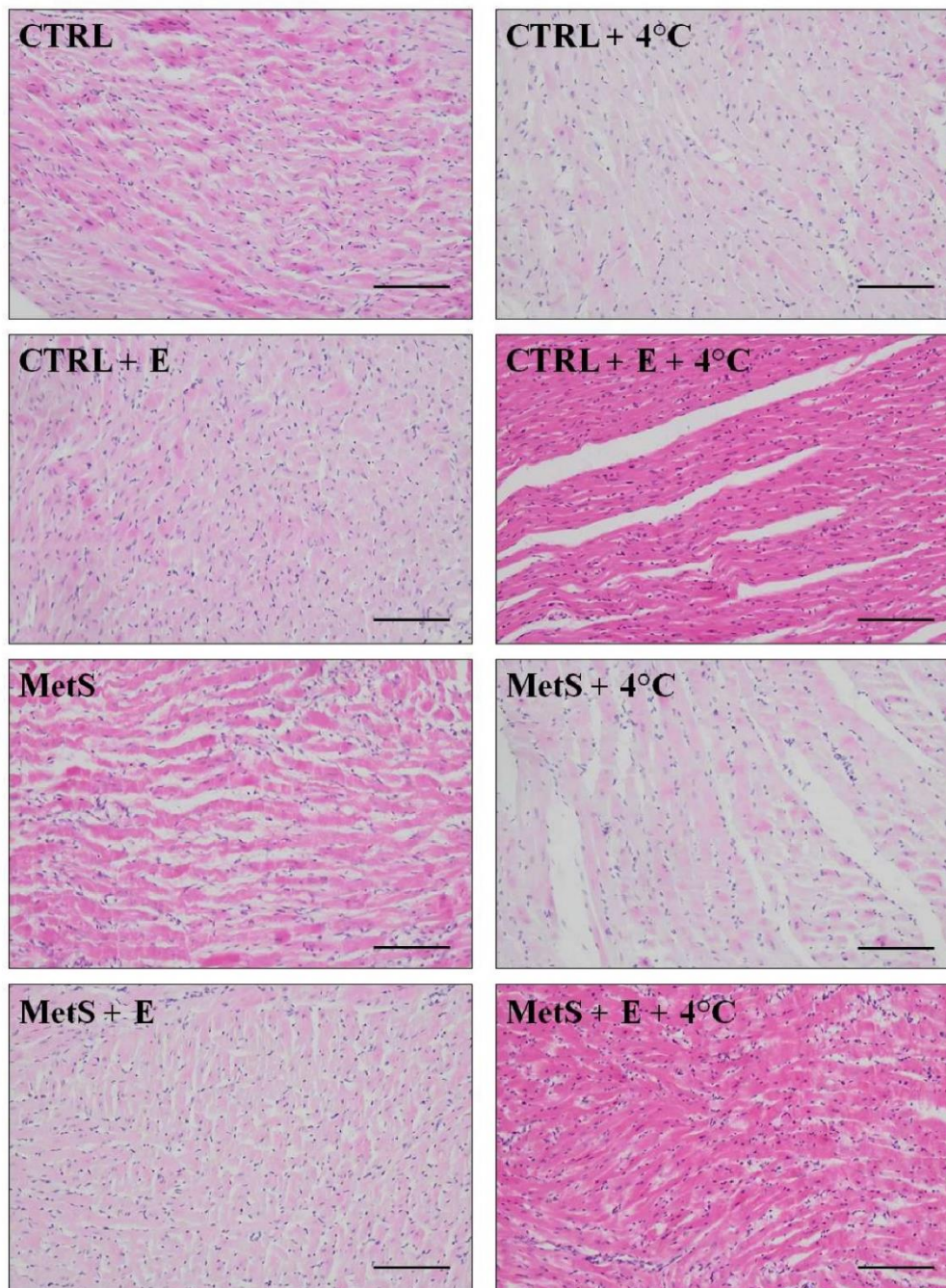
O_2^- - супероксид анјон радикал; H_2O_2 - водоник пероксид; NO_2^- - нитрити и TBARS - индекс липидне пероксидације. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($X \pm SD$).^a статистички значајна разлика између

аналогних група које су биле подвргнуте истом протоколу на различитим температурама окружења.

Утицај протокола хлађења у односу на аналогне групе које су биле чуване на собној температури на вредности прооксидационих молекула у узорцима коронарног венског ефлуента приказан је у **Табели 17**. Излагање здравих нетретираних животиња протоколу хлађења значајно је смањио ниво $O_2^{\cdot-}$ али и повећао вредности осталих прооксиданаса у односу на групу здравих животиња које су биле чуване на собној температури током целог реперфузионог периода и у периоду стабилизације. Исти тренд је примећен и између здравих животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и изложене протоколу хлађења у односу на аналогну групу пацова која је била чувана на собној температури. Са друге стране, код животиња са МС-ом које су чуване на ниској температури није примећена значајна разлика нивоа прооксиданаса у поређењу са аналогном групом животиња које су боравиле на собној температури. Субакутни третман животиња са МС-ом комбинацијом валсартан/сакубитрила уз излагање хладноћи смањио је ниво $O_2^{\cdot-}$ али са друге стране и повећао ниво осталих прооксиданаса у односу на аналогну групу животиња која је била чувана при собној температури у свим тачкама од интереса.

4.11. Патохистолошка анализа ћелија срчаног ткива након *ex vivo*-индуковане И/Р повреде

4.11.1. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања хладноћи на структуру кардиомиоцита - Н/Е бојење



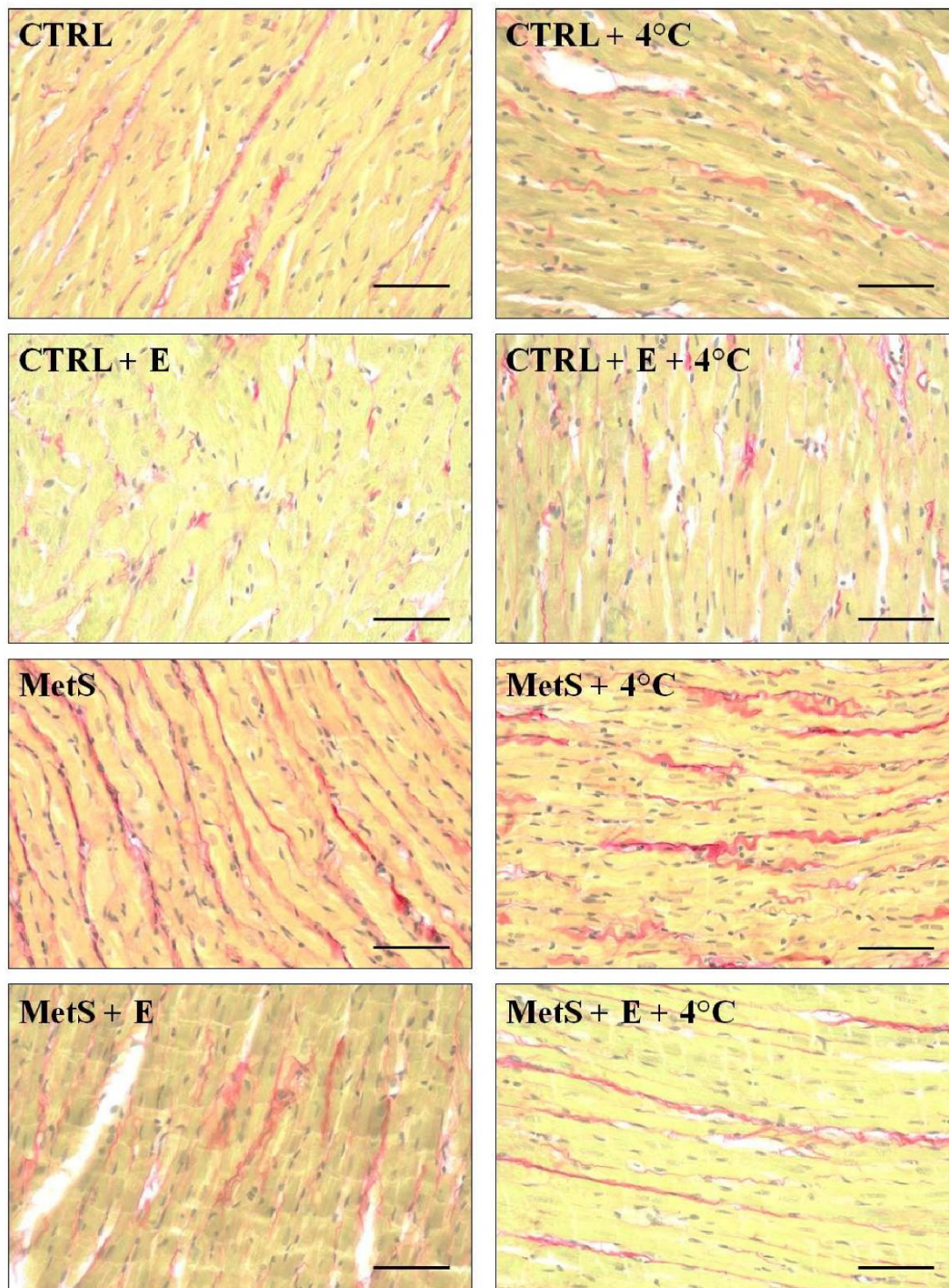
Слика 46. Репрезентативне слике попречног пресека ткива миокарда обојених Н/Е методом. Увећање 200х.

Резултати патохистолошке анализе миокарда након Н/Е бојења приказани су на Слици 46. У контролној групи пацова уочава се инфламација, исхемијске промене, присуство таласастих влакана, дискретан едем интерстицијума као и хипертрофија срчаних мишићних ћелија. Са друге стране, слабије изражене исхемијске промене,

инфламација као и хипертрофија појединачних срчаних мишићних ћелија биле су уочене на попречном пресеку миокарда здравих животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом, при чему није уочено присуство таласастих влакана. Индукција МС-а узроковала је појаву таласастих влакана, изражен едем интерстицијума, инфламацију као и хипертрофију кардиомиоцита. Међутим, у групи животиња са МС-ом које су биле третиране валсартан/сакубитрилом уочена је инфламација, слабији степен исхемијских промена без присуства хипертрофије кардиомиоцита.

Са друге стране, на попречним пресецима ткива миокарда животиња из контролне групе пацова које су биле подвргнуте хлађењу уочава се инфламација, хипертрофија кардиомиоцита и исхемијске промене, без присуства таласастих влакана. Дискретна инфламација и присуство таласастих влакана на појединим местима, без присуства исхемијских промена и хипертрофије кардиомиоцита уочено је у групи животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом уз истовремено излагање хладноћи. У групи животиња код којих је индукован МС и које су биле подвргнуте хлађењу уочавају се исхемијске промене, хипертрофија кардиомиоцита и инфламација. Међутим, третман животиња са МС-ом валсартан/сакубитрилом уз истовремено излагање хипотермијским условима довео је до мањег степена инфламације срчаних мишићних ћелија, без присуства таласастих влакана као и редукованих исхемијских промена и хипертрофије ћелија миокарда (Слика 46).

4.11.2. Ефекат третмана валсартан/сакубитрилом и излагања хладноћи на структуру кардиомиоцита - *Picricus Sirious Red* бојење



Слика 47. Репрезентативне слике попречног пресека ткива миокарда обојених *Picricus Sirious Red* методом. Увећање 400х.

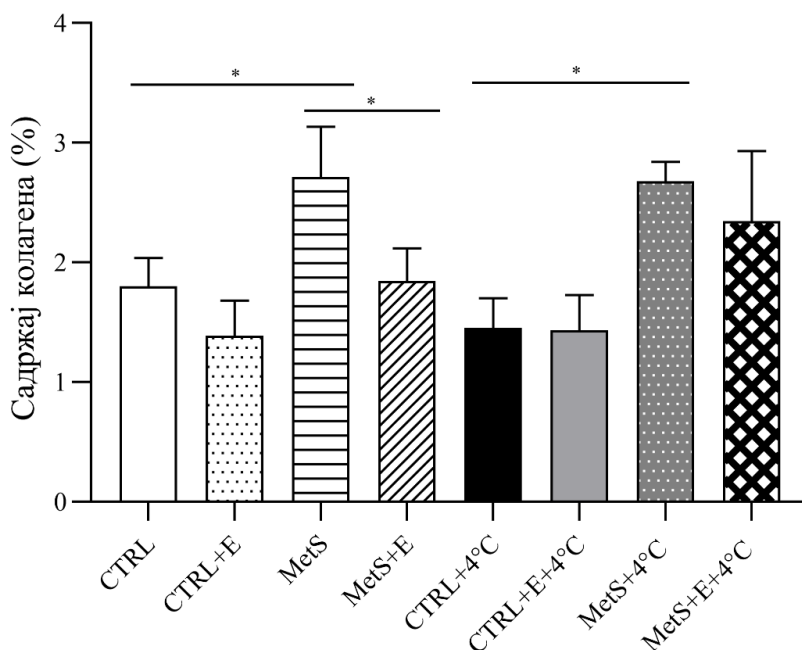


График 58. Процентуалне вредности колагених влакана у ткиву миокарда животиња које су биле подвргнуте И/Р експерименталном протоколу.
* статистички значајна разлика у поређењу са аналогном контролном групом ($p < 0,05$).

У циљу испитивања ефекта примењеног фармаколошког третмана и излагања хладноћи на садржај колагена и фиброзу миокарда животиња након *ex vivo* спроведене И/Р повреде, срчано ткиво је обојено *Sirious Red* методом при чему су резултати приказани на **Слици 47** док је квантификација колагених влакана процентуално приказана на **Графику 58**. Добијени резултати указују на значајно већи садржај колагена у групи животиња са МС-ом у односу на здраву контролну групу пацова при оба температурна протокола, што јасно указује на фиброзу миокарда животиња са МС-ом. Међутим, четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом је значајно смањио садржај колагена у миокарду животиња са МС које су биле чуване на собној температури у односу на аналогну нетретирану групу пацова. Са друге стране, садржај колагена у миокарду животиња које су биле изложене ниским температурама био је сличан са вредностима измереним у аналогним групама пацова које су биле чуване на собној температури.

4.12. *In silico* резултати

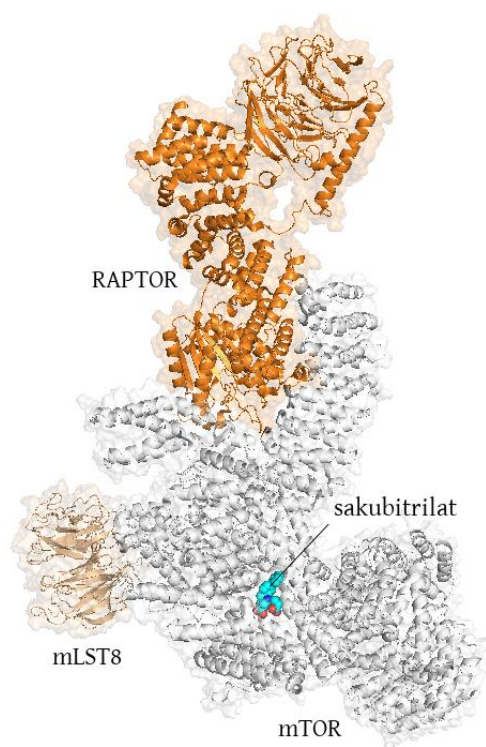
4.12.1. Анализа молекулског уклапања

У циљу идентификације потенцијалних сигналних путева који су укључени у фармаколошку промоцију *browning*-а, иницијално је спроведена *in silico* студија молекулског уклапања сакубитрилата и валсартана у подјединице mTORC1. Афинитет везивања ових молекула процењен је на основу слободне енергије везивања и других термодинамичких параметара, као и на основу броја и типа нековалентних везујућих интеракција. Параметри молекулског докинга за најбоље доковане конформације испитиваних једињења приказани су у Табели 18.

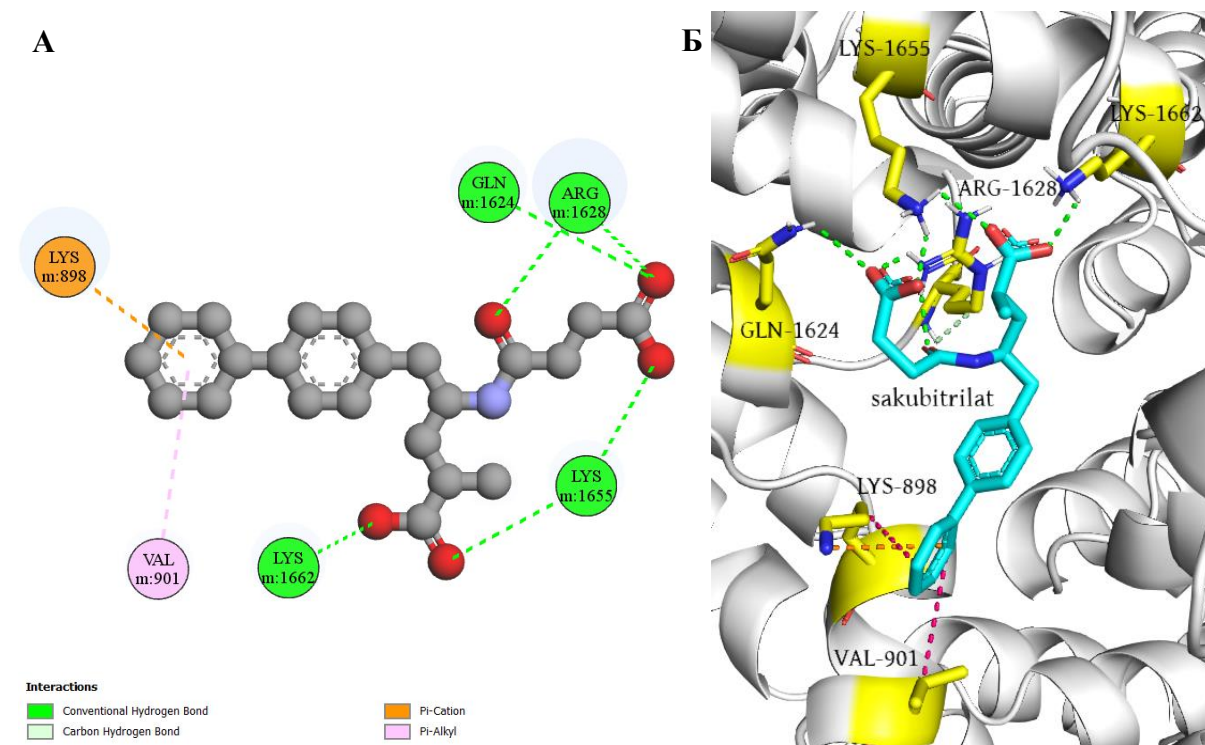
Табела 18. Параметри молекулског уклапања за најбоље доковане конформације сакубитрилата и валсартана у интеракцији са mTORC1 подјединицама.

Лиганд- протеин комплекс	ΔG_{bind} (kJ/mol)	K_b (M ⁻¹)	$\Delta G_{\text{Intermol.}}$ Energy (kJ/mol)	ΔG_{elec} (kJ/mol)	ΔG_{Final} Intermol. Energy (kJ/mol)	ΔG_{total} (kJ/mol)	ΔG_{tor} (kJ/mol)	ΔG_{unb} (kJ/mol)
Сакубитрилат -mTOR	-37,15	$3,23 \cdot 10^6$	-22,76	-25,90	-48,66	-3,72	11,46	-3,72
Сакубитрилат -mLST8	-21,92	$6,94 \cdot 10^3$	-29,33	-4,10	-33,43	-2,09	11,46	-2,09
Сакубитрилат -RAPTOR	-35,90	$1,95 \cdot 10^6$	-39,96	-7,41	-47,36	-3,39	11,46	-3,39
Валсартан- mTOR	-31,30	$3,04 \cdot 10^5$	-32,30	-10,46	-42,80	-10,17	11,46	-10,17
Валсартан- mLST8	-32,26	$4,49 \cdot 10^5$	-43,85	0,12	-43,72	-7,74	11,46	-7,74
Валсартан- RAPTOR	-27,74	$7,25 \cdot 10^4$	-35,02	-4,23	-39,20	-8,87	11,46	-8,87

Нижa вредност израчунате слободне енергије везивања, тј. докинг скорa (ΔG_{bind}) и виша вредност израчунате равнотежне константе везивања (K_b) указују на снажнију интеракцију испитиваних једињења и mTORC1 подјединица. Приликом молекулског уклапања сакубитрилата у подјединице mTORC1, највећи афинитет везивања показан је за mTOR подјединицу (Слика 48), са вредностима слободне енергије везивања од -37,15 kJ/mol и равнотежне константе везивања од $3,23 \cdot 10^6$ M⁻¹. Молекулска интеракција сакубитрилата и mTOR подјединице карактерише се грађењем шест водоничних веза са остацима GLN1624, ARG1628 (двострука интеракција), LYS1662 и LYS1655 (двострука интеракција). Бифенилно језгро сакубитрилата формира једну електростатичку π -катјон интеракцију са остатком LYS898 и једну хидрофобну π -алкил интеракцију са остатком VAL901 (Слика 49). Сакубитрилат је показао нешто нижи афинитет везивања за RAPTOR подјединицу у поређењу са mTOR подјединицом, са израчунатим докинг скором од -35,90 kJ/mol. Нешто већа вредност докинг скорa може се објаснити грађењем вишеструких хидрофобних алкил, π -алкил и амид- π интеракција, као и грађењем само три водоничне везе са остацима LYS32 (двострука интеракција) и ARG34 (Слика 50 А и Б).

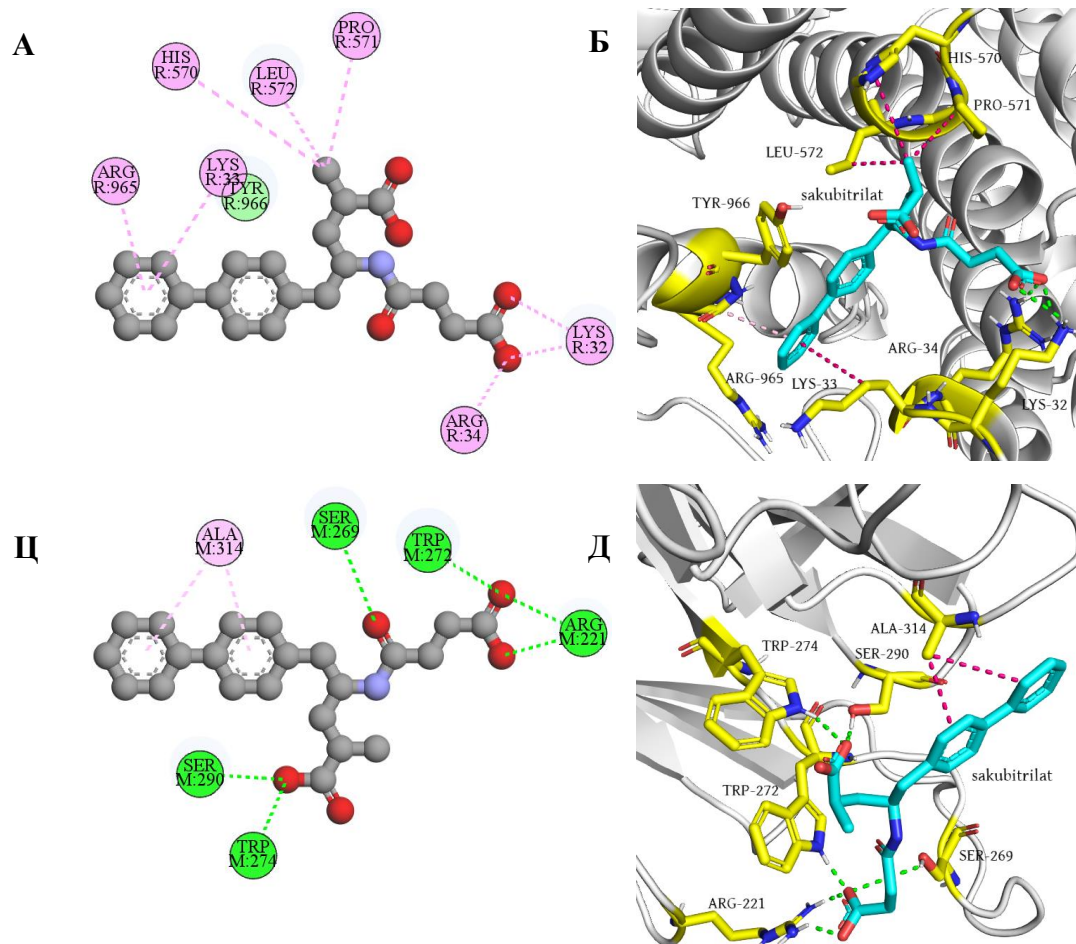


Слика 48. Приказ везивања сакубитрилата за mTOR подјединицу у оквиру mTORC1



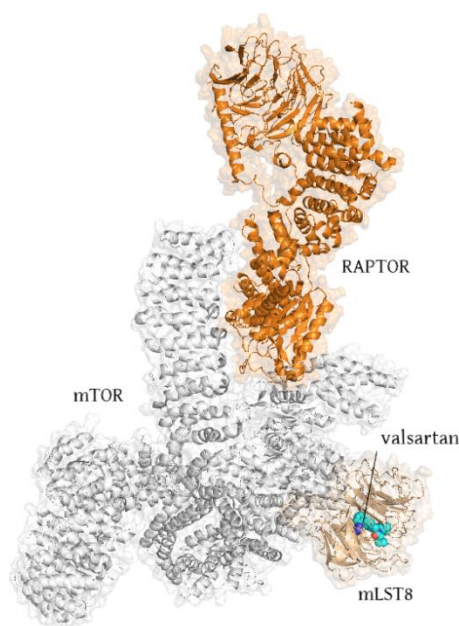
Слика 49. Дводимензионални (А) и тродимензионални (Б) приказ нековалентних интеракција које сакубитрилат формира са аминокиселинама mTOR подјединице.

Сакубитрилат интерагује са mLST8 подјединицом остварујући највиши докинг скор који износи -21,92 kJ/mol, упркос чињеници да гради шест водоничних веза са остацима ARG221 (двострука интеракција), SER269, TRP272, TRP274 и SER290. Недостатак грађења електростатичких интеракција утиче на низак афинитет овог једињења према mLST8 подјединици. (Слика 50 Ц и Д).

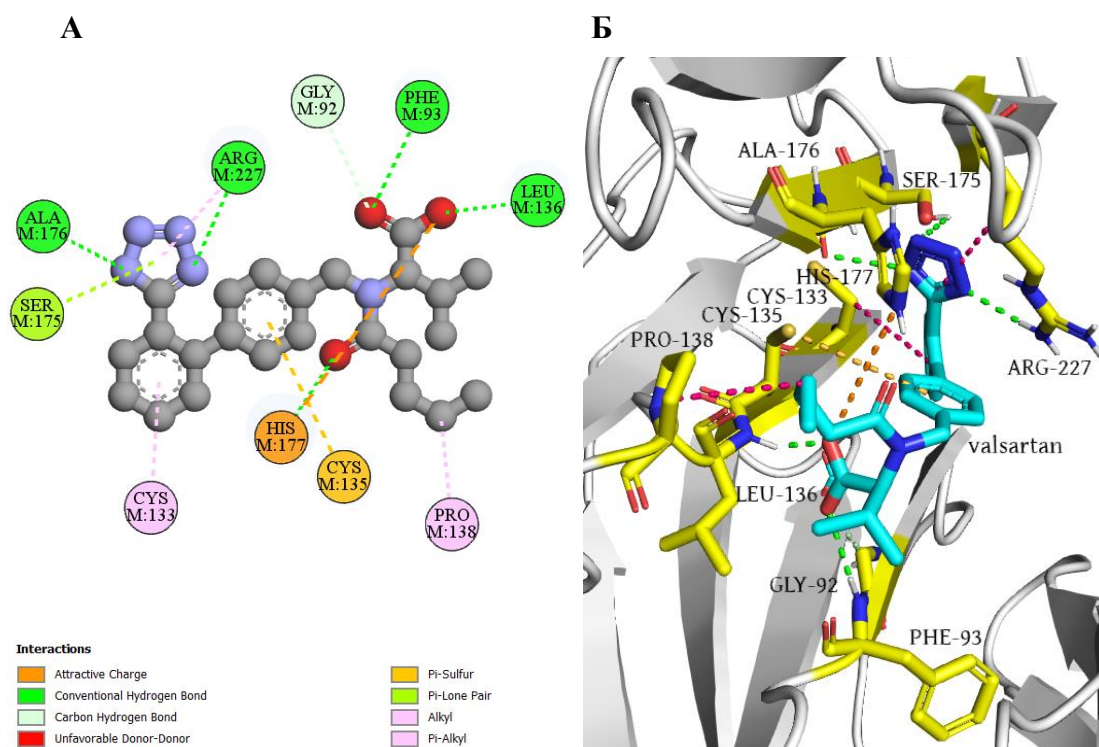


Слика 50. Дводимензионални и тродимензионални приказ молекулског уклапања сакубитрилата у структуру RAPTOR подјединице (А, Б) и mLST8 подјединице (Ц, Д). Водоничне везе су приказане зеленим испрекиданим линијама, док су хидрофобне интеракције приказане љубичастим испрекиданим линијама.

Валсартан показује највећи афинитет везивања према mLST8 подјединици (Слика 51), што се може закључити на основу вредности слободне енергије везивања (-32,26 kJ/mol) и вредности равнотежне константе везивања ($4,49 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). Ниска вредност докинг скорa може се објаснити грађењем водоничних веза са остацима PHE93, LEU136, SER175, ALA176 и ARG227, као и грађењем вишеструких хидрофобних и привлачних електростатичких интеракција (Слика 52 А и Б).



Слика 51. Приказ везивања валсартана за mLST8 подјединицу у оквиру mTORC1



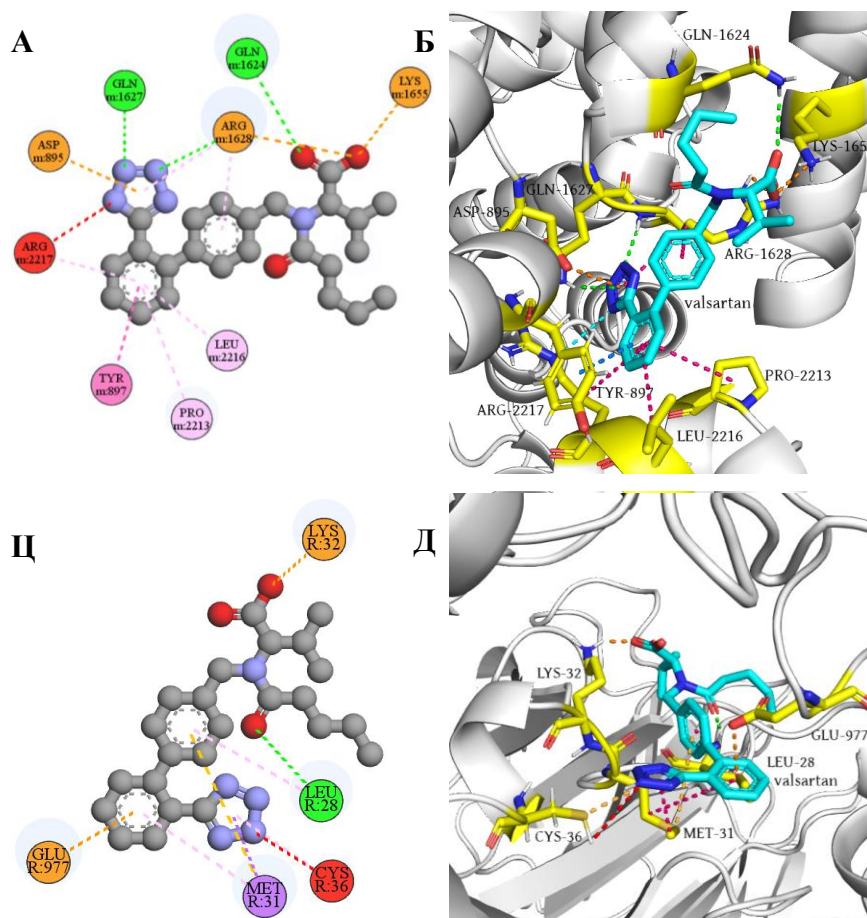
Слика 52. Дводимензионални (А) и тродимензионални (Б) приказ нековалентних интеракција које валсартан формира са аминокиселинама mLST8 подјединице.

Током молекулског докинга валсартана у mTOR подјединицу, забележена је упоредива, али ипак нешто виша вредност докинг скорa (-31,30 kJ/mol) у поређењу са вредношћу која је забележена при везивању поменутог молекула за mLST8 подјединицу. Карбоксилна група и 2H-тетразолски прстен валсартана су укључени у грађење три

привлачне електростатичке интеракције са остацима ASP895, ARG1628 и LYS1655, као и у грађење три водоничне везе са остацима GLN1624, GLN1627 и ARG1628.

Бензенов прстен повезан са 2H-тетразолом гради π - π интеракцију са остатком TYR897 и π -алкил интеракције са остацима PRO2213 и LEU2216. Међутим, стерно неповољна интеракција се гради између 2H-тетразолског прстена и остатка ARG2217, што негативно утиче на афинитет везивања овог једињења (Слика 53 А и Б).

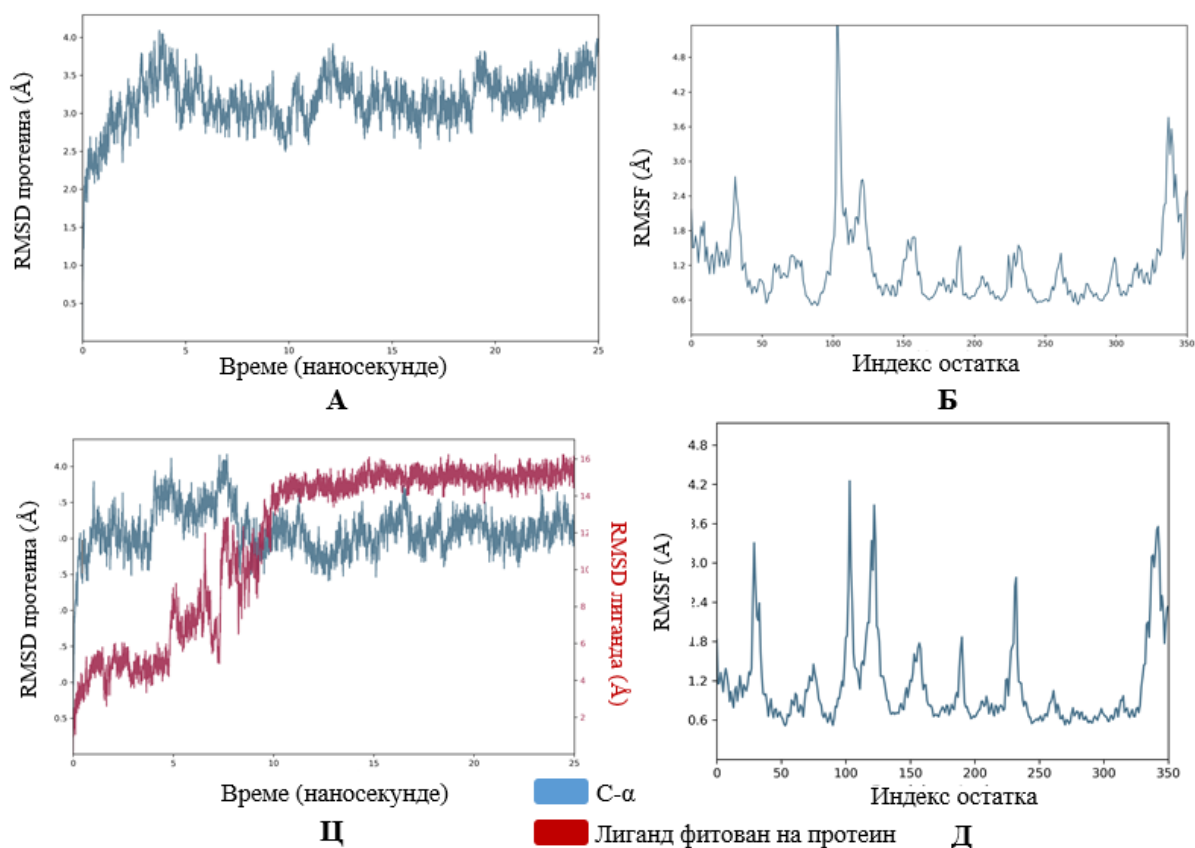
Валсартан се молекулски уклапа у RAPTOR подјединицу остварујући највишу вредност докинг скорa (-27,74 kJ/mol) у поређењу са осталим подјединицама, пре свега због грађења релативно малог броја нековалентних интеракција – осам. Наиме, само једна водонична веза се гради са остатком LEU28, као и две електростатичке интеракције са остацима LYS32 и GLU977. Преостале интеракције су хидрофобног типа, при чему се граде са прстеном 2H-тетразола. Као и у случају mTOR подјединице, тетразолски прстен валсартана интерагује са остатком CYS36, градећи притом неповољну стерну интеракцију (Слика 53 Ц и Д).



Слика 53. Дводимензионални и тродимензионални приказ молекулског уклапања валсартана у структуру mTOR подјединице (А, Б) и RAPTOR подјединице (Ц, Д). Водоничне везе су приказане зеленим испрекиданим линијама, хидрофобне интеракције су приказане љубичастим испрекиданим линијама, електростатичке интеракције су приказане наранџастим испрекиданим линијама, док је неповољна стерна интеракција приказана црвеном испрекиданом линијом.

4.12.2. Анализа молекулске динамике и MM/GBSA израчунавања

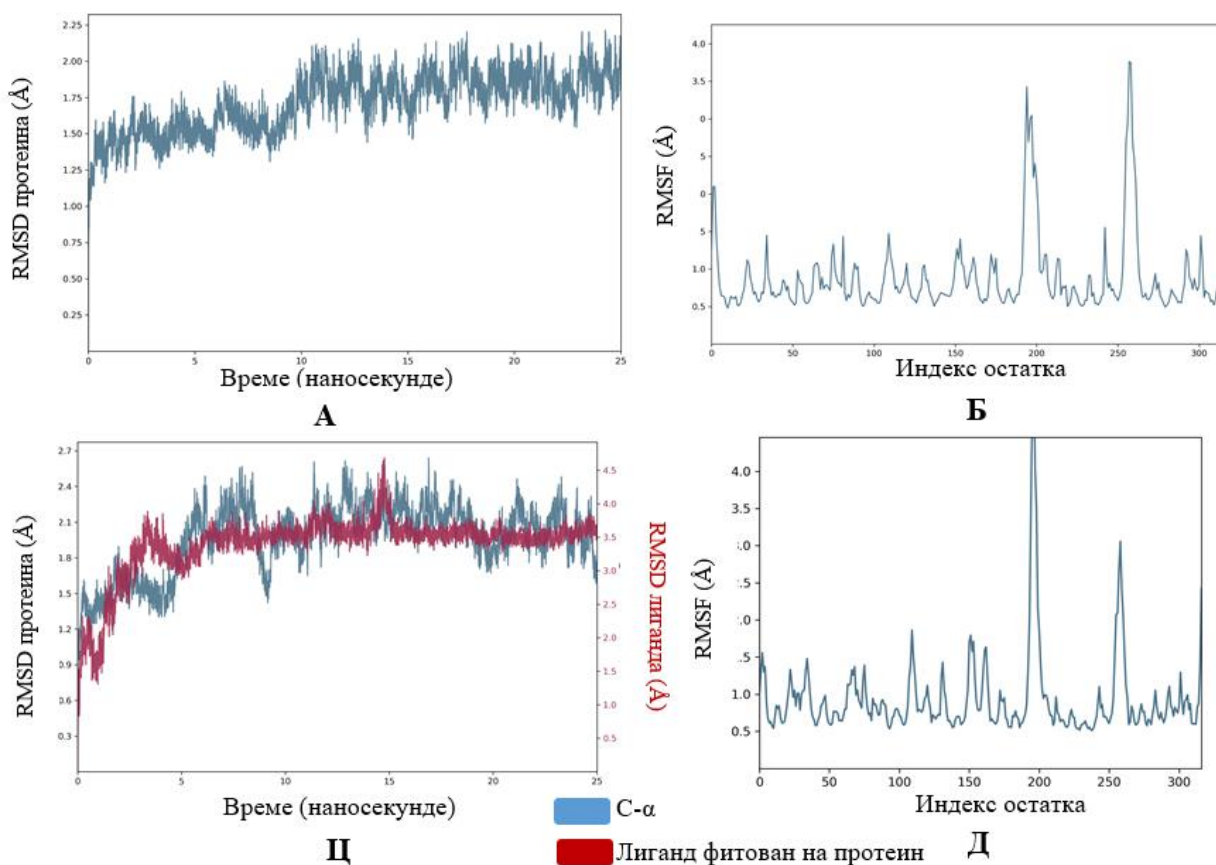
У студији молекулске динамике, испитана је конформациона стабилност сакубитрилата-*mTOR* и валсартан-*mLST8* комплекса током времена. Везујуће конформације сакубитрила и валсартана које су коришћене у студији молекулске динамике су изабране на основу афинитета везивања ових молекула који је претходно утврђен у студији молекулског докинга. RMSD (енгл. *Root Mean Square Deviation*) дијаграм указује на то да *mTOR* подјединица показује конформациону стабилност током симулације, са минималним одступањима девијација у опсегу 2-4 Å (Слика 54А). RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), при чему дијаграм показује мале локалне промене дуж протеинског ланца, осим у случају остатка LYS1452 (5,77 Å) (Слика 54Б). Сакубитрилат у комплексу са *mTOR* подјединицом показује значајна одступања у RMSD вредностима у првих 10 ps симулације, након чега се комплекс стабилизовао и остао конформационо непромењен до краја симулације (Слика 54Ц). Као последица везивања сакубитрила за *mTOR* подјединицу, примећена је додатна флукуација за остатак LYS1471 (3,88 Å), као што је приказано на RMSF дијаграму протеина (Слика 54Д).



Слика 54. (А) *mTOR* RMSD *C α* атома кроз време. (Б) *mTOR* RMSF флукуације *C α* атома. (Ц) RMSD *C α* атома сакубитрила и *mTOR* подјединице кроз време. (Д) *mTOR* RMSF флукуације *C α* атома добијене за сакубитрилат-*mTOR* комплекс.

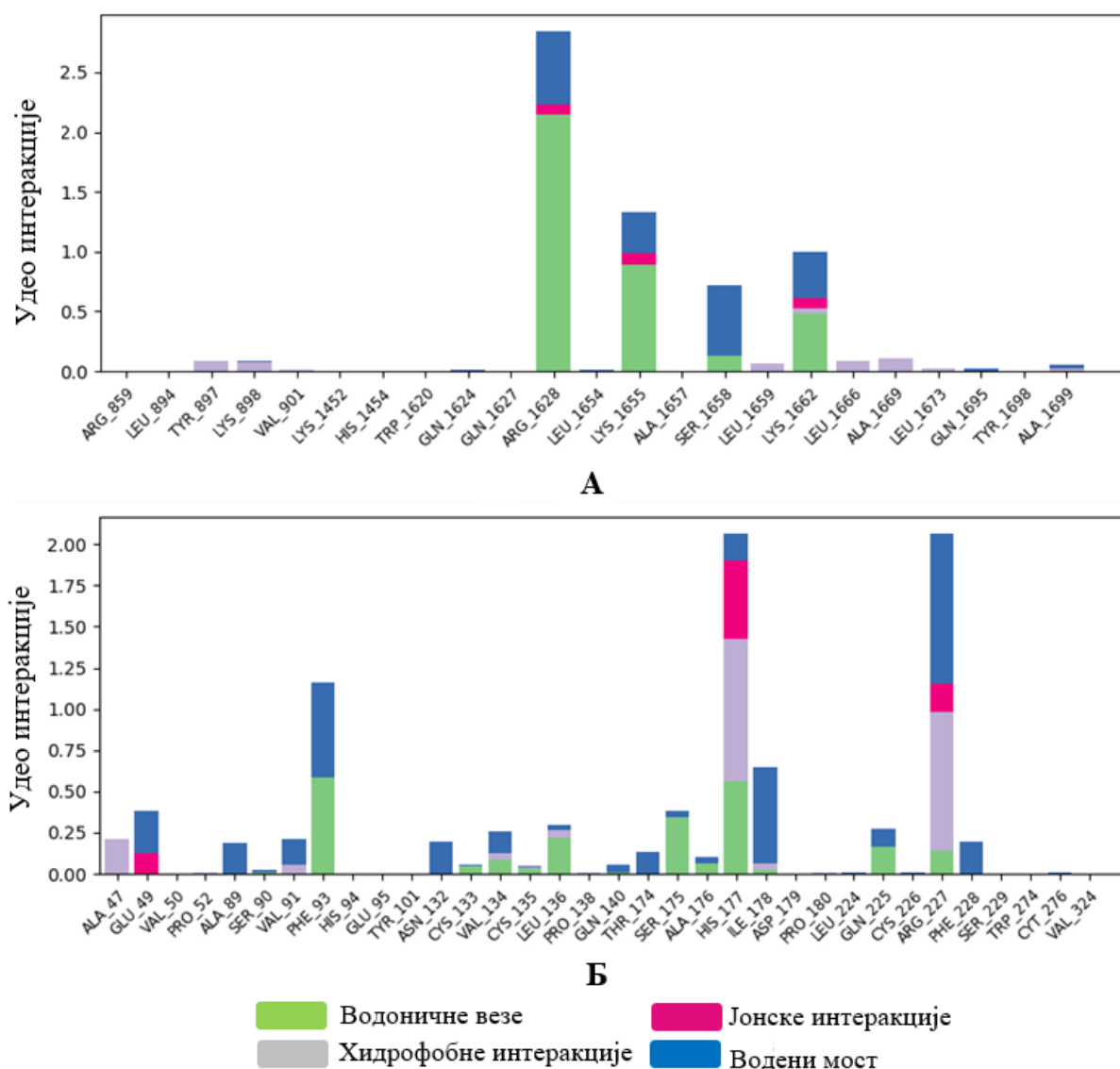
Са друге стране, RMSD дијаграм протеина показује да *mLST8* подјединица није претрпела значајне конформационе промене током симулације (Слика 55А). Глицин и пролин у позицијама 202 и 265 су једини остаци који су показали приметне флукуације од 3,43 и 3,76 Å (Слика 55Б). RMSD дијаграми валсартана и *mLST8* подјединице се међусобно преклапају, што указује на то да је валсартан остао у свом иницијалном

везујућем месту на протеину током читавог периода симулације (Слика 55Ц). Услед интеракције валсартана и mLST8 подјединице, мале локалне промене су примећене за глицинске остатке у положајима 204 и 266 са RMSF вредностима од 5,62 и 3,06 Å (Слика 55Д).



Слика 55. (А) mLST8 RMSD Cα атома кроз време. (Б) mLST8 RMSF флукутације Cα атома. (Ц) RMSD Cα атома валсартана и mLST8 подјединице кроз време. (Д) mLST8 RMSF флукутације Cα атома добијене за валсартан-mLST8 комплекс.

Анализа лиганд-протеин интеракција спроведена је са циљем да се идентификују оне везујуће интеракције које су присутне током већег дела симулације. Временски приказ лиганд-протеин интеракција за комплексе сакубитрилат-mTOR и валсартан-mLST8 представљен је на Слици 56. Интеракција сакубитрила и mTOR подјединице се карактерише грађењем вишеструких водоничних веза које укључују остатке лизина и аргинина, при чему ове интеракције претежно доприносе стабилизацији сакубитрилат-mTOR комплекса. Водоничне везе са остатком ARG1628 задржавале су се више од 210% времена симулације, док се исти тип интеракција са остацима LYS1655 и LYS1662 одржавао око 90% и 50% периода симулације. (Слика 56А). Водоничне везе са остацима PHE93, LEU136, SER175 и HIS177 биле су значајне интермолекулске интеракције које су се одржавале током симулације у валсартан-mLST8 комплексу. Ове интеракције су достигле континуитет од 58,1%, 21,6%, 34,3% и 56% времена симулације. Доминантни хидрофобни контакти су такође успостављени са остацима HIS177 и ARG227 током 86,6% и 83,9% времена симулације (Слика 56Б).



Слика 56. (А) Сакубитрилат-mTOR и (Б) валсартан-mLST8 интеракције током симулације молекулске динамике.

Израчунате вредности просечне слободне енергије везивања (ΔG_{avg}) за сакубитрилат-mTOR и валсартан-mLST8 интеракције износиле су -155,4356 kJ/mol и -126,9618064 kJ/mol. Поменуте израчунате вредности се добро слажу са вредностима докинг скорова који су добијени за ове комплексе у студији молекулског докинга.

5. ДИСКУСИЈА

Узимајући у обзир велику метаболичку активност белог масног ткива, при чему се претерана акумулација белих адипоцита тесно повезује са развојем кардиометаболичких компликација, све већа пажња се усмерава ка превођењу белог у мрко масно ткиво (*browning*) у циљу смањења настанка системских компликација које настају као последица гојазности. Овим истраживањем је по први пут показан потенцијал комбиноване примене валсартан/сакубитрила да на моделу експерименталног метаболичког синдрома индукује појаву беж адипоцита у анатомским депоима субкутаног и вицералног белог масног ткива. Иако је комбиновани фармаколошки облик валсартан/сакубитрила регистрован и одобрен за клиничку примену у терапији кардиоваскуларних болести, резултати овог истраживања указали су и на изузетан потенцијал ових лекова у регулацији биохемијских и хемодинамских параметара, на значајна антиоксидациона и антиинфламацијска својства примењених лекова, као и на потенцијал њихове комбиноване примене у индукцији мултилокурне морфологије белог масног ткива са високом експресијом гена који посредују у сингалној каскади промоције *browning*-а. Такође, у овој студији је ефекат дуалне фармаколошке терапије на индукцију *browning*-а упоређиван са истовремено примењеним протоколом хлађења, као златним стандардном у стварању мрког масног ткива, при чему су добијени занимљиви резултати који указују на њихов значајни синергистички ефекат. Како би се добила комплетнија слика којом валсартан/сакубитрил индукује *browning* спроведена је и *in silico* студија молекулског докинга и динамике у циљу откривања потенцијалних сигналних путева који посредују у настанку овог феномена. Према нашим сазнањима, ово је прва студија која је на експерименталном моделу МС-а доказала кардиопротективна својства валсартан/сакубитрила уз истовремени снажан потенцијал индукције *browning*-а три различите врсте масног ткива и расветлила циљане молекуле преко којих валсартан и сакубитрил индукују сигналну каскаду у индукцији *browning*-а.

5.1. Ефекат власартан/сакубитрила и излагања хладноћи на морфометријске, биохемијске и хемодинамске параметре пацова са метаболичким синдромом

Метаболички синдром је поремећај кога карактерише скуп метаболичких и кардиоваскуларних фактора ризика укључујући гојазност, хипертензију као и поремећај у метаболизму глукозе и липида. Међутим, граничне тачке као и основни предуслови за потврду МС-а се разликују у зависности од организације која дефинише компоненте наведеног поремећаја. Док према СЗО инсулинска резистенција представља основни фактор ризика, Међународна федерација за дијабетес наглашава централну гојазност као основни предуслов за постављање дијагнозе МС-а (207). С обзиром на све већу учесталост гојазности као последице седентарног начина живота, преваленција МС-а је све већа широм света због чега је проналазак ефикасних агенаса, који би позитивно утицали на факторе ризика за настанак МС-а, од изузетне важности у клиничкој пракси лечења гојазности.

За индукцију МС-а, у овом истраживању коришћен је модел који је подразумевао исхрану животиња високим садржајем масти у трајању од 28 дана са циљем развоја централне гојазности, хиперинсулинемије, интолеранције на глукозу и настанка инсулинске резистенције. Након тога, уследила је једнократна интраперитонеална апликација СТЗ у дози од 25 mg/kg у циљу смањења броја функционалних бета ћелија Лангерхасових острваца панкреаса. Овај модел МС-а представља експериментални пандан патологији ДМ2 у хуманој популацији (208, 209).

Морфометријски резултати наше студије показали су значајни пораст телесне масе, односа Hm/Bm као и масе $sWAT$ -а и $rWAT$ -а у групи животиња са МС-ом у поређењу са контролном групом здравих животиња (Табела 6). Уочена централна

гојазност, као најпоузданији фактор ризика, иде у прилог сазнању да је код ове групе животиња адекватно индукован МС. Међутим, четворонедељни третман оралном суспензијом валсартан/сакубитрила није значајно променио морфометријске параметре здравих, као ни пацова са МС-ом (Табела 6). У овом истраживању примењени протокол излагања хладноћи значајно је смањео телесну масу као и масу висцералних масних ткива здравих пацова, док је код пацова са МС-ом овај протокол редуковао још и Hm/Vm као и масу $sWAT$ у односу на аналогне групе животиња које су биле чуване на собној температури (Табела 6). Слични резултати добијени су у студији Wang и сарадника који су показали да двонедељно излагање животиња температури од $+4^{\circ}C$ доводи до смањења телесне масе пацова као и до повећања масе BAT -а (210). Промене у Vm указују да интермитентно излагање хладноћи активира BAT што даље доводи до смањења телесне масе при чему проценат редукције телесне масе зависи од промена у нивоу базалног метаболизма, енергетског статуса као и других биохемијских параметара животиња (211). Још једна студија спроведена на здравим мишевима показала је да интермитентно излагање животиња хладноћи значајно смањује масу $eWAT$ -а и $rWAT$ -а али без утицаја на масу $sWAT$ -а (212). Синергистички ефекат валсартан/сакубитрила и излагања хладноћи одразио се на значајно смањење телесне масе и масе свих испитиваних масних ткива здравих пацова уз редукцију свих испитиваних морфометријских параметара животиња са МС-ом у односу на аналогне контролне групе пацова које су биле изложене само протоколу хлађења (Табела 6). Такође, примењено је да су здраве експерименталне животиње које су биле изложене протоколу хлађења имале значајно мању масу висцералних масних ткива у односу на аналогну групу која је била чувана на собној температури, док је примењени третман значајно редуковао Vm , однос Hm/Vm као и масе $sWAT$ и $rWAT$ код пацова из $MetS+E+4^{\circ}C$ групе у односу на аналогну групу пацова која је била чувана на собној температури (Табела 6). Ови резултати се могу објаснити синергистичким дејством излагања хладноћи и фармаколошког дејства валсартана. Наиме, излагање хладноћи представља централни стимулус за индукцију *browning*-а и процеса адаптивне термогенезе тиме што директно утиче на појачану експресију $PGC-1\alpha$ а тиме и $PPAR-\gamma$ у масном ткиву што за последицу има стицање карактеристика беж адипоцита у депоима белог масног ткива (212). Додатно примењен валсартан, као инхибитор AT_1 рецептора, испољава и високопотентно агонистичко дејство на $PPAR-\gamma$ рецепторе при чему уз излагање хладноћи појачава ефекат на ове рецепторе у масном ткиву пацова и последично изазива промоцију *browning*-а (213).

Претходно спроведена истраживања показала су да се применом RAS инхибитора смањује инциденција ДМ2 услед регулације метаболизма глукозе. Иако механизам којим ови лекови остварују хипогликемијски ефекат још увек није потпуно расветљен, сматра се да у основи лежи појачано лучење инсулина услед смањеног хепатичног клиренса овог пептида, ублажавање вазоконстрикторног дејства ангиотензина 2 на ћелије панкреаса као и повећан проток крви кроз ткиво панкреаса (214, 215). Са друге стране, неприлизин као металопротеиназа смањује фракцију слободних пептида попут глукагона, глукагону сличног пептида 1, вазоактивног интестиналног пептида и других супстанци који играју важну улогу у гликорегулацији. Литературни подаци указују на значајну повезаност повећане инциденције ДМ2 и инсулинске резистенције и ниске плазма концентрације NP s. Претпоставља се да разлог лежи у метаболички нарушеној хомеостази посебно у масном ткиву и скелетним мишићима у којима је одржавање адекватног нивоа NP s од великог значаја у заштити од метаболичких компликација (159, 216). Услед примене сакубитрила и следствене инхибиције неприлизина, концентрација циркулишућих NP s се повећава при чему они директно побољшавају метаболизам глукозе и инсулинску резистенцију. То чине тако што интензивнијом оксидацијом слободних масних киселина користе акумулирани вишак енергије у телу, повећавају синтезу адипонектина у

адипоцитима, спречавају ослобађање проинфламацијских цитокина у макрофагима масног ткива и узрокују превођење белих масних ћелија у беж адипоците. Такође, NPs остварују повољан ефекат на контролу гликемије и стимулисањем осећаја ситости услед редукције нивоа грелина као орексигеног хормона (215, 217, 218). У нашој студији, примећено је да су животиње са МС-ом имале значајно више вредности глукозе током ОГТТ-а у поређењу са групом здравих животиња при оба температурна протокола (**График 1**). Такође је уочено да примена валсартан/сакубитрила, уз истовремени протокол хлађења или самостално, доводи до знатно ниже концентрације глукозе током ОГТТ-а у групи пацова са МС-ом у поређењу са аналогном контролном групом пацова (**График 1**). Наши резултати су у сагласности са сазнањима добијеним из *PARADIGM-HF* студије која је поредила утицај валсартан/сакубитрила у односу на монотерапију еналаприлом на морталитет и морбидитет пацијената са срчаним попуштањем. У овој клиничкој студији је примећено да терапија валсартан/сакубитрилом значајно смањује инциденцију новодијагностикованих пацијената са ДМ2 као и стопу хипергликемијских догађаја. Поред тога, у поређењу са плацебом или ARBs монотерапијом примена валсартан/сакубитрила смањује стопу хипергликемијских криза, неадекватну контролу гликемије код пацијената са ДМ2 као и настанак дијабетесних компликација (219). Међутим, благотворни ефекти комбиноване примене валсартан/сакубитрила уочени су и за циркулишуће концентрације инсулина. Наиме, примена ове фиксне комбинације лекова довела је до смањене потребе за инсулином код пацијената са дијагностикованим ДМ2 и до значајног смањења нивоа HbA1c (220). Штавише, терапија валсартан/сакубитрилом побољшала је сензитивност периферних ткива на дејство инсулина и код гојазних пацијената код којих дијагноза ДМ2 још увек није потврђена (221). Уједно, ови су резултати и у сагласности са сазнањима добијеним у нашој студији где је истовремена примена валсартан/сакубитрила значајно смањила серумски ниво инсулина код животиња код којих је индукован МС, било да су чуване на собној температури или су биле изложене протоколу хлађења (**График 2**). Такође, излагање протоколу хлађења здравих и животиња са МС-ом које нису биле третиране фармаколошким агенсима довело је до значајно нижих вредности глукозе током спроведеног ОГТТ-а, док је код животиња са МС-ом овај протокол смањео и серумску концентрацију инсулина (**Табела 7, Графици 1 и 2**). Један од механизма којим се може објаснити овај ефекат подразумева повећану осетљивост периферних ткива на дејство инсулина путем активације инсулинских рецептора услед излагања хладноћи. Други механизам се односи на повећану контрактилност скелетних мишића услед ослобађања ацетилхолина из моторних неурона чиме се интензивира гликолиза и оксидација глукозе и уједно смањује концентрација глукозо-6-фосфата. Овај пут се означава као инсулин-зависни пут што за последицу има повећано преузимање глукозе. Сличан механизам којим се може описати ефекат излагања хладноћи на повећано преузимање глукозе у скелетне мишиће (попут белог или браон масног ткива) односи се на ослобађање норепинерфина из симпатичког нервних система што за завршни ефекат има повећану толеранцију на глукозу (222).

Мултицентрична, двоструко слепа, рандомизирана *PARAGON-HF* студија поредила је утицај комбиноване примене валсартан/сакубитрила у односу на монотерапију валсартаном, на укупни липидни профил пацијената са срчаном слабошћу (223). Резултати ове студије показали су да истовремена блокада неприлизина и АТ₁ рецептора смањује серумски ниво триглицерида за чак 5% више у односу на монотерапију валсартаном, док је комбинација ова два лека повећала ниво HDL-а у просеку за око 2,6% у односу на самостално примењен валсартан. Такође, снажнији ефекат валсартан/сакубитрила на регулацију липидног статуса био је уочен код

пацијената са вишим нивоима триглицерида, смањујући у просеку за око 13% њихову серумску концентрацију (224). У складу са тим, резултати наше студије показали су снажан потенцијал валсартан/сакубитрила да након четворонедељног третмана здравих али и пацова са МС смање серумске концентрације ТС, TG и LDL-а као и да повећају ниво HDL-а у односу на контролне групе пацова (**График 3**). Међу бројним испитиваним механизмима, ефекат терапије валсартан/сакубитрилом на серумски профил липидних параметара се уско везује са повећањем нивоа NPs услед инхибиције неприлизина у масном ткиву и њихових последичних ефеката на активацију cGMP-РКА сигналне каскаде. Као последица активације овог пута долази до фосфорилације перилипина-1 и хормон сензитивних липаза које коначно индукују хидролизу триглицерида у неестерификоване масне киселине и глицерол (225, 226). Са друге стране, претходна сазнања указују на обрнуту корелацију између повећаног нивоа NPs и cGMP-а и серумских концентрација LDL-а. Претпоставља се да је овај механизам посредован модулацијом експресије ензима пропротеин конвертаза субтилизин/кексина тип 9 (енгл. *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9* - PCSK9) који се експримира у јетри и има важну улогу у регулацији липида. Наиме, услед повећане секреције PCSK9 смањује се експресија LDL рецептора у јетри при чему је смањено преузимање липопротеинских партикула у ћелије хепатоцита. Међутим, услед примене егзогеног ANP-а смањује се ниво PCSK9 и постиже се стабилна експресија LDL рецептора који посредују у ендцитози LDL-а и одржавању нормалних концентрација овог параметра у циркулацији (227). Подаци добијени из наше студије указали су и на то да је протокол хлађења истовремено примењен уз терапију валсартан/сакубитрилом значајно смањио ниво ТС у серуму здравих животиња, док је у групи пацова са МС-ом довео до значајне редукције у нивоима ТС и TG као и до повећања серумске концентрације HDL-а (**График 4**). Поред тога, здрава група контролних животиња која је била изложена протоколу хлађења имала је значајно мањи ниво ТС као и веће концентрације HDL-а у односу на контролну групу здравих пацова која је била чувана на собној температури. Такође, протокол четворонедељног излагања хладноћи значајно је смањио нивое ТС, TG и LDL-а и повећао ниво HDL-а у серуму контролних животиња са МС-ом у поређењу са групом која је била чувана на собној температури. Штавише, истовремени фармаколошки третман и излагање ниским температурама довео је до значајне редукције ТС у серуму здравих пацова као и смањења ТС, TG и LDL-а у серуму пацова са МС-ом у поређењу са аналогним групама животиња које су биле чуване на собној температури (**Табела 8**). У прилог томе иду и сазнања добијена из претклиничких студија у којима је показано да услед излагања хладноћи долази до индукције *browning*-а преко симпатичког нервног система када браон адипоцити сагоревају угљене хидрате и липиде како би произвели топлоту. Убрзавањем плазма клиренса триглицерида, браон адипоцити преузимају триглицериде у ВАТ, при чему се смањује проценат слободних масних киселина у циркулацији које су искоришћене за процес термогенезе (228, 229). Поред тога, излагање хладноћи повећава релативну генску експресију PPAR γ рецептора, који представља кључни модулаторни протеин у липидној хомеостазу (230). С обзиром да се валсартан понаша као и агониста PPAR γ рецептора, истовремено излагање хладноћи и третман валсартан/сакубитрилом има двојни ефекат на активацију овог рецептора а тиме и на благотворни ефекат у регулацији липидних параметара (133).

Поред инсулинске резистенције, повишен крвни притисак представља основни симптом који карактерише МС. У патофизиологији настанка хипертензије код особа са МС-ом налазе се бројни механизми који укључују централну/висцералну гојазност, хиперактивацију RAS-а, симпатичког нервног система, ендотелну дисфункцију и повећано ослобађање проинфламацијских медијатора (177). У нашем истраживању, животиње са МС-ом имале су значајно веће вредности систолног и дијастолног крвног

притиска, као и срчане фреквенце при оба испитивана температурна протокола у односу на здраве групе пацова. Са друге стране, субакутна терапија валсартан/сакубитрилом значајно је смањила ниво испитиваних параметара код животиња са МС-ом које су биле чуване на собној температури, док је код животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења смањила вредности систолног и дијастолног крвног притиска, али без утицаја на срчану фреквенцу (**Графици 5 и 6**). Сматра се да је овај ефекат последица инхибиције ангиотензина 2 и следствене вазодилатације, индукције натриурезе и диурезе. Са друге стране, сакубитрил повећава ниво ANP-а, као и супстанце П и брадикинина за које је познато да имају директно вазодилаторно дејство на ендотел крвних судова. Овај механизам дејства објашњава и резултате добијене из рандомизираних контролисаних студија која је доказала супериорнији антихипертензивни ефекат валсартан/сакубитрила у поређењу са самостално примењеним антагонистом АТ₁ рецептора или плацебом (231). С обзиром да не постоје студије које су испитивале одговор кардиоваскуларног система на субакутно излагање протоколу хлађења у циљу индукције *browning*-а, у нашој студији је протокол хлађења значајно повећао вредност крвног притиска у групама контролних здравих али и животиња са МС-ом. Међутим, вредност крвног притиска се није значајно разликовала између здравих животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и изложене различитом температурном протоколу. Са друге стране, пацови из MetS+E+4°C групе имали су значајно веће вредности систолног крвног притиска у односу на аналогну групу животиња која је била чувана на собној температури (MetS+E), док се вредности остала два испитивана параметра нису значајно разликовале између ове две групе животиња (**Табела 9**). Као што је раније поменуто, услед излагања хладноћи активирају се симпатички нервни систем и RAS, повећавајући плазма концентрацију норепинефрина и ангиотензина 2. Последица активације ова два система је системска вазоконстрикција која директно повећава вредности крвног притиска и срчане фреквенце. Исти резултати приказани су и у студији Yu и сарадника при чему је показано да излагање животиња температури од 4°C током три недеље узрокује значајно повећање вредности систолног и дијастолног крвног притиска (232). Међутим, захваљујући физиолошким дејствима на нивоу АТ₁ рецептора и неприлизина, третман валсартан/сакубитрилом животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења регулисао је вредност испитиваних хемодинамских параметара у односу на аналогну контролну групу животиња која је била изложена хладноћи (**График 6**).

Резултати претходно спроведених клиничких студија показали су да се поновљено излагање хладноћи може користити као успешна терапијска стратегија у лечењу пацијената са ДМ2 или повећаним БМИ (233, 234). Ехокардиографски преглед животиња са МС-ом које су биле изложене протоколу хлађења у нашој студији показао је значајно ниже вредности IVS, LVID и LVPW на крају систоле, док протокол хлађења није значајно изменио вредности ехокардиографских параметара здравих пацова у поређењу са групом здравих животиња која је била чувана на собној температури (**Слике 29 и 30**). Са друге стране, значајно повећање процентуалних вредности EF као и смањење LVIDs у групи пацова са МС-ом која је била третирана валсартан/сакубитрилом уз излагање протоколу хлађења указује на значајно побољшану срчану функцију као и контрактилну способност миокарда након примењених експерименталних протокола (**Табеле 10-12**). У претходно спроведеним клиничким (235) и експерименталним студијама (236) описана су протективна својства валсартан/сакубитрила која се описује кроз значајно повећање ејекционе фракције као и смањење величине инфаркта миокарда након примењеног третмана. Поред тога, у студији Marvanova и сарадника описан је механизам кардиопротективног протокола излагања хладноћи који је праћен редукцијом укупног броја β -адренергичких рецептора на мембрани кардиомиоцита. Наиме, услед

смањене активности $\beta 1$ -адренергичких рецептора долази до активације $\beta 3$ -АР/PKG/АМРК сигналног пута који спречава хипертрофично ремоделовање и фиброзу миокарда, обнављајући енергетску равнотежу на целуларном нивоу (237).

5.2. Ефекат експерименталног протокола на системски редокс статус пацова са метаболичким синдромом

Строго регулисана контрола редокс сигнализације је неопходна за одвијање биолошких функција у физиолошком окружењу. Међутим, у патолошким стањима долази до прекомерног стварања ROS-а које изазивају целуларно оштећење, пероксидацију нитрита и деструкцију молекула ДНК. Велики број студија доказале су да дисбаланс у продукцији прооксидационих/антиоксидационих молекула, на рачун прооксиданаса, игра важну улогу у патогенези МС-а, директно реагујући са готово свим биомолекулима, што за последицу има целуларно оштећење, системску инфламацију и кардиоваскуларне компликације (181, 238). Претходно објављене студије указале су значајно смањену активност ензима антиоксидационе заштите код пацијената са МС-ом уз драстично већи ниво прооксидационих молекула, најпре липидних пероксида (239). Стога је један од циљева наше студије био да се испита утицај субакутне примене валсартан/сакубитрила на системски редокс статус животиња са МС-ом, са посебним освртом на ефекат излагања хладноћи.

Резултати овог истраживања показују да четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом значајно смањује ниво липидне пероксидације код животиња са МС-ом и доводи до повећања ензима антиоксидационе заштите (**Графици 7 и 9**). Поред тога, примећено је да излагање хладноћи уз истовремену терапију испитиваним агенсима доводи до статистички значајне редукције прооксидационих молекула у плазми животиња са МС-ом уз значајно већу активност антиоксидационих ензима у поређењу са аналогном групом пацова које су боравиле на собној температури током експерименталног периода (**Табеле 13 и 14**). Добијени резултати су у корелацији са претходно спроведеним студијама које су показале ефикасност истовремене примене валсартан/сакубитрила у смањењу оксидационог стреса (240, 241). Наиме, показано је да валсартан/сакубитрил примењен у дози од 68 mg/kg током 8 недеља може значајно смањити системски ниво прооксидационих молекула код пацова код којих је индукована хронична бубрежна слабост (240). Са друге стране, постоје студије које су показале да акутно излагање хладноћи индукује повећану секрецију кортизола, епинефрина и норепинефрина као одговора на стресогене услове. То за последицу има активацију симпатичког нервног система тј. β -адренергичких рецептора и повећану интрацелуларну концентрацију cAMP-а. Ипак, неколико спроведених истраживања су описала да излагање хладноћи представља значајан стимулус за индукцију експресије PGC-1 α у мишићима и белим адипоцитима, као протеина за кога је познато да игра важну улогу у активацији ензима антиоксидационе заштите (242-244). Одавно је уочено да је тронедељно излагање хладноћи период који успоставља термогену адаптацију пацова при чему се у мозгу животиње повећава антиоксидациони одговор на локалну продукцију ROS-а, секреција катехоламина и адренергичка стимулација (245). Узимајући у обзир да подаци добијени из наше студије показују значајно повећану активност ензима антиоксидационе заштите уз смањење прооксидационих молекула у групама животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом и изложене протоколу хлађења, механизам добијених резултата се може објаснити на два начина. Прво, валсартан као антагониста ангиотензина 2 инхибира продукцију РКC (енгл. *Protein kinase C* – РКC) и смањује експресију ензима NAD(P)H оксидазе који се прекомерно синтетише у патолошким стањима праћеним хиперхолестеролемијом и

хипергликемијом. Заправо, *Nox-2* изоформа овог ензима доприноси смањеној биорасположивости NO и директно доприноси ендотелној дисфункцији, инфламацији и прекомерној продукцији ROS-а (241). Као део фармаколошки примењене терапије у овом истраживању, претпоставља се да сакубитрил доприноси бољем редокс статусу третираних животиња механизмом неутрализације ROS-а који укључује активацију NPR-A/cGMP сигналног пута (246). Други механизам се односи на индукцију *browning*-а услед излагања хладноћи при чему долази до повећане експресије UCP-1 у адипоцитима WAT-а, протеина за којег је доказано да поред утицаја на термогенезу смањује и производњу ROS-а (247).

На основу добијених резултата који су уједно у сагласности са претходно објављеним истраживањима, може се уочити синергистички ефекат истовременог излагања хладноћи и примене валсартан/сакубитрила на редокс статус животиња са MC-ом.

5.3. Утицај на системски ниво адипокина и на сигналне молекуле који су укључени у индукцију *browning*-а

Добро је познато да интеракција између секреторних молекула масног ткива (укључујући адипокине и батокине) и централног нервног система (који инервише масно ткиво) заузима важно место у одржавању енергетског метаболизма услед различитих метаболичких промена (248). Као и у стању оксидационог стреса, сматра се да дисбаланс у секрецији про/антиинфламацијских адипокина (у корист проинфламацијских) индукује инфилтрацију моноцита/макрофага при чему настаје зачарани круг системске инфламације који коначно води ка ослабљеној функцији срчаног, васкуларног и метаболичког ткива (249). Услед наведених чињеница, од изузетне је важности правилно разумевање профила експресије различитих адипокина као и механизма који контролишу њихову секрецију у циљу постављања нових терапијских стратегија у борби против глобалне пандемије MC-а.

Адипонектин представља важан адипокин који поред добро познате улоге у регулацији метаболичког профила уједно представља и неизоставни медијатор у промоцији *browning*-а белих адипоцита услед излагања ниским температурама. Резултати наше студије показују да истовремено излагање хладноћи уз четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом значајно повећава серумски ниво адипонектина у групи здравих као и животиња са MC-ом. Уколико посматрамо само ефекат третмана валсартан/сакубитрилом на ниво адипонектина без излагања хладноћи, уочено је да примењени третман повећава ниво циркулишућег адипокина само у групи здравих животиња. Са друге стране, подаци добијени у овој студији указују да протокол излагања хладноћи води ка повећању концентрације адипонектина у свим испитиваним групама у поређењу са животињама које су биле чуване на собној температури (**График 11**). Претходно спроведена студија *Wei* и сарадника испитивала је улогу адипонектина на термогенезу индуковану протоколом хлађења. Користећи *Adipoq*^{-/-} *knockdown* мишеве примењено је да аблација адипонектина спречава термогенезу услед излагања хладноћи као и способности организма у одржавању телесне температуре. Поред тога, у sWAT-у ових животиња примењена је значајно мања генска експресија UCP-1 услед излагања протоколу хлађења што упућује на то да је адипонектином посредована терморегулација управо посредована експресијом UCP-1 молекула (250). Имајући у виду да су у нашој студији здраве животиње које су биле изложене протоколу хлађења имале значајно виши ниво адипонектина у поређењу са животињама које су биле чуване на собној температури, добијени резултати нису изненађујући. У сагласности са овим сазнањима, подаци претходно спроведене студије показују чак двоструко већу концентрацију

циркулишућег адипокина код здравих испитаника који су били изложени двочасовном протоколу хлађења (251). Добро је познато да NPs повећавају системски ниво укупног адипонектина, па је тако терапија егзогеном инфузијом карперитида (атријалног натируретског пептида) током 7 дана значајно повећала укупан ниво адипонектина у плазми пацијената са дијагностикованом срчаном слабошћу (252). Са друге стране, бројни су докази који упућују на способност агониста PPAR γ рецептора да одрже равнотежу у продукцији различитих адипокина (131). С тим у вези, резултати наше студије добијају на вредности с обзиром да валсартан као PPAR γ агониста може утицати на вредност адипонектина док сакубитрил преко повећаног нивоа NPs повећава степен секреције овог адипокина.

Испитивањем примењеног третмана на секрецију и других адипокина приметили смо значајно веће вредности лептина у плазми животиња са МС-ом при оба температурна протокола. Такође, четворонедељна примена оралне суспензије валсартан/сакубитрила уз излагање хладноћи значајно је смањила ниво лептина код животиња са МС-ом. Резултати наше студије указују још на изоловани ефекат хлађења који се одразио кроз значајно мање вредности лептина у групама здравих и животиња са МС-ом у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури (**График 12**). До истих закључака дошла је и група научника која је испитивала ниво лептина у серуму животиња које су биле изложене хладноћи током 5 дана. Занимљиво је истаћи да је серумска концентрација лептина достигла ниже вредности тек петог дана протокола хлађења што упућује на то да је дужи период излагања ниским температурама неопходан како би се постигли очекивани резултати (249). Раније се сматрало да је основна последица активације симпатичког нервног система индукција липолизе у белим адипоцитима. Међутим, евидентно је да стимулација ових рецептора узрокује редукцију експресије гена за лептин а тиме и продукцију овог адипокина, због чега би се могло сматрати да симпатомиметички рецептори играју улогу регулатора у у секрецији лептина (253). Контрола секреције лептина регулацијом активности различитих рецептора централног нервног система се може објаснити и кроз примену лекова из групе ARBs. Наиме, ови лекови код гојазних особа компензују повећану осетљивост адренергичког система кроз инхибицију АТ₁ рецептора и истовремено смањење активности α 2-адренергичких рецептора. Тада се активирају β -адренергички рецептори, повећава се ниво cAMP-а што за крајњу последицу има инхибицију секреције лептина. Као додатни метаболички ефекат, ови лекови транспортују лептин кроз крвно-мождану баријеру што је праћено липолизом и смањењем системског нивоа триглицерида (254). Овај механизам у потпуности објашњава резултате добијене у нашој студији указујући на значајно ниже вредности лептина (**График 12**) као и серумске концентрације триглицерида (**Графици 3 и 4**) у групама животиња које су биле третиране фармаколошком комбинацијом у којој је један од примењених лекова управо из групе ARBs.

Како бисмо у потпуности разјаснили ефекат примењеног протокола на секрецију адипокина, поред утицаја на ниво анорексигених пептида, у нашој студији су се одређивале и серумске концентрације грелина као орексигеног хормона. Као што је и очекивано, значајно нижи ниво грелина измерен је у серуму животиња код којих смо индуковали МС при оба температурна протокола (**График 13**). Смањена концентрација грелина је често у литератури повезана са високом преваленцијом настанка МС-а, при чему се доминантно сусреће код гојазних појединаца као и код особа са инсулинском резистенцијом (255). Овим се могу објаснити резултати наше студије у којој су животиње са МС-ом имале значајно већу телесну масу (**Табела 6**), повећану серумску концентрацију инсулина (**График 2**) али значајно ниже вредности грелина (**График 13**). Бројне студије су испитивале утицај различитих стресогених фактора из спољашње

средине на концентрацију грелина. *Tomasik* и сарадници су уочили да излагање температури од 2°C узрокује значајно већи ниво грелина у плазми у поређењу са вредностима овог адипокина које су измерене при температури од 30°C. Штавише, физичка активност представља стресогени фактор околине који може провоцирати различите одговоре унутар неуроендокриног система уједно показујући ефекат и на продукцију грелина (256). Занимљиви резултати су добијени у једној студији која је упоређивала утицај краткорочног и дугорочног вежбања на укупни ниво грелина. Наиме, дугорочна физичка активност остварила је бољи ефекат на повећање укупног грелина у односу на акутно вежбање при чему су промене у смислу повећане концентрације грелина у односу на почетне вредности биле уочљивије код гојазних појединаца (257). У складу са тим, резултати наше студије показују да је најизразитија промена у серумској концентрацији грелина уочена у MetS+E+4°C групи у поређењу са аналогном групом животиња које су боравиле на собној температури (**График 13**). Као што смо већ напоменули, до сада ниједна студија није испитивала утицај истовремене примене валсартан/сакубитрила на промоцију *browning*-а узимајући у обзир утицај свих метаболичких аспеката код животиња са МС-ом. Из тог разлога не постоје студије са којима бисмо могли да упоредимо резултат нашег истраживања који показује значајно већи ниво грелина у серуму животиња са МС-ом након третмана валсартан/сакубитрилом (**График 13**). На основу претходних сазнања о фармаколошким дејствима примењених лекова можемо претпоставити да сакубитрил путем NPs смањује потребу за уносом хране кроз супресију ослобађања грелина услед гладовања. Међутим, тачна сигнална каскада којом NPs доводе до овог ефекта није још увек детаљно разјашњена али се сматра да је посредована стимулацијом AMPK у хипоталамусу (258). Са друге стране, власартан као лек из групе ARBs делује и као агониста PPAR γ чија се стимулација директно повезује са смањењем нивоа циркулишућег грелина. Постоје докази који иду у прилог овој тврдњи а односе се на то да услед активације PPAR γ у хипоталамусу долази до активације mTORC1 који се понаша као сензор, пружајући информацију о садржају желуца и инхибирајући потребу за уносом хране кроз редукцију нивоа грелина (259).

Као секундарни гласник, cGMP остварује бројне физиолошке функције у организму. Продукција cGMP-а је заснована на конверзији гуанозин трифосфата (енгл. *guanosine triphosphate* - GTP) у cGMP уз присуство ензима гуанилат циклазе. Са друге стране, фосфодиестеразе раскидањем фосфодиестарске везе у молекулу cGMP-а смањују ниво овог секундарног гласника. Сходно томе, биоискористљивост cGMP-а се применом различитих терапијских стратегија може повећати на два начина и то кроз повећање активности ензима гуанилат циклазе или инхибицијом ензима фосфодиестеразе. Рецептори за NPs су хомодимерне структуре и припадају групи мембранских рецептора везаних за гуанилат циклазу за чији се екстрацелуларни домен везују NPs као лиганди повећавајући продукцију cGMP-а (260). Неколико *in vitro* студија испитивало је утицај овог секундарног гласника на адипогенезу. Наиме, услед активације NPR-A рецептора у адипоцитима WAT-а долази до повећаног стварања cGMP-а, што следствено активира PKG која затим фосфорилише перилипин, као најзаступљенију протеинску структуру која облаже липидне капљице, мењајући морфологију белих адипоцита (217). Други механизам дејства NPs на активност cGMP-а заснива се на активацији p38MAPK сигналног пута и на фосфорилацији cAMP-зависног транскрипционог фактора ATF2. Овај транскрипциони фактор затим активира PGC-1 α -PPAR γ сигналну каскаду и експресију UCP-1 у адипоцитима WAT-а што на крају узрокује митохондријску биогенезу и термогенезу, другим речима *browning* белих адипоцита (217, 260). Примена синтетичког натируретског пептида код животиња које су на режиму исхране са високим садржајем масти повећала је активност гуанилат

циклазе и утицала на редукцију телесне масе ових животиња као и процентуални садржај белог масног ткива. Такође, ова фармаколошка супстанца је условила повећану осетљивост ткива на инсулин као и термогенезу кроз индукцију експресије UCP-1 молекула у субкутаним белим масним ћелијама (261, 262). Ова сазнања указују да стимулација гуанилат циклазе а тиме и cGMP-а путем NPs заузима значајно место у терапијском приступу гојазности механизмима који се заснивају на *browning*-у WAT-а. Узимајући у обзир да је у нашој студији концентрација cGMP-а у серумима животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом била значајно виша у поређењу са нетретираним групама пацова, можемо претпоставити да су повећане вредности овог секундарног гласника управо последица виших нивоа NPs услед примене сакубитрила (**График 14**). Додатно, доминантно веће концентрације cGMP-а су примећене у групама животиња које су биле изложене протоколу хлађења при чему су највише вредности овог секундарног гласника биле уочене у групама животиња које су истовремено биле изложене ниским температурама и третиране оралном суспензијом валсартан/сакубитрила (**График 14**). Наши резултати указују да се активност cGMP-а повећала двоструким механизмом од којих се један заснива на претходно описаном ефекту сакубитрила на активност гуанилат циклазе, док је други посредован ефектом хлађења. Иако не постоје доступне студије које су користиле исти или сличан протокол који је примењен у нашем истраживању, група научника је испитивала утицај хлађења на активност ензима фосфодиестеразе а тиме и на ниво cGMP-а. Добијени резултати показују да хлађење путем активације β -адренергичких рецептора значајно смањује експресију ензима фосфодиестеразе 9 (енгл. *Phosphodiesterase 9* – PDE9) у браон адипоцитима мишева, док је код *knockout* PDE9 животиња примећена интензивнија појава беж адипоцита. У складу са тим, овом студијом приказано је да PDE9-cGMP сигнални пут заузима важно место у *browning*-у масног ткива и термогенези посредованој излагању ниским температурама окружења (263).

Као основни извор енергије унутар ћелије, АТФ се примарно ствара током процеса гликолизе и респирације митохондрија. Наиме, када адипоцити први пут преузму глукозу, процес обраде овог моносахарида се одвија преко три основна пута. Највећи део глукозе, чак 50% се користи за производњу лактата, 35% за синтезу триглицерида док се преосталих 15% користи за производњу АТФ-а помоћу којег се обезбеђује енергија за ћелијско преживљавање и одржавање целуларне хомеостазе (264). Као што је раније описано, браон адипоците карактерише мултилокуларна ћелијска грађа са велики бројем митохондрија у којима је густо упакован UCP-1. Међутим, претходне студије су описале да СМК потенцирају транслокацију протона UCP-1 молекула док нуклеотиди попут АТФ-а инхибирају његову активност (265). У складу са тим, браон адипоцити се сматрају енергетски неефикасним за продукцију АТФ-а али високоефикасним за производњу топлоте која се у BAT-у одвија преко UCP-1 молекула пре него синтезом АТФ молекула (266). На основу свих наведених тврдњи, одређивање концентрације АТФ-а у деопима WAT-а представља одличан предиктор индукције *browning*-а. У нашем истраживању испитивали смо ефекат примењеног експерименталног протокола на продукцију АТФ-а у масном ткиву здравих као и животиња са MC-ом, са посебним освртом на поређење сензитивности sWAT-а у односу на два типа висцералног масног ткива. Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом значајно је смањио ниво АТФ-а у sWAT-у здравих као и пацова са MC-ом при оба температурна протокола. Такође, излагање хладноћи је за последицу имало смањење концентрације овог нуклеотида у sWAT-у свих експерименталних група (**График 15**). Са друге стране, примењени фармаколошки третман није значајно смањио ниво АТФ-а у групама животиња које су биле чуване на собној температури, док је уз истовремено излагање хладноћи овај третман смањио ниво испитиваног маркера у

односу на аналогне нетретиране групе животиња. Поред тога, није примећена статистички значајна разлика у концентрацији АТР-а у eWAT-у животиња које су биле чуване на собној температури у односу на оне групе које су биле изложене протоколу хлађења (**График 16**). Као још једна врста висцералног масног ткива које је испитивано у овом истраживању, rWAT здравих животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом имало је значајно ниже вредности АТР-а при оба температурна протокола. Међутим, концентрација АТР-а у rWAT-у изолованог од животиња са МС-ом је била значајно нижа након истовременог излагања хладноћи и третмана фармаколошким агенсима. Утицај стреса, у виду излагања хладноћи је смањио ниво АТР-а у rWAT-у свих група изузев контролне групе пацова са МС-ом (**График 17**). Доминантно веће концентрације АТР-а у свим испитиваним врстама WAT-а уочене се у групама животиња са МС-ом у односу на здраве контролне групе пацова при оба температурна протокола (**Графици 15-17**). Овакав резултат се објашњава чињеницом да се у условима прекомерне телесне масе АТР повећано производи у инсулин сензитивним ћелијама без обзира да ли постоји потреба за енергетском производњом - термин означен као „прегоревање митохондрија“ (267). Наиме, услед хиперкалоричне исхране долази до прекомерног снабдевања митохондрија различитим супстратима што узрокује хиперпродукцију АТР-а чија се прекомерна производња у литератури често повезује са настанком инсулинске резистенције и последичне дисфункције митохондрија и настанка оксидационог стреса (267, 268). Благотворни утицај протокола излагања хладноћи на ниво АТР-а у белим адипоцитима се ослања на литературне податке који указују на то да се у условима хлађења повећава експресија UCP-1 а тиме и стварање мултилокуларне морфологије ћелија за коју је претходно описано да је у обрнутој корелацији са продукцијом АТР-а (258). Међутим, опречна су мишљења о утицају хлађења на ниво АТР-а при чему једна студија истиче да хлађење не доводи до значајних промена у продукцији АТР-а (269). Протокол ове студије се заснивао на излагању експерименталних група акутном протоколу хлађења док претходне студије истичу да је за индукцију *browning*-а протоколом хлађења неопходно свакодневно излагање ниским температурама у трајању од минимум четири сата што може објаснити контрадикторност (84). Повољан утицај фармаколошке терапије примењен у нашој студији је у сагласности са резултатима који су добијени из претходног истраживања које је испитивало утицај седмодневног третмана пацова инфузијом ANP-а. Резултати студије спроведене од стране You и Laychock показали су да ANP у дозно-зависном режиму значајно смањује базални ниво АТР-а што је праћено и са бољом регулацијом секреције инсулина (270). Различити одговор три врсте WAT-а на промоцију *browning*-а је уочен у нашој студији при чему се sWAT истиче као ткиво са највећим степеном редукције АТР-а као одговора на примењену терапију. Претходне студије истакле су eWAT као ткиво са смањеним биоенергетским капацитетом при чему су адипоцити овог ткива мање сензитивни на метаболичке промене у односу на масне ћелије sWAT-а, које се карактеришу већим респираторним капацитетом и флексибилнијим митохондријама на метаболичке промене у односу на оне лоциране у eWAT-у (271). Такође, адипоцити sWAT-а су доминантно мањи у односу на ћелије висцералних ткива при чему лакше подлежу диференцијацији и процесу *browning*-а при дејству различитих стимулуса (272).

5.4. Ефекат валсартан/сакубитрила и излагања хладноћи на генску експресију, хистоморфолошке и имунохистохемијске карактеристике масног ткива

Ткивни исечци sWAT, eWAT и rWAT анализирани су хистоморфолошким методом Н/Е бојења као техником бојења којом се на најбољи начин могу уочити промене морфолошке грађе адипоцита у одговору на примењени експериментални

протокол. Ради расветљавања механизма путем којих излагање хладноћи и дуална фармаколошка терапија индукују *browning*, примењене су методе имунохистохемијског обележавања антитела као и процене релативне генске експресије у хистолошким препаратима масних ткива.

Иако је велики број студија спроведен ради доказивања ефикаснијег терапијског исхода услед комбиноване примене валсартан/сакубитрила на кардиоваскуларни систем пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом у односу на конвенционалну терапију АСЕ инхибиторима (220), још увек нема података о ефектима валсартан/сакубитрила на морфологију масног ткива, поготову у стању МС-а. Један од начина којим се може проценити да ли нека супстанца или метод може промовисати *browning* било које врсте WAT-а односи се на анализу морфолошке грађе адипоцита као и на процену њихове површине и густине. Хистоморфолошким анализом добијених резултата потврђено је да је индукција МС-а резултирала значајним повећањем у величини адипоцита, што је уједно повезано и са акумулацијом липидних капљица у депоима све три различите врсте масног ткива (Слике 31-33). Међутим, четворонедељни третман животиња са МС-ом оралном суспензијом валсартан/сакубитрила значајно је ублажио ове промене што је окарактерисано мањим дијаметром масних ћелија и мултилокуларном структуром липидних капљица (Слике 31-33). Као најефикаснија комбинација у промоцији *browning*-а издвојена је истовремена примена валсартан/сакубитрила и третмана хлађењем, при чему је излагање ниским температурама индуковало значајно смањење дијаметра и површине адипоцита у свим групама у поређењу са аналогним групама животиња које су биле чуване на собној температури (Слике 31-33). У сагласности са нашом студијом су и резултати претходно спроведеног истраживања где је доказано да чак и акутно излагање хладноћи узрокује промене морфолошких карактеристика белих адипоцита при чему ћелије WAT-а стичу грађу налик беж масним ћелијама. Хи и сарадници су приметили да тродневно излагање протоколу хлађења мења састав липидних капљица WAT-а у смислу редукције гликофосфолипида, глицеролипида и сфинголипида као и триацилглицерола, али и повећава експресију гена који учествују у процесу термогенезе (273). Међутим, како би се уочиле фенотипске промене у микроваскуларним карактеристикама масних ћелија, потребно је да се протокол хлађења примени најмање 7 дана при чему се најочигледније промене уочавају након 4-5 недеља излагања ниским температурама окружења (274). У складу са тим, у нашој студији животиње су биле изложене протоколу хлађења током 28 дана у трајању од 4 сата дневно при чему су очигледне промене у ангиогеном фенотипу јасно уочене након хистопатолошке анализе ткивних исечака. Утицај NPs на индукцију мултилокуларне ћелијске морфологије у депоима WAT-а описан је у једној *in vivo* студији спроведеној на мишевима који су конзумирали храну са високим садржајем масти. Наиме, ова група научника показала је да егзогена инјекција ANP-а индукује термогени програм у белим адипоцитима са доминантном промоцијом *browning*-а у ћелијама sWAT-а у односу на адипоците који су лоцирани у висцералним масним ткивима (156). Поред тога, у овој студији је примећено да се током излагања хладноћи повећава циркулишући ниво NPs услед контракције површинских крвних судова, чиме се спречава губитак топлоте. На тај начин се крв носи ка већим крвним судовима које повећавају притисак пуњења срца крвљу и на тај начин повећавају производњу, односно синтезу NPs у миокарду. Истовремено се у масном ткиву смањује ниво експресије NPR-C рецептора за NPs чиме се спречава деградација ових молекула (146, 275, 276). Различита сензитивност адипоцита у зависности од анатомске локализације је, као и у нашој студији, примећена и у раније спроведеним истраживањима. Наиме, мањи степен експресије гена специфичних за беж адипоците је уочен у висцералном масном ткиву животиња након излагања ниским температурама у поређењу са доминантно већом

транскрипцијом истих гена у адипоцитима sWAT-a (277, 278). Како бисмо испитали разлике у одговору различитих типова адипоцита на протокол хлађења и/или терапију валсартан/сакубитрилом, у овом истраживању смо поред патохистолошке анализе одређивали и релативну експресију различитих про/антиинфламацијских гена, као и оних специфичних за мрко масно ткиво (директни показатељи *browning*-а ћелија WAT-a) у узорцима sWAT-a, eWAT-a и rWAT-a.

Методом qRT-PCR анализирали смо ткивну експресију термогених маркера при чему су резултати у сагласности са оним који су добијени хистопатолошком анализом. Заправо, индукција МС-а довела је до значајно ниже експресије UCP-1 у сва три анализирана масна ткива ових животиња. Поред тога, ако се осврнемо на утицај хлађења можемо уочити значајно више концентрације овог гена у sWAT-у и rWAT-у свим експерименталним групама у поређењу са животињама које су биле чуване на собној температури (**Графици 27 и 28**). Када је реч о eWAT-у, протокол хлађења је повећао ниво експресије UCP-1 само у групи животиња са МС-ом које су истовремено биле третиране валсартан/сакубитрилом, али без значајне разлике између осталих група пацова (**График 29**). Међу бројним промотерима *browning*-а, излагање хладноћи представља физиолошки најрелевантнији стимулус за активацију симпатичког нервног система као главног „окидача“ за индукцију термогенезе. То је потврђено и претходном студијом у којој је излагање животиња температури од 4°C индуковало стицање фенотипске грађе WAT-a у sWAT-у и уједно повећану експресију UCP-1 у овом типу масног ткива. Са друге стране, исти протокол није индуковао повећану експресију UCP-1 у висцералним масним ткивима животиња попут eWAT-a и мезентеричког масног ткива (овај тип адипоцита представља трећу линију одбране у производњи топлоте). Смањена сензитивност висцералног масног ткива у поређењу са sWAT-ом, уочена у нашој као и у претходној студији, може се објаснити тиме да је у адипоцитима висцералног масног ткива ускладиштена резервна количина енергија при чему ове ћелије представљају трећу линију одбране у производњи топлоте током процеса термогенезе. Са даљим излагањем ниским температурама, адипоцити висцералног масног ткива обављају улогу одржавања адекватне телесне температуре која је неопходна за преживљавање (278). Додатно, различити степен сензитивности два типа белих адипоцита на промоцију *browning*-а се може објаснити и на молекулском нивоу. Узимајући у обзир да се и sWAT и висцерално масно ткиво активирају путем симпатомиметичке стимулације услед излагања хладноћи, различити регулаторни механизми су укључени у процес *browning*-а ова два типа масног ткива. Наиме, PRDM16 је главни регулаторни маркер превођења белих у беж адипоците sWAT-a, док је ниво експресије овог маркера веома низак у ћелијама висцералног масног ткива, што значи да се *browning* висцералног масног ткива одвија PRDM16-независним механизмима (81, 277). Поред утицаја хладноће, у нашој студији је уочен и ефекат валсартан/сакубитрила на повећану експресију UCP-1 у sWAT-у здравих и животиња са МС-ом (**График 27**), док је уз истовремено примењени протокол хлађења ова фармаколошка терапија значајно повећала експресију UCP-1 и у преостала два типа анализираних масних ткива животиња са МС-ом (**Графици 28 и 29**). Ефекат NPs на експресију термогених маркера је описан и у претходним студијама где је егзогена примена NPs повећавала митохондријску биогенезу и довела до равнотежног стања производње енергије услед повећане експресије UCP-1 у депоима sWAT-a (156). Такође, повећана синтеза NPs директно стимулише синтезу PKG при чему се отварају повољни ефекат на целокупни метаболички статус укључујући смањену акумулацију масти, адекватну гликорегулацију и повећану термогенезу услед стварања мултилокуларне морфологије у депоима WAT-a (279). Узимајући све наведено у обзир, ефикаснији приступ у промоцији *browning*-а постигнут применом валсартан/сакубитрила и протокола хлађења код пацова са МС-ом

у нашој студији се може образложити двојаким механизмом и то: активацијом симпатичког нервног система услед излагања хладноћи са једне стране и индукцијом UCP-1, као главног термогеног биомолекула путем NPs са друге стране.

Поред нивоа експресије UCP-1 као биомолекулске детерминанте мутилокуларне грађе, у овом истраживању одређивали смо и активност PGC-1 α -PPAR γ сигналног пута у ћелијама масног ткива након завршеног експерименталног периода. Заправо, субакутна примена валсартан/сакубитрила значајно је повећала концентрацију PGC-1 α у адипоцитима sWAT-а и eWAT-а животиња са MC-ом у односу на контролну групу животиња (**Графици 33 и 35**), док је уз истовремено примењени протокол хлађења ова дуална фармаколошка терапија повећала експресију PGC-1 α у свим испитиваним врстама WAT-а (**Графици 33-35**). До истих резултата се дошло и испитивањем концентрације PPAR γ у sWAT-а и eWAT-а животиња са MC-ом које су биле изложене протоколу хлађења и истовременом третману валсартан/сакубитрилом (**Графици 36 и 38**). Раније је описано да је третман мишева инхибитором PDE5, силденафилом, значајно повећао експресију PGC-1 α у субкутаним адипоцитима а тиме и повећао ниво UCP-1 (158). С обзиром да се инхибицијом PDE5 повећава и ниво cGMP-а а тиме и термогених молекула, ови резултати су у складу и са нашим тврдњама узимајући у обзир да смо раније описали утицај валсартан/сакубитрила путем NPs на cGMP-посредовану активацију PGC-1 α -PPAR γ пута и индукцију *browning*-а (260, 282). Студије које су користиле трансгене PGC-1 α мишеве са благо повећаном експресијом овог миокина уочиле су повећану склоност животиња ка гојењу и настанку ДМ2, што јасно указује да PGC-1 α утиче на секрецију различитих молекула из других ткива (280). С тим у вези, излагање хладноћи представља јак стимулус за секрецију PGC-1 α који учествује у регулацији преузимања глукозе у скелетне мишиће механизмима који контролишу експресију GLUT4 доприносећи адекватној метаболичкој хомеостазу (281). Уз то, PGC-1 α контролише експресију других гена који учествују у адаптивној термогенези међу којима је и PPAR γ . Група истраживача приметила је да мишеви са дефицијенцијом PPAR γ гена имају смањену метаболичку стопу, при чему масно ткиво ових животиња има редукован капацитет генерисања АТФ-а. На основу тога, долази се до закључка да примена агониста PPAR γ рецептора може побољшати метаболички капацитет кроз стимулацију термогених маркера (266). Као што смо описали у поглављу 1.5.1. валсартан заузима важно место у активацији PPAR γ , понашајући се као индиректни агониста што даље води ка експресији низа гена задужених за термогенезу и стварање беж адипокита. До истих закључака је дошла још једна група научника истичући значај активације PGC-1 α -PPAR γ сигналног пута услед примене валсартана и следствене индукције *browning*-а белих масних ћелија (138).

Важно место у индукцији експресије UCP-1 заузима и активација mTORC1 молекула, као протеина који контролише бројне ћелијске функције (143). Како бисмо испитали утицај терапије валсартан/сакубитрилом на експресију mTOR а тиме и индукције *browning*, у овом истраживању одређивали смо ниво овог протеина у масним ткивима животиња. Добијени резултати указују на значајно већу експресију mTOR у sWAT-у третираних животиња (**График 30**), док уз истовремено хлађење ова дуална терапија повећава експресију mTOR и у висцералним адипоцитима животиња са MC-ом (**Графици 31 и 32**). Недавна студија указала је на значај cGMP-PKG сигналног пута у стимулацији mTORC1, као и на значај овог молекула у *browning*-у који је посредован NPs (148). Уз то, постоје тврдње да стимулација PPAR γ рецептора води ка повећаној експресији mTORC1 а затим и бројних адипокина доприносећи бољем метаболичком профилу (145). Поред тога, излагање хладноћи додатно стимулише експресију mTOR услед активације симпатичког нервног система и cAMP-РКА сигналног пута (55). У прегледу литературе, постоје студије чији резултати показују да је активација mTORC1

неопходна за индукцију стварања беж адипоцита услед излагања протоколу хлађења (148). На основу свега наведеног, можемо претпоставити да дуални фармаколошки облик валсартан/сакубитрил поседује снажан потенцијал да активира mTORC1 и то двоструким механизмима активације PGC-1 α -PPAR γ и повећањем фракције NPs, при чему истовремена активација β -адренергичких рецептора хладноћом додатно индукује експресију mTOR а тиме и UCP-1 у масном ткиву животиња са МС-ом.

Хипертрофичне масне ћелије са високим садржајем триглицерида унутар адипоцита се често уочавају код појединаца са високим БМИ, обављајући улогу у продукцији проинфламацијских адипокина, при чему на тај начин доприносе локалној инфламацији и настанку инсулинске резистенције. Са друге стране, адипоцити мањег дијаметра имају мању концентрацију триглицерида у свом саставу при чему секрецијом већег нивоа адипонектина и мањег нивоа проинфламацијских цитокина доприносе бољем метаболичком статусу (14). Тако се сматра да дугорочна инфламација представља један од основних механизма у патофизиологији МС-а а тиме и инсулинске резистенције и кардиометаболичких компликација (207). Опречна су мишљења о улози различитих цитокина на индукцију стварања беж адипоцита. Док поједине студије указују на значај IL-1 β у промоцији *browning*-а чије се веће концентрације повезују за значајно вишом експресијом UCP-1 (283), друга група научника тврди да излагање хладноћи као најјачи стимулус превођења белог у беж масно ткиво, не утиче на повећање експресије овог цитокина (284). У нашој студији, благо повећање нивоа IL-1 β примећено је у sWAT-у животиња из MetS+E+4°C групе, док у осталим ткивима није било значајних промена (**Графици 39-41**). Са друге стране, наши резултати показују значајно већу експресију IL-6, као још једног испитиваног проинфламацијског цитокина, у масном ткиву животиња које су биле изложене протоколу хлађења (**Графици 42-44**). Добијени резултати су у сагласности са студијом *Egencioglu* и сарадника који су показали значајно мању експресију термогених маркера у ингвиналном масном ткиву *knockout* IL-6 мишева који су били изложени температури од 4°C током три дана. Сумарно гледано, очуваност IL6R α сигналних рецептора представља важан фактор за индукцију термогенезе овим цитокином услед излагања протоколу хлађења (285). Са друге стране, примећено је да валсартан поседује значајно антиинфламацијско својство смањујући експресију IL-6 и TNF α у масном ткиву, јетри и мишићима животиња које су биле третиране липополисахаридом ради индукције метаболичког дисбаланса (286). Можемо претпоставити да је очување експресије IL-6 неопходно за хладноћом индуковани *browning*, док су у групама животиња које су боравиле на ниској температури вредности овог цитокина у rWAT-у биле ниже након третмана дуалном фармаколошком терапијом (**График 43**). Релативна експресија TNF α била је значајно редукована у масним ткивима здравих животиња које су биле чуване на собној температури и уједно третиране валсартан/сакубитрилом (**Графици 51-53**). Поред тога, протокол хлађења значајно је повећао експресију овог проинфламацијског цитокина у масним ткивима животиња са МС-ом (**Графици 51-53**). Међутим, резултати у вези експресије овог цитокина и утицаја на *browning* су контрадикторни. Наиме, спроведена студија доказала је значајно ниже концентрације TNF α у масном ткиву гојазних мишева, при чему је код ових животиња уочен повећан број функционално активних беж адипоцита, већа сензитивност на β 3-адренергичке рецепторе као и повећана експресија UCP-1 (287). Са друге стране, литературни докази сугеришу да се ниво TNF α у масном ткиву повећава током првих сати излагања хладноћи а након тога полако достиже базални ниво. Међутим, постоје студије које показују да дуготрајно излагање хладноћи индукује инфламацијски одговор масног ткива и повећава експресију TNF α (249, 288). Ипак, примећене разлике у нивоу експресије проинфламацијских цитокина могу се приписати различитом ендокрином капацитету масног ткива испитиваних животиња. Као антиинфламацијски цитокин,

IL-10 има контроверзну улогу у комуникацији адипоцита са околним имунолошким ћелијама. Прво су објашњене улоге овог цитокина у регулацији хомеостазе ткива, нарочито на нивоу црева. Међутим, најновије студије су показале да дефицијенција гена за IL-10 повећава термогенезу белих адипоцита и индукује повећану сензитивност на инсулин чиме доводи до превенције настанка метаболичких болести (289). У нашој студији, ниво експресије овог цитокина био је смањен у групи животиња која је била изложена хлађењу у поређењу са оним животињама које су биле чуване на собној температури, мада је примена валсартан/сакубитрила спречила додатно смањење IL-10 у масном ткиву животиња (**Графици 45-47**). Ови резултати се могу објаснити антиоксидационим потенцијалом примењених лекова, чиме се смањује оксидациони стрес и инфламација, што је уједно и у корелацији са претходним истраживањем које је испитивало утицај ове дуалне терапије на ниво IL-10 у миокарду пацова. Користећи модел *in vivo* индукованог инфаркта миокарда, Shen и сарадници су уочили значајно смањење вредности проинфламацијских цитокина измерених у миокарду животиња третираних валсартан/сакубитрилом уз доминантно већи ниво IL-10 у кардиомиоцитима експерименталне групе животиња (290). Још један цитокин који је неопходан за симпатомиметичку индукцију *browning*-а је проинфламацијски IL-17 који путем повећане експресије TGFβ1 у адипоцитима промовише инервацију масних ћелија симпатомиметичким нервним влакнима (291). То је уочено и у нашем истраживању, где су најпре групе здравих животиња које су биле изложене протоколу хлађења имале већи ниво експресије овог цитокина у поређењу са аналогним групама које су биле чуване на собној температури. Међутим, дуална фармаколошка терапија смањила је концентрацију IL-17 у sWAT третираних животиња, као и у висцералним масним ткивима животиња са МС-ом које су биле третиране овом комбинацијом лекова (**Графици 48-50**). Овај ефекат се може придодати дејству сакубитрила који путем активације NPR-A активира PKG и PI3K-Akt сигнални пут а затим спречава активацију STAT3 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* - STAT3) молекула. Ова сигнална трансдукција за последицу има инхибицију експресије IL-17 у ткиву сисара (292). На основу анализе генске експресије свих про/антиинфламацијских цитокина у ткивним исечцима наших експерименталних животиња, можемо претпоставити да примена валсартан/сакубитрила у промоцији *browning*-а резултира другачијим цитокинским профилем у односу на онај који је забележен током протокола хлађења.

5.5. Кардиопротективна својства валсартан/сакубитрила на моделу *ex vivo* индуковане И/Р повреде миокарда

Поред ехокардиографске процене срчане функције а у циљу детаљнијег испитивања ефекта примењеног протокола на функцију миокарда, након завршеног експерименталног периода изолована срца пацова су постављена на Langendorff-ов апарат и подвргнута *ex vivo* изазваној И/Р повреди. У периоду стабилизације као и током једночасовног периода реперфузије праћени су кардиодинамски параметри од интереса, док је из сакупљених узорака ефлуента одређиван ниво прооксидационих молекула.

Комбинована примена валсартан/сакубитрила је одобрена за лечење дуготрајне инсуфицијенције миокарда код одраслих, али је посебна пажња у нашој студији била усмерена ка испитивању способности ова два лека да ублаже И/Р повреду код пацова са МС-ом. Као патофизиолошки феномен, И/Р повреда представља парадоксално погоршање ћелијске функције након поновног успостављања протока крви кроз исхемично ткиво. Наиме, током исхемије тј. у условима смањеног допремања крви, редукује се ниво кисеоника, глукозе и других супстанци неопходних за нормално функционисање ћелија што ремети адекватну метаболичку функцију органа. На

ћелијском нивоу, смањена продукција АТР молекула условљава и смањену активност Na^+/K^+ пумпе при чему се губи трансмембрански јонски градијент, што узрокује повећану интрацелуларну концентрацију Na^+ јона који у ћелију повлаче молекуле воде са собом у циљу одржавања осмотске равнотеже, што за крајњу последицу има едем ћелије као прве структурне манифестације исхемијом захваћеног ткива (293). Такође, исхемијску повреду прати и системска инфламација услед хиперпродукције проинфламацијских цитокина и експресије адхезионих молекула од стране ендотелних ћелија. Поновно успостављање адекватног протока крви кроз исхемијом захваћено ткиво (реперфузија) парадоксално изазива даље оштећење ћелија услед хемотаксом мобилисаних неутрофила, CD4^+ Т лимфоцита и циркулишућих тромбоцита. Ове ћелије даље стимулишу продукцију ROS-а и других проинфламацијских медијатора што доводи до стања оксидационог стреса (294).

У нашој студији протокол излагања ниским температурама деловао је протективније у очувању кардиоваскуларне функције што је уочено кроз значајно боље контрактилне способности миокарда ових животиња у односу на групе пацова који су били чувани у нормотермијским условима за време трајања студије. Додатно, субакутна примена валсартан/сакубитрила уз излагање хипотермијским условима окружења остварила је снажнији кардиопротективни ефекат који је процењен преко значајно већих вредности dp/dt max и dp/dt min параметара (Табела 16, Графици 54 и 55). Такође, примењена фармаколошка терапија смањила је ниво ROS-а у узорцима коронарног венског ефлуента (Графици 56 и 57) и тиме највероватније остварила антиоксидациону заштиту, што је у спрези са повећаном активношћу ензима антиоксидационе заштите у крви третираних животиња (Графици 9 и 10). Механизми који су укључени у валсартан/сакубитрил посредовану кардиопротекцију се вероватно ослањају на ефекте које ова два лека остварују инхибицијом циљаних рецептора (неприлизина и AT_1 рецептора) али и значајним антиоксидационим потенцијалом. *Potter* и сарадници су у својој студији детаљно описали ефекат карперитида (рекомбинантни хумани ANP) наводећи благотворне ефекте овог молекула не само на хемодинамске параметре пацијената са срчаном инсуфицијенцијом већ и на ниво ензима антиоксидационе заштите (153). Описано је да и ниске концентрације карперитида смањују експресију тиоредоксина, ензима који индукује стварање ROS-а, потврђујући на тај начин антиоксидационо својство NPs. Иста студија је описала да преисхемијска примена ANP-а код пацова који су подвргнути И/Р протоколу значајно смањује величину инфаркта миокарда и ублажава штетне ефекте током реперфузионог периода (295). Поред значајних антиоксидационих, антиинфламацијских и антиапоптотских ефеката валсартан/сакубитрила, у литератури је описана и ефикасност ове дуалне фармаколошке терапије на смањење срчане хипертрофије. *Котра* и сарадници истакли су значајно смањену величину инфаркта миокарда животиња третираних валсартан/сакубитрилом код којих је лигацијом десцендентне гране леве коронарне артерије изазван инфаркт миокарда (296). Сходно томе, резултати наше студије показали су да је индукција МС-а довела до некрозе ткива, повећаног интерстицијума и едематозних промена у ткиву срчаног мишића ових животиња. Са друге стране, субакутна примена валсартан/сакубитрила током 4 недеље успела је да нормализује ове промене код пацова са МС-ом који су били изложени И/Р повреди (Слика 46). Позитиван ефекат терапије валсартан/сакубитрилом огледа се још и кроз смањену заступљеност колагених влакана у ткиву миокарда животиња са МС-ом у поређењу са нетретираном контролном групом (Слика 47 и График 58).

Терапијска својства хипотермије привлаче све већу пажњу у приступима лечења срчаног застоја као и других кардиоваскуларних поремећаја. Још давне 1950. године група истраживача испитивала је заштитна својства хипотермијског приступа током

кардиохируршких операција на анималном моделу при чему су животиње које су биле подвргнуте хипотермији боље толерисале исхемију услед престанка протока крви кроз срце од контролне групе животиња (297, 298). Такође, резултати клиничких испитивања подржавају примену хипотермијског третмана након срчаног застоја који би очувао интегритет неуралне мреже и тиме смањив иреверзибилно оштећење нервних ћелија у условима хипоксије (299). Иако је недавним претклиничким студијама потврђено кардиопротективно својство хипотермијског приступа током И/Р повреде срца (300, 301), још увек нису у потпуности разјашњени механизми као ни промене на молекулском нивоу које настају као последица излагања ниским температурама. Поред различитих сигналних путева којима се могу објаснити кардиопротективни механизми хипотермијског приступа, сматра се да смањење метаболичких потреба миокарда током хипотермије чува резерве АТФ-а и на тај начин штити ћелијски и митохондријски интегритет од различитих штетних утицаја (299). Међутим, детаљније посматрано хипотермија активира специфичне протеине (енгл. *Heat-Shock Proteins* – HSP) који ублажавају реперфузијом-индуковано оштећење миокарда. Хипотермијом експримирани HSP даље активирају антиапоптоске путеве и потенцирају фосфорилацију серин/треонин киназе (енгл. *Akt*). Тако награђен комплекс HSP-Akt директно активира синтезу NO-синтазе 3 и следствену продукцију NO, што за финални ефекат има смањену продукцију ROS-а (302). Резултати наше студије показали су значајно бољу контрактилну способност миокарда животиња које су биле изложене хладноћи током реперфузионог периода, што је праћено смањеним стварањем кисеоничких радикала у узорцима коронарног венског ефлуента (Табеле 16 и 17). Такође, хипотермијски приступ успео је да ублажи морфолошке промене у ткиву миокарда након И/Р повреде при чему је супериорнији ефекат уочен уз истовремену примењену дуалну фармаколошку терапију (Слика 46).

5.6. *In silico* идентификација интеракција валсартан/сакубитрила са регулаторима *browning-a*

Механизам молекулског препознавања валсартан/сакубитрила и познатог регулатора *browning-a*, mTORC1, је још увек непознат. Са циљем да се идентификују потенцијални сигнални путеви који су укључени у процес фармаколошке индукције *browning-a*, испитан је афинитет везивања сакубитрила и валсартана према mTORC1 подјединицама. Како би се добио што прецизнији увид у везујуће интеракције које су укључене у стабилизацију лиганд-протеин комплекса, коришћен је *in silico* приступ, при чему су спроведене студије молекулског уклапања и молекулске динамике.

На основу израчунатих докинг скорова, може се уочити да су сакубитрилат и валсартан показали највећи афинитет везивања према mTOR и mLST8 подјединици (-37,15 kJ/mol и -32,26 kJ/mol) (Табела 18). Израчунате просечне вредности слободне енергије везивања (-155,4356 kJ/mol и -126,9618064 kJ/mol) су у сагласности са израчунатим докинг скоровима у студијама молекулског докинга. У претходно објављеној студији молекулског докинга која је спроведена у софтверу *AutoDock 4.2*, аутори су молекулски уклапали кетопрофен у RAPTOR и mLST8 подјединице mTORC1, да би разјаснили mTORC1-посредовану активацију COX-2 сигналног пута (303). У овој студији кетопрофен је остварио докинг скор од -28,70 kJ/mol при везивању за RAPTOR подјединицу, и -26,27 kJ/mol у интеракцији са mLST8 подјединицом. Сакубитрилат је остварио већу вредност докинг скор за mLST8 подјединицу (-21,92 kJ/mol), али значајно нижу вредност докинг скор за RAPTOR подјединицу (-35,90 kJ/mol) у поређењу са кетопрофеном. Са друге стране, валсартан је остварио нижу вредност докинг скор за обе подјединице mTORC1, што указује на снажнији афинитет везивања овог молекула.

Аминокиселински остаци LYS898, VAL901, GLN1624, ARG1628, LYS1662 и LYS1655 mTOR подјединице учествују у грађењу нековалентних интеракција са сакубитрилатом. Као што се може уочити, ови аминокиселински остаци садрже претежно базне бочне ланце, што значајно утиче на њихову способност да формирају водоничне везе са кисеониковим атомима карбоксилне групе сакубитрилата. Значајан удео у молекулској интеракцији сакубитрилата и mTOR подјединице чине електростатичке нековалентне интеракције, на шта указује π -анјон интеракција са остатком VAL901 и вредност електростатичке енергије (-25,90 kJ/mol) (Слика 49). Највећи афинитет везивања валсартана према mLST8 подјединици може се објаснити грађењем вишеструких водоничних веза, хидрофобних и електростатичких интеракција (Слика 52). Добијени резултат је додатно потврђен нижом вредношћу израчунате интермолекулске енергије (-43,85 kJ/mol), у поређењу са вредностима за друге подјединице. Међутим, упркос закључцима који су добијени у студијама молекулског докинга, добро је познато да је овај *in silico* приступ подложен одређеним ограничењима која укључују одсуство молекула воде у симулацији, као и статичку природу лиганд-протеин комплекса (304). Због поменутих чињеница, спроведено је додатно испитивање конформационе стабилности сакубитрилат-mTOR и валсартан-mLST8 комплекса коришћењем студија молекулске динамике, што омогућава процену способности ових молекула да одржавају стабилну везујућу конформацију током времена. Као што је приказано на RMSD дијаграмима, mTOR и mLST8 подјединице у комплексу са сакубитрилатом и валсартаном биле су конформационо стабилне током времена симулације, што показује да ове подјединице нису претрпеле велике конформационе промене. Сакубитрилат и валсартан су такође били стабилни у солватисаним комплексима (са одступањима од приближно 2-3 Å у просеку од почетне конфигурације), што указује на то да није дошло до већих конформационих промена почетне везујуће конформације испитиваних молекула. Анализа RMSF дијаграма илуструје да су аминокиселински остаци присутни у везујућем џепу протеина показали умерене флукуације (Слике 54 и 55).

Приказ сакубитрилат-mTOR интеракција кроз време показује да су водоничне везе са остацима LYS1662, ARG1628 и LYS1655 присутне током већег дела симулације и да значајно доприносе стабилизацији лиганд-протеин комплекса. Способност сакубитрилата да формира дуготрајне водоничне везе са аминокиселинским остацима mTOR подјединице током времена указује на висок афинитет везивања овог једињења према поменутој подјединици.

Са друге стране, водоничне везе и хидрофобне интеракције су доминантни контакти које валсартан формира при везивању за mLST8 подјединицу. Током еволуције солватисаног система током времена, водоничне везе са остацима PHE93, LEU136 и SER175 које су уочене у студијама молекулског докинга, се одржавају током симулације. Електростатичка интеракција са остатком HIS177, која је примећена у студији молекулског докинга, задржава своју јонску природу уз додатак хидрофобних и протон-везујућих својстава. Штавише, водонична веза са остатком ARG227 током симулације постала је вишеструки контакт хидрофобне и јонске природе који је додатно укључен у формирање водених мостова (Слика 56). Узимајући све у обзир, треба нагласити да способност валсартана да формира трајне водоничне везе и хидрофобне интеракције са аминокиселинским остацима mLST8 током времена, указује на његов висок афинитет везивања према овој подјединици mTORC1.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата који су приказани у оквиру ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

1. Синергистички ефекат дуалне фармаколошке терапије и излагања хипотермији довео је до значајног смањења телесне масе као и масе масног ткива код животиња са МС-ом.
2. Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом уз излагање протоколу хлађења допринео је значајно бољој гликорегулацији, нивоу инсулина као и липидном статусу животиња са МС-ом што указује на ефикасност ове дуалне терапије у ублажавању симптома дијабетеса.
3. Субакутна примена валсартан/сакубитрила утицала је на хемодинамске параметре код животиња са МС-ом у погледу регулације крвног притиска, побољшања ејекционе фракције као и дебљине зида леве коморе, док је израженији кардиопротективни ефекат уочен у групи животиња које су биле третиране овом фармаколошком терапијом у хипотермијским условима, што се огледа кроз побољшану срчану функцију и контрактилну способност миокарда ових животиња.
4. Значајно ниже вредности прооксидационих молекула уз повећану активност ензима антиоксидационе заштите измерене су након четворонедељног третмана валсартан/сакубитрилом, што доприноси смањењу оксидационог стреса као главног феномена у патогенези МС-а.
5. Протокол хлађења значајно је утицао на вредности секретованих адипокина, при чему је довео до смањења концентрације адипонектина, лептина и повећања нивоа грелина у свим испитиваним групама. Међутим, истовремено излагање хладноћи и третману валсартан/сакубитрилом животиња са МС-ом, изазвало је најизразитију промену концентрације грелина као важног орексигеног хормона у патогенези МС-а.
6. Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом смањио је ниво проинфламацијских и индуковао продукцију антиинфламацијских цитокина у условима МС-а и на тај начин допринео смањењу локалне инфламације и бољем метаболичком статусу.
7. Фармаколошки третман валсартан/сакубитрилом повећао је серумске вредности cGMP-а, док је уз истовремено излагање хладноћи смањио активност АТР-а, што указује на то да је примењени третман индуковао *browning* а тиме и стварање беж адипоцита који се сматрају неефикасним за продукцију АТР-а.
8. *Browning* промовисан субакутном применом валсартан/сакубитрила са доминантно већим ефектом у условима хипотермије, одликује се стицањем мултилокуларне морфологије WAT-а, што је праћено и повећаном експресијом UCP-1 као главног термогеног биомолекула.
9. Значај PGC-1 α -PPAR γ сигналног пута у адаптивној термогенези, која је највероватније посредована применом валсартана, се огледа кроз значајно већу експресију ових гена у белим масним ћелијама животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом.
10. mTORC1 представља заједнички циљани молекул преко којег валсартан/сакубитрил засебним механизмима индукују *browning*, при чему истовремена хипотермијска активација β 3-адренергичких рецептора додатно индукује експресију mTOR, а тиме и UCP-1 у масном ткиву животиња са МС-ом.
11. Сprovedена „слепа“ студија молекулског докинга показала је да је сакубитрилат постигао најстабилнију молекулску интеракцију са mTOR подјединицом, док је валсартан показао највећи афинитет везивања према mLST8 подјединици.

Способност грађења стабилних комплекса сакубитрилата и валсартана са mTOR и mLST8 подједицама mTORC1 током времена указује на висок афинитет везивања ова два једињења према горе поменутих подјединицама mTORC1.

12. У складу са изнетим чињеницама, овом студијом је утврђено да валсартан/сакубитрил остварују мултифакторски учинак у стању МС-а, остварујући бројне повољне хемодинамске ефекате али и снажан утицај на морфологију и функцију WAT-а као главног ендокриног органа у стању МС-а.
13. Узимајући у обзир епидемијски карактер гојазности, ово истраживање може представљати одступницу за будућа клиничка истраживања која би послужила за постављање евентуалне нове индикације за клиничку примену валсартан/сакубитрила у терапији гојазности и у превенцији настанка кардиометаболичких болести.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization: Obesity and overweight. Доступно на: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Последњи пут посећено 23.8.2023.
2. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(2):143–9.
3. Gaspar RC, Pauli JR, Shulman GI, Muñoz VR. An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021;320(3):E488–95.
4. Cheng L, Wang J, Dai H, Duan Y, An Y, Shi L, et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte*. 2021;10(1):48–65.
5. Marlatt KL, Ravussin E. Brown adipose tissue: an update on recent findings. *Curr Obes Rep*. 2017;6(4):389–96.
6. Salam MM, Yousuf R, Salam MW, Haque M. Obesity and overweight: A global public health issue. *Adv Hum Biol*. 2023;13(1):154-6.
7. Lee B, Jeong S, Roh M. Association between body mass index and health outcomes among adolescents: the mediating role of traditional and cyber bullying victimization. *BMC Public Health* 2018;18:674.
8. Kuryłowicz A, Puzianowska-Kuźnicka M. Induction of adipose tissue browning as a strategy to combat obesity. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6241.
9. Payab M, Abedi M, Foroughi Heravani N, Hadavandkhani M, Arabi M, Tayanloo-Beik A, et al. Brown adipose tissue transplantation as a novel alternative to obesity treatment: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 2021;45(1):109–21.
10. Soler-Vázquez MC, Mera P, Zagmutt S, Serra D, Herrero L. New approaches targeting brown adipose tissue transplantation as a therapy in obesity. *Biochem Pharmacol*. 2018;155:346–55.
11. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Viana M. Mechanisms of impaired brown adipose tissue recruitment in obesity. *Front Physiol*. 2019;10:94.
12. Hui HX, Feng T. Adipose Tissue as an Endocrine Organ [Internet]. *Adipose Tissue*. InTech; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76220>.
13. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *HMBCI*. 2016;26(1): 25-42.
14. Nikolic M, Novakovic J, Ramenskaya G, Kokorekin V, Jeremic N, Jakovljevic V. Cooling down with Entresto. Can sacubitril/valsartan combination enhance browning more than coldness? *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):175.
15. Toczylowski K, Hirnle T, Harasiuk D, Zabielski P, Lewczuk A, Dmitruk I, et al. Plasma concentration and expression of adipokines in epicardial and subcutaneous adipose tissue are associated with impaired left ventricular filling pattern. *J Transl Med*. 2019;17(1):310.
16. Berggren JR, Hulver MW, Houmard JA. Fat as an endocrine organ: influence of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;99(2):757-64.
17. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200.
18. Gariballa S, Alkaabi J, Yasin J, Al Essa A. Total adiponectin in overweight and obese subjects and its response to visceral fat loss. *BMC Endocr Disord*. 2019;19(1):55.
19. Luo L, Liu M. Adiponectin: friend or foe in obesity and inflammation. *Medical Review*. 2022;2(4):349-62.
20. Makris MC, Alexandrou A, Papatsoutsos EG, Malietzis G, Tsilimigras DI, Guerron AD, et al. Ghrelin and Obesity: Identifying Gaps and Dispelling Myths. A Reappraisal. In *Vivo*. 2017;31(6):1047-50.

21. Wiedmer P, Nogueiras R, Broglio F, D'Alessio D, Tschöp MH. Ghrelin, obesity and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(10):705-12.
22. Cummings DE, Shannon MH. Roles for Ghrelin in the Regulation of Appetite and Body mass. *Arch Surg.* 2003;138(4):389-96.
23. Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2018;27(1):68-83.
24. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010;11(1):11-8.
25. Gasevic D, Kohli S, Khan N, Lear SA. Abdominal Adipose Tissue and Insulin Resistance: The Role of Ethnicity. In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity.* Academic Press. 2014. p. 125-140
26. Cornide-Petronio ME, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J, Peralta C. New Insights into the Liver-Visceral Adipose Axis During Hepatic Resection and Liver Transplantation. *Cells.* 2019;8(9):1100.
27. Reynés B, van Schothorst EM, Keijer J, Ceresi E, Oliver P, Palou A. Cold induced depot-specific browning in ferret aortic perivascular adipose tissue. *Front Physiol.* 2019;10:1171.
28. Britton KA, Massaro JM, Murabito JM, Kreger BE, Hoffmann U, Fox CS. Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and allcause mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(10):921-5.
29. Marinou K, Hodson L, Vasan SK, Fielding BA, Banerjee R, Brismar K, et al. Structural and functional properties of deep abdominal subcutaneous adipose tissue explain its association with insulin resistance and cardiovascular risk in men. *Diabetes Care.* 2014;37(3):821-9.
30. Leitner BP, Huang S, Brychta RJ, Duckworth CJ, Baskin AS, McGehee S, et al. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(32):8649-54.
31. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a minireview. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23.
32. Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 2008;39(8):715-28.
33. Townsend K, Tseng YH. Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte.* 2012;1(1):13-24.
34. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 2012;151(2):400-13.
35. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19(10):1252-63.
36. Carpentier AC, Blondin DP, Virtanen KA, Richard D, Haman F, Turcotte ÉE. Brown adipose tissue energy metabolism in humans. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:447.
37. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(1):24-36.
38. Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell.* 2015;163(3):643-55.
39. Keipert S, Kutschke M, Ost M, Schmarzmayr T, van Schothorst EM, Lamp D, et al. Long-term cold adaptation does not require FGF21 or UCP1. *Cell Metab.* 2017;26(2):437-6.e5.
40. Esteve RM. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr.* 2014;61(2):100-12.

41. Orava J, Nuutila P, Noponen T, Parkkola R, Viljanen T, Enerbäck S, et al. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(11):2279-87.
42. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631-4.
43. Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, Sahoo SK, Gupta SC, Shaikh SA, et al. Sarcosine is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat Med*. 2012;18(10):1575-9.
44. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
45. Puar T, van Berkel A, Gotthardt M, Havekes B, Hermus AR, Lenders JW, et al. Genotype-dependent brown adipose tissue activation in patients with pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(1):224-32.
46. Rajan S, Gupta A, Beg M, Shankar K, Srivastava A, Varshney S, et al. Adipocyte transdifferentiation and its molecular targets. *Differentiation*. 2014;87(5):183-92.
47. Loh RKC, Kingwell BA, Carey AL. Human brown adipose tissue as a target for obesity management; beyond cold-induced thermogenesis. *Obes Rev*. 2017;18(11):1227-42.
48. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27:234-50.
49. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
50. Lee P, Greenfield JR, Ho KK, Fulham MJ. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(4):E601-6.
51. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.
52. Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):33-42.
53. Shan T, Liang X, Bi P, Zhang P, Liu W, Kuang S. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res*. 2013;54(8):2214-24.
54. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263-73.
55. Shapira SN, Seale P. Transcriptional control of brown and beige fat development and function. *Obesity (Silver Spring)*. 2019;27(1):13-21.
56. Salma N, Xiao H, Mueller E, Imbalzano AN. Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 2004;24(11):4651-63.
57. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):969-85.
58. Machado SA, Pasquarelli-do-Nascimento G, da Silva DS, Farias GR, de Oliveira Santos I, Baptista LB, et al. Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutr Metab (Lond)*. 2022;19(1):61.
59. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 1(01):S36-42.

60. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961–7.
61. Villarroya F, Peyrou M, Giralt M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie*. 2017;134:86-92.
62. Xue B, Coulter A, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Mol Cell Biol*. 2005;25(18):8311-22.
63. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*. 2004;24(7):3057-67
64. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
65. Gill JA, La Merrill MA. An emerging role for epigenetic regulation of Pgc-1 α expression in environmentally stimulated brown adipose thermogenesis. *Environ Epigenet*. 2017;3(2):dvx009.
66. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):884S-90.
67. Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS. PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(6):3913-7.
68. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 2006;3(5):333-41.
69. Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740(2):293-304.
70. Wu H, Li X, Shen C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in white and brown adipocyte regulation and differentiation. *Physiol Res*. 2020;69(5):759-73.
71. Favero G, Krajčiková K, Bonomini F, Rodella LF, Tomečková V, Rezzani R. Browning of Adipose Tissue and Sirtuin Involvement [Internet]. *Adipose Tissue*. InTech; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74760>.
72. van Dam AD, Kooijman S, Schilperoort M, Rensen PC, Boon MR. Regulation of brown fat by AMP-activated protein kinase. *Trends Mol Med*. 2015;21(9):571-9.
73. Wu L, Xia M, Duan Y, Zhang L, Jiang H, Hu X, et al. Berberine promotes the recruitment and activation of brown adipose tissue in mice and humans. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):468.
74. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol Cell*. 2017;66(6):789-800.
75. Shamsi F, Xue R, Huang TL, Lundh M, Liu Y, Leiria LO, et al. FGF6 and FGF9 regulate UCP1 expression independent of brown adipogenesis. *Nat Commun*. 2020;11(1):1421.
76. Cuevas-Ramos D, Mehta R, Aguilar-Salinas CA. Fibroblast growth factor 21 and browning of white adipose tissue. *Front Physiol*. 2019;10:37.
77. Iida S, Chen W, Nakadai T, Ohkuma Y, Roeder RG. PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific Ucp1 gene through interactions with Mediator subunit MED1. *Genes Dev*. 2015;29(3):308-21.
78. Ishibashi J, Seale P. Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature (Austin)*. 2015;2(1):65-72.

79. Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HM, Goyama S, Sato T, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* 2014;19(4):593-604.
80. Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, et al. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 2008;22(10):1397-409.
81. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell.* 2014;156(1-2):304-16.
82. Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, Drew BG, Hong C, Tu Y, et al. Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab.* 2013;17(3):423-35.
83. Fukano K, Okamatsu-Ogura Y, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K. Cold Exposure Induces Proliferation of Mature Brown Adipocyte in a β 3-Adrenergic Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166579.
84. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
85. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1504(1):82-106.
86. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell.* 2015;160(1-2):74-87.
87. Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):691-702.
88. Rosenwald M, Perdikari A, Röllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):659-67.
89. Rabiee A. Beige fat maintenance; toward a sustained metabolic health. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:634.
90. Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):389.
91. Abdullahi A, Auger C, Stanojic M, Patsouris D, Parousis A, Epelman S, et al. Alternatively activated macrophages drive browning of white adipose tissue in burns. *Ann Surg.* 2019;269(3):554-63.
92. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Gavaldà-Navarro A, Giralt M. Toward an understanding of how immune cells control brown and beige adipobiology. *Cell Metab.* 2018;27(5):954-61.
93. Wang Z, Wang QA, Liu Y, Jiang L. Energy metabolism in brown adipose tissue. *FEBS J.* 2021;288(12):3647-62.
94. Peres Valgas da Silva C, Hernández-Saavedra D, White JD, Stanford KI. Cold and exercise: therapeutic tools to activate brown adipose tissue and combat obesity. *Biology (Basel).* 2019;8(1):9.
95. Moura MA, Festuccia WT, Kawashita NH, Garófalo MA, Brito SR, Kettelhut IC, et al. Brown adipose tissue glyceroneogenesis is activated in rats exposed to cold. *Pflugers Arch.* 2005;449:463-9.
96. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2011;13(3):238-40.
97. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab.* 2011;14(2):272-9.

98. Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, Kameya T, Sugie H, Saito M. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(6):812-7.
99. Hanssen MJ, van der Lans AA, Brans B, Hoeks J, Jardon KM, Schaart G, et al. Short-term cold acclimation recruits brown adipose tissue in obese humans. *Diabetes*. 2016;65(5):1179-89.
100. Erickson A, Moreau R. The regulation of FGF21 gene expression by metabolic factors and nutrients. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;30(1):j/hmbci.2017.30.issue-1/hmbci-2016-0016/hmbci-2016-0016.xml.
101. Joung KE, Clausen D, Herdt A, Presti A, Snyder R, Peters C, et al. Association of circulating FGF-21 levels in the first week of life and postnatal growth in hospitalized preterm infants. *Metabol Open*. 2020;5:100030.
102. Lee P, Brychta RJ, Linderman J, Smith S, Chen KY, Celi FS. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):E98-102.
103. Hnsen MJ, Broeders E, Samms RJ, Vosselman MJ, van der Lans AA, Cheng CC, et al. Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Sci Rep*. 2015;5:10275.
104. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab*. 2014;19(2):302-9.
105. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*. 1992;103(Pt4):931-42.
106. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol*. 1994;266(4Pt 2):R1371-82.
107. Ghorbani M, Himms-Hagen J. Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21(6):465-75.
108. Jimenez M, Barbatelli G, Allevi R, Cinti S, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P, Preitner F. Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem*. 2003;270(4):699-705.
109. de Jong JMA, Wouters RTF, Boulet N, Cannon B, Nedergaard J, Petrovic N. The β 3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;312(6):E508-18.
110. Montanari T, Pošćić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obes Rev*. 2017;18(5):495-513.
111. Katoh T, Kakizaki H, Lee KS, Ishida K, Katou D, Yamamoto O, et al. Cardiovascular safety of mirabegron add-on therapy to tamsulosin for the treatment of overactive bladder in men with lower urinary tract symptoms: a post hoc analysis from the MATCH study. *Low Urin Tract Symptoms*. 2021;13(1):98-107.
112. Rosa GM, Ferrero S, Nitti VW, Wagg A, Saleem T, Chapple CR. Cardiovascular safety of β 3-adrenoceptor agonists for the treatment of patients with overactive bladder syndrome. *Eur Urol*. 2016;69(2):311-23.
113. Ribet C, Montastier E, Valle C, Bezaire V, Mazzucotelli A, Mairal A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology*. 2010;151(1):123-33.

114. Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6650-6.
115. Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, et al. The PPARgamma agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1327-35.
116. Xu L, Nagata N, Nagashimada M, Zhuge F, Ni Y, Chen G, et al. SGLT2 inhibition by empagliflozin promotes fat utilization and browning and attenuates inflammation and insulin resistance by polarizing m2 macrophages in diet-induced obese mice. *EBioMedicine.* 2017;20:137-49.
117. Braz GRF, da Silva AI, Silva SCA, Pedroza AAS, de Lemos MDTB, de Lima FAS, et al. Chronic serotonin reuptake inhibition uncouples brown fat mitochondria and induces beiging/browning process of white fat in overfed rats. *Life Sci.* 2020;245:117307.
118. Iborra-Egea O, Gálvez-Montón C, Roura S, Perea-Gil I, Prat-Vidal C, Soler- Botija C, et al. Mechanisms of action of sacubitril/valsartan on cardiac remodeling: a systems biology approach. *NPJ Syst Biol Appl.* 2017;3:12.
119. Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezech EM, Ofoke IH, Ogbu CO, et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep.* 2023;13(1):13398.
120. Mark Mondol S, Das D, Priom DM, Shaminur Rahman M, Rafiul Islam M, Rahaman MM. In Silico Identification and Characterization of a Hypothetical Protein From *Rhodobacter capsulatus* Revealing S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase Activity. *Bioinform Biol Insights.* 2022;16:11779322221094236.
121. Bora N, Jha AN. In silico Metabolic Pathway Analysis Identifying Target Against Leishmaniasis - A Kinetic Modeling Approach. *Front Genet.* 2020;11:179.
122. Sumera, Anwer F, Waseem M, Fatima A, Malik N, Ali A, Zahid S. Molecular Docking and Molecular Dynamics Studies Reveal Secretory Proteins as Novel Targets of Temozolomide in Glioblastoma Multiforme. *Molecules.* 2022;27(21):7198.
123. Jovanović JD, Antonijević M, Vojinović R, Filipović ND, Marković Z. In silico study of inhibitory capacity of sacubitril/valsartan toward neprilysin and angiotensin receptor. *RSC Adv.* 2022;12(46):29719-26.
124. de Gasparo M, Whitebread S. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT1 receptors. *Regul Pept.* 1995;59(3):303-11.
125. Bhuiyan MA, Ishiguro M, Hossain M, Nakamura T, Ozaki M, Miura S, et al. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life Sci.* 2009;85(3-4):136-40.
126. Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation.* 2001;103(6):904-12.
127. Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SE. Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(2):93-8.
128. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):807-25.
129. Engeli S, Böhnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension.* 2005;45(3):356-62.
130. Goossens GH, Blaak EE, van Baak MA. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev.* 2003;4(1):43-55.

131. Kurata A, Nishizawa H, Kihara S, Maeda N, Sonoda M, Okada T, et al. Blockade of angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney Int.* 2006;70:1717-24.
132. Hung WW, Hsieh TJ, Lin T, Chou PC, Hsiao PJ, Lin KD, et al. Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(1):3-12.
133. Graus-Nunes F, Rachid TL, de Oliveira SF, Barbosa-da-Silva S, Souza- Mello V. AT1 receptor antagonist induces thermogenic beige adipocytes in the inguinal white adipose tissue of obese mice. *Endocrine.* 2017;55(3):786–98.
134. Jeon EJ, Kim DY, Lee NH, Choi HE, Cheon HG. Telmisartan induces browning of fully differentiated white adipocytes via M2 macrophage polarization. *Sci Rep.* 2019;9(1):1236.
135. Smith PM, Hindmarch CC, Murphy D, Ferguson AV. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. *Front Psychol.* 2014;5:832.
136. van der Vaart JI, Boon MR, Houtkooper RH. The Role of AMPK Signaling in Brown Adipose Tissue Activation. *Cells.* 2021;10(5):1122.
137. Kim DY, Choi MJ, Ko TK, Lee NH, Kim OH, Cheon HG. Angiotensin AT1 receptor antagonism by losartan stimulates adipocyte browning via induction of apelin. *J Biol Chem.* 2020;295(44):14878-92.
138. Hasan AU, Ohmori K, Hashimoto T, Kamitori K, Yamaguchi F, Ishihara Y, et al. Valsartan ameliorates the constitutive adipokine expression pattern in mature adipocytes: a role for inverse agonism of the angiotensin II type 1 receptor in obesity. *Hypertens Res.* 2014;37(7):621-8.
139. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes.* 2013;62(6):1774-82.
140. Stanford KI, Lynes MD, Takahashi H, Baer LA, Arts PJ, May FJ, et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. *Cell Metab.* 2018;27(5):1111-1120.e3.
141. Lynes MD, Leiria LO, Lundh M, Bartelt A, Shamsi F, Huang TL, et al. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue. *Nat Med.* 2017;23(5):631-7.
142. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2002;143(6):2376-84.
143. Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, Maki M, Shibata H. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):87.
144. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature.* 2017;552(7685):368-73.
145. Blanchard PG, Festuccia WT, Houde VP, St-Pierre P, Brûlé S, Turcotte V, et al. Major involvement of mTOR in the PPAR γ -induced stimulation of adipose tissue lipid uptake and fat accretion. *J Lipid Res.* 2012;53(6):1117-25.
146. Carper D, Coué M, Nascimento EBM, Barquissau V, Lagarde D, Pestourie C, et al. Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non-shivering thermogenesis. *Cell Rep.* 2020;32(8):108075.
147. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature.* 2011;480(7375):104-8.

148. Liu D, Bordicchia M, Zhang C, Fang H, Wei W, Li JL, et al. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1704-16.
149. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993-1004.
150. Schiering N, D'Arcy A, Villard F, Ramage P, Logel C, Cumin F, et al. Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril. *Sci Rep*. 2016;6:27909.
151. Usuda D, Higashikawa T, Hotchi Y, Usami K, Shimozawa S, Tokunaga S, et al. Angiotensin receptor blocker neprilysin inhibitors. *World J Cardiol*. 2021;13(8):325-39.
152. Campbell DJ. Long-term neprilysin inhibition—implications for ARNIs. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(3):171-86.
153. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;191:341-66.
154. Wong PC, Guo J, Zhang A. The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. *Adv Physiol Educ*. 2017;41(2):179-85.
155. Luce M, Barba C, Yi D, Mey A, Roussel D, Bres E, et al. Accumulation of natriuretic peptides is associated with protein energy wasting and activation of browning in white adipose tissue in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2020;98(3):663-72.
156. Kimura H, Nagoshi T, Oi Y, Yoshii A, Tanaka Y, Takahashi H, et al. Treatment with atrial natriuretic peptide induces adipose tissue browning and exerts thermogenic actions in vivo. *Sci Rep*. 2021;11(1):17466.
157. Liu D, Ceddia RP, Collins S. Cardiac natriuretic peptides promote adipose “browning” through mTOR complex-1. *Mol Metab*. 2018;9:192-8.
158. Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruithoff K, Mayer P, et al. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB J*. 2013;27(4):1621-30.
159. Seferovic JP, Solomon SD, Seely EW. Potential mechanisms of beneficial effect of sacubitril/valsartan on glycemic control. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020;11:2042018820970444.
160. Vardeny O, Miller R, Solomon SD. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition for the treatment of heart failure. *JACC Heart Fail*. 2014;2(6):663-70.
161. Kimura H, Nagoshi T, Yoshii A, Kashiwagi Y, Tanaka Y, Ito K, et al. The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: the direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe. *Sci Rep*. 2017;7(1):12978.
162. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. 2000;49:1390-1394.
163. Brondum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm Metab Res*. 2005;37:56-60.
164. Davidson EP, Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, Yorek MA. Vascular and Neural Complications in Type 2 Diabetic Rats: Improvement by CAKubitril/Valsartan Greater Than Valsartan Alone. *Diabetes*. 2018;67(8):1616-26.
165. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-91.

166. ChemOffice Ultra 7.0.1, 2002, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA: <http://www.cambridgesoft.com>.
167. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. 2017;552(7685):368-73.
168. Protein Data Bank. Доступно на: <http://www.rcsb.org/>. Последњи пут посећено 25.8.2023.
169. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
170. Schrödinger, L., DeLano, W. PyMOL. Доступно на: <https://www.pymol.org/pymol>. Последњи пут посећено 25.8.2023.
171. Schrödinger Release 2020-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, 2020.
172. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *J Chem Theory. Comput.* 2016;12(1): 281-96.
173. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1983;79(2):926-35.
174. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(5):449-61.
175. Ernsberger PJR. The Glucose Tolerance Test as a Laboratory Tool with Clinical Implications [Internet]. Glucose Tolerance. InTech; 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/54785>.
176. Kawamoto R, Tabara Y, Kohara K, Miki T, Kusunoki T, Takayama S, et al. Relationships between lipid profiles and metabolic syndrome, insulin resistance and serum high molecular adiponectin in Japanese community-dwelling adults. *Lipids Health Dis.* 2011;10:79.
177. Stanciu S, Rusu E, Miricescu D, Radu AC, Axinia B, Vrabie AM, et al. Links between Metabolic Syndrome and Hypertension: The Relationship with the Current Antidiabetic Drugs. *Metabolites.* 2023;13(1):87.
178. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens.* 2008;21(12):1288-91.
179. Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, et al. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart, lung and Circulation.* 2002;11:167-73.
180. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Fan WYC, Nakatani BT, Pagan LU, Padovani CR, et al. Association between echocardiographic structural parameters and body mass in Wistar rats. *Oncotarget.* 2017;8(16):26100-5.
181. Masenga SK, KaBme LS, Chakulya M, Kirabo A. Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7898.
182. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
183. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131-8.
184. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, CRC Press. 1995;123-32.
185. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic

- toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*. 2003;22:205-11.
186. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090.
187. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*. 1984;105:121-6.
188. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(9):1675.
189. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA. 1984;83-5.
190. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-8.
191. Stojic I, Zivkovic V, Srejavic I, Nikolic T, Jeremic N, Jeremic J, et al. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol. Cell. Biochem*. 2018;439:19-33.
192. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43.
193. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res*. 2012;53(12):2791-6.
194. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289-98.
195. Orabi SH, Al-Sabbagh ES, Khalifa HK, Mohamed MAE, Elhamouly M, Gad-Allah SM, et al. Commiphora myrrha Resin Alcoholic Extract Ameliorates High Fat Diet Induced Obesity via Regulation of UCP1 and Adiponectin Proteins Expression in Rats. *Nutrients*. 2020;12(3):803.
196. Gately K, Al-Alao B, T Dhillon, Mauri F, Cuffe S, Seckl M, et al. Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: a verification study. *Lung Cancer*. 2012;75(2):217-22.
197. Lima YC, Kurauti MA, da Fonseca Alves G, Ferezini J, Piovan S, Malta A, et al. Whey protein sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni (Bert.) increases mitochondrial biogenesis markers in the skeletal muscle of resistance-trained rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2019;16:65.
198. Huang X, Ruan G, Liu G, Gao Y, Sun P. Immunohistochemical Analysis of PGC-1 α and ERR α Expression Reveals Their Clinical Significance in Human Ovarian Cancer. *Onco Targets Ther*. 2020;13:13055-62.
199. Gou W, Wei H, Swaby L, Green E, Wang H. Deletion of Spinophilin Promotes White Adipocyte Browning. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(1):91.
200. Eghtedari AR, Vaezi MA, Safizadeh B, Ghasempour G, Babaheidarian P, Salimi V, et al. Evaluation of the expression pattern and diagnostic value of PPAR γ in malignant and benign primary bone tumors. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022;23(1):746.
201. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
202. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*. 2006;74:443-77.
203. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50:940-50.

204. Kadipasaoglu KA, Bennink GW, Conger JL, Birovljev S, Sartori M, Clubb Jr, FJ, Frazier OH. An ex vivo model for the reperfusion of explanted human hearts. *Tex Heart Inst J.* 1993;20:33.
205. Jeremic JN, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejovic IM, Bradic JV, Milosavljevic IM, et al. Garlic Derived Diallyl Trisulfide in Experimental Metabolic Syndrome: Metabolic Effects and Cardioprotective Role. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9100.
206. Hadi AM, Mouchaers KT, Schaliij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: A new macro-based automated analysis. *Anal. Cell. Pathol.* 2010;33:257-69.
207. Haverinen E, Paalanen L, Palmieri L, Padron-Monedero A, Noguer-Zambrano I, Sarmiento-Suarez R, et al. Comparison of metabolic syndrome prevalence using four different definitions – a population-based study in Finland. *Arch Public Health.* 2021;79:231.
208. Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig.* 2014;5:349-358.
209. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216-26.
210. Wang X, Che H, Zhang W, Wang J, Ke T, Cao R, et al. Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *Int J Biol Sci.* 2015;11(10):1171-80.
211. Ravussin Y, Xiao C, Gavrilova O, Reitman ML. Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice. *PLoS One.* 2014;9(1):e85876.
212. Wang TY, Liu C, Wang A, Sun Q. Intermittent cold exposure improves glucose homeostasis associated with brown and white adipose tissues in mice. *Life Sci.* 2015;139:153-9.
213. Saavedra JM. Angiotensin Receptor Blockers Are Not Just for Hypertension Anymore. *Physiology (Bethesda).* 2021;36(3):160-73.
214. Grégoire F, Pariente A, Fourrier-Reglat A, Haramburu F, Bégaud B, Moore N. A signal of increased risk of hypoglycaemia with angiotensin receptor blockers caused by confounding. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66(1):142-5.
215. Wang R, Ye H, Zhao Y, Wei J, Wang Y, Zhang X, Wang L. Effect of sacubitril/valsartan and ACEI/ARB on glycaemia and the development of diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Med.* 2022;20(1):487.
216. Birkenfeld AL, Adams F, Schroeder C, Engeli S, Jordan J. Metabolic actions could confound advantageous effects of combined angiotensin II receptor and neprilysin inhibition. *Hypertension.* 2011;57(2):e4-5.
217. Moro C, Klimcakova E, Lomède K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia.* 2007;50(5):1038-47.
218. Birkenfeld AL, Boschmann M, Engeli S, Moro C, Arafat AM, Luft FC, et al. Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man. *PLoS One.* 2012;7(8):e43238.
219. Okumura N, Jhund PS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, et al. PARADIGM-HF Investigators and Committees*. Effects of Sacubitril/Valsartan in the PARADIGM-HF Trial (Prospective Comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure) According to Background Therapy. *Circ Heart Fail.* 2016;9(9):e003212.
220. Wijkman MO, Claggett B, Vaduganathan M, Cunningham JW, Rørth R, Jackson A, et al. Effects of sacubitril/valsartan on glycemia in patients with diabetes and heart failure: the PARAGON-HF and PARADIGM-HF trials. *Cardiovasc Diabetol.* 2022;21(1):110.

221. Jordan J, Stinkens R, Jax T, Engeli S, Blaak EE, May M, et al. Improved insulin sensitivity with angiotensin receptor neprilysin inhibition in individuals with obesity and hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(2):254-63.
222. Bukowiecki LJ. Energy balance and diabetes. The effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67(4):382-93.
223. Tridetti J, Nguyen Trung ML, Ancion A, Lancellotti P. L'étude clinique du mois. PARAGON-HF : sacubitril/valsartan (Entresto®) dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (HFpEF) [The PARAGON-HF trial]. *Rev Med Liege.* 2020;75(2):130-5.
224. Selvaraj S, Claggett BL, Packer M, Zannad F, Anand IS, Pieske B, et al. Effects of Sacubitril/Valsartan on Serum Lipids in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(17):e022069.
225. Verboven K, Hansen D, Jocken JWE, Blaak EE. Natriuretic peptides in the control of lipid metabolism and insulin sensitivity. *Obes Rev.* 2017;18(11):1243-59.
226. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens.* 2008;21(7):733-41.
227. Bordicchia M, Spannella F, Ferretti G, Bacchetti T, Vignini A, Di Pentima C, et al. PCSK9 is Expressed in Human Visceral Adipose Tissue and Regulated by Insulin and Cardiac Natriuretic Peptides. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):245.
228. Pernes G, Morgan PK, Huynh K, Mellett NA, Meikle PJ, Murphy AJ, et al. Characterization of the circulating and tissue-specific alterations to the lipidome in response to moderate and major cold stress in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2021;320(2):R95-104.
229. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011;17(2):200-5.
230. Chen W, Xu Z, You W, Zhou Y, Wang L, Huang Y, et al. Cold exposure alters lipid metabolism of skeletal muscle through HIF-1 α -induced mitophagy. *BMC Biol.* 2023;21:27.
231. Malik AH, Aronow WS. Efficacy of Sacubitril/Valsartan in Hypertension. *Am J Ther.* 2022;29(3):e322-33.
232. Yu H, Zhou Y, Duan Y, Gao Y, Fang N, Zhang J, et al. Tranilast treats cold-related hypertension by reducing the expression of NLRP3 inflammasome. *FZM.* 2021;1(2):95-101.
233. Mengel LA, Nemati Moud B, Seidl H, Mesas-Fernández A, Seeliger C, Brandl B, et al. Effect of BMI on the Thermogenic Response to Cold Exposure and Associated Changes in Metabolism and Browning Markers in Adult Humans. *Obes Facts.* 2022;15(3):405-15.
234. Huo C, Song Z, Yin J, Zhu Y, Miao X, Qian H, et al. Effect of Acute Cold Exposure on Energy Metabolism and Activity of Brown Adipose Tissue in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol.* 2022;13:917084.
235. Li BH, Fang KF, Lin PH, Zhang YH, Huang YX, Jie H. Effect of sacubitril valsartan on cardiac function and endothelial function in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2021;77(4):425-33.
236. An J, Du Y, Li X, Bao Q, Guo Y, Song Y, et al. Myocardial protective effect of sacubitril-valsartan on rats with acute myocardial infarction. *Perfusion.* 2022;37(2):208-15.

237. Marvanova A, Kasik P, Elsnicova B, Tibenska V, Galatik F, Hornikova D, et al. Continuous short-term acclimation to moderate cold elicits cardioprotection in rats, and alters β -adrenergic signaling and immune status. *Sci Rep*. 2023;13(1):18287.
238. Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Capó X, Bouzas C, Mateos D, Pons A, et al. Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3):236.
239. Bekkouche L, Bouchenak M, Malaisse WJ, Yahia DA. The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients. *Horm Metab Res*. 2014;46(4):274-82.
240. Jing W, Vaziri ND, Nunes A, Suematsu Y, Farzaneh T, Khazaeli M, et al. LCZ696 (Sacubitril/valsartan) ameliorates oxidative stress, inflammation, fibrosis and improves renal function beyond angiotensin receptor blockade in CKD. *Am J Transl Res*. 2017;9(12):5473-84.
241. Cassano V, Armentaro G, Magurno M, Aiello V, Borrello F, Miceli S, et al. Short-term effect of sacubitril/valsartan on endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with chronic heart failure. *Front Pharmacol*. 2022;13:1069828.
242. Chung N, Park J, Lim K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2017;21(2):39-47.
243. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98:115-24.
244. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127:397-408.
245. Blagojevic DP, Grubor-Lajsic GN, Spasic MB. Cold defence responses: the role of oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3(2):416-27.
246. De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P. Atrial natriuretic peptide and oxidative stress. *Peptides*. 2010;31(7):1412-9.
247. Jastroch M. Uncoupling protein 1 controls reactive oxygen species in brown adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30):7744-6.
248. Cheng CF, Ku HC, Cheng JJ, Chao SW, Li HF, Lai PF, et al. Adipocyte browning and resistance to obesity in mice is induced by expression of ATF3. *Commun Biol*. 2019;2:389.
249. Luo X, Jia R, Zhang Q, Sun B, Yan J. Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):795.
250. Wei Q, Lee JH, Wang H, Bongmba OYN, Wu CS, Pradhan G, et al. Adiponectin is required for maintaining normal body temperature in a cold environment. *BMC Physiol*. 2017;17(1):8.
251. Imbeault P, Dépaule I, Haman F. Cold exposure increases adiponectin levels in men. *Metabolism*. 2009;58(4):552-9.
252. Tanaka T, Tsutamoto T, Sakai H, Nishiyama K, Fujii M, Yamamoto T, et al. Effect of atrial natriuretic peptide on adiponectin in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(4):360-6.
253. Korhonen T, Saarela S. Role of adiposity hormones in the mouse during fasting and winter-acclimatization. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005;140(2):217-23.

254. Sharieh Hosseini SG, Khatamsaz S, Shariati M. The effects of losartan on memory performance and leptin resistance induced by obesity and high-fat diet in adult male rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(1):41-8.
255. Pulkkinen L, Ukkola O, Kolehmainen M, Uusitupa M. Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome. *Int J Pept.* 2010;2010:248948.
256. Kojima C, Sasaki H, Tsuchiya Y, Goto K. The influence of environmental temperature on appetite-related hormonal responses. *J Physiol Anthropol.* 2015;34(1):22.
257. Ouerghi N, Feki M, Bragazzi NL, Knechtle B, Hill L, Nikolaidis PT, et al. Ghrelin Response to Acute and Chronic Exercise: Insights and Implications from a Systematic Review of the Literature. *Sports Med.* 2021;51(11):2389-410.
258. Schlueter N, de Sterke A, Willmes DM, Spranger J, Jordan J, Birkenfeld AL. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 2014;144(1):12-27.
259. Li Q, Yu Q, Lin L, Zhang H, Peng M, Jing C, et al. Hypothalamic peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates ghrelin production and food intake. *Neuropeptides.* 2018;69:39-45.
260. Reverte-Salisa L, Sanyal A, Pfeifer A. Role of cAMP and cGMP Signaling in Brown Fat. *Handb Exp Pharmacol.* 2019;251:161-82.
261. Glöde A, Naumann J, Gnad T, Cannone V, Kilic A, Burnett JC Jr, et al. Divergent effects of a designer natriuretic peptide CD-NP in the regulation of adipose tissue and metabolism. *Mol Metab.* 2017;6:276-87.
262. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 2006;86:1-23.
263. Ceddia RP, Liu D, Shi F, Crowder MK, Mishra S, Kass DA, et al. Increased Energy Expenditure and Protection From Diet-Induced Obesity in Mice Lacking the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE9. *Diabetes.* 2021;70(12):2823-36.
264. Anghel SI, Bedu E, Vivier CD, Descombes P, Desvergne B, Wahli W. Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance: a critical role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29946-57.
265. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;28(2):85.
266. Ravussin E, Galgani JE. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:33-47.
267. Ye, J. Mechanism of insulin resistance in obesity: a role of ATP. *Front Med.* 2015;15: 372-82.
268. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440(7086):944-8.
269. Williams CM, Rocca JR, Edison AS, Allison DB, Morgan TJ, Hahn DA. Cold adaptation does not alter ATP homeostasis during cold exposure in *Drosophila melanogaster*. *Integr Zool.* 2018;13(4):471-81.
270. You H, Laychock SG. Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300(3):E435-44.
271. Theresa Schöttl, Lisa Kappler, Katharina Braun, Tobias Fromme, Martin Klingenspor. Limited Mitochondrial Capacity of Visceral Versus Subcutaneous White Adipocytes in Male C57BL/6N Mice, *Endocrinology.* 2015;156(3):923-33.
272. Lonzetti Bargut TC, Souza-Mello V, Barbosa Aguila M, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin.* 2017;31(1).

273. Xu Z, You W, Zhou Y, Chen W, Wang Y, Shan T. Cold-induced lipid dynamics and transcriptional programs in white adipose tissue. *BMC Biol.* 2019;17(1):74.
274. Lim S, Honek J, Xue Y, Seki T, Cao Z, Andersson P, et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat Protoc.* 2012;7(3):606-15.
275. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 2012;122(3):1022-36.
276. Kashiwagi Y, Komukai K, Kimura H, Okuyama T, Maehara T, Fukushima K, et al. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest increases the plasma level of B-type natriuretic peptide. *Sci Rep.* 2020;10:15545.
277. Zuriaga MA, Fuster JJ, Gokce N, Walsh K. Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:27.
278. Yang X, Sui W, Zhang M, Dong M, Lim S, Seki T, et al. Switching harmful visceral fat to beneficial energy combustion improves metabolic dysfunctions. *JCI Insight.* 2017;2(4):e89044.
279. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, et al. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes.* 2009;58:2880-92.
280. Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20405-10.
281. Oliveira RL, Ueno M, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Gasparetti AL, Bezerra RM, et al. Cold-induced PGC-1 α expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(4):E686-95.
282. Nikolic M, Jeremic N, Lazarevic N, Stojanovic A, Milojevic Samanovic A, Novakovic J, Zivkovic V, Nikolic M, Nedeljkovic N, Mitrovic S, Jakovljevic V. Sacubitril/Valsartan promotes white adipose tissue browning in rats with metabolic syndrome through activation of mTORC1. *BioFactors.*
283. Cheung WW, Hao S, Zheng R, Wang Z, Gonzalez A, Zhou P, et al. Targeting interleukin-1 for reversing fat browning and muscle wasting in infantile nephropathic cystinosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(5):1296-311.
284. Leppäluoto J, Westerlund T, Huttunen P, Oksa J, Smolander J, Dugué B, et al. Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, beta-endorphin, cortisol, catecholamines and cytokines in healthy females. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(2):145-53.
285. Egecioglu E, Anesten F, Schéle E, Palsdottir V. Interleukin-6 is important for regulation of core body temperature during long-term cold exposure in mice. *Biomed Rep.* 2018;9(3):206-12.
286. Iwashita M, Nakatsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiya A, Fukushima T, et al. Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice. *Adipocyte.* 2013;2(1):28-32.
287. Nisoli E, Briscini L, Giordano A, Tonello C, Wiesbrock SM, Uysal KT, et al. Tumor necrosis factor α mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8033-8.
288. Nie Y, Yan Z, Yan W, Xia Q, Zhang Y. Cold exposure stimulates lipid metabolism, induces inflammatory response in the adipose tissue of mice and promotes the osteogenic differentiation of BMMSCs via the p38 MAPK pathway in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):10875-86.

289. Rajbhandari P, Thomas BJ, Feng AC, Hong C, Wang J, Vergnes L, et al. IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell*. 2018;72(1-2):218-33.e17.
290. Shen JF, Fan ZB, Wu CW, Qi GX, Cao QY, Xu F. Sacubitril Valsartan Enhances Cardiac Function and Alleviates Myocardial Infarction in Rats through a SUV39H1/SPP1 Axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:5009289.
291. Hu B, Jin C, Zeng X, Resch JM, Jedrychowski MP, Yang Z, et al. $\gamma\delta$ T cells and adipocyte IL-17RC control fat innervation and thermogenesis. *Nature*. 2020;578(7796):610-14.
292. Ma L, Li J, Wang G, Gong S, Zhang L, Li K, et al. Atrial natriuretic peptide suppresses Th17 development through regulation of cGMP-dependent protein kinase and PI3K-Akt signaling pathways. *Regul Pept*. 2013;181:9-16.
293. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66.
294. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-E-Silva O. Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5034.
295. Giannello P, Carlier M, Jamart J, Hulhoven R, Bernheim J, Bernard A, et al. Effect of 1–28 alpha-h atrial natriuretic peptide on acute renal failure in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant* 1995;9:481-9.
296. Kompa AR, Lu J, Weller TJ, Kelly DJ, Krum H, von Lueder TG, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibition provides superior cardioprotection compared to angiotensin converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2018;258:192-8.
297. Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: An investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg*. 1950;132:849-66.
298. Bigelow WG, Callaghan JC, Hopps JA. General hypothermia for experimental intracardiac surgery; the use of electrophrenic respirations, an artificial pacemaker for cardiac standstill and radio-frequency rewarming in general hypothermia. *Ann Surg*. 1950;132:531-9.
299. Chavez LO, Leon M, Einav S, Varon J. Editor's Choice- Inside the cold heart: A review of therapeutic hypothermia cardioprotection. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2017;6(2):130-41.
300. Yang X, Liu Y, Yang XM, Hu F, Cui L, Swingle MR, et al. Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):421-30.
301. Otake H, Shite J, Paredes OL, Shinke T, Yoshikawa R, Tanino Y, et al. Catheter-based transcatheter myocardial hypothermia attenuates arrhythmia and myocardial necrosis in pigs with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:250-60.
302. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, et al. Therapeutic hypothermia cardioprotection via AKT-and nitric oxide mediated attenuation of mitochondria oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H2164-73.
303. Kang NH, Mukherjee S, Jang MH, Pham HG, Choi M, Yun JW. Ketoprofen alleviates diet-induced obesity and promotes white fat browning in mice via the activation of COX-2 through mTORC1-p38 signaling pathway. *Pflugers Arch*. 2020;472(5):583-96.
304. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4574.

8. ПРИЛОЗИ

Sacubitril/valsartan promotes white adipose tissue browning in rats with metabolic syndrome through activation of mTORC1

Marina Nikolic^{1,2} | Nevena Jeremic^{2,3,4}  | Nevena Lazarevic^{2,3,5} | Aleksandra Stojanovic^{2,3} | Andjela Milojevic Samanovic^{2,6} | Jovana Novakovic^{2,3} | Vladimir Zivkovic^{1,2,7} | Milos Nikolic³ | Nikola Nedeljkovic³ | Slobodanka Mitrovic⁸ | Vladimir Jakovljevic^{1,2,5}

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Center of Excellence for Redox Balance Research in Cardiovascular and Metabolic Disorders, Kragujevac, Serbia

³Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

⁵Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Moscow, Russia

⁶Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁷Department of Pharmacology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

In addition to their usual use in the treatment of cardiovascular disease, weak evidence is available for the potential of combined use of neprilysin inhibitor (sacubitril) and AT1 receptor antagonist (valsartan) to promote browning of white adipose tissue (WAT) in rats with metabolic syndrome (MetS). This study involved 32 male *Wistar albino* rats divided into four groups: CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with sacubitril/valsartan; MS—rats with MetS; MS + ENT—rats with MetS treated with sacubitril/valsartan. After finishing the experimental protocol, different WAT depots were isolated for further analysis of molecular pathways. Molecular docking and molecular dynamics studies were used for in silico assessment of the binding affinity of sacubitril and valsartan towards subunits of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). Sacubitril/valsartan treatment markedly diminished morphological changes in adipose tissue, resulting in smaller lipid size and multilocal lipid droplet structure in WAT. We showed significantly higher protein expression of uncoupling protein-1 (UCP-1) and mTORC1 in WAT of MS + ENT rats, correlating with increased relative gene expression of browning-related markers in tissue of rats treated with sacubitril/valsartan compared with MS group of rats. In silico analysis showed that sacubitril

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; ATP, adenosine triphosphate; AT-1, angiotensin II receptor type 1; AT-2, angiotensin II receptor type 2; ANP, atrial natriuretic peptide; BP, blood pressure; BNP, brain natriuretic peptide; BAT, brown adipose tissue; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; DBP, diastolic blood pressures; ΔG_{elec} , electrostatic energy; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; eWAT, epididymal white adipose tissue; K_b , Equilibrium binding constant; ΔG_{total} , final total internal energy; ΔG_{avg} , free binding energy; ΔG_{bind} , free binding energy; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GLP, Good Laboratory Practice; HR, heart rate; HE, hematoxylin/eosin; HDL, high-density lipoprotein; HSL, hormone-sensitive lipase; $\Delta G_{intermolecular}$, intermolecular energy low-density lipoprotein LDL; mLST-8, mammalian lethal with Sec13 protein 8; mTOR, mechanistic target of rapamycin; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; MetS, metabolic syndrome; MM/GBSA, molecular mechanics/generalized born surface area; NPs, natriuretic peptides; NPRA, NP receptor A; NF- κ B, nuclear factor kappa b; OGTT, oral glucose tolerance test; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; PKG, protein kinase G; RAS, renin-angiotensin system; RMSD, Root Mean Square Deviation; RMSF, Root Mean Square Fluctuation; rWAT, retroperitoneal white adipose tissue; Sac/Val, sacubitril/valsartan; STZ, streptozotocin; sWAT, subcutaneous white adipose tissue; SBP, systolic blood pressures; ΔG_{tor} , torsional free energy; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; T2DM, type 2 diabetes mellitus; ΔG_{unb} , unbound energy of the system; UCP-1, uncoupling protein-1; WAT, white adipose tissue; PDE, phosphodiesterases; GC, guanylate cyclase; COX2, cyclooxygenase 2.

⁸Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence

Nevena Jeremic, Center of Excellence for Redox Balance Research in Cardiovascular and Metabolic Disorders, Kragujevac, Serbia and Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.
Email: njeremic@fmn.kg.ac.rs

Funding information

Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, Grant/Award Number: 04/22; Ministry of Science, Technological Development and Innovation, Republic of Serbia, Grant/Award Number: 451-03-47/2023-01/200111

and valsartan exhibited the highest binding affinity against mTOR and mLST8, forming stable complexes with these mTORC1 subunits. The observed results confirmed strong potential of combined sacubitril/valsartan treatment to increase browning markers expression in different WAT depots in MetS condition and to form permanent complexes with mTOR and mLST8 subunits over the time.

KEYWORDS

adipose tissue, browning, molecular docking, sacubitril, valsartan

1 | BACKGROUND

Adipose tissue as a highly adaptable and important metabolic tissue, takes part as an effector in the regulation of various physiological processes including metabolic homeostasis, reproductive function, and immunity. Moreover, its function can be modified by various output signals released from neural and/or endocrine integrating centers.¹ Although considered as “safe” depot for storage of excess fat, alterations in adipose tissue morphology such as an increase in the size/number of fat cells (adipocyte hypertrophy/hyperplasia) can trigger various systemic changes resulting in the development of metabolic diseases. Indeed, in states of over-nutrition, extensive fat accumulation leads to cellular hypertrophy of mature adipocytes. This sustained stress caused by overfeeding is, in most cases, the main reason for the development of various disease scenarios, including metabolic syndrome (MetS), cardiovascular diseases, or some types of cancer.^{2,3} Whether a healthy or unhealthy metabolism is favored, depends on a balance between daily energy intake and its consumption.⁴ Therefore, one of the main strategies to combat obesity is to understand the fat cell biology and the involvement of whole-body energy metabolism in the pathogenesis of different metabolic diseases states.

In general, the adipocytes can be divided into two phenotypically well-defined types: white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). Even though white adipocytes are primary sites for lipid storage in the form of triglycerides, WAT depots differ in their secretory and metabolic functions.⁵ In contrast, BAT utilizes the energy of the stored lipid droplets and releases it in the

form of heat in the process named as “nonshivering thermogenesis.” This phenomenon occurs primarily due to the action of uncoupling protein-1 (UCP-1), a transmembrane protein which facilitates heat production by uncoupling adenosine triphosphate (ATP) synthesis.^{5,6} Apart from the usual interscapular localization of BAT, brown-like cells named as beige adipocytes appear in some WAT depots in response to various stimuli (so called “browning”).⁷ Considering that beige adipocytes also enhance heat generation as BAT, recent evidence suggests that promoting beige cells in WAT depots is a promising therapeutic strategy to fight with obesity and its related metabolic diseases.^{8,9}

In addition to its main function of storing excess calories, WAT is also the largest endocrine organ that releases many signaling molecules called adipokines. The expression of adipokine receptors in adipocytes makes these cells sensitive to the autocrine or paracrine action of adipokines, regulating energy, glucose and lipid metabolism, appetite, inflammatory response, and various central or peripheral processes.^{10,11} Apart from classical action in hemodynamic regulation, recent studies have shown that natriuretic peptides (NPs) regulate energy balance and glucose homeostasis, induce thermogenesis, and regulate fat oxidation independently of the β -adrenergic axis. These effects are mediated through interorgan metabolic crosstalk with fat tissue, as a site of NPs receptor expression. The second link between adipose tissue and NPs is pointed up by the fact that these peptides induce triglycerides lipolysis and uncoupling of mitochondrial respiration, thus promoting adipose tissue browning.^{12–14} NPs are thought to induce browning through physiological binding of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain



natriuretic peptide (BNP) to NP receptor A (NPRA), which activates cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and consequently regulates protein kinase G (PKG) activation. Throughout this NPRA-cGMP-PKG signaling cascade, NPs increase UCP-1 abundance in adipose tissue and promote beige adipocytes appearance in white fat cells.¹⁵

Recent evidence has revealed the important roles of renin-angiotensin system (RAS) components presented in adipose tissue as adipokines, implying their special local involvement in the regulation of adipose function.⁷ White adipocytes are the sites of angiotensin II production as well as both angiotensin II receptor type 1 (AT-1) and angiotensin II receptor type 2 (AT-2) receptors expression, but AT-1 receptors appeared to be the major subtype expressed in WAT. Increased expression of the AT-1 receptors causes the production of various proinflammatory cytokines in adipose tissue, generation of oxidative stress, reduction in glucose uptake, and strongly correlates with increased body weight and associated metabolic diseases.¹⁶ Hence, it has been observed that a reduction in AT-1 receptors expression in adipose tissue inhibits nuclear factor kappa b (NF- κ B) and related proinflammatory cytokines levels, but also restores peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activity by upregulating the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α), as well as other genes profile of brown adipose tissue.^{17,18} Based on this signaling cascade, the beneficial effects of AT-1 blockade are reflected in a reduction of lipid accumulation and reactive oxygen species formation, weight loss, and thermogenic gene expression, which consequently leads to changes in WAT morphology resembling beige adipose cells.^{16,19}

Considering the beneficial effect of NPs increased levels and blockade of AT-1 receptors on adipose tissue morphology and function, this study aimed to investigate the effect of dual therapy with sacubitril (Sac), as an inhibitor of neprilysin, and valsartan (Val), the antagonist of AT-1 receptors, on WAT browning with special attention to adipocyte function, remodeling, histopathological approaches and thermogenic gene expression in three different types of WAT in rats with MetS. The second part of the present research relies on molecular modeling studies, conducted with the aim of identifying potential signaling pathways involved in the pharmacological promotion of browning. In that sense, molecular docking and molecular dynamics studies were used for *in silico* assessment of the binding affinity of the Sac active metabolite (sacubitrilat or LBQ657), and Val towards mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) subunits.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethical approval

Experimental animals were stored in controlled environment conditions (room temperature $23 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity $55\% \pm 10\%$, 12-h light/dark cycle) having free access to food and tap of water. This investigation was approved by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (No. 01-4636). All experimental procedures and analysis were conducted in accordance with the European Directive for the Welfare of Laboratory Animals (No. 2010/63/EU) and principles of Good Laboratory Practice (GLP). The experiments were carried out according to the EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EES.

2.2 | Chemicals

Sacubitril/valsartan (Entresto[®]) is the official product of the pharmaceutical company Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland).

Streptozotocin (STZ) was acquired from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Germany.

2.3 | Metabolic syndrome induction

After 1 week of adaptation period, 32 male *Wistar* albino rats (8 weeks old; body weight: 200 ± 20 g) were enrolled in this study and initially divided into two equal groups depending on provided diet. Healthy rats fed with standard diet (9% fat, 20% protein, 53% starch, and 5% fiber) and animals fed with high-fat diet (51% starch, 15% protein, 25% fat, and 5% fiber) during 4 weeks. After 1 month of high-fat diet and 12 h starvation, metabolic syndrome (MetS) was induced with single intraperitoneal injection of STZ (dose 25 mg/kg, prepared *ex tempore* and dissolved in 1 mL of 0.05 M citrate buffer, pH = 4.5). Seventy-two hours after STZ injection followed with 12 h starvation, fasting glucose, and insulin levels, as well as blood pressure (BP) were measured in order to confirm MetS. Animals with fasting glucose level >7.0 mmol/L, fasting insulin level >150 $\mu\text{LU/mL}$, and BP over 130/80 were considered as rats with MetS.²⁰ Rats with MetS continued with high-fat consumption during experimental protocol in order to provide stable elevated glucose levels.

2.4 | Experimental protocol

Depending on applied treatment and diet, rats were further divided into four subgroups (eight animals per group) as follows:

1. CTRL—healthy control rats;
2. ENT—healthy rats treated with Sac/Val;
3. MS—rats with MetS;
4. MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val.

Sac/Val tablets were dissolved in distilled water at 34 mg/mL, and given by oral gastric gavage every day during 4 weeks in a dose of 68 mg/kg/day.

Untreated healthy and rats with MS received the same volume of distilled water. The dose regime of Sac/Val was chosen based on upon previously conducted study which examined beneficial effect of these drugs combination on vascular and neural dysfunction in rats with type 2 diabetes mellitus.²¹

2.5 | BP assessment

Using tail-cuff noninvasive method BP system (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems [MRBP-R], IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA), the values of systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP) as well as heart rate (HR) values were measured.²¹

2.6 | Biochemical parameters

At the end of experimental protocol, serum samples were collected for spectrophotometric determination of lipid parameters (total cholesterol [TC]; triglycerides [TG]; high- and low-density lipoprotein [HDL and LDL]) using programmed biochemical analyzer (Dimension Xpand, Siemens, IL, USA).²¹

2.7 | Oral glucose tolerance test

A day before the animal's sacrifice and overnight starvation (12 h), oral glucose tolerance test (OGTT) was carried out. The blood samples were obtained by punctuation of tail vein in order to determine fasting blood glucose level (0 min). Additionally, after oral administration of glucose in a dose of 2 g/kg of body weight, blood glucose levels were measured in 30, 60, and 120 min of glucose loading. Determination of glucose levels was performed using glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) with related

strips. In the 120th minute of OGTT, blood samples were collected for determination of insulin levels by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (FineTest; Cat. No: ER1113).²²

2.8 | cGMP determination from serum samples

In order to precisely determine the exact mechanism in the signaling cascade through which combined Sac/Val treatment induces the thermogenic markers expression, animals's serum samples were used to determine the concentration of cGMP (ng/mL) by sandwich ELISA method, according to commercial kits following the manufacturer's instructions (FineTest, Wuhan, China, Cat. No: ER0301).

2.9 | Histopatological examination of adipose tissue

After 4-week of the experimental protocol, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100 mg/10 mg of body weight) and following WAT was collected for further analysis: epididymal WAT (eWAT), retroperitoneal WAT (rWAT) and subcutaneous WAT (sWAT). The isolated tissues were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution on room temperature. Then, fixed samples were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5 µm sections for hematoxylin/eosin (HE) staining.

2.10 | Immunohistochemical staining

For immunohistochemical staining, fixed sections of tissues were dewaxed, rehydrated, and then incubated overnight with anti-UCP1 antibody (ab234430), anti-mTORC1 antibody (ab05417), and anti-COX2 antibody (ab179800) at room temperature according to the manufacturer's instructions. The stained images were visualized and analyzed using digital camera fastened on light microscope (Olympus Corporation, BX51, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). The labeling index of UCP1 was performed on 10 fields/section (×40) using Image J analysis software and results are presented as the percentage of positively stained area cells. The same index was used to evaluated immunopositivity of COX2 in WAT sections. On the other hand, a semiquantitative immunohistochemical score was used for the assessment of the intensity of mTORC1 staining and results were expressed as negative, weak, moderate, and strong expression intensity.



TABLE 1 Primers used for RT-PCR analysis.

Target gene	Forward	Reverse
UCP-1	GTACCCAGCTGTGCAATGAC	ATGACGTTCCAGGATCCGA
PGC-1 α	GCAGCGGTCTTAGCACTC	GAGGAGTTAGGCCTGCAGTT
PPAR γ	TTCAGAAAGTGCCTTGCTGTG	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG
mTORC1	TGCTGGTGTCTTTGTGAAG	TTGTGCTCTGGATTGAGGTG

Abbreviations: mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; RT-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; UCP-1, uncoupling protein-1.

2.11 | Total RNA isolation and relative RNA quantification by real-time polymerase chain reaction

After homogenization of frozen adipose tissues, total RNA (μ g) was isolated from the sections using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as specified by manufacturer's instruction. Complementary DNA was prepared by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Using Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. The mRNA-specific primers were used as follows: UCP-1, PPAR γ , PGC-1 α , and mTORC1, and β -actin as housekeeping gene (Table 1). Quantitative PCR-reactions were measured in duplicate and their mean value was used as the final one for further calculation of relative gene expression according to Livak and Schmittgen.²³

2.12 | In silico analyses

2.12.1 | Molecular docking study

To evaluate the binding affinity of sacubitrilat and valsartan for mTORC1, these two molecules were docked separately to each subunit in AutoDock 4.2 software.²⁴ Energy optimization of sacubitrilat and valsartan conformers was performed in Chem3D Ultra 7.0 software²⁵ using the AM1 semi-empirical method. The crystal structure of mTORC1 (PDB ID: 6BCX)²⁶ was obtained from the RCSB Protein Data Bank.²⁷ Protein octamer was prepared for molecular docking in BIOVIA Discovery Studio,²⁸ by removing cocrystallized ligands and cofactors from the original crystal structure. Furthermore, polar hydrogen atoms and Kollman partial charges were added in the graphical user interface AutoDockTools.²⁴ Rigid protein and flexible ligand docking protocol was executed using Lamarckian GA with default settings. Blind molecular docking studies were performed separately on each

subunit of mTORC1, using maximum defined grid box with dimensions $126 \times 126 \times 126$ points and grid spacing of $0.375 \text{ \AA}$. The grid box center for x, y, and z coordinates was defined as follows: 269.346, 215.47, and 240.765 for mTOR, 255.76, 161.095, and 281.284 for mLS8, and 160.253, 228.972, and 237.659 for RAPTOR. The three-dimensional interactions and the docked conformers of the investigated compounds with the lowest energy were visualized using Pymol 2.5.5.²⁹

The AutoDock software calculates free binding energy according to the following equation:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{intermol. Energy}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{total}} + \Delta G_{\text{tor}} - \Delta G_{\text{unb}}$$

where ΔG_{bind} represents the free binding energy, $\Delta G_{\text{intermol. Energy}}$ is the sum of the energies of dispersion and repulsion, hydrogen bond, and desolvation. ΔG_{elec} stands for the electrostatic energy, ΔG_{total} denotes the final total internal energy, ΔG_{tor} is torsional free energy, whereas ΔG_{unb} represents the unbound energy of the system.

Equilibrium binding constant (K_b) is calculated from free binding energy value according to the following equation:

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

where T is a temperature of 298 K, R is a gas constant with the value of $1.9872036 \times 10^{-3} \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, while K_b represents the equilibrium binding constant.

2.12.2 | Molecular dynamics simulations study

According to the high binding affinity of sacubitrilat and Val against mechanistic target of rapamycin (mTOR) and mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLS8) we investigated the conformational stability of these ligand-protein complexes. For that purpose, we extracted the binding sites of sacubitrilat and Val observed in the molecular docking study and performed molecular

dynamics simulations for sacubitrilat-mTOR and valsartan-mLST8 complexes using Schrödinger Desmond 2020-4 software.³⁰ Tested complexes were optimized with the OPLS3e force field.³¹ The neutralization was carried out using 0.15 M NaCl, whereas, TIP3P water model³² was utilized for the solvation of investigated systems. Molecular dynamics simulation of the duration of 25 ns was executed at constant pressure (1.01325 bar) with recording intervals of 4.8 ps for the trajectory and 1.2 ps for the energy. System equilibration under the NPT ensemble was conducted at 300 K with OPLS3e force field. The Prime molecular mechanics/generalized born surface area (MM/GBSA) method³³ was carried out to calculate the average free binding energy (ΔG_{avg}) for 3000–5000 frames from each system trajectory. Prime module of the Schrödinger software tool calculates ΔG_{avg} value in accordance with the following equation:

$$\text{MM/GBSA } \Delta G_{\text{avg}} = G_{\text{complex}} - G_{\text{protein}} - G_{\text{ligand}}$$

2.13 | Statistical analysis

All data are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) using GraphPad Prism 8 (Version for Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Parameters were initially analyzed by Shapiro–Wilk test of normality to check the distribution of the data. Independent t-test was used for samples with normal distribution, while Mann–Whitney *U*-test was performed as nonparametric test. One-way Analysis of variance (ANOVA) as well as Kruskal–Wallis test were used to estimate the differences in analyzed variables between the groups. A *p*-value < 0.05 was observed statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Effect of Sac/Val on baseline metabolic parameters (BP, lipid panel, OGTT, and insulin level)

Induction of MetS led to a significant increase in both SBP and DBP as well as in HR values compared with healthy untreated rats ($p < 0.05$; Figure 1A1–A3). However, 4-week treatment with Sac/Val significantly decreased all investigated parameters compared with rats with MetS ($p < 0.05$; Figure 1A1–A3). On the other hand, there were no statistical difference in the SBP, DBP, and HR values between CTRL and ENT groups ($p > 0.05$; Figure 1A1–A3).

After finishing experimental protocol, serum samples were used to determine the basic lipid parameters. The

obtained results showed significantly higher TG, TC, and LDL levels associated with decreased HDL values in rats with MetS compared with CTRL ($p < 0.05$; Figure 1B1–B4). However, treatment with Sac/Val succeeded both to improve HDL and reduce the TG, TC, and LDL levels in serum of MetS rats ($p < 0.05$; Figure 1B1–B4). Although healthy rats had significantly lower lipid levels compared with MetS groups, 4-week Sac/Val treatment of healthy rats (ENT) resulted in a statistically significant drop only in TC and LDL levels compared with healthy untreated group of rats (CTRL; $p < 0.05$; Figure 1B1,B3).

After overnight starvation period, but before sacrificing the animals, an OGTT was performed. Fasting glucose level (0 h) was significantly increased in groups of rats with MetS compared with healthy groups of animals, and the same trend was maintained during the time ($p < 0.05$; Figure 1C). However, fasting glucose level as well as levels at the 30, 60, and 120 min after oral glucose loading were remarkably decreased in MS + ENT group compared with rats with MetS ($p < 0.05$; Figure 1C). On the other hand, there were no statistical differences in glucose levels between the CTRL and ENT groups except after 30 min of glucose loading where administration of Sac/Val resulted in decreased glucose level compared with untreated control group ($p < 0.05$; Figure 1C).

Our results showed that serum insulin concentration was significantly increased in MetS rats compared with other groups ($p < 0.05$; Figure 1D). However, Sac/Val treatment of rats with MetS markedly lowered this parameter in comparison to MS group ($p < 0.05$; Figure 1D). Although, there were no differences in insulin concentration between the CTRL and ENT groups ($p > 0.05$; Figure 1D).

The results of our study strongly confirmed that 4-week Sac/Val treatment significantly increased cGMP concentration in both healthy and rats with MetS compared with relevant control untreated groups ($p < 0.05$; Figure 1E). Moreover, the level of cGMP in the serum samples from MS rats was notably lower relative to healthy control group of animals ($p < 0.05$; Figure 1E).

3.2 | Effect of Sac/Val treatment on morphological changes (HE staining) and browning markers expressions in sWAT

The results of histological analyses with H&E staining revealed that MetS induction resulted in enlarged lipid droplets in sWAT which is associated with the accumulation of lipid cells in this WAT depot. However, treatment with Sac/Val decreased lipid droplet size not only in MS + ENT group but also in healthy rats inducing multilocular cell structure (Figure 2A). Moreover,

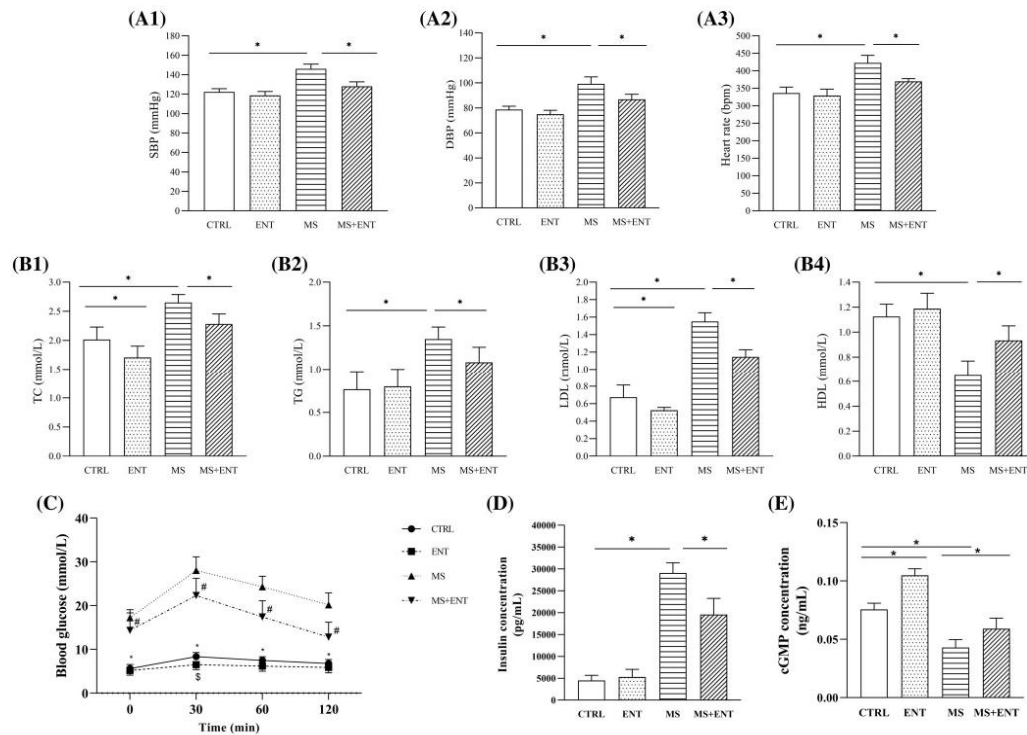


FIGURE 1 Effects of sacubitril (Sac)/valsartan (Val) treatment on (A1) systolic blood pressure (SBP); (A2) diastolic blood pressure (DBP); (A3) heart rate (HR); (B1) total cholesterol (TC); (B2) triglycerides (TG); (B3) low-density lipoprotein (LDL) and (B4) high-density lipoprotein (HDL); (C) oral glucose tolerance test; (D) serum insulin level; and (E) serum cGMP level. CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with Sac/Val; MS—rats with MetS; MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val. Values are presented as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between groups (Figure 1A,B,D,E). * $p < 0.05$ CTRL versus MS; # $p < 0.05$ MS versus MS + ENT; \$ $p < 0.05$ CTRL versus ENT (Figure 1C).

immunohistochemical analysis showed that UCP1 expression in sWAT is remarkably reduced in MS group compared with healthy control rats, while the chronic treatment with Sac/Val significantly increased the expression of this marker in tissue of rats from MS + ENT group and ENT, as well (Figure 2B,E). The examination of mTORC1 staining sections revealed its different expression in sWAT of rats treated with Sac/Val compared with untreated animals. Namely, negative staining was observed in MS tissue compared with moderate staining found in MS + ENT tissue. Moreover, weak mTORC1 expression was detected in CTRL group of rats, while Sac/Val treatment induced strong intensity of mTORC1 staining (Figure 2C). Additionally, our results showed a significantly higher COX2 expression in the sWAT of both healthy and MetS rats treated with Sac/Val compared with the analogous untreated groups (Figure 2D,F).

3.3 | Effect of Sac/Val treatment on morphological changes (HE staining) and browning markers expressions in rWAT

Four-week treatment with Sac/Val led to significant morphological changes in lipid droplet size of rWAT in both healthy and rats with MetS (Figure 3A). When it comes to immunohistochemical analysis, our results showed significantly higher UCP1 expression in MS + ENT group compared with MS rats. Also, applied treatment led to markedly increased UCP1 expression in rWAT of ENT rats compared with healthy untreated control group (Figure 3B,E). Moreover, strong intensity of mTORC1 expression was detected in rWAT of rats from ENT group compared with tissue of untreated rat, expressing weak intensity of mTORC1. In addition, analyzing the impact of applied treatment on intensity of mTORC1 expression in MetS condition, we observed that Sac/Val treatment

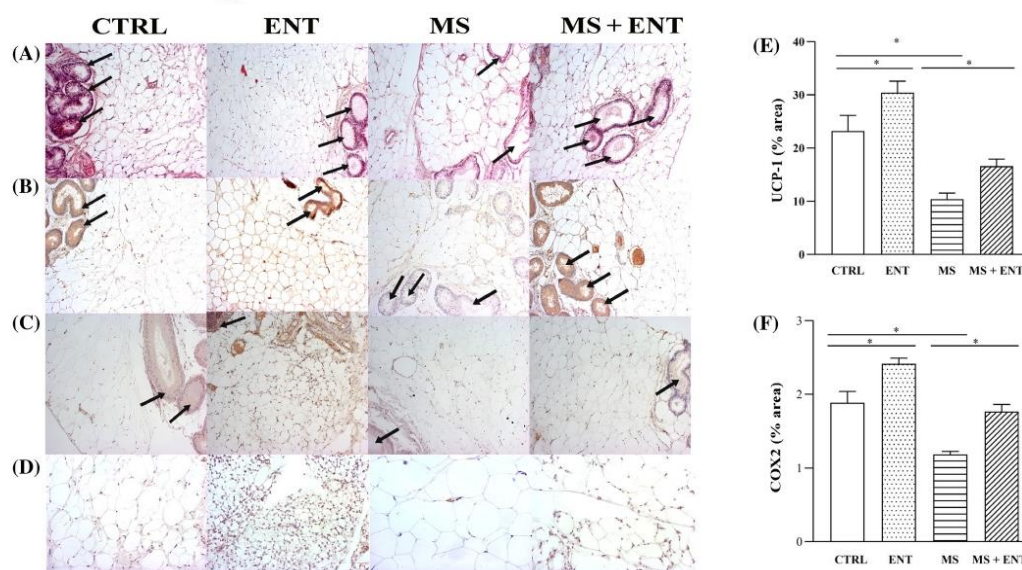


FIGURE 2 Representative subcutaneous adipose tissue sections of (A) hematoxylin/eosin-staining; (B) immunostaining of adipocytes with uncoupling protein-1 (UCP-1); (C) immunostaining of adipocytes with mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1); (D) immunostaining of adipocytes with COX2; (E) labeling index of UCP-1 presented as the percentage of positively stained area cells; (F) labeling index of COX2 presented as the percentage of positively stained area cells. CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with Sac/Val; MS—rats with metabolic syndrome (MetS); MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val. Original magnification 100 $\times$. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between groups.

induced significantly higher mTORC1 expression compared with negatively stained rWAT in MS group (Figure 3C). The expression of COX2 was markedly increased in rWAT of ENT rats compared with the healthy control group, but also increased in MetS rats treated with Sac/Val relative to the COX2 expression found in rWAT of MS rats (Figure 3D,F).

3.4 | Effect of Sac/Val treatment on morphological changes (HE staining) and browning markers expressions in eWAT

The histological analysis of eWAT showed prominent changes in lipid structure after Sac/Val treatment. Indeed, MS induced increase in lipid droplet size of eWAT compared with CTRL rats, but applied treatment significantly decreased accumulation of lipid droplets in eWAT in both ENT and MS + ENT groups (Figure 4A). Moreover, results of immunohistochemical analysis demonstrated markedly increased UCP1 expression in epididymal tissue of MS + ENT rats compared with MS group, along with overexpression in ENT group compared with

CTRL (Figure 4B,E). Additionally, the intensity of mTORC1 staining was significantly improved after Sac/Val treatment. Moderate mTORC1 intensity observed in eWAT of healthy rats was improved in tissue of rat from ENT group where strong mTORC1 intensity expression was detected. Moreover, negative mTORC1 staining was observed in eWAT of MS rats, Sac/Val treatment led to weak but stronger intensity of this marker in eWAT of MS + ENT rats compared with MS group. (Figure 4C). Significantly lower expression of COX2 was detected in eWAT of MS rats compared with healthy control group of animals. However, applied Sac/Val treatment markedly improved COX2 expression in rWAT of animals from ENT group compared with CTRL rats, along with higher expression in MS + ENT group compared with MS rats (Figure 4D,F).

3.5 | Effect of Sac/Val on browning specific genes expression in adipose tissues

Relative gene expression of PPAR γ was significantly decreased in all examined adipose tissues in MS rats

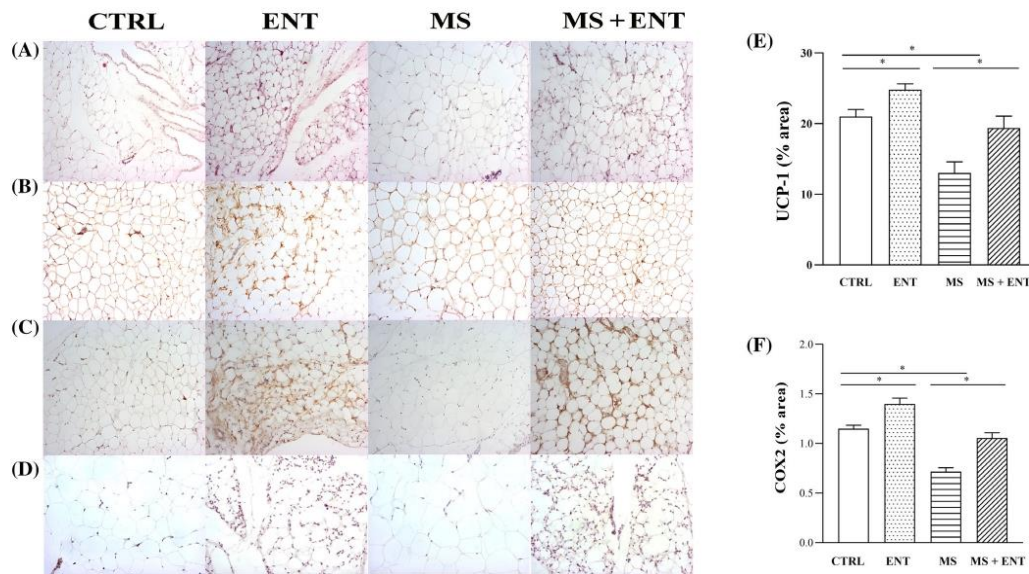


FIGURE 3 Representative retroperitoneal adipose tissue sections of (A) hematoxylin/eosin-staining; (B) immunostaining of adipocytes with uncoupling protein-1 (UCP-1); (C) immunostaining of adipocytes with mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1); (D) immunostaining of adipocytes with COX2; (E) labeling index of UCP-1 presented as the percentage of positively stained area cells; (F) labeling index of COX2 presented as the percentage of positively stained area cells. CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with Sac/Val; MS—rats with metabolic syndrome (MetS); MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val. Original magnification 100 $\times$. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between groups.

compared with CTRL group ($p < 0.05$; Figure 5A–C). However, it was observed that relative expression of this gene was significantly increased in tissue of rats treated with Sac/Val compared with untreated MetS rats ($p < 0.05$; Figure 5A–C). Moreover, Sac/Val treatment of healthy rats resulted in higher PPAR γ expression only in sWAT compared with CTRL group ($p < 0.05$; Figure 5A), with no statistical differences in epididymal and retroperitoneal adipose tissues ($p > 0.05$; Figure 5B,C).

MetS induction caused prominent reduction in PGC-1 α gene expression in sWAT as well as in eWAT and rWAT compared with healthy groups ($p < 0.05$; Figure 5D–F). However, chronic administration of Sac/Val to the animals with MetS significantly improved relative gene expression of PGC-1 α compared with MS group of rats in all investigated adipose tissues ($p < 0.05$; Figure 5D–F). Moreover, our results showed significant improvement in relative gene expression of PGC-1 α in sWAT and eWAT of healthy rats treated with Sac/Val compared with CTRL group ($p < 0.05$; Figure 5D,E).

The findings of our research demonstrated that activation of mTORC1 was more intensively in WAT depots of MS + ENT rats compared with untreated animals with

MetS ($p < 0.05$; Figure 5G–I). However, there was no statistical difference in mTORC1 gene expression in eWAT and rWAT between CTRL and ENT groups ($p > 0.05$; Figure 5H,I).

The relative UCP-1 expression was significantly decreased in WAT of rats with MetS compared with healthy group of rats ($p < 0.05$; Figure 5J–L). However, this gene relative expression in sWAT as well as in eWAT and rWAT was markedly increased in MS + ENT group compared with untreated MS rats ($p < 0.05$; Figure 5J–L). Moreover, the potential of Sac/Val treatment to induce slight increase in UCP-1 expression in sWAT was also observed in healthy rats compared with CTRL group ($p < 0.05$; Figure 5J).

3.6 | In silico results

3.6.1 | Molecular docking analysis

To identify potential signaling pathways involved in the pharmacological promotion of browning, this in silico study initially examined the molecular docking of

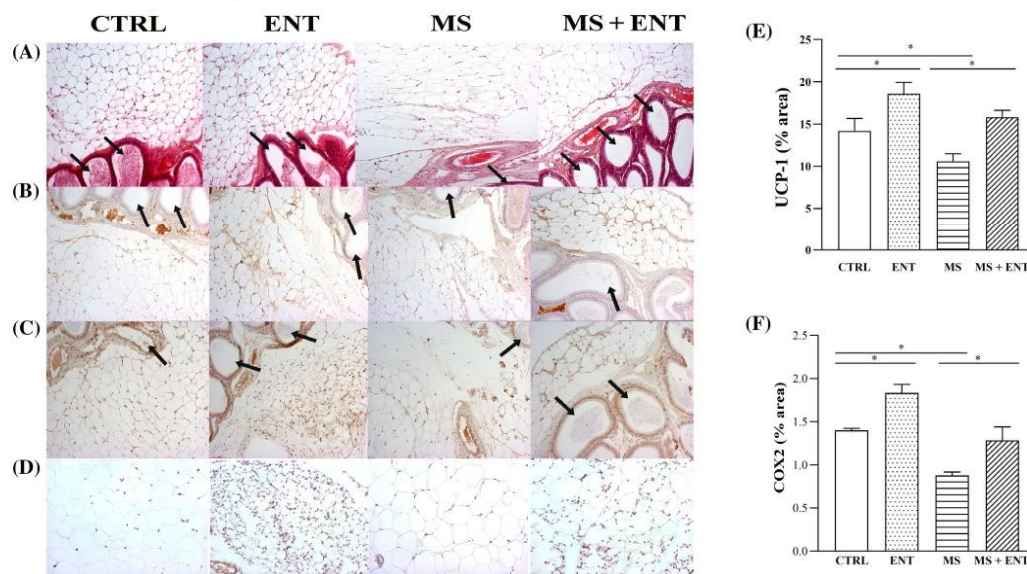


FIGURE 4 Representative epididymal adipose tissue sections of (A) hematoxylin/eosin-staining; (B) immunostaining of adipocytes with uncoupling protein-1 (UCP-1); (C) immunostaining of adipocytes with mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1); (D) immunostaining of adipocytes with COX2; (E) labeling index of UCP-1 presented as the percentage of positively stained area cells; (F) labeling index of COX2 presented as the percentage of positively stained area cells. CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with Sac/Val; MS—rats with metabolic syndrome (MetS); MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val. Original magnification 100 $\times$. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between groups.

sacubitrilat and Val into the subunits of mTORC1. In a line with that, we assessed the binding affinity of these molecules for mTORC1 using following variables: free binding energy and other associated thermodynamic parameters, as well as the number and type of noncovalent binding interactions.

Molecular docking parameters for the best-docked conformations of tested compounds are listed in Table 2. A lower value of the free binding energy (ΔG_{bind}) and a higher value of the equilibrium binding constant (K_b) indicate a stronger interaction of the tested compounds with mTORC1.

In the molecular docking of sacubitrilat within mTORC1, the highest binding affinity was observed for the mTOR subunit with a free binding energy value of -37.15 kJ/mol and an equilibrium binding constant (3.23×10^6 M $^{-1}$; Figure 6A). The interaction of sacubitrilat and the mTOR subunit is characterized by the formation of six hydrogen bonds with residues GLN1624, ARG1628 (double interaction), LYS1662, and LYS1655 (double interaction). In addition, the biphenyl residue of sacubitrilat forms an electrostatic π -cation interaction with LYS898 and a hydrophobic π -alkyl

interaction with VAL901 (Figure 6B). Sacubitrilat exhibited slightly lower binding affinity for RAPTOR subunit compared with mTOR, with a docking score (-35.90 kJ/mol). A higher docking score value can be explained by the formation of multiple hydrophobic alkyl, π -alkyl, and amide- π interactions and only three hydrogen bonds with residues LYS32 (double interaction) and ARG34 (Figure 6C). Sacubitrilat interacts with the mLST8 subunit with the highest docking score value of -21.92 kJ/mol, although it forms six hydrogen bonds with residues ARG221 (double interaction), SER269, TRP272, TRP274, and SER290. The lack of electrostatic interactions affects the low affinity of these compounds for mLST8 (Figure 6D).

On the other hand, Val exhibited the highest binding affinity against mLST8, as evident from the values of free binding energy (-32.26 kJ/mol) and equilibrium binding constant (4.49×10^5 M $^{-1}$; Figure 7A). The low value of the docking score may be attributed to the formation of the hydrogen bonds grid with residues PHE93, LEU136, SER175, ALA176, and ARG227, as well as the formation of multiple hydrophobic and attractive charge interactions (Figure 7B). During molecular fitting of Val

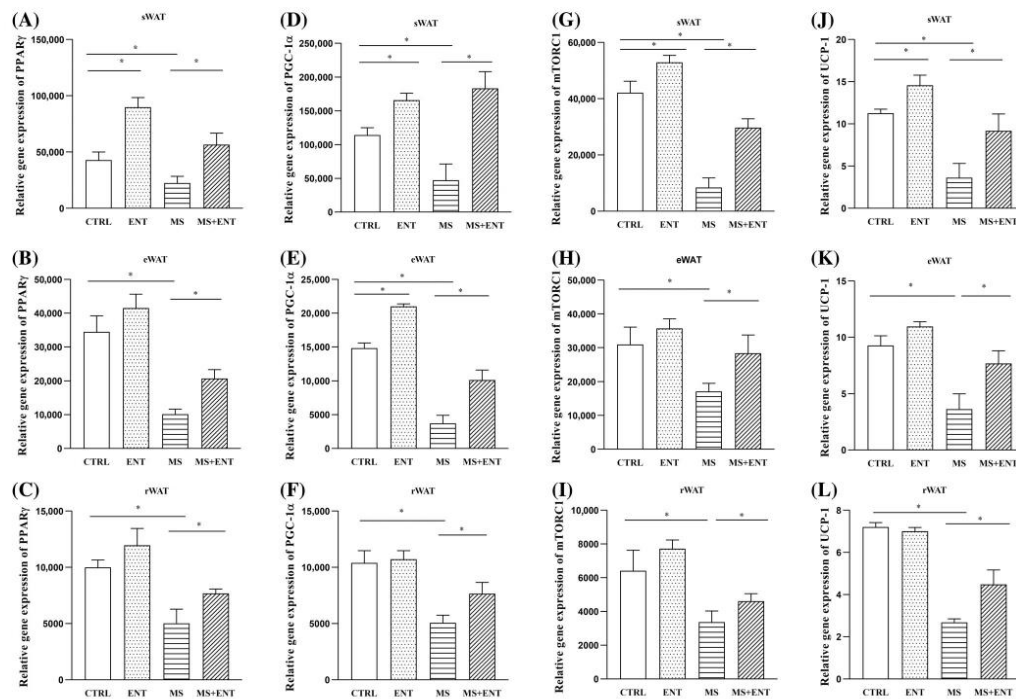


FIGURE 5 Effects of sacubitril (Sac)/valsartan (Val) treatment on relative gene expression of (A) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in subcutaneous white adipose tissue (sWAT); (B) PPAR γ in epididymal white adipose tissue (eWAT); (C) PPAR γ in retroperitoneal white adipose tissue (rWAT); (D) PPAR γ coactivator 1- α (PGC-1 α) in sWAT; (E) PGC-1 α in eWAT; (F) PGC-1 α in rWAT; (G) mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) in sWAT; (H) mTORC1 in eWAT; (I) mTORC1 in rWAT; (J) uncoupling protein-1 (UCP-1) in sWAT; (K) UCP-1 in eWAT; (L) UCP-1 in rWAT. CTRL—healthy control rats; ENT—healthy rats treated with Sac/Val; MS—rats with metabolic syndrome (MetS); MS + ENT—rats with MetS treated with Sac/Val. Values are presented as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between groups.

TABLE 2 Molecular docking parameters for the best-docked conformations of sacubitrilat and valsartan (Val) with mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) subunits.

Ligand–protein complex	ΔG_{bind} (kJ/mol)	K_b (M^{-1})	$\Delta G_{\text{Intermol.}}$ Energy (kJ/mol)	ΔG_{elec} (kJ/mol)	ΔG_{Final} Intermol. Energy (kJ/mol)	ΔG_{total} (kJ/mol)	ΔG_{tor} (kJ/mol)	ΔG_{unb} (kJ/mol)
Sacubitrilat-mTOR	-37.15	3.23×10^6	-22.76	-25.90	-48.66	-3.72	11.46	-3.72
Sacubitrilat-mLST8	-21.92	6.94×10^3	-29.33	-4.10	-33.43	-2.09	11.46	-2.09
Sacubitrilat-RAPTOR	-35.90	1.95×10^6	-39.96	-7.41	-47.36	-3.39	11.46	-3.39
Valsartan-mTOR	-31.30	3.04×10^5	-32.30	-10.46	-42.80	-10.17	11.46	-10.17
Valsartan-mLST8	-32.26	4.49×10^5	-43.85	0.12	-43.72	-7.74	11.46	-7.74
Valsartan-RAPTOR	-27.74	7.25×10^4	-35.02	-4.23	-39.20	-8.87	11.46	-8.87

into the mTOR subunit, comparable but slightly higher free binding energy (-31.30 kJ/mol) was observed compared with docking score for mLST8. The carboxyl group and 2H-tetrazole core of Val are involved in the

formation of three attractive charge interactions with residues ASP895, ARG1628, and LYS1655, as well as in the formation of three hydrogen bonds with residues GLN1624, GLN1627, and ARG1628. The benzene ring

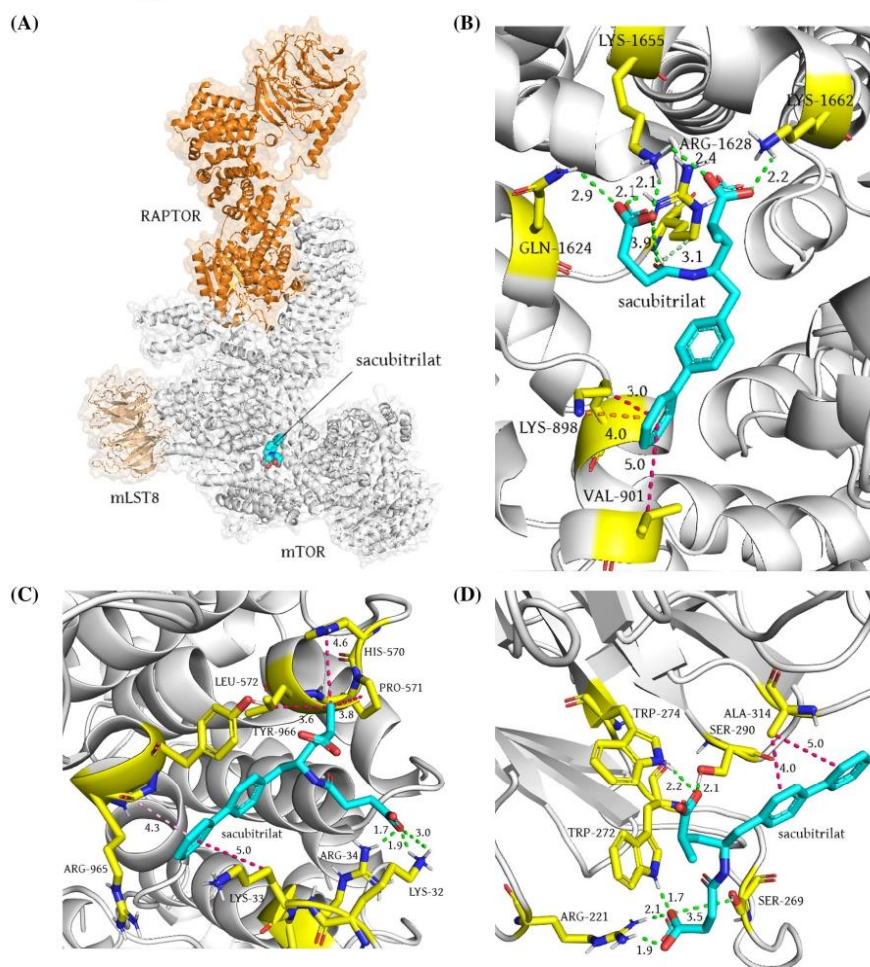


FIGURE 6 Molecular interaction of sacubitrilat and mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) subunits. (A) Schematic representation of sacubitrilat bound to the mTOR subunit. mTOR is shown in white color, RAPTOR in orange color, mLST8 in wheat color, whereas sacubitrilat is shown as cyan and red spheres; (B) Molecular docking of sacubitrilat into the mTOR subunit. Bond lengths of conventional hydrogen bonds (green-dashed lines), C—H hydrogen bonds (pale green-dashed lines), hydrophobic interactions (hot pink-dashed lines), and electrostatic interactions (orange-dashed lines) are shown within three-dimensional depiction of binding contacts; Molecular docking of sacubitrilat into the (C) RAPTOR and (D) mLST8 subunit. Within three-dimensional depiction of sacubitrilat binding contacts, the bond lengths of conventional hydrogen bonds (green-dashed lines) and hydrophobic interactions (hot pink-dashed lines) including amide- π interaction (light pink-dashed line) are shown.

attached to 2*H*-tetrazole forms a π - π interaction with TYR897 and π -alkyl interactions with residues PRO2213 and LEU2216. However, a sterically unfavorable interaction is formed between 2*H*-tetrazole ring and residue ARG2217, which negatively affects the binding affinity of

this compound (Figure 7C). Val docked into the RAPTOR subunit achieved the highest docking score (-27.74 kJ/mol) with respect to the other subunits, primarily due to the formation of a relatively small number of noncovalent interactions (eight). Namely, a single hydrogen bond

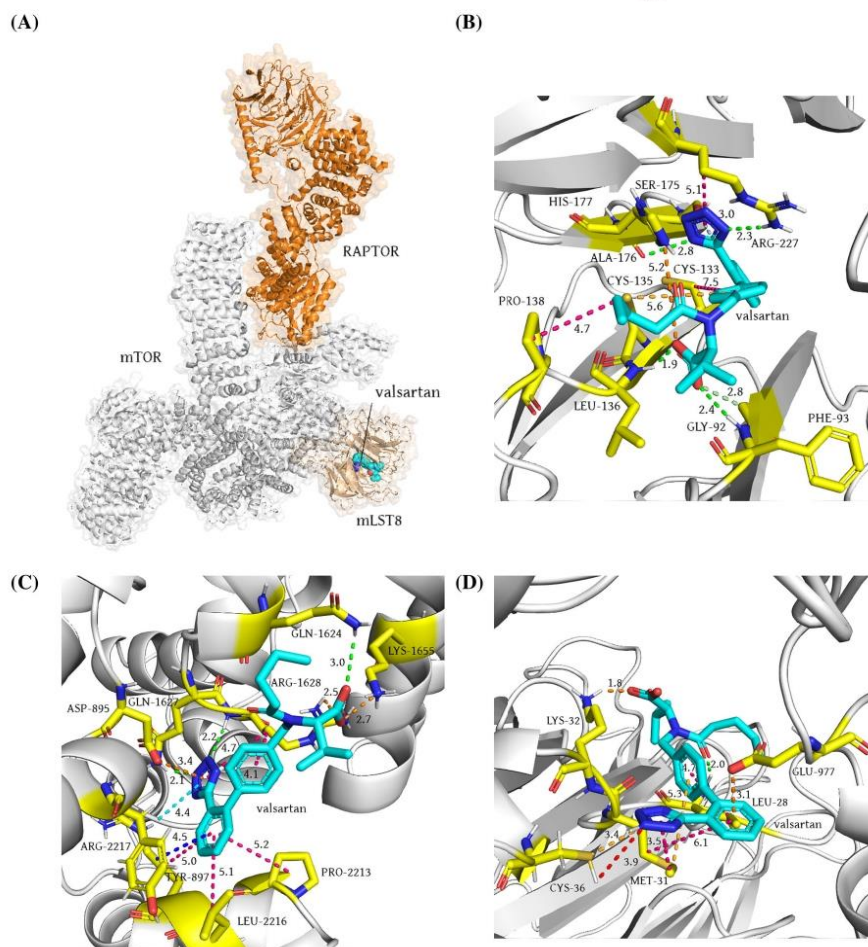


FIGURE 7 Molecular interaction of valsartan (Val) and mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) subunits. (A) Schematic representation of Val bound to the mLST8 subunit. mTOR is shown in white color, RAPTOR in orange color, mLST8 is shown in wheat color, whereas Val is shown as cyan and red spheres; (B) Molecular docking of Val into the mLST8 subunit. Bond lengths of conventional hydrogen bonds (green-dashed lines), C—H hydrogen bonds (pale green-dashed lines), hydrophobic interactions (hot pink-dashed lines), π -sulfur interaction (bright orange-dashed line), and electrostatic interactions (orange-dashed lines) are shown within three-dimensional depiction of binding contacts; Molecular docking of Val into the (C) mTOR and (D) RAPTOR subunit. Within three-dimensional depiction of Val binding contacts, the bond lengths of conventional hydrogen bonds (green-dashed lines), π -sulfur interaction (bright orange-dashed line), electrostatic interactions (orange-dashed lines), and hydrophobic interactions (hot pink-dashed lines) including π - π interaction (blue-dashed line) are shown. Unfavorable steric bumps are also presented as cyan and red-dashed lines.

is formed with LEU28 and two electrostatic interactions with LYS32 and GLU977. The remaining interactions are of the hydrophobic type, in which the 2*H*-tetrazole moiety is involved. Similarly, as in the case of mTOR subunit, the tetrazole ring forms a steric bump with residue CYS36 (Figure 7D).

3.6.2 | Molecular dynamics analysis and MM/GBSA calculation

In the present molecular dynamics study, the conformational stability of sacubitrilat-mTOR and Val-mLST8 complexes was investigated over time. The binding

modes of sacubitrilat and Val used in the molecular dynamics study were chosen based on the binding affinity previously defined in the molecular docking study.

The Root Mean Square Deviation (RMSD) plot of the mTOR subunit shows conformational stability throughout the simulation, with minimal deviations on the order of 2–4 Å (Figure 8A). On the other hand, the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot shows small local changes along the protein chain, except for residue LYS1452 (5.77 Å;

Figure 8B). Sacubitrilat in complex with mTOR showed significant deviations in RMSD values in the first 10 ns of the simulation, and then complex was stabilized and remained conformationally unchanged until the end of the simulation (Figure 8C). As a result of sacubitrilat binding to mTOR, additional fluctuation occurred for LYS1471 (3.88 Å), as shown in the protein RMSF diagram (Figure 8D). The analysis of ligand-protein contacts was performed to identify the binding interactions present for

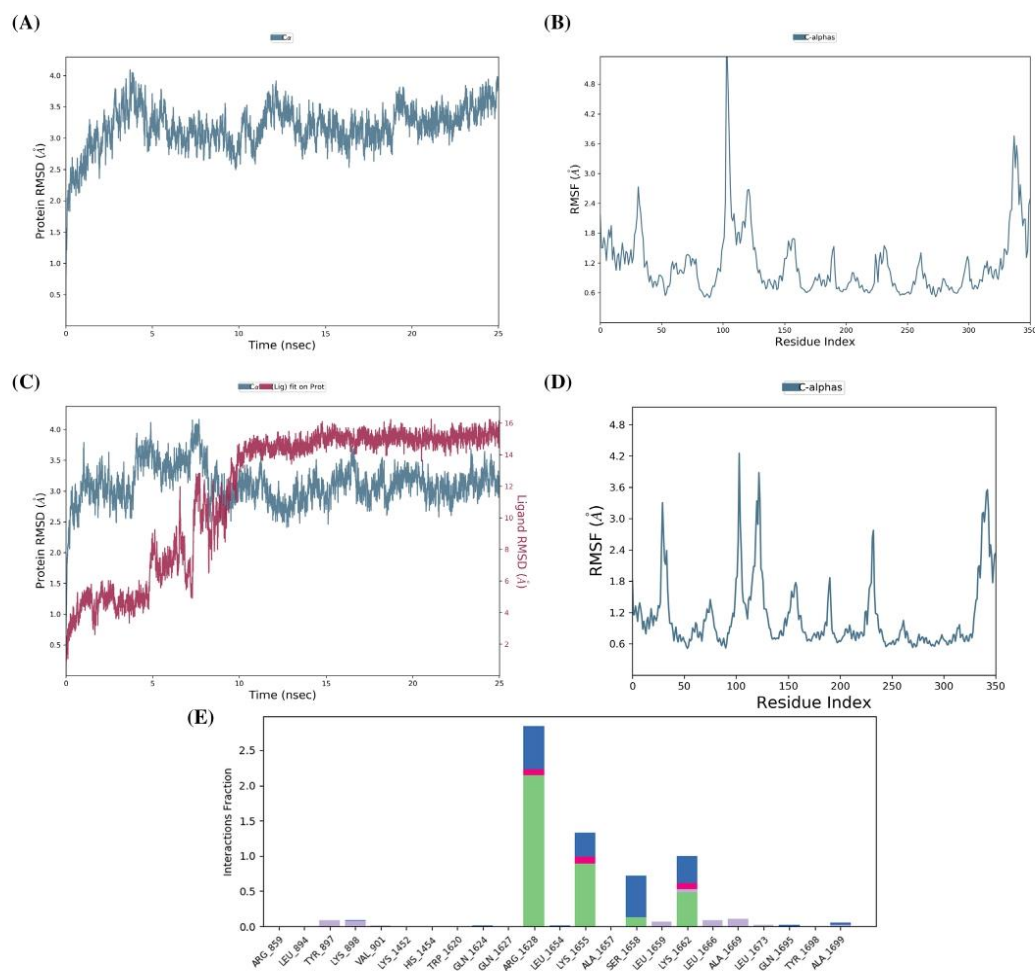


FIGURE 8 The conformational stability of sacubitrilat-mTOR complex over time. (A) Free mechanistic target of rapamycin (mTOR) RMSD of the Cα; (B) Free mTOR RMSF fluctuations of the Cα against the residue index; (C) RMSD of the Cα of sacubitrilat and mTOR against simulation time; (D) mTOR RMSF fluctuations of the Cα against the residue index obtained for sacubitrilat-mTOR complex and (E) sacubitrilat-mTOR contacts during molecular dynamic simulation. Green bars (hydrogen bonds), red bars (ionic interactions), gray bars (hydrophobic interactions), and blue bars (water bridges) were shown.



the most of the simulation time. Interaction of sacubitrilat and mTOR is characterized by the formation of multiple hydrogen bonds involving lysine and arginine residues, whereby these interactions predominantly contribute to the stabilization of the complex. Hydrogen bonds with ARG1628 lasted more than 210% of the simulation time, whereas the same type of interactions with LYS1655 and LYS1662 were maintained for about 90% and 50% of the simulation time, respectively (Figure 8E).

The protein RMSD diagram shows that the mLST8 subunit does not undergo significant conformational changes during the simulation (Figure 9A). Glycine and proline at positions 202 and 265 are the only residues that show noticeable fluctuations at 3.43 and 3.76 Å, respectively (Figure 9B). The RMSD plots of Val and mLST8 overlap each other, indicating that Val did not diffuse away from its initial binding site throughout 25 ns simulation period (Figure 9C). Due to the interaction of Val

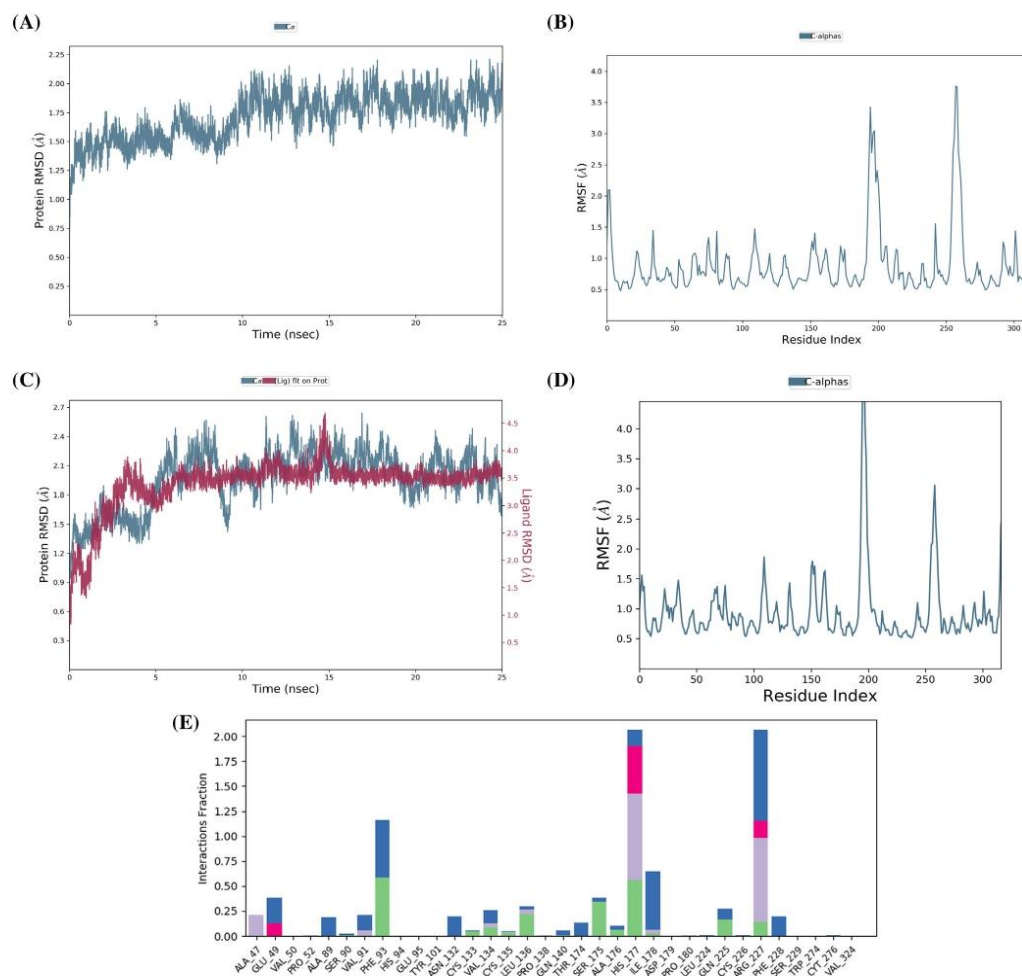


FIGURE 9 The conformational stability of valsartan (Val)-mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8) complex over time. (A) Free mLST8 RMSD of the Cα; (B) Free mLST8 RMSF fluctuations of the Cα against the residue index; (C) RMSD of the Cα of Val and mLST8 against simulation time; (D) mLST8 RMSF fluctuations of the Cα against the residue index obtained for Val-mLST8 complex and (E) Val-mLST8 contacts during molecular dynamic simulation. Green bars (hydrogen bonds), red bars (ionic interactions), gray bars (hydrophobic interactions), and blue bars (water bridges) were shown.

and mLST8, small local changes were observed for the glycine residues at positions 204 and 266 with RMSF values of 5.62 and 3.06 Å, respectively (Figure 9D). Hydrogen bonds with PHE93, LEU136, SER175, and HIS177 were significant intermolecular forces maintained in the Val-mLST8 complex. These interactions reached a continuity of 58.1%, 21.6%, 34.3%, and 56% of the simulation time, respectively. Moreover, dominant hydrophobic contacts were established with HIS177 and ARG227 during 86.6% and 83.9% of simulation time, respectively (Figure 9E).

The calculated average free binding energy values of the sacubitrilat-mTOR and Val-mLST8 interactions were -155.4356 kJ/mol and -126.9618064 kJ/mol, respectively. The calculated binding energy values are in good agreement with docking scores obtained for these complexes in molecular docking studies.

4 | DISCUSSION

Even though plethora of evidence suggests a superior potential of Sac/Val treatment compared with Val monotherapy on cardiovascular system in patients with chronic heart failure,³⁴ there are insufficient data to reveal the effects of their combined administration on morphology of adipose tissue. In addition, the variations in metabolic and endocrine profile of adipose tissue led to the excessive amount of fat depots which positively correlates with MetS factors score and have the negative impact on adipokines with endocrine function.³⁵ Specifically, MetS predisposes cardiovascular diseases exposing unfavorable association with positive clinical outcomes in these patients.³⁶ The results of PARADIGM-HF study suggest that treatment with Sac/Val not only reduce cardiovascular events, but also shows beneficial effect on metabolic state in patients with heart failure.³⁷ However, there is no specific studies so far of combined Sac/Val treatment on morphology of different fat depots in MetS condition, nor the potential of these drugs administration to serve as possible browning agents. Here, we demonstrated for the first time that 4-week treatment with Sac/Val of rats with MetS significantly improve glucose and lipid profiles, upregulate browning-specific markers in different WAT depots and promote specific gene expression linked with promotion of white fat tissue browning.

The first part of our study was oriented to examine the impact of Sac/Val administration on the main diagnostic criteria for MetS including BP values, lipidemic, and glycemic profiles. In our study, MS rats had significantly higher BP and HR values compared with healthy rats, while the treatment with Sac/Val markedly decrease

these parameters in MetS condition (Figure 1A1–A3). These results agree with the statement that elevated activation of RAS is commonly found in MetS, thus increasing the expression of angiotensinogen, and AT1 receptors, contributing to higher BP values. Hence, the inhibitors of AT1 receptors remain as an important drug class in managing the hypertension development.^{38,39} Moreover, previous studies reported markedly reduced NPs levels in patients with MetS, highlighting the importance of these peptides for homeostatic maintenance of BP levels.⁴⁰ In that sense, beneficial effect of Sac/Val, as neprilysine/AT1 receptor inhibitors, on BP and HR values may be linked to its physiological action on cardiovascular system. Furthermore, previously published paper indicated the potential of AT1 blockers to recover lipid metabolism in obese animals due to modification of adipocyte biology and morphology, thus reducing TG and TC concentration.³⁸ Moreover, the positive influence of AT1 blockage on lipid metabolism was also reported in clinical practice indicating markedly reduced serum TG concentration in patients with MetS after 6 months' treatment with telmisartan.⁴¹ The same results were obtained from our study which demonstrated significantly improved lipid profile in MS + ENT group compared with MS rats (Figure 1B1–B4). This also agrees with other research indicating lower NPs levels in MetS condition due to decreased cardiac synthesis but increased clearance by adipose tissue mainly achieved through NP clearance receptor (NPRC)-mediated lysosomal breakdown.⁴² Sac, as the inhibitor of neprilysin, prevents the degradation of NPs thus promoting their beneficial effects on lipid profile. Moreover, investigating different pathways, lipolytic effect of NPs was also related to cGMP-activated PKG cascade consequently promoting phosphorylation of perilipin 1 and hormone-sensitive lipase which finally affects hydrolysis of triglycerides into nonesterified fatty acids and glycerol.^{43,44} Meanwhile, the effect of Sac/Val on glycemic control is mediated via different pathway to lipid metabolism and it is dominantly linked to circulating level of active glucagon-like peptide-1 (GLP-1). As a gastrointestinal hormone, GLP-1 enhances meal-stimulated insulin secretion, thus regulating glucose homeostasis. However, neprilysin cleaves GLP-1 multiple active sites disabling GLP-1 receptor activation and reduce GLP-1 plasma level.⁴⁵ Inhibition of neprilysin results in increased NPs levels which consequently supports lipid mobilization and enhance postprandial energy expenditure due to induced postprandial oxidation exposing favorable effect on glucose metabolism. Several animal and clinical studies proved the improvement in glycemic status and insulin sensitivity after Sac/Val treatment, making this therapy safe and effective to combat with metabolic disorders with special regard to diabetic



subjects.^{45–47} In this study, we obtained significantly lower glucose levels in animals treated with Sac/Val (MS + ENT group; Figure 1C), but also improved insulin sensitivity (Figure 1D) compared with MS rats. These results are consistent with above-mentioned fact of presumed beneficial effect of neprilysin on glycemic control, but also with the suggestion that administration of Val could lead to increased GLP-1 pancreatic expression and this hormone plasma level.¹⁷

Recently, the great attention was put on white to brown adipocytes conversion which is considered as powerful strategy for the treatment of the obesity. While WAT is the primarily site of lipid storage, BAT depots are remained as thermogenic tissue strongly associated with decreased body weight, insulin resistance, and related metabolic disorders. Since the main role of BAT is to mediate nonshivering thermogenesis, cold exposure stays as the best-studied strategy to induce brown-like adipocyte in white fat depots. However, finding pharmacological manipulation that will favor brown-like adipocytes in WAT depots influencing overall glucose metabolism and energy homeostasis still represents the primarily focus of many investigations.⁵ In order to examine the mechanism by which 4-week Sac/Val treatment induces browning in rats with MetS, we investigated the influence of Sac/Val administration on the morphological changes in different adipose tissue depots (sWAT, rWAT, and eWAT). Histological analysis confirmed that MetS induction resulted in increased cell size in each examined adipose tissue related with the accumulation of lipid droplets. However, Sac/Val treatment markedly diminished these changes resulting in smaller lipid size and multilocular lipid droplet structure (Figures 2A, 3A, and 4A). The similar results were obtained by Kimura et al.,¹⁴ demonstrating strong potential of alone ANP treatment to recruit beige adipocytes in sWAT thus reconstituting and reorganizing morphological characteristic of WAT under high-fat diet conditions. Bearing in mind our results regarding combined neprilysin/AT1 inhibition, this is the first study demonstrating *rebrowning* potential of combined Sac/Val treatment under MetS condition.

To study the precise pathway and mechanism through which this dual pharmacological treatment activates thermogenic program, we next examined the expression levels of the markers of BAT activity in different WAT locations. We found significantly higher expression of UCP-1 and intensified mTORC1 staining augmented by Sac/Val treatment in each WAT depot of rats with MetS compared with untreated MS group (Figures 2–4). There is a large body of evidence suggesting crucial role of UCP-1, as molecular marker, to serve as an indicator of brown-like adipocytes activity. Previously conducted animal study indicated markedly

enhanced UCP-1 expression predominantly in sWAT of animals treated with ANP during 3 weeks regardless of the diet regime.¹⁴ Moreover, the same results were obtained from sWAT of mice treated with BNP with special emphasis on absent of UCP-1 expression in fat cells treated with rapamycin along with NPs.⁴⁸ Additionally, as we mentioned earlier NPRA-cGMP-PKG signaling cascade is thought to be pathway through which NPs increase UCP-1 expression and appearance of the beige adipocyte in WAT.¹⁵ In order to confirm this statement, we aimed to examine the potential of 4-week Sac/Val treatment to increase cGMP level and induce thermogenic program in primary cells. Our results showed significantly elevated cGMP concentration in serum samples of rats treated with Sac/Val compared with untreated control group (Figure 1E), so it can be proven that increased level of this secondary messenger is precisely result of higher levels of NPs due to the administration of sacubitril as a neprilysin inhibitor. Namely, as a secondary messenger, cGMP performs numerous physiological functions in the body. The production of cGMP is based on the conversion of guanosine triphosphate to cGMP in the presence of the enzyme guanylate cyclase (GC). On the other hand, phosphodiesterases (PDE) reduce the level of this secondary messenger by breaking the phosphodiester bonds in the cGMP molecule. Accordingly, the bioavailability of cGMP can be increased by applying different therapeutic strategies in two ways, by increasing the activity of the GC or by inhibiting the enzyme PDE. Receptors for NPs are homodimeric structures that belong to the group of membrane receptors linked to GC, whose extracellular domain binds NPs as ligands increasing the production of cGMP.⁴⁹ Consequently, several in vitro studies demonstrated the morphological changes of WAT after activation of NPRA in this tissue leading to increase of cGMP generation and PKG activation which further phosphorylates perilipin as the most abundant protein structure that coats lipid droplets.⁵⁰ Moreover, administration of synthetic NP to the animals fed with HFD increased GC activity and reduced body weight of these animals as well as the percentage of WAT. Also, this pharmacological substance caused increased tissue sensitivity to insulin as well as thermogenesis through the induction of UCP-1 molecule expression in subcutaneous adipocytes.⁵¹ These findings are in line with results obtained from our study highlighting that the stimulation of GC by NPs consequently increased cGMP level which take a significant place in the therapeutic approach to obesity by mechanisms based on the beige adipocytes generation.

Indeed, recent study pointed out the significance of cGMP-PKG pathway in the activation of mTORC1, as well as the importance of mTORC1 activation in NPs-

induced browning of white adipocytes.⁵² Namely, there are two biochemically and functionally different mTOR complexes—mTORC1 and mTORC2, both having mTOR in the structure as the catalytic place of the complex, but different subunits in their composition.⁵² Additionally, mTORC1 is found as crucial regulator of cell growth in response to nutrients and anabolic stimuli and its robustly increased activity in BAT after cold exposure was proved so far. The activation of sympathetic nervous system after cold exposure activates cAMP-PKA pathway, which finally activates mTORC1, as necessary molecule for brown-like fat cells development. Although cAMP and cGMP induce, respectively, PKA and PKG phosphorylation of nearly conserved amino acid motifs, it was not fully elucidated whether mTORC1 activation is required for cGMP-PKG induction of thermogenesis. Based on intensified mTORC1 expression in sWAT of rats in MS + ENT group compared with untreated MS group, our results suggest that appearance of beige adipocytes in WAT depots may be related to inhibition of neprilysin via Sac, thus increasing NPs level which finally activate mTORC1 in white fat cells. This is in line with earlier confirmed finding, demonstrating that activation of mTORC1 is crucial for NPs-mediated browning.⁴⁸ Moreover, data suggest that the NPRC is more pronounced expressed in gonadal WAT as a type of visceral fat, therefore reducing potential of NPs to bind to NPRA and consequently activate mTORC1 in this depot.⁴⁸ Also, there is evidence regarding profound induction of beige adipocytes in sWAT whereas eWAT is remained as particularly resistant to browning induction.⁵² However, our results showed for the first time that combined treatment with Sac/Val not only induced higher UCP1 expression in sWAT as well as in eWAT and rWAT of obese rats, but also promote stronger intensity of mTORC1 expression in WAT depots thus initiating signaling cascade in browning promotion. Recent study pointed out the role of mTORC1 in beige adipocytes adipogenesis via COX2 pathway, whereby mTORC1 is considered as upstream regulator of COX2 activation.⁵³ Namely, it was found that COX2 overexpression has beneficial effects on body fat regulation, insulin resistance but also mediates energy expenditure increase. Moreover, it was shown that COX2 induces transdifferentiation of white to brown fat cells, thus contributes to brown adipocytes recruitment in WAT depots.^{54,55} In line with this statement, our results showed significantly higher COX2 expression in sWAT as well as in eWAT and rWAT of rats from Sac/Val treated groups compared with the untreated MS and CTRL groups (Figures 2–4). Since mTORC1 and UCP1 expression was also increased in ENT and MS + ENT groups, along with higher COX2 expression, we can assume that applied treatment activates mTORC1 which acts as

upstream COX2 regulator and consequently increase UCP1 expression and beige recruitment in WAT depots. The presented results from this research add value to the findings obtained from previously conducted study that underlined COX2-mTORC1 as signaling pathway for white fat browning.⁵³

Another aspect of our research was based on investigation of relative gene expression that are important in browning promotion. We confirmed that results of protein expression (Figures 2–4) are in correlation with relative gene expression (Figure 5). Namely, more pronounced relative gene expression of UCP-1, as well as mTORC1 was found in WAT depots of MS + ENT rats compared with MS, but also increased in WAT of healthy animals treated with Sac/Val compared with CTRL group. Altogether, it may be certainly assumed that intensified beige adipocyte appearance in WAT depots under chronic Sac/Val treatment is coupled with increased NPs levels in white fat cells due to Sac administration, that trigger mTORC1 pathway and initiate UCP-1 gene expression. However, the crosstalk between AT1 blockade and mTORC1 gene expression is sparsely investigated. Val, as an antagonist of AT1 receptors, partially activates PPAR γ which acts as the master regulators of adipogenesis.⁵ Recent evidence implied strong correlation between PPAR γ stimulation and mTORC1 activation in the management of fat cell metabolism. While PPAR γ -mTORC1 activation leads to increased adiponectin production and its secretion in WAT, the downregulation of mTORC1 decreased adipose tissue activity of PPAR γ as one of the main regulators of adipogenesis. Based on this finding, the results of our study prove that increased expression of mTORC1 in WAT is maintained by a double regulation, regarding increased NPs binding potential to NPRA due to Sac action, but also with partially activation of PPAR γ via Val. Moreover, this statement is also confirmed by increased relative gene of PPAR γ in WAT of MS + ENT rats compared with untreated MetS animals. These results are expected due to close correlation between AT1 receptor expression and increased body fat. Indeed, Tsukuda et al.⁵⁶ indicated increased UCP-1 and PPAR γ expression in inguinal white depots of AT1 knockout mice, suggesting the pivotal role of AT1 receptor blockade in WAT browning. However, the PGC-1 α as the PPAR γ -interacting protein is highly expressed in brown adipose tissue contributing to mitochondrial biogenesis and function. Since obesity significantly reduces PGC-1 α expression in WAT, our study aimed to investigate relative gene expression of PGC-1 α in different WAT depots with special focus on Sac/Val impact on browning marker promotion. We found significantly higher PGC-1 α expression in WAT of MS + ENT rats compared with MS group, while applied treatment

failed to markedly increased this browning marker expression in rWAT of healthy rats (Figure 5). These findings are in line with previously published data highlighting decreased PGC-1 α in WAT of obese rodents as well as that adipose tissue of PGC-1 α knockout obese mice expressed impaired glucose tolerance, insulin resistance, and diminished genes expression involved in process of oxidative phosphorylation.⁵⁷ Moreover, chronic administration of losartan resulted in increased mRNA expression of PGC-1 α in eWAT of obese mice and activate pre-adipocyte differentiation in beige cells.¹⁸ Altogether, the downregulation of PGC-1 α in WAT is strongly linked with obesity while induced PGC-1 α mRNA expression in WAT due to Sac/Val treatment suggests high potential of this therapy to improve mitochondrial biogenesis and disturbance of whole-body metabolism.

The mechanism of molecular recognition between Sac/Val and the well-established upstream regulator of browning, mTORC-1, is still unknown. With the aim to identify potential signaling pathways involved in the pharmacological promotion of browning, the binding affinity of sacubitrilat and Val towards mTORC1 was investigated using an *in silico* approach. Through molecular docking and molecular dynamics analysis, we intended to obtain as precise as possible insight into the binding interactions involved in the stabilization of the ligand-protein complex.

Based on the obtained molecular docking data, it can be observed that sacubitrilat and Val showed the highest binding affinity for mTOR and mLST8 (−37.15 and −32.26 kJ/mol, respectively). The calculated average free binding energy values (−155.4356 and −126.9618064 kJ/mol, respectively) are in good agreement with the docking scores obtained in molecular docking studies. In a previously published molecular docking study performed in AutoDock 4.2.6 software, authors docked ketoprofen into the RAPTOR and mLST8 subunits of mTORC1 to elucidate the activation of mTORC1-p38-mediated activation of the COX-2 pathway.⁵³ Ketoprofen achieved the free binding energy values of −28.70 kJ/mol for RAPTOR, and −26.27 kJ/mol for mLST8. Sacubitrilat achieved a higher docking score for mLST8 subunit (−21.92 kJ/mol), but significantly lower docking score for RAPTOR subunit (−35.90 kJ/mol) compared with ketoprofen. On the other hand, Val exhibited the lower docking score for both subunits, suggesting its stronger binding affinity.

mTOR residues involved in noncovalent interactions with sacubitrilat include LYS898, VAL901, GLN1624, ARG1628, LYS1662, and LYS1655. As it can be noticed, these residues have predominantly basic side chains, which significantly affects their ability to form hydrogen bonds with the oxygen atoms of sacubitrilat's carboxyl group. In interaction of sacubitrilat with mTOR

significant portion of the electrostatic noncovalent bonding is also involved, as indicated by established π -anion interaction with VAL910 and the electrostatic energy value (−25.90 kJ/mol). The highest binding affinity of Val against mLST8 can be explained by the formation of multiple hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and attriWA charge interactions. This result is further supported by the lower value of intermolecular energy (−43.85 kJ/mol), with respect to the other subunits. However, despite these conclusions regarding molecular docking, it is well known that this *in silico* approach is subject to some limitations, including the absence of water molecules in the simulation, as well as the static nature of the ligand-protein complex.⁵⁸ Therefore, we investigated the conformational stability of sacubitrilat-mTOR and Val-mLST8 complexes using the molecular dynamics approach, which allowed us to evaluate the ability of these two compounds to maintain a stable binding pose over time. As shown in the RMSD diagrams, free mTOR and mLST8 in complex with sacubitrilat and Val were stable throughout the simulation time, indicating that these subunits did not undergo large conformational changes. Sacubitrilat and Val were also stable in solvated complexes (with deviations of $\sim$ 2–3 Å on average from the initial configuration), indicating that no major conformational changes of the starting binding pose were occurred. RMSF plot analysis shows that the binding residues in the protein binding pocket exhibit moderate fluctuations. A timeline representation of sacubitrilat-mTOR contacts revealed that established hydrogen bonds with residues LYS1662, ARG1628, and LYS1655 are present for most of the simulation time and contribute significantly to the stabilization of the ligand-protein system. The ability of sacubitrilat to form long-lasting hydrogen bonds with mTOR residues over time suggests a high binding affinity of this compound towards this subunit. On the other hand, hydrogen bonds and hydrophobic interactions are the dominant binding contacts achieved by Val in the mLST8 binding site. During the evolution of the solvated system over time, the hydrogen bonds with PHE93, LEU136, and SER175 observed in the molecular docking study are maintained throughout simulation. The electrostatic interaction with residue HIS177 observed in the molecular docking study retains its ionic nature with the addition of hydrophobic and hydrogen-bonding properties. Furthermore, hydrogen bond with residue ARG227 turned into a multiple contact of hydrophobic and ionic nature that is additionally involved in the formation of water bridges during simulation. Overall, it should be emphasized that the ability of Val to form the enduring hydrogen bonds and hydrophobic interactions with mLST8 residues over time, suggests its high binding affinity against this subunit of mTORC1.

5 | CONCLUSION

This study showed multifunctional role of Sac/Val against obesity-related dysfunction concerning improved glucose and lipid profile, but also with strong potential to affect adipose tissue disturbance and morphology. To our best knowledge, this is the first study examining the potential of combined Sac/Val administration to increased browning markers expression in different WAT depots in MetS condition with detailed explanation of its binding potential to mTORC1. Although we assumed in our previous work the pathways via Sac/Val combination induces WAT browning, the current research fully elucidated the mechanisms responsible to white to beige differentiation. Correspondingly, sacubitril increases circulating NPs level favoring their binding potential to receptors, while valsartan mediates PGC-1 α induction of PPAR γ expression. Altogether, these drugs activate mTORC1 contributing to enhanced UCP-1 expression and formation of beige adipose tissue. The binding profile of sacubitrilat and valsartan within mTORC1 subunits was estimated in silico using molecular docking and molecular dynamics studies. Blind molecular docking analyses have revealed that sacubitrilat achieved the most stable interaction with mTOR, whereas valsartan exhibited highest binding affinity for mTORC1. The ability of sacubitrilat and valsartan to form permanent complexes with mTOR and mTORC1 over time suggests a high binding affinity of these two compounds towards subunits of mTORC1. Collectively, the results of our study will distribute the knowledge about beneficial Sac/Val therapy on whole-body metabolism therefore be a promising therapeutic strategy in development of obesity in addition to well-known administration to patients with cardiovascular diseases. Moreover, the special finding of our study is directed to the strong potential of Sac/Val treatment to induce browning not only in sWAT, but also in eWAT as well as in rWAT, as a tissues closely related to clustering cardiometabolic risk factors. Although, the indication for usage of these drugs' combination is well-established in patients with cardiovascular events, there is no current data proving beneficial effect of Sac/Val in the treatment of obesity and associated cardiometabolic disorders. Finally, this study represents the first pivotal step in establishing a new indication for the clinical use of these drugs' combination in the prevention of the cardiovascular diseases' development in patients with MetS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NM (Nikolic Marina), LN, and MSA conducted chronic treatment and wrote the article. JN and JV designed and supervised the study. SA and NJ performed statistical analysis. ZV wrote and supervised the article, MS

conducted hystopatological and immunohistochemical analysis. NM (Nikolic Milos) and NN performed molecular docking, molecular dynamic analysis and wrote the article. All authors have read and agreed to the published version of the article.

FUNDING INFORMATION

The research was supported by the Ministry of Science, Technological Development and Innovation, Republic of Serbia through Grant Agreement with University of Kragujevac-Faculty of Medical Sciences No. 451-03-47/2023-01/200111, and by The Faculty of Medical Science, University of Kragujevac (Junior Project 04/22).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no competing interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used and/or analyzed during this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Nevena Jeremic  <https://orcid.org/0000-0002-5284-8180>

REFERENCES

1. Machado SA, Pasquarelli-do-Nascimento G, da Silva DS, Farias GR, de Oliveira Santos I, Baptista LB, et al. Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutr Metab*. 2022;19(1):61.
2. Keshvari S, Ceddia RP, Rajbhandari P, Chaurasia B, Bond ST. Editorial: adipose tissue in obesity and metabolic disease. *Front Physiol*. 2022;13:898861.
3. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(9):2358.
4. Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2019;129(10):3990–4000.
5. Nikolic M, Novakovic J, Ramenskaya G, Kokorekin V, Jeremic N, Jakovljevic V. Cooling down with Entresto. Can sacubitril/valsartan combination enhance browning more than coldness? *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):175.
6. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Frontiers Cardiovasc Med*. 2020; 7:22.
7. Cai Z, Fang L, Jiang Y, Liang M, Wang J, Shen Y, et al. Angiotensin II promotes white adipose tissue Browning and Lipolysis in mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:6022601.
8. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252–63.



9. Kuryłowicz A, Puzianowska-Kuźnicka M. Induction of adipose tissue Browning as a strategy to combat obesity. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6241.
10. Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;318(1–2):69–78.
11. Sahu B, Bal NC. Adipokines from white adipose tissue in regulation of whole body energy homeostasis. *Biochimie*. 2023;204:92–107.
12. Nagoshi T. Close linkage between natriuretic peptides and obesity – impact of sex on the Interorgan metabolic crosstalk. *Circ J*. 2021;85(5):655–6.
13. Carper D, Coué M, Nascimento EBM, Barquissau V, Lagarde D, Pestourie C, et al. Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non-shivering thermogenesis. *Cell Rep*. 2020;32(8):108075.
14. Kimura H, Nagoshi T, Oi Y, Yoshii A, Tanaka Y, Takahashi H, et al. Treatment with atrial natriuretic peptide induces adipose tissue browning and exerts thermogenic actions in vivo. *Sci Rep*. 2021;11(1):17466.
15. Wu W, Shi F, Liu D, Ceddia RP, Gaffin R, Wei W, et al. Enhancing natriuretic peptide signaling in adipose tissue, but not in muscle, protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci Signal*. 2017;10(489):eaam6870.
16. Kim DY, Choi MJ, Ko TK, Lee NH, Kim OH, Cheon HG. Angiotensin AT1 receptor antagonism by losartan stimulates adipocyte browning via induction of apelin. *J Biol Chem*. 2020;295(44):14878–92.
17. Graus-Nunes F, Rachid TL, de Oliveira Santos F, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V. AT1 receptor antagonist induces thermogenic beige adipocytes in the inguinal white adipose tissue of obese mice. *Endocrine*. 2017;55(3):786–98.
18. Liu HM, Wang CH, Chang ZY, Huang TH, Lee TY. Losartan attenuates insulin resistance and regulates Browning phenomenon of white adipose tissue in ob/ob mice. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(3):1828–43.
19. Than A, Xu S, Li R, Leow MK, Sun L, Chen P. Angiotensin type 2 receptor activation promotes browning of white adipose tissue and brown adipogenesis. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17022.
20. Jeremic JN, Jakovljevic VI, Zivkovic VI, Srejsovic IM, Bradic JV, Milosavljevic IM, et al. Garlic derived diallyl trisulfide in experimental metabolic syndrome: metabolic effects and Cardioprotective role. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):9100.
21. Davidson EP, Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, Yorek MA. Vascular and neural complications in type 2 diabetic rats: improvement by Sacubitril/valsartan greater Than valsartan alone. *Diabetes*. 2018;67(8):1616–26.
22. Sobot NM, Sobot TS, Jeremic JN, Bolevich SB, Bolevich SS, Mitrovic SL, et al. Minocycline as heart conditioning agent in experimental type 2 diabetes mellitus – an antibacterial drug in heart protection. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2022;395(4):429–44.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
24. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785–91.
25. ChemOffice Ultra 7.0.1. Cambridge, MA, USA: CambridgeSoft Corporation; 2002. Available from: <http://www.cambridgesoft.com>
26. Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. 2017;552(7685):368–73.
27. Protein Data Bank [cited 2023 May 5]. Available from: <http://www.rcsb.org/>
28. BIOVIA. Dassault Systèmes, Discovery studio visualizer, 17.2.0.16349. San Diego: Dassault Systèmes; 2016.
29. Schrödinger L, DeLano W. PyMOL [cited 2023 May 5]. Available from: <https://www.pymol.org/pymol>
30. Schrödinger Release 2020-4. Desmond molecular dynamics system. New York: D. E. Shaw Research; 2020.
31. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(1):281–96.
32. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79(2):926–35.
33. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(5):449–61.
34. Wijkman MO, Claggett B, Vaduganathan M, Cunningham JW, Rørth R, Jackson A, et al. Effects of sacubitril/valsartan on glycemia in patients with diabetes and heart failure: the PARAGON-HF and PARADIGM-HF trials. *Cardiovasc Diabetol*. 2022;21(1):110.
35. Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):E1782–8.
36. Perrone-Filardi P, Paolillo S, Costanzo P, Savarese G, Trimarco B, Bonow RO. The role of metabolic syndrome in heart failure. *Eur Heart J*. 2015;36(39):2630–4.
37. Cloro C, Zaffina I, Sacchetta L, Arturi F, Clausi C, Lucà S, et al. Effects of sacubitril/valsartan on both metabolic parameters and insulin resistance in prediabetic non-obese patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Front Endocrinol*. 2022;13:940654.
38. Cheng KC, Li Y, Chang WT, Kuo FY, Chen ZC, Cheng JT. Telmisartan is effective to ameliorate metabolic syndrome in rat model – a preclinical report. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018;11:901–11.
39. Michel MC, Brunner HR, Foster C, Huo Y. Angiotensin II type 1 receptor antagonists in animal models of vascular, cardiac, metabolic and renal disease. *Pharmacol Ther*. 2016;164:1–81.
40. Santhekadur PK, Kumar DP, Seneshaw M, Mirshahi F, Sanyal AJ. The multifaceted role of natriuretic peptides in metabolic syndrome. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:826–35.
41. Michel MC, Böhner H, Köster J, Schäfers R, Heemann U. Safety of telmisartan in patients with arterial hypertension: an open-label observational study. *Drug Saf*. 2004;27(5):335–44.
42. Selvaraj S, Claggett BL, Packer M, Zannad F, Anand IS, Pieske B, et al. Effects of Sacubitril/valsartan on serum lipids in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(17):e022069.
43. Verboven K, Hansen D, Jocken JWE, Blaak EE. Natriuretic peptides in the control of lipid metabolism and insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2017;18(11):1243–59.

44. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens*. 2008;21(7):733–41.
45. Esser N, Mongovin SM, Parilla J, Barrow BM, Munding TO, Fountaine BS, et al. Nephylisin inhibition improves intravenous but not oral glucose-mediated insulin secretion via GLP-1R signaling in mice with β -cell dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2022;322(3):E307–18.
46. Armentaro G, D'Arrigo G, Miceli S, Cassano V, Perticone M, Maio R, et al. Long term metabolic effects of Sacubitril/valsartan in non-diabetic and diabetic patients with heart failure reduced ejection fraction: a real life study. *Front Physiol*. 2022;13:897109.
47. Willard JR, Barrow BM, Zraika S. Improved glycaemia in high-fat-fed nephylisin-deficient mice is associated with reduced DPP-4 activity and increased active GLP-1 levels. *Diabetologia*. 2017;60(4):701–8.
48. Liu D, Ceddia RP, Collins S. Cardiac natriuretic peptides promote adipose 'browning' through mTOR complex-1. *Mol Metab*. 2018;9:192–8.
49. Reverte-Salisa L, Sanyal A, Pfeifer A. Role of cAMP and cGMP signaling in Brown fat. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;251:161–82.
50. Moro C, Lafontan M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;304(3):H358–68.
51. Glöde A, Naumann J, Gnad T, Cannone V, Kilic A, Burnett JC Jr, et al. Divergent effects of a designer natriuretic peptide CD-NP in the regulation of adipose tissue and metabolism. *Mol Metab*. 2017;6:276–87.
52. Ye Y, Liu H, Zhang F, Hu F. mTOR signaling in Brown and Beige adipocytes: implications for thermogenesis and obesity. *Nutr Metab*. 2019;16:74.
53. Kang NH, Mukherjee S, Jang MH, Pham HG, Choi M, Yun JW. Ketoprofen alleviates diet-induced obesity and promotes white fat browning in mice via the activation of COX-2 through mTORC1-p38 signaling pathway. *Pflug Arch*. 2020;472(5):583–96.
54. Francés DE, Motiño O, Agrá N, González-Rodríguez Á, Fernández-Álvarez A, Cucarella C, et al. Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance. *Diabetes*. 2015;64(5):1522–31.
55. García-Alonso V, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Rius B, Lopategi A, López-Vicario C, et al. Prostaglandin E2 exerts multiple regulatory actions on human obese adipose tissue remodeling, inflammation, adaptive thermogenesis and lipolysis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153751.
56. Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Kanno H, Nakaoka H, Wang XL, et al. Enhancement of adipocyte Browning by angiotensin II type 1 receptor blockade. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167704.
57. Kobayashi M, Deguchi Y, Nozaki Y, Higami Y. Contribution of PGC-1 α to obesity- and caloric restriction-related physiological changes in white adipose tissue. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):6025.
58. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key topics in molecular docking for drug design. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4574.

How to cite this article: Nikolic M, Jeremic N, Lazarevic N, Stojanovic A, Milojevic Samanovic A, Novakovic J, et al. Sacubitril/valsartan promotes white adipose tissue browning in rats with metabolic syndrome through activation of mTORC1. *BioFactors*. 2024. <https://doi.org/10.1002/biof.2040>

БИОГРАФИЈА

Марина Николић (дев. Ранковић) рођена је 29.09.1995. године у Крагујевцу где је завршила основну и средњу медицинску школу са одличним успехом. Школске 2014/2015 уписала је Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер интегрисане академске студије фармације. Студије је завршила у јулу 2019. године са просечном оценом 8,73 и стекла звање магистар фармације. Након обављеног приправничког стажа положила је стручни испит пред стручном комисијом Министарства здравља октобра 2020. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписује школске 2019/2020 године изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином, док наредне школске године уписује специјалистичке студије из медицинске биохемије. Као студент треће године Докторских студија положила је све програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00 као и усмени докторски испит са оценом 10.

Као студент основних студија прикључује се научно-истраживачком тиму на чијем челу се налази проф. др Владимир Јаковљевић. Своју академску каријеру започиње фебруара 2020. године у звању сарадника у настави за ужу научну област Физиологија, док је у звању асистента изабрана фебруара 2022. године. Учесник је бројних конгреса и скупова са интернационалним учешћем. Добитник је награде *Young Investigator Awards* која носи назив по проф. др Милосаву Миши Костићу за најбољу постер презентацију изложену на конгресу у Темишвару (Румунија) 2023. године.

Тренутно је ангажована на више Јуниор Пројеката Факултета медицинских наука. Одлуком Савета Факултета медицинских наука изабрана је за члана менаџерског тима часописа *Experimental and Applied Biomedical Research*. У библиографији до сада има 25 радова објављених у целини, од којих је 23 са SCI листе.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Nikolic M**, Jeremic N, Lazarevic N, Stojanovic A, Milojevic Samanovic A, Novakovic J, Zivkovic V, Nikolic M, Nedeljkovic N, Mitrovic S, Jakovljevic V. Sacubitril/Valsartan promotes white adipose tissue browning in rats with metabolic syndrome through activation of mTORC1. *BioFactors*. 2024. M21; IF= 6.1
2. **Nikolic M**, Novakovic J, Ramenskaya G, Kokorekin V, Jeremic N, Jakovljevic V. Cooling down with Entresto. Can sacubitril/valsartan combination enhance browning more than coldness? *Diabetol Metab Syndr*. 2022; 14(1): 175. M21; IF=5.395
3. **Nikolic M**, Lazarevic N, Novakovic J, Jeremic N, Jakovljevic V, Zivkovic V, Bradic J, Pecarski D, Tel-Çayan G, Glamocija J, Sokovic M, Gregori A, Petrovic J. Characterization, In Vitro Biological Activity and In Vivo Cardioprotective Properties of *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Quél. Heteropolysaccharides in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *Pharmaceuticals*. 2023; 16(6): 787. M21; IF= 5.215

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

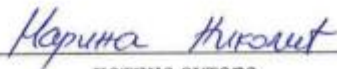
„Улога комбиноване примене антагонисте AT_1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији *browning*-а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и *in silico* идентификација сигналних путева“

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 18.03.2024. године,


потпис аутора

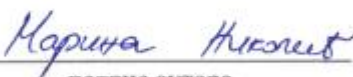
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Улога комбиноване примене антагонисте AT_1 рецептора и инхибитора
неприлизина у промоцији *browning*-а на експерименталном моделу метаболичког
синдрома и *in silico* идентификација сигналних путева“

истоветне.

У Крагујевцу, 18.03.2024. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Николић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Улога комбиноване примене антагонисте AT_1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији *browning*-а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и *in silico* идентификација сигналних путева“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 18.03.2024. године,



потпис аутора