

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Darko N. Ćirić

**Uticaj metformina i simvastatina na
mitofagiju u hepatocitima miševa na
režimu ishrane sa visokim sadržajem
masti**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Darko N. Ćirić

**Effects of metformin and simvastatin on
mitophagy in the hepatocytes of mice
fed with a high fat diet**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR:

Prof. dr Tamara Kravić-Stevović

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Akademik Vladimir Bumbaširević

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vladimir Trajković

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miljan Krstić

Vanredni profesor Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Svojoj mentorki prof. dr Tamari Kravić-Stevović na ukazanom poverenju, velikoj podršci i pomoći u svim fazama izrade disertacije

Akademiku Vladimiru Bumbašireviću na podršci i pomoći pri pisanju teze

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću na pomoći u dizajnu eksperimenata i pri pisanju teze

Prof. dr Miljanu Kostiću na korisnim savetima pri pisanju disertacije

Tamari Martinović na dugogodišnjoj prijateljskoj saradnji, pomoći u eksperimentalnom radu i iskrenoj podršci pri pisanju disertacije

Maji Misirkić Marjanović i Ljubici Vučićević na pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim savetima pri pisanju disertacije

Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju Instituta za histologiju i embriologiju za pomoć prilikom obrade i slikanja uzoraka

Svim koleginicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove disertacije

Mojim roditeljima i supruzi koji su mi pružili bezgraničnu podršku i razumevanje prilikom izrade disertacije

Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti

REZIME

Uvod: Tip 2 dijabetes predstavlja veliki zdravstveni problem za ljudsko društvo. Ovoj bolesti često prethodi kliničko stanje koje se naziva metabolički sindrom. C57BL/6J miševi na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti (HFD) su dugo korišćen životinjski model za tip 2 dijabetes i metabolički sindrom. Nova saznanja o patogenezi insulinske rezistencije, koja je karakteristična za tip 2 dijabetes i metabolički sindrom, ukazala su na veliki značaj poremećaja u mitohondrijama. Čelije regulišu sadržaj i oblik mitohondrija mitohondrijalnom biogenezom, fisijom i fuzijom mitohondrija i uklanjanjem oštećenih mitohondrija mitofagijom, koja predstavlja jedan od oblika selektivne autofagije. Autofagija je ćelijski katabolički proces pomoću koga ćelije uklanjaju oštećene i/ili nepotrebne delove citoplazme, među njima i organele, uz pomoć lizozomalnih enzima. Mitofagija ima pretežno zaštitnu ulogu jer se ovim procesom mogu ukloniti oštećene i/ili nefunkcionalne mitohondrije koje bi mogle dovesti do povećane produkcije kiseoničkih slobodnih radikala i oštećenja ćelije. Metformin i statini su često korišćeni lekovi u dijabetesu tipa 2 i metaboličkom sindromu i za oba ova leka se zna da ispoljavaju direktan uticaj na mitohondrije. Jetra je organ u kome se odigrava najveći deo metabolizma, a obilje mitohondrija je čini očiglednim izborom za proučavanje ovih organela i efekata lekova na njihovo uklanjanje procesom mitofagije.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj ishrane sa visokim sadržajem masti na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa, kao i da se ispita uticaj metformina i simvastatina na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti.

Materijal i metode: Miševi soja C57BL/6J muškog pola bili su podeljeni u četiri grupe: grupa miševa na režimu ishrane HFD-om, metforminom tretirana grupa na režimu ishrane HFD-om, simvastatinom tretirana grupa na režimu ishrane HFD-om i

kontrolna grupa miševa iste starosti. Nakon što su miševi žrtvovani cervikalnom dislokacijom, uzorci jetre, ishijadičnog nerva i aorte su uzimani za morfološke i biohemijske analize. Tkiva su dalje analizirana metodama konvencionalne svetlosne i konfokalne mikroskopije, transmisijom elektronskom mikroskopijom (TEM), tehnikama imunoblota i kvantitativne analize iRNK (RT-qPCR). Strukture od interesa su morfometrijski obrađivane, a nivoi proteina i iRNK su kvantifikovani. Rezultati su potom obrađeni odgovarajućim statističkim metodama da bi se procenilo postojanje statistički značajnih razlika u ispitivanim parametrima.

Rezultati: Miševi iz svih grupa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti su na kraju eksperimenta imali veću telesnu masu od miševa na standardnom režimu ishrane. Miševi tretirani metforminom su imali manju telesnu masu od druge dve grupe HFD miševa na kraju eksperimenta. Rezultati oralnog testa tolerancije na glukozu su pokazali lošiju regulaciju nivoa glukoze kod netretiranih HFD miševa u poređenju sa kontrolnom grupom, i poboljšanje regulacije kod tretiranih HFD miševa koje je bilo izraženije kod tretmana metforminom. U jetrama netretiranih HFD miševa bile su vidljive histološke i ultrastrukturne promene konzistentne sa razvojem nealkoholnog steatohepatitisa, dok su miševi tretirani metforminom i simvastatinom imali nešto blaže promene koje su se ogledale u razvoju nealkoholne masne bolesti jetre. Hematoksilinom i eozinom obojeni uzorci ishijadičnih nerava, kao i aorti, kontrolne i drugih eksperimentalnih grupa imali su urednu strukturu i nisu se razlikovali u morfologiji. Broj mitofaga u jetri, detektovanih kao LC3/TOM20 kolokalizovana punkta na konfokalnom mikroskopu je bio veći kod HFD netretiranih miševa u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Tretman simvastatinom kod HFD miševa je smanjio broj mitofaga u jetri, dok tretman metforminom nije uticao na njihov broj. Broj autofagijskih vakuola u jetri, detektovanih kao LC3/p62 i LC3/LAMP1 kolokalizovana punkta na konfokalnom mikroskopu, kao i broj i zapreminski udeo autofagijskih vakuola u citoplazmi hepatocita detektovanih na TEM-u bio je veći kod HFD miševa u odnosu na kontrolnu grupu. Broj mitofaga u zidu aorte, detektovanih kao LC3/TOM20 kolokalizovana punkta na konfokalnom mikroskopu, je bio veći kod HFD netretiranih miševa u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Tretman simvastatinom kod HFD miševa je smanjio broj mitofaga u zidu aorte, za razliku od tretmana metforminom koji nije značajno uticao na broj mitofaga kod miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti. Na preparatima ishijadičnih

nerava nisu detektovana LC3/TOM20 kolokalizovana punkta, a detektovan je samo mali broj LC3/LAMP1, LC3/p62 i LC3/MPB kolokalizovanih punkta u svim eksperimentalnim grupama. Elektronsko mikroskopskom analizom hepatocita detektovan je veći zapreminski udeo lipidnih kapi u citoplazmi ovih ćelija kod HFD miševa u odnosu na kontrolnu grupu. Zapreminski udeo lipofaga u citoplazmi hepatocita detektovanih na TEM-u bio je veći kod HFD miševa tretiranih metforminom i simvastatinom u odnosu na kontrolne i netretirane HFD miševe. Nije bilo razlike u zapreminskom udelu mitohondrija detektovanih na TEM-u u citoplazmi hepatocita između eksperimentalnih grupa. Netretirani HFD miševi su imali veći broj ultrastrukturnih oštećenja mijelina u ishijadičnom nervu od kontrolnih miševa. U uzorcima ishijadičnih nerava HFD miševa tretiranih metforminom broj ultrastrukturnih oštećenja mijelina bio je veći u odnosu na netretirane HFD miševe, dok je broj ultrastrukturnih oštećenja mijelina kod HFD miševa tretiranih simvastatinom bio manji nego kod netretiranih HFD miševa. Nije bilo razlike u G-odnosu mijelinizovanih vlakana ishijadičnog nerva između ispitivanih grupa miševa. U uzorcima aorti u svim eksperimentalnim grupama nisu uočene značajnije ultrastrukturne promene. Transmissionom elektronskom mikroskopijom detektovano je prisustvo malog broja autofagijskih vakuola u preparatima ishijadičnih nerava i aorti. Imunoblotom je utvrđeno da je količina markera autofagijskih vezikula LC3-II u jetri netretiranih HFD miševa manja u poređenju sa jetrama kontrolnih miševa, a da je samo u jetrama metforminom tretiranih HFD miševa došlo do porasta nivoa LC3-II proteina u odnosu na netretiranu grupu HFD miševa. Takođe, imunoblotom je utvrđeno odsustvo razlike u količini autofagijskog supstrata p62 u jetri ispitivanih grupa miševa. Metodama RT-qPCR-a utvrđeno je da nije postojala razlika između ispitivanih grupa životinja u ekspresiji gena za regulatore autofagije ATG5, GABARAP, p62, ATG7, ATG12, BECN i ATG4b.

Zaključak: Povećanje broja mitofaga u hepatocitima svih grupa na HFD-u je verovatno povezano sa blokadom kasnih faza autofagije u ovim ćelijama. Sa izuzetkom miševa tretiranih metforminom, niži nivoi LC3-II proteina u grupama na HFD-u ukazuju na smanjenje u indukciji neselektivne autofagije. Smanjenje broja autofagijskih vakuola koje sadrže mitohondrije u grupi tretiranoj simvastatinom je verovatno povezano sa njegovim mitoprotektivnim efektima, a ne sa uklanjanjem bloka u kasnim fazama

autofagije. Potencijalni mitoprotektivni i neuroprotektivni efekti, kao i bolji histološki nalaz na jetri viđen kod tretmana simvastatinom mogli bi da dovedu do novih saznanja o dosada nepoznatim, korisnim efektima statina u dijabetesu tipa 2 i metaboličkom sindromu.

Ključne reči:

Miševi, HFD, autofagija, mitofagija, metformin, statin

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

Effects of metformin and simvastatin on mitophagy in the hepatocytes of mice fed with a high fat diet

ABSTRACT

Introduction: Type 2 diabetes represents a major health burden to the society and it is often preceded by a clinical condition referred to as metabolic syndrome. High fat diet (HFD) fed C57BL/6J mice are a long-used animal model for both the metabolic syndrome and type 2 diabetes. Novel insights into the pathogenesis of insulin resistance, a feature of both of the aforementioned conditions, placed increased significance on mitochondrial disturbances. Cells regulate mitochondrial content and shape by mitochondrial biogenesis, fission and fusion of mitochondria, and removal of damaged mitochondria by mitophagy, which represents one of the several selective forms of autophagy. Autophagy is a cellular catabolic process by which cells remove damaged and/or unnecessary parts of the cytoplasm, including organelles, with the participation of lysosomal enzymes. Mitophagy is generally considered to be cytoprotective, because damaged and/or dysfunctional mitochondria give rise to an excessive reactive oxygen species production, which may have deleterious consequences to the cells. Metformin and statins are frequently used drugs in type 2 diabetes and metabolic syndrome, and both drugs are known to exert direct effects on mitochondria. Liver is an organ where major part of metabolism takes place, and abundance of mitochondria makes it an obvious choice to study these organelles and the effects these drugs might have on the removal of mitochondria by mitophagy.

Aim: The aim of this study was to assess the effects of HFD feeding on the ultrastructural characteristics of subcellular structures, mitophagy and autophagy regulators expression in C57BL/6J mice liver, aorta and sciatic nerve and the effects of metformin and simvastatin on the aforementioned cellular elements and processes.

Material and methods: Male C57BL/6J mice were assigned to four groups: HFD fed, metformin treated HFD fed, simvastatin treated HFD fed and age matched control group. After the animals were sacrificed by cervical dislocation, samples of liver, aorta and sciatic nerve were collected for morphological and biochemical analysis. Tissues

were further analyzed by conventional light and confocal microscopy, transmission electron microscopy (TEM), immunoblot and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) techniques. Appropriate structures were morphometrically assessed and protein and mRNA levels were quantified. The results were then processed with appropriate statistical methods to assess for the existence of statistically significant differences in the examined parameters.

Results: All experimental groups of HFD mice had higher body mass than control group mice at the end of the experiment. Metformin treated mice had lower body mass than other two groups of HFD mice at the end of the experiment. Oral glucose tolerance test results showed worsening of blood glucose regulation in untreated HFD fed compared with the control group of mice, and improved regulation in treated HFD mice, more pronounced with metformin treatment. The livers of untreated HFD fed mice showed histological and ultrastructural alterations consistent with the development of non-alcoholic steatohepatitis, while both mice treated with metformin and simvastatin had somewhat milder liver changes reflected in the development of non-alcoholic fatty liver disease. Hematoxylin and eosin stained sciatic nerve and aortic specimens of control and other experimental groups were of regular structure and did not differ in morphology. The number of autophagic vacuoles containing mitochondria in the liver, detected as LC3/TOM20 colocalized puncta on confocal microscope, was higher in untreated HFD fed group of mice than in the control group. Simvastatin treatment of HFD mice reduced the number of autophagic vacuoles containing mitochondria in the liver, while metformin treatment had no effect in this regard. The number of autophagic vacuoles in the liver, detected as LC3/p62 and LC3/LAMP1 colocalized puncta on confocal microscope, and number and cytoplasmic volume fraction of autophagic vacuoles in hepatocytes detected on TEM were higher in HFD fed compared with control group. The number of autophagic vacuoles containing mitochondria in the aortic wall, detected as LC3/TOM20 colocalized puncta on confocal microscope, was higher in untreated HFD fed group of mice than in the control group. Simvastatin treatment of HFD mice reduced the number of autophagic vacuoles containing mitochondria in the aortic wall, while metformin treatment had no effect in this regard. In sciatic nerve specimens LC3/TOM20 colocalized puncta could not be detected, while there were only few LC3/LAMP1, LC3/p62 and LC3/MPB colocalized puncta in all of the examined

groups. Cytoplasmic volume fraction of lipid droplets in hepatocytes detected on TEM was higher in HFD fed compared with control group. Cytoplasmic volume fraction of autophagic vacuoles containing lipid droplets in hepatocytes detected on TEM was higher in metformin and simvastatin treated HFD fed compared with untreated HFD and the control group of mice. There was no difference in cytoplasmic volume fraction of mitochondria detected on TEM between experimental groups. Untreated HFD mice had larger number of ultrastructural myelin defects in sciatic nerves than the control mice. In sciatic nerve specimens of metformin treated HFD mice the number of ultrastructural myelin defects was higher compared with untreated HFD mice, while the number of ultrastructural myelin defects in simvastatin treated HFD mice group was lower than in untreated HFD mice group. There was no difference in G-ratio of myelinated sciatic nerve fibers between experimental groups of mice. Significant ultrastructural changes were not present in the aortic specimens of all experimental groups. There was only few autophagic vacuoles in sciatic nerve and aortic specimens detected with the use of TEM. The amount of LC3-II, a marker of autophagic vesicles, was lower in untreated HFD mice than in the control mice liver, and only in the liver of metformin treated HFD mice LC3-II was increased compared with the untreated HFD mice group, as determined by Western blot. Also, by Western blot, it was determined that there was no difference in the amount of autophagy substrate p62 in the liver of the examined mice groups. The amounts of mRNA for autophagy regulators ATG5, GABARAP, p62, ATG7, ATG12, BECN and ATG4b did not differ between the examined groups judging by RT-qPCR analysis.

Conclusion: An increase in the number of autophagic vacuoles containing mitochondria in hepatocytes of all HFD fed mice groups is probably related to the late stage autophagy blockade in these cells. Except in the metformin treated mice, lower LC3-II levels in HFD fed groups indicated a decrease in non-selective autophagy induction. Decrease of autophagic vacuoles containing mitochondria in simvastatin treated group is probably related to its mitoprotective effects, and not with an autophagy late stage blockade alleviation. Potential mitoprotective and neuroprotective effects, and less severe liver histological findings seen with the simvastatin treatment, might provide further insights into so far unknown beneficial effects of statins in type 2 diabetes and metabolic syndrome.

Keywords:

Mice, HFD, autophagy, mitophagy, metformin, statin

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metabolički sindrom i tip 2 Diabetes Mellitus	1
1.2. Životinjski eksperimentalni modeli	2
1.3. Autofagija	3
1.3.1. Autofagija u dijabetesu tipa 2	6
1.4. Mitofagija	7
1.4.1. Mitofagija u dijabetesu tipa 2	9
1.4.2. Detekcija mitofagije u tkivima	9
1.5. Terapija metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJAL I METODE	14
3.1. Eksperimentalne životinje	14
3.2. Priprema histoloških uzoraka	15
3.2.1. Uzimanje uzoraka	15
3.2.2. Obrada uzoraka za konvencionalnu svetlosnu mikroskopiju	15
3.2.3. Obrada uzoraka za konfokalnu mikroskopiju	15
3.2.4. Obrada uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju	16
3.3. Morfometrijska analiza na konfokalnom mikroskopu	17
3.4. Morfometrijska analiza na transmisionom elektronskom mikroskopu	18
3.5. Imunoblot analiza	20
3.6. Određivanje količine iRNK (RT-qPCR)	23
3.6.1. Izolacija RNK	23
3.6.2. Reverzna transkripcija (RT)	23
3.6.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja (qPCR)	24
3.7. Statistička analiza	24
3.8. Etički aspekti istraživanja	25
4. REZULTATI	26
4.1. Karakteristike životinja	26
4.2. Analiza uzoraka konvencionalnom svetlosnom mikroskopijom	27
4.3. Analiza uzoraka konfokalnom mikroskopijom	30
4.4. Analiza uzoraka transmisionom elektronskom mikroskopijom	41
4.5. Imunoblot analiza	50
4.6. Određivanje nivoa ekspresije gena	51
5. DISKUSIJA	52

6. ZAKLJUČCI.....	61
7. LITERATURA.....	62

1. UVOD

1.1. Metabolički sindrom i tip 2 Diabetes Mellitus

Poremećaji metabolizma pogađaju veliki deo svetske populacije. Neke procene govore da oko 25 procenata odraslih u svetu ima poremećaje karakteristične za metabolički sindrom.¹ Posebno su pogođene populacije u visoko razvijenim državama. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) broj obolelih iznosi i do 34%², a u Japanu čak 45% muškaraca i 38% žena ima metabolički sindrom³. Metabolički sindrom predstavlja skup poremećaja koji obuhvataju centralnu gojaznost, povišen arterijski krvni pritisak, poremećaje u metabolizmu triacilglicerola, holesterola i glukoze i rezistenciju perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija).¹ Trenutnoj epidemiološkoj situaciji najviše doprinosi moderan način života čiji je neizostavni deo nedovoljna fizička aktivnost i način ishrane koji nije prilagođen našem metabolizmu.⁴ Kvalitativno nepravilna ishrana, kao i preterani unos energije koji prevazilazi potrebe organizma doprinosi pojavi metaboličkog sindroma.⁴

Tip 2 dijabetes melitus (T2DM, dijabetes tipa 2) je metabolički poremećaj čije su glavne karakteristike povišene vrednosti glukoze u krvi, insulinska rezistencija i relativni (sa napredovanjem bolesti i apsolutni) deficit sekrecije insulina iz pankreasa.⁵ Od njega boluje blizu 400 miliona ljudi u svetu, a neke procene govore da će 2035. godine skoro 600 miliona ljudi imati tip 2 dijabetes melitus.⁶ Kriterijumi za dijagnozu obuhvataju koncentraciju glukoze u krvi naše veću od 7 mmol/L ili veću od 11,1 mmol/L dva sata nakon davanja glukoze prilikom izvođenja oralnog testa tolerancije glukoze (OGTT).⁷ Dijagnoza se takođe postavlja ako postoje simptomi tipični za T2DM uz koncentraciju glukoze u krvi koja povremeno prelazi 11,1 mmol/L ili ukoliko je nivo glikoziliranog hemoglobina (HbA_{1c}) veći od 6,5%.⁷ Komplikacije T2DM su odgovorne za smanjen kvalitet života i mortalitet od ove bolesti.⁸ One zahvataju brojne organske sisteme i obuhvataju dijabetičnu retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju, kardiovaskularne i cerebrovaskularne komplikacije, perifernu angiopatiju, poremećaje u motilitetu digestivne cevi, sklonost ka infekcijama, kožne promene i probleme sa sluhom.⁸

Mehanizmi nastanka ovih komplikacija su raznoliki ali često imaju za osnovu ishemiju tkiva koja se javlja u uznapredovalom dijabetesu.⁸ Metabolički sindrom često prethodi razvoju tip 2 dijabetesa, tako da kod pacijenata obolelih od ove bolesti vidimo i ostale prethodno pomenute poremećaje koji su karakteristični za metabolički sindrom.⁹

1.2. Životinjski eksperimentalni modeli

Zbog široke rasprostranjenost T2DM i metaboličkog sindroma neophodni su odgovarajući životinjski modeli na kojima je moguće ispitivati njihove uzroke, patogenezu i progresiju.¹⁰ Modeli u kojima se upotrebljavaju glodari (miševi i pacovi) se već dugi niz godina uspešno koriste za proučavanje ovih bolesti.¹⁰ Određeni modeli su adekvatniji ukoliko uspešnije reprodukuju sve promene koje se dešavaju kod ljudi što omogućava i ispitivanje i procenu uspešnosti različitih terapijskih pristupa.¹⁰ Ovi modeli se temelje na specifičnoj genetskoj osnovi eksperimentalnih životinja, na izazivanju oboljenja hemijskim sredstvima ili specifičnim načinom ishrane.¹⁰ Često se u istraživanjima koriste modeli koji se temelje na kvalitativno izmenjenoj ishrani, a jedan od takvih modela je i model koji je korišćen i u ovom istraživanju, miševi soja C57BL/6J muškog pola na režimu ishrane sa povećanim sadržajem masti.¹¹ Ovaj model je takođe pogodan za ispitivanje komplikacija dijabetesa, kao što su dijabetična neuropatija¹² i nefropatija¹³.

Kada je kvalitativno izmenjena ishrana u pitanju u upotrebi su modeli u kojima se upotrebljava hrana bogata fruktozom, hrana bogata saharozom, hrana sa visokim sadržajem masti (engl. *high fat diet*, HFD), hrana sa visokim sadržajem ugljenih hidrata i masti (engl. *high fat-high fructose diet*, HFF)¹⁰ i hrana sa visokim sadržajem masti i holesterola (engl. *high fat-high cholesterol diet*, HFC)¹⁴. Nisu svi sojevi glodara pogodni za upotrebu u ovakvim modelima. Osim kvalitativno izmenjene ishrane, glodari treba da poseduju odgovarajuću genetsku predispoziciju koja ih čini sklonim da razviju karakteristične osobine T2DM i/ili metaboličkog sindroma. Tako su C57BL/6J miševi, a ne na primer i A/J miševi, pogodni za ispitivanje T2DM.¹¹ U različitim istraživanjima u kojima su životinje bile na režimu ishrane sa HFD, procenat energije

poreklom od masti se kretao od 20 do 60%. Prvi simptomi bolesti su se u ovim istraživanjima javljali već posle 4 nedelje¹⁰, a u nekim eksperimentima ovakvi miševi su dobijali HFD i do 16 meseci¹⁵. Hrana sa visokim procentom masti, korišćena u različitim istraživanjima, imala je masnoće životinjskog (svinjska, goveđa mast) ili biljnog porekla (kokosovo ulje, maslinovo ulje).^{14,16} U našem istraživanju koristili smo hranu sa 60% kcal iz masti, porekla pretežno iz svinjske masti, u periodu od 6 meseci.

1.3. Autofagija

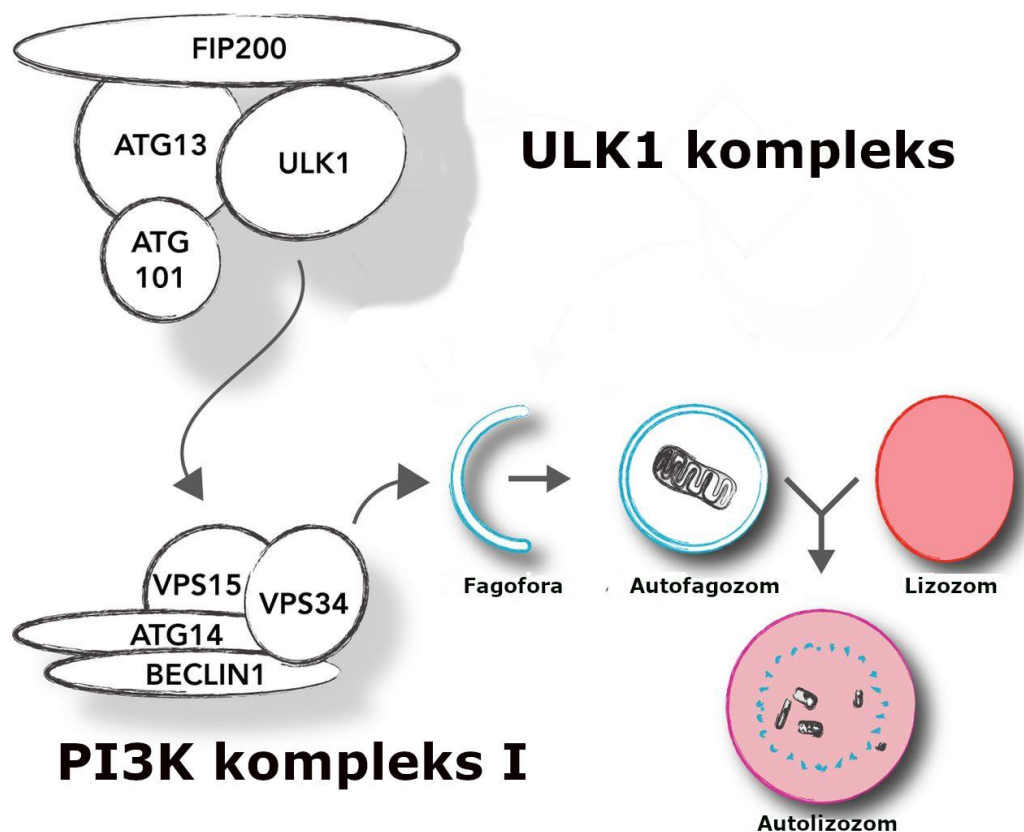
Autofagija je katabolički proces koji ćelije koriste za razgradnju delova sopstvene citoplazme pomoću lizosomalnih enzima.¹⁷ U zavisnosti od toga na koji način materijal za razgradnju dospeva u lumen lizozoma razlikujemo tri vrste autofagije: autofagiju posredovanu šaperonima (CMA, engl. *chaperon mediated autophagy*), mikroautofagiju (MI) i makroautofagiju.¹⁷ U autofagiji poredovanoj šaperonima u lumen lizozoma se unose određeni citosolni proteini koji u svom lancu aminokiselina poseduju specifičnu signalnu sekvencu.¹⁸ Citosolni šaperoni prepoznaju i odvijaju ove proteine, nakon čega dolazi do njihovog prelaska u lumen lizozoma pomoću proteinskih kompleksa na membrani lizozoma u čiji sastav ulaze LAMP-2a (engl. *lysosome associate membrane protein-2a*) transmembranski proteini.¹⁸ U mikroautofagiji, sadržaj se unosi u lumen lizozoma tako što se lizosomalna membrana deformiše i od nje se formiraju vezikularne ili tubularne strukture koje prominiraju u lizosomalni lumen sve dok se ne otkinu od membrane lizozoma.¹⁹ Proces je detaljno opisan kod gljivice *S. Cerevisiae*, ali još uvek nije poznato da li se odvija i kod sisara.²⁰ Međutim, poznato je da se u ćelijama sisara odvija tzv. endozomalna mikroautofagija (e-MI), kod koje se invaginacije membrane dešavaju na nivou endozoma^{21,22} i koja pokazuje određene sličnosti sa konvencionalnom mikroautofagijom. Makroautofagija (u daljem tekstu autofagija) je proces koji se na sličan način odvija u svim eukariotskim organizmima.²³ Prvi korak u autofagiji je obuhvatanje delova citoplazme dvomembranskom cisternom zvanom fagofora ili izolaciona membrana.^{23,24} Spajanjem slobodnih krajeva fagofore dolazi do potpunog odvajanja delova citoplazme, uključujući i organele, od ostatka ćelije dvostrukom membranom autofagozoma.^{23,24} Autofagozomi se potom spajaju sa endozomima i

lizozomima formirajući autolizozome u kojima se ćelijske strukture razlažu lizozomalnim enzimima.^{23,24} Autofagozome i autolizozome jednim imenom zvaćemo autofagijske vakuole (AV).

Proteini koji učestvuju u autofagiji su ostali dobro očuvani tokom evolucije što govori o velikom značaju koji ovaj proces ima za ćelije.²³ Većina proteina uključenih u proces autofagije kod nižih organizama ima svoje ortologe kod sisara.²³ Kod *S.Cerevisiae* proteini uključeni u autofagiju se nazivaju Atg (engl. *autophagy related*) proteini, a do sada ih je opisano više od 30.²⁵ Prvi ovakav protein za koga je utvrđeno da ima ulogu u autofagiji nosi oznaku Atg1^{26,27}, dok je najnoviji okarakterisan Atg36, koji ima ulogu u selektivnoj autofagiji peroksizoma²⁸. Ćelije aktiviraju autofagiju kada gladuju.²⁹ U toku gladovanja u ćeliji se razgrađuju komponente koje nisu neophodne za preživljavanje ćelija da bi se dobila energija i gradivni materijal za održavanje neophodnih struktura.²⁹ Ovakva autofagija se označava kao neselektivna (engl. *bulk*) autofagija.²⁹ Nasuprot njoj, oštećene ili iz drugog razloga nefunkcionalne strukture ćelije uklanjaju različitim oblicima selektivne autofagije.³⁰ Opisane su i proučavane selektivna autofagija agregata proteina (agrefagija)³¹, endoplazminog retikuluma (retikulofagija)³², mitohondrija (mitofagija)³³, ribozoma (ribofagija)³⁴, peroksizoma (peksofagija)³⁵, lipida (lipofagija)³⁶, delova nukleusa (nukleofagija)³² i intracelularnih patogena (ksenofagija)^{37,38}.

U autofagiji glavnu ulogu imaju dva makromolekularna kompleksa: ULK1 (engl. *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) kompleks³⁹ i fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K) kompleks I⁴⁰ (Slika 1.3.1). Delujući na njih, autofagiju u ćelijama sisara regulišu dve kinaze: mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*)¹⁷ i AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK)⁴¹. U prisustvu faktora rasta, koji preko signalnih puteva kao što su PI3KC1 (engl. *class I phosphatidylinositol 3-kinase*)-AKT/PKB (protein kinaza B)-TSC1/2 (engl. *tuberous sclerosis 1/2*)-RHEB (engl. *ras homolog enriched in brain*)⁴² ili RAS-RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*)-MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)-ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)-TSC1/2-RHEB (engl. *Ras homolog enriched in brain*)⁴³ aktiviraju mTOR, dolazi do inhibicije

autofagije tako što aktivirani mTOR fosforiliše i inaktivira kinazu ULK1¹⁷. Osim faktora rasta, aktivnost autofagije je regulisana i sensorima energetskeg statusa u ćeliji kao što je AMPK.⁴¹ AMPK pri sniženim nivoima ATP-a u ćeliji inaktivira mTOR.⁴¹ AMPK takođe direktno aktivira ULK1, tako sto je fosforiliše (na različitim mestima nego što to čini kinaza mTOR).⁴⁴ AMPK fosforiliše i BECLIN1 iz PI3K kompleksa I, kao i VPS34/PI3KC3 (engl. *class III phosphatidylinositol 3-kinase*) koji nije u sastavu PI3K kompleksa I u ćelijama, na taj način promovišući autofagiju.⁴⁵ ULK1 pak deluje ushodno i aktivira VPS34, ovog puta u PI3K kompleksu I, koji stvaranjem fosfatidilinositol-3-fosfata (PI3P) promovise nakupljanje drugih efektorskih proteina autofagije i formiranje autofagozoma.⁴⁶



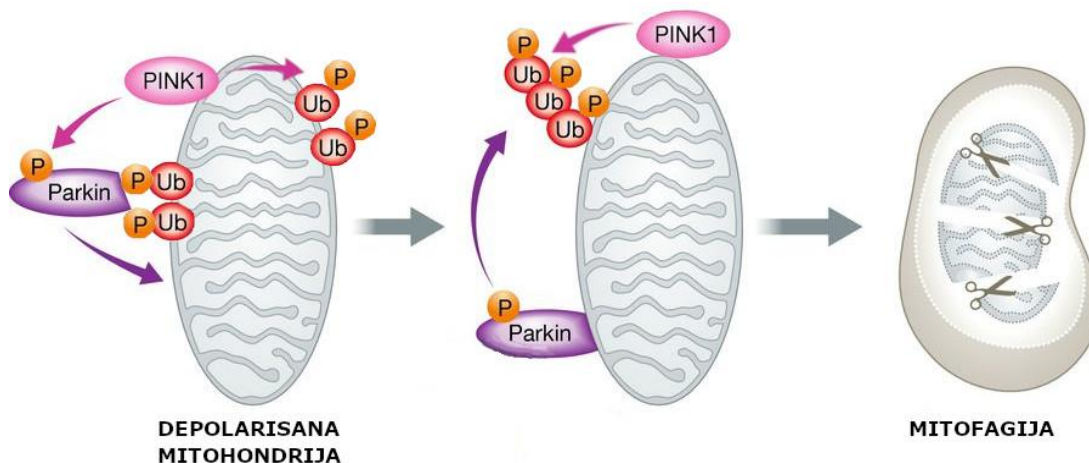
Slika 1.3.1 Komponente ULK1 kompleksa i PI3K kompleksa I. Modifikovano po M Zachari, 2017.

1.3.1. Autofagija u dijabetesu tipa 2

Pokazano je da su poremećaji u autofagiji prisutni u velikom broju različitih patoloških stanja.^{17,47} Autofagija ima značajnu ulogu u razvoju tumora⁴⁸⁻⁵¹, neurodegenerativnim⁵², kardiovaskularnim⁵³, autoimunim⁵⁴ i mnogim drugim bolestima. Poremećaji u autofagiji postoje i u dijabetesu tipa 2, a njihov značaj je usko vezan za određene vrste tkiva i organa.⁵⁵ Poremećaju u sekreciji insulina povezani su sa defektima autofagije u β -insulocitima Langerhansovih ostrvaca.⁵⁶ Autofagija u dijabetesu tipa 2 ima značajnu ulogu u insulin zavisnim tkivima kao što su jetra⁵⁷, belo masno tkivo⁵⁸ i skeletni mišići⁵⁹. Neki autori smatraju da povećanje koncentracije glukoze dovodi do povećane proizvodnje slobodnih radikala i prevazilaženja mogućnosti antioksidativnih mehanizama, što dovodi do oksidativnog i nitrozativnog stresa.^{60,61} Moguće je da su ove promene i uzrok, a ne posledica T2DM. Naime, primećeno je da dugotrajno povećanje koncentracije lipida u ćelijama i tkivima dovodi do insulinske rezistencije i kod ljudi i kod eksperimentalnih životinja (na HFD-u npr.) na taj način što remeti normalne metaboličke procese u mitohondrijama⁶²⁻⁶⁴ u kojima se onda pojačano stvaraju slobodni kiseonični radikali (ROI, engl. *reactive oxygen intermediates*)^{65,66}. Kod C57BL/6J miševa na HFD-u dolazi do poremećaja autofagije u jetri, najverovatnije usled povećane proizvodnje azot-monoksida (NO).⁶⁷ To dovodi do S-nitrolizacije proteina u jetri, uključujući i lizozomalne enzime, njihove disfunkcije i blokade završnih stadijuma autofagije.⁶⁷ Povećana produkcija NO i ROI može biti i posledica inflamacije⁶⁸, za koju je takođe, nezavisno od nalaza vezanih za autofagiju, pokazano da se odvija u jetri i drugim organima i kod eksperimentalnih životinja i kod pacijenata sa tip 2 dijabetesom⁶⁹. Ovakva blaga inflamacija je jedna od dobro proučenih karakteristika dijabetesa tipa 2, a smatra se da su za njenu pojavu u jetri odgovorne rezidentni makrofazi jetre, tzv. Kupferove ćelije.⁷⁰ U više različitih istraživanja primećene su promene u aktivacionom stanju i proizvodnji citokina u Kupferovim ćelijama.⁶⁹⁻⁷¹ Ranije je pokazano da je razvoj zapaljenskih promena u jetri kod miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti povezan sa aktivacijom Kupferovih ćelija.⁷⁰

1.4. Mitofagija

Ćelije koriste mitofagiju kada je potrebno da iz citoplazme uklone oštećene ili nefunkcionalne mitohondrije ili kada je prilikom diferencijacije potrebno smanjiti njihov broj kao npr. tokom eritropoeze.⁷² Oštećene ili nefunkcionalne mitohondrije gube membranski potencijal na svojoj unutrašnjoj membrani što dovodi do stabilizacije kinase PINK1 na spoljašnjoj membrani mitohondrija.⁷³ PINK1 fosforiliše ubikvitin na prethodno ubikvitinovanim mitohondrijalnim membranskim proteinima omogućavajući stabilizaciju PARKIN E3 ubikvitin ligaze na spoljašnjoj membrani mitohondrija.⁷⁴ PARKIN dodatno ubikvitinuje proteine spoljašnje mitohondrijalne membrane što putem pozitivne povratne sprege pojačava ceo ovaj proces (Slika 1.4.1).^{74,75} Za ubikvitinovane proteine se vezuju adaptorni proteini kao što je Sekvestozom-1/p62, koji u svojoj strukturi poseduju LIR domene (engl. *LC3 interacting region*) kojima se vezuju za proteine LC3 (engl. *microtubule-associated protein light chain 3*) familije na izolacionim mebranama.⁷⁶ Na taj način oni predstavljaju most između izolacione membrane i mitohondrije koju ona progresivno okružuje.⁷⁶



Slika 1.4.1 Mitofagija. UB – ubikvitin. P – fosfatna grupa. Modifikovano po I Dikic, 2014.

Mitofagija ima veliki značaj zato što su mitohondrije koje ne funkcionišu adekvatno izvor kiseoničkih slobodnih radikala koji imaju potencijal da oštete druge

komponente ćelije.⁷⁷ Smatra se da poremećaji u mitofagiji dovode do pojave različitih bolesti. Svoje ime PARKIN je dobio pošto je otkriveno da su poremećaji funkcije ovog proteina jedan od vodećih uzroka familijarne Parkinsonove bolesti.⁷⁸ Naknadno je utvrđeno da isto važi i za PINK1, a poremećaji u mitofagiji su dovedeni u vezu i sa sporadičnim oblicima ove bolesti.⁷⁸ Slobodni kiseonični radikali mogu da dovedu i do promena na genetskom materijalu ćelija, pa poremećaji u mitofagiji mogu da promovišu razvoj tumora.⁷⁷ Tumor supresorska uloga PARKIN-a je pokazana u tumorima dojke i ovarijuma⁷⁹, nesitnoćelijskom karcinomu pluća⁸⁰, kao i kod hepatocelularnog karcinoma^{81,82}. Pretpostavlja se da i u patogenezi kolorektalnog carcinoma Parkin gen učestvuje kao haploinsuficijentni tumor supresor.⁸³ Kontrola kvaliteta mitohondrija koju ćelja obezbeđuje mitofagijom ima ulogu i u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća⁸⁴ i idiopatske plućne fibroze^{84,85}, amiotrofične lateralne skleroze⁸⁶ i inflamatornih bolesti⁸⁷.

Pre nego što se mitohondrije nađu u lumenu autofagijskih vakuola dolazi do njihove deobe, jer se samo relativno male mitohondrije mogu efikasno obuhvatiti izolacionom membranom.^{88,89} Deobu, ili fisiju mitohondrija, promoviše ubikvitinacija i deaktivacija mitohondrijalnih membranskih proteina kao što su MFN1 i MFN2 (mitofuzin-1 i mitofuzin-2) koji pospešuju suprotan proces, fuziju mitohondrija.⁸⁸ Fuzija, fisija i mitohondrijalna biogeneza su uz mitofagiju procesi koji su odgovorni za kontrolu kvaliteta mitohondrija u ćelijama.⁹⁰ Mitofagijom se u ćelijama smanjuje mitohondrijalna masa, dok se mitohondrijalnom biogenezom mitohondrijalna masa povećava.⁹¹ Transkripcioni faktori koji regulišu mitohondrijalnu biogenezu su proteini koaktivatori PPAR- γ (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) transkripcionog faktora: PGC1 α (engl. *PPAR γ coactivator-1*), PGC1 β i PRC (engl. *PGC-1-related coactivator*).⁹² Smatra se da PGC1 β konstitutivno promoviše mitohondrijalnu biogenezu, a da PGC1 α aktivira transkripciju mitohondrijalnih gena u jedru ćelije u prisustvu određenih faktora sredine.⁹² Najmanje ima informacija o trećem članu familije, proteinu PRC, čija uloga je izgleda ograničena na regulaciju mitohondrijalne biogeneze kod proliferacije ćelija.⁹²

1.4.1. Mitofagija u dijabetesu tipa 2

Najnovija istraživanja su pokazala da je moguće da postoji suštinska povezanost tip 2 dijabetesa i mitofagije.^{93,94} Mitohondrije su mesto gde se odvija najveći deo oksidativnog metabolizma u ćeliji, a promene u raspoloživosti supstrata utiču i na promene u funkcionisanju mitohondrija.⁹⁵ Ovo je od značaja kako u smislu funkcionisanja eksperimentalnog modela koji je korišćen u ovim istraživanjima, tako i za opštu populaciju kod koje, kao što je rečeno na samom početku ove disertacije, promene u načinu ishrane predstavljaju jedan od najvažnijih uzroka povećanog oboljevanja od metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa.⁴

Smatra se da hronično povećani nivoi lipida u krvi i tkivima, kao što se može dogoditi kod ishrane bogate mastima, i kod ljudi i kod ekperimentalnih životinja dovode do pojave insulinske rezistencije usled poremećenih metaboličkih procesa u mitohondrijama, uključujući β -oksidaciju masnih kiselina.^{96,97} Ovo dovodi do promena u mitohondrijalnoj aktivnosti, mitohondrijanoj masi i kapacitetu mitohondrija za oksidativnu fosforilaciju.⁹⁶ Kod glodara visoki nivoi slobodnih masnih kiselina dovode do povećane ekspresije PGC1 α i mitohondrijalne mase.⁹⁶ Ovi efekti bi po nekim autorima mogli da prethode štetnom uticaju lipida na mitohondrije životinja hranjenih HFD-om.⁹⁶

1.4.2. Detekcija mitofagije u tkivima

Skeletni mišići, jetra i masno tkivo spadaju među najvažnija insulin zavisna tkiva. Skeletni mišići su odgovorni za najveći deo potrošnje glukoze posle obroka i za skoro svu uskladištenu glukozu tokom hiperinsulinemije.⁹⁶ Utvrđeno je da su u tip 2 dijabetesu masa mitohondrija i kapacitet za oksidativnu fosforilaciju u skeletnim mišićima smanjeni, ali da ne koreliraju sa stepenom insulinske rezistencije.⁹⁶ Jetra je glavni organ za endogenu proizvodnju glukoze i skladišti glukozu u obliku glikogena tokom obroka.⁹⁶ Insulinska rezistencije u jetri se ogleda u nemogućnosti jetre da smanji endogenu produkciju glukoze tokom hiperinsulinemije i povezana je sa količinom lipida

u citoplazmi hepatocita.⁹⁶ Kod pacijenata obolelih od metaboličkog sindroma i tip 2 dijabetesa, kao i kod eksperimentalnih životinja, javlja se nealkoholna bolest masne jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*; NAFLD).^{96,98} Ako je NAFLD praćena inflamacijom u jetri stanje se naziva nealkoholni steatohepatitis (eng. *nonalcoholic steatohepatitis*; NASH).⁹⁶ Smatra se da nakupljanje lipida u jetri remeti funkciju mitohondrija i dovodi do stvaranja slobodnih kiseoničkih radikala.⁹⁹ U belom masnom tkivu insulinska rezistencija se manifestuje kao nemogućnost insulina da spreči lipolizu, a primećeno je da kod dijabetesa tipa 2 dolazi do smanjenja mitohondrijalne mase u belim adipocitima.⁹⁶

Osim insulin zavisnih, druga tkiva koja su od značaja za proučavanje bioloških procesa u dijabetesu, uključujući mitofagiju, su ona tkiva u kojima se razvijaju komplikacije dijabetesa. Do sada su u istraživanjima bili obuhvaćeni pankreas¹⁰⁰, periferni nervi¹⁰¹, koža¹⁰², krvni sudovi¹⁰³, bubrezi¹⁰⁴ i druga tkiva¹⁰⁵. Izbor jetre kao primarnog predmeta proučavanja u ovoj disertaciji diktiran je kako prethodnim saznanjima koja su ukazivala da postoje određene promene u mitohondrijalnoj aktivnosti u tip 2 dijabetesu⁹⁶, tako i osobinom hepatocita da u svojoj citoplazmi poseduju veliki broj mitohondrija¹⁰⁶ što olakšava detekciju eventualnih promena u mitofagiji, ukoliko one postoje. Iako je fokus naših istraživanja bio na tkivu jetre, takođe smo ispitivali uzorke perifernih nerava i aorte, da bi smo dobili što kompletniju sliku efekata ispitivanih lekova u ovom eksperimentalnom modelu.

Proučavanje autofagije se temelji na mikroskopskim i molekularno-biološkim metodama koje omogućuju identifikaciju autofagijskih struktura i kvantifikaciju proteina (i njihovih iRNK) koji učestvuju u autofagiji.¹⁰⁷ Metode za detekciju mitofagije se u velikoj meri oslanjaju na mikroskopske tehnike kojima se identifikuju autofagijske vakuole koje sadrže mitohondrije (mitofagi) ili njihove ostatke.¹⁰⁷ Razloge treba tražiti u tome što promene u proteinima koji učestvuju u autofagiji ne ukazuju direktno na promene u selektivnoj autofagiji mitohondrija.¹⁰⁷ Ukupna količina proteina u ćeliji koji direktno učestvuju u mitofagiji (PINK1, PARKIN npr.) ne mora obavezno da ukazuje na stepen aktivnosti ovog procesa, jer u regulaciji mitofagije značajnu ulogu imaju

njihove posttranslacione modifikacije.¹⁰⁸ Zbog toga se za ispitivanje autofagije najviše koriste mikroskopske metode detekcije ovog procesa, metode konfokalne i fluorescentne mikroskopije i transmisijne elektronske mikroskopije (TEM).¹⁰⁷

Konfokalnim mikroskopom mogu se identifikovati i kvantifikovati autofagozomi i autolizozomi koji u svom lumenu sadrže mitohondrijalne proteine.¹⁰⁷ Identifikacija se postiže obeležavanjem proteina markera autofagozoma (LC3) i mitohondrijalnih proteina kao što su TOM20 (engl. *translocase of outer membrane 20*) i COX4 (engl. *cytochrome c oxidase subunit 4*) fluorescentnim bojama vezanim za antitela koja se specifično vezuju za ove proteine.¹⁰⁷ Metodama konfokalne mikroskopije moguće je direktno analizirati uzorke genetski modifikovanih životinja kod kojih je eksprimiran autofagozomalni ili mitohondrijalni protein za koji je kovalentno vezan fluorescentni protein kao što je GFP (engl. *green fluorescent protein*) ili RFP (engl. *red fluorescent protein*).¹⁰⁷

Nedavno su promovisani novi eksperimentalni modeli u kojima su kod miševa samo u mitohondrijama ćelija eksprimirani Keima fluorescentni protein (mt-Keima miševi, nepublikovan soj)^{109,110}, odnosno mCherry-GFP-FIS1 (engl. *mitochondrial fission 1*) protein (mito-QC miševi soja C57BL/6J)¹¹¹. Ovi fluorescentni proteini su rezistentni na dejstvo lizozomalnih proteaza, i menjaju talasnu dužinu emitovane svetlosti prilikom promene kiselosti sredine.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Mitohondrije mt-Keima miševa posmatrane na fluorescentnom ili konfokalnom mikroskopu emituju svetlost u zelenom delu spektra kada se nalaze u neutralnoj sredini, kao npr. u citoplazmi, dok u kiseloj sredini autolizozoma (pH 4,5) mitohondrije emituju svetlost u crvenom delu spektra.^{109,110} Kod mito-QC miševa u kiseloj sredini autolizozoma dolazi do gašenja zelenog fluorescentnog signala poreklom sa GFP-a, dok ostaje vidljiv crveni fluorescentni signal sa mCherry proteina.¹¹¹ Ograničenja ovih modela su, između ostalog, što ne detektuju lokalizaciju mitohondrija u autofagozomima, a ako postoji defekt u zakišeljavanju lumena, ni u lizozomima.

Prisustvo mitohondrija u autofagozomima moguće je utvrditi metodama transmisione elektronske mikroskopije.¹¹² Detekcija mitohondrija u autolizozomima transmisionim elektronskim mikroskopom je moguća sve dok se morfologija ovih organela značajno ne naruši usled enzimske digestije i na osnovu slične elektronske gustine sadržaja autolizozoma i mitohondrija u citosolu.¹¹²⁻¹¹⁴ Za detekciju mitohondrija u autolizozomima ipak se preporučuje obeležavanje mitohondrijalnih proteina zlatom obeleženim antitelima metodama imuno-elektroske mikroskopije.¹¹⁴ Zbog malog broja mitofaga u kojima je ultrastruktura mitohondrija dovoljno očuvana, mitofage je moguće identifikovati samo u ograničenom broju preseka dostupnih za ispitivanje transmisionim elektronskim mikroskopije pa ova metoda nije najpogodnija za kvantifikaciju mitofagije.¹¹² Za kvantifikaciju mitofagije najčešće se koriste metode konfokalne mikroskopije.¹⁰⁷

1.5. Terapija metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2

Metformin i statini spadaju među najčešće korišćene lekove u terapiji metaboličkog sindroma¹¹⁵ i tip 2 dijabetesa¹¹⁶. Poznato je da ovi lekovi imaju značajne efekte na mitohondrije. Metformin direktno inhibira kompleks I mitohondrijalnog respiratornog lanca što dovodi do pada nivoa ATP-a u ćeliji i indirektno aktivacije AMPK.^{117,118} Inhibicija mitohondrijalnog kompleksa I metforminom može da poveća proizvodnju kiseoničkih slobodnih radikala u mitohondrijama i da dovede do pojave „mitohondrijalnog stresa“ u ćelijama.¹¹⁹ Statini inhibiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktazu, ključni enzim u sintezi holesterola u ćelijama.¹²⁰ Kada je u pitanju dejstvo statina na mitohondrije, u različitim studijama su opisani i povoljni i nepovoljni uticaji na njihovu funkciju.^{121,122} S obzirom na dejstva koja ispoljavaju na mitohondrije, važno je ispitati uticaje ovih terapijskih modaliteta na mitofagiju u dijabetesu tipa 2 i metaboličkom sindromu.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje uticaja ishrane sa visokim sadržajem masti na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa.
2. Ispitivanje uticaja metformina i simvastatina na ultrastrukturne karakteristike subcelularnih struktura, mitofagiju i ekspresiju regulatora autofagije u jetri, aorti i ishijadičnom nervu C57BL/6J miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Miševi soja C57BL/6J muškog pola, starosti 8 nedelja, nabavljeni su iz vivarijuma Galenike a.d. u Beogradu. Životinje su čuvane u standardnim uslovima, sa slobodnim pristupom hrani i vodi u periodu od 6 meseci. Za potrebe istraživanja sve životinje su podeljene u 4 grupe od po 8 životinja. Kontrolna grupa je imala pristup standardnoj hrani, dok su tri eksperimentalne grupe bili na režimu ishrane sa povećanim sadržajem masti (HFD miševi). Hrana sa povećanim sadržajem masti se od standardne hrane razlikovala samo u procentu kalorija porekla iz masti koji je iznosio 60%, i bio uglavnom porekla svinjske masti. Kod svih životinja je merena telesna masa na početku i na kraju istraživanja.

Jednom dnevno, poslednjih mesec dana trajanja eksperimenta, jednoj grupi životinja na dijeti sa visokim sadržajem masti davan je metformin u dozi 300 mg/kg telesne mase, a drugoj na istom režimu ishrane simvastatin u dozi 100 mg/kg telesne mase orogastričnom sondom. Doza leka je prethodno bila rastvorena u 0,5 ml destilovane vode. Kontrolnoj grupi životinja na standardnom režimu ishrane i netretiranoj grupi životinja na dijeti sa visokim sadržajem masti u istom periodu je davana ista zapremina destilovane vode orogastričnom sondom.

Oralni test tolerancije glukoze je izveden na svim životinjama pre žrtvovanja. Miševima je davan rastvor glukoze u količini 2g/kg telesne mase orogastričnom sondom. Nivo glukoze je meren u uzorcima krvi uzetim iz repne vene neposredno pre davanja glukoze, i u intervalima od po 30 minuta posle aplikacije glukoze, pri čemu je poslednji ispitani uzorak krvi uziman nakon 120 minuta.

3.2. Priprema histoloških uzoraka

3.2.1. Uzimanje uzoraka

Sve životinje su 6 meseci posle početka eksperimenta žrtvovane cervikalnom dislokacijom nakon čega su im uzeti uzorci jetre, n. ischiadicusa i torakalne aorte. Delovi ovih organa su bili fiksirani imerzionom fiksacijom u 10% neutralnom puferovanom formalinu za ispitivanja na svetlosnom mikroskopu ili u 2,5% glutaraldehidu za ispitivanja na elektronskom mikroskopu. Delovi jetre su zamrzavani u tečnom azotu nakon čega su skladišteni na -80° C do dalje obrade za molekularno-biološke analize.

3.2.2. Obrada uzoraka za konvencionalnu svetlosnu mikroskopiju

Uzorci tkiva prethodno fiksirani u 4% formaldehidu su kalupljeni u parafinske kalupe koji su sečeni na mikrotomu. Dobijeni isečci debljine 3–5 μ m su potom montirani na predmetna stakla i bojani hematoksilinom i eozinom (HE)¹²³, ili imunohistohemijskim metodama. Uzorci su analizirani na Leica DM4000BLED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) mikroskopu i fotografisani uz pomoć kamere Leica DFC295 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.2.3. Obrada uzoraka za konfokalnu mikroskopiju

Svi uzorci za konfokalnu mikroskopiju su analizirani na Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) konfokalnom mikroskopu. Uzorci tkiva prethodno fiksirani u 4% formaldehidu su kalupljeni u parafinske kalupe koji su sečeni na mikrotomu. Dobijeni isečci debljine 3–5 μ m su potom montirani na predmetna stakla. Za identifikaciju mitofaga i njihovu morfometrijsku analizu, uzorci za konfokalnu mikroskopiju su inkubirani 90 minuta sa zečijim anti-TOM20 antitelom (1:200, Santa

Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; sc-11415) a zatim 60 minuta sa Alexa Fluor 633 kozjim anti-zečjim IgG antitelom (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; A21070) i 90 minuta sa anti-LC3B/Dylight488 konjugovanim antitelom (1:2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PA5-22938).

Za analizu autofagije uzorci za konfokalnu mikroskopiju su inkubirani 90 minuta sa zečjim anti-p62 antitelom (1:100, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; NBP1-48320) ili sa zečjim anti-LAMP1 (engl. *lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) antitelom (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PA1-654A), a zatim 60 minuta sa Alexa Fluor 633 kozjim anti-zečjim IgG antitelom (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; A21070) i 90 minuta sa anti-LC3B/Dylight488 konjugovanim antitelom (1:2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; PA5-22938).

Za analizu uklanjanja mijelina autofagijom uzorci ishijadičkog nerva su inkubirani 90 minuta sa zečjim anti-LC3B antitelom (1:100, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; PA5-35195), zatim 60 minuta sa Alexa Fluor 633 kozjim anti-zečjim IgG antitelom (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; A21070), a posle toga 90 minuta sa mišjim anti-MBP (engl. *myelin basic protein*) antitelom (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; MA5-15922) i 60 minuta sa Alexa Fluor 488 kozjim anti-mišjim IgG antitelom (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; A-11001).

3.2.4. Obrada uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju

Uzorci tkiva su fiksirani u 2,5% glutaraldehidu na temperaturi od +4°C, a potom kalupljeni u epoksidnim smolama. Prvog dana uzorci su isprani 3 puta u kakodilatnom puferu (pH 7,3), dodatno fiksirani u 1% rastvorom osmijum-tetroksida u kakodilatnom puferu tokom 60 minuta na temperaturi +4° i ponovo 3 puta isprani u kakodilatnom puferu (pH 7,3). Potom je preko uzoraka sipan prezasićen rastvor uranil-acetata u destilovanoj vodi, u kome su uzorci stajali preko noći na +4°C. Drugog dana, uzorci su

isprani destilovanom vodom, a zatim dehidrirani rastućim koncentracijama etanola od 50%, 70% i 96% i 100% etanolom. Tkiva su isprana 2 puta u propilen-oksidu, a onda je preko uzoraka sipana mešavina propilen-oksida i epoksidnih smola (Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u odnosu 3:1. Uzorci su ostavljeni da stoje do sledećeg jutra, da bi trećeg dana iz uzoraka bila uklonjena prethodno sipana mešavina i nalivena nova, ovoga puta dobijena mešanjem istih zapremina smola i propilen oksida. Nakon 3 sata ova mešavina je odlivena a uzorci su prebačeni u modle za kalupljenje. U modli je preko uzoraka nalivena kombinacija čistih epoksidnih smola i ostavljena da stoji 48h u temperaturi od 60°C.

Po završenoj proceduri ukalupljeni uzorci su sečeni na ultramikrotomu (Leica UltraCut UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) staklenim nožem da bi se dobili polutanki isečaci debljine oko 500nm. Polutanki isečci su bojeni rastvorom toluidin plavog i posmatrani na svetlosnom mikroskopu da bi se odabrao deo uzorka za dalje sečenje. Odabrani deo uzorka je onda sečen dijamantskim nožem (16DIA.DU4530, DiATOME, Hatfield, PA, USA) da bi se dobili ultratanki isečci debljine oko 70 nm. Ultratanki isečci su montirani na bakarne mrežice (G4901, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Posle sušenja, bakarne mrežice sa uzorcima su kontrastirane 4% rastvorom uranil-acetata u metanolu i rastvorom olovo-citrata. Uzorci su posle sušenja posmatrani na transmisionom elektronskom mikroskopu (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, OR, USA).

3.3. Morfometrijska analiza na konfokalnom mikroskopu

Broj mitofaga u tkivu jetre, nerva i aorte je određivan ručnim brojanjem kolokalizovanih (žutih) LC3B/TOM20 punkta. Broj autofagijskih vakuola u tkivu jetre i nerva je određivan ručnim brojanjem kolokalizovanih (žutih) LC3B/p62 i LC3B/LAMP1 punkta. Broj autofagijskih vakuola u tkivu nerva koje sadrže ostatke

mijelina je određivan ručnim brojanjem kolokalizovanih (žutih) LC3B/MBP punkta. Sve slike za morfolometrijske analize su dobijene korišćenjem x63 objektiva (PL APO 63x 1.3 Glycerol HCX CS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) uz upotrebu x4 digitalnog uveličanja (ukupno uveličanje x252) na 20 vidnih polja po uzorku biranih „Systematic Uniform Random Sampling“ (SUR) metodom.¹²⁴

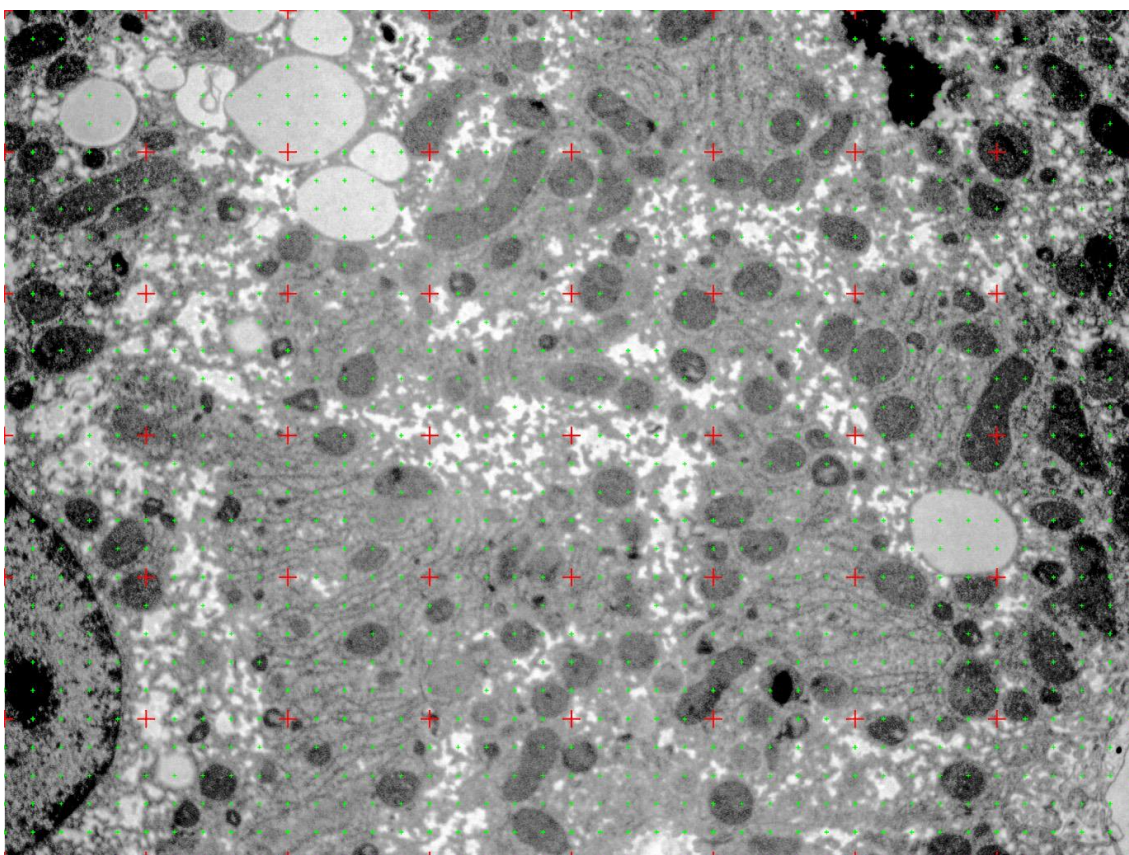
3.4. Morfolometrijska analiza na transmissionom elektronskom mikroskopu

Svi ultratanki iseći i fotomikrografije korišćene za morfolometrijske analize odabrane su primenom SUR metode¹²⁴. Uzorci su fotografisani na najmanjem uveličanju na kojem je bilo moguće precizno identifikovati ispitivane strukture. Subcelularne strukture su kvantifikovane brojanjem ili analizom njihovog zapreminskog udela (engl. *fractional volume analysis*) u citoplazmi ćelije. Analiza zapreminskog udela je urađena primenom mrežice sa tačkama u dve različite gustine (Slika 3.4.1)¹²⁴ korišćenjem formule:

$$X = \frac{\Sigma P_{ap}}{(\Sigma P_{cyt} * \rho)}$$

U formuli ΣP_{ap} predstavlja broj tačaka mrežice veće gustine unutar ispitivane strukture, ΣP_{cyt} broj tačaka mrežice manje gustine unutar citoplazme, dok ρ označava odnos broj tačaka veće gustine i broja tačaka manje gustine na mrežici koji je iznosio 25 (Slika 3.4.1). Na ovaj način utvrđuje se odnos površina ispitivanih struktura i citoplazme na preseku ćelije. Iz njega se može izvući zaključak o odnosu zapremina ispitivanih struktura i citoplazme na osnovu *Delesse*-ovog principa, koji kaže da je

odnos površine (engl. *fractional area*) proporcionalan odnosu zapremina citoplazme i organela u ćeliji (engl. *fractional volume*).¹²⁴ Brojevi fotomikrografija i korišćena uveličanja za morfometrijski analizirane strukture dati su u tabeli (Tabela 3.4.1). U kvantifikaciju autofagijskih vakuola bile su uključene i izolacione membrane, koje se na transmissionom elektronskom mikroskopu ne mogu razlikovati od autofagozoma osim ako se u ravni preseka ne nalaze njihove slobodne ivice¹²⁴.



Slika 3.4.1 Mrežica sa tačkama u dve različite gustine na fotomikrografiji uzorka jetre. (TEM, x5600)

G-odnos (engl. G-ratio) je računat kao odnos unutrašnjeg i spoljašnjeg dijametra mijelinskog omotača. Na fotomikrografijama sa transmissionog elektronskog mikroskopa mereni su unutrašnji i spoljašnji dijametar mijelinskog omotača tako što su mereni najveći i najmanji dijametri i računate srednje vrednosti na način kao što je ranije opisano.¹²⁵

Tabela 3.4.1 Brojevi fotomikrografija i korišćena uveličanja za morfometriju.

	Korišćeno uveličanje	Broj fotomikrografija
Zapreminski udeo autofagijskih vakuola u hepatocitima	x11000	60
Broj autofagijskih vakuola u hepatocitima	x11000	60
Zapreminski udeo lipofaga u hepatocitima	x11000	60
Zapreminski udeo masnih kapi u hepatocitima	x5600	60
Zapreminski udeo mitohondrija u hepatocitima	x11000	60
Broj Kupferovih ćelija po hepatocitu	x1100	60
Broj aktiviranih Kupferovih ćelija	x5600	100
Broj Kupferovih ćelija sa lipofazima	x5600	100
Broj Kupferovih ćelija sa masnim kapima	x5600	100
Broj oštećenog mijelina u ishijadičnom nervu	x4400	100
G-odnos u ishijadičnom nervu	x4400	100

3.5. Imunoblot analiza

Tkivo je disocirano 30 minuta na 0°C u puferu za lizu ćelija koji se sastojao od 30 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP-40 deterdženta, 1 mM proteaznog inhibitora fenilmetilsulfonyl fluorida (PMSF), 20 µl/ml komercijalnog rastvora proteaznih inhibitora (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2 mM natrijum ortovanadata (Na₃VO₄) i 50 mM natrijum fluorida (NaF). Lizati su centrifugirani 15 minuta na +4°C na ubrzanju od 14000 g. Koncentracija proteina u supernatantu je

određivana metodom po Bradford-u¹²⁶. Reakcija se izvodi mešanjem 980 µl Bradfordovog reagensa (0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (v/v) etanol, 10% (v/v) H₃PO₄ u vodi) sa 20 µl uzorka. Posle 10 minuta reakcije čitana je apsorpcija na talasnoj dužini od 570 nm. Koncentracija proteina u uzorku je izračunavana u odnosu na standardnu krivu dobijenu pomoću poznatih koncentracija BSA.

Za elektroforezu, uzorci su pripremani kuvanjem 5 minuta na 95°C mešavine rastvora ekstrahovanih proteina sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera. Finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% natrijum dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*), 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptoetanol, 0,002% bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8.

Jednake količine proteina su sipane u bunare, a zatim su uzorci nanošeni na gel za sabijanje proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 M Tris HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris HCl, pH 8.8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijum persulfat i 0,033% N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (engl. *N,N,N',N'-tetramethylethylene-1,2-diamine*), dok se pufer za rezervoare u kojima je tekla elektroforeza sastojao od 192 mM glicina, 0,1% SDS i 25 mM Tris HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 minuta pri konstantnom naponu. Tokom prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a posle prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska ivice boje bromfenol plavo iz gela. Na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekularnih masa (10-250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) da bi se odredile pozicije molekularnih masa ispitivanih proteina.

Po završetku elektroforeze proteini su prebačeni sa gela pomoću aparata za polusuvi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) na nitrocelulozne membrane (Hybond C, GE Healthcare, Chicago, IL,

USA). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene na visoko adsorbujući filter papir prethodno natopljen puferom za transfer. Gelovi su isprani malom količinom pufera za transfer i postavljeni na membrane. Preko gela je stavljen još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom za transfer. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi. Transfer na membranu se odvijao 90 minuta na sobnoj temperaturi pod dejstvom struje konstantne jačine (0,8 mA/cm² membrane).

Po završenom transferu, nespecifično vezivanje antitela je blokirano inkubacijom delova membrane gde su se nalazili ispitivani proteini u rastvoru 10% obranog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) sa 0,05% Tween 20 deterdženta (TBST) 60 minuta na sobnoj temperaturi. Membrane su uz blago mešanje inkubirane sa primarnim antitelima (1:900 zečje anti-LC3 antitelo i 1:2000 zečje anti-SQSTM1/p62 antitelo, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) rastvorenim u 5% obranom mleku na temperaturi od +4°C do sledećeg jutra.

Narednog dana membrane su isprane tri puta u TBST-u, a zatim inkubirane 75 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG antitelom (Jackson IP Laboratories, West Grove, PA, USA) konjugovanim sa peroksidazom rena (HRP, engl. horseradish peroxidase). Posle inkubacije, membrane su isprane tri puta u TBST-u i prelivene hemiluminiscentnim reagensom (ECL; GE Healthcare, Chicago, IL, USA), supstratom za peroksidazu rena. Intenzitet hemiluminiscence, proporcionalan količini proteina vezanog za membranu, je detektovan aparatom za detekciju (ChemiDoc Imager, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ekspresija proteina, tj. relativna optička gustina imunoreaktivnih traka proteina, je kvantifikovana denzitometrijom pomoću programa *Image Lab* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Rezultati su prikazani relativno u odnosu na aktin.

3.6. Određivanje količine iRNK (RT-qPCR)

3.6.1. Izolacija RNK

Izolacija RNK iz mišjih jetri je vršena tako što su uzorci disocirani u 1ml TRIzol™ (15596026, Invitrogen, Paisley, UK) reagensa posle čega je RNK ekstrahovana korišćenjem fazne separacije u 50 µl hloroforma. Uzorci su inkubirani 10 minuta na +4°C, a zatim centrifugirani 15 minuta na +4°C na ubrzanju 12000 g. Centrifugiranjem uzoraka izdvajaju se tri faze: gornja vodena faza u kojoj je iRNK, srednja faza sa DNK, i donja hloroformska faza sa proteinima i lipidima. Vodena faza sa iRNK prebačena je u epruvete i dodavana joj je jednaka zapremina izopropanola. Uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 15 minuta na +4°C na ubrzanju 12000 g što je dovelo do izdvajanja taloga sa iRNK na dnu epruvete. Po odlivanju supernatanta, talog je centrifugiran dva puta po 5 minuta na ubrzanju 7500 g u 70% etanolom. Etanol je oba puta odliven automatskom pipetom, a talog sa iRNK ostavljen da se osuši i da ispari preostali etanol da bi zatim bio rastvoren u destilovanoj vodi.

3.6.2. Reverzna transkripcija (RT)

Koncentracija iRNK u uzorcima određivana je na Gene Quant spektrofotometru. Posle toga je 1 µg iRNK iz svakog uzorka rastvoren u 15 µl destilovane vode sa 0,2 µg nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1 mM dNTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Za kontrolu kontaminacije upotrebljavana je destilovana voda korišćena za rastvaranje. Rastvori su inkubirani 10 minuta na 70°C, da bi se nasumični heksamerni prajmeri vezali za iRNK. Zatim su uzorci ohlađeni 5 minuta na 0°C i u njih je dodato po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5 x First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1 µl M-MuLV reverzne transkriptaze (200 U/µl, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Uzorci su inkubirani redom 10 minuta na 25°C, 60

minuta na 42°C (temperatura na kojoj se odvija reverzna transkripcija) i 10 minuta na 70°C (temperatura na kojoj se prekida reverzna transkripcija).

3.6.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja (qPCR)

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja molekula cDNK je izvedena na Realplex2 Mastercycler-u (Eppendorf, Hamburg, Germany). Korišćeni su TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), i TaqMan probe (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) na sledeće gene: ATG4b, ATG5, ATG7, ATG12, SQSTM1/p62, GABARAP (engl. GABA Receptor-Associated Protein), BECN1 i 18S ribozomalna RNK (RN18S).

Uzorci sa cDNK su prvo zagrejani 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala polimeraza. Reakciju je činilo 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 sekundi denaturacije cDNK na 95°C, 1 minut vezivanja prajmera za DNK na 45°C i sinteze novih DNK lanaca na 60°C. Sve reakcije su urađene u triplikatu. Relativna ekspresija gena je dobijena po formuli $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika prosečnih Ct (engl. *Cycle threshold*) vrednosti triplikata gena od interesa i prosečne Ct vrednosti kontrolnih triplikata (RN18S).

3.7. Statistička analiza

Za opisivanje numeričkih obeležja posmatranja korišćene su aritmetička sredina i standardna devijacija. Za ispitivanje značajnosti razlike između grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey post-hock testom ili Kruskal–Wallis test rangova praćen Mann-Whitney testom. Za ispitivanje statističke značajnosti razlike učestalosti obeležija posmatranja korišćen je Hi-kvadrat ili Fisher-ov test.

Statistička analiza je urađena pomoću programa SPSS verzija 24 (IBM, Armonk, NY, USA). Vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$ su smatrane statistički značajnim odnosno visoko značajnim. Rezultati su prikazivani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Za grafički prikaz rezultata korišćen je Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

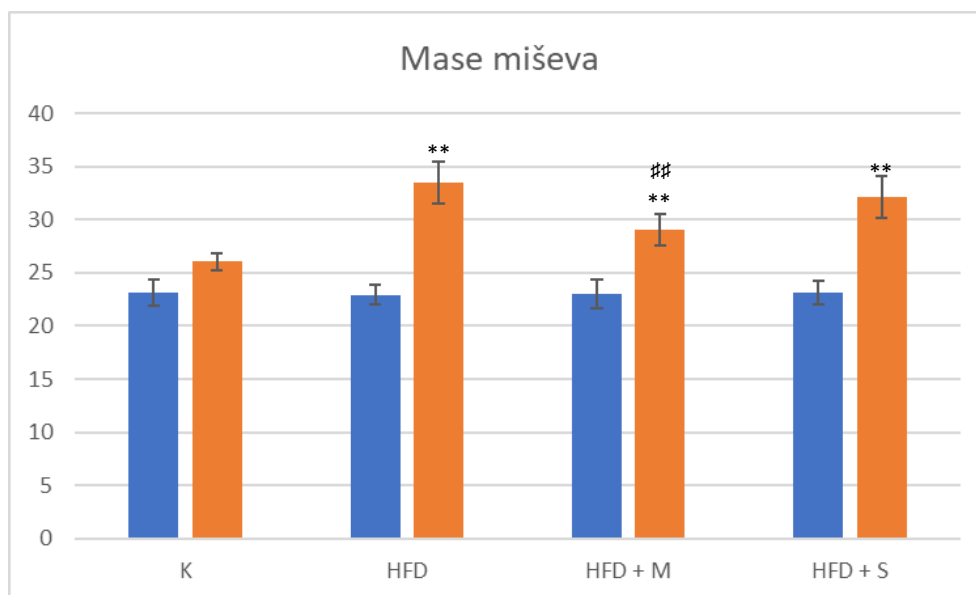
3.8. Etički aspekti istraživanja

Dozvole za obavljanje ovih eksperimenata izdate su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (9110/2; 3/4/2018) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprava za veterinu (323-07-03704/2017-05/1).

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike životinja

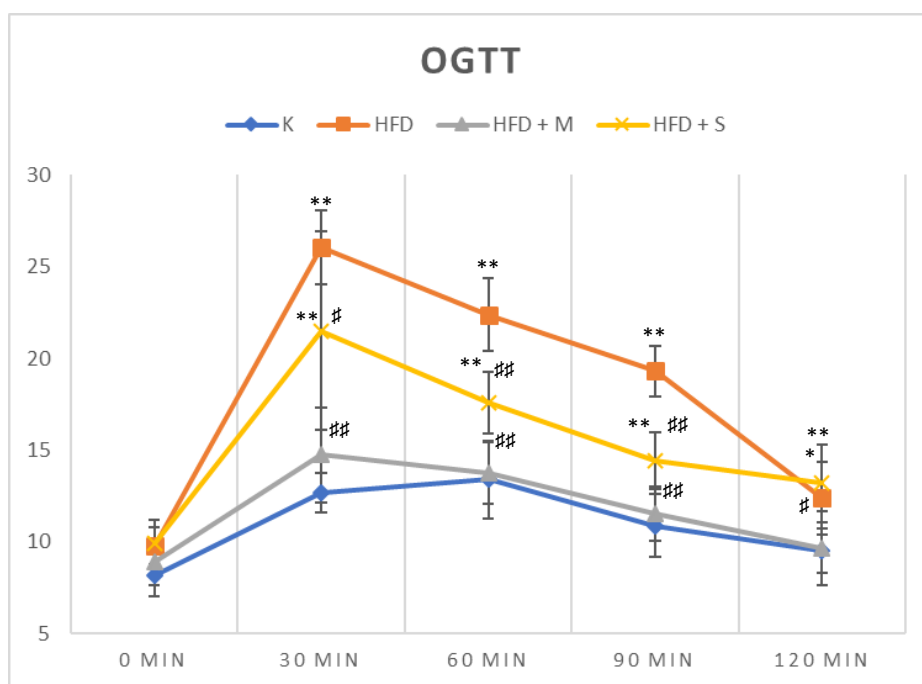
Merenja telesne mase miševa pokazala su da na početku eksperimenta nije bilo statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Režim ishrane i terapija metforminom su uticali na telesnu masu miševa na kraju eksperimenta. Miševi iz svih grupa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti su imali statistički visoko značajno veću telesnu masu od miševa na standardnom režimu ishrane ($p < 0,01$). Tretman metforminom je, za razliku od simvastatina, uticao na telesnu masu HFD miševa. Miševi tretirani metforminom su imali manju telesnu masu od druge dve grupe HFD miševa na kraju eksperimenta, a razlika je bila statistički visoko značajna ($p < 0,01$) (Grafikon 4.1.1).



Grafikon 4.1.1 Mase u gramima C57BL/6J miševa na početku (plavo) i na kraju eksperimenta (narandžasto). ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i ## $p < 0,01$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

Rezultati OGTT-a su pokazali da postoji statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) u koncentraciji glukoze u krvi 30, 60 i 90 minuta posle aplikacije glukoze i

statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u koncentraciji glukoze u krvi 120 minuta posle aplikacije glukoze između netretiranih HFD i kontrolne grupe miševa, sa višim nivoima glukoze kod prvih. U poređenju sa netretiranim HFD miševima, tretman sa metforminom je smanjio vrednosti glukoze u krvi tako da je 30, 60 i 90 minuta posle aplikacije glukoze postojala statistički visoko značajna ($p < 0,01$), a 120 minuta posle aplikacije glukoze statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Tretman simvastatinom je smanjio vrednosti koncentracije glukoze u krvi na OGTT testu u manjoj meri od metformina. Statistički visoko značajne razlike ($p < 0,01$) između simvastatinom tretiranih HFD miševa i netretiranih HFD miševa su postojale 60 i 90 minuta posle početka OGTT-a, dok je razlika koncentracije glukoze u krvi 30 minuta posle početka OGTT-a bila statistički značajna ($p < 0,05$) (Grafikon 4.1.2).

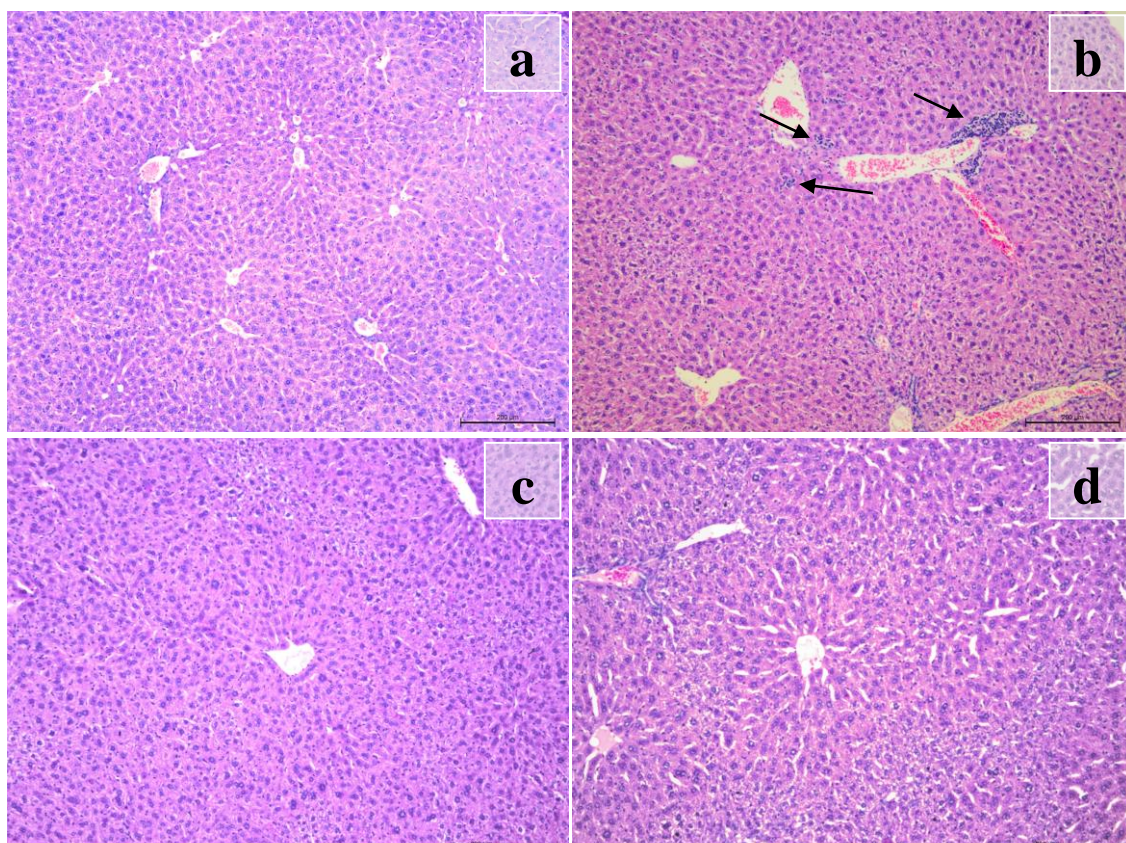


Grafikon 4.1.2 Koncentracija glukoze u krvi u mmol/L kod C57BL/6J miševa na OGTT-u. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

4.2. Analiza uzoraka konvencionalnom svetlosnom mikroskopijom

Uzorci jetre, perifernog nerva i aorte analizirani su primenom konvencionalne svetlosne mikroskopije. Na preparatima jetre obojenim hematoksilinom i eozinom, kod

svih grupa miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti, bila je vidljiva vakuolarna degeneracija hepatocita, prominentnija na periferiji nego u centralnom delu jetrinih lobulusa (Slika 4.2.1). U jetrama netretiranih HFD miševa bio je prisutan multifokalni zapaljenski infiltrat u vidu nasumično raspoređenih lobularnih mikrogranuloma (Slika 4.2.1b), dok je u grupama tretiranim metforminom i simvastatinom zapaljenski infiltrat bio prisutan samo u malom broju uzoraka. Sve navedene promene nisu bile prisutne u jetrama kontrolne grupe miševa. Promene na jetri kod HFD miševa na metforminu i simvastatinu ukazuju na razvoj NAFLD, dok je nešto lošiji nalaz praćen zapaljenjem kod netretiranih HFD miševa karakterističan za NASH. Učestalost promena karakterističnih za NASH bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) kod netretiranih HFD miševa u poređenju sa HFD miševima tretiranim metforminom i simvastatinom (Tabela 4.2.1).

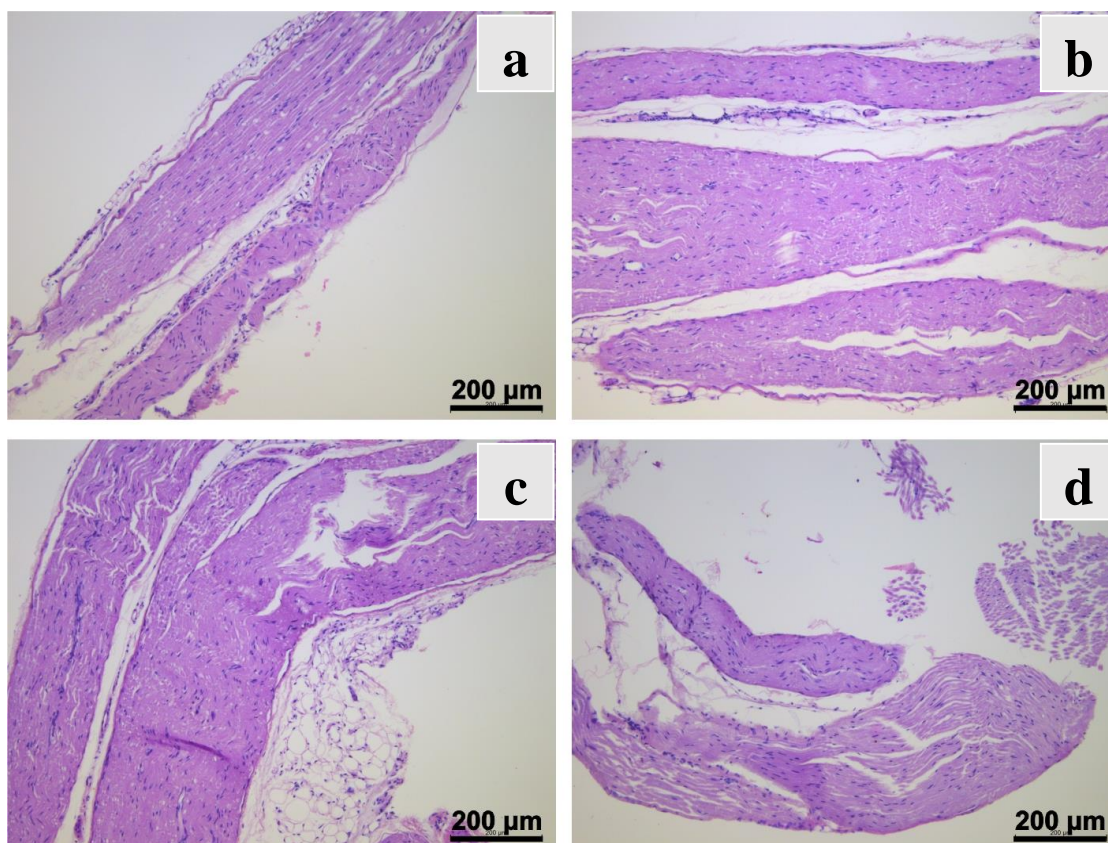


Slika 4.2.1 Uzorci jetre C57BL/6J miševa bojeni hematoksilinom i eozinom (x100). Strelice – zapaljenski infiltrat. (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom.

Tabela 4.2.1 Učestalost patoloških promena na jetri C57BL/6J HFD miševa. * $p < 0,05$

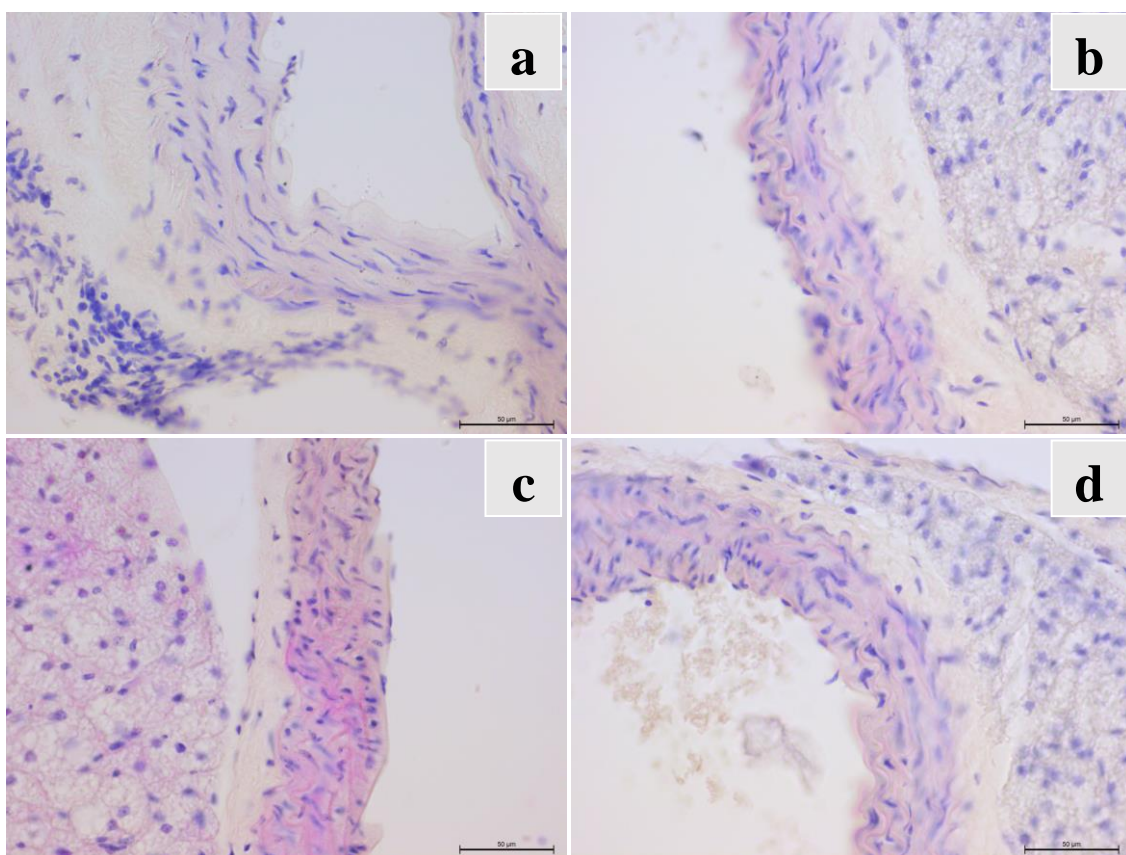
	HFD*	HFD + M	HFD + S
NAFLD	1	6	5
NASH	7	2	2

Hematoksilinom i eozinom obojeni uzorci perifernih nerava kontrolne i drugih eksperimentalnih grupa imali su urednu strukturu i nisu se razlikovali u morfologiji. Zapaljenski infiltrat nije bio vidljiv ni u jednom od analiziranih uzoraka (Slika 4.2.2).



Slika 4.2.2 Uzorci ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa bojeni hematoksilinom i eozinom (x100). (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom.

Hematoksinom i eozinom obojeni preparati mišjih aorti svih eksperimentalnih grupa imali su urednu strukturu i nisu se razlikovali u morfologiji. Ni zapaljenski infiltrati, ni aterosklerotske promene nisu bile prisutne u zidovima aorti ni u jednom od analiziranih uzoraka (Slika 4.2.3).

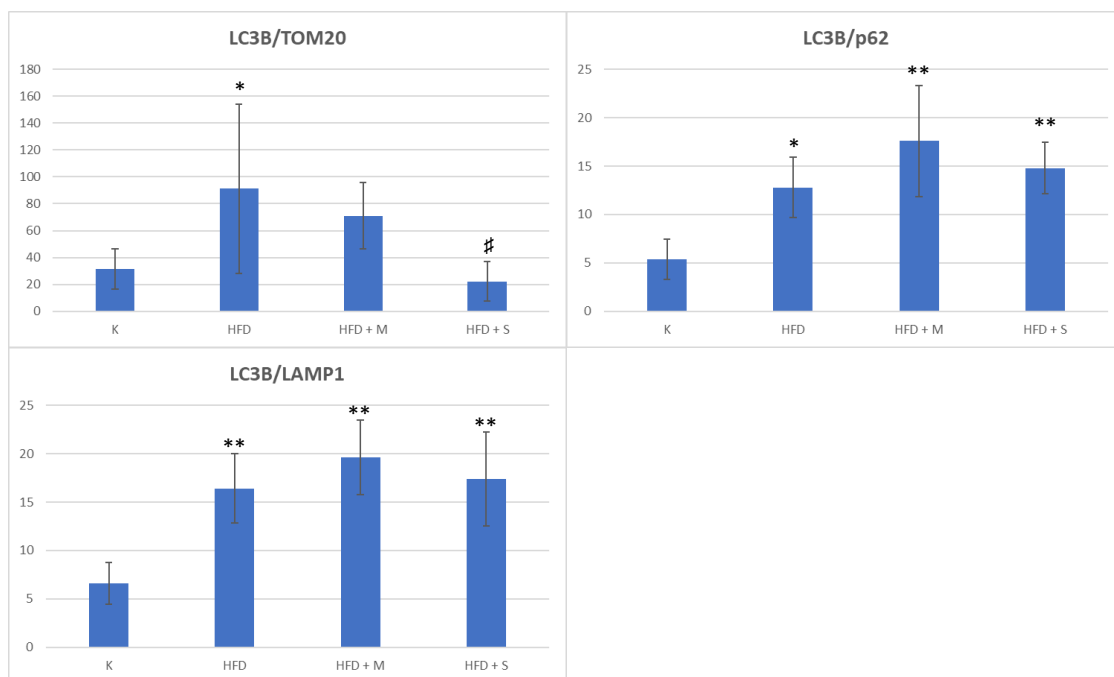


Slika 4.2.3 Uzorci aorte C57BL/6J miševa bojeni hematoksinom i eozinom (x400). (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom.

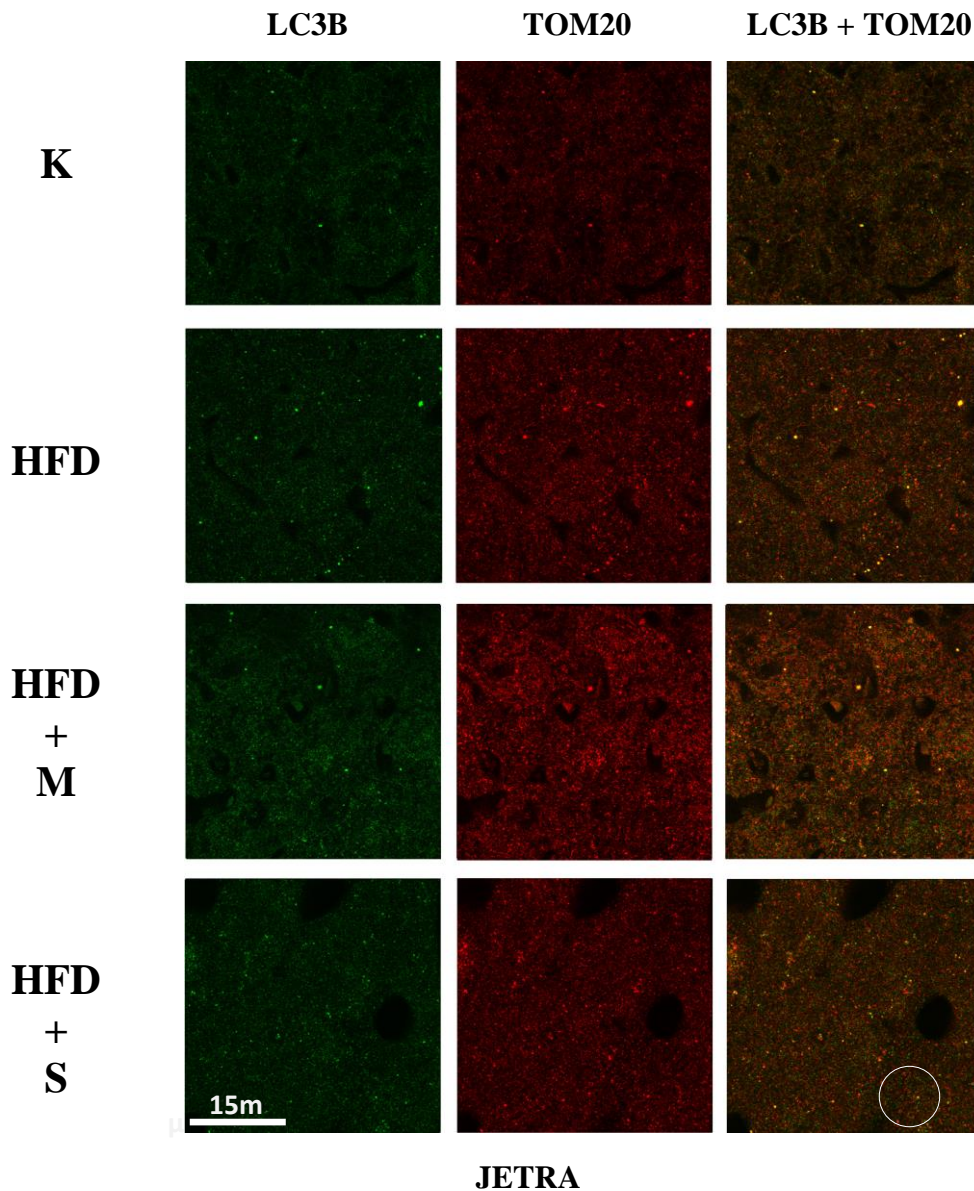
4.3. Analiza uzoraka konfokalnom mikroskopijom

Posmatranjem uzoraka jetre u kojima su fluorescentnim antitelima bili obeleženi LC3B i TOM20 proteini i naknadnom morfometrijskom analizom kolokalizovanih punkta utvrđeno je da je kod HFD netretiranih miševa postojao statistički značajno veći

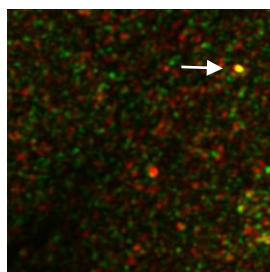
broj mitofaga u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,05$). Tretman metforminom kod HFD miševa nije uticao na broj mitofaga, dok je u jetrama životinja kojima je davan simvastatin bilo statistički značajno manje mitofaga nego u jetrama netretiranih HFD miševa ($p < 0,05$) (Grafikon 4.3.1, Slika 4.3.1 i Slika 4.3.2). Analizom LC3B/LAMP1 obojenih uzoraka nađena je statistički visoko značajna razlika između sve tri grupe HFD miševa i kontrolne grupe u broju kolokalizovanih LC3B/LAMP1 punkta ($p < 0,01$) (Grafikon 4.3.1, Slika 4.3.3). Morfometrijskom analizom kolokalizovanih LC3B/p62 punkta utvrđeno je da je postojala statistički značajna razlika između netretiranih HFD miševa i kontrolne grupe u broju ($p < 0,05$), odnosno statistički visoko značajna razlika između metforminom i simvastatinom tretiranih HFD miševa i kontrolne grupe (Grafikon 4.3.1, Slika 4.3.4).



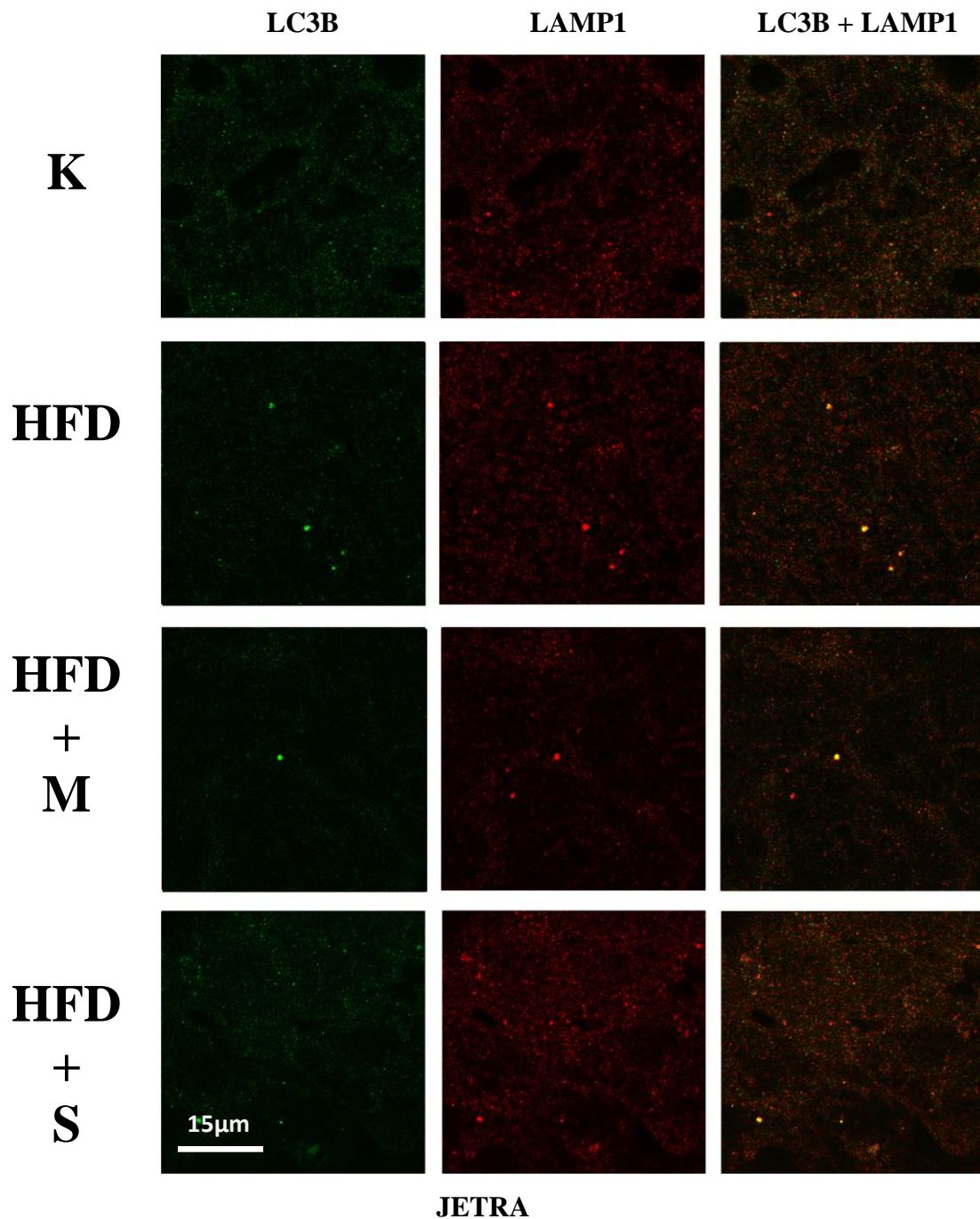
Grafikon 4.3.1 Rezultati morfometrijskih analiza uzoraka jetre C57BL/6J miševa na konfokalnom mikroskopu prikazani kao broj kolokalizovanih punkta. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.



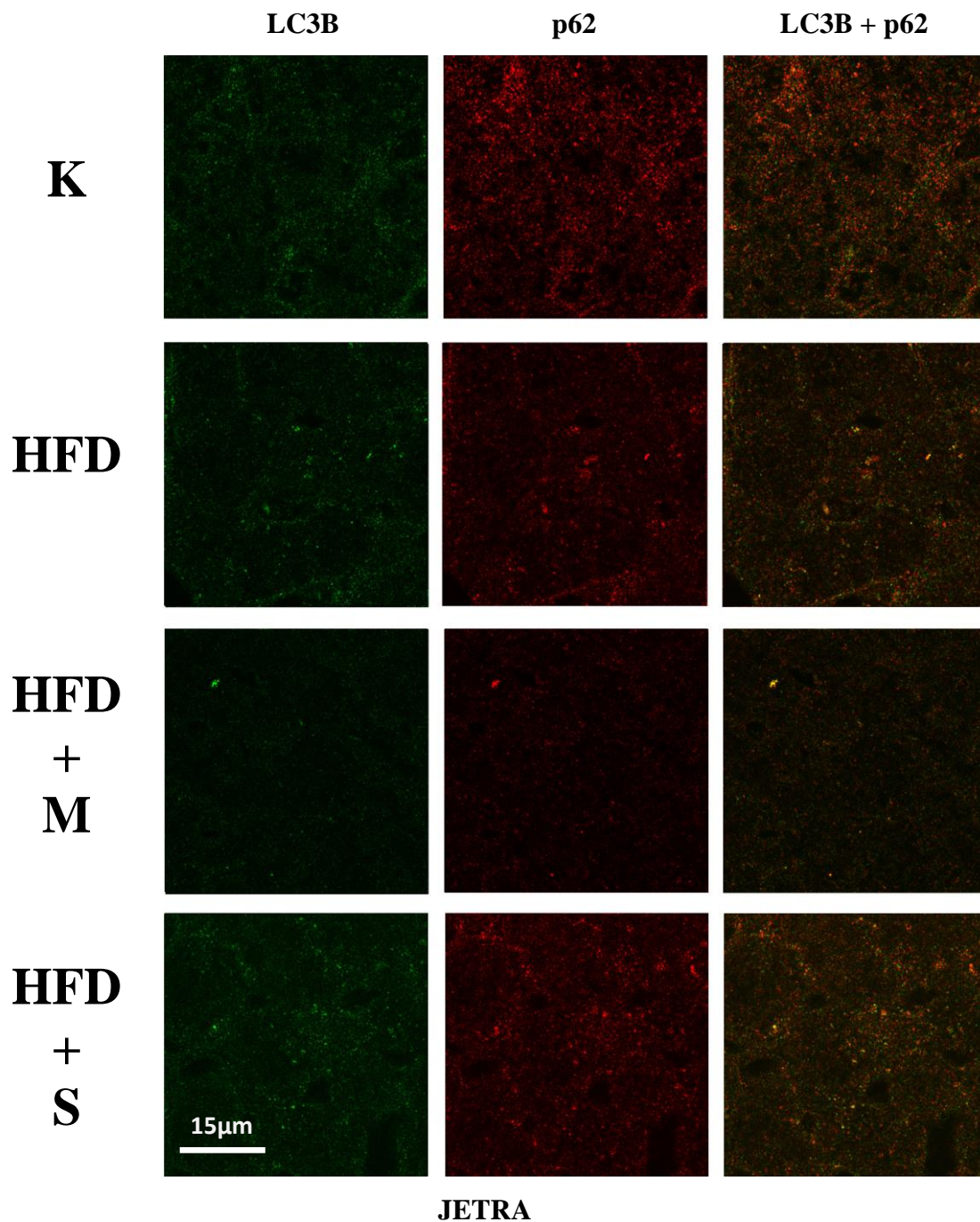
Slika 4.3.1 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka jetre C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i TOM20 (crveno) (x252). Žuta punkta predstavljaju kolokalizaciju LC3B i TOM20 signala sa mesta u ćeliji gde se nalaze mitofazi. Beli krug obeležava deo prikazan na većem uveličanju na slici 4.3.2. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.



Slika 4.3.2 Detalj sa slike 4.3.1 preseka jetre jednog od C57BL/6J HFD miševa tretiranih simvastatinom (x1008). Žuta struktura obeležena strelicom predstavlja kolokalizaciju LC3B i TOM20 signala sa mesta u ćeliji gde se nalazi mitofag.



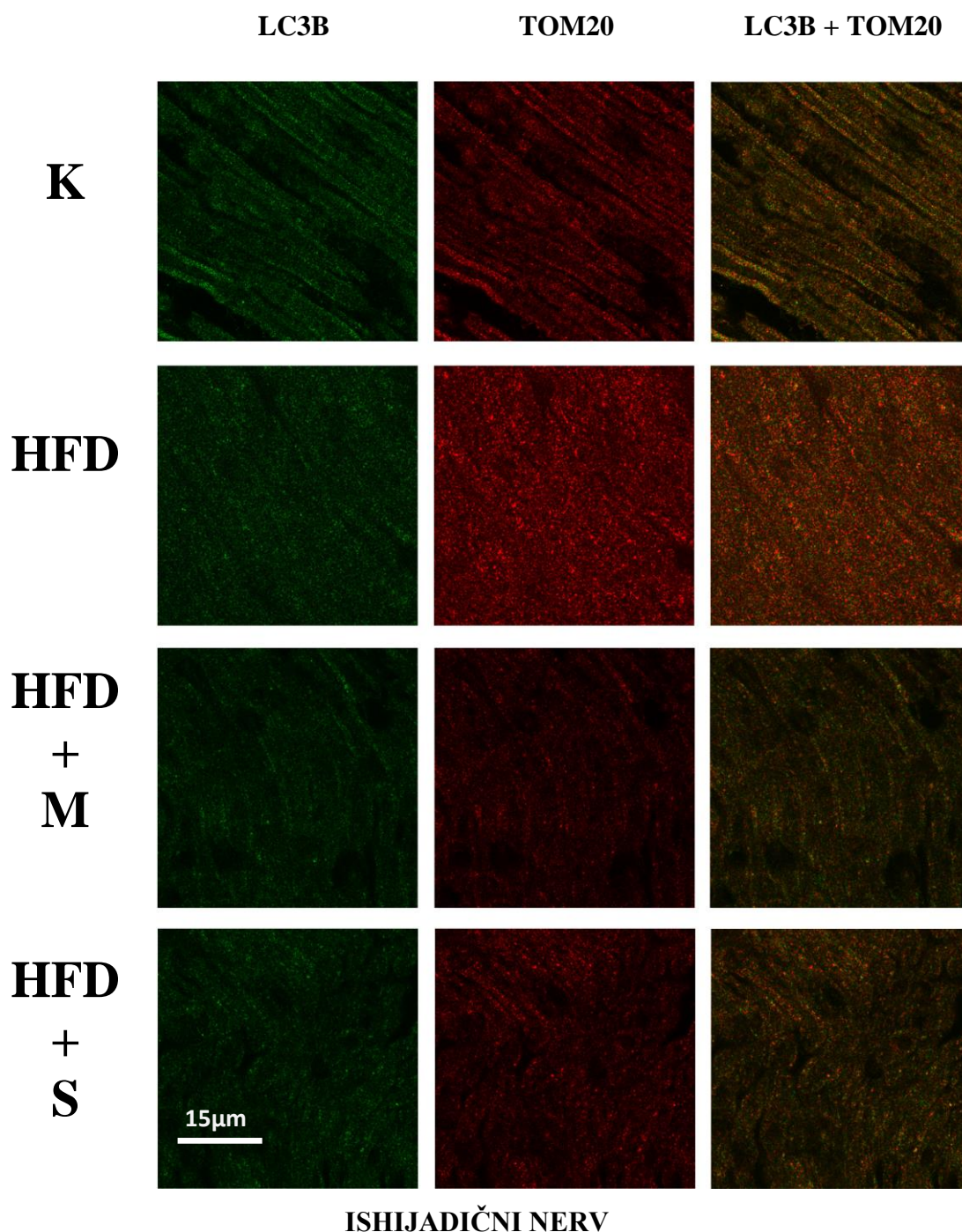
Slika 4.3.3 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka jetre C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i LAMP1 (crveno) (x252). Žuta punkta predstavljaju kolokalizaciju LC3B i LAMP1 signala sa mesta u ćeliji gde se nalaze autolizozomi. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.



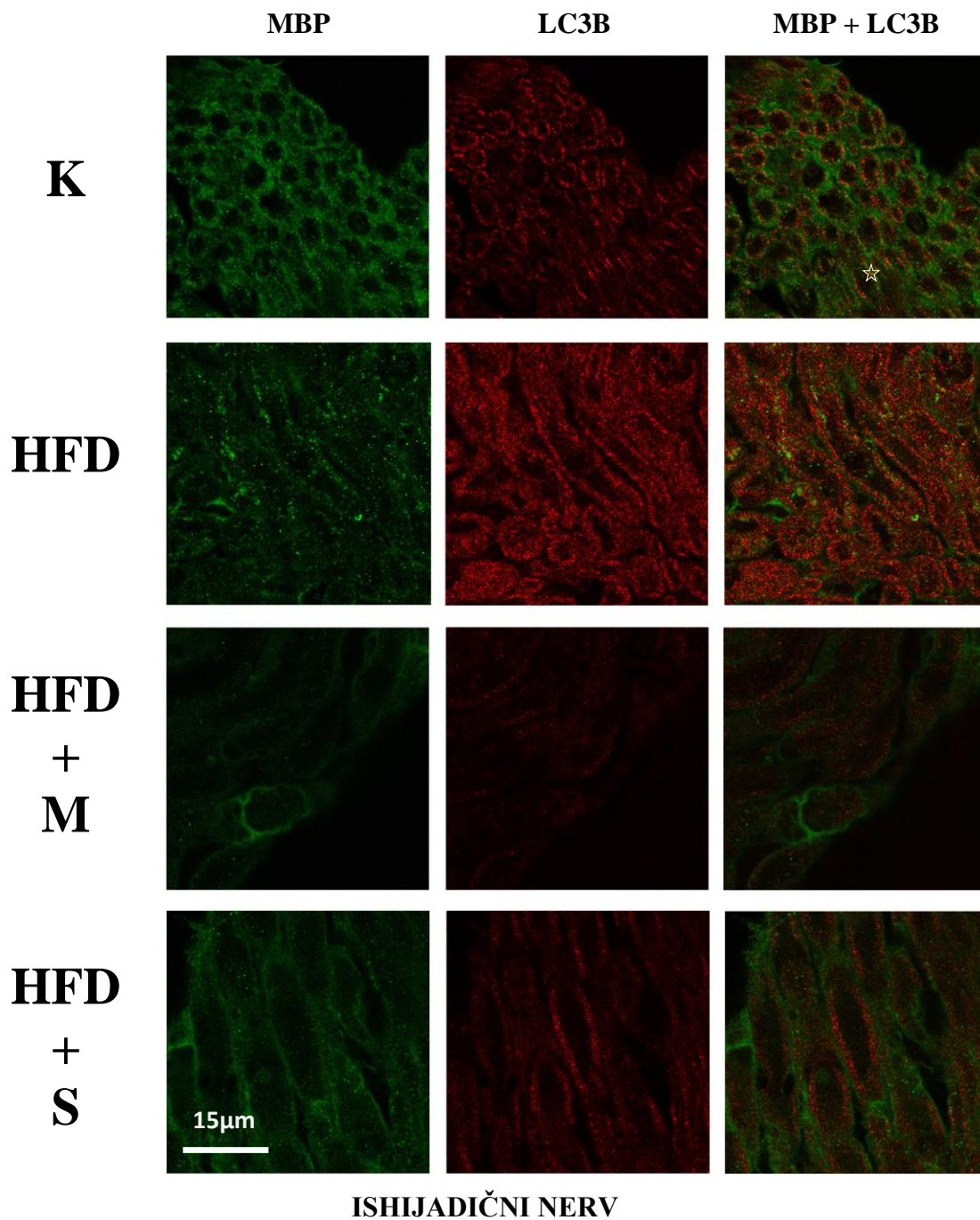
Slika 4.3.4 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka jetre C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i p62 (crveno) (x252). Žuta punkta predstavljaju kolokalizaciju LC3B i p62 signala sa mesta u čeliji gde se nalaze autofagijske vakuole. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

Na preparatima perifernih nerava nismo detektovali LC3B/TOM20 kolokalizovana punkta (Slika 4.3.5). Obleležavanjem fluorescentnim antitelima

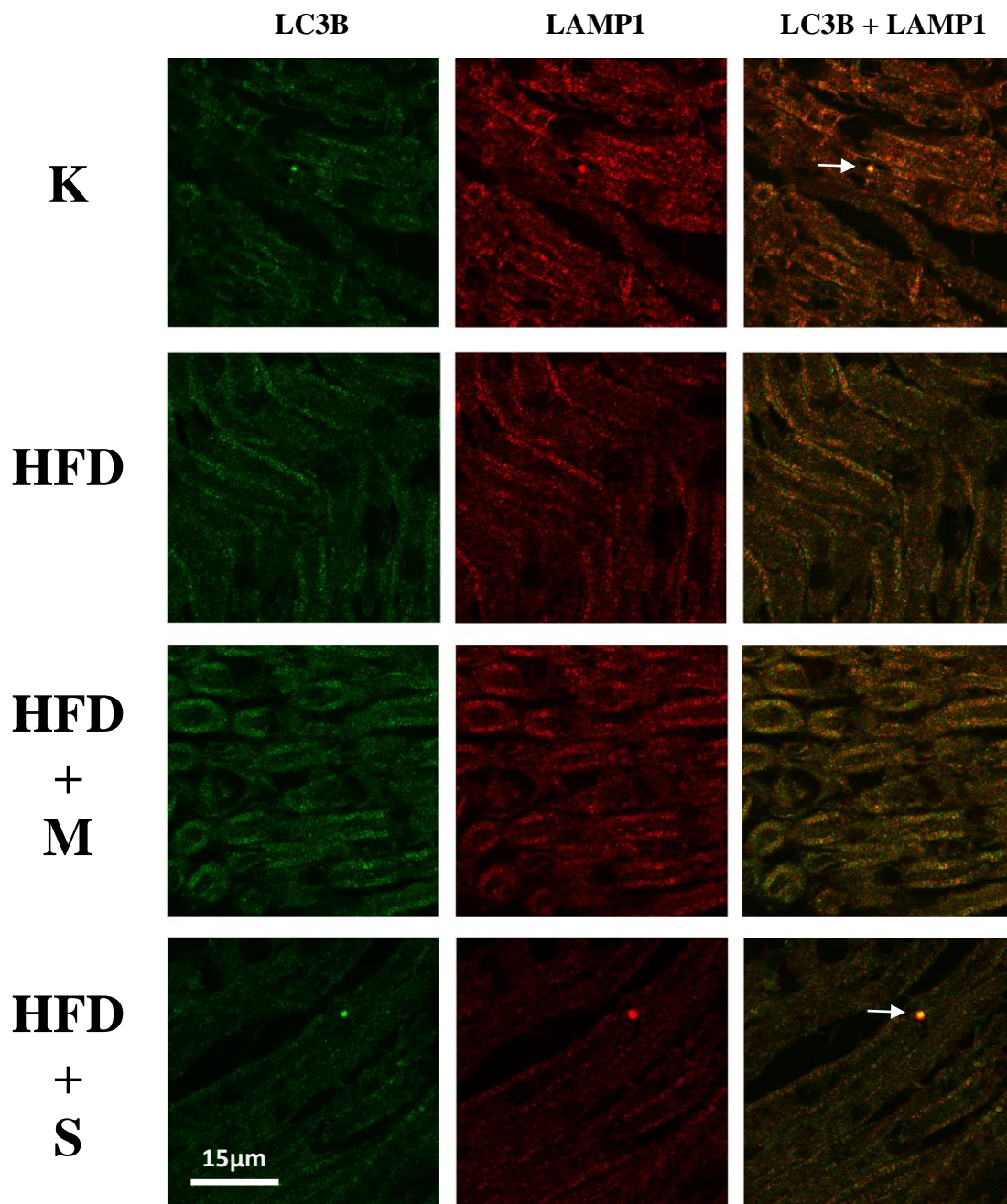
LC3B/MPB (Slika 4.3.6), LC3B/LAMP1 (Slika 4.3.7) i LC3B/p62 (Slika 4.3.8) proteina na prepatima perifernih nerava bili smo u mogućnosti da detektujemo samo retka kolokalizovana punkta prisutna u svim eksperimentalnim grupama.



Slika 4.3.5 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i TOM20 (crveno) (x252). K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

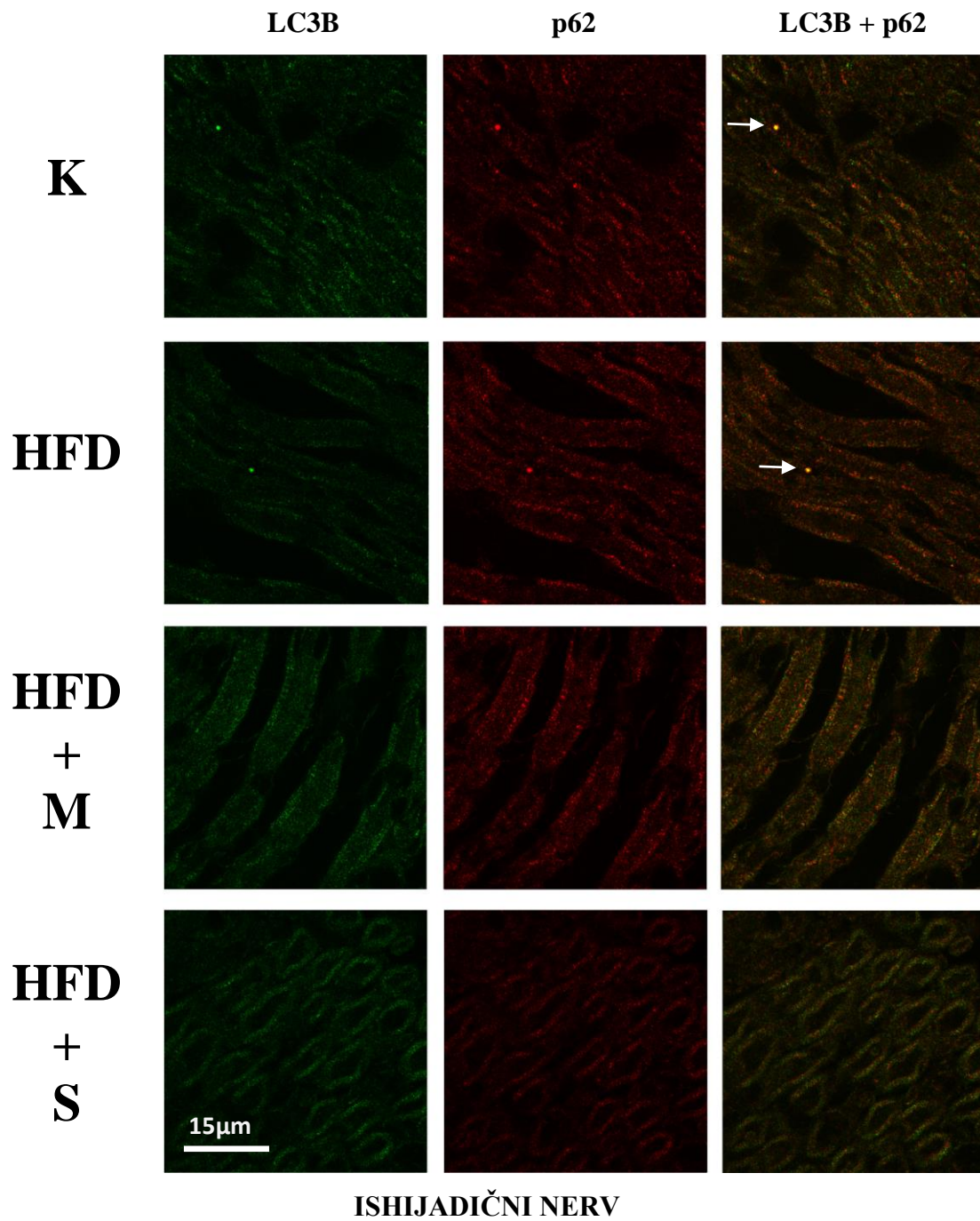


Slika 4.3.6 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na MBP (zeleno) i LC3B (crveno) (x252). K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin. ☆ – žuta kolokalizacija MBP i LC3B.



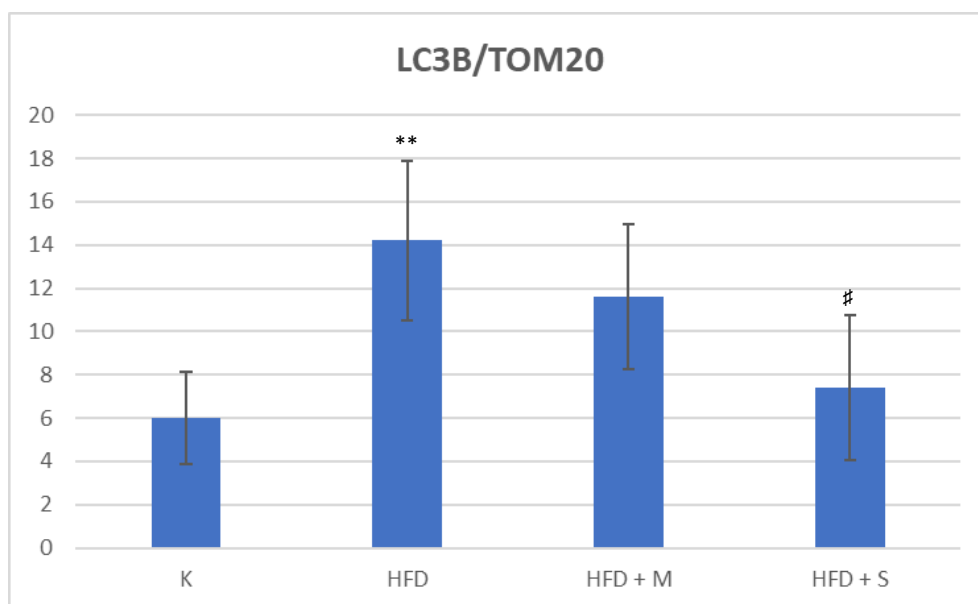
ISHIJADIČNI NERV

Slika 4.3.7 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i LAMP1 (crveno) (x252). K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin. Strelice – žuta kolokalizacija LC3B i LAMP1.

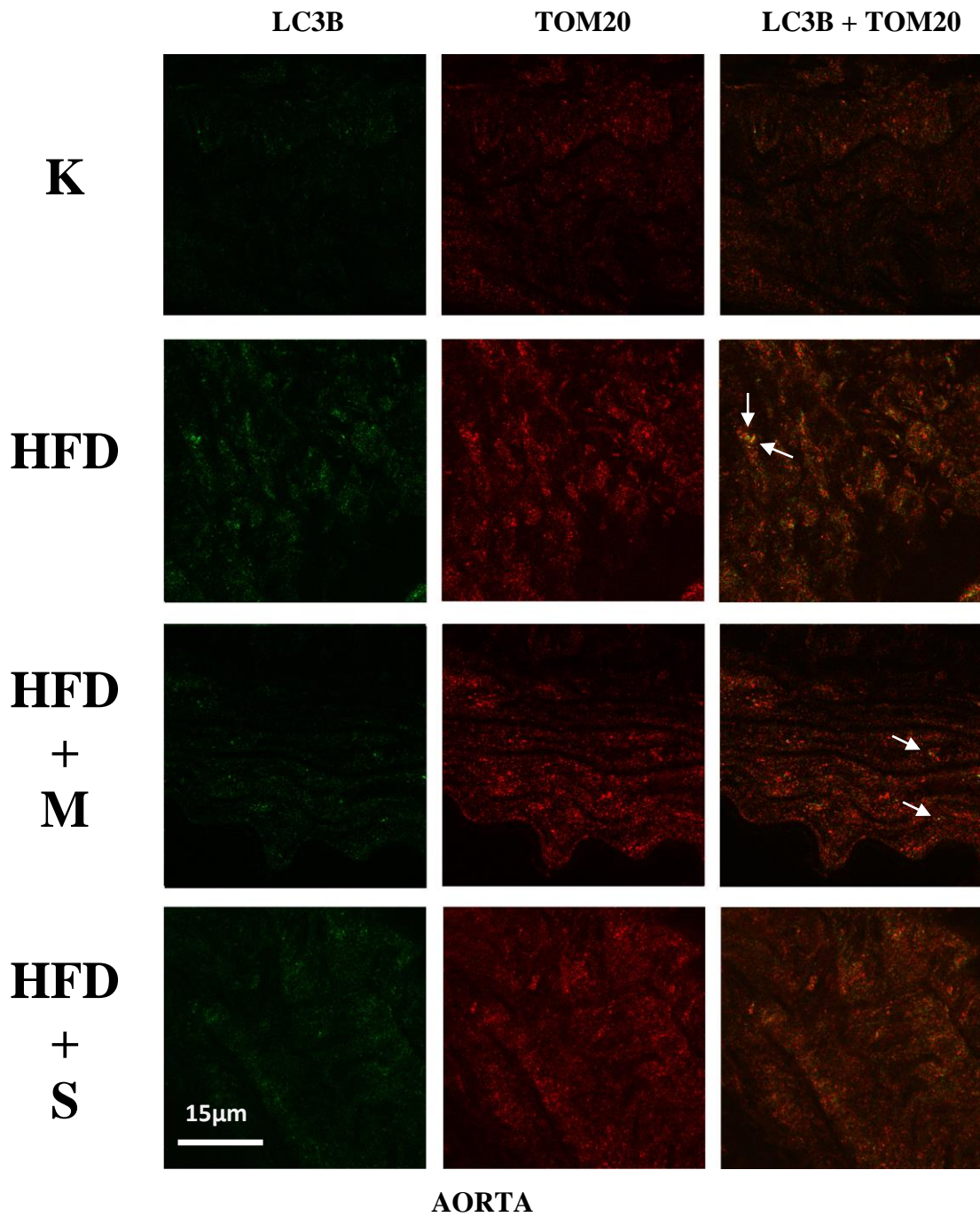


Slika 4.3.8 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i p62 (crveno) (x252). K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin. Strelice – žuta kolokalizacija LC3B i p62.

Na preparatima aorti u kojima su fluorescentnim antitelima bili obeleženi LC3B i TOM20 proteini i naknadnom morfometrijskom analizom kolokalizovanih punkta utvrđeno je da je kod HFD netretiranih miševa postojala statistički visoko značajna razlika u broju mitofaga u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,01$). Tretman HFD miševa metforminom nije uticao na broj mitofaga, dok je u aortama životinja kojima je davan simvastatin bilo statistički značajno manje mitofaga nego u aortama netretiranih HFD miševa ($p < 0,05$, Grafikon 4.3.2, Slika 4.3.9).



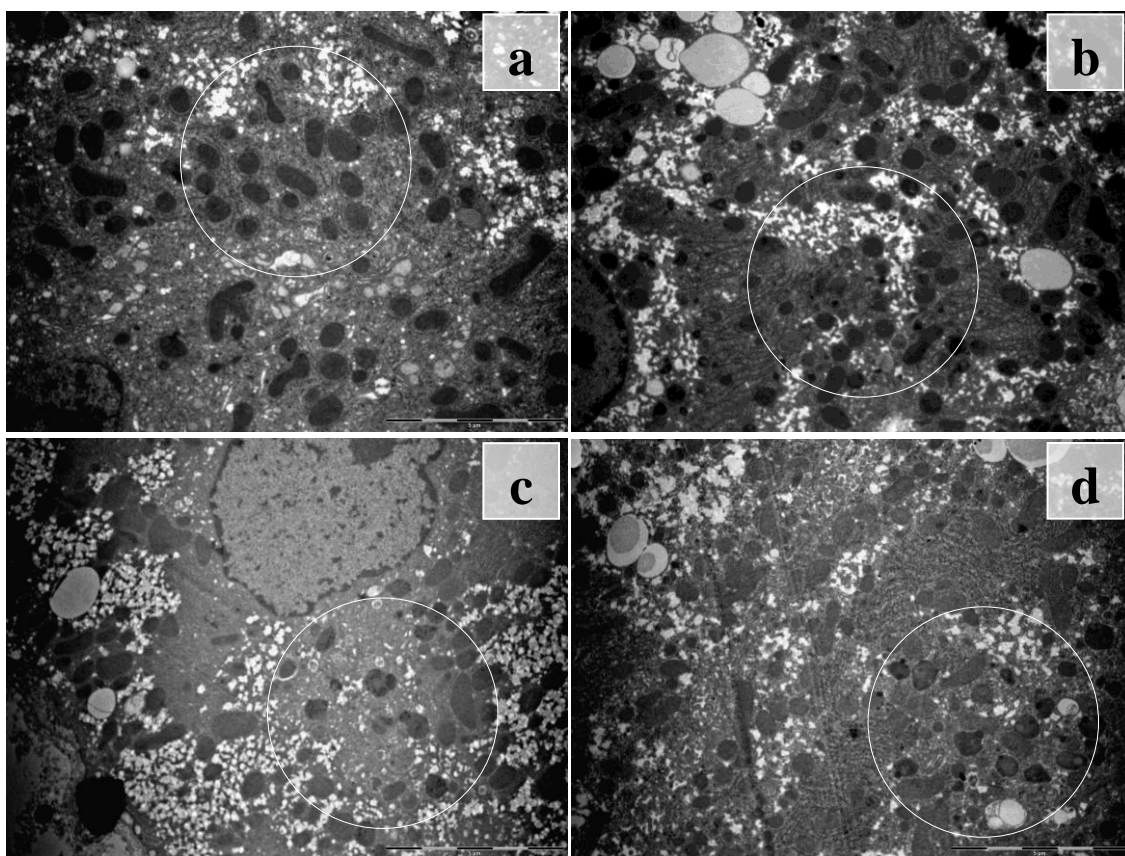
Grafikon 4.3.2 Rezultati morfometrijskih analiza uzoraka aorte C57BL/6J miševa na konfokalnom mikroskopu prikazani kao broj kolokalizovanih punkta. ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i # $p < 0,05$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.



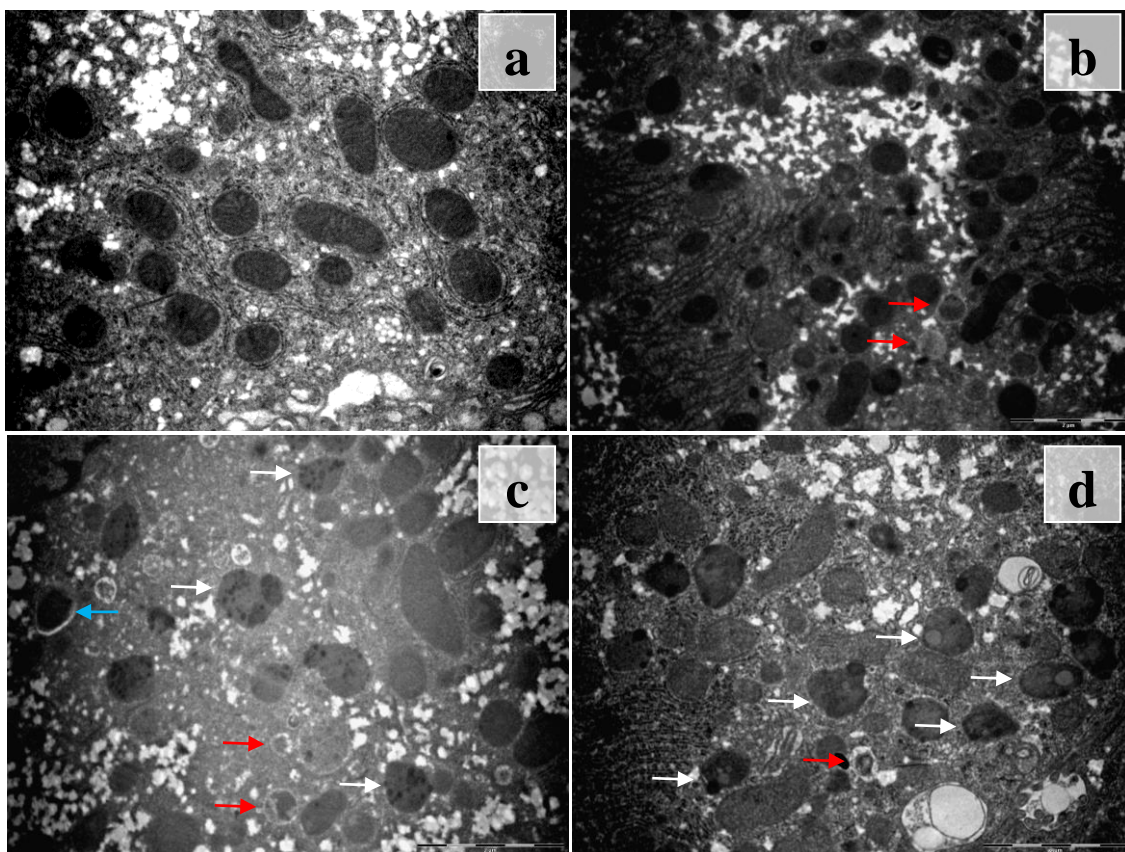
Slika 4.3.9 Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa preseka aorte C57BL/6J miševa obojenih imunofluorescentnim antitelima na LC3B (zeleno) i TOM20 (crveno) (x252). Strelice označavaju žuta punkta koja predstavljaju kolokalizaciju LC3B i TOM20 signala sa mesta u ćeliji gde se nalaze mitofazi. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

4.4. Analiza uzoraka transmisijom elektronskom mikroskopijom

Uzorci jetre, perifernog nerva i aorte analizirani su primenom transmisijom elektronske mikroskopije. Analizom ultrastrukturnih osobina hepatocita utvrđeno je da su nukleusi i organele izgledali uobičajeno, bez upadljivih ultrastrukturnih razlika među eksperimentalnim grupama životinja. Kod svih eksperimentalnih grupa na HFD režimu ishrane, za razliku od kontrolnih životinja, bio je vidljiv veći broj autofagijskih vakuola i lipidnih kapi u citoplazmi hepatocita (Slika 4.4.1 i 4.4.2).



Slika 4.4.1 Reprezentativne fotomikrografije hepatocita C57BL/6J miševa. U uzorcima uzetim od miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti vide se brojne masne kapi i autofagijske vakuole. Beli krugovi obeležavaju delove prikazane na većem uveličanju na slici 4.4.2 na sledećoj strani. (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom. (TEM, x5600)

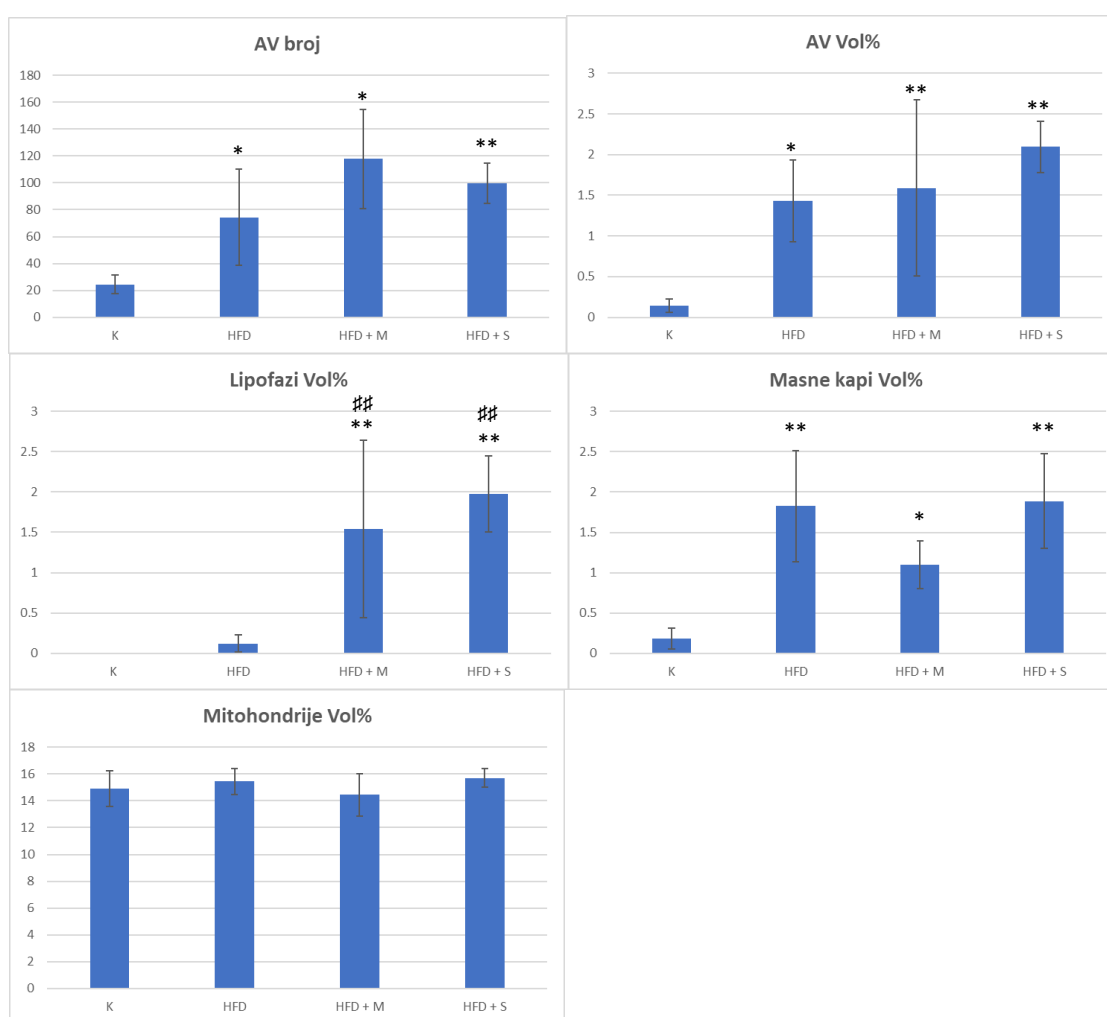


Slika 4.4.2 Detalji citoplazme hepatocita sa slike 4.4.1 C57BL/6J miševa. Crvene strelice – autofagijske vakuole. Bele strelice – autofagijske vakuole lipofazi. Plava strelica – fagofoza zahvata mitohondriju, na većem uveličanju na slici 4.4.3d. . (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom. (TEM, x11000)

Morfometrijskom analizom autofagijskih vakuola u citoplazmi hepatocita utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između kontrolne grupe životinja i netretiranih HFD miševa, odnosno statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) između kontrolne grupe životinja i HFD miševa tretiranih metforminom i simvastatinom u zapreminskom udelu autofagijskih vakuola (Grafikon 4.4.1).

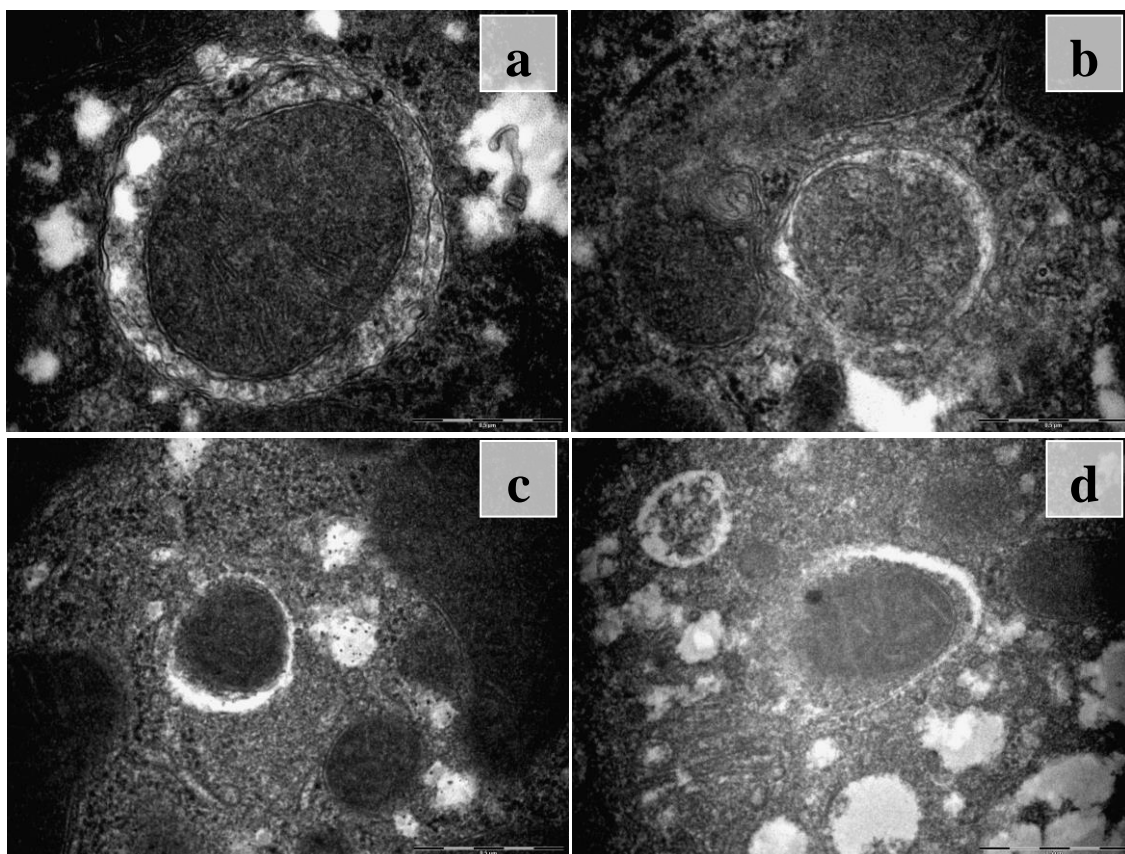
Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u broju autofagijskih vakuola u citoplazmi hepatocita bila je prisutna između kontrolne grupe i netretiranih HFD miševa, kao i između kontrolne grupe i HFD miševa tretiranih metforminom, dok je između kontrolne grupe i HFD miševa tretiranih simvastatinom postojala statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$). Između kontrolne grupe životinja i netretiranih HFD miševa, kao i između kontrolne grupe životinja i HFD miševa tretiranih simvastatinom bila je prisutna

statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u zapreminskom udelu lipidnih kapi u citoplazmi hepatocita, dok je između kontrolne grupe životinja i HFD miševa tretiranih metforminom razlika bila statistički visoko značajna ($p < 0,01$). Određivanje zapreminskog odnosa mitohondrija i citoplazme hepatocita pokazalo je da nema statistički značajne razlike u zapreminskom udelu mitohondrija u citoplazmi hepatocita između različitih eksperimentalnih grupa miševa (Grafikon 4.4.1).



Grafikon 4.4.1 Rezultati morfometrijskih analiza hepatocita C57BL/6J miševa na transmissionom elektronskom mikroskopu. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. AV – autofagijske vakuole, Vol% - zapreminski udeo u citoplazmi, K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

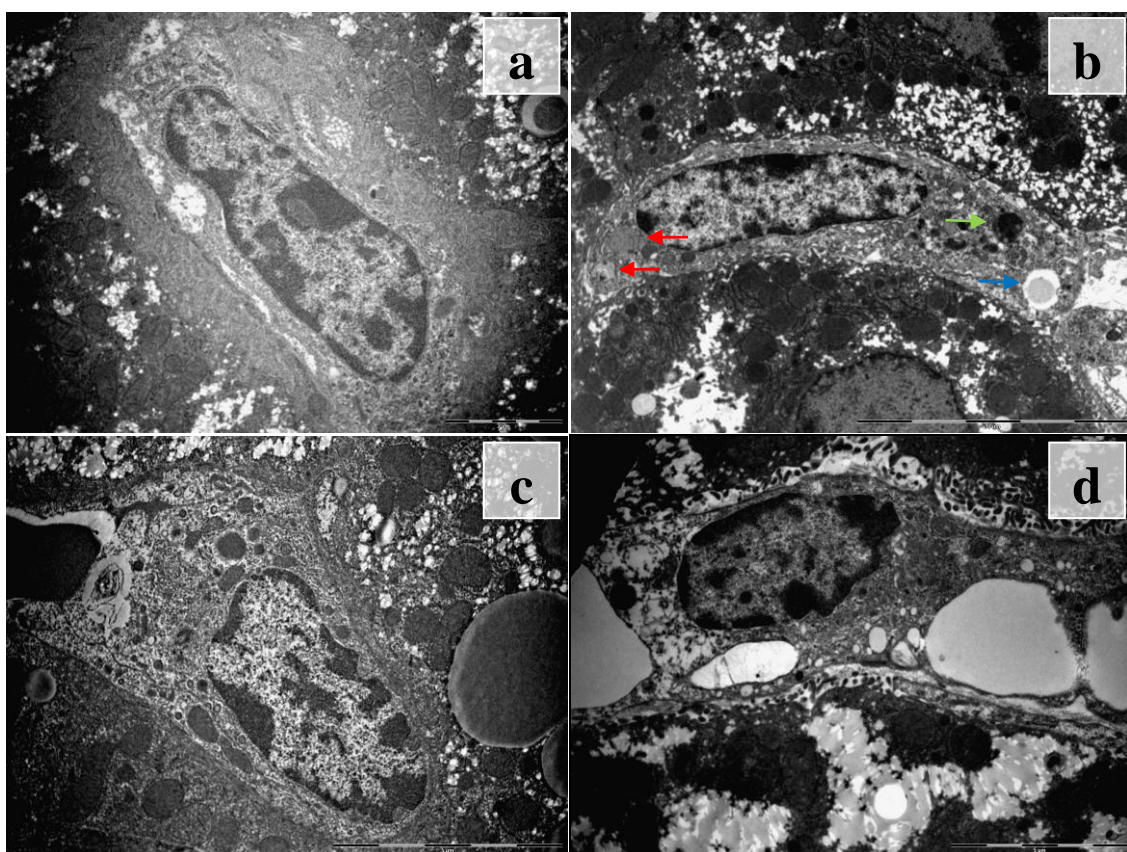
U uzorcima jetre ispitivanih životinja bilo je moguće detektovati manji broj autofagijskih vakuola koje su u svom lumenu sadržale mitohondrije ili sadržaj koji je podsećao na njihove ostatke (Slika 4.4.3). Procenjeno je da se ovakve strukture ipak ne javljaju dovoljno često i da nije racionalno sprovoditi njihovu morfometrijsku analizu na TEM-u.



Slika 4.4.3 Dobro očuvana (A) i delimično razgrađena mitohondrija (B) u autolizozomima hepatocita netretiranih HFD miševa. Mitohondrija u autofagozomu (C) i mitohondrija delimično obavijena izolacionom membranom (D) u citoplazmi hepatocita HFD miševa tretiranih metforminom (Detalj sa slike 4.4.2c) (TEM, x44000)

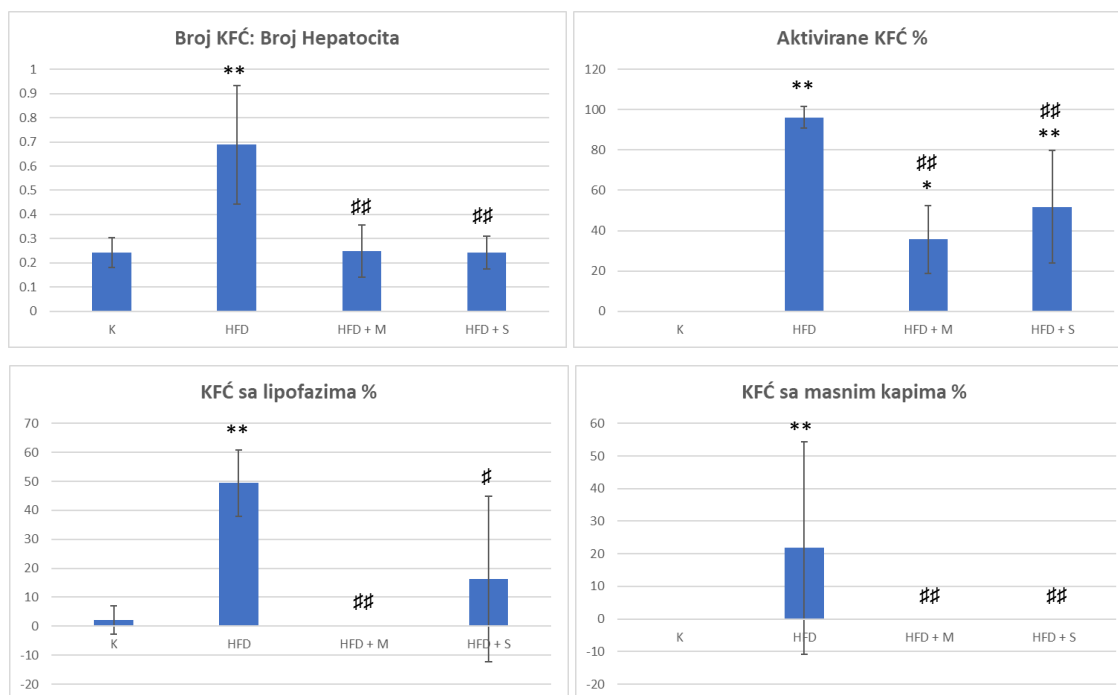
Morfometrijskom analizom je utvrđeno da postoji statistički visoko značajna razlika u odnosu broja Kupferovih ćelija i hepatocita ($p < 0,01$) u jetrama metforminom tretiranih HFD miševa u poređenju sa jetrama kontrolnih i HFD miševa tretiranih metforminom i simvastatinom. Na osnovu ultrastrukturnog izgleda i prisustva fagozoma utvrđivano je stanje aktivacije Kupferovih ćelija (Slika 4.4.4). Za razliku od kontrolne grupe, u kojoj nismo detektovali prisustvo aktiviranih Kupferovih ćelija, one su bile

prisutne kod HFD miševa. Postoji statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) u procentu aktiviranih Kupferovih ćelija između netretiranih i simvastatinom tretiranih HFD miševa i kontrolne grupe, kao i statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između metforminom tretiranih HFD miševa i kontrolne grupe. U poređenju sa netretiranim HFD miševima, u jetrama miševa tretiranih metforminom i simvastatinom procenat aktiviranih Kupferovih ćelija bio je manji, a razlike su bile statistički visoko značajne ($p < 0,01$) (Grafikon 4.4.2).

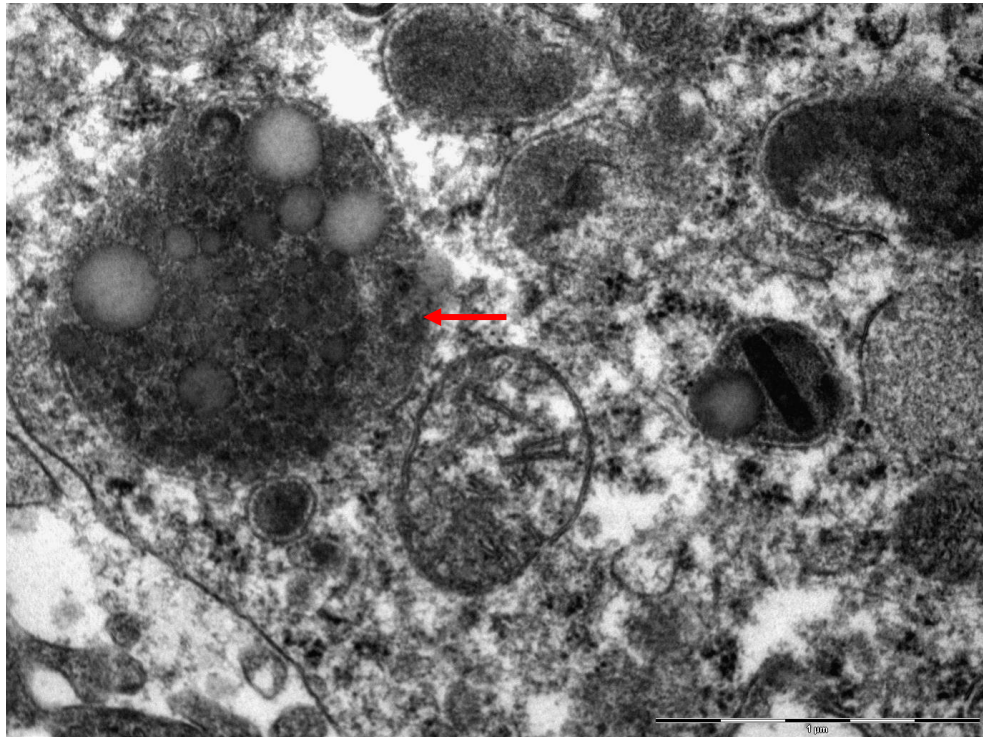


Slika 4.4.4 Reprezentativne fotomikrografije Kupferovih ćelija iz jetri C57BL/6J miševa. Crvene strelice – fagozomi. Zelena strelica – lipofag. Plava strelica – masna kap. (a) Kontrola (b) Netretirani HFD miševi (c) HFD miševi tretirani metforminom. (d) HFD miševi tretirani simvastatinom. (TEM, x5600)

Da bi smo procenili ulogu Kupferovih ćelija u metabolizmu masti, utvrđivali smo prisustvo lipofaga (autolizozoma u čijem lumenu su bile vidljive masne kapljice) (Slika 4.4.5) i masnih kapi u njihovoj citoplazmi. Postojala je statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) u procentu Kupferovih ćelija u čijoj citoplazmi su bili detektovani lipofazi i masne kapi između kontrolne grupe i netretiranih HFD miševa. Razlika u procentu Kupferovih ćelija u čijoj citoplazmi su bile detektovane masne kapi između netretiranih HFD miševa i HFD miševa tretiranih metforminom i simvastinom bila je statistički visoko značajna ($p < 0,01$). Postojala je statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) u procentu Kupferovih ćelija u čijoj citoplazmi su bile detektovani lipofazi između netretiranih HFD miševa i simvastatinom tretiranih HFD miševa i statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između netretiranih HFD miševa i metforminom tretiranih HFD miševa (Grafikon 4.4.2).



Grafikon 4.4.2 Rezultati morfometrijskih analiza Kupferovih ćelija u jetri C57BL/6J miševa na transmissionom elektronskom mikroskopu. ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom i # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u poređenju sa netretiranom HFD grupom miševa. % - procenat od ukupnog broja Kupferovih ćelija, K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin. KFC – Kupferove ćelije.

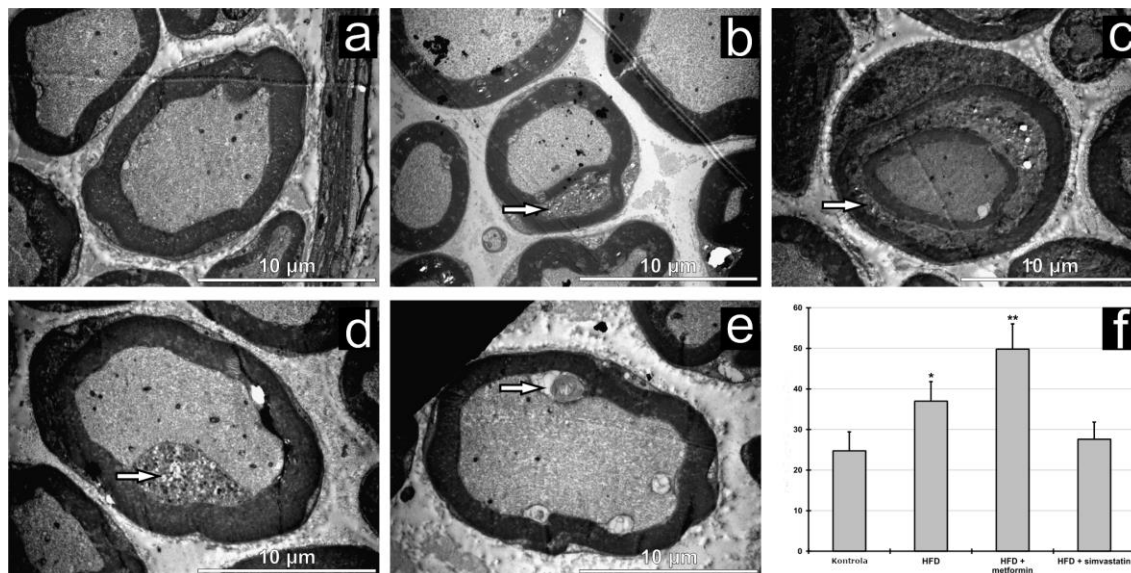


Slika 4.4.5 Fotomikrografija lipofaga u Kupferovoj ćeliji iz jetre Netretirani HFD miševa. Crvena strelica – lipofag.

Ultrastrukturne analize preparata perifernih nerava pokazale su da su u nervima sve četiri eksperimentalne grupe miševa bila prisutna kako neizmenjena mijelinizovana nervna vlakna tako i mijelinizovana vlakna sa različitim oštećenjima u mijelinskom omotaču. U kontrolnoj grupi životinja većina nervnih vlakana je bila bez znakova oštećenja (Slika 4.4.6a), iako je mali broj aksona bio obavijen mijelinskim omotačima sa određenim promenama u ultrastrukтури. U drugim grupama, oštećenja mijelinskog omotača su bila češće prisutna.

Jedna vrsta oštećenja se manifestovala kao široka pukotina u centralnim delovima mijelinskog omotača (Slika 4.4.6b). I sa unutrašnje i sa spoljašnje strane ovakvih pukotina su bile zone neoštećenog, kompaktnog mijelina. Povremeno smo mogli da uočimo kako ove oštećene zone u centralnom mijelinu prave pun krug oko aksona i unutrašnje zone neoštećenog mijelina (Slika 4.4.6c). Druga vrsta oštećenja se manifestovala kao široka struktura koja razdvaja mijelinski omotač od aksoplazme, sa

sadržajem koji je izgledao kao različit citoplazmatski materijal (Slika 4.4.6d), a povremeno su se mogle videti i mijelinske figure (Slika 4.4.6e).



Slika 4.4.6 Ultrastrukturalne karakteristike (a-e) i morfometrijska analiza (f) oštećenja mijelina u ishijadičnim nervima C57BL/6J miševa. (a) Očuvan mijelinski omotač kontrolnih miševa. (b) Pukotina u centralnom delu mijelinskog omotača (strelica). (c) Potpuno razdvajanje unutrašnjeg i spoljašnjeg dela mijelina (strelica). (d) Citoplazmatski materijal Švanove ćelije koji prominira ka aksoplazmi (strelica) (e) Mijelinska figura u dilatiranom unutrašnjem pojasu citoplazme Švanove ćelije (strelica). (TEM, x4400) (f) Procenat oštećenih mijelinizovanih vlakana. HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

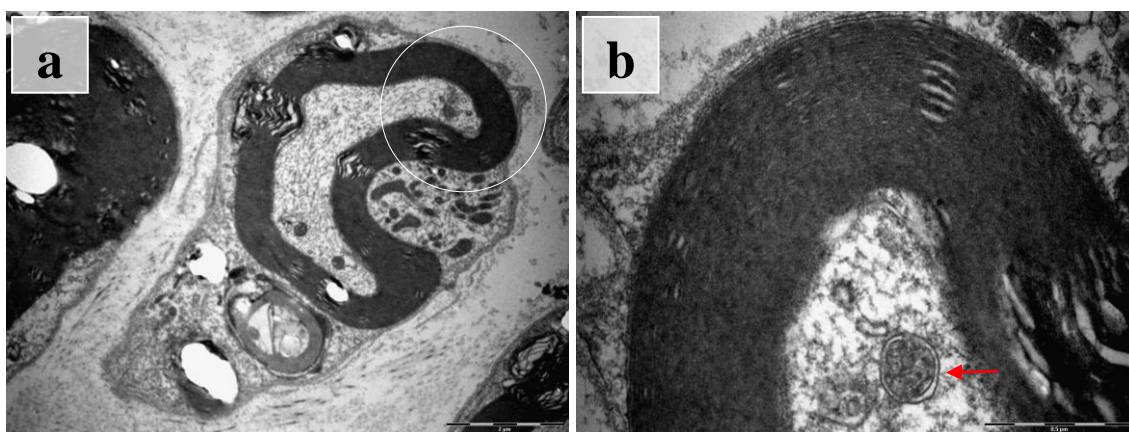
Netretirani miševi na režimu ishrane sa povećanim sadržajem masti su imali veći broj ovakvih ultrastrukturalno izmenjenih mijelinizovanih vlakana od kontrolnih miševa ($p < 0,05$). U uzorcima nerava miševa tretiranih metforminom i simvastatinom uočen je različit stepen oštećenja ultrastrukture mijelinizovanih vlakana. U uzorcima nerava miševa tretiranih metforminom detektovan je veći broj oštećenja mijelinizovanih vlakana u odnosu na netretirane HFD miševе, dok je broj oštećenih mijelinizovanih vlakana kod miševa tretiranih simvastatinom bio manji nego kod netretiranih HFD miševa. Razlika u broju oštećenih mijelinizovanih vlakana između metforminom tretiranih HFD miševa i kontrolnih i netretiranih HFD miševa je bila statistički visoko značajna ($p < 0,01$). Broj oštećenih mijelinizovanih vlakana u uzorcima nerava miševa tretiranih simvastatinom nije se statistički značajno razlikovao od broja oštećenih mijelinizovanih vlakana u kontrolnoj grupi miševa ($p = 0,83$) (Slika 4.4.6f).

Da bi smo procenili da li je oštećenje mijelina praćeno demijelinizacijom merili smo spoljašnje i unutrašnje dijemetre mijelinizovanih nervnih vlakana i računali G-odnos. U ovim parametrima nije bilo statistički značajne razlike između različitih eksperimentalnih grupa (Tabela 4.4.1).

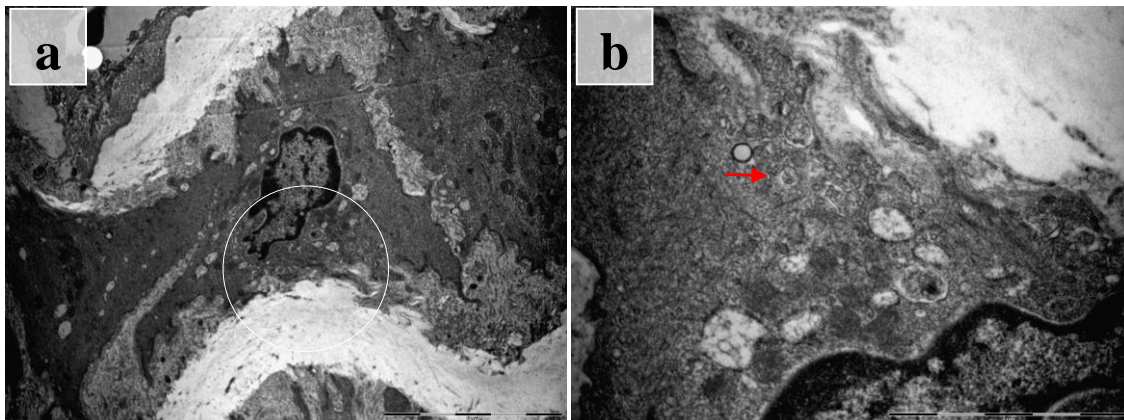
Tabela 4.4.1 Prikaz rezultata analize G-odnosa.

	Kontrola	HFD	HFD + M	HFD + S
G-odnos	0,580 ± 0,047	0,611 ± 0,011	0,577 ± 0,053	0,635 ± 0,011

U svim eksperimentalnim grupama aorte su bile normalnih ultrastrukturnih karakteristika sa jasno istaknutim elastičnim laminama između kojih su se nalazile glatke mišićne ćelije. Transmissionom elektronskom mikroskopijom uspeći smo da detektujemo prisustvo samo malog broja autofagijskih vakuola u preparatima nerava (Slika 4.4.7) i aorti (Slika 4.4.8), ali u njima nismo mogli da uočimo materijal za koji bi smo bili sigurni da vodi poreklo od mitohondrija.



Slika 4.4.7 Retke autofagijske vakuole u Švanovim ćelijama i aksoplazmi ishijadičnog nerva C57BL/6J miševa. Beli krug – deo slike 4.4.7a prikazan na većem uveličanju na slici 4.4.7b. Crvena strelica - autofagijska vakuola. (TEM, a: x 8900, b: x44000)



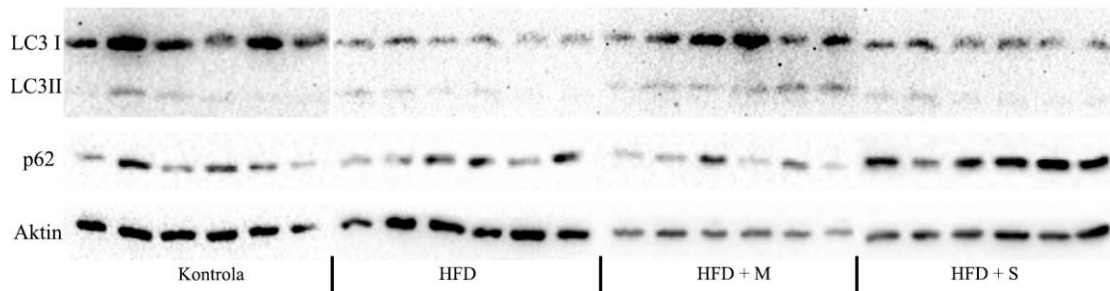
Slika 4.4.8 Retke autofagijske vakuole u glatkim mišićnim ćelijama zida aorte C57BL/6J miševa. Beli krug – deo slike 4.4.8a prikazan na većem uveličanju na slici 4.4.8b. Crvena strelica - autofagijska vakuola. (TEM, a: x5600, b: x18000)

4.5. Immunoblot analiza

Količine LC3-II i p62 u jetri ispitivanih životinja date su u tabeli 4.5.1. Postojala je statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$) u količini LC3-II između kontrolne i grupe životinja na HFD režimu ishrane. Tretman metforminom doveo je do statistički visoko značajnog porasta nivoa LC3-II kod HFD miševa ($p < 0,01$) (Slika 4.5.1), dok između simvastatinom tretiranih i netretiranih HFD miševa nije bilo statistički značajne razlike ($p = 0,77$). Postojala je statistički visoko značajna razlika između kontrolnih i HFD miševa tretiranih simvastatinom ($p < 0,01$). Nije bilo statistički značajne razlike u količini p62 u jetri između ispitivanih grupa miševa.

Tabela 4.5.1 Relativne količine proteina u jetri.

	Kontrola	HFD	HFD + M	HFD + S
LC3-II	$0,098 \pm 0,039$	$0,019 \pm 0,006^{**}$	$0,111 \pm 0,040$	$0,035 \pm 0,017^{**}$
p62	$0,377 \pm 0,378$	$0,133 \pm 0,089$	$0,14 \pm 0,102$	$0,331 \pm 0,129$



Slika 4.5.1 Imunoblot analiza količine LC3 i p62 proteina u jetri C57BL/6J miševa. K – kontrola, HFD – režim ishrane sa visokim sadržajem masti, M – metformin, S – simvastatin.

4.6. Određivanje nivoa ekspresije gena

Srednje vrednosti nivoa ekspresije gena uključenih u proces autofagije prikazane kao $2^{-\Delta C_t} \times 10^6$ date su tabeli. Nije utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa životinja u ekspresiji ovih gena.

Tabela 4.6.1 Vrednosti ekspresije gena uključenih u proces autofagije.

	Kontrola	HFD	HFD + M	HFD + S
ATG5	3,28 ± 2,14	3,53 ± 2,67	6,57 ± 0,68	3,57 ± 2,64
GABARAP	32,12 ± 21,40	57,21 ± 29,63	24,88 ± 5,52	31 ± 13,08
SQSTM1/p62	50,40 ± 24,99	89,22 ± 79,43	47,31 ± 23,18	55,04 ± 15,1
ATG7	3,33 ± 2,08	4,08 ± 1,72	3,31 ± 1,15	3,24 ± 1,12
ATG12	0,56 ± 0,43	11,23 ± 25,03	0,71 ± 0,25	0,54 ± 0,22
BECN	5,02 ± 1,88	6,54 ± 2,73	4,71 ± 1,43	4,28 ± 1,08
ATG4b	3,15 ± 1,08	3,74 ± 1,54	2,98 ± 0,89	2,11 ± 0,62

5. DISKUSIJA

U dosadašnjim istraživanjima bioloških procesa u dijabetesu tipa 2 i metaboličkom sindromu pažnja je bila usmerena na ispitivanje neselektivne autofagije, dok je istraživanje specifičnih oblika autofagije, pa i mitofagije, bilo manje zastupljeno. Ovo je lako razumeti s obzirom na značaj kakav jedan sveprisutni katabolički proces¹²⁷ kao što je autofagija može imati u bolestima čija patofiziološka osnova počiva na poremećajima metabolizma. Pored toga metode za proučavanje neselektivne autofagije su mnogo razvijenije i raznovrsnije od dostupnih metoda za proučavanje selektivnih oblika autofagije.¹⁰⁷ Ipak, imajući u vidu da najnovija istraživanja veliki značaj u razvoju metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2 pripisuju promenama metabolizma u mitohondrijama, poremećaju njihove funkcije i posledicama koje to može imati po ćelije^{96,128}, potrebno je razumeti i promene u homeostazi mitohondrija¹²⁹ pomoću kojih se ćelije adaptiraju na novonastale uslove. Neuspeh u adaptaciji ćelija, kao i u drugim slučajevima u medicini, dovodi do razvoja karakterističnih znakova i simptoma bolesti.

U našem istraživanju mitofagija je ispitivana na mišjem modelu u kome je korišćena dijeta sa visokim sadržajem masti. Početni koraci u ispitivanjima mitofagije u jetri kod glodara na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti napravljeni su razvojem novog mišjeg modela specifično dizajniranog za proučavanje mitofagije, transgenog miša za mt-Keima protein.^{109,110} S obzirom da Sun i saradnici nisu objavili koji soj miševa je korišćen za proizvodnju mt-Keima miša^{109,110}, ostaje nejasno da li se radi o modelu koji uspešno oponaša karakteristike metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2. Nedavno su objavljeni i rezultati Dethlefsen-a i saradnika u kojima se opisuju promene u mitofagiji kod C57BL/6J miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti i fruktoze, u kojima je pomoću imunoblota analizirana ekspresija proteina koji učestvuju u mitofagiji.¹³⁰ U ovim istraživanjima korišćeni su različiti režimi ishrane. Sun i saradnici su koristili hranu sa visokim sadržajem masti koja sadrži 42% kCal porekla iz mlečne masti, a Dethlefsen i saradnici hranu sa visokim sadržajem masti i

fruktoze. Iznenadjuće je da su u ovim istraživanjima dobijeni na prvi pogled suprotstavljeni rezultati, interpretirani od strane Suna i saradnika kao smanjenje mitofagije kod miševa hranjenih HFD-om¹⁰⁹, odnosno kao povećanje mitofagije u studiji Dethlefsen-a i saradnika kod miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti i fruktoze¹³⁰. U našim eksperimentima u grupi miševa netretiranoj lekovima koja je bila na HFD-u detektovali smo veći broj autofagijskih struktura koje sadrže mitohondrije, te na prvi pogled deluje da su naši rezultati saglasni sa zaključcima Dethlefsen-a i saradnika. Međutim, prilikom interpretacije rezultata eksperimenata u kojima se ispituje autofagija ili mitofagija potrebno je imati u vidu da bilo kakvo povećanje broja autofagijskih struktura ili količine proteina koji učestvuju u autofagiji (LC3, p62) može biti posledica kako indukcije autofagije, tako i njene blokade u kasnim stadijumima.¹⁰⁷ Na žalost, ispitivanja autofagije na živim organizmima su, za razliku od ispitivanja na kulturama ćelija, znatno otežana ograničenim mogućnostima za ispitivanje autofagijskog fluksa.¹⁰⁷ U radu sa kulturama ćelija, kod prividne aktivacije autofagije usled povećanja broja autofagozoma, autolizozoma i količine proteina koji učestvuju u autofagiji, sprovode se verifikacioni eksperimenti primenom supstanci kao što su hlorokvin ili bafilomicin, koje blokiraju terminalne faze autofagije, fuziju autofagozoma i lizozoma i/ili degradaciju u autolizozomima.¹⁰⁷ Tada se očekuje, ako je fluks zaista povećan, da dođe do dodatnog nakupljanja pomenutih elemenata.¹⁰⁷ Kako tehnike za ispitivanje autofagijskog fluksa *in vivo* još uvek nisu razvijene u meri u kojoj je to slučaj kada je u pitanju rad sa ćelijskim kulturama¹⁰⁷, o dobijenim rezultatima se često može zaključivati samo indirektno.

Povećan broj i zapreminski udeo autofagijskih vakuola u citoplazmi hepatocita i povećan broj LC3B/p62 i LC3B/LAMP1 kolokalizacijskih punta u jetri na konfokalnom mikroskopu, zajedno sa smanjenom količinom LC3-II proteina na imunoblotu, ukazuju na smanjenu indukciju i prisutnu blokadu kasnih faza autofagije u hepatocitima HFD miševa. U nedavnoj publikovanoj studiji takođe je detektovana blokada autofagije u ćelijama jetre u tip 2 dijabetesu.⁶⁷ Rezultati ove studije ukazuju da povećana koncentracija NO u hepatocitima C57BL/6J miševa koji su razvili insulinsku rezistenciju dovodi do nitrozilacije lizozomalnih proteaza i njihove deaktivacije.⁶⁷ To

znači da bi nakupljanje autofagijskih vakuola koje sadrže mitohondrije u našem eksperimentu kod HFD netretiranih miševa, kao i rezultati eksperimenata Dethlefsen-a i saradnika mogli da budu posledica blokade, a ne indukcije mitofagije. Nalazi kod mt-Keima miševa mogli bi se objasniti ako bi pored inaktivacije lizosomalnih enzima nitrozilacijom bilo poremećeno i zakišeljavanje lizozoma. U prilog tome govori nedavna studija u kojoj je primećeno da u limfocitima periferne krvi bolesnika sa dijabetesom tipa 2 postoji poremećaj zakišeljavanja lizozoma.¹³¹ S obzirom na osetljivost emisionog spektra Keima proteina na promene u pH^{109,110} defekti u zakišeljavanju lizozoma bi onemogućili identifikaciju mitohondrija u autolizozomima u ovom eksperimentalnom modelu.

Metformin i statini su lekovi koji se koriste u terapiji metaboličkog sindroma¹¹⁵ i tip 2 dijabetesa¹¹⁶ za regulaciju poremećaja u metabolizmu glukoze i holesterola. Kada je reč o ispitivanju efekata metformina i statina, po našim saznanjima do sada nema objavljenih podataka o uticaju ovih lekova na mitofagiju u jetri ni u životinjskim eksperimentalnim modelima za metabolički sindrom i dijabetes tipa 2, ni kod obolelih pacijenata. Metformin^{117,119} i statini^{121,122} deluju na biološke procese u mitohondrijama, pa je racionalno očekivati da bi mogli da utiču na funkcionalno stanje mitohondrija i njihovo uklanjanje mitofagijom u ovim oboljenjima.

Izostanak uticaja metformina, aktivatora autofagije¹³², na broj mitofaga kod životinja na HFD režimu ishrane mogao bi da bude povezan sa odvojenom regulacijom neselektivne autofagije i mitofagije, te da se tumači kao izostanak indukcije mitofagije u ovom modelu. Ipak, s obzirom na direktno dejstvo metformina na mitohondrije u smislu inhibicije respiratornog lanca¹¹⁹, kao i predloženo promovišuće dejstvo metformina na mitofagiju u hepatosteatozi¹³³, ne možemo da isključimo mogućnost da je kod HFD miševa u našem eksperimentu aktivacija mitofagije dostigla svoj maksimalni kapacitet i bez dodatnih stimulusa. Ukoliko pak u ispitivanom modelu postoji blokada mitofagije, to bi takođe moglo da objasni izostanak vidljivih efekata metformina. U svakom slučaju, povoljan uticaj metformina na regulaciju glukoze, opisan u rezultatima OGTT

testa, ne može se povezati sa promenama u posmatranim parametrima mitofagije kod ispitivanih životinja.

Smanjenje broja mitofaga u hepatocitima pod uticajem simvastatina moglo bi biti posledica otklanjanja postojećeg bloka u mitofagiji kod HFD miševa ili inhibicije prethodno aktivirane mitofagije. Prethodno objavljeni podaci govore o značaju indukcije mitofagije u kardioprotektivnim efektima¹³⁴ i prevenciji miopatije kao neželjenog efekta kod terapije statinima¹³⁵. Indukcija mitofagije može biti posledica oštećenja mitohondrija, a u različitim istraživanjima statinima su pripisivani kako korisni¹²² tako i štetni uticaji na ove organelle¹²¹. Iako u našoj studiji nisu primećene razlike u ultrastrukturnoj građi mitohondrija u hepatocitima netretiranih HFD miševa i HFD miševa tretiranih statinima, u odnosu na miševe hranjene standardnom dijetom, ne mogu se isključiti promene na mitohondrijama koje nisu morfološke prirode. Ukoliko HFD i metabolički poremećaji kod miševa dovode do oštećenja mitohondrija i usled toga do indukcije mitofagije, pad broja mitofaga u hepatocitima bi mogao da ukazuje na protektivne efekte simvastatina na mitohondrije. Kako se u nekim studijama smatra da poremećaji mitohondrija predstavljaju osnovu razvoja insulinske rezistencije⁹⁶, ovakav uticaj simvastatina bi se mogao dovesti u vezu sa nešto boljim rezultatima koje su životinje na simvastatinu u ovim eksperimentima imale na OGTT-u, odnosno sa većom osetljivošću na insulin HFD miševa tretiranih statinima, od netretiranih HFD miševa.

Postoji i mogućnost da simvastatin otklanja prethodno postojeći blok mitofagije kod HFD miševa. S obzirom da uklanjanje mitohondrija mitofagijom štiti ćelije od dejstva kiseoničkih slobodnih radikala koji se proizvode u oštećenim mitohondrijama¹³⁶, ovakav uticaj simvastatina bi takođe imao povoljno dejstvo na ćelije koje bi tada bile manje izložene oksidativnom stresu. Opisani efekat, kao i eventualni mitoprotektivni efekti, doprineo bi boljoj osetljivosti na insulin simvastatinom tretiranih životinja. Ipak, imajući u vidu da terapija simvastatinom nije smanjila ni broj ni zapreminski udeo autofagijskih vakuola u citoplazmi HFD miševa, kao ni broj LC3/LAMP1 i LC3/p62 kolokalizovanih punkta na konfokalnom mikroskopu, izgleda da simvastatin ipak ne utiče na eventualnu blokadu autofagije u ovom eksperimentalnom modelu. U tom

smislu ne izgleda verovatno da bi blok u mitofagiji mogao da postoji nezavisno od opšte blokade autofagije, pa smatramo da ovo ne predstavlja verovatni mehanizam delovanja simvastatina.

Ukoliko bi manji broj mitofaga kod simvastatinom tretiranih životinja bio rezultat inhibicije mitofagije, u okolnostima kada bi njeno neometano odvijanje predstavljalo zaštitni mehanizam, odnosno ako manji nivo mitofagije nije posledica boljeg funkcionalnog stanja i smanjenja oštećenja mitohondrija, tada bi hepatociti bili izloženi većem oksidativnom stresu, a simvastatin imao potencijalno štetne efekte po jetru. Međutim, smatramo da ovo takođe nije verovatna opcija, s obzirom na poboljšanu regulaciju nivoa glukoze u krvi na OGTT testu i izostanak pojave NASH kod HFD miševa koji su primali simvastatin.

Nepostojanje statistički značajne razlike u nivou ekspresije iRNK gena koji učestvuju u autofagiji u jetri moglo bi biti posledica suviše suptilnih razlika koje nisu mogle biti detektovane u ovom eksperimentalnom modelu na ispitivanom broju životinja, ali i činjenice da su za regulaciju autofagije osim regulacije transkripcije gena u velikoj meri zadužene i posttranslacione kovalentne modifikacije proteina koji učestvuju u autofagiji¹³⁷. Veći broj i zapreminski udeo autofagijskih vakuola u citoplazmi kod HFD miševa detektovan elektronskim mikroskopom i broj LC3/LAMP1 i LC3/p62 kolokalizovanih punkta na konfokalnom mikroskopu, mogao bi da bude posledica stimulacije i/ili blokade autofagije, pri čemu bi jedan od ova dva procesa mogao da dominira u pojedinim eksperimentalnim grupama. Tako pad u nivoima LC3-II proteina u jetri kod netretiranih HFD miševa i kod HFD miševa tretiranih simvastatinom ukazuje da postoji smanjena indukcija i blokada kasnih faza autofagije u hepatocitima. Povećanje količine LC3-II kod HFD miševa tretiranih metforminom do nivoa uporedivog sa vrednostima prisutnim kod kontrolnih životinja ukazuje na indukciju autofagije u ovoj eksperimentalnoj grupi, koja ipak nije uticala na već povećan broj autofagijskih vakuola kod HFD miševa. U svakom slučaju, s obzirom na razlike u uzrocima koji dovode do mitofagije i nespecifične autofagije, tj. oštećenja mitohondrija i promena u unutarćelijskim komunikacionim putevima koji signaliziraju

nedostatak hranjivih materija¹³⁸, smatramo da kod regulacije ova dva procesa ne mora uvek postojati uzročno-posledična povezanost.

Kada je reč o interpretaciji ostalih rezultata naših eksperimenata, pojava NAFLD i NASH kod miševa na režimu ishrane HFD-om, kao i povezanost promena u Kupferovim ćelijama sa razvojem NASH su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima drugih istraživača. Ranije je pokazano da je razvoj zapaljenskih promena u jetri kod miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti povezan sa aktivacijom Kupferovih ćelija⁷⁰, što je u skladu sa većim brojem Kupferovih ćelija i ultrastrukturnim karakteristikama ovih ćelija koje ukazuju na njihovu aktivaciju u jetri netretiranih HFD miševa, jedinoj grupi životinja koja je u našem istraživanju imala razvijene znakove (zapaljenski infiltrat) karakteristične za NASH. Takođe je nedavno utvrđeno da je holesterol u hrani ključni faktor koji kod miševa doprinosi razvoju NASH¹⁴. Naime, rezultati Wouters-a i saradnika su pokazali da se samo kod miševa koji su na režimu ishrane sa puno masti i holesterola (1% mase holesterola u hrani, HFC), a ne i kod miševa koji dobijaju hranu bogatu mastima bez holesterola, razvija NASH¹⁴. Hrana u našim eksperimentima obogaćena mastima poreklom iz svinjske masti sadržala je oko 0,3 % holesterola. Imajući ovo u vidu, smatramo da je moguće da je, osim bolje osetljivosti na insulin i efekata na mitofagiju, jedan od mogućih uzroka nepostojanja NASH kod simvastatinom tretiranih životinja inhibicija endogene sinteze holesterola simvastatinom. Osim toga, moguće je da u ovom efektu simvastatina određenu ulogu imaju i njegova druga poznata dejstva, nezavisna od inhibicije HMG-CoA reduktaze, kao što su antiinflamatorni i imunomodulatorni uticaji¹³⁹. Izostanak razvoja NASH kod grupe na metforminu je takođe u saglasnosti sa objavljenim rezultatima Woo-a i saradnika da metformin smanjuje inflamaciju u jetri kod C57BL/6J miševa na HFD-u identičnog sastava kao u našem istraživanju (60% kCal iz masti, svinjska mast)¹⁴⁰.

Izostanak promena u zapreminskom udelu mitohondrija izmedju različitih ispitivanih grupa u našem istraživanju ukazuje da promene u mitofagiji kod HFD miševa nisu bile praćene promenama u ukupnoj količini mitohondrija u hepatocitima. Moguće je da je zbog prisutnog bloka u mitofagiji proces uklanjanja mitohondrija

relativno neefikasan, ili da hepatociti uklanjanje mitohondrija kompenzuju povećanom mitohondrijalnom biogenezom, što bi mogla da bude tema budućih istraživanja.

Iako je zapreminski udeo masnih kapi u citoplazmi hepatocita bio povećan kod HFD miševa u odnosu na kontrole, bez statistički značajnih razlika između tretiranih i netretiranih grupa na HFD-u, veći broj lipofaga kod HFD miševa tretiranih metforminom i simvastatinom nego kod netretiranih HFD miševa ukazuje na potencijalno korisne efekte ovih lekova na metabolizam masti preko modulacije procesa autofagije. Sa druge strane, lipofazi i masne kapi u Kupferovim ćelijama su, za razliku od hepatocita, bili najviše prisutni kod netretiranih HFD miševa. Iako uzroci ovih razlika između hepatocita i Kupferovih ćelija ostaju nejasni, primamljivo je spekulirati da lošija regulacija metabolizma lipida u netretiranoj grupi HFD miševa dovodi do nakupljanja masnih kapi i indukcije lipofagije u Kupferovim ćelijama, što može biti povezano sa njihovom aktivacijom, razvojem insulinske rezistencije i pojavom NASH.

Histološke promene na perifernim nervima koje su bile manje izražene u grupi životinja tretiranih simvastatinom takođe ukazuju na povoljne efekte ovog leka u mišjem modelu metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2. Oštećenja mijelina koja su bila prisutna kod netretiranih HFD miševa i HFD miševa tretiranih metforminom, a u grupi tretiranoj simvastatinom smanjena na nivo koji je bio prisutan u kontrolnim životinjama, verovatno nisu posledica povoljnih efekata simvastatina na metabolizam glukoze, jer je metformin, koji je dodatno povećao oštećenje mijelinskog omotača, omogućio još bolju kontrolu glikemije na OGTT-u. Da metformin može da pogorša dijabetičnu neuropatiju poznato je od ranije¹⁴¹, dok su povoljni efekti simvastatina kod oštećenja mijelina prvi put pokazani u ovim istraživanjima i nedavno publikovani¹⁴². Takođe, izostanak demijelinizacije, sudeći po rezultatima analize G-odnosa kod mijelinizovanih nervnih vlakana, kao i nepostojanje zapaljenskog infiltrata u ishijadičnom nervu vodi nas do zaključka da ni promene u metabolizmu holesterola koji je neophodan za sintezu mijelina i remijelinizaciju¹⁴³ ni antiinflamatorno dejstvo statina¹³⁹ nisu imali važnu ulogu u njegovim neuroprotektivnim efektima. Na žalost, u perifernim nervima nismo uspeli da detektujemo prisustvo mitofaga metodama koje

smo imali na raspolaganju. Ovo svakako ne znači da se mitofagija u njima ne odvija, već da se odvija toliko retko da bi za njeno ispitivanje bilo potrebno koristiti još osjetljivije metode. Transmissionom elektronskom mikroskopijom smo uspeli pouzdano da identifikujemo samo mali broj autofagijskih vakuola, koje su bile vidljive i kao mesta kolokalizacionih punkta LC3B/LAMP1 i LC3B/p62 proteina na konfokalnom mikroskopu. Mali broj ovih punkta i njihovo podjednako prisustvo u svim ispitivanim grupama doveli su nas do zaključka da razlike u autofagiji verovatno nisu prisutne. Sličan rezultat dobijen imunofluorescentnim bojenjem LC3B i MBP proteina ukazuje da autofagija verovatno nema značajnu ulogu u uklanjanu oštećenog mijelina u ovom eksperimentalnom modelu, što po našim saznanjima do sada nije ni publikovano u literaturi.

Izostanak histoloških i ultrastrukturnih promena na aortama, uključujući nepostojanje aterosklerotskih promena kod HFD miševa, ukazuju na neadekvatnost ovog eksperimentalnog modela za ispitivanje aterosklerotskih i drugih promena koje se mogu javiti u zidu aorte. Za proučavanje ateroskleroze koriste se drugačiji životinjski modeli, kao što su miševi kojima nedostaju funkcionalni receptori za lipoproteine male gustine (LDL, engl. *low density lipoprotein*) ili za apolipoprotein E (ApoE).¹⁴⁴ Porast broja mitofaga u aortama HFD miševa i njegovo smanjenje na nivo viđen kod kontrolnih životinja posle tretmana simvastatinom, promene koje su detektovane i u hepatocitima, ukazuju da promene u mitofagiji do kojih dolazi pod uticajem ispitivanih lekova i režima ishrane verovatno nisu ograničene samo na tkivo jetre i da je moguće da imaju sistemski značaj.

Iako i terapija metforminom može dovesti do određenih neželjenih efekata, od kojih smo pogoršanje neuropatije dokumentovali u našim rezultatima, može se reći da je on lek prvog izbora za regulaciju nivoa glukoze u krvi u tip 2 dijabetesu¹⁴⁵. Za razliku od metformina, upotreba simvastatina u terapiji obolelih od dijabetesa tipa 2 praćena je određenim kontraverzama. Pored mogućih neželjenih efekata, od kojih je najčešći miopatija indukovana statinima, koja se pažljivim praćenjem pacijenata na terapiji može na vreme preduprediti¹³⁹, posebnu zabrinutost izazvali su rezultati studija koje su tvrdile

da se kod pacijenata na statinima, koji su ordinirani zbog povećanih vrednosti LDL holesterola u krvi, javlja nešto veći rizik od pojave dijabetesa tipa 2 kasnije u životu^{116,146,147}. Zbog ovoga postoji bojazan da bi upotreba statina u dijabetesu tipa 2 mogla da pogorša stanje osnovne bolesti.^{116,146,147} Ipak, trenutno postoji saglasnost da korist od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih protektivnih efekata statina kod dijabetičnih pacijenata koji imaju i poremećaj regulacije holesterola prevazilazi prethodno pomenute rizike.^{116,146,147} Neuroprotektivni efekti i moguća mitoprotektivna dejstva u hepatocitima, pokazana u našem istraživanju, predstavljaju dodatne argumente koji govore u prilog sadašnjeg konsenzusa o upotrebi statina u dijabetesu tipa 2.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Režim ishrane sa visokim sadržajem masti dovodi do povećanja broja mitofaga u hepatocitima miševa usled blokade kasnih faza autofagije i mitofagije. Razvoj nealkoholnog steatohepatitisa kod miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti povezan je sa aktivacijom i povećanjem broja Kupferovih ćelija. Ishrana sa visokim sadržajem masti dovodi do ultrastrukturnih oštećenja mijelina u perifernim nervima.
- Simvastatin dovodi do smanjenja broja mitofaga u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti koji nije posledica uklanjanja bloka u kasnim fazama autofagije. Metformin ne utiče na broj mitofaga u jetri miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti. Simvastatin i metformin dovode do smanjene aktivacije Kupferovih ćelija i prevencije nealkoholnog steatohepatitisa kod životinja na ishrani sa visokim sadržajem masti. Simvastatin ima neuroprotektivni efekat i dovodi do smanjenja ultrastrukturnih oštećenja mijelina u perifernim nervima miševa na ishrani sa visokim sadržajem masti, dok tretman metforminom povećava postojeće oštećenje mijelina u perifernim nervima.

7. LITERATURA

1. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev.* 2015; 16: 1-12.
2. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the international diabetes federation among adults in the U.S. *Diabetes Care.* 2005; 28: 2745–2749.
3. Sone H, Yamada N, Yamashita H, Katayama S, Akanuma Y. Prevalence and incidence of diabetic microangiopathy in Japan. *Nippon Rinsho.* 2005; 63(Suppl 6): 18–22.
4. Bremer AA, Mietus-Snyder M, Lustig RH. Toward a unifying hypothesis of metabolic syndrome. *Pediatrics.* 2012; 129: 557-570.
5. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014; 383: 1068-1083.
6. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon).* 2014; 42: 698-702.
7. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018; 41(Suppl 1): S13-S27.
8. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 19ed. McGraw-Hill, New York; 2017.
9. Goldberg RB, Mather K. Targeting the consequences of the metabolic syndrome in the Diabetes Prevention Program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2077-2090.
10. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 351982.
11. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 1988; 37: 1163-1167.
12. Xu L, Tang D, Guan M, Xie C, Xue Y. Effect of high-fat diet on peripheral neuropathy in C57BL/6 mice. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 305205.
13. Glastras SJ, Chen H, Teh R, McGrath RT, Chen J, Pollock CA, Wong MG, Saad S. Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *PLoS One.* 2016; 11 :e0162131.
14. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D, Kerksiek A, van Kruchten R, Maeda N, Staels B, van Bilsen M, Shiri-Sverdlov R, Hofker

- MH. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008; 48: 474-486.
15. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L, Conget P. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013; 8: e60931.
 16. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006; 36: 485-501.
 17. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010; 90: 1383-1435.
 18. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012; 22: 407-417.
 19. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1125-1136.
 20. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 2011; 7: 673-682.
 21. Uytterhoeven V, Lauwers E, Maes I, Miskiewicz K, Melo MN, Swerts J, Kuenen S, Wittocx R, Corthout N, Marrink SJ, Munck S, Verstreken P. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron*. 2015; 88: 735-748.
 22. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*. 2011; 20: 131-139.
 23. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 931-937.
 24. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*. 2005; 1: 1-10.
 25. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. 2003; 5: 539-545.
 26. Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1997; 179: 1068-1076.

27. Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1997; 192: 245-250.
28. Motley AM, Nuttall JM, Hettema EH. Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2012; 31: 2852-2868.
29. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010; 330: 1344-1348.
30. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011; 7: 279-296.
31. Jin M, Liu X, Klionsky DJ. SnapShot: selective autophagy. *Cell*. 2013; 152: 368-368.
32. Nakatogawa H, Mochida K. Reticulophagy and nucleophagy: new findings and unsolved issues. *Autophagy*. 2015; 11: 2377-2378.
33. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013; 20: 31-42.
34. An H, Harper JW. Systematic analysis of ribophagy in human cells reveals bystander flux during selective autophagy. *Nat Cell Biol*. 2018; 20: 135-143.
35. Hutchins MU, Veenhuis M, Klionsky DJ. Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci*. 1999; 112: 4079-4087.
36. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*. 2018; 20: 233-242.
37. Colombo MI, Gutierrez MG, Romano PS. The two faces of autophagy: *Coxiella* and *Mycobacterium*. *Autophagy*. 2006; 2: 162-164.
38. Gomes LC, Dikic I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol Cell*. 2014; 54: 224-233.
39. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*. 2017; 61: 585-596.
40. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*. 2016; 428: 1714-1724.
41. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214-226.
42. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009; 43: 67-93.

43. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005; 121: 179-193.
44. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 132-141.
45. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*. 2013; 152: 290-303.
46. Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*. 2013; 23: 301-309.
47. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018; 104: 485-495.
48. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999; 402: 672-676.
49. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 1999; 59: 59-65.
50. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1809-1820.
51. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 15077-15082.
52. Nah J, Yuan J, Jung YK. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol Cells*. 2015; 38: 381-389.
53. Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852: 243-251.
54. Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2017; 176: 55-62.
55. Ryter SW, Koo JK, Choi AM. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014; 17: 329-337.
56. Mazza S, Maffucci T. Autophagy and pancreatic β -cells. *Vitam Horm*. 2014; 95: 145-164.

57. Zhang Q, Li Y, Liang T, Lu X, Zhang C, Liu X, Jiang X, Martin RC, Cheng M, Cai L. ER stress and autophagy dysfunction contribute to fatty liver in diabetic mice. *Int J Biol Sci.* 2015; 11: 559-568.
58. Kosacka J, Kern M, Klötting N, Paeschke S, Rudich A, Haim Y, Gericke M, Serke H, Stumvoll M, Bechmann I, Nowicki M, Blüher M. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 409: 21-32.
59. Kruse R, Vind BF, Petersson SJ, Kristensen JM, Højlund K. Markers of autophagy are adapted to hyperglycaemia in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2015; 58: 2087-2095.
60. Son SM. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. *Diabetes Metab J.* 2012; 36: 190-198.
61. Graham EJ, Adler FR. Long-term models of oxidative stress and mitochondrial damage in insulin resistance progression. *J Theor Biol.* 2014; 340: 238-250.
62. Henique C, Mansouri A, Fumey G, Lenoir V, Girard J, Bouillaud F, Prip-Buus C, Cohen I. Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2010; 285: 36818-36827.
63. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. *Eur J Nutr.* 2016; 55: 1-6.
64. GR García-Ruiz C, Baulies A, Mari M, García-Rovés PM, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence? *Free Radic Res.* 2013; 47: 854-68.
65. Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J.* 2009; 417: 183-193.
66. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009 May 29;284(22):14809-18.
67. Qian Q, Zhang Z, Orwig A, Chen S, Ding WX, Xu Y, Kunz RC, Lind NRL, Stamler JS, Yang L. S-Nitrosoglutathione Reductase Dysfunction Contributes to Obesity-Associated Hepatic Insulin Resistance via Regulating Autophagy. *Diabetes.* 2018; 67: 193-207.
68. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol.* 2009; 51: 212-223.

69. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol.* 2015; 7: 2184-2188.
70. Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298: G107-116.
71. Mayoral Monibas R, Johnson AM, Osborn O, Traves PG, Mahata SK. Distinct Hepatic Macrophage Populations in Lean and Obese Mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016; 7: 152.
72. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 9-14.
73. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010; 8: e1000298.
74. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015; 524: 309-314.
75. Dikic I, Bremm A. DUBs counteract parkin for efficient mitophagy. *EMBO J.* 2014; 33: 2442-2443.
76. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2014; 16: 495-501.
77. Kongara S, Karantza V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Front Oncol* 2012; 2: 171.
78. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 2015; 85: 257-273.
79. Cesari R, Martin ES, Calin GA, Pentimalli F, Bichi R, McAdams H, Trapasso F, Drusco A, Shimizu M, Masciullo V, D'Andrilli G, Scambia G, Picchio MC, Alder H, Godwin AK, Croce CM. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 5956-5961.
80. Picchio MC, Martin ES, Cesari R, Calin GA, Yendamuri S, Kuroki T, Pentimalli F, Sarti M, Yoder K, Kaiser LR, Fishel R, Croce CM. Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2720-2724.
81. Wang F, Denison S, Lai JP, Philips LA, Montoya D, Kock N, Schüle B, Klein C, Shridhar V, Roberts LR, Smith DI. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 40: 85-96.

82. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008; 27: 6002-6011.
83. Pouligiannis G, McIntyre RE, Dimitriadi M, Apps JR, Wilson CH, Ichimura K, Luo F, Cantley LC, Wyllie AH, Adams DJ, Arends MJ. PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15145-15150.
84. Hara H, Kuwano K, Araya J. Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*. 2018; 7. pii: E86.
85. Malsin ES, Kamp DW. The mitochondria in lung fibrosis: friend or foe? *Transl Res*. 2018 J. pii: S1931-5244(18)30088-4.
86. Evans CS, Holzbaur ELF. Autophagy and mitophagy in ALS. *Neurobiol Dis*. 2018. pii: S0969-9961(18)30214-6.
87. Zhao Y, Huang 2, Liu J, Wu X, Zhou S, Dai K, Kou Y. Mitophagy Contributes to the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *Inflammation*. 2018 Jun 30. [Epub ahead of print]
88. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 872-884.
89. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 2008; 27: 433-446.
90. Yoo SM, Jung YK. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol Cells*. 2018; 41: 18-26.
91. Carelli V, Maresca A, Caporali L, Trifunov S, Zanna C, Rugolo M. Mitochondria: Biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 63: 21-24.
92. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015; 282: 647-672.
93. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol*. 2017; 11: 637-645.
94. Bhansali S, Bhansali A, Walia R, Saikia UN, Dhawan V. Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 347.

95. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2018; 39: 489-517.
96. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8: 92-103.
97. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 8713-8742.
98. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2014 ; 510: 84-91.
99. Satapati S, Kucejova B, Duarte JA, Fletcher JA, Reynolds L, Sunny NE, He T, Nair LA, Livingston KA, Fu X, Merritt ME, Sherry AD, Malloy CR, Shelton JM, Lambert J, Parks EJ, Corbin I, Magnuson MA, Browning JD, Burgess SC. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest.* 2015; 125: 4447-4462.
100. Marchetti P, Bugliani M, Boggi U, Masini M, Marselli L. The pancreatic beta cells in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 771: 288-309.
101. Jolivald CG, Frizzi KE, Guernsey L, Marquez A, Ochoa J, Rodriguez M, Calcutt NA. Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016; 6: 223-255.
102. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Stansberry KB, Scanelli JA, Pittenger GL. Dermal neurovascular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24: 1468-1475.
103. Winer N, Sowers JR. Diabetes and arterial stiffening. *Adv Cardiol.* 2007; 44: 245-251.
104. Nosadini R. Hypertension and renal complications in type 2 diabetes. *Semin Vasc Med.* 2002; 2: 109-119.
105. Katsuda Y, Ohta T, Miyajima K, Kemmochi Y, Sasase T, Tong B, Shinohara M, Yamada T. Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Exp Anim.* 2014 ;63: 121-132.
106. Loud AV. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol.* 1968; 37: 27-46.
107. Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12: 1-222.
108. Durcan TM, Fon EA. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes Dev.* 2015; 29: 989-999.

109. Sun N, Yun J, Liu J, Malide D, Liu C, Rovira II, Holmström KM, Fergusson MM, Yoo YH, Combs CA, Finkel T. Measuring In Vivo Mitophagy. *Mol Cell*. 2015; 60: 685-696.
110. Sun N, Malide D, Liu J, Rovira II, Combs CA, Finkel T. A fluorescence-based imaging method to measure in vitro and in vivo mitophagy using mt-Keima. *Nat Protoc*. 2017; 12: 1576-1587.
111. McWilliams TG, Prescott AR, Allen GF, Tamjar J, Munson MJ, Thomson C, Muqit MM, Ganley IG. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J Cell Biol*. 2016; 214: 333-345.
112. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012; 393: 547-564.
113. Zhu J, Dagda RK, Chu CT. Monitoring mitophagy in neuronal cell cultures. *Methods Mol Biol*. 2011; 793: 325-339.
114. Chen L, Ma K, Han J, Chen Q, Zhu Y. Monitoring Mitophagy in Mammalian Cells. *Methods Enzymol*. 2017; 588: 187-208.
115. Lim S, Eckel RH. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014; 15: 329-341.
116. van Stee MF, de Graaf AA, Groen AK. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17: 94.
117. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122: 253-270.
118. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014; 10: 143-156.
119. Hur KY, Lee MS. New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig*. 2015; 6: 600-609.
120. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl*. 2003; 4: 3-8.
121. Ramachandran R, Wierzbicki AS. Statins, Muscle Disease and Mitochondria. *J Clin Med*. 2017;6. pii: E75.
122. Parihar A, Parihar MS, Zenebe WJ, Ghafourifar P. Statins lower calcium-induced oxidative stress in isolated mitochondria. *Hum Exp Toxicol*. 2012; 31: 355-363.
123. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. Bancroft's theory and practice of histology techniques. 7ed. Churchill Livingstone, Elsevier 2012; 173-186.

124. Lucocq JM, Hacker C. Cutting a fine figure: On the use of thin sections in electron microscopy to quantify autophagy. *Autophagy*. 2013; 9: 1443-1448.
125. Brösamle C, Schwab ME. Ipsilateral, ventral corticospinal tract of the adult rat: ultrastructure, myelination and synaptic connections. *J Neurocytol*. 2000; 29: 499-507.
126. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
127. Kohli L, Roth KA. Autophagy: cerebral home cooking. *Am J Pathol*. 2010; 176: 1065-1071.
128. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, Herder C, Carstensen M, Krausch M, Knoefel WT, Schlensak M, Roden M. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015; 21: 739-746.
129. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol*. 2014; 56: 182-188.
130. Dethlefsen MM, Kristensen CM, Tøndering AS, Lassen SB, Ringholm S, Pilegaard H. Impact of liver PGC-1 α on exercise and exercise training-induced regulation of hepatic autophagy and mitophagy in mice on HFF. *Physiol Rep*. 2018; 6: e13731.
131. Martinovic T. Ultrastructural alterations in peripheral blood lymphocytes in type 2 diabetes patients. Doctoral Dissertation. Belgrade, 2018.
132. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol*. 2015; 89: 437-450.
133. Song YM, Lee WK, Lee YH, Kang ES, Cha BS, Lee BW. Metformin Restores Parkin-Mediated Mitophagy, Suppressed by Cytosolic p53. *Int J Mol Sci*. 2016; 17. pii: E122.
134. Andres AM, Hernandez G, Lee P, Huang C, Ratliff EP, Sin J, Thornton CA, Damasco MV, Gottlieb RA. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21: 1960-1973.
135. Andres A, Ramesh M, Campos J, Hernandez G, Lee P, Tucker K, Islam M, Gurney M, Linton PJ, Gottlieb R. Attenuation of Mitophagy Exacerbates the Deleterious Effects of Statins on Skeletal Muscle. *FASEB J*. 2017; 31(1_supplement): 1022.17.
136. Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive

- oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem.* 2012; 287: 3265-3272.
137. Botti-Millet J, Nascimbeni AC, Dupont N, Morel E, Codogno P. Fine-tuning autophagy: from transcriptional to posttranslational regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016; 311: C351-C362.
 138. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 2015; 22: 377-388.
 139. Grover HS, Luthra S, Maroo S. Are statins really wonder drugs? *J Formos Med Assoc.* 2014; 113 : 892-898.
 140. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, Guo X, Guo T, Botchlett R, Qi T, Pei Y, Zheng J, Xu Y, An X, Chen L, Chen L, Li Q, Xiao X, Huo Y, Wu C. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PLoS One.* 2014; 9: e91111.
 141. Wile DJ, Toth C. Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 2010; 33: 156-161.
 142. Ciric D, Martinovic T, Petricevic S, Trajkovic V, Bumbasirevic V, Kravic-Stevovic T. Metformin exacerbates and simvastatin attenuates myelin damage in high fat diet-fed C57BL/6 J mice. *Neuropathology.* 2018; 38: 468-474.
 143. Berghoff SA, Gerndt N, Winchenbach J, Stumpf SK, Hosang L, Odoardi F, Ruhwedel T, Böhler C, Barrette B, Stassart R, Liebetanz D, Dibaj P, Möbius W, Edgar JM, Saher G1. Dietary cholesterol promotes repair of demyelinated lesions in the adult brain. *Nat Commun.* 2017; 8: 14241.
 144. Getz GS, Reardon CA. Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research. *Methods Mol Biol.* 2015; 1339: 1-16.
 145. American Diabetes Association. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018; 41(Suppl 1): S73-S85.
 146. Agouridis AP, Kostapanos MS, Elisaf MS. Statins and their increased risk of inducing diabetes. *Expert Opin Drug Saf.* 2015; 14: 1835-1844.
 147. Robinson JG. Statins and diabetes risk: how real is it and what are the mechanisms? *Curr Opin Lipidol.* 2015; 26 :228-235.

BIOGRAFIJA

Darko Ćirić rođen je u Beogradu, 1982. Diplomirao je 2010. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,43. Od 2003. do 2006. godine bio je student demonstrator na predmetu histologija i embriologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a od 2004. do 2006. godine i moderator na histološkom forumu Retikulum. 2003/2004 godine bio je student demonstrator na predmetu biohemija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Završio je specijalističke akademske studije pod mentorstvom prof. Tamare Kravić-Stevović 2013. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, modul Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija i embriologija sa prosečnom ocenom 9,73 i završnim specijalističkim akademskim radom "Molekularni mehanizmi i ultrastrukturne karakteristike autofagije u malignim ćelijama".

Doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu upisao je 2013. godine.

Na Institutu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu radi od 2012. godine, trenutno u zvanju asistenta.

Angažovan je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III 41025 "Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski bilans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja".

Dr Darko Ćirić je 2014. bio na jednomesečnom usavršavanju u Hamburgu u Centru za molekularnu neurobiologiju (ZMNH) Univerzitetske klinike Ependorf radi učenja tehnika rada sa kulturama ćelija, transfekcije ćelija, imunoblota i koimunoprecipitacije.

Član je Udruženja patologa i citologa Srbije, Evropskog udruženja patologa, Srpskog društva za mikroskopiju i Evropskog društva za mikroskopiju.

Koautor je 10 radova sa SCI liste. Učesnik je brojnih stranih i domaćih kongresa, na kojima prezentovalo rezultate u vidu 18 izvoda. Dobitnik je jedne stipendije za učešće na međunarodnim skupovima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Darko Ćirić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 27.12.2018.

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Darko Ćirić

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada „Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti“

Mentor van. prof. dr Tamara Kravić-Stevović

Potpisani Darko Ćirić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.12.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uticaj metformina i simvastatina na mitofagiju u hepatocitima miševa na režimu ishrane sa visokim sadržajem masti“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.12.2018.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.