

Mehanizmi inzulinske rezistencije u amiodaronskom modelu masne jetre

Puljak, Livia

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:918463>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Livia Puljak, dr. med.

**MEHANIZMI INZULINSKE REZISTENCIJE U AMIODARONSKOM MODELU
MASNE JETRE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr. sc. Damir Sapunar

U Splitu, 29. ožujka 2008.

Rad je izrađen u laboratoriju dr. Gordana Kilića na odjelu za Internu medicinu, odsjek Probavne i jetrene bolesti na University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas (SAD).

Voditelj rada: dr.sc. Gordan Kilić

Redni broj rada:

ZAHVALE

Zahvaljujem dr. Gordanu Kiliću i dr. Gregu Fitzu što su me zaposlili u svom američkom laboratoriju. Obitelj dr. Kilića mi je pomogla da se u Americi osjećam kao kod kuće pa hvala i drugim članovima obitelji Kilić: Martini, Katarini, Stjepanu, Gordani i profesoru Srećku Kiliću. Hvala i kolegici dr. Svjetlani Dolovčak koja je nastavila raditi u laboratoriju dr. Kilića nakon mog odlaska.

Profesori Mladen Boban, Davor Eterović i Željko Dujić su me preporučili dr. Kiliću za posao te im najljepše zahvaljujem na ukazanom povjerenju.

Profesor Matko Marušić, koji je poslao u inozemstvo više od sto hrvatskih znanstvenika, zaslužuje posebnu zahvalnost zbog korisnih savjeta. Kad sam odlazila u Ameriku rekao mi je da moram u laboratorij doći svaki dan prije šefa, ostati poslije šefa te da se ne petljam s muškarcima u institutu. Sve ove savjete sam se više-manje trudila slijediti.

Hvala i profesoru Damiru Sapunaru za izvrsnu poslovnu suradnju, optimizam i posao u Hrvatskoj.

Moje laboratorijske suradnice u Denveru bile su Marlyn Troetsch i Sylene Goodwin. U Dallasu su mi sa štakorskim jetrenim stanicama pomagali Vinay Parameswara, Victoria Esser i Daniel Emmett. Donna Brown, Nelda Parker, Karen Land, Susan Chadwick i Deborah Gardner su administratorice koje su omogućile da sve teče glatko. Svima njima veliko hvala.

Zahvalna sam uredu za postdocove te postdoktorskoj udruzi pri University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas jer su mi pružili priliku da budem

predsjednica te udruge gotovo godinu dana, promijenim svijet postdocova nabolje i upoznam mnoge kolege.

Boravak u Americi su ugodnijim učinile i moje brojne cimerice i cimeri: Kara Lukin, Zora Generalovich, Jesus Banales, Thiago Detanico, Tanja Freitas, Heather Bruce, Wen-Pin Chang i Carlos David Esteban Nieto.

Hvala brojnim prijateljima u Hrvatskoj i u Americi za društvenu i poslovnu podršku.

Hvala članovima moje obitelji jer su mi uvijek bili pouzdan izvor moralne podrške, ljubavi i financija. Čak i kad su mi govorili da će me u Americi ubiti gangsteri i da ću se udebljati od hamburgera, ja im to nisam zamjerila jer sam znala da su iskreno zabrinuti za moj život i vitku liniju.

Marita Mimica i Natalia Cotić iz Službe za poslijediplomsku nastavu i stalno medicinsko usavršavanje Medicinskog fakulteta u Splitu pobrinule su se za administrativnu podršku moje doktorske disertacije pa im se ljubazno zahvaljujem. Hvala i kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu za svakodnevnu podršku na poslu: profesorica Mirna Saraga Babić, profesor Ivica Grković, docentica Katarina Vilović, mr. Katarina Vukojević, dr. Sanja Lovrić Kojundžić, dr. Dominko Carev, mr. Vana Košta, dr. Ana Čarić, mr. Maja Marinović Guić i dr. Ana Poljičanin.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	7
INTERNETSKI IZVORI	8
1. UVOD	9
1.1. Inzulinska rezistencija u jetri	9
1.2. Nealkoholna masna bolest jetre	10
<i>1.2.1. Definicija, prevalencija i klinički spektar NAMBJ</i>	10
<i>1.2.2. Patogeneza NAMBJ</i>	12
1.3. Inzulinska rezistencija i masna jetra	14
1.4. Poremećaj inzulinske signalne kaskade u NAMBJ	15
1.5. Inzulin i Cl⁻ kanali u jetri	18
1.6. Inzulinska rezistencija i protein kinaza C	19
2. CILJ DISERTACIJE	21
3. TVORIVA I POSTUPCI	24
3.1. Priprema stanica	24
3.2. Mjerenje untarstanične masti	24
3.3. Priprema adenovirusa i transdukcija	25
3.4. Otpuštanje glukoze	26

3.5. Western blot analiza	26
3.6. Mjerenje egzocitoze	27
3.7. Mjerenje [Ca²⁺]	28
3.8. Detekcija PKC aktivnosti	28
3.9. Oslikavanje i analiza	29
3.10. Mjerenja vodljivosti (conductance) i struje (current)	30
3.11. Otopine	30
3.12. Statistička analiza	31
4. REZULTATI	32
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČCI	50
7. SAŽETAK	52
8. SUMMARY	54
9. LITERATURA	55
10. ŽIVOTOPIS	67

POPIS KRATICA

Adv-βgal	adenovirus koji kodira β -galaktozidazu bakterije Escherichia coli
BSA	goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumine)
DMEM	stanični medij Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimetil sulfoksid (engl. dimethyl sulphoxide)
ECL	pojačana kemiluminiscencija (engl. enhanced chemiluminescence)
GTPaza	gvanozin trifosfataza
IR-β	β -podjedinica inzulinskog receptora (engl. insulin receptor beta)
IRS	proteini substrata za inzulinski receptor (engl. insulin receptor substrate proteins)
NAMBJ	nealkoholna masna bolest jetre
NPPB	5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoična kiselina
PBS	fosfatni pufer (engl. phosphate-buffered saline)
PI 3-kinaza	fosfatidil inozitol 3-kinaza (engl. phosphatidil inositol 3-kinase)
PKC	protein kinaza C
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (engl. phorbol 12-myristate 13-acetate)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)
SDS-PAGE	gel za elektroforezu (engl. sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide gel)
TBS	Tris pufer (engl. Tris-buffered saline)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. tumor necrosis factor α)
VLDL	lipoproteini vrlo male gustoće (engl. very low density lipoprotein)

INTERNETSKI IZVORI

PUBMED (National Library of Medicine) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

(Nacionalna medicinska biblioteka, Bethesda, SAD)

1. UVOD

1.1. Inzulinska rezistencija u jetri

Inzulin je regulator homeostaze glukoze u cijelom tijelu jer regulira opskrbu glukozom prema trenutnim potrebama organizma. Inzulin potiče odlaganje glukoze u masnom tkivu i mišićima te inhibira glikogenolizu u jetri i mišićima te glukoneogenezu u jetri što sprječava proizvodnju glukoze u jetri. Inzulin također kontrolira druge važne procese kao što su sinteza i pohrana masti, sinteza proteina, stanični rast, proliferacija stanica, njihovo preživljenje i diferencijacija (1).

Inzulinska rezistencija je smanjena sposobnost stanica da odgovore na inzulin. Inzulinska rezistencija tipično se razvija u pretilih osoba i dovodi do nastanka dijabetesa tipa II (2).

Jetra je organ osjetljiv na inzulin i ključan za regulaciju energije u tijelu. Inzulinska rezistencija u hepatocitima ima niz posljedica jer su to metabolički vrlo aktivne stanice. Inzulinska rezistencija je prepoznata i kao patološki čimbenik u razvoju ne-alkoholne masne bolesti jetre (NAMBJ), a utječe i na progresiju kroničnog virusnog hepatitisa C te alkoholnog hepatitisa (3). Ove kliničke informacije pružaju dodatni dokaz da čimbenici povezani s inzulinskom rezistencijom imaju važan patobiološki učinak na jetru.

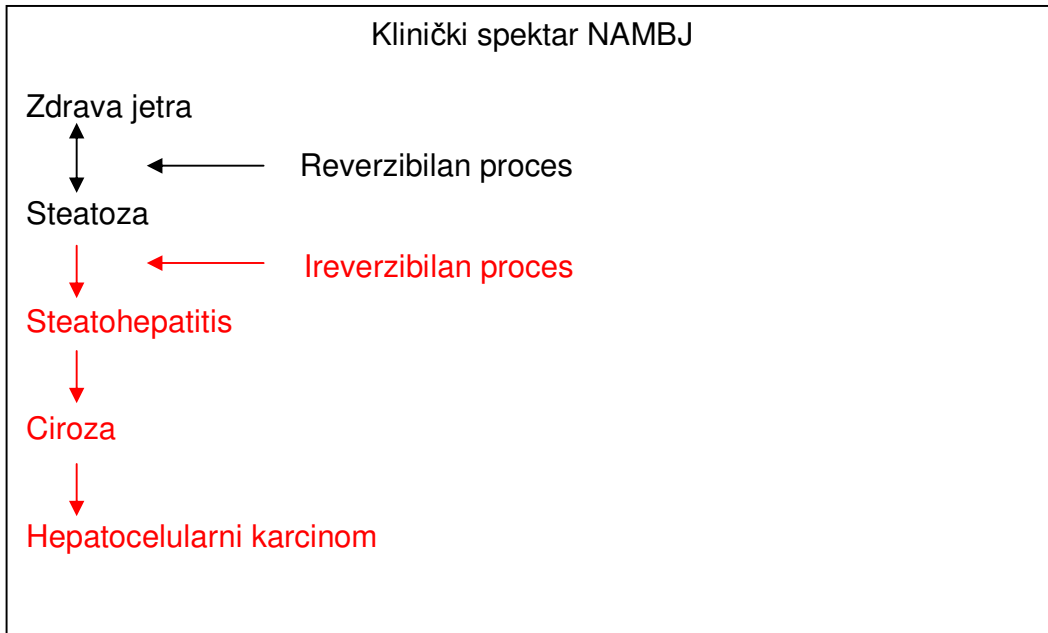
1.2. Nealkoholna masna bolest jetre

NAMBJ je potencijalni uzrok progresivnog oštećenja jetre te rizični čimbenik za razvoj hepatocelularnog karcinoma i zatajenja jetre. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) NAMBJ je najučestalija jetrena bolest s prevalencijom od 5% u općoj populaciji te 25-75% u bolesnika s pretjeranom tjelesnom masom i dijabetesom tipa II. Mogućnost napredovanja NAMBJ u steatohepatitis, jetrenu cirozu te čak i hepatocelularni karcinom predstavlja veliki klinički i znanstveni problem jer su podaci o nastanku i razvoju NAMBJ oskudni, a nema ni prikladnih metoda liječenja.

1.2.1. Definicija, prevalencija i klinički spektar NAMBJ

Termin nealkoholni steatohepatitis prvi put je upotrebljen 1980. godine za definiranje prethodno prepoznatog kliničkopatološkog sindroma koji se nije razlikovao od manifestacija alkoholnog hepatitisa, a viđao se uglavnom u pretilih žena i/ili žena s dijabetesom koje su negirale konzumaciju alkohola (4). S vremenom je postalo jasno da je masna jetra s nekroinflamacijom (nealkoholni steatohepatitis) samo jedno stanje u širokom spektru bolesti koji se sastoji od masne bolesti jetre (stetoze), steatohepatitisa i kriptogene ciroze jetre koja može napredovati u hepatocelularni karcinom u malom broju bolesnika (Slika 1). Cijeli ovaj spektar se sada naziva nealkoholna masna bolest jetre. Naziv je opravdan u bolesnika u kojih se nakon pomnih kliničkih i laboratorijskih testiranja može zaključiti da ne konzumiraju alkohol preko 20 g na dan (žene), odnosno 40 g na dan (muškarci).

Slika 1. Shematski prikaz kliničkog spektra NAMBJ. Prijelaz bolesti u steatohepatitis je “kritična točka” nakon koje NAMBJ više nije reverzibilno stanje.



NAMBJ je zasebna bolest koju treba razlikovati od drugih oblika steatoze jetre s ili bez nekroinflamacije, a nastaju kao posljedica lijekova, prehrane, genetskih i drugih razloga, jer ova stanja imaju različitu patogenezu i ishod. Kliničke posljedice NAMBJ proizlaze iz njene prevalencije i prirodnog tijeka.

1.2.2. Patogeneza NAMBJ

Patogeneza NAMBJ je povezana s inzulinskom rezistencijom i metaboličkim sindromom, koji se manifestira kao kombinacija nekoliko stanja: pretilost, dijabetes i hipertrigliceridemija (5). Ova su stanja glavni rizični čimbenici za razvoj NAMBJ i nealkoholnog steatohepatitisa. Histološki spektar NAMBJ uključuje niz faza od izolirane jetrene steatoze do steatohepatitisa.

Jetrena steatoza nastaje uslijed relativnog povećanja triglicerida u odnosu na njihovu potrošnju. Formiranje triglicerida ovisi o dostupnosti slobodnih masnih kiselina. Povećanje periferne lipolize omogućuje opskrbu masnim kiselinama i njihov ulazak u jetru (6).

Pretilost je glavni rizični čimbenik za razvoj NAMBJ i studije na pretilim osobama pokazuju kako je povećana konzumacija ugljikohidrata i zasićenih masti također dijelom odgovorna za povećanje sinteze novih masnih kiselina u NAMBJ (7). Povećan unos fruktoze doprinosi pretilosti i sintezi novih masnih kiselina u jetri (8).

Mogućnost mobilizacije triglicerida ovisi i o prikladnom oblikovanju i izvozu lipoproteina vrlo male gustoće (engl. very low density lipoproteins, VLDL). Za to su potrebni normalno stvaranje apolipoproteina B100 te aktivnost mikrosomalnog

prijenosnog proteina. Poremećaj stvaranja apolipoproteina u pacijentima s NAMBJ će dovesti do smanjenja stvaranja VLDL te povećati rizik od nakupljanja masti u jetri (9).

Steatohepatitis se odlikuje masnom jetrom zajedno s citološkim povećanjem stanica (engl. ballooning), prisutnošću Malloryjevih tjelešaca, fibroze oko stanica (pericelularna fibroza) te upalnim promjenama (10). Budući je steatoza reverzibilno stanje, pretpostavlja se da je za nastanak steatohepatitisa potrebno dodatno patofiziološko oštećenja unutar jetre. Ova se teorija naziva "hipoteza dvaju udaraca" (11).

Precizan mehanizam na koji se steatoza razvija u steatohepatitis nije poznat. Također se ne zna je li ovaj proces neovisan o inzulinskoj rezistenciji ili ga uzrokuje teška i produžena inzulinska rezistencija. Neovisno o uzroku, ova stanja povezuje oksidativni stres zbog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. reactive oxygen species, ROS) ili smanjene obrane antioksidantima (6).

Iako oksidacija masnih kiselina u mitohondrijima nije smanjena u NAMBJ, preko 40% mitohondrija u ovoj bolesti ima poremećenu strukturu (6). Ova je abnormalnost povezana s poremećajem enzimske aktivnosti u elektronskom prijenosnom lancu, što razdvaja oksidaciju od fosforilacije i rezultira stvaranjem ROS (12).

Patogeneza povećanja stanica i nastanka Malloryjevih tjelešaca ostaje nejasna. Veličina i oblik stanica određena je unutar- i van-staničnim čimbenicima. Citoskelet te međudjelovanja između citoskeleta i stanične membrane su dva glavna čimbenika koja pomažu stanicama u održavanju oblika i veličine. Ova

međudjelovanja su regulirana pomoću skupine malih gvanozin trifosfataza (GTP-aza), uključujući Rho, Rac i Cdc42 koje su dokazano bitne za inzulinski signalni put (13). Inzulinska signalizacija može poremetiti aktinsku citoskeletnu mrežu (14) te je stoga teoretski moguće da abnormalna inzulinska signalizacija može uzrokovati poremećaj citoskeletne funkcije i napuhivanje citoplazme.

1.3. Inzulinska rezistencija i masna jetra

Brojne su studije pokazale kako je stanično nakupljanje masti u jetri i stanicama skeletnih mišića obilježje sindroma inzulinske rezistencije (kombinacija pretilosti, dijabetesa tipa II i masne bolesti jetre) (15, 16). Višak unutarstanične masti u jetri uzrokovan je promjenom transporta masnih kiselina u hepatocitima, njihovom sintezom ili metabolizmom (17).

Dokazano je da nakupljanje masti u jetri dovodi do razvoja inzulinske rezistencije, ali nije poznat točan mehanizam kojim se to događa (18).

Određivanje povezanosti jetrene steatoze i jetrene inzulinske rezistencije zahtijeva eksperimentalne modele u kojima se u jetri nakuplja mast bez perifernog nakupljanja masti.

Studija koja je proučavala vremenski tijek nastanka jetrene i periferne inzulinske rezistencije pokazala je kako štakori razvijaju jetrenu inzulinsku rezistenciju prije periferne inzulinske rezistencije (19). Također je dokazano kako se sprječavanjem nakupljanja masti u jetri sprječava nastanak inzulinske rezistencije te da postoji direktna linearna povezanost između količine masti i težine inzulinske rezistencije (20).

Postoje pretpostavke kako periferna inzulinska rezistencija u kombinaciji s povišenom koncentracijom glukoze i masnih kiselina u plazmi potiče sintezu masnih kiselina u jetri te sprječava β -oksidaciju, što zajedno dovodi do nastanka jetrene steatoze (6, 18). Druga je hipoteza da se nakupljanje masti u jetri te jetrena inzulinska rezistencija mogu dogoditi i bez periferne inzulinske rezistencije (19, 21). Ipak, mehanizam kojim nakupljanje masti u jetri dovodi do jetrene inzulinske rezistencije nije razjašnjen niti je poznato što nastaje prije, jetrena steatoza ili inzulinska rezistencija.

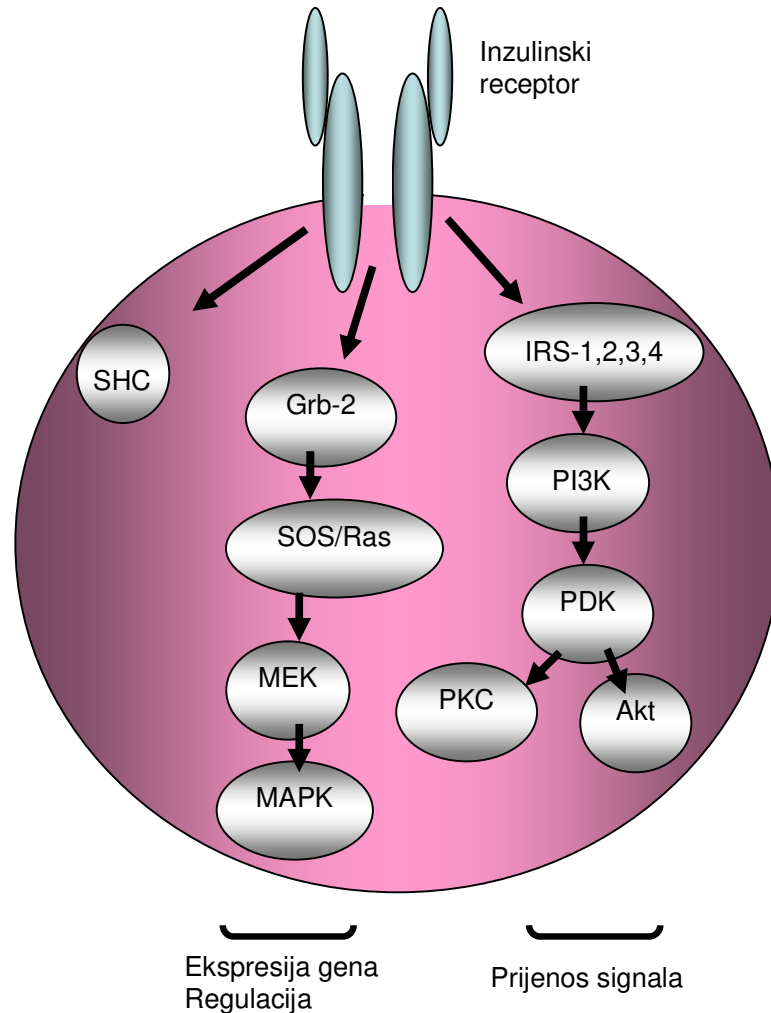
Stanični mehanizmi kojima nakupljanje masti u hepatocitima može dovesti do jetrene inzulinske rezistencije su složeni i mogu uključivati (I) poremećaj prijenosa signala u inzulinskoj signalnoj kaskadi, (II) nemogućnost inzulina da aktivira glikogen sintetazu te (III) aktivaciju protein kinaze C (PKC) koja je važna za kinaznu aktivnost inzulinskog receptora (20).

Inzulinska rezistencija u jetri tako može nastati zbog inhibicije inzulinske signalne kaskade ili smanjenja broja inzulinskih receptora (15, 22, 23). Dok su stanični mehanizmi odgovorni za poremećaj regulacije glukoneogeneze dobro definirani, nije poznato je li rani stanični odgovor na inzulin (egzocitoza i otvaranje Cl^- kanala) promijenjen u inzulinskoj rezistenciji te, ako jest, koji je mehanizam odgovoran. Isto tako nije poznata uloga PKC u jetrenoj inzulinskoj rezistenciji.

1.4. Poremećaj inzulinske signalne kaskade u NAMBJ

Pohrana i otpuštanje energije tijekom razdoblja hranjenja i gladovanja te veliki dio somatskog rasta regulirani su inzulinskim signalnim sustavom (Slika 2).

Slika 2. Inzulinska signalna kaskada.



Popis kratica: SHC=Src homology 2 domain containing; Grb-2=Growth Factor Receptor Bound Protein 2; SOS=son of sevenless; Ras=rat sarcoma oncogene; MEK=mitogen-induced extracellular kinase; MAPK=mitogen activated protein kinase; IRS=insulin receptor substrate; PI3K=phosphatidylinositol-3-kinaze; PDK=3-phosphoinositide-dependent protein kinase; PKC=protein kinaze C; Akt=protein kinaze B

Inzulin je najpoznatiji po svojoj ulozi u regulaciji glukoze u krvi: inzulin potiskuje jetrenu glukoneogenezu i promiče sintezu glikogena te njegovu pohranu u jetri i mišićima; potiče sintezu triglicerida u jetri i pohranu u masnom tkivu te pohranu aminokiselina u mišićima. Ovaj signalni sustav ima širu ulogu jer zajedno s inzulinskim čimbenikom rasta (IGF) promiče somatski rast. Potpuna disfunkcija esencijalnih komponenti inzulinskog signalnog sustava je rijetka i letalna. Djelomični poremećaji povezani su s brojnim metaboličkim poremećajima, uključujući dislipidemiju, hipertenziju, žensku neplodnost te intoleranciju glukoze koja može napredovati u dijabetes tipa II.

Nakon vezivanja inzulina, inzulinski receptor se fosforilira tirozinom kroz proces autofosforilacije, što je nužan korak za aktivaciju signalne kaskade. Većina unutarstaničnih signala nastaje pomoću signalnih kompleksa koji se tvore oko proteina fosforiliziranih tirozinom, uključujući substratne proteine inzulinskog receptora (IRS) te proteine Shc, APS, SH2B, Gab1/2, Dock1/2 i cbl. Iako uloga svih ovih substrata zahtijeva pozornost, studije s transgeničnim miševima su pokazale kako se većina inzulinskih učinaka ostvaruje preko dva IRS proteina koji se nazivaju IRS-1 i IRS-2. IRS proteini povezuju inzulinski receptor s drugim signalnim kaskadama kao što je kaskada fosfatidil-inozitol 3-kinaze (PI3K) koja je najviše istraživana i kontrolira niz procesa u citoplazmi i jezgri.

Serinska kinaza Akt (također se naziva protein kinaza B) aktivira se preko PI3K puta, a važna je za metaboličku regulaciju i ekspresiju gena. Inzulinska stimulacija Akt uzrokuje inhibiciju apoptoze. Transkripcijski faktor Foxo1 je također substrat Akt tijekom inzulinske stimulacije. Fosforilacija Foxo1

stimulirana inzulinom mijenja ekspresiju različitih gena, uključujući gene koji kodiraju fosfoenolpiruvat karboksikinazu (engl. phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK), tirozinsku aminotransferazu i glukoza-6-fosfatazu.

Inzulinska rezistencija je povezana s nekoliko humanih bolesti, ali zajednički mehanizam koji bi objasnio nastanak akutne i kronične inzulinske rezistencije u ljudi je teško prokazati. Eksperimenti s transgeničnim životinjama pokazuju kako se defekt može naći na različitim razinama i na nekoliko mjesta u inzulinskoj signalnoj kaskadi, uključujući regulatorna međudjelovanja. Svega nekoliko od tih koraka se smatra specifičnima za inzulinski signalni put jer se mnogi poremećeni elementi dijele s drugim staničnim sustavima.

Povećana aktivnost lipidnih fosfataza, uključujući protein tirozinsku fosfatazu PTP1B, inozitolsku fosfatazu SHIP2 ili lipidnu fosfatazu pTEN su klinički važni uzroci inzulinske rezistencije. Inhibicija ovih fosfataza genskim knockoutom ili kemijskim inhibitorima povećava toleranciju glukoze što znači da bi se inhibitori ovih fosfataza mogli koristiti u terapiji dijabetesa. Različiti citokini i metaboliti potiču serinsku fosforilaciju IRS proteina koji inhibiraju prijenos signala. Tu spadaju cirkulirajuće slobodne masne kiseline, diacilglicerol, acetyl-CoA i ceramidi. Citokini iz masnog tkiva, osobito čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF- α), stimuliraju serin-treonin fosforilaciju IRS-1 i/ili IRS-2, što također inhibira inzulinski signal.

1.5. Inzulin i Cl⁻ kanali u jetri

Poremećaj prijenosa signala u inzulinskoj signalnoj kaskadi može se

očítovati promjenom egzocitotne aktivnosti posredovane inzulinom. Početni odgovor jetrenih stanica na inzulin posredovan je egzocitozom specifične populacije vezikula koje sadrže Cl⁻ kanale u svojim membranama (24). Ugrađivanje ovih vezikula u staničnu membranu je direktno odgovorno za petnaesterostruko povećanje vodljivosti membrane zbog otvaranja Cl⁻ kanala. Aktivacija Cl⁻ kanala mijenja membranski potencijal i unutarstanični pH. Izlazak kloridnih iona izvan stanice dio je regulatornog smanjenja volumena stanice. Ove promjene reguliraju niz transportnih i metaboličkih procesa u hepatocitima (25-27). Stoga je razjašnjenje molekularnih mehanizama odgovornih za promjenu aktivnosti Cl⁻ kanala ključno za razumijevanje metabolizma jetre. Mehanizam otvaranja Cl⁻ kanala nakon različitih fizioloških podražaja je opisan (26, 28), međutim, vrlo malo se zna o staničnim mehanizmima koji reguliraju otvaranje Cl⁻ kanala pod utjecajem inzulina.

1.6. Inzulinska rezistencija i protein kinaza C

PKC je enzim iz skupine proteinskih kinaza koji katalizira fosforilaciju tirozinskih ostataka pojedinih proteina. Aktivacija različitih izoformi PKC dokazana je u patogenezi inzulinske rezistencije u čovjeka i na životinjskim modelima (20, 22, 29-31).

Aktivacija različitih izoformi PKC dokazana je u patogenezi inzulinske rezistencije u skeletnim mišićima ljudi (PKC- δ i - β II) (29) i glodavaca (PKC- θ)

(22, 30). PKC- ϵ je dovedena u vezu s jetrenom steatozom (20), dok je PKC- δ identificirana kao potencijalni medijator jetrene inzulinske rezisencije uzrokovane jetrenom steatozom (31).

2. CILJ DISERTACIJE

Mehanizam kojim nakupljanje masti u jetri dovodi do jetrene inzulinske rezistencije nije poznat. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati učinak nakupljanja slobodnih masnih kiselina na početni stanični odgovor na inzulin u jetrenim stanicama te ulogu PKC kinaze u ovom procesu.

Hipoteza je bila da eksperimentalno izazvano nakupljanje lipida u jetrenim stanicama inhibira otvaranje ionskih kloridnih kanala i egzocitozu ovisnu o inzulinu te dovodi do inzulinske rezistencije, a da je ova inhibicija barem djelomično posljedica aktivacije protein kinaze C.

Specifični ciljevi istraživanja korišteni za potvrdu ove hipoteze bili su:

1. Validacija modela NAMBJ u kojem se amiodaronom uzrokuje nakupljanje masti u stanici;
2. Dokazati porast (ili smanjenje) udjela masnih kiselina u povećanju sadržaja lipida u staničnom modelu NAMBJ;
3. Potvrditi smanjenje metabolizma glukoze u staničnom modelu NAMBJ;
4. Dokazati smanjenje broja inzulinskih receptora u staničnom modelu NAMBJ;
5. Dokazati smanjenje egzocitoze vezikula s kloridnim kanalima u NAMBJ;
6. Potvrditi (smanjenje ili povećanje) aktivnosti PKC kinaze u staničnom modelu NAMBJ.

U istraživanjima jetrene steatoze i jetrene inzulinske rezistencije koriste se eksperimentalni modeli u kojima se potiče nakupljanje masti u stanicama. Model

korišten u ovom istraživanju zasniva se na osobini amiodarona da već nakon 24 sata izazove nakupljanje masti u staničnoj liniji hepatoma štakora (engl. rat hepatoma tissue culture, HTC) (32, 33).

HTC stanice su preko noći (~18 h) bile izložene djelovanju amiodarona što izaziva nakupljanje lipida (33, 34). Stanice tretirane amiodaronom usporedile su se s kontrolnim, netretiranim stanicama.

Cilj 1 i 2: Nakon ispiranja stanica izvanstaničnom tekućinom koja ne sadrži amiodaron, kontrolne i tretirane stanice su se podvrgle fluorescentnoj mikroskopiji pomoću Nile Red fluorescentne boje za mjerenje količine lipida u stanici. Za procjenu udjela masnih kiselina u povećanju količine lipida u jetrenim stanicama pratio se povećani izražaj (engl. overexpression) enzima karnitin-palmitoil transferaze 1a (CPT1a) primjenom tehnologije adenovirusa. CPT1a ima ključnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina u jetrenim stanicama jer prenosi masne kiseline iz citosola u mitohondrije.

Cilj 3: Promjena glukoznog metabolizma uzrokovana viškom lipida u jetrenim stanicama odredila se mjerenjem glukoze nastale iz laktata i piruvata u kontrolnim i eksperimentalnim stanicama tretiranim amiodaronom.

Cilj 4: Kako je vezanje inzulina za inzulinski receptor nužno za aktivaciju inzulinskog signalnog puta, istraženo je da li je inzulinska rezistencija uzrokovana smanjenjem broja inzulinskih receptora korištenjem Western blot tehnike.

Cilj 5. Početni odgovor jetrenih stanica na inzulin je posredovan egzocitozom posebne populacije vezikula koje sadrže kloridne kanale. Kako bi ispitali učinak inzulinske rezistencije na stanični odgovor, ispitana je egzocitoza

pomoću fluorescentne boje FM1-43 prije i nakon stimulacije stanica inzulinom. Promjene u površini stanica odredile su se mjerenjem kapacitivnosti stanične membrane prije i nakon izloženosti inzulinom metodom priklještenja napona. Promjene vodljivosti određene su mjerenjem ukupnih struja.

Cilj 6: Budući je inzulinska rezistencija u literaturi povezana s aktivacijom PKC, njena aktivnost je izmjerena nakon izlaganja stanica djelovanju amiodarona ili arahidonske kiseline pomoću fluorescentne boje fim-1. Učinak PKC aktivnosti na inzulinski odgovor, egzocitoza i vodljivost određeni su u stanicama nakon njihova izlaganja stimulatoru PKC (forbol 12-miristat 13-acetat, PMA) te inhibitoru PKC (chelerythrin).

3. TVORIVA I POSTUPCI

3.1. Priprema stanica

Svi su eksperimenti obavljani na HTC stanicama koje potječu od benignog tumora jetre (hepatoma) štakora. HTC stanice se koriste kao model transporta kloridnih iona na membranama hepatocita jer imaju kloridne kanale i signalne puteve analogne onima u primarnim hepatocitima (35, 36). Stanice se nanose na okrugla pokrovna stakalca unutar komora za snimanje te se pohranjuju u inkubatoru na 37°C u atmosferi s 5% CO₂ te 95% zraka. Za održavanje stanica je korišten stanični medij Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) nadopunjen s 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml penicilina te 100 µg/ml streptomicina.

3.2. Mjerenje unutarstanične masti

Unutarstanična količina masti u HTC stanicama je eksperimentalno povećana inkubacijom stanica preko noći s amiodaronom (50 µM, Sigma, St. Louis, MO, USA). Amiodaron je snažni inhibitor oksidacije masnih kiselina i izlučivanja lipoproteina iz stanice te dovodi do nakupljanja lipida u hepatocitima (32, 33). Količina masti je mjerena korištenjem fluorescentnog lipidnog markera Nile red. Nile red nije fluorescentan u otopini, ali postaje fluorescentan nakon vezanja za masne kiseline i triacilglicerole (37, 38). Posljedično, fluorescentni intenzitet Nile reda je direktno proporcionalan količini masti u citosolu. Za ove eksperimente stanice su prije eksperimenta inkubirane s 1 µM Nile red tijekom 2 h.

Fluorescencija je pobuđena ekscitacijskim filterom (vrhunac na 535 nm) te registrirana emisijskim filterom (vrhunac na 610 nm). Podaci iz različitih stanica su uspoređeni na slikama koje su snimane istim trajanjem izloženosti svjetlu od 25 ms. Sličan je postupak korišten za kvantifikaciju unutarstaničnih masti u drugim tipovima stanica (37, 39, 40).

3.3. Priprema adenovirusa i transdukcija

Adenovirusi koji su korišteni sadržavaju cDNA koja kodira β -galaktozidazu bakterije *Escherichia coli* (Adv- β gal) ili štakorski enzim CPT1a pod kontrolom ranog promotora citomegalovirusa. Virus i stanični lizati su pripremljeni pomoću humane embrionalne linije stanica bubrega 293A koje su služile kao domaćin (41). Adenovirusna transdukcija enzima CPT1a obavljena je 2 h nakon što su HTC stanice prionule za podlogu pokrovnih stakalaca u komorama za snimanje. Stanice su nakon toga inkubirane 90 min na 37°C u 0.75 ml DMEM medija koji je sadržavao 10^{10} čestica virusa. Medij je nakon toga odstranjen te su stanice isprane s fosfatnim puferom (PBS; engl. phosphate-buffered saline) prije nego im je dodan svježi DMEM. Odgovarajući titar Adv- β gal, pripremljen na isti način, korišten je za transdukciju kontrolnih stanica. Stanice su u obje grupe nakon toga inkubirane preko noći ~18 h kako bi se omogućila ekspresija proteina kodiranih virusom prije obavljanja mjerenja.

3.4. Otpuštanje glukoze

Petrijeve posude s HTC stanicama su isprane dvaput s fosfatnim puferom i DMEM-om koji je sadržavao 5 mM lakatata i 0.5 mM piruvata, bez glukoze. Inzulin je stavljan je u koncentraciji od 1 nM. Uzorci medija su uzeti nakon 0, 0.5, 1, 2, 3 i 4 h. Otpuštanje glukoze iz stanica mjereno je korištenjem kita HK-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.5. Western blot analiza

Stanice su triput isprane u hladnom fosfatnom puferu. Ukupni stanični lizati su pripremljeni od $\sim 10^7$ stanica tako što je dodano 0.5 ml pufera za disocijaciju (engl. lysis buffer) koji je sadržavao: 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 0.5% natrijev deoksikolat, 1% Triton x-100, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 60 mg/dl aprotinin, 10mg/dl leupeptin and 1 mg/dl pepstatin (pH 7.4). Lizati su centrifugirani na 4°C tijekom 10 min na 21 000 g kako bi se otklonile jezgre i stanični debris. Supernatant je sačuvan te iskorišten za Western blot analizu. SDS-PAGE i imunobloting su obavljani korištenjem minigelova. Proteini su preneseni prema prethodno opisanom protokolu (42) te obrađeni korištenjem pojačane kemiluminiscencije za detekciju (Amersham, Buckinghamshire, Velika Britanija) sa specifičnim antitijelima protiv inzulinskog receptora (Biosource, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) korištenjem 3% goveđeg serumskog albumina (BSA; engl. bovine serum albumine) u tris-puferu (TBS; engl. tris-buffered saline). Sva ispiranja su obavljena s 0.5% Tween/TBS u trajanju od 5 min. Autoradiogrami su

analizirani programom PhosphorImager (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

Detekcija traka i analiza obavljene su pomoću Kodak Image Station CF440 (Carestream Molecular Imaging, New Haven, CT, SAD). Koncentracija proteina određena je pomoću BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.6. Mjerenje egzocitoze

Egzocitoza je mjerena oslikavanjem u stvarnom vremenu (real time imaging) korištenjem fluorescentne boje FM1-43 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). FM1-43 se veže za membrane, ali ne prolazi kroz lipidni dvosloj. Boja nije fluorescentna u otopini već kad se veže za biološke membrane i tada se kvantni dobitak (engl. quantum yield) povećava otprilike 250 puta (43). Stoga je intenzitet fluorescencije direktno povezan s količinom membrane izložene djelovanju FM1-43. FM1-43 je dodan izvanstaničnoj otopini u koncentraciji od 4 μ M. U početku FM1-43 ulazi u vanjsku membranu izloženu izvanstaničnoj otopini. Kasnije, kad se vezikule spoje sa staničnom membranom, FM1-43 ulazi i u novi dio membrane što rezultira povećanjem mjerene fluorescencije. Ukupna promjena FM1-43 fluorescencije pruža mjeru ukupne egzocitoze u stvarnom vremenu. Fluorescencija boje FM1-43 je pobuđena ekscitacijskim filterom (vrhunac na 480 nm) te registrirana emisijskim filterom (vrhunac na 535 nm). Slike su snimane svakih 30 s korištenjem ekspozicije od 200 ms. Ova je metoda prethodno korištena za prikaz egzocitoze u drugim vrstama stanica (44).

3.7. Mjerenje $[Ca^{2+}]_i$

Unutarstanični $[Ca^{2+}]_i$ je mjeren fluorescentnom bojom Fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) koja je osjetljiva na Ca^{2+} (45). Fluo-3 AM je otopljena u dimetil sulfoksidu (DMSO) s jednakom količinom Pluronic F-127 (10% otopina u vodi). Stanice su se nakon toga inkubirale tijekom 30 min u Fluo-3 AM. Nakon ispiranja boje iz izvanstanične tekućine, Fluo-3 AM fluorescencija se pobudila ekscitacijskim filterom (vrhunac na 480 nm) te registrirana emisijskim filterom (vrhunac na 535 nm). Slike su snimane svakih 10 s korištenjem ekspozicije od 50 ms. $[Ca^{2+}]_i$ je određen korištenjem formule:

$$[Ca^{2+}]_i = F K_d / (F_{max} - F)$$

gdje je $K_d = 400$ nM (46). F je stanična Fluo-3 AM fluorescencija, a F_{max} je fluorescencija kod nivoa zasićenosti $[Ca^{2+}]_i$ koja se dobije na kraju svakog eksperimenta dodavanjem $5 \mu M$ ionomicina.

3.8. Detekcija PKC aktivnosti

Stimulacija PKC aktivnosti dovodi do njenog premještanja iz citosolskih odjeljaka u staničnu membranu (47). Razina PKC u staničnoj membrani HTC stanica mjerena je fluorescentnom bojom fim-1 AM. Fim-1 AM se veže za katalitičko vezno mjesto na različitim izoformama PKC te aktivacija kinaze povećava fluorescenciju stanične membrane (fluorescenciju ruba stanice) (48-50). Fim-1 AM je otopljen u DMSO i Pluronic F-127. Stanice su prije eksperimenata inkubirane s $20 \mu M$ fim-1 AM u trajanju od 30 min. Za kvantifikaciju PKC

aktivnosti izmjerena je fluorescentna aktivnost ruba oko stanične membrane širokog 1 μM . Preliminarna mjerenja ukupne stanične fluorescencije fim-1 AM te kvantitativni Western blot različitih PKC izoformi (podaci koji još nisu publicirani) ukazuju na to da se ekspresija PKC izoformi znatno razlikuje u različitim eksperimentalnim uvjetima. Stoga je, kako bi se izbjegle ove varijacije, fluorescencija staničnog ruba normalizirana prema ukupnoj staničnoj fluorescenciji. Kao kod fibroblasta, fim-1 AM oboji mitohondrije i u HTC stanicama (48) te su ove regije isključene iz mjerenja fluorescencije ruba. Fim-1 AM fluorescencija je pobuđena ekscitacijskim filterom (vrhunac na 480 nm) te registrirana emisijskim filterom (vrhunac na 535 nm). Slike su rađene s ekspozicijom od 1.5 s.

3.9. Oslikavanje i analiza

HTC stanice su se perfundirale u komoricama za snimanje brzinom koja dozvoljava potpunu izmjenu volumena komorice u ~ 1 min. Stanice su promatrane uz imerziju na povećanju od 60 x. Fluorescentne slike dobijene su korištenjem 12-bit SensicamQE kamere koju je kontrolirao program SlideBook 3.0 (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO, USA). Kvantitativna analiza fluorescentnih slika obavljena je na računalu korištenjem programa NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) i IgorPro3 (Wave Metrics, Lake Oswego, OR, USA). Ukupna stanična fluorescencija boja Nile red, FM1-43 te fim-1 AM mjerena je na regiji koja sadrži sliku stanice. Za oduzimanje vrijednosti pozadine mjerena je vrijednost fluorescencije u regiji slike koja nije

sadržavala stanice. Nakon oduzimanja vrijednosti pozadine, intenzitet fluorescencije boje FM1-43 je normaliziran prema vrijednostima neposredno nakon početka primjene boje. Za Nile red eksperimente, intenzitet fluorescencije je izražen relativno u odnosu na vrijednosti iz kontrolnih stanica.

3.10. Mjerenja vodljivosti (engl. conductance) i struje (engl. current)

Vodljivost stanične membrane mjerena je u whole-cell konfiguraciji korištenjem patch clamp tehnike. Voltage clamp na stanicama je podešen na 40 mV te je vodljivost membrane određena svakih 3 s primjenom voltažnih pulseva od 4 ms. Strujni je odgovor korišten za određivanje vodljivosti i kapacitivnosti. Za usporedbu vodljivosti izazvane inzulinom u različitim stanicama, vodljivost je normalizirana na početnu kapacitivnost (engl. capacitance) kojom se mjeri površina stanica te je izražena u pS/pF.

Whole-cell struje koje su nastale kao odgovor na stimulaciju inzulinom mjerene su nakon kompenzacije za kapacitivnost stanice i otpor pipete. Whole-cell struje kao odgovor na voltažne pulseve (0.5 s trajanje) filtrirane su pomoću Bessel filtera te su uzorci uzimani svako 0.5 s. Kako bi se odredio reverzni potencijal, korišten je linearni porast voltaže od -90 mV do 90 mV (trajanje 0.2 s).

3.11. Otopine

Svi su eksperimenti obavljani nakon ispiranja staničnog medija s umjetnom izvanstaničnom tekućinom koja nije sadržavala amiodaron. Ova otopina sadrži: 142 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM D-

glukoze, 10 mM Hepes/NaOH. Za patch clamp snimanja stanice su dijalizirane s otopinom koja sadrži: 130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ te 10 mM Hepes/NaOH (slobodni [Ca²⁺] ~ 0.1 μM). Za povećanje unutarstanične koncentracije masnih kiselina u određenim je eksperimentima u pipetnu otopinu nadodana arahidonska kiselina (15 μM). pH svih otopina je bio 7.25. Osmolalnost izvanstanične otopine je bila 200 mOsm/kg, a osmolalnost pipetne otopine 270-275 mOsm/kg. Sve kemikalije kupljene su od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD).

3.12. Statistička analiza

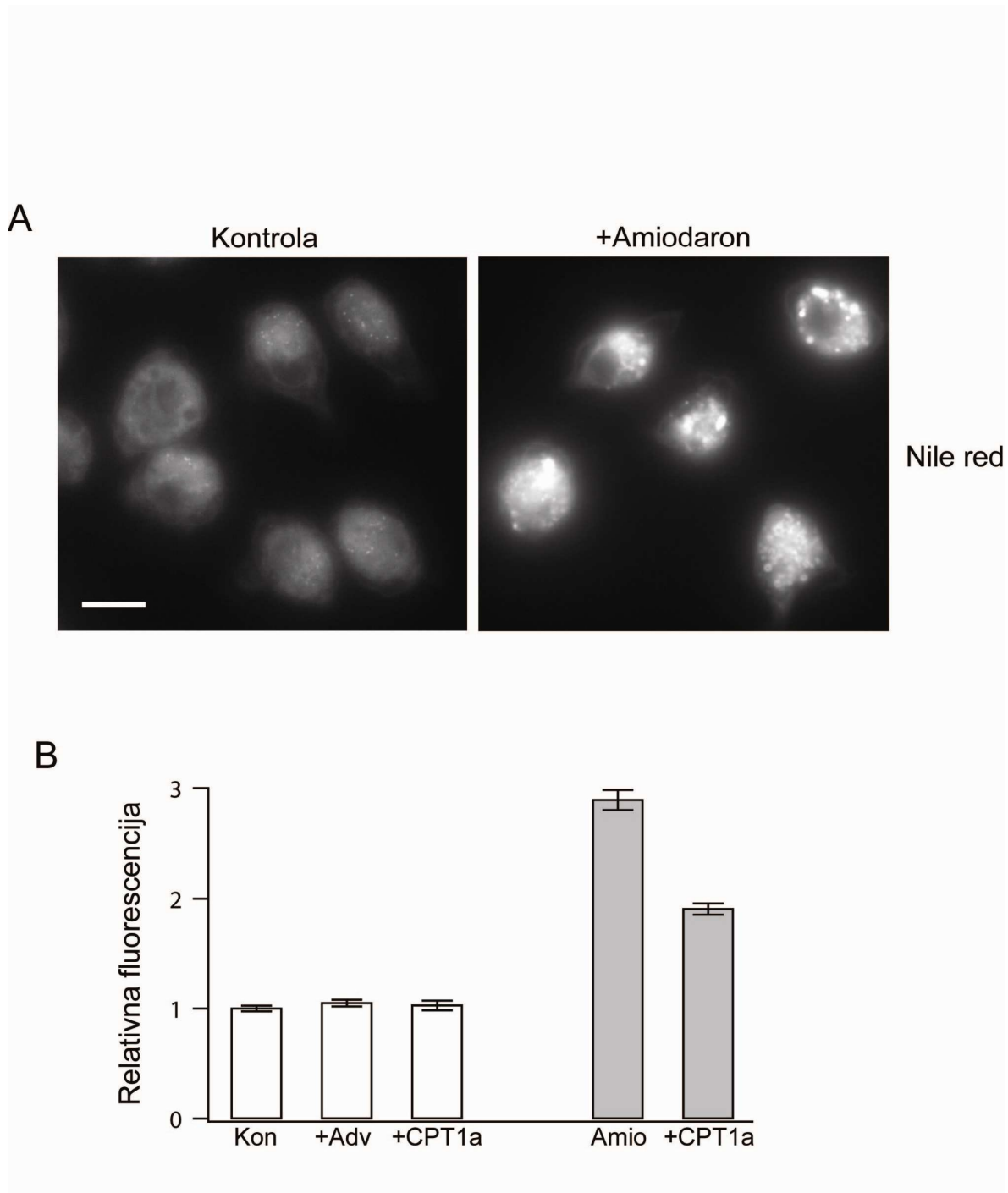
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna greška srednje vrijednosti (mean ± SEM). Rezultati su uspoređeni korištenjem Student t testa za sparene i nesporene podatke.

4. REZULTATI

Inzulinska rezistencija u jetri usko je povezana s nakupljanjem masti u hepatocitima. Kako bi se eksperimentalno povećala količina unutarstanične masti, HTC stanice su preko noći inkubirane s amiodaronom koji dovodi do masne bolesti jetre u miševa (33). Nakon ispiranja s izvanstaničnom tekućinom koja nije sadržavala amiodaron, količina lipida je mjerena pomoću fluorescentne boje Nile red. Reprezentativne slike kontrolnih HTC stanica te HTC stanica tretiranih amiodaronom prikazane su na slici 3A. Izlaganje stanica amiodaronu preko noći prosječno uzrokuje dvostruko povećanje količine unutarstaničnih lipida (Slika 3B). Kako bi se procjenio doprinos masnih kiselina ovom povećanju, karnitin palmitoil transferaza 1a (CPT1a) je pretjerano izražena (engl. overexpressed) u HTC stanicama korištenjem adenovirusne tehnologije (51). CPT1a igra glavnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina u jetrenim stanicama jer prenosi masne kiseline iz citosola u mitohondrije za daljnju razgradnju. Pretjerani izražaj CPT1a značajno smanjuje Nile red fluorescenciju stanica tretiranih s amiodaronom (Slika 3B), što potvrđuje da amiodaron povećava koncentraciju masnih kiselina u HTC stanicama.

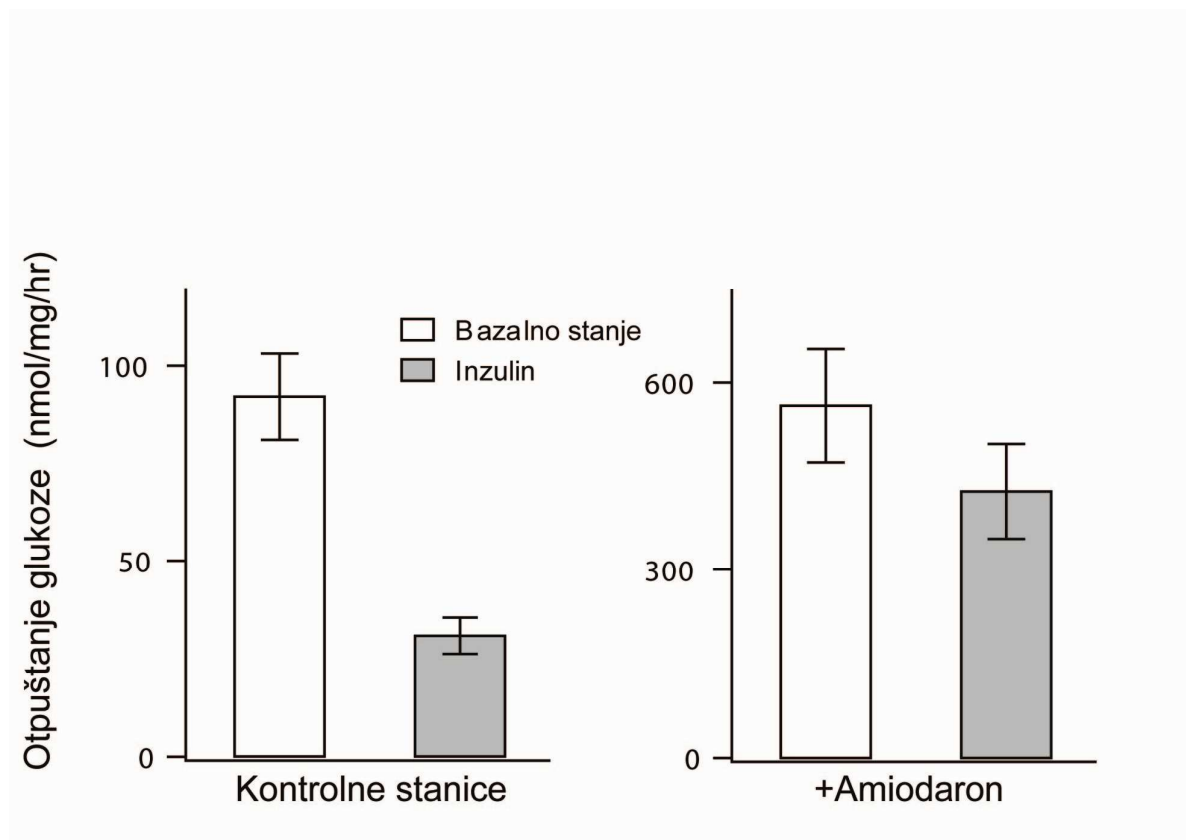
Jetrena inzulinska rezistencija je karakterizirana većom razinom konstitutivne proizvodnje glukoze i smanjenom sposobnošću inzulina da potisne glukoneogenezu (52). Kako bi se provjerilo mijenja li višak masnih kiselina metabolizam glukoze, proizvodnja glukoze iz laktata i piruvata je izmjerena u kontrolnim i amiodaronom tretiranim HTC stanicama.

Slika 3. Unutarstanično nakupljanje masnih kiselina. A) kontrolne stanice i stanice izložene amiodaronu (50 μ M preko noći). Ljestvica: 12 μ m. B) relativna Nile red fluorescencija u kontrolnim i eksperimentalnim stanicama.



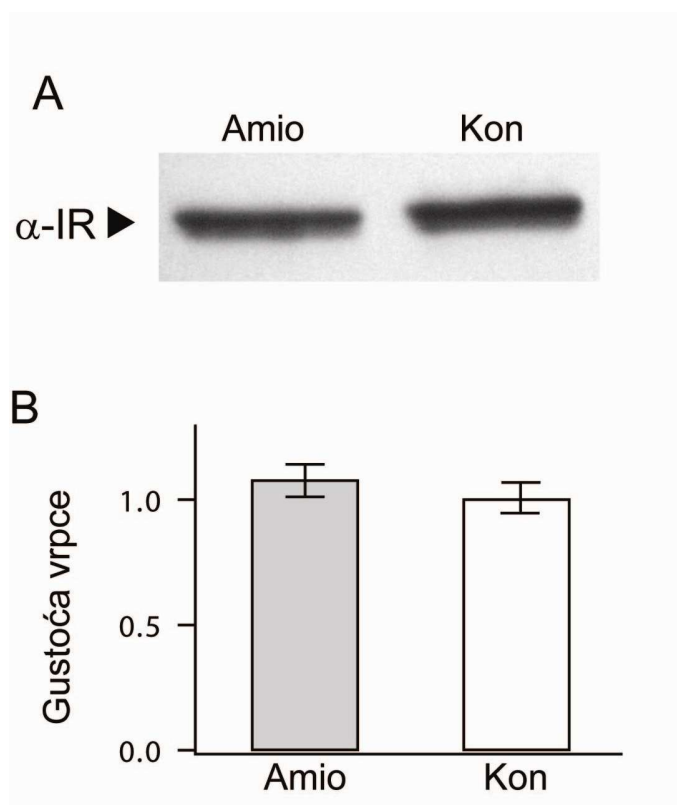
Podaci sažeti na slici 4 pokazuju kako amiodaronom tretirane stanice proizvode oko 6 puta više glukoze nego kontrolne stanice. Relativna sposobnost inzulina da potisne glukoneogenezu je bila značajno smanjena. Ovi podaci pokazuju kako amiodaronom tretirane HTC stanice razvijaju fenotip karakterističan za inzulinsku rezistenciju te predstavljaju stanični model s upadljivim defektom regulacije glukoneogeneze.

Slika 4. Inzulin i glukoneogeneza. HTC stanice su bile inkubirane 4 h u prisutnosti glukoneogenetskih substrata i bez glukoze. Inzulin (1 nM) je inhibirao glukoneogenezu u kontrolnim HTC stanicama za 70% ($p < 0.03$) te za 25% u stanicama izloženim amiodaronu ($p < 0.02$).



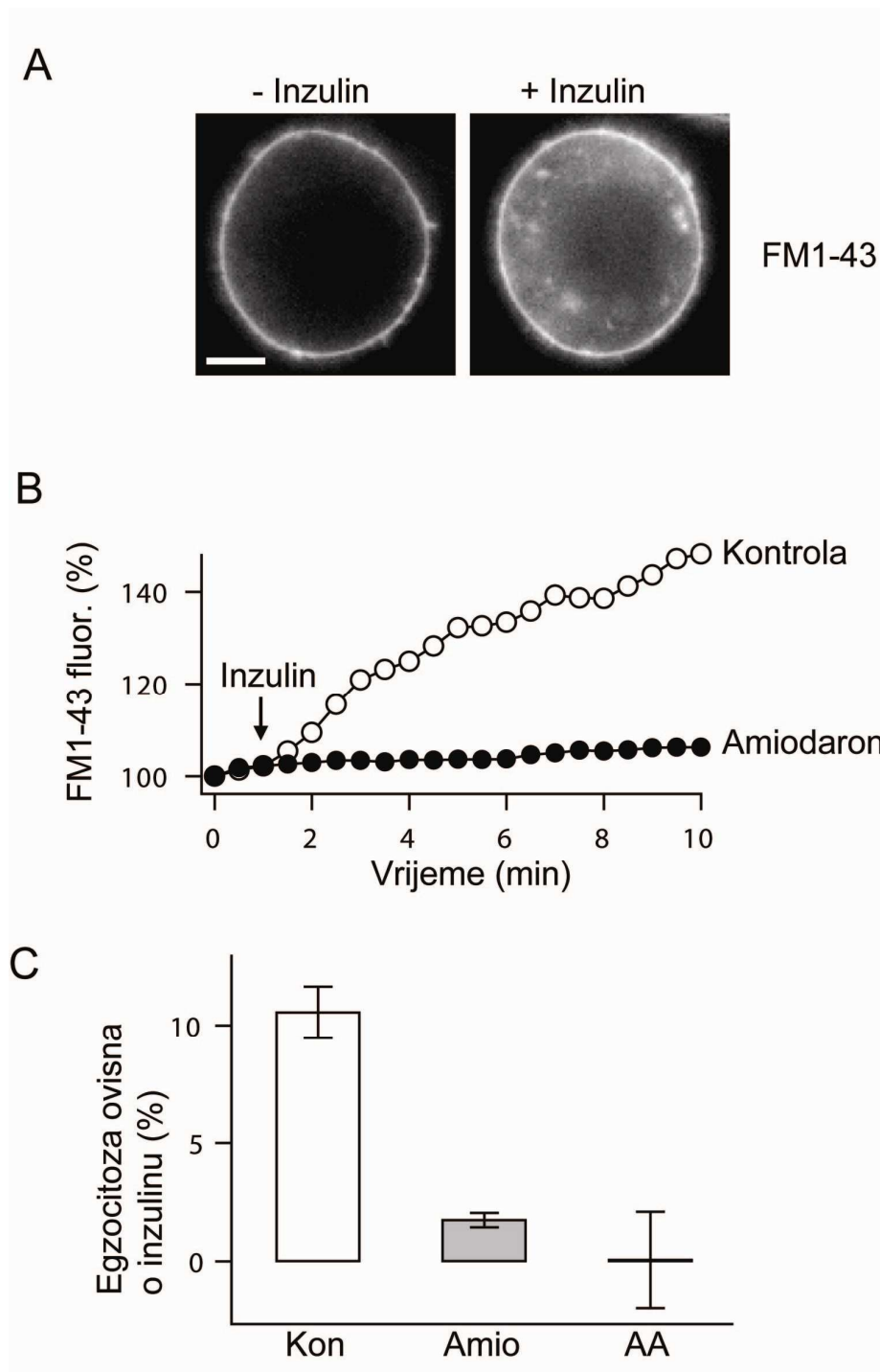
Vezivanje inzulina za α -podjedinicu inzulinskog receptora nužno je za aktivaciju inzulinskih signalnih puteva (16). Stoga je provjereno uzrokuje li inzulinska rezistencija smanjenje broja inzulinskih receptora. Na slici 5 prikazani su rezultati Western blot analize, dobijeni korištenjem specifičnih antitijela protiv α -podjedinice inzulinskog receptora, koji pokazuju kako amiodaronom tretirane HTC stanice imaju jednak broj inzulinskih receptora kao i kontrolne stanice.

Slika 5. Ekspresija inzulinskog receptora.



Početni odgovor HTC stanica na inzulin posredovan je egzocitozom osobite populacije vezikula koje sadrže Cl^- kanale u svojim membranama (24). Kako bi se vidjelo mijenja li inzulinska rezistencija ovaj odgovor na inzulin, egzocitoza i vodljivost (conductance) su mjerene u kontrolnim stanicama te nakon povećanja količine masnih kiselina. Egzocitoza je mjerena pomoću FM1-43, fluorescentne boje za prikaz stanične membrane (24, 53). U odsutnosti inzulina FM1-43 fluorescencija se postupno povećala zbog konstitutivne egzocitoze brzinom od $2.3 \pm 0.2 \text{ \%/min}$ (8 stanica) u kontrolnim, $1.2 \pm 0.2 \text{ \%/min}$ (10 stanica) u HTC stanicama tretiranim amiodaronom te $5.3 \pm 0.4 \text{ \%/min}$ (8 stanica) nakon izlaganja arahidonskoj kiselini. Reprezentativna mjerenja na slici 6A i B prikazuju kako inzulin brzo povećava FM1-43 fluorescenciju u kontrolnim stanicama za oko 10% unutar prvih nekoliko minuta nakon njegove akutne primjene. Prethodno je pokazano kako se egzocitoza ovisna o inzulinu razlikuje od konstitutivne egzocitoze. Membranska kapacitivnost (engl. capacitance) u HTC stanicama bila je $21.8 \pm 2.6 \text{ pF}$ (9 stanica) kad je mjerena u whole-cell konfiguraciji. Budući je kapacitivnost stanice direktno proporcionalna površini stanične membrane ($\sim 10 \text{ fF } \mu\text{M}^{-2}$) (54) te da postoji povezanost između kapacitivnosti i FM1-43 fluorescencije u HTC stanicama, što je pokazano u drugim vrstama stanica (53, 55), ovi rezultati ukazuju na to da inzulin stimulira umetanje oko 7000 posebnih vezikula ($0.1 \text{ } \mu\text{M}$ u promjeru) u staničnu membranu unutar nekoliko minuta nakon izlaganja inzulinu. Egzocitoza ovisna o inzulinu bila je značajno inhibirana u HTC stanicama tretiranim s amiodaronom (Slika 6B i C).

Slika 6. Inhibicija egzocitoze ovisne o inzulinu. A) fluorescentni prikaz stanice prije i nakon izlaganja inzulinu. B) i C) promjene FM-43 fluorescencije (egzocitoza) nakon stimulacije inzulinom.

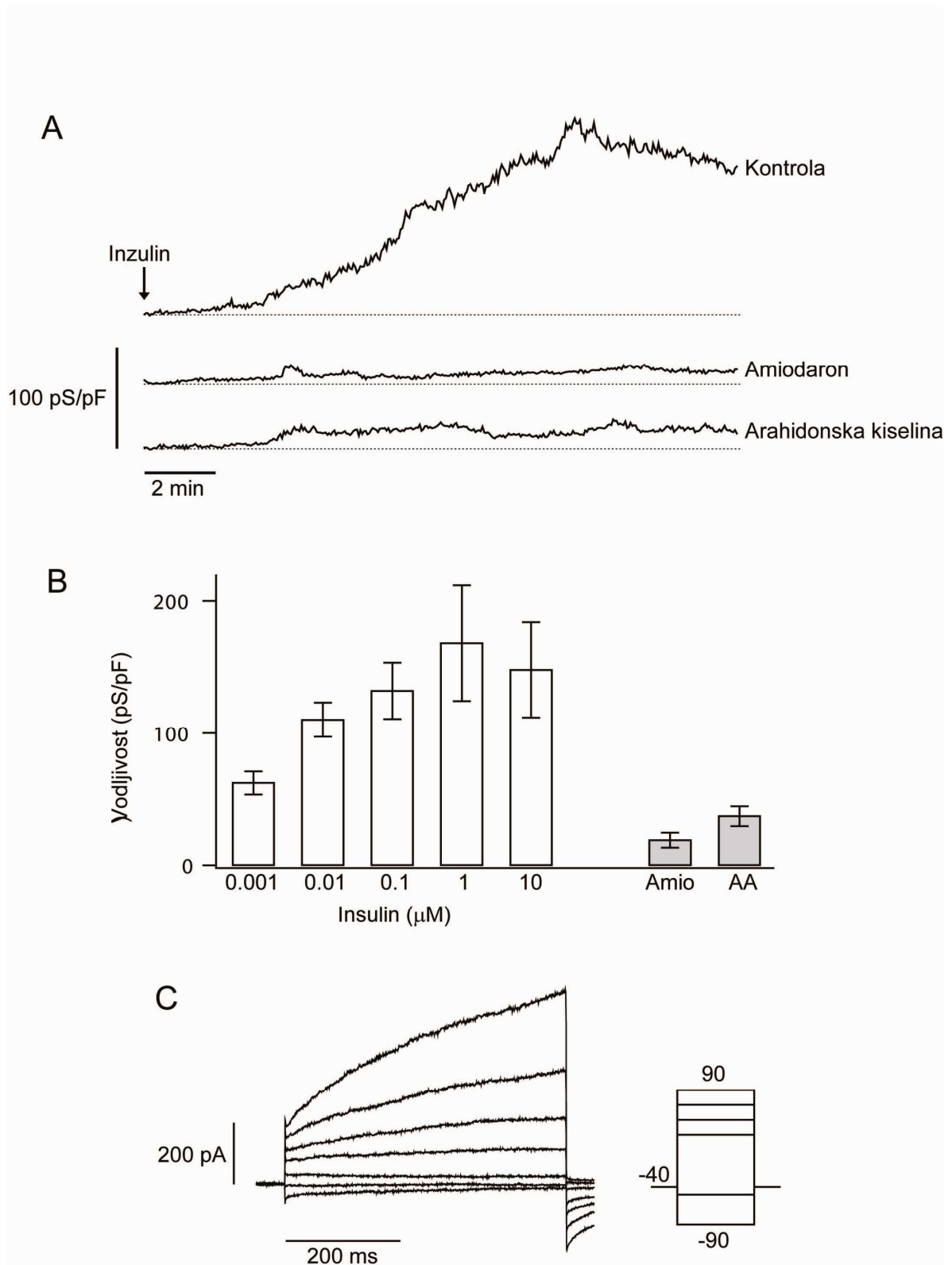


Slični su rezultati dobijeni i u kontrolnim stanicama nakon izlaganja arahidonskoj kiselini (15 μM , Slika 6C). Stoga se može zaključiti kako je inzulinska rezistencija u jetri povezana s egzocitoznim odgovorom na inzulin.

Za procijeniti je li odgovor vodljivosti na inzulin također inhibiran kod inzulinske rezistencije, vodljivost membrane je mjerena patch clamp tehnikom. Reprezentativna snimanja na slici 7A prikazuju kako inzulin aktivira vodljivost koja postupno dosegne vrhunac od ~10 min nakon izlaganja. Slično egzocitozi, inzulin aktivira vodljivost ovisno o dozi (1 nM do 10 μM , Slika 7B) pružajući daljnju potporu hipotezi da egzocitoza vezikula koje sadrže ionske kanale može utjecati na vodljivost (24). Vodljivost ovisna o inzulinu je bila inhibirana u stanicama tretiranim amiodaronom ($P < 0.02$) i nakon unutarstanične dijalize s arahidonskom kiselinom ($P < 0.05$) (Slika 7A i B). Stoga se može zaključiti kako je odgovor vodljivosti jetrenih stanica na inzulin potentno inhibiran kod inzulinske rezistencije.

Za detaljniju procjenu vodljivosti ovisne o inzulinu izmjeren je i reverzni potencijal (E_r) whole-cell struja tijekom odgovora na inzulin. E_r je bio 8.4 ± 0.8 mV (9 stanica). Ova je vrijednost vrlo blizu ravnotežnog potencijala Cl^- od -1 mV koji je izmjeren pomoću Nernstove jednadžbe te ukazuje na aktivaciju kloridnih kanala kako je prethodno opisano (24). Štoviše, whole-cell struje izazvane inzulinom pokazale su ispravljanje prema vani (engl. outward rectification) te sporu aktivaciju pri pozitivnim potencijalima održavanja (Slika 7C).

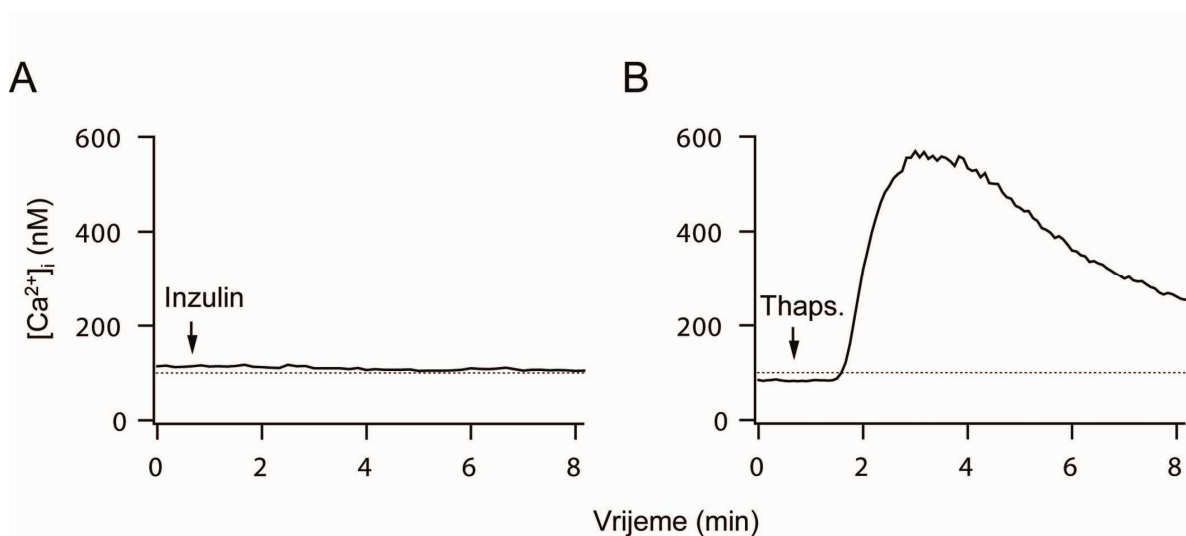
Slika 7. Inhibicija Cl⁻ vodljivosti ovisne o inzulinu.



Za procijeniti aktivira li inzulin Cl^- kanale, stanice su izložene neselektivnom blokatoru kloridnih kanala 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoična kiselina (NPPB). U prisutnosti $25 \mu\text{M}$ NPPB odgovor vodljivosti na inzulin smanjio se od $148 \pm 36 \text{ pS pF}^{-1}$ (9 stanica) na $41.0 \pm 4.3 \text{ pS pF}^{-1}$ (5 stanica). Ove biofizičke osobine su u suglasnosti s prethodnim rezultatima (24) te pokazuju da inzulin stimulira otvaranje posebne populacije Cl^- kanala u jetrenim stanicama.

Dokazano je kako whole-cell struje aktivirane inzulinom ili povećanjem unutarstaničnog $[\text{Ca}^{2+}]_i$ imaju iste osobine (24, 56). Stoga je istraženo povećava li inzulin razinu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pomoću fluorescentne boje fluo-3. Reprezentativna snimanja prikazana na slici 8 pokazuju kako inzulin nema nikakva učinka na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Za razliku od inzulina tapsigargin, koji aktivira slične Cl^- kanale u HTC stanicama (56) je izazvao veliko prolazno povećanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 8B). Stoga se može zaključiti kako aktivacija Cl^- kanala pomoću inzulina ne zahtijeva povećanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

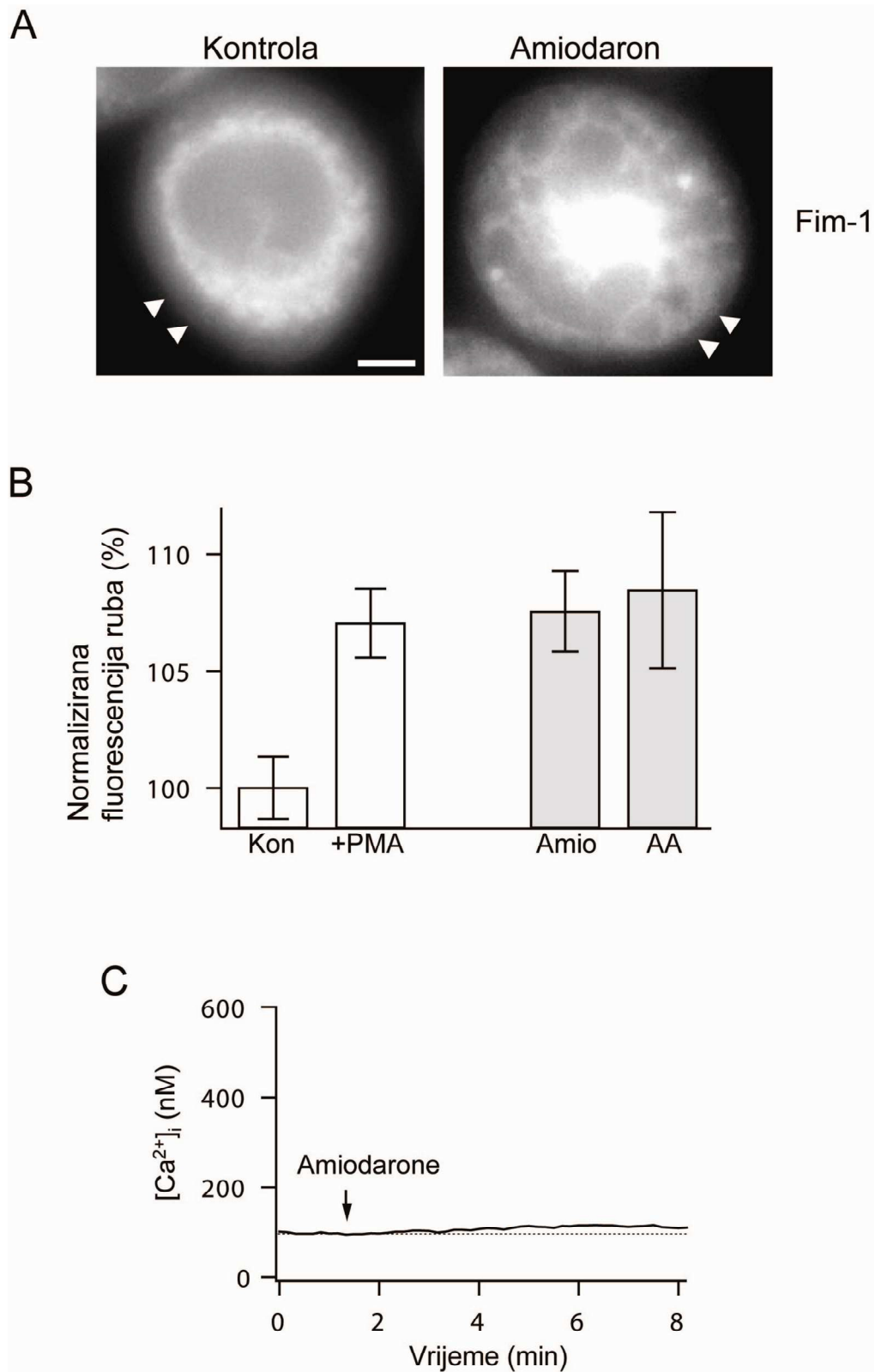
Slika 8. Inzulin i $[\text{Ca}^{2+}]_i$.



Inzulinska rezistencija u mišićnim stanicama povezana je s povećanjem PKC aktivnosti (15). Stoga je izmjerena aktivnost PKC nakon tretmana s amiodaronom i arahidonskom kiselinom korištenjem fluorescentne boje fim-1 (48). Fim-1 se veže za različite izoforme PKC i kad se PKC translocira iz stanične membrane nakon aktivacije, fluorescencija stanične membrane (staničnog ruba) se povećava (48, 49). Reprezentativne slike na slici 9A prikazuju područje oko stanične membrane (strelice) koja je svjetlija u stanicama tretiranim amiodaronom nego u kontrolnim stanicama. Kako bi se ispitalo hoće li fim-1 obojati PKC, HTC stanice su stimulirane s forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA; engl. phorbol 12-myristate 13-acetate). PMA je povećao fluorescenciju staničnog ruba (Slika 9B) čime je pokazano kako je fim-1 korisna boja za bilježenje aktivnosti PKC. Slični rezultati dobijeni su nakon tretiranja stanica s amiodaronom i arahidonskom kiselinom (Slika 9B), što pokazuje kako višak masnih kiselina u jetri potentno stimulira PKC aktivnost.

Prethodne studije u HTC stanicama pokazale su kako je aktivacija PKC usko povezana s povećanjem $[Ca^{2+}]_i$ (57). Stoga bi osim masnih kiselina i tretman amiodaronom mogao stimulirati PKC aktivnost povećanjem $[Ca^{2+}]_i$. Za ispitivanje ove mogućnosti $[Ca^{2+}]_i$ je izmjeren nakon akutnog izlaganja amiodaronu. Reprezentativna snimanja prikazana su na slici 9C.

Slika 9. Masne kiseline i PKC aktivnost.



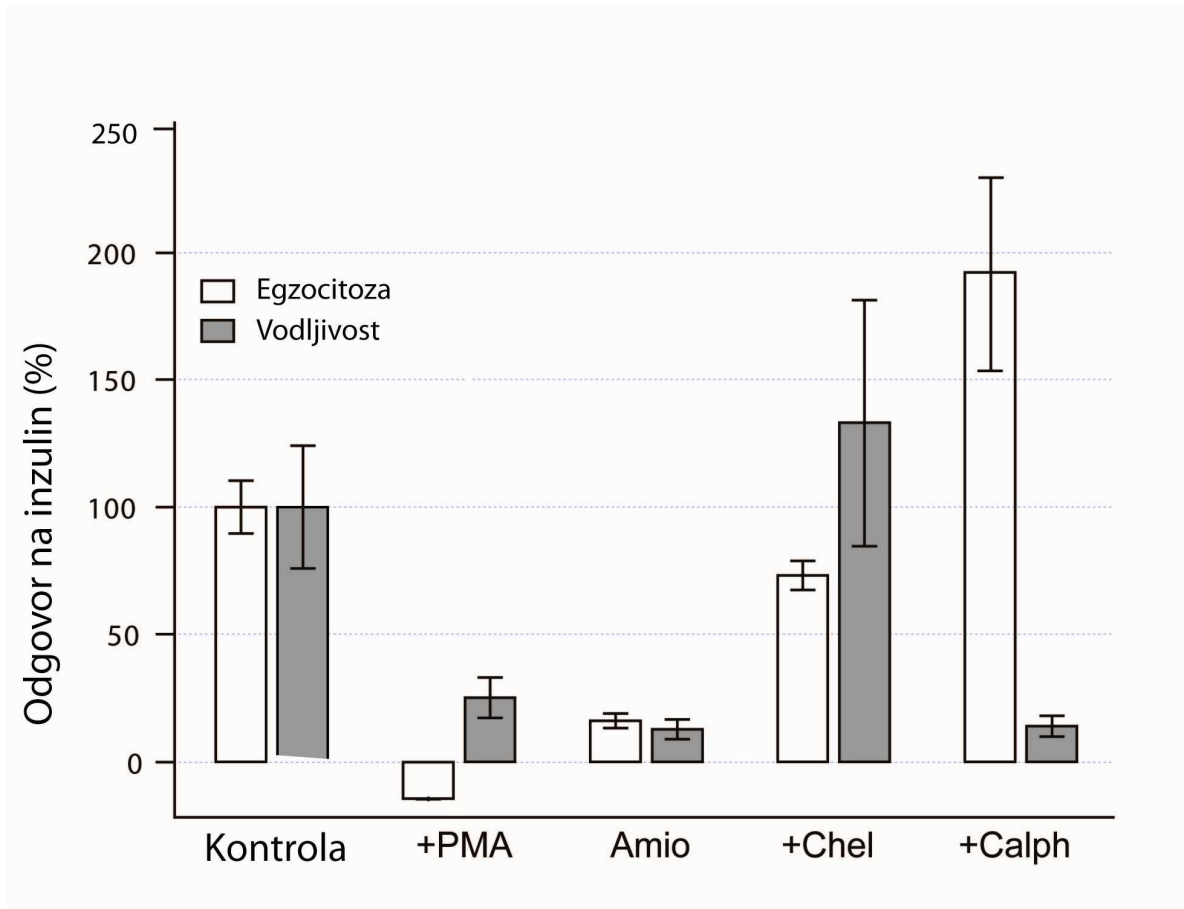
Podaci prikazani u tablici 1 pokazuju kako amiodaron stimulira samo malo povećanje $[Ca^{2+}]_i$ (~10 nM). Sukladno ovom nalazu, bazalna razina $[Ca^{2+}]_i$ u stanicama tretiranim amiodaronom nije se značajno razlikovala od one u kontrolnim stanicama (Tablica 1, $p > 0.25$). Stoga se zaključuje kako aktivacija PKC u amiodaronskim stanicama nije povezana s povećanjem $[Ca^{2+}]_i$.

Tablica 1. Učinak amiodarona na $[Ca^{2+}]_i$. Bazalni $[Ca^{2+}]_i$ je mjereno u HTC stanicama.

	Bazalni $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ (nM)
Kontrola	91.9 ± 4.9 (n = 19)	10.7 ± 0.9 (n = 16)
Stimulacija amiodaronom	94.4 ± 5.3 (n = 13)	—

Kako bi dokazali doprinosi li PKC aktivnost inhibiciji odgovora na inzulin, egzocitoza i vodljivost su izmjerene nakon manipulacije PKC aktivnosti. U prvoj skupini eksperimenata PKC je akutno stimulirana s PMA u kontrolnim stanicama. U bazalnim uvjetima PMA je povećao brzinu konstitutivne egzocitoze na $3.5 \pm 0.2 \text{ \%min}^{-1}$ (44 stanice), ali nije imao nikakav učinak na vodljivost ($17.9 \pm 2.0 \text{ pS pF}^{-1}$; 5 stanica). Stoga, PKC aktivacija sama po sebi ne stimulira ionske kanale u HTC stanicama. Izlaganje PMA značajno je inhibiralo odgovor na inzulin (Slika 10) ukazujući na to da PKC funkcionira kao inhibitor ovog odgovora.

Slika 10. Odgovori na inzulin i PKC aktivnost.



Ako je aktivacija PKC odgovorna za poremećene reakcije na inzulin tada je za očekivati da će inhibicija PKC aktivnosti u amiodaronskim stanicama popraviti odgovor na inzulin. Za testiranje ove hipoteze u drugoj skupini eksperimenata su odgovori na inzulin izmjereni u amiodaronskim stanicama nakon tretmana s PKC inhibitorima cheleritrin i kalfostin C. Podatci sažeti u Slici 10 pokazuju kako inhibicija PKC aktivnosti dovodi do djelomičnog ili potpunog oporavka egzocitoznog odgovora, ali ima varijabilan učinak na vodljivost. Cheleritrin je oporavio egzocitozu za ~75%, a vodljivost za ~130% u odnosu na kontrolne vrijednosti. Kalfostin C je gotovo udvostručio odgovor egzocitoze, ali nije imao nikakav učinak na vodljivost. Ovi rezultati pokazuju da povećana PKC aktivnost kod inzulinske rezistencije može doprinijeti inhibiciji inzulinskog odgovora egzocitoze i vodljivosti.

Za procjenu uloge PKC u regulaciji otpuštanja glukoze, glukoneogeneza je izmjerena u kontrolnim i amiodaronskim stanicama nakon inhibicije PKC aktivnosti. U obje skupinama stanica cheleritrin (25 μ M, 30 min) je sam povećao otpuštanje glukoze za ~200 nmol mg⁻¹ h⁻¹ ($P < 0.003$). Štoviše, cheleritrin nije imao utjecaja na supresiju otpuštanja glukoze izazvanu inzulinom što bi moglo značiti da različiti mehanizmi mogu biti odgovorni za regulaciju glukoneogeneze i otvaranje Cl⁻ kanala posredovanjem PKC.

5. RASPRAVA

Ove studije podupiru hipotezu da nakupljanje masnih kiselina u jetri dovodi do razvoja inzulinske rezistencije te da su masne kiseline same za sebe sposobne inhibirati egzocitozu ovisnu o inzulinu te otvaranje Cl⁻ kanala putem stimulacije PKC aktivnosti.

Inkubiranje HTC stanica s amiodaronom preko noći značajno povećava količinu masnih kiselina u stanici te uzrokuje potentnu inhibiciju odgovora na inzulin u jetrenim stanicama. Ovi su učinci viđeni i u kontrolnim stanicama nakon što su izložene visokim koncentracijama arahidonske kiseline, masne kiseline koja se nalazi u ljudskom tijelu. Budući amiodaron nije bio prisutan u izvanstaničnoj tekućini tijekom eksperimenata, učinak amiodarona bi mogao biti posredovan masnim kiselinama. Najznačajnije je što je tretman s amiodaronom u HTC stanicama proizveo stanični fenotip inzulinske rezistencije. Inzulin normalno potiskuje glukoneogenezu, međutim taj je učinak u ovom modelu inzulinske rezistencije značajno smanjen. Ovi su rezultati u suglasnosti s prethodnim studijama te pokazuju kako bi nakupljanje masnih kiselina moglo biti rani poremećaj odgovoran za razvoj inzulinske rezistencije u jetrenim stanicama (23, 58-60). Treba imati na umu i da amiodaronski tretman kao model masne bolesti jetre i inzulinske rezistencije ima prednost što dozvoljava nakupljanje masti u izoliranim jetrenim stanicama bez izazivanja promjene hormona, metabolita ili drugih regulatornih čimbenika. Budući je vrlo složeno ispitivati inzulinsku rezistenciju *in vivo* zbog složenog sustavnog okoliša i povezanih promjena

cirkulirajućih hormona, amiodaronom tretirane stanice mogu biti korisne za proučavanje inzulinske rezistencije na jednoj jedinoj stanici.

Dokazano je kako inzulin stimulira otvaranje Cl^- kanala tako što potiče egzocitozu osobite skupine vezikula koje sadrže Cl^- kanale u svojim membranama (24). Otvaranje Cl^- kanala je direktno povezano s regulacijom staničnog metabolizma i rasta (26, 61, 62), a disfunkcija Cl^- kanala doprinosi nastanku niza bolesti. Stoga je atraktivna hipoteza prema kojoj poremećaj egzocitoze i o njoj ovisnog otvaranja Cl^- kanala mogu biti kritični događaji za razvoj inzulinske rezistencije u jetrenim stanicama. Rezultati su još uverljiviji kad se ima na umu da je nedavno dokazano kako se inzulinska aktivacija unosa glukoze u mišićne stanice odvija putem egzocitoze osobite skupine vezikula koje sadrže glukozne transportere GLUT4 (16). Poremećena egzocitoza vezikula koje sadrže GLUT4 doprinosi inhibiciji inzulinom posredovanog unosa glukoze te dovodi do inzulinske rezistencije u mišićnim stanicama (63). Iako mišićne i jetrene stanice imaju različite metaboličke funkcije, egzocitoza može biti zajednički mehanizam za ubacivanje transportnih proteina u stanična membranu nakon stimulacije inzulinom, u svrhu zadovoljavanja fizioloških potreba ovih tkiva.

Korištenjem fim-1 pokazano je kako je PKC aktivnost potentno stimulirana nakon tretiranja stanica s amiodaronom ili arahidonskom kiselinom. Ovi su rezultati sukladni s drugim studijama koje su dokazale povezanost između masne bolesti jetre i PKC u različitim modelima inzulinske rezistencije. Primjerice, nekoliko PKC izoformi je stimulirano u jetri pacijenata s dijabetesom tipa II (64). Slični rezultati dobiveni su i u primarnim hepatocitima iz inzulina

rezistentnih štakora (30, 31, 65). Biokemijske su studije također dokazale kako su masne kiseline i njihovi metaboliti sposobni stimulirati PKC aktivnost (66, 67).

Ove studije pružaju dokaz da je stimulacija PKC aktivnosti direktno odgovorna za inhibiciju početnog staničnog odgovora na inzulin. Aktivacija PKC aktivnosti nakon akutnog izlaganja stanice djelovanju PMA, arahidonske kiseline ili amiodarona dovela je do potentne inhibicije egzocitoze i otvaranja kloridnih kanala. Inhibicija PKC aktivnosti pomoću chelitrina dovela je do djelomičnog ili potpunog oporavka inzulinskog odgovora u stanicama tretiranim s amiodaronom. Drugi PKC inhibitor, kalfostin C, je udvostručio egzocitozni odgovor, ali nije imao nikakav utjecaj na vodljivost. Ovo je iznenađujući rezultat. Suprotno od chelitrina koji se veže na katalitički dio PKC te sprječava prijenos fosfatnih skupina na ciljne proteine, kalfostin C se veže na regulatorni dio te sprječava premještanje PKC u stanična membranu. Budući je u ovim stanicama PKC u velikim količinama prisutna u membrani, očekivano je da kalfostin C neće imati nikakav efekt. Razlika između njegova utjecaja na egzocitozu i vodljivost ukazuje na to da bi ovi procesi mogli biti regulirani različitim mehanizmima. Međutim, mnoge biokemijski nepovezane manipulacije pokazale su efekt i na egzocitozu i na otvaranje kloridnih kanala. Ovi uključuju PKC aktivaciju (PMA, rezultati eksperimenata iz ove disertacije), inhibitore PI 3-kinaze (wortmannin, LY294002), disrupciju mikrotubulske aktivnosti (nocodazole) (24) te inhibitore tirozin kinaze (genistein; nepublicirani rezultati). Ovi rezultati ukazuju na druga moguća objašnjenja. Kalfostin C može djelovati preko mehanizama neovisnih o PKC (68) te regrutirati drugu skupinu vezikula koje mogu biti dio egzocitoznog odgovora na

inzulin. Ove vezikule mogu biti drugačije od onih koje sadrže kloridne kanale te u tom slučaju ne bi dovele do povećanja vodljivosti, kao što su ove studije pokazale.

Mjesta na koja PKC djeluje u jetrenim stanicama nisu poznata. Objavljeno je kako su Munc18 te SNAP25 uključeni u modulaciju egzocitoze putem PKC u neuroendokrinim stanicama (69, 70). Munc18 i ostali proteini esencijalni za egzocitozu pronađeni su i u hepatocitima (71). Međutim, za razliku od jetrenih stanica PKC potencira egzocitozu ovisnu o kalciju u neuroendokrinim stanicama (72, 73). Stoga nije jasno je li i na koji način su ovi proteini uključeni u egzocitozu koja nije ovisna o inzulinu. PKC također može inhibirati inzulinsku aktivnost tako da inaktivira β -podjedinicu inzulinskog receptora (IR- β) te inzulinski receptor substrat proteina (IRS) kao što je prethodno opisano (22, 74). Aktivacija ovih proteina pomoću inzulina je rani događaj potreban za stimulaciju inzulinskih signalnih puteva. Budući da PKC izoforme u principu mogu međudjelovati s mnogim različitim proteinima kako bi se regulirale različite stanične funkcije, stanični mehanizmi odgovorni za inhibiciju egzocitoze ovisne o inzulinu pomoću PKC trebaju biti detaljnije definirani.

Ako pretpostavimo da su ovi rezultati relevantni za odgovor jetrenih stanica na inzulin, dvije dodatne stvari treba uzeti u obzir. Prvo, HTC stanice izražavaju namanje 10 različitih PKC izoformi (Kilić Gordan; neobjavljeni rezultati). Točne izoforme koje mogu biti odgovorne za inhibiciju inzulinskog odgovora nisu poznate. Drugo, amiodaron se ovdje koristi kao farmakološko sredstvo za povećanje unutarstanične količine masti. Nije poznato na koji način

amiodaron mijenja metabolizam masnih kiselina. Studije na mišjim hepatocitima pokazuju kako amiodaron stimulira ekspresiju gena koji su direktno uključeni u metabolizam masti (75). Druge studije pokazuju kako amiodaron izaziva masnu bolest jetre tako što inhibira oksidaciju masnih kiselina te sekreciju lipoproteina (33). Stoga višestruki mehanizmi mogu biti odgovorni za djelovanje amiodarona. Zanimljivo je kako se amiodaron rutinski koristi kao antiaritmik u kliničkoj praksi te su stanični mehanizmi njegova djelovanja u srčanim stanicama dobro dokumentirani. Primjerice, amiodaron potentno inhibira ionske kanale u ventrikularnim miocitima (76). U endotelnim stanicama amiodaron uzrokuje vazodilataciju tako što trajno povišuje razinu $[Ca^{2+}]_i$ (77). Kako ne postoji dokaz za prisutnost kanala ovisnih o naponu u jetrenim stanicama (78) te amiodaron ne remeti homeostazu $[Ca^{2+}]_i$ (slika 7C, tablica 1), malo je vjerojatno da ovi mehanizmi uzrokuju efekt amiodarona u jetrenim stanicama.

6. ZAKLJUČCI

Ove studije pokazuju da unutarstanično nakupljanje masti dovodi do razvoja inzulinske rezistencije u jetrenim stanicama. Egzocitoza ovisna o inzulinu te otvaranje kloridnih kanala potentno su inhibirani u ovim uvjetima. Također je utvrđeno kako je stimulacija PKC aktivnosti direktno odgovorna za ovu inhibiciju. Stoga, PKC izoforme mogu biti potencijalni ciljevi za farmakološku modulaciju defektnog metabolizma u inzulinskoj rezistenciji preko djelovanja na egzocitozu te otvaranje kloridnih kanala.

7. SAŽETAK

U ovoj disertaciji opisani su stanični mehanizmi odgovornih za inhibiciju staničnih odgovora na inzulin u stanicama masne jetre.

Početni odgovor jetrenih stanica na inzulin posredovan je egzocitozom vezikula koje sadrže kloridne kanale te otvaranjem kloridnih kanala na staničnoj membrani. Unutarstanično nakupljanje masnih kiselina vodi do složenog poremećaja metabolizma i usko je povezano s inzulinskom rezistencijom. Nije poznato na koji način je aktivnost kloridnih kanala promijenjena kod inzulinske rezistencije te kojim mehanizmom.

Mi smo istražili učinak nakupljanja masnih kiselina na otvaranje kloridnih kanala u staničnoj liniji jetre (HTC stanice). Tretiranje amiodaronom preko noći povećalo je masni sadržaj stanice dvostruko te ubrzalo glukoneogenezu peterostruko. Sposobnost inzulina da potisne glukoneogenezu je bila značajno smanjena što ukazuje na to da liječenje amiodaronom uzrokuje inzulinsku rezistenciju. Western blot analiza pokazala je kako HTC stanice imaju isti broj inzulinskih receptora kao i kontrolne. Međutim, inzulin nije uspio u HTC stanicama aktivirati egzocitozu i otvaranje kloridnih kanala. Ovi su inhibitorni učinci zamijećeni i u kontrolnim stanicama nakon tretiranja s arahidonskom kiselinom. Daljnje studije su pokazale kako masne kiseline stimuliraju aktivnost PKC, a inhibicija PKC djelomično oporavlja egzocitozu i otvaranje kloridnih kanala u inzulin-rezistentnim stanicama. Aktivacija PKC pomoću PMA u kontrolnim stanicama potentno je inhibirala odgovor na inzulin.

Ovi rezultati pokazuju kako je stimulacija PKC aktivnosti u inzulinskoj rezistenciji odgovorna za inhibiciju staničnih odgovora na inzulin u jetrenoj stanici.

8. SUMMARY

In this dissertation cellular mechanisms responsible for inhibition of cellular responses to insulin in fatty liver cells are described.

The initial response of liver cells to insulin is mediated through exocytosis of Cl⁻ channel-containing vesicles and a subsequent opening of plasma membrane Cl⁻ channels. Intracellular accumulation of fatty acids leads to profound defects in metabolism, and is closely associated with insulin resistance. It is not known whether the activity of Cl⁻ channels is altered in insulin resistance and by which mechanisms.

We studied the effects of fatty acid accumulation on the Cl⁻ channel opening in a model liver cell line. Overnight treatment with amiodarone increased fat content by ~2 fold, and the rates of gluconeogenesis by ~5 fold. The ability of insulin to suppress gluconeogenesis was markedly reduced indicating that amiodarone treatment induces insulin resistance. Western blot analysis showed that these cells express the same number of insulin receptors as control cells. However, insulin failed to activate exocytosis and Cl⁻ channel opening. These inhibitory effects were mimicked in control cells by exposures to arachidonic acid. Further studies demonstrated that fatty acids stimulate the PKC activity, and inhibition of PKC partially restored exocytosis and Cl⁻ channel opening in insulin-resistant cells. Accordingly, activation of PKC with PMA in control cells potently inhibited the insulin responses.

These results suggest that stimulation of PKC activity in insulin resistance contributes to the inhibition of cellular responses to insulin in liver cells.

9. LITERATURA

1. Kahn, C.R. 1985. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 36:429-451.
2. Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846.
3. Decock, S., Verslype, C., and Fevery, J. 2007. Hepatitis C and insulin resistance: mutual interactions. A review. *Acta Clin Belg* 62:111-119.
4. Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., and Oh, B.J. 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55:434-438.
5. Grundy, S.M. 1999. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 83:25F-29F.
6. Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., and Clore, J.N. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192.
7. Schwarz, J.M., Linfoot, P., Dare, D., and Aghajanian, K. 2003. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77:43-50.
8. Park, J., Lemieux, S., Lewis, G.F., Kuksis, A., and Steiner, G. 1997. Chronic exogenous insulin and chronic carbohydrate supplementation

- increase de novo VLDL triglyceride fatty acid production in rats. *J Lipid Res* 38:2529-2536.
9. Charlton, M., Sreekumar, R., Rasmussen, D., Lindor, K., and Nair, K.S. 2002. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35:898-904.
 10. Contos, M.J., and Sanyal, A.J. 2002. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 9:37-51.
 11. Day, C.P., and James, O.F. 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845.
 12. Chavin, K.D., Yang, S., Lin, H.Z., Chatham, J., Chacko, V.P., Hoek, J.B., Walajtys-Rode, E., Rashid, A., Chen, C.H., Huang, C.C., et al. 1999. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 274:5692-5700.
 13. Cenni, V., Sirri, A., Riccio, M., Lattanzi, G., Santi, S., de Pol, A., Maraldi, N.M., and Marmioli, S. 2003. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. *Cell Mol Life Sci* 60:2710-2720.
 14. Tobe, K., Asai, S., Matuoka, K., Yamamoto, T., Chida, K., Kaburagi, Y., Akanuma, Y., Kuroki, T., Takenawa, T., Kimura, S., et al. 2003. Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling. *Genes Cells* 8:29-40.
 15. Shulman, G.I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176.

16. Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
17. Koteish, A., and Diehl, A.M. 2001. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21:89-104.
18. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., and Melchionda, N. 1999. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450-455.
19. Kraegen, E.W., Clark, P.W., Jenkins, A.B., Daley, E.A., Chisholm, D.J., and Storlien, L.H. 1991. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40:1397-1403.
20. Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and Shulman, G.I. 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279:32345-32353.
21. Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., et al. 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7522-7527.
22. Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. 2002. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277:50230-50236.

23. Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. 2000. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6:87-97.
24. Kilic, G., Doctor, R.B., and Fitz, J.G. 2001. Insulin stimulates membrane conductance in a liver cell line: evidence for insertion of ion channels through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 276:26762-26768.
25. Friedmann, N., and Dambach, G. 1980. Antagonistic effect of insulin on glucagon-evoked hyperpolarization. A correlation between changes in membrane potential and gluconeogenesis. *Biochim Biophys Acta* 596:180-185.
26. Li, X., and Weinman, S.A. 2002. Chloride channels and hepatocellular function: prospects for molecular identification. *Annu Rev Physiol* 64:609-633.
27. Boyer, J.L., Graf, J., and Meier, P.J. 1992. Hepatic transport systems regulating pHi, cell volume, and bile secretion. *Annu Rev Physiol* 54:415-438.
28. Nilius, B., and Droogmans, G. 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 177:119-147.
29. Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. 2002. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in

- diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51:2005-2011.
30. Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., and Shulman, G.I. 1999. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274.
 31. Lam, T.K., Yoshii, H., Haber, C.A., Bogdanovic, E., Lam, L., Fantus, I.G., and Giacca, A. 2002. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C- δ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E682-691.
 32. Fromenty, B., Fisch, C., Labbe, G., Degott, C., Deschamps, D., Berson, A., Letteron, P., and Pessayre, D. 1990. Amiodarone inhibits the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 255:1371-1376.
 33. Letteron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B., and Pessayre, D. 2003. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 38:133-140.
 34. Khan, S.H., and Sorof, S. 1994. Liver fatty acid-binding protein: specific mediator of the mitogenesis induced by two classes of carcinogenic peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:848-852.

35. Bodily, K., Wang, Y., Roman, R., Sostman, A., and Fitz, J.G. 1997. Characterization of a swelling-activated anion conductance in homozygous typing cell hepatoma cells. *Hepatology* 25:403-410.
36. Roman, R.M., and Fitz, J.G. 1999. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology* 116:964-979.
37. Greenspan, P., and Fowler, S.D. 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* 26:781-789.
38. Fowler, S.D., Brown, W.J., Warfel, J., and Greenspan, P. 1987. Use of Nile red for the rapid in situ quantitation of lipids on thin-layer chromatograms. *J Lipid Res* 28:1225-1232.
39. Ostermeyer, A.G., Paci, J.M., Zeng, Y., Lublin, D.M., Munro, S., and Brown, D.A. 2001. Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol* 152:1071-1078.
40. Al-Saffar, N.M., Titley, J.C., Robertson, D., Clarke, P.A., Jackson, L.E., Leach, M.O., and Ronen, S.M. 2002. Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br J Cancer* 86:963-970.
41. Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gomez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., and Newgard, C.B. 1994. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 43 Pt A:161-189.

42. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
43. Betz, W.J., Mao, F., and Smith, C.B. 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.
44. Cochilla, A.J., Angleson, J.K., and Betz, W.J. 1999. Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22:1-10.
45. Diaz, M.E., Trafford, A.W., and Eisner, D.A. 2001. The effects of exogenous calcium buffers on the systolic calcium transient in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 80:1915-1925.
46. Auld, A., Chen, J., Brereton, H.M., Wang, Y.J., Gregory, R.B., and Barritt, G.J. 2000. Store-operated Ca(2+) inflow in Reuber hepatoma cells is inhibited by voltage-operated Ca(2+) channel antagonists and, in contrast to freshly isolated hepatocytes, does not require a pertussis toxin-sensitive trimeric GTP-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1497:11-26.
47. Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353-2364.
48. Chen, C.S., and Poenie, M. 1993. New fluorescent probes for protein kinase C. Synthesis, characterization, and application. *J Biol Chem* 268:15812-15822.

49. Dupont, J.L., Janoshazi, A., Bellahcene, M., Mykita, S., and de Barry, J. 2000. Reversible protein kinase C activation in PC12 cells: effect of NGF treatment. *Eur J Neurosci* 12:215-226.
50. Ueda, N., Ikeda, K., Oshima, T., Adachi, M., Furukawa, M., and Takasaka, T. 1996. Subcellular distribution of protein kinase C in the living outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 94:24-30.
51. Perdomo, G., Commerford, S.R., Richard, A.M., Adams, S.H., Corkey, B.E., O'Doherty, R.M., and Brown, N.F. 2004. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem* 279:27177-27186.
52. DeFronzo, R.A. 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 131:281-303.
53. Smith, C.B., and Betz, W.J. 1996. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* 380:531-534.
54. Lindau, M., and Neher, E. 1988. Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* 411:137-146.
55. Kilic, G., Angleson, J.K., Cochilla, A.J., Nussinovitch, I., and Betz, W.J. 2001. Sustained stimulation of exocytosis triggers continuous membrane retrieval in rat pituitary somatotrophs. *J Physiol* 532:771-783.
56. Kilic, G., and Fitz, J.G. 2002. Heterotrimeric G-proteins activate Cl⁻ channels through stimulation of a cyclooxygenase-dependent pathway in a model liver cell line. *J Biol Chem* 277:11721-11727.

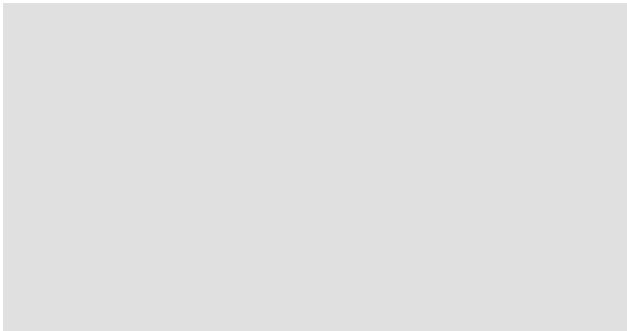
57. Roman, R.M., Bodily, K.O., Wang, Y., Raymond, J.R., and Fitz, J.G. 1998. Activation of protein kinase Calpha couples cell volume to membrane Cl⁻ permeability in HTC hepatoma and Mz-ChA-1 cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 28:1073-1080.
58. Roden, M., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. 2001. Nuclear magnetic resonance studies of hepatic glucose metabolism in humans. *Recent Prog Horm Res* 56:219-237.
59. Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292:1728-1731.
60. Pagliassotti, M.J., Prach, P.A., Koppenhafer, T.A., and Pan, D.A. 1996. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* 271:R1319-1326.
61. Wondergem, R., Gong, W., Monen, S.H., Dooley, S.N., Gonce, J.L., Conner, T.D., Houser, M., Ecay, T.W., and Ferslew, K.E. 2001. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J Physiol* 532:661-672.
62. Roman, R.M., Smith, R.L., Feranchak, A.P., Clayton, G.H., Doctor, R.B., and Fitz, J.G. 2001. CIC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G344-353.

63. Minokoshi, Y., Kahn, C.R., and Kahn, B.B. 2003. Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 278:33609-33612.
64. Considine, R.V., Nyce, M.R., Allen, L.E., Morales, L.M., Triester, S., Serrano, J., Colberg, J., Lanza-Jacoby, S., and Caro, J.F. 1995. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest* 95:2938-2944.
65. Karasik, A., Rothenberg, P.L., Yamada, K., White, M.F., and Kahn, C.R. 1990. Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosphorylation in liver of starved rats. *J Biol Chem* 265:10226-10231.
66. Khan, W.A., Blobe, G.C., and Hannun, Y.A. 1992. Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and physiologic membranes: requirement for free oleate. *J Biol Chem* 267:3605-3612.
67. Verkest, V., McArthur, M., and Hamilton, S. 1988. Fatty acid activation of protein kinase C: dependence on diacylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 152:825-829.
68. Zheng, X.L., Gui, Y., Du, G., Frohman, M.A., and Peng, D.Q. 2004. Calphostin-C induction of vascular smooth muscle cell apoptosis proceeds

- through phospholipase D and microtubule inhibition. *J Biol Chem* 279:7112-7118.
69. Barclay, J.W., Craig, T.J., Fisher, R.J., Ciuffo, L.F., Evans, G.J., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. 2003. Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem* 278:10538-10545.
 70. Nagy, G., Matti, U., Nehring, R.B., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J.B. 2002. Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. *J Neurosci* 22:9278-9286.
 71. Fujita, H., Tuma, P.L., Finnegan, C.M., Locco, L., and Hubbard, A.L. 1998. Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane. *Biochem J* 329 (Pt 3):527-538.
 72. Zhu, H., Hille, B., and Xu, T. 2002. Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17055-17059.
 73. Gillis, K.D., Mossner, R., and Neher, E. 1996. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* 16:1209-1220.
 74. Takayama, S., White, M.F., and Kahn, C.R. 1988. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 263:3440-3447.

75. McCarthy, T.C., Pollak, P.T., Hanniman, E.A., and Sinal, C.J. 2004. Disruption of hepatic lipid homeostasis in mice after amiodarone treatment is associated with peroxisome proliferator-activated receptor-alpha target gene activation. *J Pharmacol Exp Ther* 311:864-873.
76. Kodama, I., Kamiya, K., and Toyama, J. 1999. Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *Am J Cardiol* 84:20R-28R.
77. Grossmann, M., Dobrev, D., Himmel, H.M., and Kirch, W. 2000. Local venous response to N-desethylamiodarone in humans. *Clin Pharmacol Ther* 67:22-31.
78. Graf, J., and Haussinger, D. 1996. Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 24 Suppl 1:53-77.

10. ŽIVOTOPIS



Akadska titula:

2002. Doktor medicine.

Fakultetsko obrazovanje:

1996 – 2002. Medicinski fakultet u Splitu, Područni studij Sveučilišta u Zagrebu

Radno iskustvo:

2006 – Znanstveni novak,
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Splitu

2004 – 2006. Postdoctoral Research Fellow,
Department of Internal Medicine, University of
Texas Southwestern Medical Center at Dallas

2003 – 2004. Postdoctoral Research Fellow,
Department of Internal Medicine, University of
Colorado Health Sciences Center

Članstvo u udrugama i profesionalnim organizacijama:

2000 – 2002. Croatian Medical Students' International Committee (CroMSIC);

2004 – 2006. Postdoctoral Association of the University of Texas Southwestern
Medical Center;

2005 – 2006 American Association for Advancement of Science (AAAS);

2007 - Hrvatsko društvo za medicinu utemeljenu na dokazima;

2008 – International Association for the study of Pain

Ostale aktivnosti:

1997 – 1999. Demonstrator na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju pri Medicinskom fakultetu u Splitu

2000 – Recenzent za *Croatian Medical Journal* i *Medical Education*;

2000 – 2001. Međunarodni tajnik Studentskog zbora Sveučilišta u Splitu;

2001. Nacionalni koordinator za Central European Student Network (CSN);

2001. pokretač i voditelj studentskog projekta "Promocija darivanja organa i tkiva";

2001 – 2004. Urednica web portala www.medicina.hr;

2002. Osnivač i predsjednica studentske udruge Croatian Medical Students' International Committee (CroMSIC-Split);

2002. Znanstvena razmjena studenata u Nijmegenu, Nizozemska; istraživanje energetskog metabolizma kolorektalnog karcinoma na odjelu za staničnu biologiju u Nijmegen Center for Molecular Life Sciences;

2004 – 2007. Associate Editor for POSTDOCKET, newsletter of US-based National Postdoctoral Association;

2005. Osnivač i predsjednica udruge postdoktorskih znanstvenika pri University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas;

2006 – Voditeljica inicijative za osnivanje Cochrane centra u Hrvatskoj;

2007 – Zamjenica urednika Glasnika Medicinskog fakulteta u Splitu;

2007 – Administrator Tempus JEP projekta "Capacity Building for Research in Croatia".

Nagrade:

1997 – 2002. Stipendija "A" kategorije Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske za najbolje studente;

2005. Abstract of the year, American Association for the Study of Liver Diseases.

Publikacije i prezentacije na znanstvenim skupovima

Publikacije:

1. **Puljak L**, Parameswara V, Dolovcak S, Walrop SL, Emmett D, Esser V, Fitz JG, Kilic G. Evidence for AMPK-dependent regulation of exocytosis of lipoproteins in a model liver cell line. *Experimental Cell Research*. 2008. 314(10):2100-9.
2. **Puljak L**, Vukojevic K, Lovric Kojundzic S, Sapunar D. Assessing clinical and life sciences performance of research institutions in Split, Croatia, 2000-2006. *Croatian Medical Journal*. 2008. 49(2):164-74.
3. **Puljak L**, Sapunar D. Turning Croatian science into policy. *Croatian Medical Journal*. 2008. 49(2):155-7.
4. **Puljak L**, Lovric Kojundzic S, Sapunar D. Gender and academic medicine: A good pipeline of women graduates is not advancing. *Teaching and learning in medicine*. 2008. 20(3):273-8.
5. Emmett DS, Feranchak A, Kilic G, **Puljak L**, Miller B, Dolovcak S, McWilliams R, Doctor RB, Fitz JG. Characterization of ionotropic purinergic receptors in hepatocytes. *Hepatology*. 2008. 47(2); 698-705
6. **Puljak L**, Brnjas Kraljevic J, Barac Latas V, Sapunar D. Demographics and motives of medical school applicants in Croatia. *Medical Teacher*. 2007. 29(8); 227-34
7. **Puljak L**. An overlooked source of physician scientists. *Journal of Investigative Medicine*. 2007. 55(8); 402-5
8. **Puljak L**. Croatia founded a national body for ethics in science. *Science and Engineering Ethics*. 2007;13:191-193.
9. **Puljak L**, Kilic G. Emerging roles of chloride channels in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Apr;1762(4):404-13.
10. **Puljak L**, Pagliassotti MJ, Wei Y, Qadri I, Parameswara V, Esser V, Fitz JG, Kilic G. Inhibition of cellular responses to insulin in a rat liver cell line. A role for PKC in insulin resistance. *J Physiol*. 2005 Mar 1;563(Pt 2):471-82.

Poster prezentacije:

1. **Puljak L**, Lovric Kojundzic S, Sapunar D. Behavioral and morphological changes in rat DRG following lidocaine injection. 5th Croatian Congress of Pharmacology and 2nd Croatian Congress of Physiological Society. Osijek, September 2007. *Periodicum Biologorum*, Vol. 109, Suppl 2, 2007.
2. **Puljak L**, Lovric Kojundzic S, Sapunar D. Behavioral and morphological changes in rat DRG following lidocaine injection. 14th Young Neuroscientist Meeting, Trieste, Italy. May 31, 2007.
3. **Puljak L**, Parameswara V, Esser V, Kilic G. Metformin reverses NASH through vesicular exocytosis and AMPK. Marie Curie Workshop 2006 in Croatia and Serbia. Zagreb and Belgrade. 2006.
4. **Puljak L**, Parameswara V, Esser V, Kilic G. Metformin reverses fatty liver disease through stimulation of vesicular exocytosis. A role for AMPK.

- Postdoctoral Poster Session at The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas. December 5-7, 2005.
5. Emmett DS, Feranchak A, Kilic G, **Puljak L**, Miller B, Doctor RB, McWilliams R, Fitz JG. Identification and characterization of a novel population of P2X4 receptors in hepatocytes. *Hepatology*, Vol. 42, No. 4, Suppl. 1, 2005.
 6. Tomic S, Andelinovic S, **Puljak L**, Pesutic-Pisac V, Bezic J, Milostic K, Trgo G. Prognostic significance of lymphatic and blood vessel invasion by tumor cells in colorectal carcinoma. *Acta clin Croat* 2002; 41:135-186
Conference papers. 13th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology Zagreb, Croatia 7-8. svibnja 2002
 7. **Puljak L**. Medical students' project on organ donation. Taipei, Taiwan, 2002.
 8. **Puljak L**, Franicevic D. Raising awareness on organ donation and donor card. Treći hrvatski kirurški kongres, Pula, 15-18. 2002.